



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Aislamiento y caracterización**  
**de bacterias halófilas**  
**degradadoras de hidrocarburos**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

PRESENTA:

I.B.I. Dayanira S. Paniagua Meza

Tutor: Rafael Vázquez Duhalt



Cuernavaca, Mor.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

***A los grandes pilares de mi vida,  
mi fortaleza, mis grandes maestros...***

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael Vázquez, por confiar en mí, por su dedicación, por todas sus enseñanzas, por permitirme formar parte de su grupo y por todo su apoyo.

A la Dra. Sylvie Le Borgne por su paciencia, enseñanza y apoyo.

Al Dr. Mariano Gutiérrez por participar en mi comité, por todas sus sugerencias y observaciones oportunas, por la dedicación y el gran apoyo.

Al jurado revisor de la tesis: Dra. Guadalupe Spin, Dra. Katy Juarez, Dra. Refujio Rodriguez y Dra. Maria Trejo, por sus críticas, comentarios y sugerencias.

A mis padres por su amor, comprensión, su enorme paciencia y sobre todo por su infinito apoyo en todas mis decisiones.

A Beto y Montse por ser mas que mis hermanos, mis mejores amigos y acompañarme y apoyarme durante todo mi camino.

A mis viejos amigos que siempre están al pendiente y cerca de mí, aunque estemos lejos.

A mis nuevos amigos, Marce, Lu, Rosita, Karla, Pich, Chinitos y Barbas por su amistad y apoyo, por escucharme y alentarme cuando el trayecto se hacia pesado.

# INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>2. GENERALIDADES</b>	<b>7</b>
<b>2.1. BACTERIAS HALÓFILAS</b>	<b>7</b>
2.1.1. <i>AMBIENTES HIPERSALINOS</i>	7
2.1.2. <i>MECANISMOS HALOADAPTATIVOS</i>	7
2.1.3. <i>CLASIFICACIÓN</i>	8
2.1.4. <i>DIVERSIDAD METABÓLICA</i>	9
<b>2.2. HIDROCARBUROS</b>	<b>10</b>
2.2.1. <i>GASÓLEO</i>	10
2.2.2. <i>BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS</i>	10
<b>3. ANTECEDENTES</b>	<b>16</b>
<b>3.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN SALINA EN LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS</b>	<b>16</b>
<b>3.2. DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POR BACTERIAS HALÓFILAS</b>	<b>17</b>
3.2.1. <i>CONSORCIOS</i>	17
3.2.2. <i>AISLAMIENTOS</i>	18
3.2.3. <i>MARINOBACTER</i>	20
<b>4. HIPOTESIS</b>	<b>23</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>5.1. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>23</b>
<b>5.2. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>23</b>
<b>6. MATERIALES</b>	<b>25</b>
<b>6.1. MICROORGANISMOS</b>	<b>25</b>
<b>6.2. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES</b>	<b>26</b>
<b>6.3. OLIGONUCLEÓTIDOS</b>	<b>27</b>
6.3.1. <i>OLIGONUCLEÓTIDOS PARA SECUENCIACIÓN DE 16S DNA</i>	27
6.3.2. <i>OLIGONUCLEÓTIDOS PARA ANÁLISIS DE GENES CODIFICANTES PARA ENZIMAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS</i>	28
<b>6.4. MARCADORES DE PESO MOLECULAR</b>	<b>28</b>
<b>7.1. PROPAGACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO</b>	<b>30</b>
<b>7.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL</b>	<b>30</b>
<b>7.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO</b>	<b>31</b>
<b>7.4. IDENTIFICACIÓN POR COMPARACIÓN DE SECUENCIA EL GEN 16S DNA</b>	<b>31</b>
7.4.1. <i>PROPAGACIÓN</i>	31

7.4.2.	EXTRACCIÓN DE DNA BACTERIAL	31
7.4.3.	AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DEL GEN 16S DNA	31
<b>7.5.</b>	<b>ANÁLISIS DE GENES CODIFICANTES PARA ENZIMAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS</b>	<b>33</b>
7.5.1.	ENZIMAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS	33
<b>7.6.</b>	<b>ANÁLISIS DE DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS</b>	<b>34</b>
7.6.1.	ANÁLISIS DE DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES	34
7.6.2.	ANÁLISIS DE FRACCIONES DE GASÓLEO SUSCEPTIBLES A BIODEGRADACIÓN	35
7.6.3.	CINÉTICA DE MINERALIZACIÓN DE GASÓLEO	36
7.6.4.	CINÉTICA DE MINERALIZACIÓN DE GASÓLEO A DISTINTAS SALINIDADES	37
7.6.5.	CINÉTICA DE MINERALIZACIÓN DE FRACCIONES DE GASÓLEO	37
<b>7.6.6.</b>	<b>DEGRADACIÓN DE FRACCIONES EN CONCENTRACIONES SIMILARES</b>	<b>38</b>
7.6.7.	DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS MODELO	39

---

## **8. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

---

<b>8.1.</b>	<b>IDENTIFICACIÓN POR COMPARACIÓN DE SECUENCIA DEL GEN 16S DNA</b>	<b>42</b>
<b>8.2.</b>	<b>SELECCIÓN DE LAS CEPAS</b>	<b>43</b>
<b>8.3.</b>	<b>CINÉTICA DE MINERALIZACIÓN DE HIDROCARBUROS EN MEDIO MÍNIMO CON 90 G/L DE NaCl44</b>	
<b>8.4.</b>	<b>AGREGADOS CELULARES</b>	<b>45</b>
<b>8.5.</b>	<b>ANÁLISIS DE GENES CODIFICANTES PARA ENZIMAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS</b>	<b>46</b>
<b>8.6.</b>	<b>DEGRADACIÓN HIDROCARBUROS TOTALES DE GASÓLEO</b>	<b>49</b>
<b>8.7.</b>	<b>CINÉTICA DE MINERALIZACIÓN DE GASÓLEO A DISTINTAS SALINIDADES</b>	<b>50</b>
<b>8.8.</b>	<b>CINÉTICA DE MINERALIZACIÓN DE FRACCIONES DE GASÓLEO.</b>	<b>53</b>
<b>8.9.</b>	<b>DEGRADACIÓN DE LAS FRACCIONES DE GASÓLEO A CONCENTRACIONES IGUALES</b>	<b>56</b>
<b>8.10.</b>	<b>DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS MODELO</b>	<b>59</b>

---

## **9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

---

## **10. BIBLIOGRAFIA**

---

## **APÉNDICE**

---

<b>A.1.</b>	<b>SECUENCIAS DEL GEN 16S PARA IDENTIFICACIÓN DE CEPAS AISLADAS</b>	<b>75</b>
	CEPA 8.15B	75
	CEPA 6.25	75
	CEPA 5.59	76
	CEPA 8.113	76
<b>A.2.</b>	<b>ESPECTROS IR DE FRACCIONAMIENTO DE GASÓLEO AROMÁTICOS</b>	<b>78</b>
		79

---

## **ANEXO**

---

## RESUMEN

La contaminación por hidrocarburos se ha convertido en un tema de interés para la biotecnología debido a su alto impacto ecológico y tóxico. La principal fuente de contaminación por hidrocarburos es la industria del petróleo y petroquímica. Estas industrias dispersan efluentes con mezclas complejas de hidrocarburos y una salinidad hasta 3 veces mayor a la del mar. La biorremediación es una alternativa segura y económica para el tratamiento de dichos efluentes pero los microorganismos convencionales son incapaces de llevar a cabo una biorremediación eficiente bajo condiciones hipersalinas. La característica de halofilicidad, así como la de hidrocarbonoclasta, han sido ampliamente estudiadas de manera independiente, sin embargo poco analizadas de manera conjunta; dando lugar a muchas incógnitas sobre la influencia de una sobre la otra. Es por ello que en el presente trabajo se plantea el estudio de la degradación hidrocarburos en condiciones hipersalinas por bacterias halófilas.

Para este estudio se analizaron cuatro aislamientos procedentes de tanques de desalinización de petróleo, denominados 6.25, 8.15b, 5.59 y 8.I13, que fueron identificados mediante análisis de secuencia de 16S, concluyendo que las primeras tres cepas pertenecen al género *Marinobacter*, mientras que 8.I13 pertenece al género *Bacillus*. En estudios preeliminares se encontró que *Marinobacter* 6.25 y 8.15b tienen mayor capacidad hidrocarbonoclasta, por lo que los estudios subsecuentes se realizaron sólo con dichas cepas. Esta capacidad se analizó mediante cinéticas de mineralización de gasóleo en cultivos de 25ml de medio mínimo mineral hipersalino en frascos serológicos sellados y análisis de perfil cromatográfico, observando degradación preferencial de hidrocarburos con mayores tiempos de retención correspondientes a alifáticos de cadena larga y fracciones más pesadas; el fraccionamiento subsecuente evidenció la degradación de alifáticos, aromáticos y resinas. Al analizar la mineralización de gasóleo en distintas concentraciones de NaCl, se observó que la concentración ensayada más favorable para la degradación es en 50g/l de NaCl en ambas cepas, y una halotolerancia que va hasta los 100 g/l de NaCl. Análisis posteriores mostraron la amplia diversidad catabólica y especificidad de *Marinobacter* 8.15b al degradar hidrocarburos de distinta naturaleza estructural y química.

Este trabajo es el primer reporte de la degradación de resinas por bacterias halófilas en condiciones hipersalinas.

# INTRODUCCIÓN

---



## 1. INTRODUCCIÓN

Durante muchos años, se pensó que no podían existir organismos que sobrevivieran a condiciones extremas, como la alta salinidad, que se presenta en muchos ecosistemas. Esta idea fundamenta el concepto de la preservación de alimentos en salmuera, el cual consiste en envasar conservas en una solución con concentraciones salinas cercanas a la saturación. Investigaciones posteriores descubrieron la existencia de microorganismos no solo capaces de soportar tales condiciones, sino de llevar a cabo de manera óptima sus funciones metabólicas. Este descubrimiento dio origen a una nueva clasificación de microorganismos denominados halófilos, dentro de los cuales se encuentran eubacterias, arqueobacterias y eucariontes. Dependiendo de la salinidad es el reino dominante; se ha encontrado que los cuerpos de agua con salinidad mayor a 25% son dominados por arqueobacterias, mientras que a concentraciones inferiores toda la actividad heterótrofa es atribuible a eubacterias (Oren, 1992)

Estos microorganismos considerados como extremos, debido a la alta presión osmótica en la que se desarrollan, han sido poco estudiados. Encontrando en ellos una amplia diversidad metabólica.

Actualmente, una de las capacidades metabólicas más estudiadas en el área de biotecnología ambiental y en los microorganismos en general, es la capacidad de degradación de compuestos xenobioticos, entre los que destacan diversos hidrocarburos como lo son: benceno, tolueno, etil-benceno y xileno (BTEX), hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH's) y compuestos halogenados. Estos compuestos contaminantes son importantes por su persistencia en el ambiente y su elevada toxicidad, que incluye su capacidad mutagénica y carcinogénica así como afectaciones al sistema nervioso central.

La principal fuente de contaminación por estos compuestos es la industria del petróleo y petroquímica. Durante el proceso de refinación se produce un efluente denominado *aguas de producción*, que proviene de la decantación de la emulsión petroleo-agua, con una concentración salina que alcanza hasta 3 veces la concentración del mar (Díaz y col., 2002). Por otra parte, gran cantidad de efluentes industriales con alta concentración salina son descargados en el medio ambiente, por lo que las bacterias halófilas sn una alternativa en la biorremediación de salmueras contaminadas. (DasSarma y col. 2001)

# GENERALIDADES

## 2. GENERALIDADES

La capacidad hidrocarbonoclasta y la halofilicidad, son dos características microbiológicas poco abundantes que han sido estudiadas en su mayoría, de manera independiente. Cada una de ellas depende de distintos factores metabólicos y/o ambientales, entre otros. Debido a que en el presente trabajo se estudiarán ambas capacidades de manera simultánea, en éste capítulo se describen algunos conceptos fundamentales.

En la sección 2.1 se definen conceptos básicos sobre la halofilicidad, ya que las condiciones hipersalinas representan un estrés con el cual, no todos los organismos pueden contender. Esta característica es un concepto bien definido que involucra rangos estrictos de salinidad y mecanismos adaptativos específicos. También se aborda la diversidad metabólica encontrada en estos organismos.

En la sección 2.2 se definen los hidrocarburos, se mencionan sus fuentes y su diversidad química, así como, algunas rutas metabólicas involucradas en su degradación, mostrando, de esta manera, la especificidad de dicho catabolismo.

### *2.1. Bacterias halófilas*

Las bacterias halófilas (del griego *halos* = sal, *filos* = amante de) son aquellas que se encuentran en ambientes hipersalinos, reproduciéndose y realizando sus funciones metabólicas de manera eficaz. (González-Hernández y Peña, 2002).

#### **2.1.1. Ambientes hipersalinos**

Los ambientes hipersalinos se definen como aquellos que presentan una salinidad más alta que la del mar (>3.5% p/v de sales disueltas). Algunos se originan de la evaporación del agua marina, como los sedimentos salinos y los canales intermareales (DasSarma y Arora, 2001; Rothschild y Mancinelli, 2001). Otros, se pueden encontrar en las profundidades del mar y bajo los sedimentos marinos, debido a la extinción y nueva formación de mares ancestrales. Estas salmueras son relativamente estables debido a su alta densidad, se conocen como domos salinos y en general están asociados a pozos petroleros. (DasSarma y Arora, 2001).

#### **2.1.2. Mecanismos haloadaptativos**

Las altas concentraciones salinas resultan extremas para el desarrollo de microorganismos, ya que la presión osmótica aumenta, dando lugar a la disminución de

presión de turgencia, desecación y deshidratación celular. Sin embargo, se han encontrado distintos organismos con la capacidad de desarrollarse óptimamente en un amplio rango de salinidades. Las bacterias halófilas utilizan estrategias de haloadaptación, siendo dos los mecanismos fundamentales y que se describen a continuación.

#### **2.1.2.1. SALT-in (equilibrio salino)**

Este mecanismo de haloadaptación consiste en mantener altas concentraciones intracelulares de sal osmóticamente equivalente a la concentración externa. En los organismos con este tipo de regulación, los sistemas enzimáticos y componentes estructurales se han adaptado a la presencia de altas concentraciones de sal, asegurando el funcionamiento de la maquinaria celular. Este mecanismo de haloadaptación se encuentra principalmente en arqueobacterias.

#### **2.1.2.2. Solutos compatibles**

En este mecanismo las células balancean la presión osmótica del medio intracelular, con la síntesis y acumulación intracelular de solutos orgánicos como el glicerol, la glicina betaína, ectoína, glicosilglicerol, sacarosa, trehalosa y 2-sulfotrehalosa. (González-Hernández y Peña, 2002; Oren, 2002); Las eubacterias son las principales usuarias de este mecanismo, dándoles la característica de tolerar amplios rangos de salinidad (halotolerantes).

También se han observado algunas adaptaciones moleculares relacionadas con la salinidad del medio como el exceso de aminoácidos con carácter ácido y pocos aminoácidos hidrofóbicos en sus proteínas, ausencia de peptidoglicanos, la presencia de lípidos muy ácidos, así como una relación entre esteres lipídicos y medios hipersalinos. (González-Hernández y Peña, 2002)

#### **2.1.3. Clasificación**

Los organismos halófilos se clasifican según los requerimientos salinos para su crecimiento (DasSarma y Arora, 2001). En la tabla 1 se muestra dicha clasificación.

**Tabla 1. Clasificación de halófilos según requerimiento salino**

<b>Clasificación</b>	<b>[NaCl] % (p/v)</b>
No halófilos	< 2%
Halófilos ligeros	2-5 %
Halófilos moderados	5-20%
Halófilos extremos	20-30%

### **2.1.4. Diversidad metabólica**

La diversidad de bacterias halófilas ha sido ampliamente revisada y se han distinguido varias características de grupo (Ventosa y col., 1998a; 1998b; Kamekura, 1998; Grant y col., 1998). Entre los organismos halófilos conocidos, se tienen organismos oxigénicos, anaeróbicos fotótrofos, heterótrofos aeróbicos, fermentadores, desnitrificantes, sulfatoredutores y metanogénicos (Oren, 2002)

Se encuentran microorganismos halófilos en los tres dominios: *Bacteria*, *Arquea* y *Eukarya*. Dentro del dominio *Bacteria*, la variedad metabólica está comúnmente asociada a halófilos moderados o halotolerantes. Entre las bacterias fotótrofas se encuentran, normalmente, las cianobacterias especialmente en zonas aerobias de tapetes microbianos; los géneros típicos son: *Chlorobium*, *Chromatium*, *Chloroflex*, *Thiocapsa*, *Rhodospirillum* y *Ectothiorhodospira*. Las bacterias aeróbicas heterótrofas Gram-negativo se encuentran típicamente en salmueras de baja salinidad con los siguientes géneros representativos: *Halomonas*, *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Marinomonas* y *Pseudomonas*, entre otras. También se encuentran bacterias aeróbicas heterótrofas Gram-positivo, aunque de manera menos abundante, incluyendo *Marinococcus*, *Sporosarcina*, *Salinococcus* y *Bacillus*, Mientras que los ambientes con mayor concentración salina son generalmente habitados por *Halobacteriaceae*, las cuales son arqueas halófilas extremas de género *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Haloferax*, *Halorubrum*, *Halococcus* y *Halorubrum*. También hay arqueas metanogénicas (*Methanohalophilus*).

Con base en esta diversidad metabólica es interesante conocer el potencial de los microorganismos halófilos en la degradación de hidrocarburos. Se ha explorado poco este tema y hay gran cantidad de incógnitas. En los casos de microorganismos cuyo sistema haloadaptativo es SALT-in, se plantea la existencia de enzimas tolerantes a poca actividad de agua, o nuevas rutas metabólicas degradadoras aún no conocidas (García y col., 2005a); mientras que en microorganismos cuyo sistema haloadaptativo es el de

solutos compatibles, se espera encontrar rutas de degradación ya conocidas en otros organismos, ya que tienen mayor versatilidad metabólica (Oren y col. 1992)

## *2.2. Hidrocarburos*

Los hidrocarburos son compuestos formados por esqueletos de carbono e hidrogeno. La principal mezcla de hidrocarburos de origen natural es el petróleo, constituido por n-alcanos, isoalcanos, alquenos, naftenos, aromáticos y compuestos de azufre, nitrógeno y oxígeno. Para su explotación el petróleo es destilado, obteniendo así fracciones de distintos pesos moleculares y una de las más pesadas es el gasóleo.

### **2.2.1. Gasóleo**

Para el presente estudio se seleccionó el gasóleo como mezcla modelo para los ensayos de degradación, debido a que es uno de los productos de destilación más pesados, por lo que sus componentes son hidrocarburos de cadena larga, poco volátiles, correspondientes a fracciones susceptibles a biodegradación y libres de asfaltenos. El gasóleo se destila atmosféricamente en un intervalo de temperaturas de 250 a 375°C y comprende hidrocarburos con un contenido de carbono de C<sub>15</sub> a C<sub>23</sub>.

### **2.2.2. Biodegradación de hidrocarburos**

Existe abundante literatura sobre la degradación bacteriana de hidrocarburos (Atlas y Bartha, 1972a, 1972b; Bertrard y col., 1983; Colwell, 1977; Head y Swannell, 1999; Head y col., 2006; Harayama y col., 1999, 2004).

Los organismos degradadores de hidrocarburos llevan a cabo un conjunto de reacciones específicas para degradar cada una de las diferentes fracciones del petróleo. Las reacciones iniciales involucran la oxidación del sustrato mediante oxigenasas (Leahy y Colwell, 1990).

Las rutas de biodegradación dependen de las condiciones fisicoquímicas del medio, la naturaleza del hidrocarburo a degradar y la cepa microbiana (Vázquez-Duhalt, 2000).

Las parafinas de cadena corta son los sustratos más fácilmente degradados por los microorganismos, seguidos por parafinas de cadena larga, isoparafinas, cicloparafinas, aromáticos, heterocíclicos y resinas o asfaltenos (Venkateswaran y col., 1995).

### **2.2.2.1. Alifáticos**

La fracción alifática de los hidrocarburos se compone de parafinas normales o alcanos, oleofinas o alquenos, isoparafinas o alcanos ramificados y naftenos o cicloalcanos. A continuación se mencionan algunos mecanismos de degradación de dichos compuestos:

#### **2.2.2.1.1. Parafinas normales**

Las reacciones de degradación más comunes de parafinas normales o hidrocarburos alifáticos consisten en la oxidación del grupo metilo terminal mediante el oxígeno molecular para formar un alcohol primario. Este mecanismo de oxidación es catalizado en la mayoría de los casos con un sistema mono-oxigenasa.

Hay dos sistemas mono-oxigenasa que han sido identificados:

El primero involucra al citocromo P-450, una flavoproteína y una proteína férrica. Este sistema es sensible al monóxido de carbono y se ha encontrado en *Corynebacterium sp.* y en algunas cepas de *Candida* (Vázquez-Duhalt, 2000).

El segundo mecanismo de oxidación involucra a la enzima alcano mono-oxigenasa, rubresoxina y una flavoproteína conformando una cadena de transporte de electrones, este complejo enzimático se ha encontrado en bacterias del grupo *Pseudomonas* (Vázquez-Duhalt, 2000).

En algunos microorganismos la oxidación comienza en carbonos no terminales, produciendo cetonas, posteriormente oxidadas a esteres y luego hidroxiladas para formar un ácido y un alcohol primario, que es metabolizado posteriormente por la alcohol-aldehído deshidrogenasa produciendo el ácido graso correspondiente. Estas enzimas normalmente están unidas a una molécula de NADH y son inducidas por la presencia de hidrocarburos.

#### **2.2.2.1.2. Oleofinas**

La degradación de las oleofinas o alquenos generalmente comienza en ambos extremos de la molécula, produciendo una gran variedad de compuestos. Los alquenos internos son modificados por la hidratación del doble enlace; los alcoholes secundarios o cetonas son transformadas a esteres e hidrolizados para formar alcoholes primarios y ácidos carboxílicos.

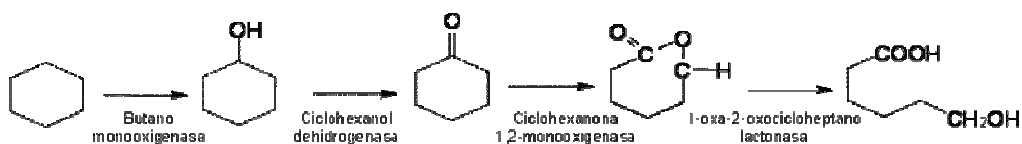
### 2.2.2.1.3. Isoparafinas

Un escaso número de microorganismos degradadores de hidrocarburos son capaces de metabolizar hidrocarburos ramificados. Algunos estudios reportan la degradación mediante citocromo P450 ó mono-oxigenasas de tipo AlkB

### 2.2.2.1.4. Naftenos

Algunos organismos degradadores de cicloalcanos son: *Nocardia sp.* y *Pseudomonas sp.* y *Brachymonas petroleovorans* CHX. Este mecanismo de degradación consiste en la oxidación del compuesto hasta ácido carboxílico. En la figura 1 se muestra la secuencia de reacciones de degradación.

**Figura 1. Degradación de Naftenos**

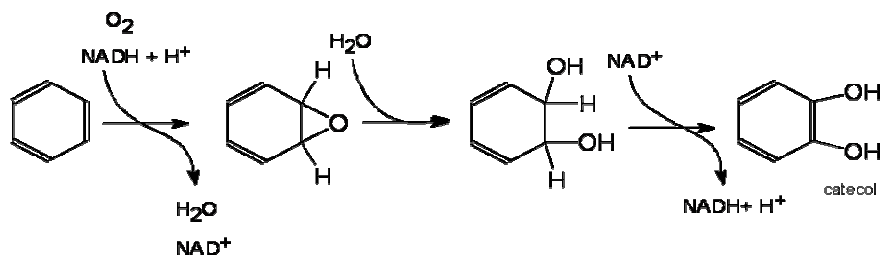


Vázquez-Duhalt, 2000.

### 2.2.2.2. Aromáticos

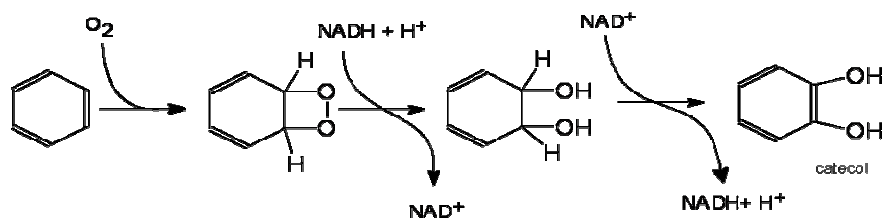
La degradación de compuestos aromáticos ha sido una de las degradaciones de hidrocarburos más estudiadas, debido a que existen varios organismos capaces de llevar a cabo este tipo de reacciones y a la alta toxicidad de estos compuestos. La ruptura del anillo aromático se realiza a través de una reacción de dihidroxilación, seguida por una oxidación. Se han identificado dos tipos de enzimas que efectúan esta reacción: mono-oxigenasas (fig.2) y dioxigenasas (fig.3), dando como producto, en ambos casos, una molécula de catecol.

**Figura 2. Mecanismo de mono-oxigenasas**



Vázquez-Duhalt, 2000.



**Figura 3. Mecanismo de dioxigenasas**

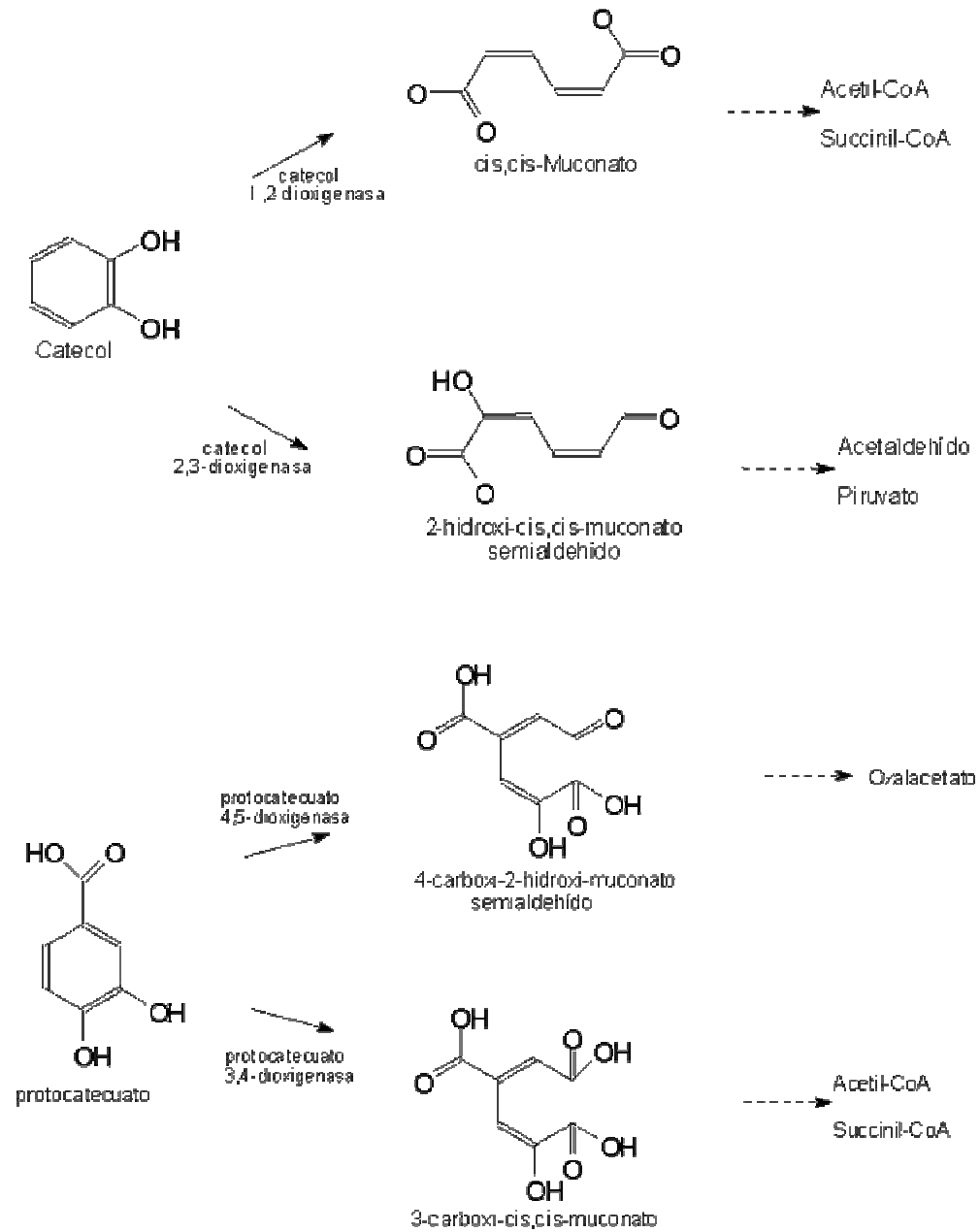
Vázquez-Duhalt, 2000.

En la biodegradación de compuestos poliaromáticos se llevan a cabo reacciones de oxidación sucesivas hasta formar protocatecuato o catecol. Cuya degradación (fig.4) da como resultado compuestos de metabolismo intermediario.

### **2.2.2.3 Resinas**

Las resinas comprenden la fracción de compuestos polares del gasóleo. Está conformada por compuestos cuya polaridad y peso molecular son mayores que los de alifáticos y aromáticos (Boukir y col., 2001). La degradación de compuestos polares puede darse de múltiples maneras dependiendo el organismo presente. Debido a la estructura de cada compuesto, este puede ser degradado por enzimas que realicen escisiones en alguno de los anillos aromáticos o por enzimas que ataquen el grupo polar. Una muestra de la diversidad metabólica que se presenta en la degradación de éstos compuestos es la degradación de dibenzotiofeno, la cual puede darse hasta la mineralización en las rutas degradadoras de naftaleno o de dibenzotiofeno (*Pseudomonas putida*) o la desulfuración (*Rhodococcus* sp. IGTS8) cuyo compuesto final es 2-hidroxibifenil, el cual es liberado al medio (*University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database*).

**Figura 4. Degradación de protocatecuato y catecol**



# ANTECEDENTES

### 3. ANTECEDENTES

A pesar del limitado número de reportes de degradación de hidrocarburos por organismos halófilos, se sugiere que los mecanismos de degradación de hidrocarburos en bacterias halófilas, que utilizan como sistema haloadaptativo el de solutos compatibles, no difieren mucho de los presentados por bacterias no halófilas. Este sistema de haloadaptación da lugar a enzimas “convencionales” ya conocidas para la degradación de hidrocarburos (Oren y col., 1992). Por otro lado, en las bacterias que utilizan el mecanismo de SALT-in, las enzimas deben ser distintas a las estudiadas para soportar concentraciones salinas intracelulares tan altas, presentando una resistencia salina o incluso un requerimiento salino (Oren 2002).

#### *3.1. Efecto de la concentración salina en la degradación de hidrocarburos*

Existe un gran número de investigaciones de bacterias marinas degradadoras de hidrocarburos como las realizadas por Atlas y Bartha (1972a, 1972b), Berthard y Rambeloarisoa (1983), Colwell (1977), o más recientes como las realizadas por Head y Swannell (1999), Head y col. (2006), y Harayama y col. (1999, 2004), por mencionar algunos. Sin embargo, existen pocas investigaciones que reporten el efecto de la concentración de NaCl en la biodegradación de hidrocarburos. Algunas de ellas son las realizadas por Kerr y Capone (1988), quienes estudiaron la relación entre la degradación de naftaleno y la concentración de NaCl, reportando que los microorganismos degradadores no presentan un cambio significativo en la velocidad de degradación en un alto rango de salinidad. Sin embargo, Ward y Brock (1978) estudiaron la degradación de hidrocarburos en ambientes hipersalinos, utilizando bacterias aisladas de partes aledañas al Gran Lago Salado en E.U.A.; concluyendo que existe una reducción del metabolismo de hidrocarburos en condiciones hipersalinas. Otros grupos han llegado a las mismas conclusiones, como es el caso de Riis y col. (2003) y Kuznetsov y col. (1992), Nicholson y Fathepure (2005). Sin embargo, Riis y col. (2003) y Kleinstauber y col. (2006) descubrieron que después de largos periodos de exposición, la degradación y la cantidad de hidrocarburos metabolizados se incrementa, sugiriendo una adaptación del consorcio microbiano a las altas concentraciones salinas. En contraste, otros reportes indican que al aumentar la salinidad la degradación de hidrocarburos también aumenta (Yang y col., 2000; Díaz y col., 2000).

Esta diversidad de resultados muestra que la halofilicidad y la degradación de hidrocarburos no están directamente relacionadas, son características independientes, las cuales pueden encontrarse en un rango de combinaciones tan amplio como la diversidad metabólica microbiana.

## 3.2. Degradación de hidrocarburos por bacterias halófilas

### **3.2.1. Consorcios**

La degradación de hidrocarburos en ambientes hipersalinos con bacterias aisladas ha sido muy poco estudiada, la mayor parte de estudios se realizan utilizando consorcios microbianos, debido, a que generalmente, muestran mayor degradación que los aislamientos puros, ya que las distintas especies que los componen desarrollan procesos complementarios.

Algunos de estos estudios fueron los realizados por Díaz y col., (2000), quienes identificaron y estudiaron 2 consorcios bacterianos, integrados por 3 especies de *Marinobacter ssp.*, *Erwinia ananas* y *Bacillus spp.* los cuales degradaron hidrocarburos de petróleo crudo en concentraciones salinas que van de 40 a 220 g/L de NaCl. Riis y col. (2003) reportan un consorcio conformado por *Cellulomonas spp.*, *Bacillus marisflavi*, *Dietzia maris* y *Halomonas eurihalina* con capacidad de degradar diesel en un rango de 0 – 17.5% de NaCl mostrando una degradación óptima en 10% de NaCl. Kulichevskaya y col. (1992) encontraron organismos pertenecientes a los géneros *Rhodococcus*, *Micrococcus* y *Arthrobacter* capaces de degradar hidrocarburos de petróleo, los cultivos fueron capaces de crecer en un amplio rango de salinidad (0.5 – 25% de NaCl); la oxidación de hidrocarburos de petróleo solo se observó en salinidades mayores a 15% NaCl comprobando la existencia de arqueobacterias halófilas extremas en depósitos de petróleo. Woolard e Irving (1994,1995) reportan la biodegradación de fenoles en ambientes hipersalinos, utilizando una película bacteriana aislada del Great Salt Lake que removió el 99% de fenol en una solución de 0.1 g/l y 15% (p/v) NaCl en un reactor alimentado en lote. Las bacterias presentes no se identificaron. Nicholson y Fatherpure (2004). Reportaron un consorcio, aislado de una muestra de suelo salado impactado con aceite, que degrada BTEX en 145 g/l de NaCl, mostrando que el consorcio fue dominado por *Marinobacter*. Este mismo grupo (Nicholson y Fatherpure, 2005) reportó el hallazgo de un consorcio dominado por *Acidovorax delafieldi* y *Pseudomonas sp.* en ausencia de NaCl; dominado por *Halobacillus*

*salinus* cuando la salinidad se situó entre 1 y 2.5M de NaCl; dominado por *Bacillus simplex* entre 1 y 4 M de NaCl y finalmente dominado por una bacteria no identificada cuando la salinidad se encontraba por encima de 2.5M de NaCl. En este consorcio, obtenido de un ambiente sin antecedentes de contaminación, la degradación de tolueno y benceno fue dependiente de la concentración de NaCl. Por otro lado, los tapetes microbianos de cianobacterias mostraron degradación eficiente de petróleo crudo a salinidades superiores al 21% (Cohen, 2002; Abed y col., 2006). Los aislamientos provenientes de éste tapete microbiano no mostraron degradación en cultivos axénicos, mostrando que el consorcio cuenta con una complementariedad metabólica que le confiere la capacidad degradadora. Otro tapete microbiano de cianobacterias dominado por *Microcoleus chthonoplastes* y *Picobenthos*, muestra una mayor capacidad de degradación de hidrocarburos aromáticos sobre alifáticos a 7.5% de NaCl (Grötzschel y col., 2002).

Hay pocos trabajos que muestran el efecto de la inmovilización, ya sea del sustrato, observando una baja degradación (Grötzschel y col., 2002); o de los organismos, reportando mayor halotolerancia durante la degradación, así como una degradación más eficiente en comparación con lo observado en forma libre (Díaz y col., 2002).

La degradación de hidrocarburos por consorcios presenta un comportamiento dinámico y complejo, debido a los procesos complementarios que se desarrollan entre las distintas especies que lo componen. Además, la proporción poblacional varía de acuerdo a la concentración salina. Esta situación quedó demostrada por Kleinsteuher y col. (2006). El consorcio estudiado mostró una degradación preferencial en entre 7.5% y 15% de NaCl con diesel como única fuente de carbono. *Halomonas*, *Ralstonia* y *Dietzia* mostraron un amplio rango de tolerancia salina (0%-20% NaCl), *Idiomarina* fue la especie dominante a 7.5%, *Alcanivorax* y *Marinobacter* fueron dominantes a 15% NaCl durante 42 días de cultivo, desapareciendo en cultivos de mayor tiempo; Una  $\alpha$ -*Protobacterium* cercana a *Caulobacterse* fue encontrada entre 15% - 20% en 84 días de cultivo. En cultivos de mayor tiempo, aparecieron otras especies como *Sphingomonas*, *Janibacter*, *Desulfobacula*, *Desulfosporosius*, *Halomonas*, *Ralstonia* y *Dietzia*, así como bacterias de las familias *Ectothiorhodospiraceae* y *Methylophilaceae*.

### **3.2.2. Aislamientos**

Pocos estudios reportan cultivos axénicos de bacterias halófilas degradadoras de hidrocarburos. Este es el caso de Zvyagintseva y col. (2001) quienes observaron que *Dietzia*

*maris* tiene la capacidad de degradar parafinas, aceite de turbina y aceite mineral purificado en concentraciones que van de 0.5 a 10% de NaCl.

*Streptomyces albiacialis* tiene la capacidad de degradar petróleo y petrolato líquido como única fuente de carbono y energía en un rango de 3-10% NaCl, la degradación disminuyó conforme aumento la salinidad (Kuznetsov y col., 1992). Kulichevskaya y col., (1992), aislaron *Halobacterium* sp. H-352 observando degradación de hidrocarburos en petróleo, a una salinidad de 30% de NaCl, los n-alcanos de C<sub>10</sub> – C<sub>30</sub> de la mezcla virtualmente desaparecieron. Bertrand y col., (1990) aislaron una arqueobacteria halófila extrema hidrocarbonoclasta nombrada EH4 mostrando un crecimiento óptimo a 3.5 mol/l de NaCl. Degrada hidrocarburos saturados (tetradecano, eicosano, hexadecano, heneicosano, pristano) y aromáticos (acenaphteno, fenantreno, antraceno, 9-metil antraceno).

García y col., (2004) Aislaron y caracterizaron una nueva especie de *Halomonas* capaz de crecer en fenol, ácido *p*-cumarico, ácido ferulico, ácido benzoico, ácido parahidroxibenzoico, ácido cinámico, ácido salicílico, ácido fenilpropionico y ácido *p*-aminosalicílico como única fuente de carbono y energía. Este aislamiento crece en rangos que abarcan 1.5 a 30% (p/v) de NaCl teniendo un crecimiento optimo en 7.5 – 10% (p/v). Debido a su capacidad se propuso el nombre de *Halomonas organivorans*. Este grupo también reporta el hallazgo de bacterias relacionadas filogenéticamente con los géneros *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Marinobacter*, *Salinicoccus* y *Halobacillus* capaces de degradar los compuestos anteriormente mencionados (García y col. 2005a).

Otro aislamiento es el de *Thalassobacillus devorans*, una bacteria halófila moderada capaz de usar fenol como única fuente de carbono con crecimiento optimo en 7.5-10% (p/v) NaCl (García y col., 2005b)

Emerson y col. (1994) descubrieron una arquea halófila (*Haloferax* sp.) capaz de crecer con compuestos aromáticos (benzoato, cinamato, y fenilpropanoato) como única fuente de carbono y energía. *Haloferax* sp. D1227 crece a 45°C, 0.86 – 5.2M, aunque el óptimo se presenta de 1.7 a 2.6 M de NaCl. Este fenómeno de mineralización de un compuesto aromático por medio de arquea nunca se había demostrado antes según el autor. En experimentos realizados en el artículo se determinó que de 89% de C14 rescatado de la prueba, el 79% se mineraliza completamente hasta CO<sub>2</sub> mientras que el 19% se emplea de manera estructural y se incorpora a la biomasa.

*Pseudomonas halodurans*, una bacteria halotolerante, capaz de crecer en concentraciones mayores a 2.65 M de NaCl, mostró capacidad de degradación de compuestos aromáticos mediante escisión *orto* en el anillo aromático (Rosenberg, 1983) esta bacteria fue renombrada mas tarde como *Halomonas halodurans* (Hebert y Vreeland, 1987).

Plotnikova y col. (2001) aislaron bacterias halófilas capaces de degradar naftaleno (*Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Arthrobacter sp.* y *Bacillus sp.*), fenantreno y bifenil (*Arthrobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*). Algunas especies de *Rhodococcus* y *Arthrobacter* crecieron en gentsato, por lo cual se sugirió que la degradación de naftaleno pueda ser a través de la ruta de gentsato, mientras que las demás especies utilizan la vía de catecol. Todas estas especies son halotolerantes moderadas. Se encontró que los genes responsables de la ruta de degradación se encuentran en un plásmido; por lo que se sugiere que la capacidad degradadora de las bacteria portadora puede perderse si no se mantiene un medio de selección estricto. El plásmido de la bacteria halotolerante *Pseudomonas sp.* fue clonado en una cepa de *P. putida* dando como resultado una mutante más halotolerante, aunque no al nivel de la cepa de origen del plásmido, por lo que concluyen que la halotolerancia puede deberse tanto a genes del plásmido como a los del cromosoma.

Hinteregger y Streichsbier (1997) estudiaron la capacidad degradadora de una nueva *Halomonas sp.* aislada de Great Salt Lake y capaz de degradar fenol como única fuente de carbono. El crecimiento óptimo se presentó entre 3 y 5% (p/v) mediante la vía de escisión en *orto* del anillo aromático.

También se ha demostrado la existencia de organismos resistentes a distintas condiciones extremas de manera simultánea, como son bacterias haloalcalófilas, como *Halomonas*, con capacidad degradadora de compuestos fenólicos, como fenol, catecol y ácido 2,4-diclorofenoxiacético de manera eficaz (95% de transformación). Dependiendo de la cepa y de la relación C/N ésta cepa utiliza la vía de escisión en *orto* o en *meta* del anillo aromático (Maltseva y col., 1996; Alva y Peyton, 2003; Maskow y Kleinstaubler 2004)

Otro aislamiento es el de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, bacteria que muestra un crecimiento óptimo a 32°C, pH 7-7.5, crece en un rango de 0.08 a 3.5M de NaCl y degrada tetradecano, hexadecano, eicosano, n-eicosano, priseno, fenildecano y fenantreno como única fuente de carbono (Gauthier y col., 1992).



---

### **3.2.3. Marinobacter**

El género de *Marinobacter* ha sido frecuentemente asociado a la degradación de hidrocarburos en altas concentraciones salinas, (Gauthier y col., 1992; Riis, 2003; Nicholson y Fatherpure, 2004; García y col., 2005; Márquez y Ventosa, 2005; Kleinteuber, 2006; Gu y col., 2007). Fue descrito por primera vez por Gauthier y col. en 1992. *Marinobacter* es una bacteria halófila moderada asociada a *gamma* Proteobacteria. Esta bacteria ha sido aislada de ambientes marinos (Kim y col., 2006; Green y col., 2006; Romanenko y col., 2005; Yoon y col., 2003, 2004; Gorshkova y col., 2003;). También ha sido detectada en reservorios de petróleo y de pozos petroleros (Sette y col., 2007; Huu y col., 1999), así como de ecosistemas contaminados con petróleo (Gu y col., 2007; Brito y col., 2006; Yakimov y col., 2005; Díaz y col., 2000). *Marinobacter* tolera un amplio rango de concentraciones de NaCl, haciéndola una especie potencialmente aplicable para la biorremediación en ambientes donde la concentración salina es fluctuante.

*M. hydrocarbonoclasticus* fue aislada del mar mediterráneo cerca de una refinería, crece en un rango de salinidad de 0.1 a 3.5 M de NaCl con una concentración óptima de 0.6 M. También cuenta con otras características extremófilas, es psicrófila, alcalina, termotolerante y tiene tolerancia a los metales pesados, confiriéndole versatilidad en ambientes extremos y de interés para eventuales aplicaciones ambientales (Shivaji y col., 2005; Deppe y col., 2005; Takai y col., 2005; Shieh y col., 2003; Ivanova y col., 2002).

Venkateswaran y col. (1995) hacen el único reporte de un aislamiento de *Pseudomonas sp.* con la capacidad de degradar resinas como única fuente de carbono. Aunque esta degradación no se ensayó en condiciones halófilas.

HIPOTESIS  
Y  
OBETIVOS

## 4. HIPOTESIS

Los aislamientos bacterianos procedentes de instalaciones petroleras y capaces de crecer en altas concentraciones de sal, metabolizarán los hidrocarburos de manera diferencial de acuerdo al tipo de hidrocarburo.

## 5. OBJETIVOS

### *5.1. Objetivo general*

Estudiar la degradación de hidrocarburos en ambientes hipersalinos por bacterias halófilas

### *5.2. Objetivos particulares*

1. Aislar e identificar bacterias halófilas degradadoras de hidrocarburos.
2. Estudiar el crecimiento y la capacidad degradadora, de las cepas aisladas, a distintas salinidades.
3. Estudiar la cinética de degradación del gasóleo y sus fracciones.
4. Determinar la especificidad en la degradación de diferentes fracciones del gasóleo, de las bacterias aisladas.
5. Estudiar la especificidad de la degradación de compuestos modelo.

# MATERIALES

## 6. MATERIALES

### 6.1. *Microorganismos*

Se estudiaron cuatro cepas bacterianas no identificadas, denominadas 5-59, 6-25, 8-15b, 8-I13 donadas por la Dra. Sylvie Le Borgne de la UAM-Cuajimalpa, aisladas de tanques deshidratadores de petróleo, en medio NACE-90 en condiciones aerobias a 37°C, pH 7. En la Tabla 2. se describe la morfología colonial y celular:

**Tabla 2. Morfología colonial de los aislamientos**

<b>Cepas características</b>	<b>5-59</b>	<b>6-25</b>	<b>8-15b</b>	<b>8-I13</b>
Forma	circular	circular	circular	circular
Color	crema	crema	crema	crema
Tamaño	>1mm	>1mm	>1mm	>1mm
Borde	entero	entero	entero	entero
Elevación	convexa	convexa	convexa	convexa
Superficie	lisa	lisa	lisa	lisa
Luz transmitida	opaca	opaca	opaca	opaca
Luz reflejada	brillante	brillante	brillante	brillante
Aspecto	húmedo	húmedo	húmedo	húmedo
Consistencia	suave	suave-butirosa	suave	suave-butirosa

Dra. Sylvie Le Borgne Le Gall

## 6.2. Medios de cultivo y soluciones

### **Medio mínimo salino MSM-50**

- ✓ NaCl 50 g/l
- ✓ MgCl<sub>2</sub> 0.5 g/l
- ✓ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.45g/l
- ✓ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.9 g/l
- ✓ NH<sub>4</sub>Cl 0.3 g/l
- ✓ KCl 0.3 g/l
- ✓ Solución de elementos traza 1ml
- ✓ Ajustar pH a 7.0
- ✓ Agregar 20 g/l de agar para medio sólido

### **Solución de elementos traza**

- ✓ MgCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 0.036 g
- ✓ ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.044 g
- ✓ FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.230 g
- ✓ CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0.005 g
- ✓ Aforar a 100 ml

### **Medio LB**

- ✓ Triptona 10 g/l
- ✓ Extracto de levadura 5 g/l
- ✓ NaCl 5 g/l

### **Medio YT2X-75**

- ✓ Triptona 16 g/l
- ✓ Extracto de levadura 10 g/l
- ✓ NaCl 75 g/l

**Solución patrón de IPTG**

- ✓ Isopropiltio- $\beta$ -D-galactoside 2g
- ✓ Aforar hasta 10 ml con H<sub>2</sub>O destilada

**Solución patrón de X-gal**

- ✓ X-gal 20mg
- ✓ Aforar hasta 1ml con dimetilformamida

**Solución patrón de ampicilina**

- ✓ Ampicilina 0.1g
- ✓ Aforar con agua destilada hasta 1ml

**Amortiguador GTE**

- ✓ Glucosa 50mM
- ✓ Tris 25mM
- ✓ EDTA 10mM
- ✓ Ajustar pH 8

**Solución álcali-SDS**

- ✓ NaOH 0.2N
- ✓ SDS 1%

**Solución de acetatos**

- ✓ Acetato de potasio 5M 60 ml
- ✓ Acido acético glacial 11.5 ml
- ✓ H<sub>2</sub>O 28.5 ml

***6.3. Oligonucleótidos*****6.3.1 Oligonucleótidos para secuenciación de 16S DNA**

nombre	<i>E. coli</i> pst	Secuencia (5' → 3')	Especificidad de dominio
<i>Fd1</i>	8	CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	B
<i>Rd1</i>	1542	AAGGAGGTGATCCAGCC	A, B

### **6.3.2. Oligonucleótidos para análisis de genes codificantes para enzimas degradadoras de hidrocarburos**

<b>primer</b>	<b>Secuencia (5' → 3')</b>	<b>gen</b>	<b>Tamaño (bp)</b>	<b>enzima</b>
Alk B fwd	CAYGARCTBGGBCAYAARW <sup>1</sup>	<i>alkB</i>	537	alcano monooxigenasa
Alk B rwd	GTGRTGRTCVGARTGBCG <sup>1</sup>			
+ pPAH-F	GGYAAAYGCNAAAGAATTCGTNTGYWSHTAYCAYGGITGGG <sup>2</sup>	<i>nahAc</i>	702	naftaleno-1,2-dioxigenasa
+ pPHA-NR700	CCAGAATTCNGTNGTRTTHGCATCRATSGGRTKCCA <sup>2</sup>			
* Cat 1	ACCATCGARGGYCCSCTSTAY <sup>3</sup>	<i>isoB</i>	411	catecol-1,2-dioxigenasa
* Cat 3	GTTRATCTGGGTGGTSAG <sup>3</sup>			
* Pro 3.4.2	GCSCCSCTSGAGCCSAACTTC <sup>3</sup>	<i>pcaH</i>	336	protocatecuete-3,4-dioxigenasa
* Pro 3.4.4.	GCCGCGSAGSACGATRTCGAA <sup>3</sup>			
* Cat 2.3.1	GARCTSTAYGCSGAYAAGGAR <sup>3</sup>	<i>nahH</i>	429	catecol-2,3-dioxigenasa
*Cat 2.3.2	RCCGCTSGGRTCGAAGAARTA <sup>3</sup>			

<sup>1</sup>Los oligonucleótidos fueron diseñados como se describe en la sección 7.5.1.1.

<sup>2</sup> Hedlund y col., 1999

<sup>3</sup> Garcia y col., 2005

### ***6.4. Marcadores de peso molecular***

Los marcadores de peso molecular para DNA utilizados en este trabajo fueron:  $\lambda$  *Hind-III* y 1kb DNA ladder, de Promega; 1kb plus, de invitrogen; y VI, de Roche.



# MÉTODOS

## 7. MÉTODOS

### 7.1. *Propagación en medio líquido*

Los cuatro aislamientos se propagaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 20 ml de Medio MSM-90 (90 g/l de NaCl ya que fue la salinidad del medio del que se aislaron). Los matraces se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 15 minutos, cuando alcanzaron la temperatura ambiente se adicionaron 100 µl de gasóleo en cada frasco como única fuente de carbono y energía, la adición se hizo posterior a la esterilización para evitar la pérdida de algunos hidrocarburos volátiles, los frascos se inocularon con 4 ml de solución bacteriana proveniente de las muestras donadas por la Dra. Sylvie Le Borgne. Los cultivos se incubaron a 30°C y 150 rpm durante 7 días.

### 7.2. *Determinación de proteína total*

Se pusieron 25 ml de medio en tubos de centrifuga de 30 ml y se centrifugaron a 15000 g en una centrifuga Beckman modelo J2-21 durante 10 minutos, pasado el tiempo se retiró el gasóleo de los tubos usando una pipeta Pasteur y una vez eliminada la mayor cantidad de gasóleo posible, se procedió a retirar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 5 ml de solución amortiguadora pH 7 y cada muestra se sonicó 9 veces a intervalos de 30 segundos, en un sonicador marca Vibra Cell con micro punta a una frecuencia de 8 kHz  $\pm$  20Hz. Se centrifugó a 12000 rpm para separar los restos celulares de la solución proteica y el sobrenadante se filtró con una membrana de nylon marca milipore de 0.45µm de poro, con el fin de eliminar por completo los restos celulares. Posteriormente se adicionó una solución de ácido tricloroacético (TCA) hasta alcanzar una concentración de TCA final de 20%, se centrifugó a 15000 g durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante, el precipitado se redisolvió en 200 µl de NaOH 1M y 1.8 ml de H<sub>2</sub>O llegando a un volumen final de 2 ml.

De la solución de proteínas final se tomó una alícuota menor o igual a 0.8 ml dependiendo la concentración proteica (en caso de ser menor a 0.8 ml se completó a este volumen con H<sub>2</sub>O) y se le adicionaron 0.2 ml del reactivo Bio-Rad para determinación de proteínas hasta llegar a un volumen final de 1 ml. Se dejó reaccionar durante 5 minutos y se determinó la concentración de proteínas mediante densidad óptica de la solución en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-650, a una  $\lambda$ = 595 en una celda de cuarzo, utilizando una curva patrón efectuada con BSA con un R<sup>2</sup> =0.9970

### 7.3. Microscopía electrónica de barrido

Las muestras fueron preparadas y fotografiadas en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM con un microscopio con las siguientes especificaciones:

Equipo: JEOL JSM 5410-LV (Bajo Vacío)  
 Magnificación: 15 - 200 000x  
 Resolución: aprox. 4nm  
 Detectores: Electrones secundarios y dispersos

### 7.4. Identificación por comparación de secuencia el gen

#### 16S DNA

#### **7.4.1. Propagación**

Se inocularon 3 ml de medio YT2X con 90 g/l de NaCl en tubos de cultivo, con precipitados de cada una de las cuatro cepas previamente propagados en medio MSM-90, y se dejaron crecer una noche a 30°C y 150 rpm

#### **7.4.2. Extracción de DNA bacterial**

Se realizó la extracción del DNA con el kit UltraClean microbial DNA isolation system de Mo Bio, según protocolo de fabricante. La extracción fue comprobada mediante un gel de agarosa al 2%. Utilizando como marcador  $\lambda$  Hind-III

#### **7.4.3. Amplificación y clonación del gen 16S DNA**

El gen 16S DNA fue amplificado con los oligonucleótidos Fd1 y Rd1 mediante PCR con los siguientes reactivos:

H <sub>2</sub> O	18.125 $\mu$ l
HotStarTaq Buffer (10X)	2.5 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	0.5 $\mu$ l
Fd1 (50 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
Rd1 (50 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.75 $\mu$ l
Templado	2.5 $\mu$ l
HotStarTaq DNA polimerasa (5U/ $\mu$ l)	0.125 $\mu$ l
	25 $\mu$ l

Bajo las siguientes condiciones de amplificación:

Desnaturalización inicial	95 °C	3 min.	1 ciclo
Desnaturalización	95 °C	0.5 min.	
Hibridación	53 °C	0.5 min.	30 ciclos
Extensión	72 °C	2 min.	
Extensión final	72 °C	10 min.	1 ciclo

Los fragmentos amplificados se ligaron al vector pGEM-T de Promega, según protocolo del fabricante. Para a expresión del vector se utilizaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las cepas obtenidas como positivas en la transformación y expresión del vector (colonias blancas) fueron inoculadas en 3 ml de medio LB, se incubaron a 37°C una noche. Se centrifugaron a fin de remover el medio de cultivo. El precipitado de células se resuspendió en 100  $\mu$ l de amortiguador GTE. Se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200  $\mu$ l de solución de álcali-SDS, se mezcló gentilmente y se incubó 5 minutos en hielo. Se agregaron 150  $\mu$ l de solución de acetatos y se mezcló en un agitador vórtex a máxima velocidad. Se incubó 5 minutos en hielo. Se centrifugo en una centrifuga mod. 5415 C, marca Eppendorff. El sobrenadante se trasvasó a un tubo limpio. Se le agregaron 200  $\mu$ l de fenol y 200  $\mu$ l de cloroformo. Se agitó la mezcla, se centrifugó por 2 minutos y se trasvasó la fase superior. Se repitió el procedimiento pero agregando 350  $\mu$ l de cloroformo exclusivamente. Se agregaron 0.9 ml de etanol al 100%, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó por 1 minuto y se desechó el sobrenadante. El precipitado se secó en una centrifuga de vacío 1.5 minutos. El precipitado se resuspendió en medio TE.

La digestión del plásmido se realizó con enzima de restricción *EcoRI* usando la siguiente concentración de reactivos:

DNA	2 $\mu$ l
buffer	2 $\mu$ l
RNAsa	1 $\mu$ l
EcoRI	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	14.5 $\mu$ l
	<hr/>
	20 $\mu$ l

Se incubó durante 3 horas

Los fragmentos de DNA correspondientes al gen 16S DNA de las cuatro cepas se mandaron secuenciar en la unidad de secuencia de la UAM-I

El alineamiento de las secuencias del gen 16S DNA se realizó en la base de datos de NCBI

## *7.5. Análisis de genes codificantes para enzimas degradadoras de hidrocarburos*

Estos análisis se efectuaron mediante PCR con oligonucleótidos específicos descritos en la sección 6.3.2 de distintas enzimas con el DNA total como templado buscando amplificar fragmentos de tamaño correspondiente a la secuencia de la enzima ensayada.

### **7.5.1. Enzimas degradadoras de hidrocarburos**

Las enzimas ensayadas fueron: alcano-1-monooxigenasa, naftaleno-1,2-dioxigenasa, catecol-1,2-dioxigenasa, protocatecuato-3,4-dioxigenasa y catecol-2,3-dioxigenasa.

#### **7.5.1.1. Alcano-1-monooxigenasa**

Los oligonucleótidos utilizados para el gen de esta enzima se detallan en la sección 6.3.1 y se diseñaron en base a los alineamientos de las secuencias peptídicas de las alcano monooxigenasas de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens Pf-5* y *Marinobacter aquaolei*, así como los alineamientos de las secuencias de los genes correspondientes (gene alkB, Maqu\_0440, Maqu\_0610 y Maqu\_2843).

#### **7.5.1.2. Naftaleno-1,2-dioxigenasa**

Los oligonucleótidos utilizados para el gen de esta enzima se detallan en la sección 6.3.1 y las condiciones de amplificación (Hedlund y col., 1999) son las siguientes:

Desnaturalización inicial	96 °C	3 min.	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C	1 min.	
Hibridación	42 °C	1.5 min.	35 ciclos
Extensión	72 °C	3 min.	
Extensión final	72 °C	7 min.	1 ciclo

**7.5.1.3. Catecol-1,2-dioxigenasa**

Los oligonucleótidos utilizados para el gen de esta enzima se detallan en la sección 6.3.1 y las condiciones de amplificación (García y Col. 2005) son las siguientes:

Desnaturalización inicial	95 °C	5 min.	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C	1 min.	
Hibridación	50 °C	1 min.	35 ciclos
Extensión	72 °C	1 min.	

**7.5.1.4. Protocatecuato-3,4-dioxigenasa**

Los oligonucleótidos utilizados para el gen de esta enzima se detallan en la sección 6.3.1 y las condiciones de amplificación (García y Col. 2005) son las siguientes:

Desnaturalización inicial	95 °C	5 min.	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C	1 min.	
hibridación	50 °C	1 min.	35 ciclos
Extensión	72 °C	1 min.	

**7.5.1.5. Catecol-2,3-dioxigenasa**

Los oligonucleótidos utilizados para el gen de esta enzima se detallan en la sección 6.3.1 y las condiciones de amplificación (García y Col. 2005) son las siguientes:

Desnaturalización inicial	95 °C	5 min.	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C	1 min.	
Hibridación	40-45 °C	1 min.	35 ciclos
Extensión	72 °C	1 min.	

***7.6. Análisis de degradación de hidrocarburos*****7.6.1. Análisis de degradación de hidrocarburos totales****7.6.1.1. Cultivo**

Este análisis se hizo incubando las cepas 8.15b, 8.I13, 5.45 y 6.25 por triplicado en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 45 ml de medio MSM-90 estéril. Posterior a la esterilización se adicionaron 100 µl de gasóleo equivalentes a 96.3 mg como única fuente

de carbono y energía. Se dejaron incubar durante 5 semanas a 30°C y 150 rpm. Una vez transcurrido el tiempo indicado, se procedió a la extracción de los hidrocarburos.

### **7.6.1.2. Extracción de hidrocarburos**

El medio se acidificó con 1 gota de ácido clorhídrico y se trasvasó a un tubo de centrifuga de teflón. El matraz del cultivo fue enjuagado con 10 ml de diclorometano (DCM), mismos que se agregaron al tubo de teflón. Las muestras se centrifugaron en un equipo marca Beckman modelo J2-21 a 5000 rpm durante 15 minutos, con el fin de separar la fase acuosa de la fase orgánica y los restos celulares. La fase orgánica se trasvaso a un matraz de bola de 125 ml repitiendo el proceso tres veces. Una vez colectados los 30 ml de fase orgánica en el matraz de bola, este se secó en un rotovapor marca Büchi modelo R-114 a 60°C. El remanente se secó con nitrógeno gaseoso.

### **7.6.1.3. Degradación de hidrocarburos totales**

Los hidrocarburos obtenidos se aforaron con DCM a 1ml y se inyectó 1µl de cada muestra en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 series II acoplado a un detector FID bajo las siguientes condiciones de operación:

Programa del horno.- Temperatura inicial: 40°C, Tiempo inicial: 4 min., Incremento de temperatura: 10°C/min., Temperatura final: 290°C, Tiempo final: 20 min.

Volumen de inyección de muestra: 1µl

Flujos de gas.- Helio (gas acarreador): 0.158 ml/min.

Misceláneos.- Temperatura FID: 290°C, Temperatura del puerto de inyección: 270°C, Modo splitless

Columna.- HP-M5S Longitud: 30m, Diámetro (i.d.): 0.250mm, Tipo de columna: capilar, polaridad intermedia

## **7.6.2. Análisis de fracciones de gasóleo susceptibles a biodegradación**

### **7.6.2.1. Fraccionamiento de gasóleo (SARA)**

El fraccionamiento se realizó por cromatografía en una columna abierta (200 x 10.5 mm i.d.) taponada con fibra de vidrio en el fondo y empacada con sílica gel de 60-200 mallas activada a 75°C durante 2 hrs. La columna se estabilizó con 20 ml de hexano, el gasóleo se pesó y se mezcló con sílica gel. Se puso en la columna y se tapó con un poco de sílica gel limpia. La fracción de saturados se eluyó con 3 volúmenes de

columna de n-hexano a 2.46 ml/min., seguido por la fracción de aromáticos eluida con 3 volúmenes tolueno a 2.46 ml/min.; por último se utilizaron 3 volúmenes de tolueno/metanol 90:10 para eluir las resinas. (Vázquez y Mansoori. 2000). La remoción de solventes se hizo en rotovapor y el remanente se secó con nitrógeno. La fracción de aromáticos fue refraccionada del modo antes descrito con el fin de obtener una mayor purificación. Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante espectroscopia de infrarrojo.

#### **7.6.2.2. Análisis de fracciones degradadas**

Este análisis se realizó mediante CG bajo las condiciones de operación descritas para el análisis de hidrocarburos totales.

#### **7.6.3. Cinética de mineralización de gasóleo**

##### **7.6.3.1. Inóculo**

El inóculo fue propagado consecutivamente en medio NACE hasta una  $OD_{600}=0.3$ , lavado con MSM tres veces y resuspendido en el mismo volumen.

##### **7.6.3.2. Cultivo**

Para este análisis se utilizaron frascos serológicos con tapa de hule con 20 ml de medio MSM. Se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 15 minutos. Una vez alcanzada la temperatura ambiente se adicionaron 100 µl de gasóleo equivalentes a 96.3 mg, como única fuente de carbono. Se inocularon al 20% (v/v). Se incubaron a 30°C y 150 rpm. Los cultivos fueron aireados periódicamente a fin de evitar la limitación de  $O_2$  en la degradación. Este experimento se realizó por duplicado, teniendo como controles, frascos inoculados con cada cepa sin gasóleo, frascos con biomasa muerta y gasóleo y frascos con gasóleo sin biomasa.

##### **7.6.3.3. Cuantificación de producción de $CO_2$**

Se realizó tomando 100 µl de la fase gaseosa contenida en los frascos serológicos cada semana, analizando esta muestra mediante CG con un cromatógrafo Gow Mac, USA, equipado con columna CTR-1 Alltech, USA y detector de conductividad térmica. Las condiciones de operación fueron: gas acarreador, helio; temperatura del inyector 100°C; del horno 35°C y del detector, 100°C. Tomando la siguiente ecuación de la curva patrón:

$$\mu\text{moles de } CO_2 \text{ producido} = 20.008 [\% \text{ área de } CO_2 ]$$



#### **7.6.4. Cinética de mineralización de gasóleo a distintas salinidades**

##### **7.6.4.1. Inóculo**

El inóculo fue propagado consecutivamente en medio NACE-90 hasta una  $OD_{600}=0.3$ , lavado con MSM-90 tres veces y resuspendido en el mismo volumen con MSM a la salinidad correspondiente.

##### **7.6.4.2. Cultivo**

Para este análisis se utilizaron frascos serológicos con tapa de hule con 20 ml de medio MSM con las siguientes salinidades: 50, 75, 100, 150, 200, 250 y 300 g/l de NaCl y 37.5 g/l de NaCl como referencia ya que es la salinidad del mar. Se esterilizaron en autoclave a 20°C durante 15 minutos. Una vez alcanzada la temperatura ambiente se adicionaron 100 µl de gasóleo equivalentes a 96.3 mg como única fuente de carbono. Se inocularon al 20% (v/v). Se incubaron a 30°C y 150 rpm. Este experimento se realizó por duplicado, teniendo como controles, frascos inoculados con cada cepa sin gasóleo y frascos con gasóleo sin inóculo.

##### **7.6.4.3. Cuantificación de moles producidas de CO<sub>2</sub>**

Esta cuantificación se realizó mediante el procedimiento descrito en la sección 7.6.3.3.

#### **7.6.5. Cinética de mineralización de fracciones de gasóleo**

##### **7.6.5.1. Inóculo**

El inóculo fue propagado consecutivamente en medio NACE-50 hasta una  $OD_{600}=0.3$ , lavado con MSM-50 tres veces y resuspendido en el mismo volumen.

##### **7.6.5.2. Cultivo**

Para este análisis se utilizaron frascos serológicos con tapa de hule con 20 ml de medio MSM-50. Se esterilizaron en autoclave a 20°C durante 15 minutos. Una vez alcanzada la temperatura ambiente se adicionaron 93 µl de alifáticos equivalentes a 67.7 mg, 4.5 µl de aromáticos equivalentes a 4.7 mg ó 3.5 µl de resinas equivalentes a 3.4 mg. Dichas fracciones fueron obtenidas mediante el procedimiento descrito en la sección 7.6.2.1. Estas cantidades se consideraron a partir de la composición del gasóleo observada en fraccionamientos anteriores. Los frascos se inocularon al 20% (v/v). Se

incubaron a 30°C y 150 rpm. Este experimento se realizó por duplicado, teniendo como controles, frascos inoculados con cada cepa sin gasóleo, frascos con biomasa previamente esterilizada a fin de monitorear la absorción de hidrocarburos y controles sin biomasa, a fin de descartar la oxidación abiótica.

### **7.6.5.3. Cuantificación de moles producidas de CO<sub>2</sub>**

Esta cuantificación se realizó mediante el procedimiento descrito en la sección 7.6.3.3

### **7.6.6. Degradación de fracciones en concentraciones**

#### **similares**

Con el fin de analizar, cuantificar y comparar la degradación de las tres fracciones de gasóleo, se ensayó la degradación con 100µl de cada una.

#### **7.6.6.1. Inóculo**

El inóculo fue propagado consecutivamente en medio NACE-50 hasta una OD<sub>600</sub>=0.3, lavado con MSM-50 tres veces y resuspendido en el mismo volumen.

#### **7.6.6.2. Cultivo**

Para este análisis se utilizaron frascos serológicos con tapa de hule con 20 ml de medio MSM-50. Se esterilizaron en autoclave a 20°C durante 15 minutos. Una vez alcanzada la temperatura ambiente se adicionaron 100µl de alifáticos equivalentes a 72.8 mg, 100µl de aromáticos equivalentes a 104.3 mg o 100µl de resinas equivalentes a 97.3 mg. Se inocularon al 20% (v/v). Se incubaron a 30°C y 150 rpm. Este experimento se realizó por triplicado, teniendo como controles, frascos inoculados con cada cepa sin fuente de carbono, frascos con biomasa previamente esterilizada y controles sin biomasa.

#### **7.6.6.3. Extracción de hidrocarburos**

Esta extracción se realizó mediante el procedimiento descrito en la sección 7.6.1.2. agregando 100µl de undecano, como estandar externo (E.E.), al inicio de la extracción.

#### **7.6.6.4. Cuantificación de fracciones degradadas**

Para cuantificar la degradación se realizó un análisis mediante cromatografía de gases como se describe en la sección 7.6.1.3. La cuantificación se realizó comparando la

relación de áreas E.E./C.M. (estándar externo/compuesto modelo) entre los controles y las muestras experimentales.

### **7.6.7. Degradación de compuestos modelo**

#### **7.6.7.1. Compuestos modelo**

Se seleccionaron compuestos modelo representantes de cada una de las tres fracciones que componen el gasóleo, se disolvieron en solventes orgánicos no tóxicos y no metabolizados por las cepa ensayada y se adicionaron a una concentración final de 0.4 g/l de cultivo. En la tabla 3 se muestran los compuestos modelo seleccionados y el solvente utilizado para cada uno.

**Tabla 3. Compuestos modelo**

<b>compuesto</b>	<b>fracción</b>	<b>Solvente</b>
octadecano	alifático	THF
escualeno	alifático	THF
antraceno	aromático	THF
criseno	aromático	THF
pireno	aromático	DMSO
carbasol	resina	DMSO
1,4-naftoquinona	resina	DMSO
dibenzotiofeno sulfona	resina	DMSO

#### **7.6.7.2. Inóculo**

El inóculo fue propagado consecutivamente en medio NACE-50 hasta una  $OD_{600}=0.3$ , lavado con MSM-50 tres veces y resuspendido en el mismo volumen.

#### **7.6.7.3. Cultivo**

Para este análisis se utilizaron frascos serológicos con tapa de hule con 20 ml de medio MSM-50. Se esterilizaron en autoclave a 20°C durante 15 minutos. Una vez alcanzada la temperatura ambiente se adicionó la solución de cada compuesto de manera individual, hasta una concentración final de 0.4 g/l de cultivo. Se inocularon al 20% (v/v). Se incubaron a 30°C y 150 rpm. Este experimento se realizó por triplicado, teniendo como controles, frascos inoculados con cada cepa sin fuente de carbono, frascos con biomasa previamente esterilizada y controles sin biomasa.

**7.6.7.4. Extracción de compuestos modelo**

Esta extracción se realizó mediante el procedimiento descrito en la sección 7.6.6.3.

**7.6.7.5. Cuantificación de degradación de compuesto modelo**

Este procedimiento se realizó mediante el procedimiento descrito en la sección 7.6.6.4.

RESULTADOS

Y

DISCUSIONES

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 8.1. Identificación por comparación de secuencia del gen

#### 16S DNA

Para la identificación de los aislamientos, se realizaron los análisis de secuencia del gen 16S. Las secuencias obtenidas mediante la metodología descrita en la sección 7.4., se compararon a través de un mega alineamiento en la base de datos de NCBI, a fin de buscar la mayor identidad filogenética con algún organismo reportado.

De los cuatro aislamientos bacterianos analizados, tres tienen una identidad  $\geq 96\%$  con *Marinobacter* mientras que el restante tiene una identidad de 90% con *Bacillus pumilus* (tabla 4).

Para identificar a un organismo mediante este método, se recomienda que la identidad sea  $\geq 90\%$  para identificar el género y  $\geq 97\%$  para la especie (Janda y Abbott, 2007); por lo que podemos concluir que las cepas 6.25, 8.15b y 5.59 pertenecen al género *Marinobacter*, mientras que 8.I13 pertenece al género *Bacillus*.

**Tabla 4. Identidad de los aislamientos por secuencia de 16S**

cepa	identidad	organismo más cercano
8.15b	97%	• <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>
6.25	96%	• <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>
5.59	96%	• <i>Marinobacter sp.</i> BP-Mb1 • <i>Marinobacter sp.</i> HS225
8.I13	90%	• <i>Bacillus pumilus</i>

En la literatura, *Marinobacter* ha sido frecuentemente asociado a la degradación de hidrocarburos en altas concentraciones salinas, (Gauthier y col., 1992; Huu y col., 1999;

Díaz y col., 2000; Riis, 2003; Nicholson y Fatherpure, 2004; García y col., 2005; Márquez y Ventosa, 2005; Kleinteuber, 2006; Gu y col., 2007). También existen trabajos en donde se reportan organismos del género *Bacillus* como degradadores de hidrocarburos (Kumar y col., 2007; Díaz y col., 2000; Zhuang y col., 2002). En los reportes citados, las actividades hidrocarbonoclastas fueron ensayadas en compuestos puros, por lo que su efecto de degradación en mezclas complejas era, hasta este trabajo, desconocido.

## 8.2. Selección de las cepas

Para seleccionar las cepas con mayor capacidad hidrocarbonoclasta, se inocularon matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de MSM-90 con los 4 aislamientos y con gasóleo como única fuente de carbono, como se describe en la sección 7.1. Después de 5 días de cultivo se presentó turbidez en el medio y opacidad de las gotas de gasóleo. En la tabla 5 se muestra la producción de biomasa, determinada por medio de la cuantificación de proteína soluble, como se describe en la sección 7.2.

**Tabla 5. Incremento de proteína después de 5 días de cultivo**

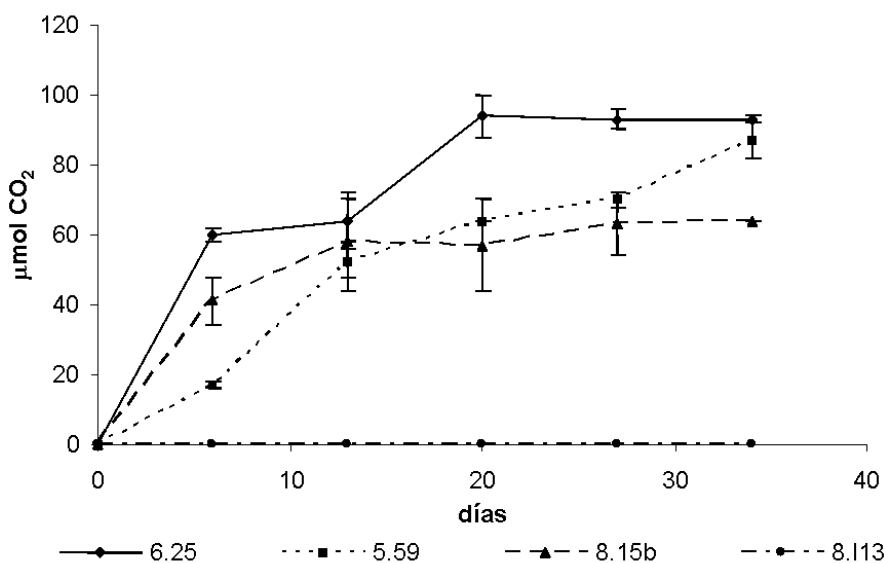
Experimento	[proteína] mg/l		
	t <sub>0</sub>	t <sub>f</sub>	incremento
C.N.abiótico	Blanco	Blanco	-
8.15b	0.562	25.8	25.3
6.25	0.293	22.35	22.06
8.I13	0.498	21.25	20.75
5.59	0.376	17.96	17.58

C.N.- control negativo

El incremento en la proteína soluble mostró un aumento en la biomasa, atribuible a la degradación de gasóleo, ya que fue la única fuente de carbono y energía en este experimento; por lo cual, se confirmó la capacidad de degradación de hidrocarburos como única fuente de carbono y energía, observando un mayor crecimiento en las cepas 8.15b y 6.25.

### 8.3. Cinética de mineralización de hidrocarburos en medio mínimo con 90 g/l de NaCl

Con el fin de corroborar los datos obtenidos en el experimento anterior y analizar si los aislamientos tienen la capacidad metabólica de mineralizar un sustrato complejo como el gasóleo, se hicieron cinéticas de mineralización. Se cuantificó la producción de CO<sub>2</sub> en MSM-90 (Fig. 5), de acuerdo a lo descrito en la sección 7.6.3.



**Figura 5. Mineralización de gasóleo de los cuatro aislamientos.**

Se realizó en 25 ml de cultivo con MSM-90 y 100μl de gasóleo (3.8 g/l), 150 rpm a 30°C. En los controles no se observó producción de CO<sub>2</sub>, por lo que la totalidad del CO<sub>2</sub> producido se relaciona al metabolismo de hidrocarburos.

En la cinética de mineralización se observa que la mayor producción de CO<sub>2</sub> esta dada por las cepas 6.25 y 5.59, sin embargo, la velocidad máxima de mineralización calculada a partir de la pendiente de la fase exponencial (tabla 6), muestra que las cepas más rápidas fueron las cepas 6.25 y 8.15b.



**Tabla 6. Velocidades máximas de producción de CO<sub>2</sub>**

<b>cepa</b>	<b>Velocidad de producción de CO<sub>2</sub></b> ( $\mu$ moles de CO <sub>2</sub> /día)
6.25	10.05
8.15b	8.46
5.59	4.59

No se pudo calcular velocidad de mineralización de la cepa 8.I13, porque no se determinó producción de CO<sub>2</sub>. Estos resultados contrastan con lo observado en la producción de proteína soluble. Ya que las condiciones de este experimento impiden tener una aireación tan eficiente como en el caso del cultivo en matraces, donde la aireación es constante. Podemos suponer que este factor es determinante para la degradación de gasóleo en la cepa 8.I13.

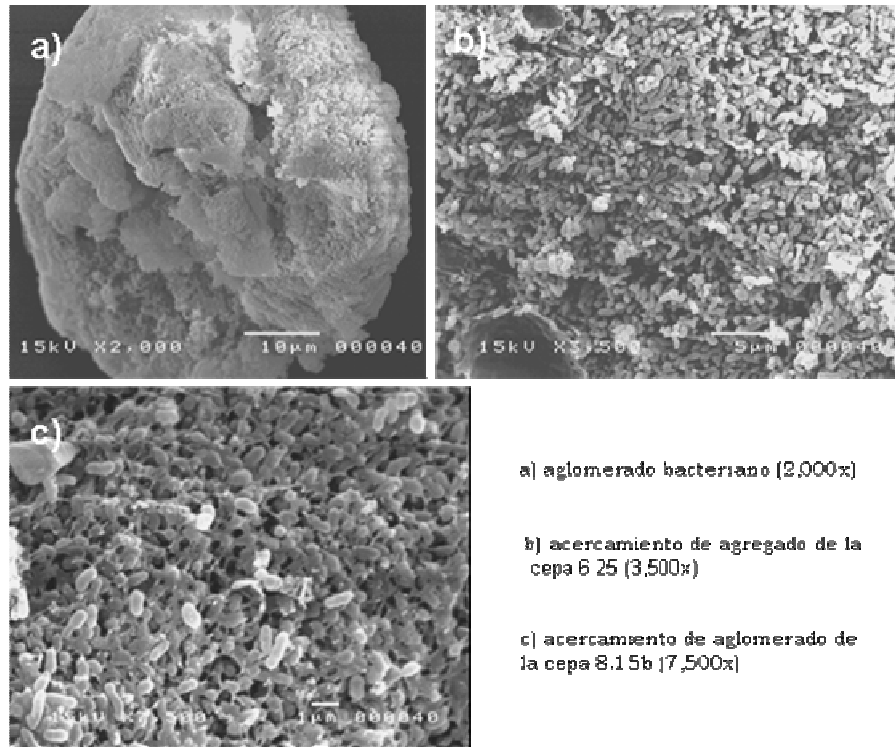
Debido a los resultados observados, se seleccionaron las cepas 8.15b y 6.25 para realizar los siguientes experimentos de degradación de hidrocarburos.

#### *8.4. Agregados celulares*

Durante la propagación de las muestras en medio MSM-90 con gasóleo se observó la formación de gránulos, los cuales no se observaron en el cultivo en medio NACE.

Con el fin de identificar la naturaleza de éstos (presumiblemente agregados celulares), se analizó la muestra mediante microscopía electrónica de barrido, como se describe en la sección 7.3.

En la figura 6 se muestran fotografías donde se observan que los gránulos son agregados celulares, conformados por células con forma de bacilo, asociadas a una superficie lisa de naturaleza no identificada. Cabe mencionar que en el cultivo se observa emulsión del medio hasta 6 semanas de incubación a 30°C.



a) aglomerado bacteriano (2,000x)

b) acercamiento de agregado de la cepa 6.25 (3,500x)

c) acercamiento de aglomerado de la cepa 8.15b (7,500x)

### **Figura 6. Fotografías de microscopía óptica de los agregados celulares.**

Estos agregados se observaron durante la propagación de las cepas 8.15b y 6.25 en MSM -90 con gasóleo como única fuente de carbono, mientras que en medio NACE no se observó formación de aglomerado alguno.

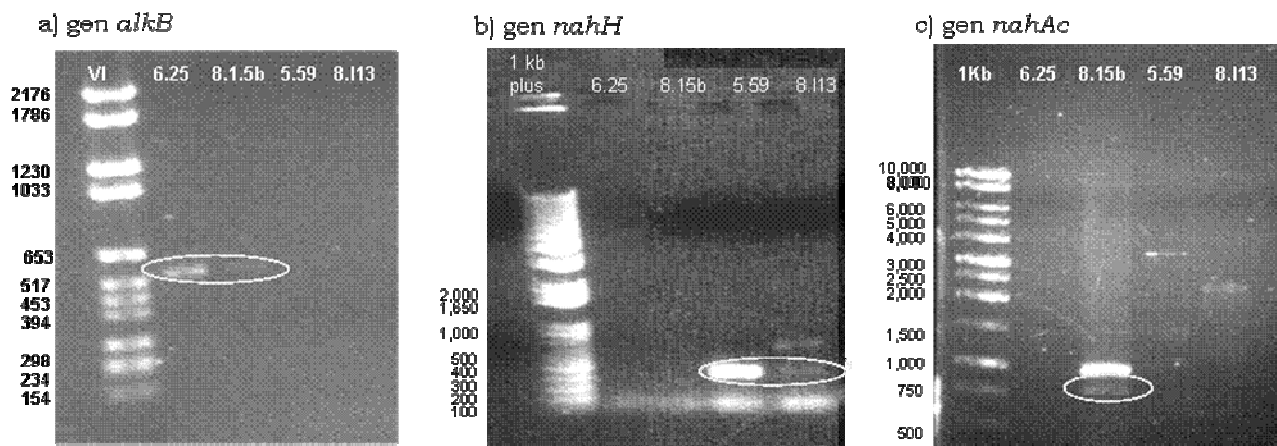
Debido a la formación de estos agregados únicamente en presencia de gasóleo, sumado a la producción del  $\text{CO}_2$  y la proteína soluble producida, podemos inferir que la formación de agregados celulares, está directamente relacionada con la biodisponibilidad del gasóleo. De esta manera se supone que la degradación de hidrocarburos se da mediante contacto directo de la célula con las gotas inmiscibles, dando lugar a la formación de los agregados mostrados en la figura 6. (Bouchez-Naïtali y col., 1999)

La morfología observada en las fotografías concuerda con la morfología reportada para *Marinobacter*: bacilos, sin esporas, con flagelo polar (MicrobeWiki).

## **8.5. Análisis de genes codificantes para enzimas degradadoras de hidrocarburos**

Se realizaron los PCRs descritos en la sección 7.5. con el propósito de buscar fragmentos en el genoma, que sugirieran la presencia de posibles genes homólogos que

codifiquen para algunas enzimas degradadoras de hidrocarburos. Los resultados se muestran en la figura 7.



**Figura 7. PCRs de los genes codificantes para enzimas degradadoras de hidrocarburos.** a) Se observan 2 fragmentos entre 517 pb y 653 pb amplificados a partir de DNA genómico de las cepas 6.25 y 8.15b, utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *alkB* que codifica para la enzima alcano-monooxigenasa. El tamaño esperado es de 537 pb.

b) Se observan 2 fragmentos entre 400 pb y 500 pb amplificados a partir de DNA genómico de las cepas 5.59 y 8.113, utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *nahH* que codifica para la enzima catecol 2,3-dioxigenasa. El tamaño esperado es de 429 pb.

c) Se observa 1 fragmento de alrededor de 750 pb amplificados a partir de DNA genómico de la cepa 8.15b, utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *nahAc* que codifica para la enzima naftaleno 1,2-dioxigenasa. El tamaño esperado es de 702 pb.

Se observó que en el PCR realizado con el genoma de la cepa 8.15b, se amplificó un fragmento que coincide en tamaño, con lo esperado en las amplificaciones realizados con oligonucleótidos específicos para el gen *alkB*, que codifica para la enzima alcano monooxigenasa, y *nahAc* que codifica para la enzima naftaleno-1,2-dioxigenasa (Fig. 7a y 7b).

Estos resultados sugieren la presencia de un gen homólogo al gen *alkB*, que podría codificar para una enzima con la capacidad de oxidar un amplio espectro de alifáticos, ya que la alcano monooxigenasa degrada alifáticos en un rango de C<sub>5</sub> – C<sub>16</sub> (van Beilen y col.,2003).

También se sugiere la presencia de un gen homólogo de *nahAc* que codifica para la naftaleno-1,2-dioxigenasa, la cual ya ha sido reportada en *Marinobacter* (Hedlund y col.,

2001). Es una enzima versátil que participa en un gran número de reacciones: Dioxigenación sobre hidrocarburos aromáticos entre los que destacan: naftaleno, antraceno, fenantreno y fluoreno; sobre aromáticos sustituidos como son: estireno, metoxinaftaleno y 2-nitronaftaleno; y sobre aromáticos heterocíclicos dibenzotiofeno, dibenzofurano, dibenzo-1,4-dioxina e indol; también realiza reacciones de mono-oxigenación, desaturación, O- y N- dealquilación y sulfoxidación. Ente los sustratos destacan: tolueno, etilbenceno, acetofenona, carbasol, *N*-metilanilina, anisol, etil fenil sulfoxido, dibenzotiofeno (*University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database*). Por lo que una enzima proveniente de un gen homólogo de *nahAc* podría dar gran diversidad hidrocarbonoclasta a la cepa.

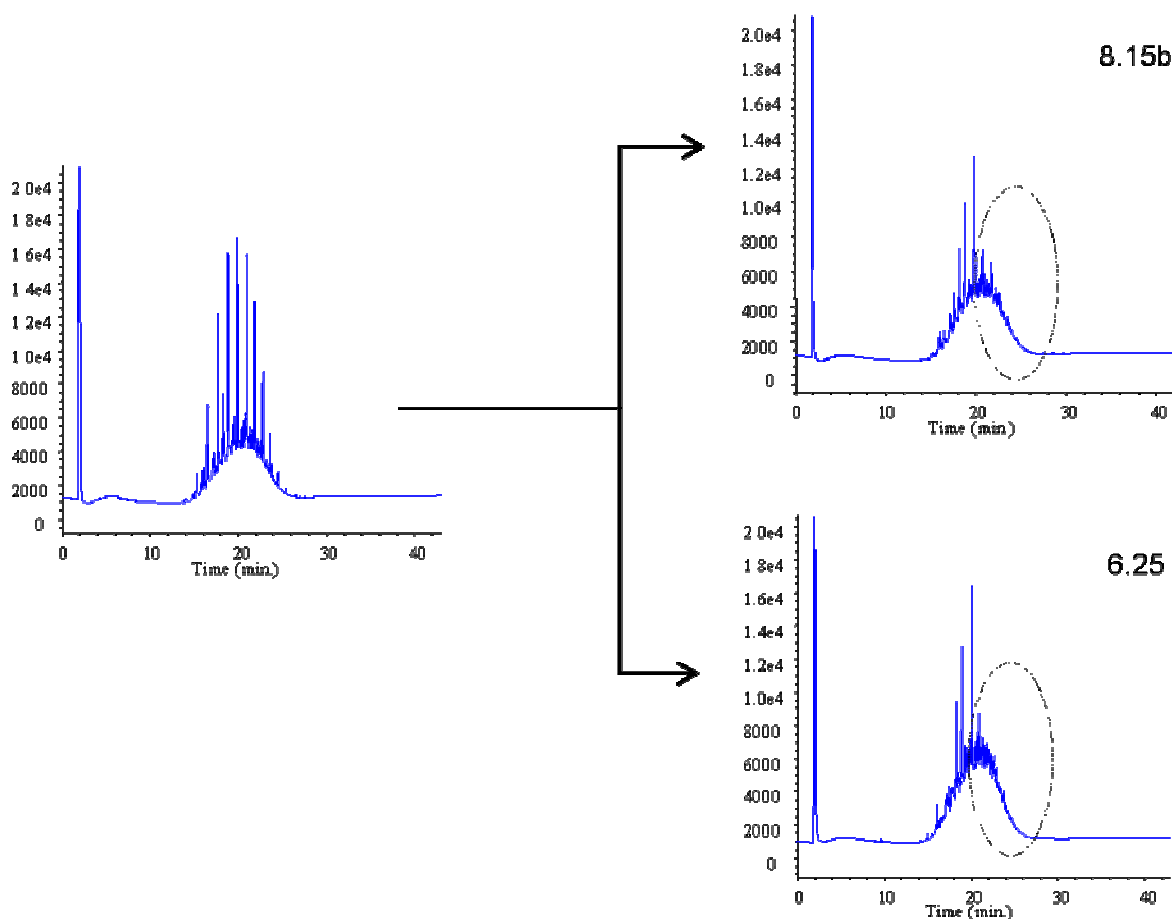
Por su parte, la cepa 6.25 presenta un fragmento amplificado con los oligonucleotidos correspondientes al gen *alkB* que coincide con el tamaño esperado (Fig 8a), lo que también sugiere la presencia de un gen homólogo, que podría codificar para una enzima, con la capacidad de oxidar un amplio espectro de alcanos ya que la alcano monooxigenasa degrada alifáticos en un rango de C<sub>5</sub> – C<sub>16</sub> (van Beilen y col.,2003).

Las cepas 5.59 y 8.I13 presentan un fragmento amplificado con los oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *nahH*, que codifica para la enzima catecol-2,3-dioxigenasa, lo que sugiere la presencia de un gen homólogo (Fig. 7c). Esta enzima es conocida por intervenir en la degradación de benceno, tolueno, xileno y naftaleno (Mesarch y col., 2000), también interviene en las ruta de degradación de 1,4-diclorobenceno, benzoato por hidroxilación, carbazol, estireno, oxidando el catecol como metabolito intermedio de la degradación; también participa en rutas metabólicas de metabolismo secundario (*University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database*), por lo que la presencia de un gen homólogo en el genoma, no daría información concluyente acerca de su capacidad de degradación de hidrocarburos.

Aunque el análisis haya dado negativo en los PCRs para genes homólogos de *alkB* y *nahAc* en 5.59 y 8.I13, no se puede descartar su presencia en el genoma, ya que una baja identidad de secuencia podría dar falsos negativos.

## 8.6. Degradación hidrocarburos totales de gasóleo

Para analizar la degradación de los hidrocarburos totales del gasóleo de manera cualitativa, se realizó un cultivo de 5 semanas de acuerdo a lo descrito en la sección 7.6.1. Se ensayaron las cepas 8.15b y 6.25, debido a que fueron las que tuvieron mayor crecimiento de acuerdo a los resultados presentados anteriormente (secciones 8.2. y 8.3.). Los cromatogramas obtenidos muestran un patrón de degradación en el que los hidrocarburos más pesados se reducen en mayor proporción (fig. 8).



**Figura 8. Degradación de hidrocarburos totales de gasóleo** Este experimento se realizó en MSM-90 con 100 $\mu$ l de gasóleo como única fuente de carbono y energía (96.3 g/l), a 30°C, 150 rpm durante 5 semanas, mostrando la degradación con respecto a los controles. Se puede apreciar la desaparición de los picos con tiempos de retención mayores, indicados con un círculo punteado, que corresponden a los alifáticos de cadena larga, poliaromáticos y resinas.

Este patrón cromatográfico de degradación no es común, ya que en general los microorganismos degradan preferencialmente a los componentes de bajo peso molecular

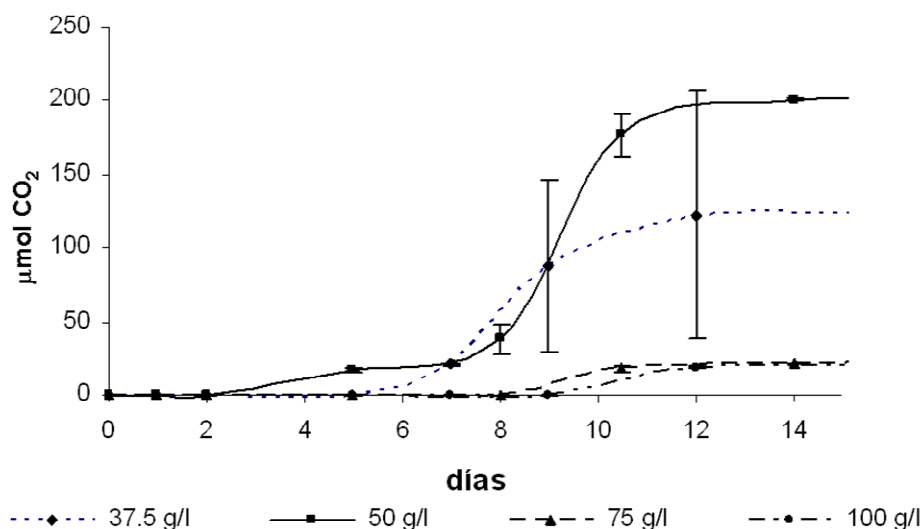
(Venkateswaran y col., 1995). Aunque *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* es conocida por su habilidad de degradar alcanos de cadena larga (Ballihaut y col., 2004).

### 8.7. Cinética de mineralización de gasóleo a distintas salinidades

Una vez comprobada la capacidad hidrocarbonoclasta de las cepas y con el propósito de encontrar las condiciones hipersalinas más favorables para la degradación de hidrocarburos se ensayaron las cepas 8.15b y 6.25 de acuerdo al protocolo descrito en la sección 7.6.4.

Las cinéticas a distintas salinidades se realizaron en MSM a pH 7 y 30°C, ya que han sido reportadas como las condiciones óptimas de crecimiento para el género *Marinobacter* (Huu y col., 1999; Gauthier y col., 1992).

En las figuras 9 y 10 se muestran las curvas mineralización a 37.5, 50, 75 y 100 g/l de NaCl de la cepas 6.25 y 8.15b respectivamente, ya que fueron las salinidades en las que se detectó producción de CO<sub>2</sub>,



**Figura 9. Cinética de mineralización de gasóleo de la cepa 6.25 a distintas salinidades.** Estos ensayos se realizaron por duplicado en MSM con 100μl de gasóleo como única fuente de carbono y energía (3.8 g/l), considerando 37.5g/l de NaCl como salinidad de

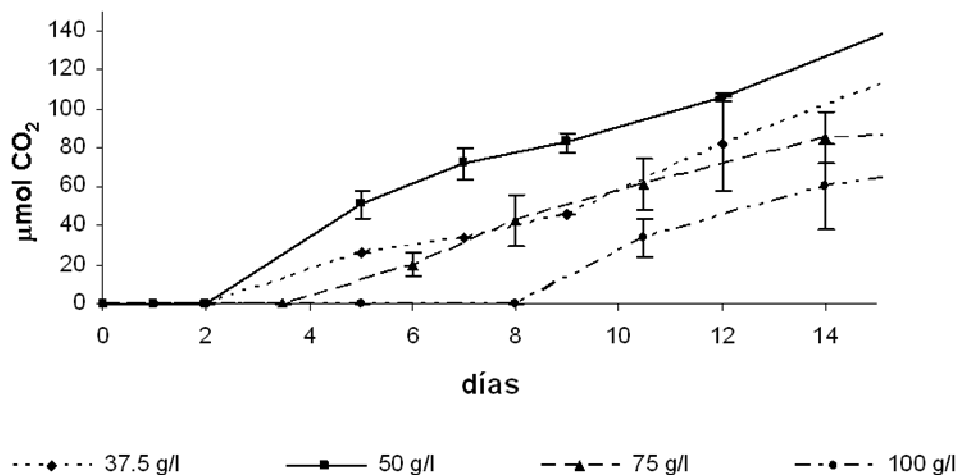
referencia, ya que es la salinidad del mar. Concentraciones mayores son consideradas hipersalinas. Las condiciones de cultivo fueron 30°C y 150 rpm.

En la cepa 6.25 se observa que la fase de latencia se prolonga conforme aumenta la salinidad, Sin embargo esto no sucede con la cinética a 50 g/l de NaCl, siendo ésta la fase de latencia más corta (fig. 9). En la tabla 7 se muestran las velocidades máximas en la producción de CO<sub>2</sub> a partir de gasóleo, obteniendo la máxima velocidad en 50 g/l de NaCl, lo que sugiere que de las condiciones hipersalinas ensayadas (>37.5 g/l de NaCl), la salinidad que favorece la degradación de hidrocarburos es la de 50 g/l.

**Tabla 7. Velocidades máximas de producción de CO<sub>2</sub> de la cepa 6.25**

salinidad (g/l)	V.max (μmol CO <sub>2</sub> /día)
37.5	33.5
50	<b>55.6</b>
75	7.2
100	6.3

En el caso de la cepa 8.15b se observa que la fase de latencia correspondiente a 37.5 g/l y 50 g/l tiene la misma duración, sin embargo seguimos observando el patrón de retardo conforme aumenta la salinidad (fig. 10), concordando con los resultados obtenidos por Gauthier y col. (1992).



**Figura 10. Cinética de mineralización de gasóleo la cepa 8.15b a distintas salinidades.** Estos ensayos se realizaron por duplicado en MSM con 100μl de gasóleo como

única fuente de carbono y energía (3.8 g/l), considerando 37.5g/l de NaCl como salinidad de referencia, ya que es la salinidad del mar. Concentraciones mayores son consideradas hipersalinas. Las condiciones de cultivo fueron 30°C y 150 rpm.

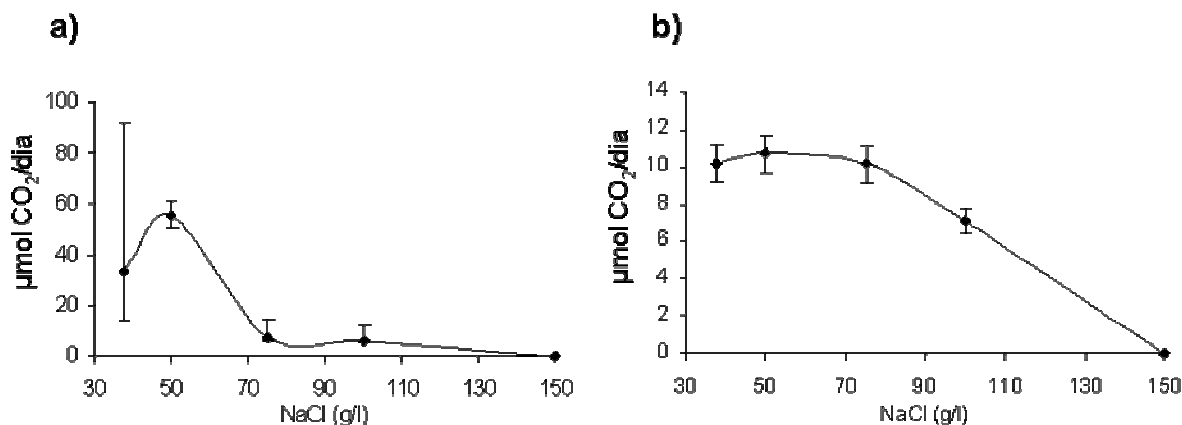
En la tabla 8 se muestran las velocidades máximas de producción de CO<sub>2</sub> de la cepa 8.15b a partir de gasóleo, observando que la mayor velocidad se da en 50 g/l, aunque la diferencia entre las velocidades a 37.5 g/l, 50 g/l y 70 g/l no es muy significativa, lo que podría indicar una halotolerancia mayor con respecto a la cepa 6.25.

**Tabla 8. Velocidades máximas de producción de CO<sub>2</sub> de la cepa 8.15**

salinidad (g/l)	V. max (μmol CO <sub>2</sub> /día)
37.5	10.1
50	<b>10.7</b>
75	10.1
100	7.1

Gauthier y col. (1992) reportaron, en *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, un mejor crecimiento a una concentración 0.6 M de NaCl, equivalente a 35 g/l de NaCl, con eicosano como sustrato. En nuestro estudio no se ensayó dicha salinidad, debido a que no esta considerada dentro del rango de hipersalinidad, a pesar de ello, la salinidad más baja ensayada fue cercana, la curva de salinidad (fig 11b) de la cepa 8.15b muestra un comportamiento de campana , y no una pendiente negativa como se esperaría si la salinidad más favorable estuviera por debajo de las salinidades ensayadas. La inconsistencia en los reportes puede deberse al tipo de sustrato y al trato previo del cultivo o, a la posible diferencia de especie. En lo concerniente a la cepa 6.25, la curva de salinidad presenta un amplio error en el punto de 37.5 g/l (fig 11a), por lo que los resultados no pueden ser comparados con los reportados por Gauthier y col., 1992, sin embargo para fines de este estudio las salinidades de interés conciernen a las que están por encima de 37.5 g/l.





**Figura 11. Curvas de salinidad.** a) curva de salinidad de la cepa 6.25, graficando las distintas concentraciones de salinidad vs. las velocidades máximas reportadas en la tabla 7.

b) curva de salinidad de la cepa 8.15b, graficando las distintas concentraciones de salinidad vs. las velocidades máximas reportadas en la tabla 8.

Una vez encontrada la condición hipersalina favorable para la degradación de hidrocarburos, que en ambos casos resultó ser de 50 g/l de NaCl, se realizaron cinéticas de mineralización de gasóleo y sus fracciones.

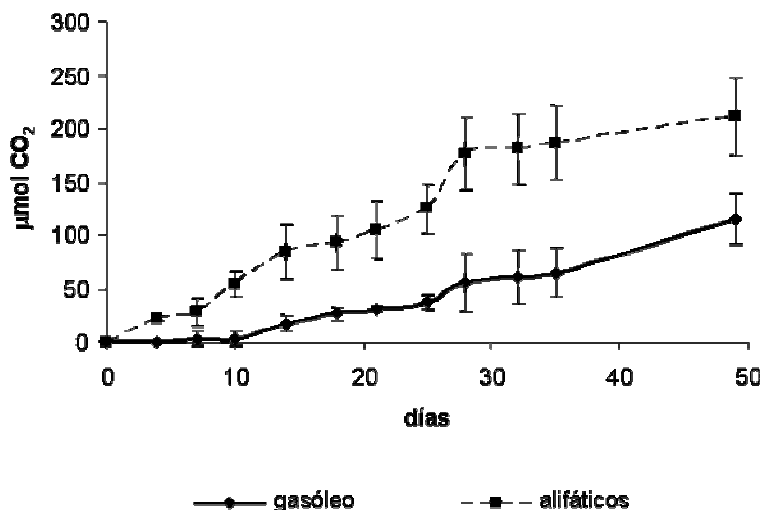
### 8.8. Cinética de mineralización de fracciones de gasóleo.

Con la finalidad de estudiar la degradación de los distintos compuestos del gasóleo, se realizaron cinéticas de mineralización de las distintas fracciones que lo componen (alifáticos, aromáticos y resinas), utilizando el volumen de cada una de las fracciones equivalente al volumen en el que se encuentran en 100µl de gasóleo; como se detalla en la sección 7.6.5.

En la cepa 6.25 se observó que la producción de CO<sub>2</sub> es mayor en la degradación de alifáticos que en el gasóleo, no observándose degradación en resinas y aromáticos (fig. 12), lo que, aunado a los resultados del análisis de genes codificantes para enzimas degradadoras de hidrocarburos mostrados en la sección 8.5., sugiere, no sólo la presencia de un gen homólogo a *alkB*, también su posible expresión en una proteína degradadora de hidrocarburos alifáticos.

El patrón observado en la mineralización de gasóleo y la fracción alifática es muy similar en ambos casos (fig. 12), por lo que se sugiere que la mineralización observada en el

gasóleo es totalmente atribuible a la fracción alifática. El comportamiento muestra más de una fase exponencial, lo que nos hace suponer que, dentro de ésta fracción, la cepa encuentra distintos sustratos. También se observa una mayor producción de CO<sub>2</sub> en la mineralización de alifáticos en comparación con el que se produce con gasóleo (fig. 12), lo que hace suponer una inhibición por parte de las otras fracciones (aromáticos y/o resinas), que al no ser metabolizables pueden inhibir la degradación de la fracción alifática que si lo es (Johnsen y col., 2005).

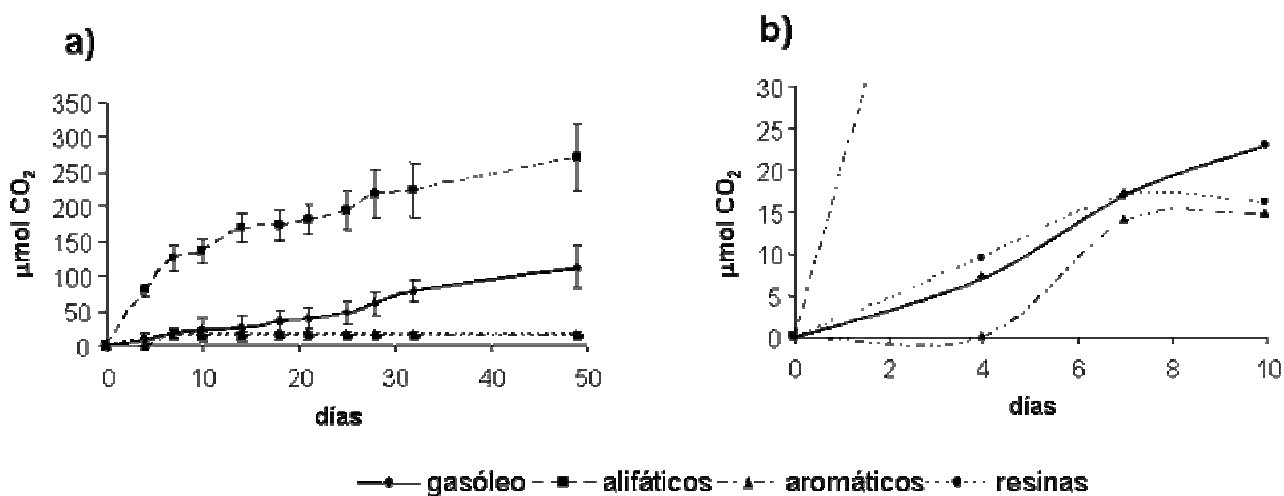


**Figura 12. Cinética de mineralización de gasóleo y alifáticos de la cepa**

**6.25.** En MSM-50 con 100μl de gasóleo (3.8 g/l), o con 93μl de alifáticos (2.7 g/l), equivalentes a la fracción alifática de 100μl de gasóleo, según se indica, a 30°C y 150 rpm..

En la cepa 8.15b se observa mineralización de las tres fracciones. En la figura 13 se observa un comportamiento de más de una fase exponencial en la mezcla de gasóleo, mientras que en las tres fracciones se observa un comportamiento de Monod; lo cual nos sugiere el metabolismo de un sólo sustrato en cada fracción. Estos resultados demuestran que la cepa cuenta con la batería enzimática necesaria para degradar las tres fracciones de gasóleo como única fuente de carbono. Lo anterior, aunado a los resultados del análisis de genes codificantes para enzimas degradadoras de hidrocarburos mostrados en la sección 8.5.; sugiere, no sólo la presencia de genes homólogos a *alkB* y *nahAc*, también su posible expresión en proteínas degradadoras de hidrocarburos cuyos sustratos sean tan diversos como los correspondientes a la alcano monooxigenasa y a la naftaleno 1,2-dioxigenasa. Sin

embargo, no se puede descartar la participación de otras enzimas en la degradación de las distintas fracciones.



**Figura 13. Cinética de mineralización de gasóleo y sus fracciones de la cepa 8.15b**

a) Mineralización de gasóleo y sus fracciones en MSM-50 con 100µl de gasóleo (3.8 g/l); o con 93µl de alifáticos (2.7 g/l), equivalentes a la fracción alifática de 100µl de gasóleo; o con 4.5µl de aromáticos (0.18 g/l), equivalentes a la fracción aromática de 100µl de gasóleo; o con 3.5µl de resinas (2.7 g/l), equivalentes a la fracción polar de 100µl de gasóleo, según se indique, a 30°C y 150 rpm

b) Acercamiento de la fase inicial, con el objetivo de demostrar de manera más detallada la degradación de aromáticos y resinas

En la cepa 8.15b, se observa una disminución en la velocidad de la mineralización de la mezcla compleja (gasóleo) con respecto a las fracciones alifática y aromática, lo que sugiere una inhibición por parte de las resinas. Así mismo, se observa que las velocidades de degradación de alifáticos y aromáticos es mayor que en gasóleo y la diferencia entre las velocidades de degradación entre gasóleo y resinas son muy similares.

Se realizó un balance estequiométrico del carbono mineralizado a partir de formulas mínimas para las tres fracciones y el gasóleo. Los resultados se muestran en la tabla 9. Observando una mayor mineralización de las resinas en comparación con las otras fracciones (alifáticos y aromáticos) e inclusive con el gasóleo. Este comportamiento resulta atípico ya que las resinas son compuestos recalcitrantes (Venkateswaran y col., 1995; Boukir y col., 2001; Fernandez-Alvarez y col., 2006). El género *Marinobacter* también ha sido asociado en la degradación de moléculas aromáticas (Hedlund y col., 2001; García y col 2005), sin embargo no hay estudios que reporten su capacidad de degradar resinas ni

mezclas complejas de hidrocarburos. Existe un único reporte de un aislamiento de *Pseudomonas sp.* capaz de crecer con resinas como única fuente de carbono (Venkateswaran y col., 1995). Aunque los resultados no son comprobables ya que se trata de géneros y condiciones distintas. El estudio citado tampoco hace un comparativo en cuanto a la degradación de las otras fracciones. Sin embargo deja abierta la posibilidad de encontrar organismos con estas facultades.

Debido a estos hallazgos y con el fin de hacer comparables los valores de degradación, se decidió seguir con estudios de degradación de cantidades equivalentes de las fracciones como sustrato con la cepa 8.15b.

**Tabla 9. Balance estequiométrico de carbono mineralizado por la cepa 8.15b**

<b>fracción</b>	<b>gasóleo</b>	<b>alifáticos</b>	<b>aromáticos</b>	<b>resinas</b>
Composición elemental (%)	C: 87.25	C: 85.7	C: 85.2	C: 81.8
	H: 11.5	H: 13.9	H: 10.4	H: 9.5
	S: 1.05			S: 3.76
	O: 0.04			O: 3.9
	N: 0.01			N: 1.04
Vol. Adicionado ( $\mu$ l)	100	93	4.5	3.5
CO <sub>2</sub> producido ( $\mu$ moles)	113,05	270,77	14,7	16
% de C metabolizado	1.64	5.21	6.68	12.31

### 8.9. Degradación de las fracciones de gasóleo a concentraciones iguales

Estos experimentos se realizaron conforme al protocolo descrito en la sección 7.6.6.

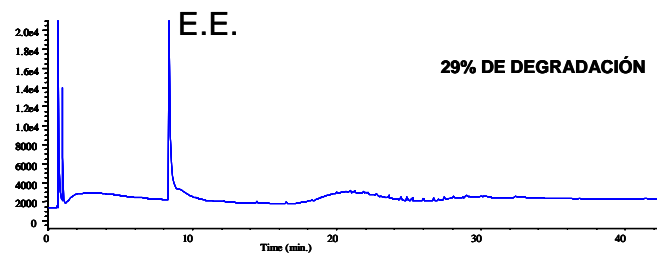
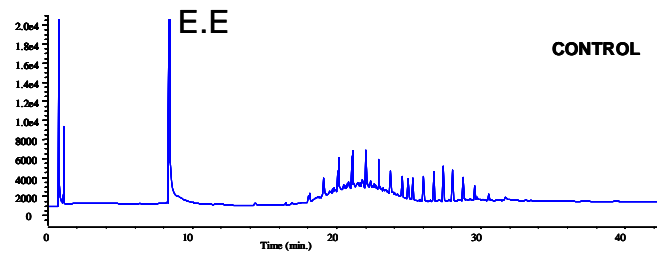
Al someter a la cepa 8.15b a la degradación de las tres fracciones de manera independiente y en volúmenes equivalentes (hasta 50 veces más en el caso de las resinas en comparación a lo expuesto con el gasóleo).

A nivel cualitativo, la degradación en alifáticos resulta evidente en los cromatogramas, donde se observa que la degradación no es excluyente de algún tamaño específico de cadena alifática. En el caso de los aromáticos, al no observar un cambio en el

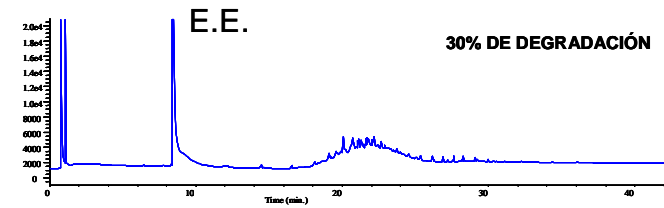
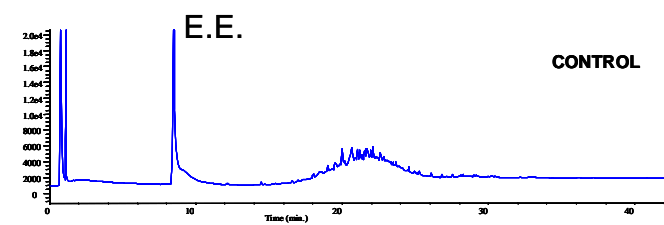
perfil del cromatograma pero si en la cantidad, se puede suponer que la degradación es global, al igual que en la fracción de resinas.

A nivel cuantitativo se observó que el mayor porcentaje de degradación en ocho semanas de cultivo se dio en 10 $\mu$ l de aromáticos y 10 $\mu$ l de alifáticos de manera equivalente, debido, tal vez, a que al tener una menor concentración de sustrato, la cantidad metabolizada representa un mayor porcentaje. Mientras que en las resinas únicamente se presentan los datos con 100 $\mu$ l de sustrato y una degradación equivalente al 18%, ya que los datos a 10 $\mu$ l no fueron reproducibles (fig. 14), por lo cual los datos no pueden ser comparados.

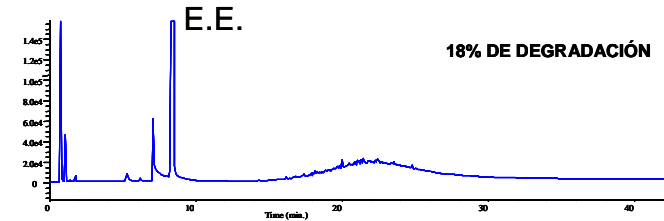
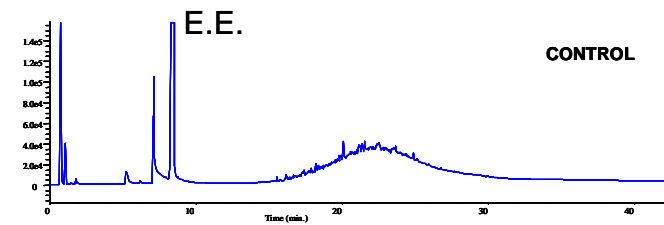
a) alifáticos



b) aromáticos



c) resinas



E.E.: estandar externo

### Figura 14. Degradación de las tres fracciones por la cepa 8.15b.

Los experimentos se realizaron por duplicado en MSM-50, a 30°C y 150 rpm durante 8 semanas.

- a) control abiótico y muestra experimental de 10µl de alifáticos (0.29 g/l), con un 29% de degradación con respecto al control.
- b) control abiótico y muestra experimental de 10µl de aromáticos (0.41 g/l), con un 30% de degradación con respecto al control.
- c) control abiótico y muestra experimental de 100µl de resinas (3.9 g/l), con un 18% de degradación con respecto al control.

### 8.10. Degradación de compuestos modelo

Si bien, en los experimentos anteriores se analizó la degradación de las fracciones del gasóleo, en este experimento se pretendió analizar la degradación de las distintas clases de compuestos que conforman cada fracción. En base a ello se seleccionaron 8 distintos compuestos que se enlistan en la sección 7.6.7.

En la tabla 10 se muestra el porcentaje de degradación de los compuestos ensayados a una concentración de 0.4 mg/ml después de 8 semanas de cultivo. Observando que la mayor degradación después de la naftoquinona, se presenta en el octadecano, seguido de antraceno, criseno y carbazol y los compuestos menos degradados son escualeno y DBTS. En el pireno no se observó degradación.

**Tabla 10. Degradación de compuestos modelo**

<b>compuesto</b>	<b>% degradado</b>
octadecano	97.9
antraceno	75.1
criseno	51.8
carbazol	40.2
DBTS	15.2
escualeno	14.6
naftoquinona	100
pireno	0

La degradación de criseno, pero no de pireno sugiere la presencia de rutas específicas en la degradación de compuestos poliaromáticos; la degradación de naftoquinona, DBTS y carbasol indica una amplia diversidad metabólica que abarca los hidrocarburos polares.

Los resultados observados confirman la presencia de una o varias enzimas cuyo sustrato es o son alifáticos ramificados con instauraciones como el escualeno, aunado con los resultados observados en los análisis de genes codificantes para enzimas degradadoras, se sugiere que, el o los genes que codifican para las enzimas presentes en la cepa 8.15b son homólogos del gen *alkB*, ya que en la degradación de escualeno, se han asociado enzimas tipo Gpo1 provenientes del gene *alkB* en la conversión de alcanos lineales, ramificados, cíclicos, así como alquenos y aromáticos con sustituciones alifáticas a sus correspondientes alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos y epóxidos (van Beilen y Funhoff, 2007).

La presencia de una enzima funcional codificada por un gen homólogo de *nahAc*, justificaría la degradación observada sobre antraceno, DBTS y carbazol (*University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database*).

La degradación de octadecano no se justifica por la posible presencia de una enzima proveniente de un gen homólogo de *alkB* ya que la alcano monooxigenasa tiene la capacidad de degradar alifáticos en un rango de C<sub>5</sub>-C<sub>16</sub> (Van Beilen y col., 2003); por lo que se puede suponer la existencia de alguna otra enzima distinta con la capacidad de oxidar al octadecano y a los alifáticos de cadena larga presentes en el gasóleo. A últimas fechas se ha sugerido la presencia de la enzima proveniente del gen *almA*, capaz de metabolizar alcanos de hasta C<sub>40</sub>, encontrada en *Acinetobacter*; ya que, un análisis de homología de secuencia sugiere la presencia de enzimas similares en el cromosoma de *Marinobacter aquaolei* (Wentzel y col., 2007).



CONCLUSIONES  
Y  
PERSPECTIVAS

---

## 9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se realizaron cuatro aislamientos bacterianos de tanques de desalinización de petróleo con capacidad de crecer en gasóleo como única fuente de carbono y por tanto con capacidad degradadora de hidrocarburos en medio hipersalino. Los cuatro aislamientos forman agregados celulares con gotas de gasóleo como núcleo.

Tres de los aislamientos se asignaron al género *Marinobacter*, mediante secuenciación y comparación del gen 16S; mientras el aislamiento restante se asignó al género *Bacillus*.

Las fotografías de microscopía electrónica de barrido sugiere que *Marinobacter* 8.15b y 6.25 acceden al sustrato inmisible a través de contacto directo con las gotas de gasóleo.

Las dos cepas con mayor crecimiento y velocidad mineralización son *Marinobacter* 6.25 y *Marinobacter* 8.15b, las cuales, presentan degradación en un espectro de salinidad que va de 37.5 g/l de NaCl hasta 100 g/l, con un retardo en la fase de latencia a medida que la salinidad aumenta. De las condiciones hipersalinas ensayadas, la más favorable para la degradación de gasóleo es a 50 g/l de NaCl para ambas cepas.

*Marinobacter* 6.25 tiene la capacidad de mineralizar la fracción alifática, mientras que los otros componentes del gasóleo presentan un efecto inhibitorio en la degradación de estos, por lo que la velocidad de mineralización del gasóleo es menor que la de la fracción alifática; mientras que 8.15b, muestra un espectro mas amplio de degradación y mineralización sobre alifáticos, aromáticos y resinas de manera independiente aún a concentraciones 50 veces mayores las expuestas en el gasóleo.

Los ensayos realizados para encontrar posibles genes homólogos de *alkB*, *nahAc* y *nahH* en el DNA bacteriano de ambas cepas sugieren la presencia de un gen homólogo de *alkB* en *Marinobacter* 6.25 y genes homólogos para *alkB* y *nahAc* en *Marinobacter* 8.15b, lo que concuerda con la degradación de los alcanos ligeros de la fracción alifática, escualeno, dibenzotiofeno sulfona, antraceno y carbazol observada por esta cepa. Por su parte, la degradación observada sobre alifáticos de cadena larga como son el octadecano plantea la presencia de enzimas degradadoras de alifáticos más pesados que los conocidos para la alcano monooxigenasa codificada por el gen *alkB*. Al parecer, los presuntos genes homólogos de *alkB* y *nahAc*, están involucrados con la capacidad de *Marinobacter* 8.15b de

degradar y mineralizar las distintas fracciones de gasóleo, aunque seguramente no son las únicas.

La degradación de compuestos polares, como la naftoquinona, y de aromáticos, como criseno, nos habla sobre una amplia diversidad catabólica que metaboliza una amplia gama de hidrocarburos con distintas estructuras y propiedades; aunque la ausencia de degradación en pireno también nos confirma la especificidad en estas rutas catabólicas.

La amplia diversidad catabólica en hidrocarburos, aunado a su tolerancia a altas concentraciones de sal, hacen de *Marinobacter 8.15b* un microorganismo muy interesante desde el punto de vista ambiental. Estas propiedades justifican el continuar los estudios con *Marinobacter 8.15* para fines de biorremediación en ambientes hipersalinos.

La degradación de resinas nunca había sido estudiada en bacterias halófilas. Las enzimas involucradas, rutas de degradación, la investigación sobre sustratos preferenciales en esta fracción y la posible degradación sobre hidrocarburos aún más recalcitrantes como los asfaltenos siguen siendo interrogantes.

La relevancia de estas investigaciones radica en que, a pesar de que los ambientes hipersalinos representan un bajo porcentaje de los ecosistemas naturales, gran parte de los efluentes responsables de la contaminación con hidrocarburos son hipersalinos. Sin embargo la degradación de hidrocarburos en éstos ambientes a sido poco estudiada, debido a la de por si escasa actividad hidrocarbonoclasta que se registra en la diversidad microbiana, diversidad que disminuye conforme la salinidad aumenta.

# APÉNDICE

---

## APÉNDICE

### ***A.1. Secuencias del gen 16S para identificación de cepas aisladas***

#### **cepa 8.15b**

5'...NNNANATTGACGCATGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGGGGTAGCT  
 TGCTACCCGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCAGTAGTGGGGGATAG  
 CCCGGGAAACCCGGATTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGACCTTGC  
 GCTATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGT  
 AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGNNCTGAGACACGGCCCGAACTCCTACGGGAGGCAG  
 CASTGGGGVMTATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTT  
 CGGGTTGTAAGCACTTTCAGTAGGGAGGAAAACCTTATGGCTAATACCCATGAGGCTTGACGTTACCT  
 ACAGAAGAAGCACCGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG  
 GAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGGTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTTAACC  
 TGGGAACGGCATTTCGAAACTGTCAGACTAGAGTGTGKTARAGGGTAGTGRAATTTCTGTGTAGCGG  
 NTGAAATGCGTAGATWTAGGAAGGAACMCCAGTGGYGAAGGCGGYTACCTGGACCAACACTGACACT  
 GAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTARATACYCTGGTAGTCYACGGCCGTAAACSATGTCA  
 ACTAGCCGTTGGGACTCTTGAAGTCTTAGTRGCGCAGCTAACGCACTAAGTTGACCGCTGGRGAGTA  
 YGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGSVGGCSYGCACAAGCRGATGGAGCATGTGGTTTAA  
 TTCGACGCAACGCGAAGAAYCTTAYCTRGYCTTGACATCCAGASAACCTTCCAGAGATGGATTRSTGCC  
 TTCGRGAACTCTGARACAGGTGCTGCATRGCCGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTC  
 CCGTAACGAGCGCAACCCCTATCCCTGGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCCAGGGAGACTGCC  
 GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACA  
 CGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCCAACTCGCGAGAGTGAGCCAATCCCTTAAACGCGTC  
 GTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCYGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAT  
 GTCGCGRTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGATTGCACCA  
 GAAGTAGTTAGTCTARCCTTCGGGAGGACGATTACCACGGTGTGRTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTA  
 ACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGMKGCTGGATCACCTCCTTAGTTTGGGATTCCCGGAAACTTGC  
 GGCCGTACTCCCAGGCGGTCAACTTACTGCGGTAGCTGCGCACTAAGACTTCAGAGTCGCAACGGC  
 TAGTTGACATCGTTTACCGGCGGCACTACCAAGGCATCTAAGCTGGTTTGGTCCGAGGCTATCGCAC  
 CTCAGTGCCGGGGTGGCCCAGGTAGCCGCCTTCCCCACTGGGGTTGCTTCTATACTACCAATTGCAC  
 CGCTACAAGGAAATTCCTACTACCCTCTACACACTTAGGCTGAAGATTCAATGCGATGCAGGTGAGCCCG  
 GGCTTCCATTCGGTACAAACCCATACCCGCTGAGCCCACGATTCGATAACGCTTGACTCTCGAT...3'

#### **cepa 6.25**

5'...GGGGCAATTGGACATGGGGGCACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTT  
 TCGGGTTGTAAGCACTTTCAGTAGGGAGGAAAACCTTATGGCTAATACCCATGAGGCTTGACGTTACC  
 TACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATC  
 GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGGTAAGCGAGATGTGAAAAGCCCCGGGCTTAAC  
 CTGGGAACGGCATTTCGAACTGTCAGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGTGGAATTTCTGTGTAGCGG  
 TGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACACTGACAYTGA  
 GGTGCSRAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATWCCYTGGTAGTCCAMGCCGTAAMSRWTGTCAAC  
 TAGCCGTTGGGACTCTTGAAGTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCACTAAGTTGACCGCTGGGGAAAGTAC  
 GGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGRGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT  
 YGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATCCAGAGAACCTTCCCAGAGATGGATTGGTGC

CCTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGRGTAAAGT  
 CCCGTAACGAGCGCAACYCCTATCCCTGGWTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCCAGGGAGACTGC  
 CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGSATGACGTCAGGTCATCATGGCCCTTACGGCCARGGCTACAC  
 ACGTGCTACAATGGCSSGTACAGARGGCTGCCAACTCSCRRRRTGAGCCAATCCYTAAAACGCGTC  
 GTAKTCCGGATCGGAGYYKCAACTCGACTCCGTGAAGTCSGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAT  
 GTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCATGGGAGTGATTGCACCA  
 GAAGTAGTTAGTCTARCCTTCGGGAGGACGATTACYACGGTGTGRTTCATGACTGGKKSAAAGTSSYGAA  
 YWSKWSSMSWASRGARCYWKSRYYSATSRMYKMRSTTTGGAATCCTGGAGGGTCCCACCCTTAGA  
 ATTTAAATGCTGGGTTGCCACAGCCACCTTCTCCACTGTGTTCTCCTTATTATAACCATTACCGTACAC  
 GGAATTCATTACTTTATCGACTCTAGCTGAAGATCCAATGCGTTTCAGGTAAGCCGGGGTTTCAATCTG  
 CTTTTCAAAAACCTACGCGTTAGCA...3'

**cepa 5.59**

5'...ATGGGGGGGTTTGGACATGGGGGCACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGC  
 TTTCCGGTTGTAAAGCACTTTCAGTGAGGAGGAAAACCTTAAGGTTAATACCCTTGAGGCTTGACGTTA  
 CTCACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAA  
 TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGATAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTTA  
 ACCTGGGAACGGCATTTCGAACTGTCGGGCTAGAGTATGGTAGAGGGTAGTGGAATTTCTGTGTAGC  
 GGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAATACTGACACT  
 GAGGTGCGAAAGCGTKRGRAGCAAACAGGATTAGATACCYTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAA  
 CTAGCCGTTGGGATCTTGAATCCKTAGTGCGCAGCTAACGCACTAAGTTGACCGCCTGRGGAGTAC  
 GGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTRGAGCATGTGGTTTAATT  
 CGACGCAACGCGWAGAACCTTACCTGGYCTTGACATCCTGCGAACTTTCTAGAGATAGATTGKTGCCT  
 TCGGGAACGCASTGACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTC  
 CCGTAACGAGCGCAACYCCTATCCCTAGTTGCTAGCAGTTCGGCTGARAACCTTAGGGCAGACTGCCK  
 GTGACAAACCKGAGGAWGSTGGGATGACGTCAGGTCATCATGKCCCTTACGGCCAAGGCTAACACA  
 CGTGCTACAATGRCGCGCACAGAGGGCTAGCAAACCTCGCGAGGGTAAGCCAATCKCTTAAAMCGTCG  
 TMKTMGWYCGSAATCTGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCA  
 GAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCATGGGAGTGATTGC  
 ACCAGAAGTGGTTAGTCTAAYCTTTCGGGAGGACGATCACCACGGTGTGGATTTCATGACTGGGGTGAA  
 GTCGTAACMAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCWRCTGCATCACTACTAGCTTTGTGGAATCCTGGAAG  
 GCTCCCAACCCTATTCGCACCTAGATGTCAGGAATGGTTCCAGTAGCCGCTTTCCCATGGTGTCTTTT  
 TTATATCTACCCATTTACCGCTTACACAGGAAATTTCCCTTACCCTCTAGCATATCTCTAGCTCGACGTA  
 CAATGCGTTCTAGTAGCCTGGGCCTTCATTTTCGTTATGACCCTACCGCTTAGCCATAGTTTCGATTACG  
 TGGACCTCCGATAACGAGT...3'

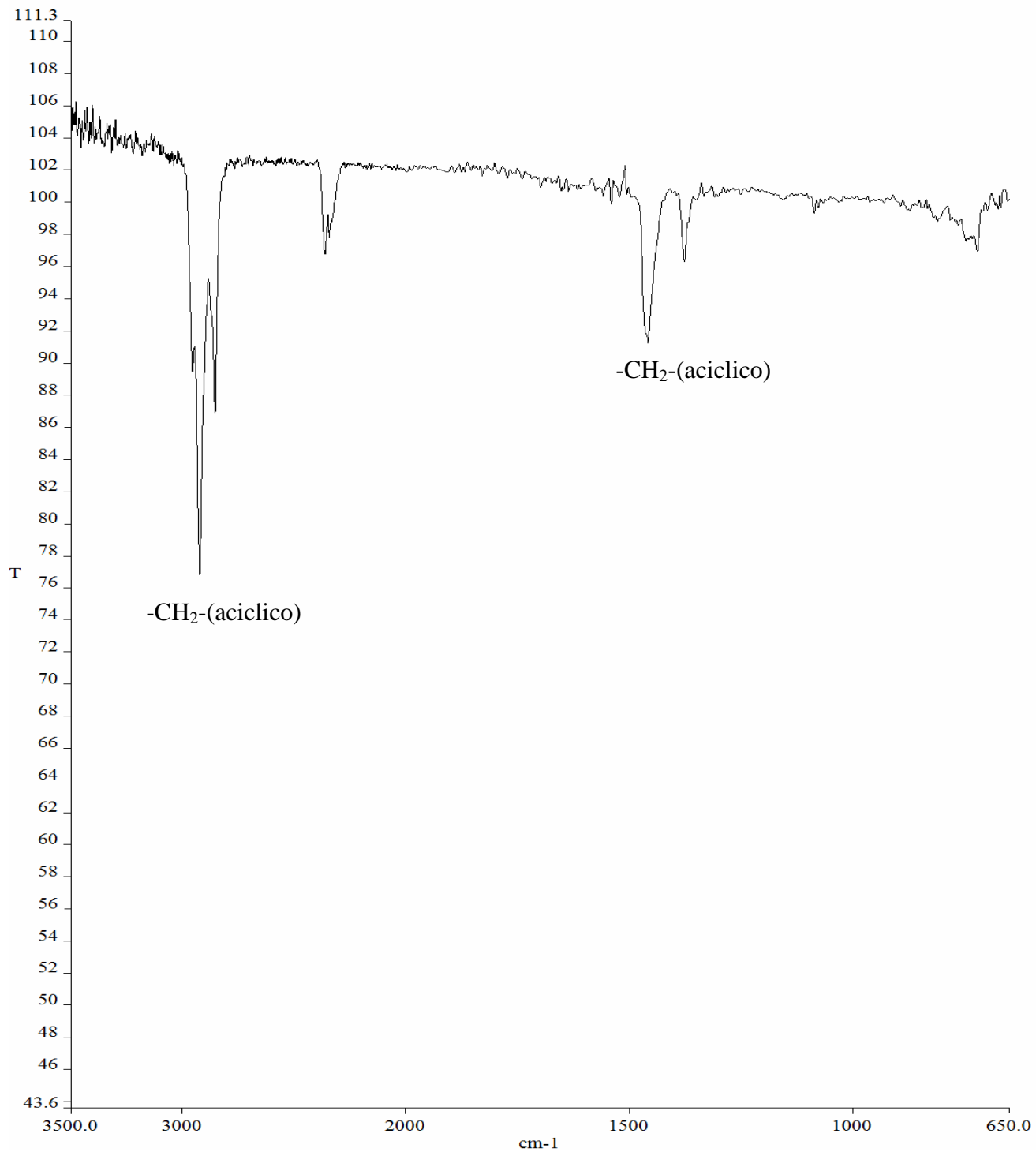
**cepa 8.113**

5'...CTGAGATCTTCCGCAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTT  
 TCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTAAGTCTCGCACCTTGACGGTAC  
 CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC  
 CGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAAC  
 CGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGAACTTGAAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCG  
 GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCT  
 GAGGAGCGAAAGCGTGGGRRRCGAMCAGGATTAGATAACCCTGGTAGTMYMCGCCGTAAACGATGAG  
 TGCTAAGTGTARGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAATCGCATTAAAGCACTCCGYCTGGRA  
 GTACGGWCGCAAGACTGMACTCAAAGGAATTGACGRGGTGTCYCGACAAGCRGTRGAGCATGTGG  
 CTTTTAWKTCGAAGCAACGCGWAGAATCCTTACCAGGTCTTGACATSKACTGACAAYTCTTAGAGATA  
 GGGGCTTTCYCKTCKDGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGYTCGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGAT

GTTGRGTTAAGTMCCGCAACGAGYGCAACYCTTGGATCTTAGTTGCYAGCATTTCAGTTGRGTCAYYYTA  
MGGYGACTSCMCGGTGACWAACCGGAKGRAGGTGSSGCATGACGTCRAATCATTTCATGSCCCTTATG  
ACSTGRGYTACACACSTGCTACAAGGACAGAAYMAMGGGCTGCAAGACCGCWAGSTKTAGYGCRA  
CCSATRAATCTGWYYCAGTMTTCGRATYRCAGYCTGCAACTCGACTGCGWGRARCATGKWAYYGCTAR  
KWATYGCGGATCRSCATSCCRYGSTGAATACGWTCCTCCGGGCCTTGTACACACCGSCCGGTCACACCA  
CGAGAGWTTGCAACACMCAAAGTCGGTGAGGTAACCWTTATGGAGCCAGCCTGCYGAAGTGTGGGG  
CAGATGATTGKGGTGAAGTCGTAACMASGTTAGCCCGTATCGGAAGGTGCTKACTGCATCACCTCATC  
AGCTTTGGATCCCGGGATCGCTCACCCCGCTTCGCTACTCAGCGTCAGATACAGACCAGAGAGTCCCT  
TCCGCCACTGGTGTCCTCCCATCTCTACGCATTCACGCTACACGTGAATTCCTCTCTCTTCTGCACT  
CAGTTCCCAGTTCCAATGACTTCCTGTTGACCGGGCCTTTCAATCGACTAAAACGCTTGCAGCCTTACG  
CCATATTCCGACACGCTTGCCTTCGT...3'

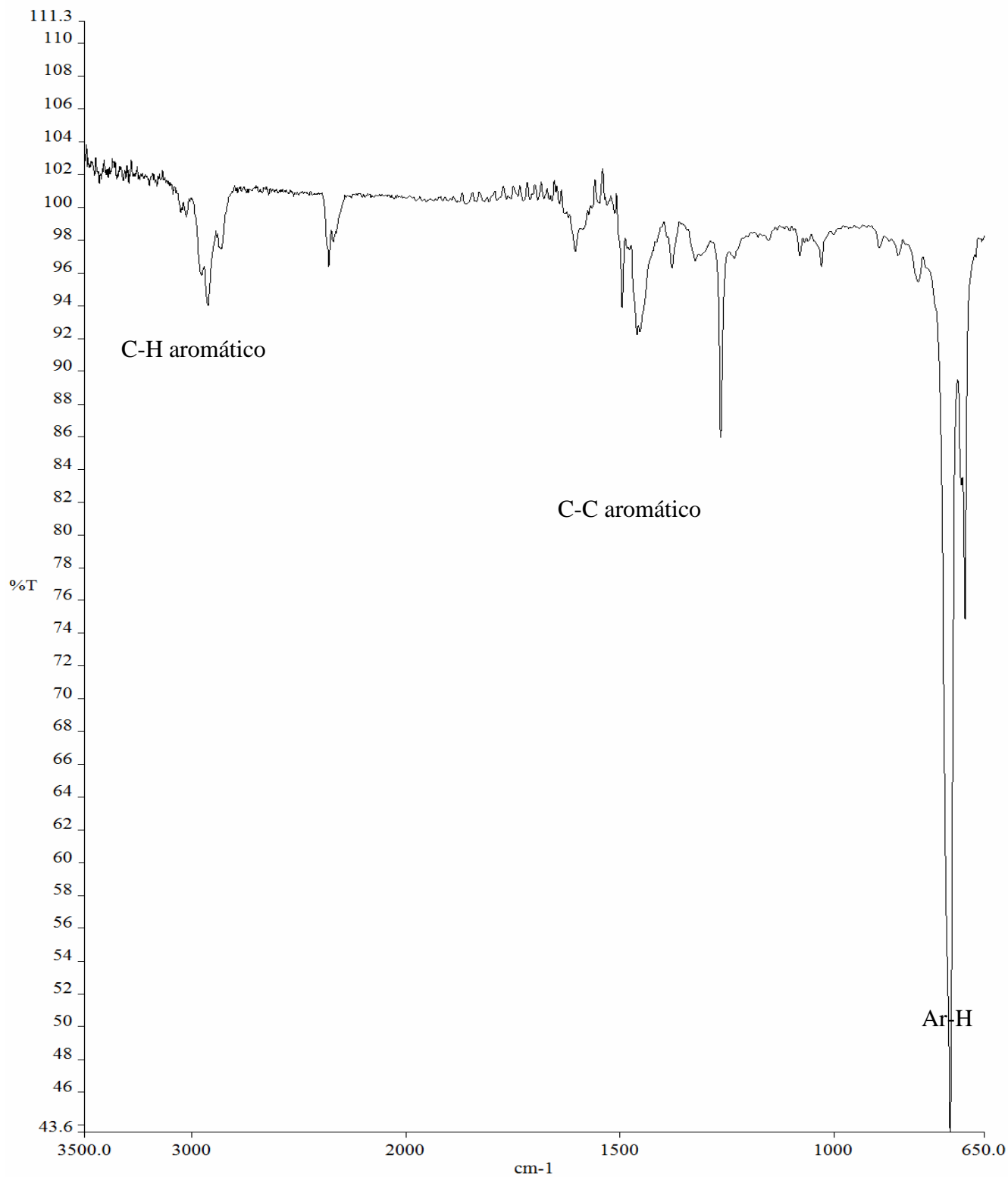
## A.2. Espectros IR de fraccionamiento de gasóleo

### Alifáticos

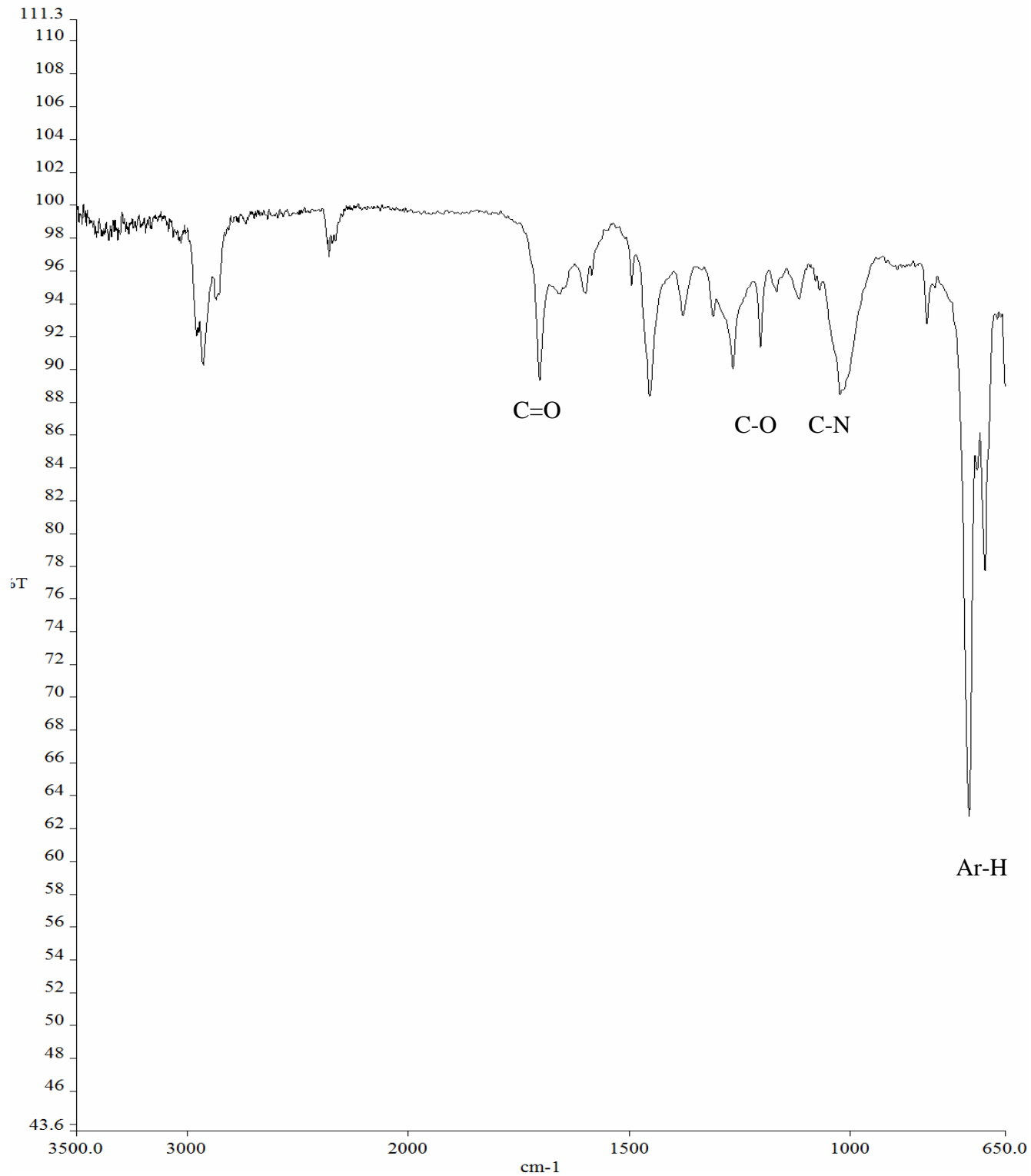




**Aromáticos**



**Resinas**



# ANEXO

# Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archaea

Sylvie Le Borgne<sup>a</sup> Dayanira Paniagua<sup>b</sup> Rafael Vazquez-Duhalt<sup>b</sup>

<sup>a</sup>UAM-Cuajimalpa, México, D.F., and <sup>b</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico

© S. Karger AG, Basel  
**PROOF Copy  
for personal  
use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS  
ARTICLE WITHOUT WRITTEN  
CONSENT FROM S. KARGER  
AG, BASEL IS A VIOLATION  
OF THE COPYRIGHT.

## Key Words

Halophile · Bacteria · Archaea · Hypersaline · Organic pollutant · Biodegradation

## Abstract

Hypersaline environments are important for both surface extension and ecological significance. As all other ecosystems, they are impacted by pollution. However, little information is available on the biodegradation of organic pollutants by halophilic microorganisms in such environments. In addition, it is estimated that 5% of industrial effluents are saline and hypersaline. Conventional nonextremophilic microorganisms are unable to efficiently perform the removal of organic pollutants at high salt concentrations. Halophilic microorganisms are metabolically different and are adapted to extreme salinity; these microorganisms are good candidates for the bioremediation of hypersaline environments and treatment of saline effluents. This literature survey indicates that both the moderately halophilic bacteria and the extremely halophilic archaea have a broader catabolic versatility and capability than previously thought. A diversity of contaminating compounds is susceptible to be degraded by halotolerant and halophile bacteria. Nevertheless, significant research efforts are still necessary in order to estimate the true potential of these microorganisms to be applied in environmental processes and in the remediation of contaminated hypersaline ecosystems. This effort should be also fo-

cused on basic research to understand the overall degradation mechanism, to identify the enzymes involved in the degradation process and the metabolism regulation.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Environmental pollution due to anthropogenic activity has spread to all types of ecosystems. Marine and fresh water, soils and air have been impacted by the dispersion of contaminants. Contamination and biodegradation in extreme environments has received little attention although many contaminated ecosystems present high or low temperatures, extreme acidic or alkaline pH, high pressures or high salinity [Margesin and Schinner, 2001a]. Extremophilic microorganisms (extremophiles) are adapted to thrive in such hostile environments. Extremophiles include psychrophiles: optimal growth temperature <20°C; thermophiles and hyperthermophiles: optimal growth temperature >50 and 75°C, respectively; barophiles: optimal growth at greater than 1 atm; acidophiles and alkalophiles: optimal growth at pH <3 and >10, respectively, and high salt concentrations; halophiles: optimal growth in 2.0–5.2 M sodium chloride [Rotschild and Mancinelli, 2001]. Not only can these microorganisms survive and grow under extreme conditions but usually require these conditions for survival

## KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2008 S. Karger AG, Basel  
1464–1801/08/0154–0074\$24.50/0

Accessible online at:  
www.karger.com/mmb

Sylvie Le Borgne  
UAM-Cuajimalpa  
Av. Pedro A. de los Santos 84  
11850 México, D.F. (Mexico)

Tel. +52 ■■■■, Fax +52 ■■■■, E-Mail ■■■■



and growth. Tolerant microorganisms can grow under extreme conditions but these conditions are not their optimal growth conditions.

Halophilic and halotolerant microorganisms are able to thrive and grow in saline and hypersaline environments. These microorganisms are being the object of basic studies in relation to the origin of life in our planet and the molecular mechanisms of adaptation to saline and hypersaline conditions [DasSarma and Aora, 2002]. The oldest prokaryote fossils found in 3,500 million-year-old stromatolites resemble the contemporary microbial mats found in hypersaline environments. Halobacteria and methanogenic bacteria are both placed on a very ancient phylogenetic branch of archaea. Apart from their evolutionary and ecological significance, halophiles have promising biotechnological applications including food industry pigments, organic osmotic stabilizers, surfactants, enzymes able to function at low water activities, bacteriorhodopsin applications including holography, optical computers and optical memory, production of renewable energy and biodegradation of organic pollutants [Margesin and Schinner, 2001b; Oren, 2002a, b].

The degradation or transformation of organic pollutants by halophilic and halotolerant microorganisms has received little attention. However, a survey of the literature indicates that halophilic microorganisms have more catabolic versatility than previously thought. The specific aim of this work is to provide a critical review of organic pollutants degradation by halophilic and halotolerant microorganisms with emphasis on aerobic and facultative anaerobic halophilic bacteria and archaea. The range of compounds known to be degraded by anaerobic halophilic bacteria is very limited, so the potential of this group of microorganisms for the degradation of organic pollutants has been stated to be doubtful [Oren, 1992]. A short overview on halophilic bacteria and archaea is presented focused on the problematic of saline and hypersaline pollution.

### **Pollution of Hypersaline Ecosystems**

A variety of saline and hypersaline ecosystems are present on Earth. The salt concentration in these environments can vary from 3.5% (w/v) of total dissolved salts, as in seawater, to concentrations close to saturation (35%). Hypersaline environments are those containing salt concentrations in excess of seawater. These systems have considerable economic, ecological and scientific value and can be both of natural and man made origin,

including natural saline and hypersaline lakes and ponds, salt marshes, solar salt production facilities, brine inclusions in salt mine crystals and petroleum deposits. Saline and hypersaline aquatic environments can be classified as athalassohaline or thalassohaline depending on their origin. Athalassohaline waters are mainly formed from salt deposits due to evaporative events in inland water bodies. They are not of marine origin. Natural thalassohaline environments are originated from the evaporation of seawater due to the inland isolation of sea water bodies. Their composition resembles those of seawater and it is mainly dominated by sodium chloride and sulfate ions. Solar salterns are artificial thalassohaline environments where seawater is evaporated to obtain salt for commercial purposes. The Great Salt Lake in Utah, the Dead Sea in Israel, the Red Sea and lakes of the Atacama Desert in Chile are typical examples of hypersaline environments. Another type of hypersaline environment is the saline alkaline soda lake where the high salt concentration is combined with a high pH due to the presence of carbonate. All these environments are ecological niches of halophilic microorganisms [Oren, 2002a].

As all natural ecosystems on our planet, hypersaline environments are subjected to environmental contamination (fig. 1). Industrial and municipal effluents are often discharged into saline and hypersaline depression and intertidal zones, especially in developing countries [Lefebvre, 2004]. Several industrial processes, such as pesticide, chemical and pharmaceutical production as well as gas and oil extraction, generate thousands of millions of liters of saline to highly saline wastewaters [Lefebvre and Moletta, 2006]. It has been estimated that 5% of the total world effluents are highly saline [Lefebvre, 2004]. The petroleum industry generates a huge amount of oily and saline residual waters (oily brines, production waters) with salinities up to 10% or more after separation of crude oil from reservoir water. The most abundant extraneous material in the crude oil extraction process is water. Most wells, especially during their declining years, produce vast quantities of highly saline waters which have to be disposed [Speight, 1998]. The main contaminants in these production waters are aromatic and polycyclic hydrocarbons (PAHs). Due to decreasing freshwater availability, water re-use as well as seawater use and re-use strategies are being implemented in industries, increasing the volume of saline and hypersaline effluents to be treated [Alva and Peyton, 2003].

The biological treatment of industrial hypersaline wastewaters and the bioremediation of polluted hypersaline environments is not possible with conventional mi-



Fig. 1. Waste pond with salt built up.

croorganism [Oren, 2002b; Pieper and Reineke, 2000]. Conventional microorganisms are unable to operate efficiently at salinities above that of seawater and their capacity of adaptation to salinity is easily lost after exposition to low salinity conditions. High and fluctuating salinity promotes the loss of cell wall integrity, protein denaturalization and changes in osmotic pressure [Perretti and Di Palma, 2005]. Such inhibition effects due to high salinity have been reported in several conventional wastewater treatment plants [Kargi and Dincer, 1997; Woolard and Irving, 1994]. Thus, halophilic microorganisms are potential candidates for the degradation of pollutants at high salt concentrations.

### Halophilic Bacteria and Archaea

Halophiles grow and carry out their metabolic functions under hypersaline conditions [Litchfield, 1998]. Halophilic microorganisms can be classified according their salt requirements (table 1) [DasSarma and Aora, 2002]. Nonhalophilic microorganisms show an optimal growth below 0.2 M NaCl while halotolerant microorganisms are able to grow both under high and low salinity conditions. As the salt concentration increases, the microbial diversity is reduced and halotolerant and halophilic species tend to dominate [Oren, 2002b].

Table 1. Classification of halophilic microorganisms according to their NaCl requirements

Classification	NaCl concentration	
	mol/l	% (w/v)
Slight halophiles	0.2–0.85	2–5
Moderate halophiles	0.85–3.4	5–20
Extreme halophiles	3.4–5.1	20–30

Halophilic microorganisms include moderately halophilic and halotolerant bacteria found in many subgroups within the kingdom bacteria. Extreme halophilic bacteria are found in the archaea kingdom. Halophiles and halotolerant organisms are also present in the eukarya kingdom; they are not the subject of this review. The diversity of halophilic bacteria and archaea has been extensively reviewed and several characteristic groups have been distinguished [Grant et al., 1998; Kamekura, 1998; Ventosa et al., 1998a, b]. The phototrophic bacteria are generally found under the cyanobacteria in anaerobic zones of microbial mats, typical genera are *Chlorobium*, *Chromatium*, *Chloroflex*, *Thiocapsa*, *Rhodospirillum* and *Ectothiorhodospira*. Aerobic heterotrophic Gram-negative bacteria are typically found in moderately saline

brines with the following representative genera: *Halomonas*, *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Marinomonas* and *Pseudomonas*, among others. Aerobic heterotrophic Gram-positive bacteria are also present but less abundantly, they include *Marinococcus*, *Sporosarcina*, *Salinococcus* and *Bacillus*. Hypersaline waters with neutral pH are generally inhabited by *Halobacteriaceae* which are extreme halophilic archaea mainly from the *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Haloferax*, *Halorubrum*, *Halococcus* and *Halorubrum* genera. Methanogenic archaea (*Methanohalophilus*) are also present. The microbial diversity of soda lakes has also been reviewed showing the presence of the same microbial groups as those mentioned above as well as alkaliphilic and haloalkaliphilic microorganisms and sulfur-oxidizing bacteria [Jones et al., 1998].

Most halophilic archaea are red pigmented and, until recently, were generally thought to require high salt concentrations of at least 15–20% for growth, limiting the range of habitats where they could be found. However, new specimens of halophilic archaea were recently isolated from environments having salinities close to those of seawater. This archaea is able to grow at salinities from 2.5% NaCl, extending the range of habitats of this type of microorganisms [Purdy et al., 2004]. Halophilic archaea preferentially use amino acids as carbon and energy sources and they also can obtain energy from light through the bacteriorhodopsin proton pump. Halophilic bacteria have attracted less attention than the red halophilic archaea even though they inhabit a wider range of habitats; they have a wider range of metabolic capabilities and considerable diversity with respect to the carbon and energy sources they can use [Ventosa et al., 1998a, b].

Halophilic bacteria and archaea have the ability to adapt to fluctuations in external osmotic pressure and maintain an osmotic balance between their cytoplasm and the hypersaline extracellular environment. Two main specific mechanisms of osmoadaptation exist: the 'salt-in' mechanism in which the intracellular salt concentration is maintained high, and the accumulation of organic osmotic solutes mechanism in which the intracellular salt concentration is maintained low. Halophilic archaea use the 'salt-in' mechanism which consists in accumulating high intracellular concentrations of salts, mainly  $K^+$  and  $Cl^-$ . The cellular structural components, the intracellular machinery and both the intra- and the extracellular enzymes have evolved to the presence of high salt concentrations and are adapted to operate under very high salinities [Oren, 2002b]. On the other hand, halophilic bacteria mainly use the 'compatible solutes' adaptation strategy that consists of the biosynthesis and

intracellular accumulation of uncharged and highly water-soluble organic solutes which reduce the thermodynamic activity of water in order to compensate the external osmotic pressure [Oren, 1999]. An exception is the family of anaerobic halophilic bacteria (*Haloanaerobiaceae*) that have a high intracellular salt concentration [Oren, 1986].

### **Biodegradation of Organic Pollutant by Halophilic Bacteria and Archaea**

#### *Petroleum Hydrocarbons*

Petroleum hydrocarbons are the origin of important pollution in almost all types of ecosystems. Atmosphere, soils, superficial and underground waters, and marine environment have been continuously affected by pollution produced during the extraction, refining, transport and use of petroleum. There is a significant amount of literature concerning hydrocarbon biodegradation by marine microorganisms, starting by the classical reviews, such as Atlas and Bartha [1972] and Colwell [1977], or more recent reviews [Harayama, 1999, 2004; Head and Swannell, 1999; Head et al., 2006]. However, information on hydrocarbon degradation in the presence of high salt concentrations is scarce. As mentioned above, hydrocarbon biodegradation in the presence of high salt concentrations is important because the bioremediation of oil-polluted salt marshes and treatment of industrial wastewaters.

It has often been reported that the biodegradation potential of extreme halophilic, acidophilic, alkaliphilic, or barophilic microorganisms is limited [Margesin and Schinner, 2001b]. In most cases, the metabolic activity and diversity decreases as the salt concentration increases, reducing the hydrocarbon metabolization [Kleinsteuber et al., 2006; Kuznetsov et al., 1992; Riis et al., 2003; Ward and Brock, 1978]. However, after long exposition times, degradation can be observed and the amount of metabolized hydrocarbons increases in saline environments [Kleinsteuber et al., 2006; Riis et al., 2003], suggesting an adaptation of the microbial consortia to high salt concentrations [Kleinsteuber et al., 2006]. Nevertheless, there are reports in which the hydrocarbon biodegradation was not affected in a wide salinity range [Kerr and Capone, 1988], while other reports claim that a salinity increase enhanced the hydrocarbon degradation [Diaz et al., 2000; Yang et al., 2000]. This diversity of results shows the complexity of microbial communities and the specificity of the polluted sites.

Several studies were performed using microbial consortia because they generally show higher degradation performance than axenic cultures. Unfortunately, most microbial consortia are not characterized in terms of their biodegradation capacity, as in the case of an oil-bearing stratum that showed oxidation of petroleum hydrocarbons at salinities higher than 15% NaCl and in which the presence of extreme halophilic archaea was detected [Kulichevskaya et al., 1992]. Bacterial consortia isolated from the North Sea and able to metabolize petroleum hydrocarbons at a salinity range from 0 to 22% of NaCl mainly included *Marinobacter* spp./*Erwinia ananas* and *Bacillus* spp. [Díaz et al., 2000, 2002]. The degradation of aliphatic hydrocarbons was independent of the salinity level, while a salinity increase enhanced the degradation of pristane and phytane, but the degradation of total hydrocarbon was reduced. On the other hand, a consortium containing *Cellulomonas* spp., *Bacillus marisflavi*, *Dietzia maris* and *Halomonas eurihalina* was able to metabolize diesel oil from 0 to 17.5% of NaCl, showing an optimal hydrocarbon degradation at 10% NaCl [Riis et al., 2003]. The dynamic behavior and complexity of hydrocarbon-degrading microbial consortia at high salt concentrations was clearly demonstrated by Kleinstuber et al. [2006]. This microbial consortium showed a preferential growth from 7.5 to 15% of NaCl with diesel fuel as solo source of carbon and energy. *Halomonas*, *Ralstonia* and *Dietzia* showed a wide salinity tolerance (from 0 to 20% of NaCl), *Idiomarina* was a dominant species at 7.5% and *Alcanivorax* and *Marinobacter* were dominant at 15% of NaCl in 42-day cultures, but these species disappeared in older cultures. An  $\alpha$ -proteobacterium closely related to *Caulobacter* was found between salinities of 15 and 20% in 84-day cultures. In older cultures and at different salinities, other species appeared, such as *Sphingomonas* (a well-known PAH degrader), *Janibacter* (a xenobiotic-degrading actinomycete) as well as bacteria from the *Ectothiorhodospiraceae* and *Methylophilaceae* families, *Desulfobacula*, *Desulfosporosius*, *Halomonas*, *Ralstonia* and *Dietzia* (the last two species are known as hydrocarbon degraders). As expected, several viable and noncultivable bacterial cells were found during the experiments.

Cyanobacteria-rich microbial mats showed efficient degradation of crude oil at salinities up to 21% [Abed et al., 2006; Cohen, 2002]. Cyanobacterial strains isolated from this microbial mat, however, did not degrade crude oil in axenic cultures. The complexity of this microbial consortium shows a high complementarity in terms of metabolic functions. Hydrocarbon degradation of oil was

done primarily by aerobic heterotrophic bacteria. The oxygenic photosynthesis of oil-insensitive cyanobacteria supplied the molecular oxygen for the efficient aerobic metabolism. Environmental conditions at the mat surface switch from highly oxidic conditions in the light to anaerobic sulfide-rich habitat in the dark, allowing the combined aerobic and anaerobic degradation of crude oil [Cohen, 2002]. Another microbial mat showed higher capacity to metabolize aromatic hydrocarbons than aliphatic compounds at 7.5% of NaCl [Grötzschel et al., 2002].

Few studies of hydrocarbon degradation at high salt concentration have been carried out using axenic cultures. Bacteria as *Rhodococcus*, *Micrococcus* and *Arthrobacter* were able to grow in a wide salinity range from 0.5 to 25% NaCl but hydrocarbon metabolization was observed only up to 15% of NaCl [Kulichevskaya et al., 1992; Zvyagintseva et al., 2001].

Extreme halophilic archaea have been reported to be able to metabolize hydrocarbons. *Halobacterium* sp. showed a high capacity to degrade C<sub>10</sub>–C<sub>30</sub> n-alkanes in a medium containing 30% NaCl. Hydrocarbon co-metabolization has been reported for *H. salinarium*, *H. volcanii* and *H. distributum* [Kulichevskaya et al., 1992]. Another extreme halophilic archaea strain, EH4, having oxidase and catalase activities was able to metabolize saturated hydrocarbons (tetradecane, eicosane, hexadecane, heneicosane, pristane) and PAHs (acenaphthene, phenanthrene, anthracene, 9-metylanthracene) growing in a medium with 310 g/l of salts [Bertrand et al., 1990]. In this strain, the decrease of salinity had a strong effect on both the bacterial growth and hydrocarbon degradation. Maximal growth was obtained at 20% NaCl, while no hydrocarbon degradation was found below 10% NaCl. As several nonhalophilic bacteria, the PAH-degrader *Halomonas eurihalina* produces an emulsifier to improve the mass transfer during hydrocarbon metabolization [Martínez-Checa et al., 2002]. This emulsifying compound is an exopolysaccharide that emulsifies crude oil more efficiently than synthetic surfactants.

On the other hand, *Dietzia maris*, an environmental actinomycete, is able to degrade paraffin and other petroleum derivatives at NaCl concentrations up to 10% [Zvyagintseva et al., 2001]. The halotolerant actinomycete *Streptomyces albiaxis* is able to grow at salinities up to 30% using crude oil as unique source of carbon and energy in a salinity range of 3–10% NaCl [Kuznetsov et al., 1992]. Immobilization of hypersaline microbial mats and bacterial consortium improved both salinity tolerance and hydrocarbon degradation [Díaz et al., 2002; Grötzschel et al., 2002].



This review of the scarce information on hydrocarbon degradation at high salt concentration shows that most of the studies are phenomenological and there are still many unanswered questions. Are metabolic pathways similar than for mesophilic microorganisms? Are enzymes more stable to salt concentration or temperature? Enzymes from extremophiles could be very interesting for industrial applications. Thus, research efforts focused on the basic characterization of the microorganisms able to transform hydrocarbons in hypersaline ecosystems and the metabolic mechanisms involved in the petroleum degradation under extreme conditions are necessary.

#### *Aromatic Compounds*

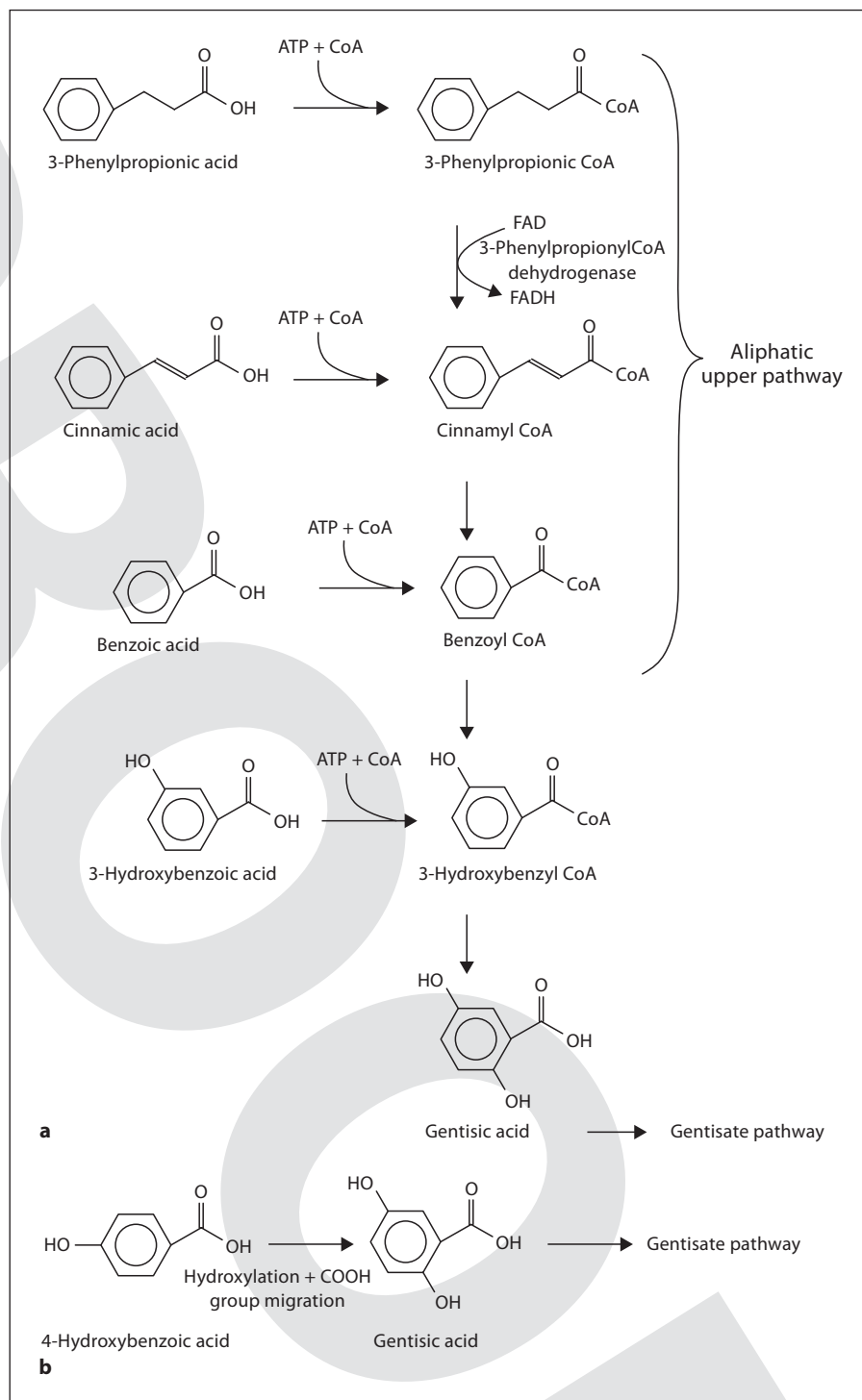
*Aromatic Acids.* This category includes compounds that contain both an aromatic ring and a COOH group. Aromatic acids are abundant in the biosphere originated by natural and anthropogenic activities, and some of them are pollutants. The 4-hydroxybenzoic, ferulic, *p*-coumaric, vanillic, cinnamic, and syringic acids are naturally present in plants and plant root exudates. Aromatic acids may also enter the environment due to their use as raw materials for the production of agrochemicals, pharmaceuticals, varnishes and other specialty materials. In addition, they can also indirectly enter the environment as intermediates during the biodegradation of natural polymers (lignins and tannins), from aromatic amino acid precursors and as intermediates during the biodegradation of pollutants such as pesticides or PAHs. Because of their anionic character at the pH of most soil and sediment environments, they are expected to move rapidly through the soil and therefore pose a great risk of groundwater contamination.

Benzoate has been used as a test substrate for the taxonomic characterization of some halophilic and halotolerant bacteria (not isolated for biodegradation purposes), and only very few isolates were found to grow on this aromatic substrate [Del Moral et al., 1988; García et al., 1987; Ventosa et al., 1982]. This is not surprising considering that the reported bacteria were not isolated with benzoate as the sole source of carbon and energy.

Early studies indicated that the novel species *Pseudomonas halodurans*, a halotolerant bacterium able to grow at NaCl concentrations up to 2.65 M, was capable of *ortho* cleavage of aromatic compounds including benzoic acid [Rosenberg, 1983]. This bacterium was later renamed *Halomonas halodurans* [Hebert and Vreeland, 1987]. A diffusion gradient chamber was used to enrich microbial populations able to degrade toluate at high NaCl concentrations from oil brine contaminated soils [Emerson and

Breznak, 1997]. Two dominant strains of halophilic and toluate-utilizing strains, identified as *Pseudomonas nautical*, could be isolated. Decreased levels of toluate degradation at increasing NaCl concentrations were observed. Poor growth was obtained at toluate concentrations above 3 mM in the presence of 5% NaCl and no growth was observed at any toluate concentration in the presence of NaCl concentrations above 10%. Recently, halophilic bacteria able to degrade a variety of aromatic acids including benzoic, *p*-hydroxybenzoic, cinnamic, salicylic, phenylacetic, phenylpropionic, *p*-coumaric, ferulic and *p*-aminosalicylic acids were isolated from water and sediment of salterns and hypersaline soils located near to oil refineries and food-processing industries [García et al., 2005a]. The bacteria were enriched in minimal medium containing individual aromatic acids at final concentrations of 1–5 mM as the sole carbon and energy source in the presence of 10% NaCl. The influence of NaCl concentration on growth and biodegradation was not studied, and the biodegradation products were not analyzed neither. Although bacteria could be isolated with all aromatic acids tested, the highest number of isolates was obtained using benzoic acid for the enrichment. All the isolates were moderately halophilic bacteria mainly from the genus *Halomonas*. A new species, *Halomonas organivorans*, able to degrade a wide range of aromatic acids (benzoic, *p*-hydroxybenzoic, cinnamic, salicylic, phenylacetic, phenylpropionic, *p*-coumaric, ferulic and *p*-aminosalicylic acids), was detected in this study [García et al., 2004]. These authors propose that *Halomonas* could be used as a model genus for elucidating the metabolism of aromatic compounds at high salt concentrations. The genus *Marinobacter*, as mentioned above, has been frequently associated to hydrocarbon degradation at high salinities [Gu et al., 2007; Marquez and Ventosa, 2005]; however, only one *Marinobacter* species was detected in this study. Some isolates belonging to the genera *Chromohalobacter*, *Salinococcus* and *Halobacillus* were also found. This is the first report in which members of these genera are able to degrade organic pollutants. The *Halomonas elongata* strain Mar isolated from table-olive fermentation brines is the first halophilic bacterium shown to be able to degrade ferulic acid into vanillic acid in the presence of 8% NaCl [Abdelkafi et al., 2006]. Vanillic acid is the starting material in the chemical synthesis of the flavor molecule vanillin.

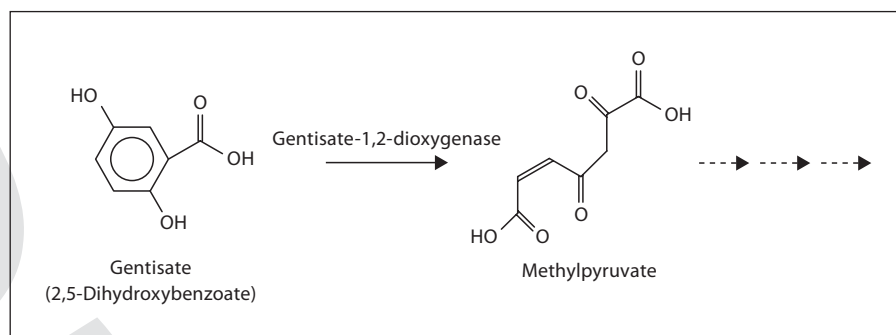
Few isolates of halophilic archaea with aromatic acids biodegradative capabilities have been described. *Haloferax* sp. strain D1227 is the first reported archeon capable of aerobic metabolism of aromatic acids as benzoic, cin-



**Fig. 2.** Pathways for the degradation of aromatic acids in extremely halophilic archaea. **a** Degradation of 3-phenylpropionic acid by *Haloferax* sp. D1227. **b** Degradation of 4-hydroxybenzoic acid by *Halo-harcula* sp. D1.

amic, and 3-phenylpropionic acid [Emerson et al., 1994]. This microorganism was isolated from petroleum-contaminated soil near Gran Rapids, Mich., USA. It belongs to the *Halobacteriaceae* family and requires 2 M NaCl for

optimal growth. The degradation of 3-phenylpropionic acid by the halophilic archeon *Haloferax* sp. D1227 was studied in more detail since this compound has an interesting structure with both an aromatic ring and an ali-



**Fig. 3.** Gentsiate degradation pathway.

phatic side chain [Fu and Oriel, 1999]. It was shown that the catabolism of this compound proceeds by initial shortening of the aliphatic side chain to form benzoyl-CoA via a mechanism similar to fatty acids  $\beta$ -oxidation, followed by aromatic degradation through the gentsiate pathway (fig. 2a, 3). A novel halophilic archaea strain (*Haloarcula* sp. D1), able to grow aerobically on 4-hydroxybenzoic acid (4HBA) as the sole source of carbon and energy, was isolated [Fairley et al., 2002]. This is the first halophilic archaon able to metabolize 4HBA, while the formerly isolated *Haloferax* sp. D1227 had been found to be unable to degrade this compound. 4HBA was metabolized through the gentsiate pathway involving a hydroxylation that induces an intramolecular migration. More recently, the isolation of forty four new haloarchaeal strains able to grow with low concentrations of *p*-hydroxybenzoic acid (0.4 mM) as the sole carbon and energy source was reported [Cuadros-Orellana et al., 2006]. These authors claim that the ability to degrade *p*-hydroxybenzoic acid could be a widespread feature among the Halobacteriaceae.

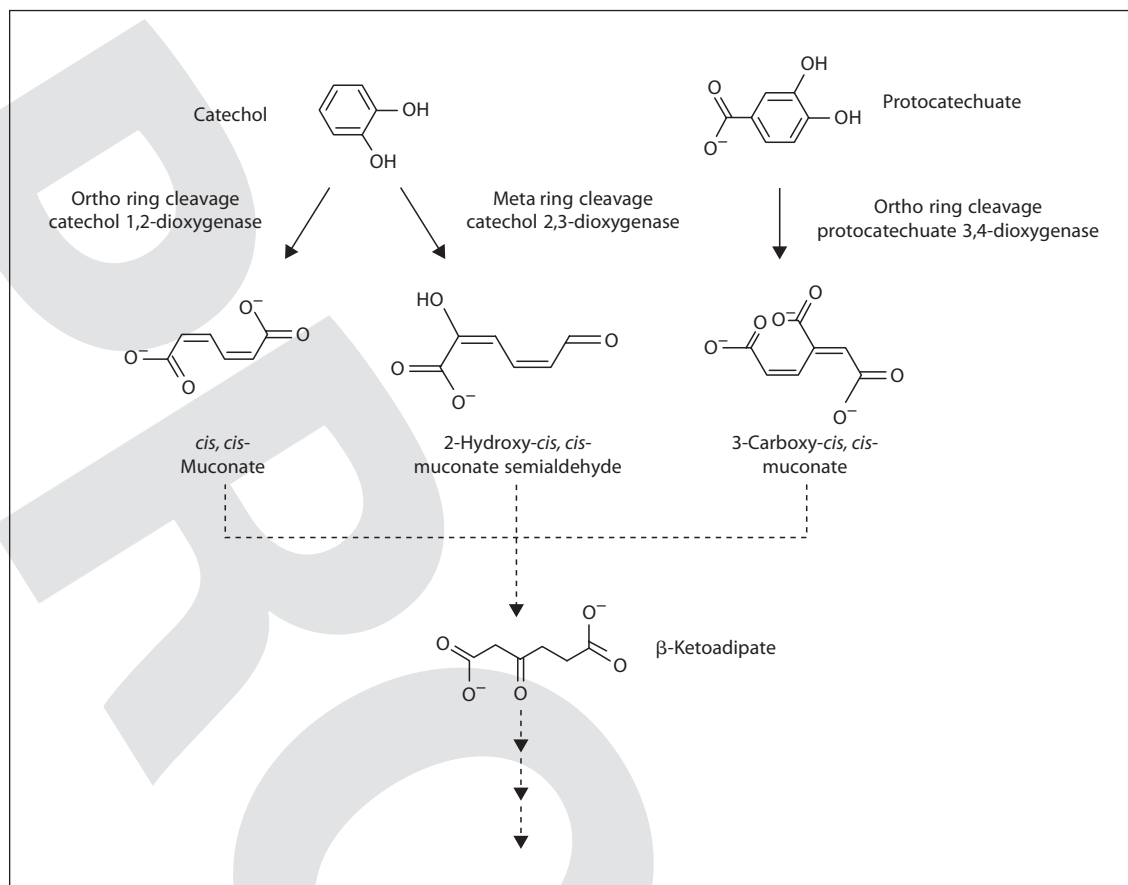
**Phenols and Phenolic Compounds.** Phenols are major pollutants of industrial wastewaters since they are commonly used in many industries such as oil refining, coke conversion, pharmaceutical and resin manufacturing plants.

Biodegradation of phenol in hypersaline wastewaters was reported by Woolard and Irving [1994, 1995]. These authors used a halophilic bacteria biofilm isolated from a saltern at the Great Salt Lake. More than 99% of the phenol was removed from a synthetic wastewater containing from 0.1 to 0.13 g/l of phenol and 15% (w/v) NaCl in a batch-sequenced reactor. The bacteria present in the biofilm and responsible for biodegradation were not identified. Hinteregger and Schreiber [1997] studied the biodegradative capacity of a new phenol-degrading *Halomonas* sp. strain isolated from the Great Salt Lake. This

strain degraded phenol as the sole source of carbon and energy in a model industrial saline wastewater. Optimum growth of this strain on phenol occurred at NaCl concentrations from 3 to 5% (w/v). At these salinities, 0.1 g/l of phenol was degraded in 13 h. The disappearance of phenol was accompanied by the accumulation of *cis,cis*-muconic acid, an intermediate of phenol degradation through the *ortho*-cleavage pathway (fig. 4).

Alva and Peyton [2003] reported phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile bacterium *Halomonas campisalis*. This bacterium is able to grow with phenol as the sole source of carbon and energy at pH 8–11 and 0–150 g/l NaCl, and phenol was mineralized to CO<sub>2</sub>. Catechol and *cis,cis*-muconic acid were identified as intermediate products indicating that phenol biodegradation proceeded through the *ortho*-cleavage pathway. *Cis,cis*-muconate accumulation was favored with increasing pH. These authors mention that *cis,cis*-muconate is normally effluxed from the cells. At high pH, this compound is present as an anion which may hinder permeability through cell membranes and re-incorporation into the cells for further degradation. When *cis,cis*-muconate was used as substrate, efficient degradation was found at low salinities but no degradation at medium and high salinity conditions could be detected. According to the authors, the cell membranes of *Halomonas campisalis* may be less compact and internally coherent at low lower salinities allowing *cis,cis*-muconate to re-enter the cell. Maskow and Kleinstuber [2004] reported the isolation of the haloalkaliphile *Halomonas* sp. EF11 able to grow on phenol as the sole source for carbon and energy. This strain assimilated phenol through the *meta* pathway at a high C/N ratio and both through the *ortho* and *meta* pathways at a low C/N ratio (fig. 4).

During an extensive screening of aromatic compound-degrading halophilic bacteria, García et al. [2005a] isolated the new species *Halomonas organivorans* [García et



**Fig. 4.** Pathways for the degradation of phenol and protocatechuate.

al., 2004] and *Thalassobacillus devorans*, a moderately halophilic, phenol-degrading, Gram-positive bacterium [García et al., 2005b] able to use phenol as the sole source of carbon and energy. Both bacteria produced optimal growth in media containing 7.5–10% (w/v) NaCl. No bacteria could be isolated when *p*-cresol was the sole source of carbon and energy.

Tyrosol (*p*-hydroxyphenylethanol) is a phenolic compound that naturally occurs in olive mill wastewaters. A novel *Bacillus* sp., strain YAS1, could transform tyrosol into *p*-hydroxyphenylacetic acid under hypersaline conditions (50 g/l NaCl) in the presence of 1 g/l of yeast extract [Abdelkafi et al., 2005]. The strain was reported to be moderately halotolerant with an optimal growth at 3–6% NaCl. Biodegradation of nitro- and chloro-substituted phenols will be described below in the halogenated hydrocarbons section.

*Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylenes (BTEX).* BTEX compounds are partially soluble in water and can

contaminate soils and aquifers. These compounds can be found in the environment after oil and oil derivatives (gasoline, solvents) spills or released from oilfield wastewaters. Benzene is a well-known carcinogenic compound which makes it a priority pollutant. Little is known concerning the degradation of BTEX by halophilic and halotolerant bacteria. The biodegradation of benzene by an enrichment culture developed from an oil-brine soil sample in the presence of 145 g/l of NaCl was recently reported [Nicholson and Fathepure, 2004]. The obtained enriched culture was also able to degrade toluene, ethylbenzene and xylenes. Toluene was rapidly biodegraded (20  $\mu$ mol in a week) while degradation of benzene, ethylbenzene and xylene required 2–3 weeks. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of the bacterial populations present in this enriched culture showed that it was dominated by *Marinobacter* species.

The genus *Marinobacter* was first described by Gauthier et al. [1992]. *Marinobacter* species are moderate halo-

philic bacteria affiliated to the gamma-proteobacteria. These bacteria have been mainly isolated from marine environments [Gorshkova et al., 2003; Green et al., 2006; Kim et al., 2006; Romanenko et al., 2005; Rontani et al., 1997, 2003; Yoon et al., 2003, 2004]. They also have been detected in oil reservoirs and oil-producing wells [Huu et al., 1999, Sette et al., 2006], as well as oil-impacted ecosystems [Brito et al., 2006; Gu et al., 2007; Piedad Diaz et al., 2000; Yakimov et al., 2005]. *Marinobacter* species tolerate a wide range of NaCl concentrations making them potentially useful for field applications in fluctuating conditions of salt concentration. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, isolated from Mediterranean seawater near a petroleum refinery, grows at NaCl concentrations from 0.1 to 3.5 M with an optimum at 0.6 M. Additionally, these microbes have other extremophilic characteristics such as psychrophily, alkaliphily, thermotolerance and tolerance to heavy metals which make them versatile and interesting for eventual environmental applications [Deppe et al., 2005; Ivanova et al., 2002; Shieh et al., 2003; Shivaji et al., 2005; Takai et al., 2005]. In fact, the hydrocarbon-degrading bacterium *Marinobacter aquoeli* (heterotypic synonym of *M. hydrocarbonoclasticus*) is being currently sequenced at the DOE Joint Genome Institute.

Nicholson and Fathepure [2005] recently reported the degradation of benzene and toluene by enriched cultures initially developed from samples of uncontaminated hypersaline soils taken at the Great Salt Plains, Oklahoma and in the presence of benzene and 2.5 M NaCl. They demonstrate that microorganisms from hypersaline environments with no contamination history are able to degrade aromatic compounds as benzene and toluene. In this case, no degradation of ethylbenzene and xylenes occurred even after long incubation times. The DGGE analysis of the bacterial populations in this culture revealed that different types of bacteria were dominant depending on the NaCl concentration (*Acidovorax delafieldi* and *Pseudomonas* sp. in the absence of NaCl; *Halobacillus salinus* between 1 and 2.5 M NaCl; *Bacillus simplex* between 1 and 4 M NaCl as well as nonidentified bacteria above 2.5 M NaCl).

#### Halogenated Hydrocarbons

Halogenated hydrocarbons cover a wide group of aliphatic and aromatic compounds in which one (or more) of the hydrogen atoms is substituted by a halogen group (chlorine, fluorine, bromine or iodine). These compounds are used for industrial, petrochemical, food industry, and agricultural applications. Halogenated hydrocarbons are of environmental concern because of their persistence

and toxicity, some of them are thought to cause damage to the ozone layer and have been forbidden by most countries. In particular, chlorinated hydrocarbons are widely used because of their chemical and thermal stability as well as their fungicidal, herbicidal, and insecticidal properties.

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is a widely used herbicide. A variety of nonextremophilic environmental microorganisms can degrade this compound [Fulthorpe et al., 1995]. Maltseva et al. [1996] reported the isolation of haloalkaliphilic bacteria related to the family *Halomonadaceae* (91% identity after analysis of 303 nucleotides of the 16S rRNA gene). These isolates were able to degrade 2,4-D as the sole source of carbon and energy, growing optimally at pH 8.4–9.4 and NaCl concentrations of 0.6–1.0 M. One of the isolates was further characterized revealing that it utilizes the same 2,4-D degradation pathway as most of the nonextremophilic 2,4-D-degrading bacteria. Additionally, this strain was also able to degrade benzoic acid, 3-chlorobenzoic acid and 4-chlorophenol [Oriol et al., 1997].

Chlorinated phenols have been widely used as wood preservatives and agricultural biocides. Maltseva and Oriol [1997] reported the isolation of the alkaliphilic and slightly halophilic *Nocardioides* sp. strain M6, able to grow on 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) as well as on 2,4,5- and 2,4,6-trichlorophenol (2,4,5-TCP and 2,4,6-TCP) as the sole source of carbon and energy. Strain M6 degraded 0.7 g/l of 2,4,6-TCP in 120 h and could grow at concentrations up to 1.6 g/l of 2,4,6-TCP; however, the length of the lag phase increased on increasing the concentration of this substrate.

Halophilic archaea from the genus *Halobacterium*, *Haloharcula* and *Haloferax* were submitted to an adaptation/selection process to high concentrations (up to 1 mM) of various halogenated compounds including TCP, lindane and DDT [Oesterhelt, 1998]. GC-MS analysis has shown that these bacteria could, at least, partially decompose these compounds.

#### Organic Solvents

Trichloroethylene (TCE) is a chlorinated hydrocarbon commonly used as an industrial solvent. Fuse [1998] reported the use of a halophilic methane-oxidizing bacterium *Methylomicrobium* sp. strain NI to oxidize TCE in a medium with a salt concentration of 2–6 % (w/v). Such bacteria could be useful for the bioremediation of TCE contamination in seawater or ecosystems containing salt concentration close to seawater.

A halotolerant, alkaliphilic and methane-oxidizing bacterium (methanotrope), isolated from highly alkaline and saline soda lakes, that can grow on methanol as carbon and energy source at pH 9–10 has been described [Khemelina et al., 1997; Sorokin et al., 2000]. *Methylobacterium* species and *Methylobacter alcaliphilus* growing with Na<sup>+</sup> concentrations up to 1.1 and 1.5 M, respectively, were able to metabolize methanol. *Methylobacterium* species growing with low methanol concentrations (2–5 mM) were inactivated after three passages [Sorokin et al., 2000]. This growth inhibition was attributed to formaldehyde accumulation due to low formaldehyde-oxidizing activity in these bacteria. Formaldehyde is an intermediate from methane and methanol degradation, and is further metabolized through assimilatory or dissimilatory pathways. On the contrary, *Methylobacter alcaliphilus* was grown in the presence of higher concentrations of methanol (50 mM) [Khemelina et al., 1997].

Formaldehyde is used in the production of polymers and other chemicals and as a disinfectant. Oren et al. [1992] have described the isolation and partial characterization of a highly halotolerant bacterium (isolate MA-C) able to degrade formaldehyde in a medium containing between 0 and 20% (w/v) NaCl. This unidentified isolate was considered to be resistant to formaldehyde and grew well in media supplemented with 100 ppm formaldehyde. In the case of *Halomonas* species, the formaldehyde tolerance seems to be dependent on the composition and structure of outer membranes [Azachi et al., 1996].

N,N'-dimethylformamide (DMF) is a versatile solvent employed in the textile and pharmaceutical industries due to its solubility in both aqueous and organic solvents. Aerobic bacterial consortia, able to degrade 200 mg/l of DMF through a wide range of NaCl concentrations (up to 7%) [Bromley-Challenor et al., 2000], could be useful for the treatment DMF-contaminated effluents with fluctuating salinities.

Nitriles, such as acetonitrile, are important compounds for industry. Sorokin et al. [2007a] isolated a moderately salt-tolerant alkaliphilic bacteria (new genus and species) *Natronocella acetinitrilica* from a soda lake sediment sample. This bacterium was able to use acetonitrile and propionitrile as a carbon, energy and nitrogen source at extremely high pH (10) and moderate salinity (0.6 M NaCl).

### Organophosphorus Compounds

Organophosphorus compounds are ester or thiol derivatives of phosphoric, phosphonic or phosphoramidic acids. They are widely used as pesticides, plasticizers and

chemical warfare agents (nerve agents). Their continuous and extensive use as pesticides has led to contamination of several ecosystems in the world. These compounds are highly toxic to insects and mammals. The microbial degradation of organophosphorus compounds by nonextremophilic microorganisms has been recently reviewed [Singh and Walker, 2006].

Few halophilic microorganisms, able to degrade organophosphorus compounds, have been described. DeFranck and Chen [1991] reported the isolation of a moderately halophilic bacterium from a hypersaline spring (24% w/v of salt) near the Great Salt Lake that showed high enzymatic activity for organophosphorus compounds transformation. The isolate, designated JD6.5, was reported to be an obligate halophile and tentatively identified as an *Alteromonas* species. An organophosphorus acid anhydrase, responsible for the hydrolysis of ester bond, was purified from this isolate, and the purified enzyme exhibited activity against diisopropylfluorophosphate, *p*-nitrophenylmethyl(phenyl)phosphinate, *p*-nitrophenylethyl(phenyl)phosphinate and diethyl *p*-nitrophenylphosphate (paroxon). The optimum pH and temperature reported for this enzyme were 8.5 and 50°C, respectively. This research group carried out a screening program to determine if organophosphorus anhydrases were commonly found in other species of *Alteromonas* [DeFranck et al., 1993]. A wide spectrum of hydrolytic activities against several organophosphorus compounds were detected in cell extracts from *Alteromonas* species and other nonidentified halophilic bacterial isolates. These results suggest that functionally similar enzymes might be present in the tested bacteria; these enzymes have potential for the decontamination of chemical warfare agents.

The archaeon *Halobacterium salinarum* was shown to contain an alkaline *p*-nitrophenyl phosphatase able to hydrolyze *p*-nitrophenylphosphate in reversed micelles in organic solvent [Marhuenda-Egea et al., 2002]. The hydrolysis of other organophosphorus compounds with this enzyme was not reported.

A Gram-negative halophilic bacterium, identified as *Chromohalobacter marimortui* or *Pseudomonas beijerinckii* after 16S rRNA gene sequencing, could utilize phosphonoacetate, 2-aminoethyl-, 3-aminopropyl-, 4-aminobutyl-, methyl- and ethyl-phosphonates as phosphorus sources for growth [Hayes et al., 2000]. This strain grew optimally at 10% (w/v) NaCl. The growth rate on different phosphonates and the range of utilized phosphonates decreased at elevated NaCl concentrations.

### Nitrogen Compounds

Organic nitrogen compounds are found in foods, organic materials, fertilizers, poisons, and explosives. Information concerning the degradation of this type of compound by halophilic or halotolerant microorganisms is scarce.

The phenylurea herbicides are an important group of pesticides used worldwide. The microbial degradation of the phenyl ring in these compounds has been reported to be slow [Sørensen et al., 2003]. A moderate halophilic *Marinobacter* sp. isolate able to degrade 1,3-diphenylurea (DPU) was isolated from a contaminated ephemeral desert stream bed in the Negev Desert, Israel [Sørensen et al., 2002]. This isolate apparently could completely mineralize DPU, and aniline was detected as an intermediate metabolite suggesting that a metabolic pathway involving cleavage of the urea bridge between the phenyl structures. The optimum specific growth rate occurred in the presence of 0.51 M NaCl and at 35°C. The influence of the NaCl concentration on DPU degradation was not assayed.

A strictly halophilic denitrifying bacterium, able to degrade trimethylamine (TMA), was isolated from coastal sediments and wastewater contaminated by marine water [Kim et al., 2003]. TMA is a malodorous pollutant found in fish-meal manufacturing processes effluents which has teratogenic effects on animal embryos. Sequence analysis of 16S rRNA genes revealed that these isolates were clustered on a branch remote from other genera in the alpha-Proteobacteria and the nearest homologs were *Roseobacter* species. Maximum growth rate was found at 0.25–0.50 M NaCl. The versatility of these facultative anaerobic bacterial isolates was demonstrated because they could degrade TMA under both aerobic and denitrifying conditions. TMA degradation occurred via dimethylamine to ammonia and was coupled to respiratory nitrate reduction. These isolates possessed both a TMA monooxygenase and a TMA dehydrogenase for the oxidation of TMA under aerobic conditions.

### Azo Dyes

Azo dyes are chemical compounds having the following general structure R–N=N–R', in which R and R' can be either aryl or alkyl. The N=N group is called an azo or di-imide, and the more stable azo dyes derivatives contain two aryl groups. Azo dyes are released in wastewaters generated both by dye producing and dye consuming industries. Biodegradation of azo dyes can occur in both aerobic and anaerobic environments. In both cases, the initial step is the reductive cleavage of the azo bond.

Under aerobic conditions, this initial step is typically followed by hydroxylation and ring opening of the aromatic intermediates. The recalcitrant nature of such compounds could therefore be overcome by utilizing anaerobic-aerobic co-cultures [Field et al., 1995]. However, due to the electron-withdrawal character of their N=N groups, these compounds are not very susceptible to oxidative metabolism and, as a consequence of this recalcitrance in aerobic environments, these compounds preferentially end up in anaerobic sediments, aquifers and groundwaters [Razo-Flores et al., 1997]. Rupture of the N=N double bond leads to the decolorization. Guo et al. [2007] have described the decolorization of several azo dyes under anaerobic conditions by a new member of the *Halomonas* genus, strain GTW, isolated from coastal sediments in Dalian Bay (China). Optimal decolorization occurred at 30°C, pH 6.5–8.5 and NaCl 10–20% with yeast extract as the carbon source. Nevertheless, neither the precise anaerobic conditions nor the degradation products were described. Asad et al. [2007] reported the isolation of three new *Halomonas* strains from textile effluents that were able to use a wide range of azo dyes as the sole source of carbon. These strains could decolorize the azo dyes in a wide range of NaCl concentrations (up to 20%) and pH (5–11), and decolorization occurred only under anaerobic conditions and in static cultures but not under aerobic conditions (cultures submitted to agitation). HPLC analysis of the decolorized media indicated that decolorization proceeded through reduction of the azo bond followed by cleavage of the reduced bond to produce aromatic amines. The wide range of salinities for dye decolorization is an interesting characteristic for an eventual application to the decolorization of textile effluents that are generally saline and slightly alkaline.

### Sulfur Compounds

Reduced organic sulfur compounds include mercaptanes and carbonyl- and methylsulfides. These volatile compounds play an important role in the processes of global warming, acid precipitation and global sulfur cycle. They have been identified as predominant odorants in several industrial gaseous emissions. The use of haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria in a biotechnological process designed to remove hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) from gaseous emissions of petroleum industry has been recently described [van den Bosch et al., 2007]. The advantages of operating at alkaline pH and under saline conditions are the increased solubility of H<sub>2</sub>S and the possibility to use and re-use seawater, respectively. No similar bioprocess under saline conditions has been de-

scribed for the abatement of volatile organic sulfur compounds odorous emissions yet. However, halophilic bacteria able to degrade dimethyl sulfide (DMS) have been described. Alkaliphilic halophilic and methylotrophic methanogens from the *Methanohalophilus* genus are able to catabolize DMS and grow in medium with a methyl group-containing substrate (methanogenic substrate, such as methanol or trimethylamine) as organic substrate [Mathrani et al., 1988]. Another *Methanohalophilus* strain able to grow over a range of external NaCl concentrations from 1.2 to 2.9 M and with methanol, trimethylamine and DMS as substrates for methanogenesis has been described [Robertson et al., 1992]. This strain produced different organic osmotic solutes to regulate the increase of external NaCl concentration. Interestingly, the relative ratio of these osmotic solutes seems depend more on the methanogenic substrate than on the external osmolarity.

Thiocyanate [SCN]<sup>-</sup> is a C<sub>1</sub> organic sulfur compound naturally produced during biological cyanide detoxification processes and also found in wastewater from coke and metal plants. Some microorganisms can utilize thiocyanate as an energy, carbon, nitrogen or sulfur source after it is hydrolyzed to sulfide, ammonia, and CO<sub>2</sub>. Two thiocyanate degradation pathways have been described. In the first one, the C–S bond is broken to form H<sub>2</sub>S and cyanate (N≡C–O<sup>-</sup>) by a cyanase enzyme. The released H<sub>2</sub>S is used as an electron donor and energy source. In the second one, the N≡C bond is broken to NH<sub>3</sub> and carbonyl sulfide (O=C=S) by a thiocyanate hydrolase. The produced H<sub>2</sub>S is eventually oxidized to sulfate. Three types of alkaliphilic halophilic bacteria able to utilize thiocyanate have been described by Sorokin et al. [2001]. The first group included obligate heterotrophes that utilized thiocyanate as a nitrogen source, but not as carbon or energy source. These bacteria were related to *Halomonas*. The second group included obligately autotrophic sulfur-oxidizing bacteria which utilized thiocyanate nitrogen during growth with thiosulfate as the energy source. These bacteria were related to *Thioalkalivibrio*. The third group included obligately autotrophic sulfur-oxidizing bacteria able to utilize thiocyanate as the sole source of nitrogen and energy (no thiosulfate required). These bacteria were also related to *Thioalkalivibrio*. The first two groups of bacteria showed high levels of cyanase activity contrary to the third group of bacteria. Recently described new genera and species of the third type of thiocyanate degrading bacteria included *Thioalkalivibrio paradoxus* and *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* [Sorokin et al., 2002]; *Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans*,

able to grow with thiocyanate as electron donor, either aerobically or anaerobically, and with nitrate or nitrite as electron acceptor [Sorokin et al., 2004] and *Thiohalophilus thiocyanoxidans* capable of anaerobic growth with nitrite as electron acceptor and thiocyanate as electron donor under hypersaline conditions (2–4 M NaCl) [Sorokin et al., 2007b].

### Metabolic Pathways, Enzymes and Genes

Most of the information on pollutant degradation in saline environments is phenomenological, and scarce information is available in literature on the metabolic mechanisms and enzymatic system involved in the pollutant degradation. Here, a review of little available information on metabolic pathways, enzymes and genes involved in the pollutant degradation by halophile microorganism is presented.

**PAH Degradation by Marinobacter.** The *Marinobacter* strain NCE312, isolated from a naphthalene-degrading culture inoculated from creosote-contaminated marine sediment, was shown to have a *Pseudomonas*-like naphthalene 1,2-dioxygenase [Hedlund et al., 2001]. This strain could grow on naphthalene as the sole source of carbon and energy producing bright yellow diffusible products characteristics from the *meta* ring cleavage of catechol through the action of a catechol 2,3-dioxygenase. This strain also degraded 2-methylnaphthalene but not 1-methylnaphthalene, 2,6-dimethylnaphthalene, acenaphthene, biphenyl, phenanthrene or fluorene. Figure 5 shows the naphthalene degradation via the catechol pathway of *Pseudomonas* based on Eaton et al. [1992]. The naphthalene 1,2-dioxygenase and the catechol 2,3-dioxygenase are enzymes involved in the naphthalene metabolism. Degenerate PCR primers directed to a central portion of the naphthalene 1,2-dioxygenase large subunit (NahAc) could successfully amplify a DNA fragment encoding a naphthalene dioxygenase in strain NCE312. According to a phylogenetic analysis, this dioxygenase was related to well-studied naphthalene 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas*, *Burkholderia* and *Nephtunomonas* and may have been acquired through horizontal gene transfer.

**Aromatic Acids Degradation in Moderate Halophilic Bacteria and Halophilic Archaea.** García et al. [2005a] amplified genes encoding the three ring-cleaving enzymes catechol 1,2-dioxygenase, catechol 2,3-dioxygenase and protocatechuate 3,4-dioxygenase of the  $\beta$ -ketoadipate pathway for the metabolism of aromatic com-



pounds in moderate halophilic bacteria. They have used degenerate PCR primers designed from conserved regions of nonhalophilic bacteria: *Acinetobacter radiore-sistens* for catechol 1,2-dioxygenase, *Pseudomonas puti-da* for catechol 2,3-dioxygenase and *Pseudomonas aeru-ginosa* for protocatechuate 3,4-dioxygenase. Figure 4 shows the reactions catalyzed by these enzymes. Some isolates seemed to be catabolically versatile since they contained the genes encoding for both the catechol 1,2- and the protocatechuate 3,4-dioxygenases. The degenerate primers designed for the catechol 2,3-dioxygenase gene gave slightly positive signals only for three of the tested strains; the majority of the strains yielded no signal or a smaller PCR product than expected. Catechol 1,2- and protocatechuate 3,4-dioxygenase activities were detected in *Halomonas organivorans* but not catechol 2,3-dioxygenase activity. According to the measured enzymatic activities, *Halomonas organivorans* preferentially used the catechol *ortho* pathway for degrading the benzoic, cinnamic, salicylic, phenylpropionic and *p*-aminosalicylic acid and, the protocatechuate pathway for degrading the *p*-hydroxybenzoic, *p*-coumaric and ferulic acid. The phenylacetic acid was apparently degraded through a different pathway since none of the ring-cleavage enzymatic activities assayed could be detected in this bacterium.

A gentisate 1,2-dioxygenase enzyme was purified and sequenced from the halophilic archaeon *Haloferax* sp. D1227 [Fu and Oriel, 1998]. As mentioned before, this microorganism is capable of aerobic metabolism of benzoic, cinnamic, and 3-phenylpropionic acid. Figure 3 shows the reaction catalyzed by the gentisate 1,2-dioxy-genase. Ring fission occurs between the carbonyl and the hydroxyl groups and therefore it cannot be considered nor as an *ortho* or a *para* ring-fission type. The gentisate 1,2-dioxygenase from *Haloferax* D1227 has similar molecular weight and subunit structure as its eubacterial counterparts. It possess a four histidine cluster, His-X-His, and the amino acids His, Tyr and Glu in the extradiol dioxygenase fingerprint region. These sequences are related to iron ligand binding and catalytic function in bacterial extradiol dioxygenases (*meta* ring-cleavage enzymes). The optimal salt concentration for this enzyme was 2 M KCl or NaCl. This enzyme had a 9.2% excess of acidic over basic amino acids, this is a characteristic feature of halophilic enzymes.

A pathway was proposed for the degradation of the 3-phenylpropionic, cinnamic, benzoic and 3-hydroxybenzoic acids in *Haloferax* sp. D1227 [Fu and Oriel, 1999]. The first part of this pathway involves a pathway similar

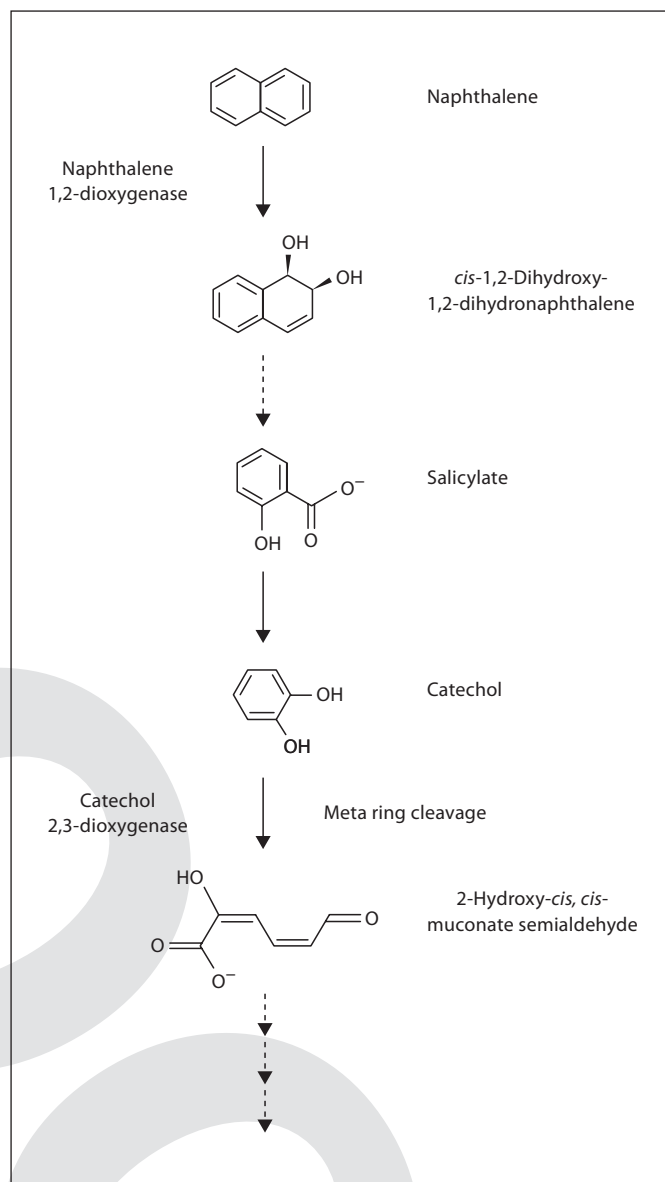
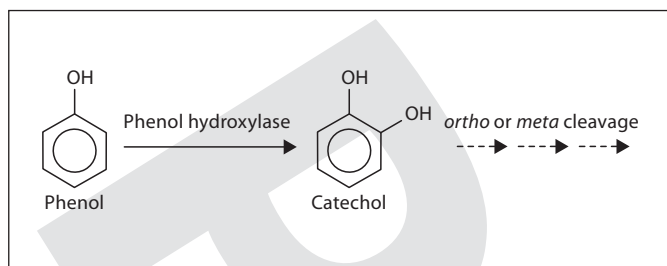


Fig. 5. Pathway for the degradation of naphthalene.

to fatty acids  $\beta$  oxidation in which CoA thioesters are formed (fig. 2a). The 3-phenylpropionic acid is metabolized by a 2-carbon consecutive cleavage to produce benzoylCoA. Each carbon is removed by coenzyme A as acetyl CoA. BenzoylCoA is further degraded through the gentisate pathway. The upper aliphatic pathway is induced by 3-phenylpropionic and cinnamic acid but not by benzoic acid. The lower gentisate pathway from benzoic to gentisic acid is induced by benzoate. Recently, Fairley et al. [2006] found that a gentisate 1,2-dioxygen-



**Fig. 6.** Transformation of phenol into catechol by phenol hydroxylase.

ase gene (*gdoA*) was expressed during growth of *Haloferax* sp. D1227 on benzoate, 3-hydroxybenzoate, cinnamate, and 3-phenylpropionate. Both genes, encoding a putative CoA-synthetase subunit (*acdB*) and a CoA-thioesterase (*tieA*), were expressed during growth on benzoate, cinnamate, and 3-phenylpropionate but not on 3-hydroxybenzoate. These findings are consistent with the above proposed pathway. A *gdoA* gene was also detected in *Haloharcula* sp. strain D1, a halophilic archaeal isolate able to degrade 4-hydroxybenzoic acid (4HBA) as mentioned before [Fairley et al., 2002, 2006]. In this strain, the *gdoA* gene was expressed during growth on 4HBA but not on benzoate. However, gentisate 1,2-dioxygenase activity was detected on this substrate, suggesting that a second and independently regulated *gdoA* gene, with low homology with the *gdoA* gene expressed on 4HBA, might be present in this strain for the degradation of benzoate. No growth was detected on 3-phenylpropionate, cinnamate or 3-hydroxybenzoate. The *acdB* and *tieA* genes were not expressed during growth of this strain on benzoate, suggesting different pathways for the catabolism of aromatic acids in the two archaea *Haloharcula* and *Haloferax*. The *Haloharcula* sp. strain D1 was also shown to metabolize 4HBA via gentisate and not protocatechuate or catechol. The first step of 4HBA degradation did not involve the formation of CoA thioesters but a hydroxylation-induced intramolecular migration of the carboxyl group to form gentisic acid (fig. ■■■) [Fairley et al., 2002]. This unusual pathway had been previously reported in *Bacillus stearothermophilus* [Keenan and Chapman, 1978].

**Phenol Degradation by Moderate Halophilic Bacteria.** Aerobic halophilic bacteria degrade phenol mainly by the *meta* and *ortho* cleavage pathways (fig. 4). Some bacteria degrade phenol use one of these two pathways, while others may degrade phenol using both pathways [Jiang et al., 2006]. The first step in the pathway, the conversion of

phenol to catechol, is catalyzed by a multicomponent phenol hydroxylase (fig. 6) [Nordlund et al., 1990]. The accumulation of catechol and *cis,cis*-muconic acid, intermediates of phenol degradation through the *ortho*-cleavage pathway, has been observed during the growth of several *Halomonas* strains on phenol, indicating that these bacteria used the *ortho* pathway [Alva and Peyton, 2003; Hinteregger and Schreiber, 1997; Maskow and Kleinstueber, 2004]. This is also the case for *Halomonas organivorans*, a moderate halophile able to degrade phenol and several aromatic acids that showed high catechol 1,2-dioxygenase activity, also indicating the *ortho* pathway [García et al., 2005a]. Interestingly, the haloalkaliphilic *Halomonas* sp. strain EF11 assimilated phenol through both the *ortho* and the *meta* pathways depending on the C/N ratio in the culture medium [Maskow and Kleinstueber, 2004].

**2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degradation by Moderate Halophilic Bacteria.** In nonhalophilic bacteria, catabolism of the herbicide 2,4-D involves enzymes encoded in the broad host range conjugative pJP4 plasmid. The chlorocatechol oxidative operon consisting of the *tfdCDEF* genes is encoded by this plasmid; it converts 3,5-dichlorocatechol to chloromaleylacetate; this compound is then dechlorinated and incorporated into the oxoadipate pathway ( $\beta$ -oxidation degradation) (fig. 7) [Perkins et al., 1990]. The moderately halophilic *Halomonas* sp. strain I-18 degraded the herbicide 2,4-D by using the same pathway as most nonextremophilic 2,4-D-degrading bacteria. Comparison of partial sequences of the *tfdA* gene (encoding a 2,4-D- $\alpha$ -ketoglutaric acid oxygenase) from this isolate with those of nonextremophilic bacteria suggested a common genetic origin of the 2,4-D degradation pathway [Maltseva et al., 1996]. The plasmid pJP4 was successfully used in conjugation experiments with mixed cultures enriched from water and sediment samples from an alkaline pond. One transconjugant, the alkaliphilic moderately halophilic *Halomonas* strain EF43, stably maintained the plasmid and degraded 2,4-D, but it could not use this compound as the sole source of carbon and energy [Kleinstueber et al., 2001]. So, the nonextremophilic genes encoding 2,4-D degradation carried by the pJP4 plasmid were expressed in *Halomonas* and the plasmid-encoded 2,4-D degradative enzymes were active in this bacteria. This is not surprising since moderately halophilic organisms maintain a non-extreme low salt concentration in their cytoplasm in which nonextremophilic enzymes can be active; these bacteria could eventually be the hosts for degradative pathways from nonextremophilic organisms.

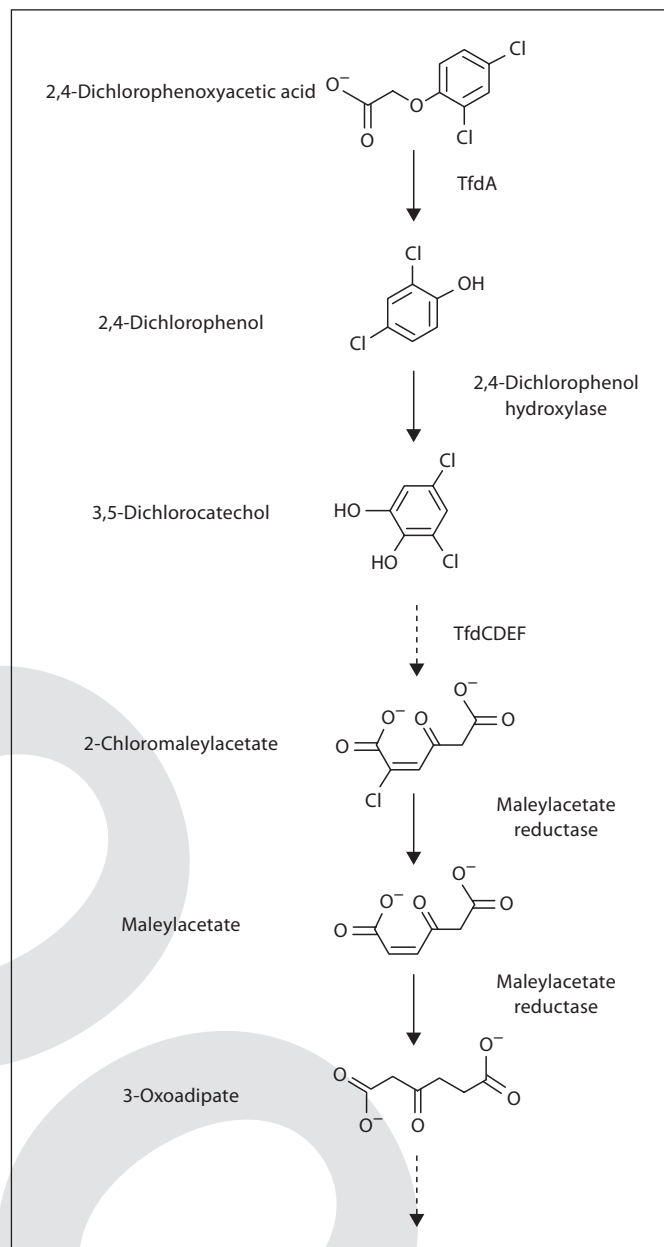
## Final Remarks

Doubtless, saline and hypersaline ecosystems are very important **because both** surface extension and natural equilibria. Over the last decades, fundamentally important contributions to our understanding of the ecology of complex microbial in saline and hypersaline communities have been made. Among these contributions are detailed studies of carbon, oxygen, nitrogen, and sulfur biogeochemical cycling, measurements of trace gas production and consumption, measurements of light penetration and photosynthesis, and surveys of the overwhelming diversity of microorganisms, as determined using molecular biological methods.

As all ecosystems on Earth, saline and hypersaline environments are submitted to pollution. Due to their reduced microbial diversity when compared with nonextreme environments, pollutant degradation becomes critical in these environments. Available information in the literature on the microbial degradation of xenobiotics and contaminants in these ecosystems is scarce. This work demonstrates that halotolerant and halophilic microorganisms are able to metabolize some pollutants. Nevertheless, significant research efforts are still necessary in order to estimate the potential of these natural systems to recover from pollution. These efforts should also be focused on basic research to understand the overall degradation mechanisms and to identify the enzymes involved in the degradation process and metabolism regulation.

From the application point of view, scientists have faith in their search for extremophiles, the bacteria that live in harsh environments. Some bacteria from extreme environments probably have enzymes that can direct novel chemical reactions. In addition, enzymes from halophilic bacteria could have several potential advantages. The first is obvious: a number of chemical processes require enzymes to act, or retain their activity, at high salt concentration.

The main challenge to use enzymes in industry has been lack of stability. Enzymes are nontoxic, biodegradable, and great catalysts, but many of them are too unstable under industrial process conditions. Halophilic enzymes could be more stable in some process conditions. Even if they are to be used at a low salt concentration, they may last far longer than regular enzymes. They may also resist the destructive effects of organic chemicals used in other steps of the industrial processes.



**Fig. 7.** Pathway for the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. TfdA is the 2,4-D:alpha-ketoglutaric acid dioxygenase. TfdCDEF are enzymes of the chlorocatechol degradation pathway.

Finally, microbes and enzymatic systems from mesophilic environments are unable to efficiently perform pollutant degradation at high salt concentration, as in the case of the treatment of saline effluents on conventional wastewater treatment plants. Thus, new bioremediation and biotreatment processes should be designed for resto-

ration of contaminated saline and hypersaline ecosystems and saline industrial effluents. To reach this goal, the understanding of the metabolic mechanisms involved in the transformation of pollutants by halotolerant and halophilic bacteria is imperative.

## References

- Abdelkafi S, Chambkha M, Casalat L, Sayadi S, Labat M: Isolation and characterization of a novel *Bacillus* sp., strain YAS1, capable of transforming tyrosol under hypersaline conditions. *FEMS Microbiol Lett* 2005;252:79–84.
- Abdelkafi S, Sayadi S, Ben Ali Gam Z, Casalat L, Labat M: Bioconversion of ferulic acid to vanillic acid by *Halomonas elongata* isolated from table-olive fermentation. *FEMS Microbiol Lett* 2006;262:115–120.
- Abed RMM, Al-Thukair A, de Beer D: Bacterial diversity of a cyanobacterial mat degrading petroleum compounds at elevated salinities and temperatures. *FEMS Microbiol Lett* 2006;57:290–301.
- Alva V, Peyton BM: Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile *Halomonas campisalis*: influence of pH and salinity. *Environ Sci Technol* 2003;37:4397–4402.
- Asad S, Amoozegar MA, Pourbabaee AA, Sarbolouki MN, Dastgheib SM: Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. *Bioresour Technol* 2007;98:2082–2088.
- Atlas RM, Bartha R: Degradation and mineralization of petroleum in seawater: limitation by nitrogen and phosphorous. *Biotechnol Bioeng* 1972;14:309–317.
- Azachi M, Henis Y, Shapira R, Oren A: The role of the outer membrane in formaldehyde tolerance in *Escherichia coli* VU3695 and *Halomonas* sp. *MAC. Microbiology* 1996;142:1249–1254.
- Bertrand JC, Almallah M, Acquaviva M, Mille G: Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium. *Lett Appl Microbiol* 1990;11:260–263.
- Brito EM, Guyoneaud R, Goni-Urriza M, Ranchou-Peyruse A, Verbaere A, Crapez MA, Wasserman JC, Duran R: Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Res Microbiol* 2006;157:752–762.
- Bromley-Challenor KCA, Caggiano N, Knapps JS: Bacterial growth on N,N-dimethylformamide: implications for the treatment of industrial wastewaters. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2000;25:8–16.
- Cohen Y: Bioremediation of oil by marine microbial mats. *Int Microbiol* 2002;5:189–193.
- Colwell RR: Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *CRC Crit Rev Microbiol* 1977;5:423–445.
- Cuadros-Orellana S, Pohlschröder M, Durrant LR: Isolation and characterization of halophilic archaea able to grow in aromatic compounds. *Int Biodeter Biodegradation* 2006;57:151–154.
- DasSarma S, Arora P: Halophiles; in *Encyclopedia of Life Sciences*. London, Nature Publishing Group, 2002, vol 8, pp 458–466.
- DeFrank JJ, Beaudry WT, Cheng TC, Harvey SP, Stroup AN, Szafraniec LL: Screening of halophilic bacteria and *Alteromonas* species for organophosphorus hydrolyzing enzyme activity. *Chem Biol Interact* 1993;87:141–148.
- DeFrank JJ, Cheng TC: Purification and properties of an organophosphorus acid anhydase from a halophilic bacterial isolate *J Bacteriol* 1991;173:1938–1943.
- Del Moral A, Prado B, Quesada E, García T, Ferrer R, Ramos-Cormenzana A: Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods from an inland saltern. *J Gen Microbiol* 1988;134:733–741.
- Deppe U, Richnow HH, Michaelis W, Antranikian G: Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium. *Extremophiles* 2005;9:461–470.
- Díaz MP, Boyd KG, Grigson SJW, Burgess JG: Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. *Biotechnol Bioeng* 2002;79:145–153.
- Díaz MP, Grigson SJW, Peppiatt CJ, Burgess JG: Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. *Mar Biotechnol* 2000;2:522–532.
- Eaton RW, Chapman PJ: Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. *J Bacteriol* 1992;174:7542–7554.
- Emerson D, Breznak JA: The response of microbial populations from oil-brine contaminated soil to gradient of NaCl and sodium *p*-toluate in a diffusion gradient chamber. *FEMS Microbiol Ecol* 1997;23:285–300.
- Emerson D, Chauchan S, Oriel P, Breznak JA: *Haloferax* sp. D1227, a halophilic archaeon capable of growth on aromatic compounds. *Arch Microbiol* 1994;161:445–452.
- Fairley DJ, Boyd DR, Sharma ND, Allen CC, Morgan P, Larkin MJ: Aerobic metabolism of 4-hydroxybenzoic acid in *Archaea* via an unusual pathway involving an intramolecular migration (NIH shift). *Appl Environ Microbiol* 2002;68:6246–6255.
- Fairley DJ, Wang G, Rensing C, Pepper IL, Larkin MJ: Expression of gentisate 1,2-dioxygenase (*gdoA*) genes involved in aromatic degradation in two haloarchaeal genera. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;73:691–695.
- Field JA, Stams AJ, Kato M, Schraa G: Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in co-cultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1995;67:47–77.
- Fu W, Oriel P: Gentisate 1,2-dioxygenase from *Haloferax* sp. D1227. *Extremophiles* 1998;2:439–436.
- Fu W, Oriel P: Degradation of 3-phenylpropionic acid by *Haloferax* sp. D1227. *Extremophiles* 1999;3:45–53.
- Fulthorpe RR, McGowan C, Maltseva OV, Holben WE, Tiedje JM: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria contain mosaics of catabolic genes. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:3274–3281.
- Fuse H: Oxidation of organic compounds by bacteria. Patent JP10128385. 1998.
- García MT, Gallego V, Ventosa A, Mellado E: *Thalassobacillus devorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, phenol-degrading, Gram-positive bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005b;55:1789–1795.
- García MT, Mellado E, Ostos JC, Ventosa A: *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:1723–1728.
- García MT, Ventosa A, Mellado E: Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 2005a;54:97–109.
- García MT, Ventosa A, Ruiz-Berraquero F, Kocur M: Taxonomic study and amended description of *Vibrio costicola*. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:352–360.
- Gauthier MJ, Lafay B, Christen R, Fernandez L, Acquaviva M, Bonin P, Bertrand JC: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:568–576.
- Gorshkova NM, Ivanova EP, Sergeev AF, Zhukova NV, Alexeeva Y, Wright JP, Nicolau DV, Mikhailov VV, Christen R: *Marinobacter excellens* sp. nov., isolated from sediments of the Sea of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:2073–2078.

## Acknowledgement

The authors wish to acknowledge the National Council for Science and Technology of Mexico for funding the Project CONACYT 50154 entitled 'Caracterización metabólica y molecular de la degradación de contaminantes ambientales por microorganismos halófilos extremos'.

- Grant WD, Gemmel RT, McGenity TJ: Halophiles; in Horikoshi K, Grant W (eds): *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*. New York, Wiley-Liss, 1998, pp 93–132.
- Green DH, Bowman JP, Smith EA, Gutierrez T, Bolch CJ: *Marinobacter algicola* sp. nov., isolated from laboratory cultures of paralytic shellfish toxin-producing dinoflagellates. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:523–527.
- Grötzschel S, Köster J, Abed RMM, Beer D: Degradation of petroleum model compounds immobilized on clay by a hypersaline microbial mat. *Biodegradation* 2002;13:273–283.
- Gu J, Cai H, Yu SL, Qu R, Yin B, Guo YF, Zhao JY, Wu XL: *Marinobacter gudaonensis* sp. nov., isolated from an oil-polluted saline soil in a Chinese oilfield. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:250–254.
- Guo J, Zhou J, Wang D, Tian C, Wang P, Uddin MS: A novel moderately halophilic bacterium for decolorizing azo dye under high salt condition. *Biodegradation* 2008;19:15–19.
- Harayama S, Kasai Y, Hara A: Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr Opin Biotechnol* 2004;15:205–214.
- Harayama S, Kishira H, Kasai Y, Shutsubo K: Petroleum biodegradation in marine environments. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1999;1:63–70.
- Hayes VE, Ternan NG, McMullan G: Organophosphonate metabolism by a moderately halophilic bacterial isolate. *FEMS Microbiol Lett* 2000;186:171–175.
- Head IM, Jones DM, Roling WF: Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:173–182.
- Head IM, Swannell RP: Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:234–239.
- Hebert AM, Vreeland RH: Phenotypic comparison of halotolerant bacteria: *Halomonas halodurans* sp. nov., nom. rev., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:347–350.
- Hedlund BP, Geiselbrecht AD, Staley JT: *Marinobacter* strain NCE312 has a *Pseudomonas*-like naphthalene dioxygenase. *FEMS Microbiol Lett* 2001;201:47–51.
- Hinteregger C, Streischsberg F: *Halomonas* sp., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic waste-water. *Biotechnol Lett* 1997;19:1099–1102.
- Huu NB, Denner EB, Ha DT, Wanner G, Stan-Lotter H: *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:367–375.
- Ivanova EP, Kurilenko VV, Kurilenko AV, Gorskova NM, Shubin FN, Nicolau DV, Chelomin VP: Tolerance to cadmium of free-living and associated with marine animals and eelgrass marine gamma-proteobacteria. *Curr Microbiol* 2002;44:357–362.
- Jiang HL, Tay ST, Maszenan AM, Tay JH: Physiological traits of bacterial strains isolated from phenol-degrading aerobic granules. *FEMS Microbiol Ecol* 2006;57:182–191.
- Jones BE, Grant WD, Duckworth AW, Owenson GG: Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles* 1998;2:191–200.
- Kamekura M: Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles* 1998;2:289–295.
- Kargi F, Dincer AR: Biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation. *J Chem Tech Biotechnol* 1997;69:167–172.
- Keenan SL, Chapman PJ: Carboxy-migration facilitated by bacterial hydroxylation of 4-hydroxybenzoate. *J Chem Soc Chem Commun* 1978;17:731–732.
- Kerr RP, Capone DG: The effect of salinity on the microbial mineralization of two polycyclic aromatic hydrocarbons in estuarine sediments. *Marine Environ Res* 1988;26:181–198.
- Khmelina VN, Kalyuzhnaya MG, Starostina NG, Suzina NE, Trotsenko YA: Isolation and characterization of halotolerant alkaliphilic methanotrophic bacteria from Tuva soda lakes. *Curr Microbiol* 1997;35:257–261.
- Kim SG, Bae HS, Oh HM, Lee ST: Isolation and characterization of novel halotolerant and/or halophilic denitrifying bacteria with versatile metabolic pathways for the degradation of trimethylamine. *FEMS Microbiol Lett* 2003;225:263–269.
- Kim BY, Weon HY, Yoo SH, Kim JS, Kwon SW, Stackebrandt E, Go SJ: *Marinobacter koreensis* sp. nov., isolated from sea sand in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:2653–2656.
- Kleinstaub S, Muller RH, Babel W: Expression of the 2,4-D degradative pathway of pJP4 in an alkaliphilic, moderately halophilic soda lake isolate, *Halomonas* sp. EF43. *Extremophiles* 2001;5:375–384.
- Kleinstaub S, Riis V, Fetzer I, Harms H, Müller S: Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:3531–3542.
- Kulichevskaya IS, Milekhina EI, Borzenkov IA, Zvyagintseva IS, Belyaev SS: Oxidation of petroleum hydrocarbons by extremely halophilic archaeobacteria. *Microbiology* 1992;60:596–601.
- Kuznetsov VD, Zaitseva TA, Vakulenko LV, Philippova SN: *Streptomyces albiacialis* sp. Nov. A new petroleum hydrocarbon degrading species of thermo and halotolerant *Streptomyces*. *Microbiology* 1992;61:62–67.
- Lefebvre O: Application des micro-organismes halophiles au traitement des effluents industriels hypersalins; PhD thesis. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 2004.
- Lefebvre O, Moletta R: Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. *Water Res* 2006;40:3671–3682.
- Litchfield CD: Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Meteorit Planet Sci* 1998;33:813–819.
- Maltseva O, McGowan C, Fulthorpe R, Oriel P: Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by haloalkaliphilic bacteria. *Microbiol* 1996;142:1115–1122.
- Maltseva O, Oriel P: Monitoring of an alkaline 2,4,6-trichlorophenol-degrading enrichment culture by DNA fingerprinting methods and isolation of the responsible organism, haloalkaliphilic *Nocardioideis* sp. strain M6. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:4145–4149.
- Margesin R, Schinner F: Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001a;56:650–663.
- Margesin R, Schinner R: Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 2001b;5:73–83.
- Marhuenda-Egea FC, Piera-Velazquez S, Cadenas C, Cadenas E: Mechanism of adaptation of an atypical alkaline *p*-nitrophenyl phosphatase from the archaeon *Halobacterium salinarum* at low-water environments. *Biotechnol Bioeng* 2002;78:497–502.
- Marquez MC, Ventosa A: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Gauthier et al. 1992 and *Marinobacter aquaeolei* Nguyen et al. 1999 are heterotypic synonyms. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:1349–1351.
- Martinez-Checa F, Toledo FL, Vichez R, Quesada E, Calvo C: Yield production, chemical composition, and functional properties of emulsified H28 synthesized by *Halomonas eurialina* strain H-28 in media containing various hydrocarbons. 2002;58:358–363.
- Maskow T, Kleinstaub S: Carbon and energy fluxes during haloadaptation of *Halomonas* sp. EF11 growing on phenol. *Extremophiles* 2004;8:133–141.
- Mathrani IM, Boone DR, Mah RA, Fox GE, Lau PP: *Methanohalophilus zhilinae* sp. nov., an alkaliphilic, halophilic, methylotrophic methanogen. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:139–142.
- Nicholson CA, Fathepure BZ: Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:1222–1225.
- Nicholson CA, Fathepure BZ: Aerobic biodegradation of benzene and toluene under hypersaline conditions at the Great Salt Plains, Oklahoma. *FEMS Microbiol Lett* 2005;245:257–262.
- Nordlund I, Powlowski J, Shingler V: Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J Bacteriol* 1990;172:6826–6833.
- Oesterhelt D, Patzelt H, Kesler B: Decomposition of halogenated hydrocarbons by halophilic bacteria. Patent DE19639894. 1998.
- Oren A: Intracellular salt concentrations of the anaerobic halophilic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Halobacteroides halobius*. *Can J Microbiol*. 1986;32:4–9.
- Oren A: Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999;63:334–348.
- Oren A: *Halophilic Microorganisms and Their Environments*. Amsterdam, Kluwer Academic Publishers, 2002a.

- Oren A: Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2002b;28:56–63.
- Oren A, Gurevich P, Azachi M, Hents Y: Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations. *Biodegradation* 1992;3:387–398.
- Oriel P, Chauhan S, Maltseva O, Fu W: Degradation of aromatics and haloaromatics by halophilic bacteria, in Horikoshi K, Fukuda M, Kudo T (eds): *Microbial Diversity and Genetics of Biodegradation*. Tokyo, Japan Scientific Societies Press, 1997, pp 123–130.
- Perkins EJ, Gordon MP, Caceres O, Lurquin PF: Organization and sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4. *J Bacteriol* 1990;172:2351–2359.
- Pernetti M, Di Palma L: Experimental evaluation of inhibition effects of saline wastewater on activated sludge. *Environ Technol* 2005; 26:695–703.
- Piedad Diaz M, Grigson SJ, Peppiatt CJ, Burgess JG: Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. *Mar Biotechnol* 2000;2:522–532.
- Pieper D, Reineke W: Engineering bacteria for bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11:262–270.
- Purdy KJ, Cresswell-Maynard TD, Nedwell DB, McGenity TJ, Grant WD, Timmis KN, Embley TM: Isolation of haloarchaea that grow at low salinities. *Environ Microbiol* 2004;6: 591–595.
- Razo-Flores E, Donlon B, Lettinga G, Field JA: Biotransformation and biodegradation of N-substituted aromatics in methanogenic granular sludge. *FEMS Microbiol Rev* 1997; 20:525–538.
- Riis V, Kleinstuber S, Babel W: Influence of high salinities on the degradation of diesel fuel by bacteria consortia. *Can J Microbiol* 2003;49:713–721.
- Robertson DE, Lai MC, Gunsalus RP, Roberts MF: Composition, variation, and dynamics of major osmotic solutes in *Methanohalophilus* strain FDF1. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:2438–2443.
- Romanenko LA, Schumann P, Rohde M, Zhukova NV, Mikhailov VV, Stackebrandt E: *Marinobacter bryozoorum* sp. nov. and *Marinobacter sediminum* sp. nov., novel bacteria from the marine environment. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:143–148.
- Rontani JF, Gilewicz MJ, Michotey VD, Zheng TL, Bonin PC, Bertrand JC: Aerobic and anaerobic metabolism of 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one by a denitrifying bacterium isolated from marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:636–643.
- Rontani JF, Mouzdahir A, Michotey V, Caumette P, Bonin P: Production of a polyunsaturated isoprenoid wax ester during aerobic metabolism of squalene by *Marinobacter squalenivorans* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:4167–4176.
- Rosenberg A: *Pseudomonas halodurans* sp. nov., a halotolerant bacterium. *Arch Microbiol* 1983;136:117–123.
- Rothschild LJ, Mancinelli RL: Life in extreme environments. *Nature* 2001;409:1092–1101.
- Sette LD, Simioni KC, Vasconcelos SP, Dussan LJ, Neto EV, Oliveira VM: Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2007; 91:253–266.
- Shieh WY, Jean WD, Lin YT, Tseng M: *Marinobacter lutaensis* sp. nov., a thermotolerant marine bacterium isolated from a coastal hot spring in Lutaio, Taiwan. *Can J Microbiol* 2003;49:244–252.
- Shivaji S, Gupta P, Chaturvedi P, Suresh K, DeLille D: *Marinobacter maritimus* sp. nov., a psychrotolerant strain isolated from sea water off the subantarctic Kerguelen islands. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:1453–1456.
- Singh BK, Walker A: Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30:428–471.
- Sørensen SR, Arbeli Z, Aamand J, Ronen Z: Metabolism of diphenylurea by a *Marinobacter* sp. isolated from a contaminated ephemeral stream bed in the Negev Desert. *FEMS Microbiol Lett* 2002;213:199–204.
- Sørensen SR, Bending GD, Jacobsen CS, Walker A, Aamand J: Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMS Microbiol Ecol* 2003;45:1–11.
- Sorokin DY, Jones BE, Kuenen JG: An obligate methylotrophic, methane-oxidizing *Methylobacterium* species from a highly alkaline environment. *Extremophiles* 2000;4:145–155.
- Sorokin DY, Tourova TP, Antipov AN, Muyzer G, Kuenen JG: Anaerobic growth of the haloalkaliphilic denitrifying sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans* sp. nov. with thiocyanate. *Microbiology* 2004;150:2435–2442.
- Sorokin DY, Tourova TP, Bezoudnova EY, Pol A, Muyzer G: Denitrification in a binary culture and thiocyanate metabolism in *Thiohalophilus thiocyanoxidans* gen. nov. sp. nov. – a moderately halophilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing Gammaproteobacterium from hypersaline lakes. *Arch Microbiol* 2007b;187:441–450.
- Sorokin DY, Tourova TP, Lysenko AM, Kuenen JG: Microbial thiocyanate utilization under highly alkaline conditions. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:528–538.
- Sorokin DY, Tourova TP, Lysenko AM, Mityushina LL, Kuenen JG: *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* sp. nov. and *Thioalkalivibrio paradoxus* sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur-oxidizing bacteria capable of growth on thiocyanate, from soda lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:657–664.
- Sorokin DY, van Pelt S, Tourova TP, Takaichi S, Muyzer G: Acetonitrile degradation under haloalkaline conditions by *Natronocella acetinitrilica* gen. nov., sp. nov. *Microbiology* 2007a;153:1157–1164.
- Speight JG: *The Chemistry and Technology of Petroleum*, ed 3. New York, Marcel Dekker, 1998, pp 1–202.
- Takai K, Moyer CL, Miyazaki M, Nogi Y, Hirayama H, Nealson KH, Horikoshi K: *Marinobacter alkaliphilus* sp. nov., a novel alkaliphilic bacterium isolated from seafloor alkaline serpentine mud from Ocean Drilling Program Site 1200 at South Chamorro Seamount, Mariana Forearc. *Extremophiles* 2005;9:17–27.
- van den Bosch PL, van Beusekom OC, Buisman CJ, Janssen AJ: Sulfide oxidation under haloalkaline conditions in a fed-batch bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 2007;97:1053–1063.
- Ventosa A, Carmen Marquez M, Garabito MJ, Arahal DR: Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles* 1998a;2:297–304.
- Ventosa A, Nieto JJ, Oren A: Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998b;62:504–544.
- Ventosa A, Quesada E, Rodriguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A: Numerical taxonomy of moderately halophilic gram-negative rods. *J Gen Microbiol* 1982;128:1959–1968.
- Ward DM, and Brock TD: Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Appl Environ Microbiol* 1978;35:353–359.
- Woolard CR, Irvine RL: Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. *Water Environ Res* 1994;66: 230–235.
- Woolard CR, Irvine RL: Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. *Water Res* 1995;29:1159–1168.
- Yakimov MM, Denaro R, Genovese M, Cappello S, D'Auria G, Chernikova TN, Timmis KN, Golyshein PN, Giluliano L: Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environ Microbiol* 2005;7: 1426–1441.
- Yang L, Lai C, Shieh WK: Biodegradation of dispersed diesel fuel under high salinity conditions. *Wat Res* 2000;34:3303–3314.
- Yoon JH, Shin DY, Kim IG, Kang KH, Park YH: *Marinobacter litoralis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from sea water from the East Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:563–568.
- Yoon JH, Yeo SH, Kim IG, Oh TK: *Marinobacter flavimaris* sp. nov. and *Marinobacter daepoensis* sp. nov., slightly halophilic organisms isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54: 1799–1803.
- Zvyagintseva IS, Poglasova MN, Gotoeva MT, Belyaev SS: Effect of the medium salinity on oil degradation by nocardioform bacteria. *Microbiology* 2001;70:652–656.

# BIBLIOGRAFÍA

---

---

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Abed R.M.M., Al-Thukair A., de Beer D.** 2006. Bacterial diversity of a cyanobacterial mat degrading petroleum compounds at elevated salinities and temperatures. *FEMS Microbiol. Lett.* **57**: 290-301.
- Atlas R. M. and Bartha R.** 1972a. Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. *Can. J. Microbiol.* **18**: 1851-1855.
- Atlas R. M. and Bartha R.** 1972b. Degradation and mineralization of petroleum in seawater: limitation by nitrogen and phosphorous. *Biotechnol. Bioeng.* **14**: 309-317.
- Alva V. A. and Peyton B. M.** 2003. Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile *Halomonas campisalis*: Influence of pH and Salinity. *Environ. Sci. Technol.* **37**: 4397-4402.
- Ballihaut G., Klein B., Goulas P., Duran R., Caumette P., Grimaud R.** 2004. Analysis of the adaptation to alkanes of the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* sp 17 by two dimensional gel electrophoresis. *Aquat. Living Resour.* **17**: 269-272.
- Bertrand J. C., Almallah M., Acquaviva M., Mille G.** 1990. Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**: 260-263.
- Bertrand J. C., Rambeloarisoa E., Rontani J. F., Giusti G., Mattei G.** 1983. Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. *Biotechnol. Lett.* **5**: 567-572.
- Brito E.M., Guyoneaud R., Goni-Urriza M., Ranchou-Peyruse A., Verbaere A., Crapez M.A., Wasserman J.C., Duran R.** 2006. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Res. Microbiol.* **157**: 752-762.
- Bouchez-Naïtali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J. Y., Vandecasteele J. P.** 1999. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 421-428



- Boukir A., Aries E., Guiliano M., Asia L., Doumenq P., Mille G.** 2001. Subfractionation, characterization and photooxidation of crude oil resins. *Chemosphere*. **43**: 279-286.
- Cohen Y.** 2002. Bioremediation of oil by marine microbial mats. *Int. Microbiol.* **5**: 189-193.
- Colwell R. R.** 1977 Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Crit. Rev. Microbiol.* **5**: 423-45.
- DasSarma, S. and Arora P.** 2001. Halophiles. *Enciclopedia of Life Sciences*. 2001. Nature Publishing Group.
- Deppe U., Richnow H. H., Michaelis W., Antranikian G.** 2005. Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium. *Extremophiles*. **9**: 461-47.
- Díaz M. P., Grigson Steve J. W., Peppiatt Chris J., and Grant Burgess J.** 2000. Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degradating euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. *Mar. Biotechnol.* **2**: 522-532.
- Díaz M. P., Boyd K. G., Grigson S. J. W., Burgess J. G.** 2002. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polyethylene fibers. *Biotechnol. Bioeng.* **79**: 145-153.
- Emerson D., Chauhan S., Oriel P., Breznak J. A.** 1994. *Haloferax* sp. D1227, a halophilic Archeon capable of growth on aromatic compounds. *Arch. Microbiol.* **161**: 445-452.
- Fernández-Álvarez P., Vila J., Garrido-Fernández J. M., Grifoll M., Lema J. M.** 2006. Trials of bioremediation on a beach affected by the heavy oil spill of the Prestige. *J. Hazardous Materials*. **B137**: 1523-1531.
- García M. T., Mellado E., Ostos J. C., Ventosa A.** 2004. *Halomonas organivorans* sp. Nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1723-1728.
- García M. T., Ventosa A., Mellado E.** 2005a. Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54**: 97-109.

- García M. T., Gallego V., Ventosa A., Mellado E.** 2005b. *Thalassobacillus devorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, phenol-degrading, Gram-positive bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1789-1795.
- Gauthier M.J., Lafay B., Christen R., Fernandez L., Acquaviva M., Bonin P., Bertrand J. C.** 1992. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. Nov., sp. Nov., a new extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42** (4):568-576.
- González-Hernández J.C., Peña A.** 2002. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (levadura halófila). *Rev. Latinoam. Microbiol.* **44**: 137-156.
- Gorshkova N. M., Ivanova E. P., Sergeev A. F., Zhukova N. V., Alexeeva Y, Wright J. P., Nicolau D. V., Mikhailov V. V., Christen R.** 2003. *Marinobacter excellens* sp. nov., isolated from sediments of the Sea of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 2073-2078.
- Grant W. D., Gemmel R. T., McGenity T. J.** 1998. Capítulo: Halophiles. editores Horikoshi K, Grant W: *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*. Editorial Wiley-Liss. pp 93-132.
- Green D. H., Bowman J. P., Smith E. A., Gutierrez T, Bolch C. J.** 2006. *Marinobacter algicola* sp. nov., isolated from laboratory cultures of paralytic shellfish toxin-producing dinoflagellates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 523-527.
- Grötzschel S., Köster J., Abed R. M. M., Beer D.** 2002. Degradation of petroleum model compounds immobilized on clay by a hypersaline microbial mat. *Biodegradation.* **13**: 273-283.
- Gu J., Cai H., Yu S. L., Qu R., Yin B., Guo Y. F., Zhao J. Y., Wu X. L.** 2007. *Marinobacter gudaonensis* sp. nov., isolated from an oil-polluted saline soil in a Chinese oilfield. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 250-254.
- Harayama S, Kishira H, Kasai Y, Shutsubo K.** 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 63-70.
- Harayama S, Kasai Y, Hara A.** 2004. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 205-14.

- Head I. M., Jones D. M., Roling W. F.** 2006 Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:173-182.
- Head I. M., Swannell R. P.** 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 234-9.
- Hedlund B. P., Geiselbrecht A. D., Bair T.J., Staley J.T.** 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 251-259.
- Hedlund B. P., Geiselbrecht A. D., Staley J. T.** 2001. *Marinobacter* strain NCE312 has a Pseudomonas-like naphthalene dioxygenase. *FEMS Microbiol. Lett.* **201**: 47-51.
- Hebert A. M., and Vreeland R. H.** 1987. Phenotypic comparison of halotolerant bacteria: *Halomonas halodurans* sp. nov., nom. rev., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 347-350.
- Hinteregger C. and Streichsbier F.** 1997. *Halomonas* sp., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic waste-water. *Biotechnol. Lett.* **19**: 1099-1102.
- Huu N. B., Denner E. B. M., Ha D. T. C., Wanner G., Stan-Lotter H.** 1999. *Marinobacter aquaeolei* sp. Nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 367-375.
- Ivanova E. P., Kurilenko V. V., Kurilenko A. V., Gorshkova N. M., Shubin F. N., Nicolau D. V., Chelomin V. P.** 2002. Tolerance to cadmium of free-living and associated with marine animals and eelgrass marine gamma-proteobacteria. *Curr. Microbiol.* **44**: 357-362.
- Janda J. M. and Abbott S. L.** 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 2761-2764.
- Johnsen A. R., Wick L. Y., Harms H.** 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Poll.* **133**: 71-84.
- Kamekura M.** 1998. Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles* **2**: 289-295.

- Kerr, R. P., Capone, D. G.** 1988. The effect of salinity on the microbial mineralization of two polycyclic aromatic hydrocarbons in estuarine sediments. *Mar. Environ. Res.* **26**: 181-198.
- Kim B. Y., Weon H. Y., Yoo S. H., Kim J. S., Kwon S. W., Stackebrandt E., Go S. J.** 2006. *Marinobacter koreensis* sp. nov., isolated from sea sand in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 2653-2656.
- Kleinsteuber, S; Riis V; Fetzer I; Harms H; Müller S.** 2006. Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3531-3542.
- Kumar M., León V., De Sisto Materano A., Ilzins O. A.** 2007. A halotolerant and thermotolerant *Bacillus* sp. Degrades hydrocarbons and produces tension-active emulsifying agent. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 211-220.
- Kulichevskaya, I. S., Milekhina, E. I., Borzenkov, I. A., Zvyagintseva, I. S., Belyaev S. S.** 1992. Oxidation of petroleum hydrocarbons by extremely halophilic archaeobacteria. *Microbiology.* **60**: 596-601.
- Kuznetsov V. D., Zaitseva T. A., Vakulenko L. V., Filippova S. N.** 1992. *Streptomyces albiaxialis* sp. Nov. A new petroleum hydrocarbon degrading species of thermo and halotolerant Streptomyces. *Microbiology.* **61**: 62-67.
- Leahy Joseph G., and Colwell Rita R.** 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* **54**: 305-315.
- Maltseva O., McGowan C., Fulthorpe R., and Oriel P.** 1996. Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by haloalkaliphilic bacteria. *Microbiology.* **142**: 1115-1122.
- Marquez MC, Ventosa A.** 2005. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Gauthier et al. 1992 and *Marinobacter aquaeolei* Nguyen et al. 1999 are heterotypic synonyms. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1349-1351.
- Maskow T, Kleinsteuber S.** 2004. Carbon and energy fluxes during haloadaptation of *Halomonas* sp. EF11 growing on phenol. *Extremophiles.* **8**: 133-1341.

- Mesarch M. B., Nakatsu C. H., Nies L.** 2000. Development of Catechol 2,3-Dioxygenase-Specific Primers for Monitoring Bioremediation by Competitive Quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol* **66**: 678–683.
- MicrobeWiki** <http://microbewiki.kenyon.edu/>
- Nicholson C. A. and Fathepure B. Z.** 2004. Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1222-1225.
- Nicholson C. A. and Fathepure B. Z.** 2005. Aerobic Biodegradation of benzene and toluene under hypersaline conditions at the Great Salt Plains, Oklahoma. *FEMS Microbiol. Lett.* **245**: 257-262.
- Oren A., Gurevich P., Azachi M. and Henis Y.** 1992. Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations. *Biodegradation.* **2-3**: 387-398.
- Oren A.** 2002. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 56-63
- Plotnikova E. G., Altyntseva O.V., Kosheleva I. A., Puntus I. F., Filinov A. E., Gavrish E. Yu., Demakov V. A. and Boronin A. M.** 2001. Bacterial degraders of polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from salt-contaminated soils and bottom sediments in salt mining areas. *Microbiology.* **70**: 51-58
- Riis, V., Kleinstaub, S., Babel, W.** 2003. Influence of high salinities on the degradation of diesel fuel by bacteria consortia. *Can. J. Microbiol.* **49**: 713-721
- Romanenko L. A., Schumann P., Rohde M., Zhukova N. V., Mikhailov V. V., Stackebrandt E.** 2005. *Marinobacter bryozorum* sp. nov. and *Marinobacter sediminum* sp. nov., novel bacteria from the marine environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:143-148.
- Rontani J. F., Mouzdahir A., Michotey V., Caumette P., Bonin P.** 2003. Production of a polyunsaturated isoprenoid wax ester during aerobic metabolism of squalene by *Marinobacter squalenivorans* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4167-4176.
- Rosenberg A.** 1983. *Pseudomonas halodurans* sp. nov., a halotolerant bacterium. *Arch. Microbiol.* **136**: 117-123.

- Rothschild L. J., and Mancinelli R. L.** 2001. Life in extreme environments. *Nature*. **409**: 1092-1101.
- Sette L. D., Simioni K. C., Vasconcellos S. P., Dussan L. J., Neto E. V., Oliveira V. M.** 2007. Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie van Leeuwenhoek* **91**: 253-266.
- Shieh W. Y., Jean W. D., Lin Y. T., Tseng M.** 2003. *Marinobacter lutaoensis* sp. nov., a thermotolerant marine bacterium isolated from a coastal hot spring in Lutao, Taiwan. *Can. J. Microbiol.* **49**: 244-252.
- Shivaji S., Gupta P., Chaturvedi P., Suresh K., Delille D.** 2005. *Marinobacter maritimus* sp. nov., a psychrotolerant strain isolated from sea water off the subantarctic Kerguelen islands. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:1453-1456.
- Takai K., Moyer C. L., Miyazaki M., Nogi Y., Hirayama H., Nealson K. H., Horikoshi K.** 2005. *Marinobacter alkaliphilus* sp. nov., a novel alkaliphilic bacterium isolated from subseafloor alkaline serpentine mud from Ocean Drilling Program Site 1200 at South Chamorro Seamount, Mariana Forearc. *Extremophiles* **9**: 17-27.
- University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database.**  
<http://umbbd.msi.umn.edu/>
- van Beilen J. B., Li Z., Duetz W. A., Smits T. H. M., Witholt B.** 2003. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Science and Technology*. **58**: 427-440.
- van Beilen J. B., Funhoff E. G.** 2007. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**:13–21.
- Vázquez-Duhalt. R.** 2000. Environmental Oil Biocatalysis. Capítulo 15 del libro environmental biotechnology and cleaner bioprocesses. Editores: Olguin E.J., Sánchez G., Hernández E. Editorial Taylor & Francis.
- Vázquez D., Mansoori G. A.** 2000. Identification and measurement of petroleum precipitates. *J. Petroleum. Sci. Eng.* **26**: 49-55.

- Venkateswaran K., Hoaki T., Kato M., Maruyama T.** 1995. Microbial degradation of resins fractionated from Arabian light crude oil. *Can. J. Microbiol.* **41**: 418-424.
- Ventosa A., Carmen Marquez M., Garabito M. J., Arahal D. R.** 1998a. Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles.* **2**: 297-304.
- Ventosa A., Nieto J. J., Oren A.** 1998b. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 504-544.
- Ward David M., and Brock T. D.** 1978. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 353-359.
- Wentzel A., Ellingsen T. E., Kotlar H. K., Zotchev S. B., Throne-Holst M.** 2007. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**:1209–1221.
- Woolard C. R., Irvine R. L.** 1994. Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. *Water Environ. Res.* **66**: 230-235.
- Woolard C. R., Irvine R. L.** 1995. Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. *Wat. Res.* **29**: 1159-1168.
- Yakimov M. M., Denaro R., Genovese M., Cappello S., D'Auria G., Chernikova T. N., Timmis K. N., Golyshin P. N., Giluliano L.** 2005. Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environ. Microbiol.* **7**: 1426-1441.
- Yang L., Lai C., Shieh W. K.** 2000. Biodegradation of dispersed diesel fuel under high salinity conditions. *Wat. Res.* **34**: 3303-3314
- Yoon J. H., Shin D. Y., Kim I. G., Kang K. H., Park Y. H.** 2003. *Marinobacter litoralis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from sea water from the East Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 563-568.
- Yoon J. H., Yeo S. H., Kim I. G., Oh T. K.** 2004. *Marinobacter flavimaris* sp. nov. and *Marinobacter daepoensis* sp. nov., slightly halophilic organisms isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1799-1803.

**Zhuang W. Q., Tay J. H., Maszenan A. M.** 2002. *Bacillus naphthovorans* sp. Nov. from oil-contaminated tropical marine sediments and its role in naphthalene biodegradation. Appl. Microbiol. Biotechnol. **58**: 547-553.

**Zvyagintseva, I. S., Poglasova, M. N., Gotoeva, M. T., Belyaev S.S.** 2001. Effect of the medium salinity on oil degradation by nocardioform bacteria. Microbiology. **70**: 652-656.