

Las comunidades microbianas: Diferentes modelos y una cierta unidad metodológica

César Hernández-Rodríguez*

RESUMEN. Los trabajos que formaron parte del simposium que sobre comunidades microbianas se organizó en el XXXV Congreso Nacional de Microbiología se inscriben en el esfuerzo de comprender desde una perspectiva molecular, mas allá del cultivo, o mejor aún incluyendo al cultivo, a los microorganismos que se encuentran en hábitats naturales (tracto digestivo de insectos) o generados por las actividades humanas (ductos de la industria petrolera, digestores anaerobios o alimentos fermentados). Los trabajos plantean diferentes preguntas y muestran variados intereses, pero mantienen una cierta unidad metodológica que permite ejemplificar el potencial de conocimientos y aplicaciones que se pueden obtener con un enfoque molecular de la ecología microbiana de comunidades.

Palabras clave: Ecología microbiana molecular, comunidades microbianas.

La ecología microbiana durante la mayor parte del siglo XX se basó en estudios realizados con la fracción cultivable de microorganismos de algún hábitat. Sin embargo, pocos años antes del fin de siglo, fueron desarrollados métodos moleculares capaces de estudiar a los microorganismos de manera más amplia e independiente del cultivo.¹⁻³ Las capacidades de los métodos provenientes de la biología molecular ayudaron a reconocer que hasta el momento la ecología microbiana había venido documentando una fracción microbiana muy pequeña, no necesariamente la más relevante en cuanto a número y actividad. La falsa expectativa, proveniente de los evidentes éxitos de la bacteriología médica, de que todos los microorganismos podían tarde o temprano ser cultivados axénicamente, pronto se derrumbó ante el reconocimiento de que los estudios de la diversidad microbiana basados en el cultivo sólo reflejaban una fracción muy pequeña de la comunidad existente y daban un falso protagonismo a microorganismos cuyo único "mérito" era el de ser fáciles de cultivar. Debido a esto, los estudios descriptivos de lo que en genética de poblaciones se conoce como estructura poblacional no se de-

ABSTRACT. The papers included in this section were previously exposed in the Microbial Communities Symposium organized in XXXV Congreso Nacional de Microbiología. The contributions try to understand the diversity associated to different microbial communities from a molecular perspective, regardless of culture or including a cultured based perspective. Thus, natural models, including bacteria associated to insect tissues, biofilms and microbial communities in man-made habitats as oil pipelines, anaerobic digestors and fermented foods are described. The papers explain several questions and exhibit different perspectives, but maintain a methodological unit, illustrating the knowledge and applicative potential of microbial ecology from a molecular point of view.

Key words: Molecular microbial ecology, microbial communities.

sarrollaron convenientemente en microbiología. Debieron haberse publicado miles de trabajos con comunidades microbianas y consorcios en los que nunca se sabrá realmente qué microorganismos se encontraron presentes.

El mejoramiento de cepas por métodos moleculares para su aplicación potencial al ambiente generó la expectativa de que un conjunto de "super cepas", con los suficientes genes y promotores, podría realizar cualquier actividad relevante y contribuir a la solución de problemas ambientales concretos; aunque debe reconocerse que la mayoría de ecólogos microbianos se mantuvieron escépticos. Sin embargo, las fuertes críticas y presión política de los grupos ambientalistas o ecologistas promovió que, al margen de la discusión científica, se legislara en contra o se viera como políticamente incorrecta la liberación de microorganismos modificados genéticamente. De cualquier manera, la comunidad científica pronto se percató de que los logros obtenidos con esta estrategia tenían fuertes limitaciones, dada la impresionante complejidad de casi cualquier ambiente estudiado. Por este motivo, las comunidades microbianas han vuelto a ser un capítulo central en la ecología microbiana. Si es posible alguna solución para enfrentar los problemas generados por la contaminación ambiental de agua y suelo, el biodeterioro de materiales y patrimonio artístico, la búsqueda de nuevas moléculas y enzimas, etc., esto sólo será posible a través del entendimiento de la estructura poblacional y función de las comunidades microbianas y para

* Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN, D.F., México.

ello se ha vuelto imperativo el uso del enorme potencial metodológico proveniente de la biología molecular. En este sentido es fundamental que todos aquellos investigadores dentro del área ecología microbiana incorporen las herramientas moleculares a sus estudios. Sin embargo no debe mantenerse el enfoque molecular en la ecología microbiana ajeno a la autocrítica, ya que los métodos moleculares, aunque consiguen ampliar el registro de especies obtenido con estrategias basadas en el cultivo, mantienen algunas limitaciones que obligan en ocasiones a ensayar al menos dos estrategias diferentes.

Los trabajos que formaron parte del simposium que sobre comunidades microbianas se organizó en el XXXV Congreso Nacional de Microbiología se inscriben en el esfuerzo de comprender desde una perspectiva molecular, mas allá del cultivo, o mejor aún incluyendo al cultivo, a los microorganismos que se encuentran en hábitats naturales (tejidos de insectos) o generados por las actividades humanas (ductos de la industria petrolera, digestores anaerobios o alimentos fermen-

tados). Los trabajos plantean diferentes preguntas y muestran variados intereses, pero mantienen una cierta unidad metodológica que permite ejemplificar el potencial de conocimientos y aplicaciones que se pueden obtener con un enfoque molecular de la ecología microbiana de comunidades.

REFERENCIAS

1. Liesack W, & Stackebrandt E. 1992. Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* 174:5072-8.
2. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.
3. Neufeld JD, Yu Z, Lam W, Mohn WW. 2004. Serial analysis of ribosomal sequence tags (SARST) Serial analysis of ribosomal sequence tags (SARST): a high-throughput method for profiling complex microbial communities. *Environ. Microbiol.* 2:131-44.

Diversidad de bacterias endosimbiontes de insectos de la subfamilia triatominae

Lucía Huerta-Núñez,* Julio Martínez,* Rosa Linda Alcocer,** Janine M. Ramsey,***
Esperanza Martínez-Romero*

* Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, Apdo. Postal 565-A, Cuernavaca, Mor. emartine@ccg.unam.mx;

** Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mor.

*** Centro de Investigación de Paludismo, INSP, Tapachula, Chiapas, CP 30700.

Muchas especies de insectos contienen bacterias intracelulares (conocidas como endosimbiontes) transmitidas por generaciones. En estudios microscópicos de tejidos de insectos F. Blockmann observó diversas bacterias que sólo con recientes enfoques moleculares han podido ser analizadas (Ishikawa, 2003). Algunas de éstas se encuentran confinadas en pequeños cuerpos o paquetes llamados micetocitos o bacteriocitos (Ishikawa, 2003). Muchas de estas bacterias son benéficas para los insectos y se considera que se encuentran en vías de convertirse en organelos celulares. El análisis genómico de estas bacterias reveló que tienen genomas reducidos y que se encuentran cercanamente relacionadas con bacterias de vida libre. El caso más conocido es el de un endosimbionte de áfidos, *Buchnera*, que tiene un genoma de un séptimo del tamaño del de *E. coli*, carece de genes para la síntesis de fosfolípidos, de lipopolisacáridos, de algunos aminoácidos y para la reparación del ADN, pero propor-

ciona otros aminoácidos y la vitamina riboflavina al insecto (Shigenobu et al., 2000). Los insectos sin estas bacterias no se desarrollan normalmente. Dado el número tan enorme de especies de insectos existentes, es muy probable que exista una gran variedad de bacterias que han co-evolucionado con ellos. El conocimiento sobre esto es aún muy limitado.

En Cuernavaca, Morelos hasta el 88% de los *Triatoma pallidipennis* (Fig. 1) se encuentran infectados por los protozoarios de la especie *Trypanosoma cruzi* que causan la enfermedad de Chagas (Cortés-Jiménez et al., 1996). Hemos analizado chinches de la especie *Triatoma pallidipennis* y de *Triatoma longipennis* libres de tripanosomas. Las chinches una vez esterilizadas superficialmente se someten a disección para obtener las glándulas salivales y los ovarios (en el caso de las hembras), éstos se lavan, se colocan en medios de cultivos (para identificar bacterias en la superficie) y se maceran.



Figura 1. *Triatoma pallidipennis* (chínche besucona).

La extracción de ADN del tejido se realizó con el Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation kit de Amersham Biosciences. Para identificar las bacterias dentro de las chinches se secuenciaron productos de PCR sintetizados utilizando primers del gen ribosomal 16S fD1 y rD1 (Weisburg et al., 1991). Con este enfoque, en los ovarios y glándulas salivales de estas chinches hemos revelado la existencia de diversas bacterias como *Variovorax* y estafilococos pero más frecuentemente otras muy semejantes a *Arsenophonus triatominarum* que se describió en una especie de triatoma sudamericana (Hypsa & Dale, 1997; Fig. 2). *Arsenophonus* es una γ -Proteobacteria con cierta relación a *Escherichia coli*. En los árboles filogenéticos, el *Arsenophonus* más alejado dentro de este género es el de una garrapata de perro (Grindle et al., 2003).

Las secuencias intergénicas (ITS), entre los genes que codifican al 16S y al 23S RNA ribosomal, permiten discriminar entre especies de bacterias cercanamente relacionadas ya que son mucho más variables que los genes ribosomales que las bordean. Están reportadas las secuencias de ITS de *Arsenophonus* de mosquita blanca (Thao & Baumann, 2004) y de una avispa parasitoide (Ghera et al., 1991). En el laboratorio diseñamos oligómeros específicos para detectar *Arsenophonus* y el análisis de las secuencias obtenidos usando estos oligómeros mostró que los linajes de *Arsenophonus* de triatomas mexicanos son diferentes de los del triatoma de Sudamérica (*T. infestans*) y también diferentes de los de mosquita blanca y de la avispa. Además distinguimos distintos linajes de *Arsenophonus* mexicanos de acuerdo a la secuencia de los ITS.

Mediante microscopia electrónica identificamos conglomerados de bacterias intracelulares en las glándulas salivales de *A. pallidipennis*. Estos datos concuerdan con los reportes de Louis et al., 1986 y de Hypsa., 1993 en donde se observan bacterias en distintos tejidos de chinches triatomas, pero queda por confirmar la especie de las bacterias observadas. Hasta el momento no hemos podido cultivar al *Arsenophonus* de *T. pallidipennis* en medios de cultivo de laboratorio (LB, YM, PY, Toledo et al., 2003 y medio para Actinomicetos) ni tampoco en medios para cultivo de células de insecto con o sin trehalosa (azúcar que normalmente se encuentra en la hemolinfa de los insectos, Moriwaki et al., 2003; Thompson, 2003) o con macerados de tejidos de *T. pallidipennis*. Sin embargo se ha reportado que los *Arsenophonus* de la avispa *Nassoniae* son cultivables (Ghera et al., 1991) y los de *T. infestans* se pueden reproducir en células de insecto en cultivo. Los endosimbiontes de mosquita blanca, de avispa y de una mosca se consideran como endosimbiontes secundarios (Dale et al., 2006, Zchori-Fein & Brown, 2002) y se tiene evidencia que pueden transferirse entre insectos (Thao & Baumann, 2004; Tsuchida et al., 2002). Por otro lado los endosimbiontes primarios sólo se heredan por vía materna, son no cultivables en medios tradicionales de laboratorio y poseen genomas muy reducidos (Shigenobu et al., 2000). Para definir si los *Arsenophonus* de triatomas son endosimbiontes primarios o secundarios estamos investigando si se heredan por vía materna, estudiando la progenie de diferentes cruces de *T. pallidipennis* con *T. longipennis* mediante el análisis de las secuencias de ITS.

Para establecer si los genomas de *Arsenophonus* han estado sujetos a un proceso de evolución reductiva, hemos realizado hibridaciones heterólogas utilizando el genoma de *E. coli* K12 en microarreglos. Este tipo de enfoque se ha utilizado con anterioridad entre bacterias relacionadas. Por ejemplo, se hibridó el ADN del genoma de una cepa de *Klebsiella* con *E. coli* (Dong et al., 2001) y los resultados de hibridación con el genoma de *E. coli* de dos bacterias asociadas a insectos, SOPE (de un coleóptero de plantas de arroz) y *Sodalis glossinidius* (de la mosca Tse-tse) permitieron entender las funciones de estas bacterias de acuerdo a los hábitos alimenticios de sus insectos hospederos (Río et al., 2003). De manera semejante, hemos realizado la hibridación heteróloga del ADN de tejidos de chinche que incluye el de *Arsenophonus* (amplificado con GenomiPhi DNA Amplification Kit de Amersham) con los microarreglos de *E. coli*. Se utilizaron los microarreglos de *E. coli* con 50 meros de Affimetrix de regiones codificantes. Encontramos que alrededor del 50% de los

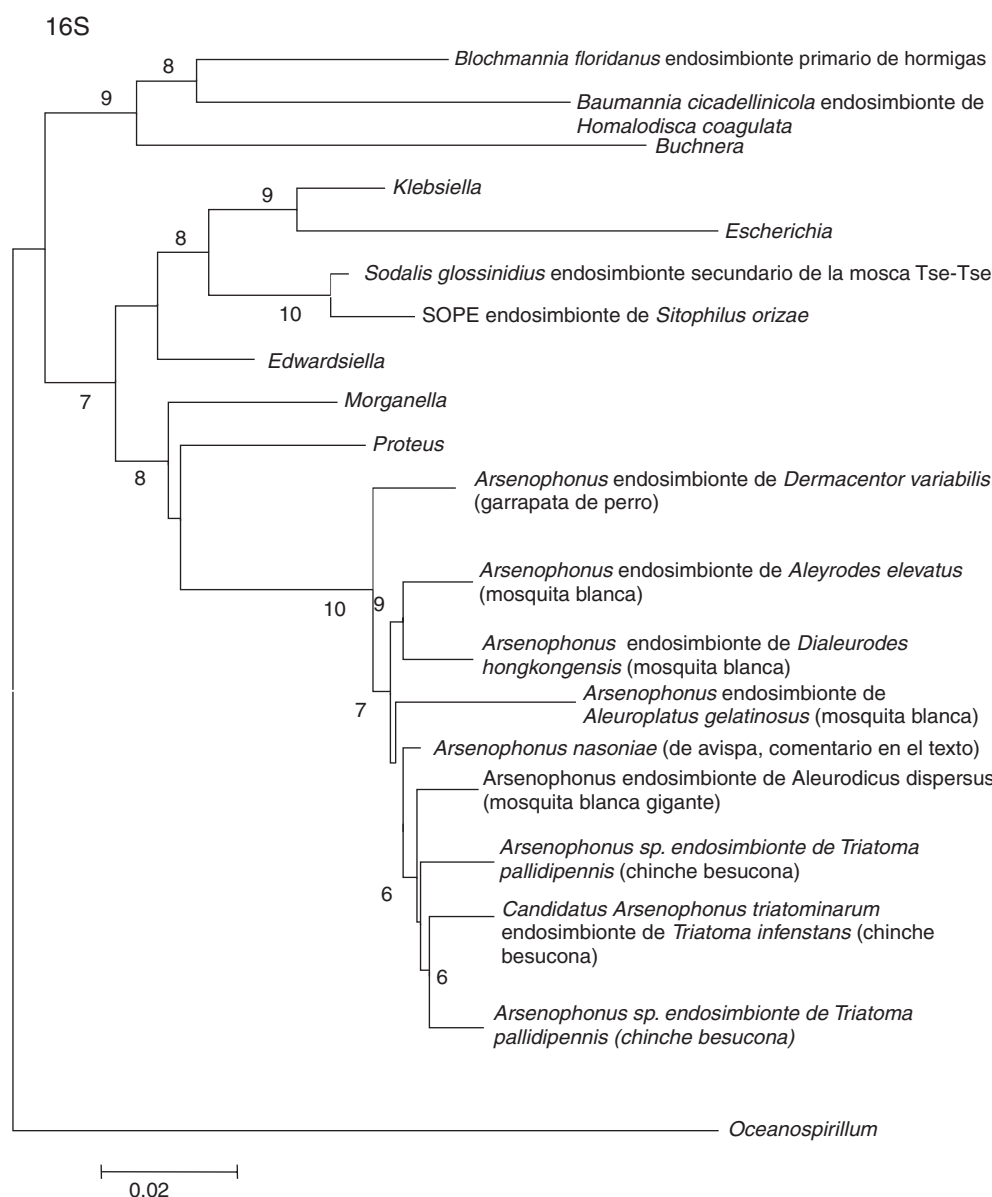


Figura 2. Árbol filogenético de genes 16S de *Arsenophonus* y especies relacionadas obtenido usando Neighbor-Joining.

genes de *E. coli* no hibridan con el genoma de *Arsenophonus*, esto sugiere que éste es un genoma reducido como el de los otros endosimbiontes de insectos. Para confirmar esto, estamos tratando de obtener un banco genómico de *Arsenophonus*, sin embargo, la clonación directa del ADN de los tejidos resultó en la obtención sólo de clones de material genético de insectos. Con el fin de enriquecer el ADN de la bacteria hemos realizado gradientes de Percoll para separar las células de bacteria del tejido del insecto. Los macerados de glándula salival se centrifugaron durante 2 horas a 14500

rpm en gradientes que se han utilizado para separar los bacteroides de los nódulos de las leguminosas (Romanov et al., 1994). Tres de las 40 fracciones colectadas resultaron positivas al ser analizadas por PCR con oligómeros diseñados para revelar *Arsenophonus*. A partir del ADN extraído de estas fracciones se intentará obtener clones del genoma de *Arsenophonus*. A futuro, el interés aplicado del estudio de los endosimbiontes de insectos es poder prevenir las enfermedades transmitidas por insectos al interferir con sus bacterias endosimbiontes (Durvasula et al., 1997).

AGRADECIMIENTOS

Al apoyo de DGAPA, PAPIIT IN201106, de Christian Sohlenkamp, de Jorge Ramírez y Jorge Sepúlveda del IFC, UNAM.

REFERENCIAS

1. Cortés-Jiménez, M., B. Noguera-Torres, R. Alejandre-Aguilar, L. Isita-Torneli & E. Ramírez-Moreno. 1996. Frequency of triatomines infected with *Trypanosoma cruzi* collected in Cuernavaca City, Morelos, Mexico. *Rev. Lat. Microbiol.* 38:115-119.
2. Dale, C., M. Beeton, C. Harbison, T. Jones & M. Pontes, Mauricio. 2006. Isolation, pure culture, and characterization of "*Candidatus Arsenophonus arthropodicus*," an intracellular secondary endosymbiont from the hippoboscids louse fly *Pseudolynchia canariensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2997-3004.
3. Dong, Y., J. D. Glasner, F. R. Blattner & E. W. Triplett. 2001. Genomic interspecies microarray hybridization: rapid discovery of three thousand genes in the maize endophyte, *Klebsiella pneumoniae* 342, by microarray hybridization with *Escherichia coli* K-12 open reading frames. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1911-1921.
4. Durvasula, R. V., A. Gumbs, A. Panackal, O. Kruglov, S. Aksoy, R. B. Merrifield, F. F. Richards & C. B. Beard. 1997. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:3274-3278.
5. Gherna, R. L., J. H. Werren, W. Weisburg, R. Cote, C. R. Woese, L. Mandelco & D. J. Brenner. 1991. *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov., the causative agent of the son-killer trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:563-565.
6. Grindle, N., J. J. Tyner, K. Clay & C. Fuqua. 2003. Identification of *Arsenophonus*-type bacteria from the dog tick *Dermacentor variabilis*. *J. Invertebr. Pathol.* 83:264-266.
7. Hypsa, V. 1993. Endocytobionts of *Triatoma infestans*: distribution and transmission. *J. Invertebrate Pathol.* 61:32-38.
8. Hypsa, V. & C. Dale. 1997. In vitro culture and phylogenetic analysis of "*Candidatus arsenophonus triatominarum*," an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:1140-1144.
9. Ishikawa, H. 2003. Insect symbiosis: An introduction, pp. 1-21. In K. Bourtzis & T. A. Miller (Eds) *Insect Symbiosis*, CRC Press. New York.
10. Louis, C., L. Drif & C. Vago. 1986. Mise en évidence et étude ultrastructurale de procaryotes de type rickettsien dans les glandes salivaires des Triatomidae (*Heteroptera*). *Annals. Soc. Ent. Fr.* 22:153-162.
11. Moriwaki, N. & K. Matsushita, M. Nishina & Y. Kono. 2003. High concentrations of trehalose in aphid hemolymph. *Appl. Entomol. Zool.* 38:241-248.
12. Rio, R. V. M., C. Lefevre, A. Heddi & S. Aksoy. 2003. Comparative genomics of insect-symbiotic bacteria: influence of host environment on microbial genome composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6825-6832.
13. Romanov, V. I., I. Hernández-Lucas & E. Martínez-Romero. 1994. Carbon metabolism enzymes of *Rhizobium tropici* cultures and bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2339-2342.
14. Shigenobu, S., H. Watanabe, M. Hattori, Y. Sakaki & H. Ishikawa. 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature* 407:81-86.
15. Thao, M. L. & P. Baumann. 2004. Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). *Curr. Microbiol.* 4:140-144.
16. Thompson, S. N. 2003. Trehalose - the insect 'blood' sugar. *Adv. Insect Physiol.* 31:205-285.
17. Toledo, I., L. Lloret & E. Martínez-Romero. 2003. *Sinorhizobium americanum* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Syst. Appl. Microbiol.* 26:54-64.
18. Tsuchida, T., R. Koga, H. Shibao, T. Matsumoto & T. Fukatsu. 2002. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Mol. Ecol.* 11:2123-2135.
19. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier & D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal ADN amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
20. Zchori-Fein, E. & J. K. Brown. 2002. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95:711-718.

Análisis comparativo del papel de diversas especies microbianas en la formación de biopelículas corrosivas en ductos de acero que transportan agua marina y crudo Maya.

Isabel Neria-González,* Juan M. Romero,** César Hernández Rodríguez*

* Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. D. F., México.

** Instituto Mexicano del Petróleo. E-mail: chdez38@hotmail.com

Las biopelículas son comunidades de microorganismos congregadas en una matriz polisacárida que se forman continuamente por la adhesión de bacterias, algas, hongos y otros microorganismos y que se adhieren a una superficie. La formación de una biopelícula comienza sobre una superficie libre de microorganismos, a

la que se adhieren bacterias planctónicas a través de receptores presentes en la superficie celular (Donlan, 2001; Watnick & Kolter, 2000). Las interacciones iónicas entre las superficies bacterianas y del sustrato juegan un papel importante en la unión a la superficie. Los materiales pueden ofrecer superficies hidrofóbicas (te-

flón, plásticos, látex o silicón) e hidrofílicas (vidrio y diversos metales), mientras que la superficie de las bacterias Gram negativas y muchas de las Gram positivas es hidrofóbicas lo que les permite unirse a las superficies por medio de interacciones hidrofóbicas. Sin embargo, muchas bacterias están rodeadas de exopolisacáridos capsulares (EPS) y lipopolisacáridos de la membrana externa que mantienen una carga superficial negativa que les permite interaccionar con superficies hidrofílicas (Donlan, 2001). Apéndices como las fimbrias o pilis aumentan la hidrofobicidad superficial y le permiten a la bacteria adherirse a las superficies hidrofóbicas, y los flagelos ayudan a superar la fuerza repulsiva entre el sustrato y la superficie celular permitiendo el anclaje de la célula en la superficie. El EPS bacteriano facilita la unión de otras especies bacterianas y promueve la consolidación, estructura de la matriz y por tanto la formación de gradientes electroquímicos de pH, potencial de óxido-reducción, etc. característicos de las biopelículas (Párces & Fuqua, 2003). Sin embargo, la estructura de la biopelícula no es homogénea, ya que se forman dentro de ella canales que permiten el paso de la fase acuosa que acarrea nutrientes y oxígeno, favoreciendo el crecimiento celular dentro de la biopelícula. También, funcionan como estructuras de filtración que capturan o retienen partículas que incluyen minerales, iones metálicos, materia orgánica, etc.

Por otra parte, una teoría sostiene que las biopelículas promueven la corrosión metálica cuando el metal está sumergido en un ambiente acuoso. La respiración celular dentro de la biopelícula establece regiones anódicas y catódicas sobre la superficie del metal, promoviendo el flujo de electrones (Little y col., 1997). Las biopelículas causan el biodeterioro del metal al modificar la interfase solución-metal y afectar las interacciones de la superficie del metal y el ambiente (Párces & Fuqua, 2003, Videla & Herrera, 2005).

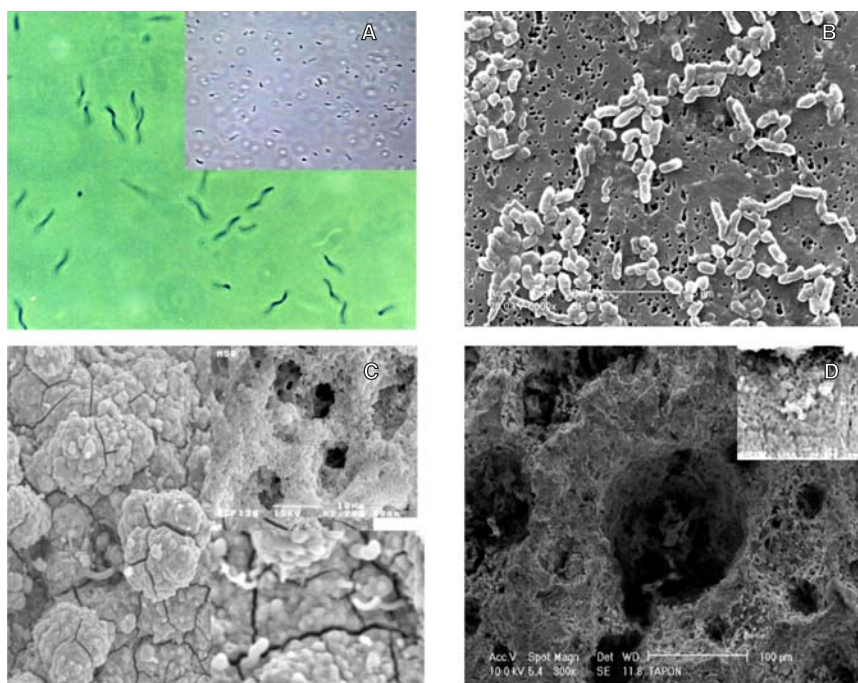
La caracterización de la comunidad bacteriana puede ayudar a comprender cuáles son los eventos que determinan el inicio, crecimiento y consolidación de la biopelícula sobre una superficie metálica y cómo influye en la corrosión. En este trabajo, a partir de dos trabajos previamente publicados (López y col., 2006; Neria y col. 2006), se comparan la diversidad de bacterias asociadas a biopelículas maduras formadas en acueductos marinos y oleoductos por métodos basados en el cultivo y estrategias moleculares independientes del cultivo, y propone el papel que tienen estos microorganismos en los diferentes eventos de la formación de estas comunidades que eventualmente corroen la superficie metálica de acero de los ductos.

La formación de biopelículas sobre la superficie de acero de los acueductos marinos y oleoductos teóricamente se podría iniciar por bacterias planctónicas, aeróbicas o anaeróbicas facultativas, móviles y productoras de EPS. Se han identificado algunas bacterias con estas características, tales como las bacterias halofílicas moderadas *Idiomarina* spp., *Exiguobacterium* spp., *Chromohalobacter salinarum* y *Bacillus* spp. y, por otra parte, las enterobacterias *Enterobacter* spp. y *Citrobacter* spp. (Tabla 1), todas ellas detectadas con una abundancia relativa alta en los acueductos marinos y oleoductos respectivamente (López y col., 2006; Neria y col., 2006). Estos microorganismos tienen muchas de las características que deben poseer los colonizadores primarios, como son el encontrarse libres en el ambiente marino, poseer flagelos y ser productores de EPS (Fig. 1). La abundancia relativa de bacterias productoras de EPS ha sido observada en biopelículas de diverso estado de madurez expuestas en agua marina del Golfo de México (Acuña y col., 2006.). Una vez establecidos estos microorganismos, el crecimiento de la matriz polisacárida de la biopelícula generaría la formación de gradientes de óxido-reducción que generan microambientes que permitirían la colonización por otras bacterias anaeróbicas facultativas y estrictas, en particular bacterias fermentadoras. Así se propone que *Halomonas* spp. y *Holomonas* spp. en los ductos marinos y las propias enterobacterias y las anaeróbicas estrictas *Halanaerobium* spp. de los oleoductos ocupen los nichos de la biopelícula para un metabolismo fermentativo que finalmente generaría metabolitos con carácter ácido. Asimismo, las bacterias sulfato reductoras (BSR) detectadas en la biopelícula del oleoducto, como *Desulfovibrio* spp. y *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans*, tendrían condiciones para establecerse, iniciar sus actividades metabólicas y promover la biocorrosión del metal, un efecto al que han sido fuertemente asociadas. Por otra parte, llama la atención que este gremio no se haya detectado, ni por cultivo ni métodos moleculares, en las biopelículas marinas. Posiblemente, las condiciones en esos ductos, donde circulan grandes cantidades de agua de mar, a altas presiones y con un estrés mecánico fuerte determinen condiciones en las que las biopelículas formadas no son muy gruesas, están expuestas permanentemente al oxígeno disuelto del agua y que se desprenden frecuentemente, lo que limita su engrosamiento y mantiene tensiones de oxígeno relativamente altas o que mantienen potenciales de óxido-reducción que impiden el desarrollo de este gremio especialmente sensible al oxígeno. Por el contrario, el gremio de las bacterias oxidantes del hierro como *Marinobacter aquaeolei* sólo fue detectado en los ductos marinos. Esta especie quimiolitotrófica ha sido previamente detectada en ambientes petroleros en Viet-

Tabla 1. Bacterias detectadas en biopelículas corrosivas del acero de acueductos marinos y oleoductos por cultivo o en librerías de genes 16S rDNA.

Característica fisiológica	Especies bacterianas identificadas en las biopelículas	
	Muestras de oleoductos ^{a, b}	Muestras de acueductos ^{a, c}
Bacterias aerobias estrictas	No detectadas	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus firmus</i> , <i>Bacillus litorales</i> , <i>Exiguobacterium lactigenes</i> , <i>Exiguobacterium aurantiacum</i> , <i>Chromohalobacter salinarum</i>
Bacterias productoras de EPSs	<i>Enterobacter dissolvens</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Citrobacter</i> sp., <i>Citrobacter farmeri</i> y bacterias sulfato reductoras	<i>Idiomarina loihiensis</i> ^a <i>Idiomarina fontislapisidis</i>
Bacterias fermentadoras	<i>Halanaerobium congolense</i> , <i>Halanaerobium fermentum</i> , <i>Halanaerobium praevalens</i>	<i>Halomonas aquamarina</i> , <i>Halomonas axialensis</i> , <i>Halomonas meridiana</i>
Bacterias productoras de ácidos	<i>Citrobacter amalonaticus</i> , <i>Halanaerobium congolense</i>	<i>Halomonas</i> spp.
Bacterias sulfato reductoras	<i>Desulfonatronovibrio hydrogenovorans</i> <i>Desulfovibrio capillatus</i> <i>Desulfovibrio alaskensis</i>	No detectadas
Bacterias oxidantes de Fe		<i>Marinobacter aquaeolei</i>

^a bacterias con flagelos, ^b bacterias facultativas y anaerobias estrictas, ^c bacterias aerobias.

**Figura 1.** Representación de las etapas de formación hipotética de una biopelícula corrosiva para acueductos y oleoductos. Las micrografías fueron obtenidas por SEM a partir de cupones de acero API X52.

A, Etapa 1. Las bacterias presentes en el agua marina como *Idiomarina* spp., *Exiguobacterium* spp. y *Bacillus* spp. y en la mezcla de crudo como *Citrobacter* spp. y *Enterobacter* spp. podrían ser los organismos que colonizan las paredes de los ductos; B, Etapa 2. Después de la colonización primaria, se producen EPS's y se forman microcolonias, otras bacterias se unen a la matriz de EPS. Por un lado, *Halomonas* spp., *Halomonas* sp. y *Marinobacter aquaeolei* y por otro lado *Desulfovibrio* spp. *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans* y *Halanaerobium* spp. podrían ser los colonos secundarios que se unen a las biopelículas marinas y de oleoductos respectivamente; C, Etapa 3. Formación de la biopelícula asociada a la corrosión del acero. Biopelículas aerobia en el acueducto y anaerobia en el oleoducto se estructuran; D, Inducción de la corrosión localizada de la superficie del acero en los ductos.

nam y se ha demostrado que tiene capacidad de utilizar ciertos minerales ferrosos como la pirita (FeS_2), el vidrio basaltito (contiene ~ 10 de FeO), la siderita (FeCO_3), y hierro soluble como única fuente de energía (Edwards y col. 2003). No parece raro que esta bacteria forme parte de una biopelícula marina, donde la propia agua provee escasos nutrientes y la competencia por las fuentes de energía orgánica debe ser muy fuerte. En este escenario, donde además existe abundancia de iones ferroso producto de la corrosión metálica, *M. aquaeolei* ocupa una fracción pequeña pero relevante dentro de la estructura poblacional de la biopelícula marina.

Analizando las características fisiológicas de las especies detectadas en las biopelículas se puede inferir su participación en la biocorrosión, Tabla 1. En ambas biopelículas existen bacterias productoras de ácidos orgánicos e inorgánicos que disminuyen el pH del medio acelerando la corrosión metálica. Así, la fermentación de carbohidratos por *Halomonas* spp. y *Halanaerobium* spp. produce ácidos orgánicos y la respiración anaerobia de las BSR produce ácido sulfhídrico. También se forman productos ácidos después de la potencial reducción del azufre y tiosulfato por *H. concolense* y la degradación de aminoácidos por *Citrobacter* spp. Por otra parte, los productos de fermentación como el acetato, propionato, butirato, H_2 y CO_2 producidos por *Halanerobium* spp. y algunas enterobacterias pueden ser utilizados como fuente de carbono por las BSR en la biopelícula.¹³ Las BSR inducen la corrosión por el consumo de H_2 y la producción de sulfuro que genera FeS . *M. aquaeolei* oxida los iones ferrosos (Fe^{++}) a iones férricos (Fe^{+++}) y el producto final es el hidróxido férrico cuando el pH del medio es cercano a la neutralidad, como en el agua marina. En contraste, *Enterobacter cloacae* cuando utiliza al acetato como fuente de energía puede reducir el Cr^{6+} y Mn^{4+} bajo condiciones anaeróbicas, lo que también puede contribuir a la corrosión de la superficie del acero. Por otra parte, los EPS generan una serie de cambios fisicoquímicos que alteran la interfase metal-solución, entre los más importantes son el tipo y concentración de los iones, los valores de pH, y los cambios en el potencial óxido-reducción alterando el comportamiento pasivo o activo del sustrato metálico y sus productos corrosivos (Videla & Herrera, 2005). También, los EPS impiden la difusión externa de los metabolitos y productos corrosivos generando la acumulación de éstos, y en consecuencia el desgaste del metal (corrosión localizada). La ausencia de BSR en la biopelícula marina podría deberse al ambiente aerobio en la que se desarrolla y porque generalmente las BSR están presentes en los sedimentos marinos y escasamente se encuentran en el agua. La presencia de *Bacillus* spp., que se ha reconocido que en ocasiones sintetizan compues-

tos antimicrobianos y tienen efectos anticorrosión, podrían ser antagonistas de las BSR y generar protección del metal como se ha descrito (Jayaraman y col. 1997; Parsek & Fuqua, 2003), aunque no consideramos que en nuestro modelo esto haya ocurrido dado los evidentes signos de corrosión. Finalmente, la formación de la biopelícula puede ser un requerimiento universal en la corrosión, pero no necesariamente suficiente, deben considerarse la naturaleza de la biopelícula, la hidrofobicidad, el transporte de micronutrientes al seno de la biopelícula, así como el tipo de microorganismos y sus características de adherencia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por los proyectos CGPI-IPN 2004587 y 20050685. I. Neria agradece al CONACyT y PIFI-IPN por las becas recibidas. C. Hernández-Rodríguez es becario de la COFAA y EDI, IPN y del SNI-CONACyT.

REFERENCIAS

1. Acuña, N., B. O. Ortega-Morales & A. Valadez-González. 2006. Biofilm Colonization dynamics and its influence on the corrosion resistance of Austenitic UNS S31603 stainless steel exposed to Gulf of Mexico seawater. *Marine Biotechnol.* 8:62-70.
2. Resistance of Austenitic UNS S31603 Stainless Steel Exposed to Gulf of Mexico Seawater.
3. Donlan, R. M. 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Healthcare Epidemiology* 33:1387-1392.
4. Edwards, K. J., D. R. Rogers, C. O. Wirsén & T. M. McCollom. 2003. Isolation and characterization of novel psychrophilic, neutrophilic, Fe-oxidizing, chemolithoautotrophic alpha- and gamma-proteobacteria from the deep sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2906-2913.
5. Jayaraman, A., E. T. Cheng, J. C. Earthman & T. K. Wood. 1997. Importance for biofilm formation for corrosion inhibition of SAE 1018 steel axenic aerobic biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18:396-401.
6. Little, B. J., P. A. Wagner & Z. Lewandowski. 1997. Spatial relationships between bacteria and mineral surfaces, pp. 123-159. In J. F. Banfield & K. H. Nealson (Eds). *Geomicrobiology: interaction between microbes and minerals*. Mineralogical Society of America. Washington, D. C.
7. López, M. A., F. J. Zavala Díaz de la Serna, J. Jan-Roblero, J. M. Romero & C. Hernández-Rodríguez. 2006. Phylogenetic analysis of a biofilm bacterial population in water pipeline in Gulf of Mexico. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58:145-154.
8. Neria-González, I., E. T. Wang, F. Ramírez, J. M. Romero & C. Hernández-Rodríguez. 2006. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. *Anaerobe* 12:122-133.
9. Videla H. A. & L. K. Herrera. 2005. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *Int. Microbiol.* 8:169-180.
10. Parsek, M. R. & C. Fuqua. 2003. Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *J. Bacteriol.* 186:4427-4440.
11. Watnick, P. & R. Kolter. 2000. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 182:2675-79.

Caracterización de la diversidad de comunidades microbianas útiles en biorremediación y producción de probióticos por su huella genética

Lilianha Domínguez Malfavón,* Claudio Garibay Orijel,** Héctor Mario Poggi-Varaldo,** Jaime García Mena*

* Departamento de Genética y Biología Molecular, ** Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV. Av. IPN 2508, Col Zacatenco México DF 07360. jgmna@cinvestav.mx

En la naturaleza los microorganismos actúan e interactúan en conjunto en diversos tipos de asociaciones manteniendo un balance apropiado de varios procesos importantes de transferencia de materia y energía. Muchas de esas asociaciones son aprovechadas en procesos de biorremediación ambiental o en procesos de producción industrial de probióticos. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los microorganismos que se encargan de éstos procesos no son conocidos y mucho menos identificados. La caracterización e identificación de los microorganismos presentes en cualquiera de las mencionadas asociaciones o consorcios, es de interés porque este conocimiento tiene el potencial de permitir la selección de inóculos para un bioreactor o de optimizar condiciones de crecimiento de microorganismos en un proceso. Dentro de las herramientas útiles para hacer una caracterización, podemos citar observaciones microscópicas, cultivos, inmunodetecciones y reacciones enzimáticas detectadas en pruebas bioquímicas. No obstante su utilidad, cada uno de estos métodos presenta limitaciones que previenen un uso generalizado. Una metodología ideal de trabajo permitiría la caracterización de una comunidad microbiana de interés, de una manera cualitativa y cuantitativa. La mencionada metodología tomaría ventaja de un componente común de los microorganismos, como sería las proteínas, los lípidos o los ácidos nucleicos. La búsqueda de un mejor método de caracterización ha aportado que dentro de estos últimos, el DNA haya sido usado convenientemente para los fines de caracterización de comunidades. Desde los primeros reportes (Muyzer *et al.*, 1993), la amplificación por PCR del DNA del gen ribosomal 16S utilizando primers contra regiones variables y su análisis por electroforesis en gradiente químico desnaturante (DGGE) ha probado ser de utilidad para analizar la diversidad genética de poblaciones complejas de microorganismos. Con este principio se han reportado caracterizaciones de la sucesión de comunidades bacterianas en muestras de composta (Takaku *et al.*, 2006) o la caracterización sistemática de comunidades de eucariontes (Aguilera *et al.*, 2006). Debido a la necesidad de caracterizar consorcios microbianos en biotecnología, nuestro grupo en CINVESTAV ha desarrollado

un procedimiento metodológico de rutina para la caracterización de la diversidad de comunidades microbianas útiles en biorremediación y en la producción de probióticos por su huella genética. Este método toma ventaja del polimorfismo característico del gen 16S ribosomal (García-Mena, J., 2004) y de la capacidad de fraccionar diferencialmente las moléculas amplificadas por PCR mediante DGGE. El procedimiento inicia con la toma de una muestra que contiene la comunidad microbiana a caracterizarse (Fig. 1.I), posteriormente se procede a la extracción de los ácidos nucleicos totales por el método de fenol (García-Mena, J., resultados sin publicar) y se analiza su calidad por fraccionamiento electroforético en un gel de agarosa al 0.5% (Fig. 1.II). Posteriormente se realiza la amplificación específica por PCR utilizando dos primers que reconocen una región variable del gen 16S ribosomal. El primer sentido contiene una pinza de 40 pares de bases de GC (Muyzer *et al.*, 1993) comprobándose la amplificación del producto de aproximadamente 500 pares de bases por análisis electroforético en geles de agarosa al 1.0 % (Fig. 1.III). Los productos son fraccionados en un gel de poliacrilamida al 8% con un gradiente químico usualmente del 20 al 40% (Fig. 1.IV). De esta manera quedan determinados los perfiles de bandas que permiten establecer una huella genética derivada de una electroforesis en gel en gradiente desnaturante (DGGE) que es de utilidad para el estudio de la sucesión de microorganismos en comunidades diversas o de utilidad para conocer la estructura de un consorcio. Debido a que en la práctica no hemos encontrado discrepancias en la identificación de un microorganismo al trabajar con 460 pares de bases o al secuenciar la totalidad del gen 16S (García-Mena, J., resultados sin publicar) y a que se ha reportado que la construcción de una genoteca de productos de PCR amplificados a partir de la muestra, para luego hacer una caracterización por DGGE, no ofrece resultados ventajosos a la caracterización directa por DGGE sobre la diversidad de una comunidad (Burr *et al.*, 2006); cuando en un estudio es necesario identificar los microorganismos que componen la comunidad microbiana, se efectúa una extracción directa del DNA de las bandas de interés del gel (Fig. 1.V), así como una clona-

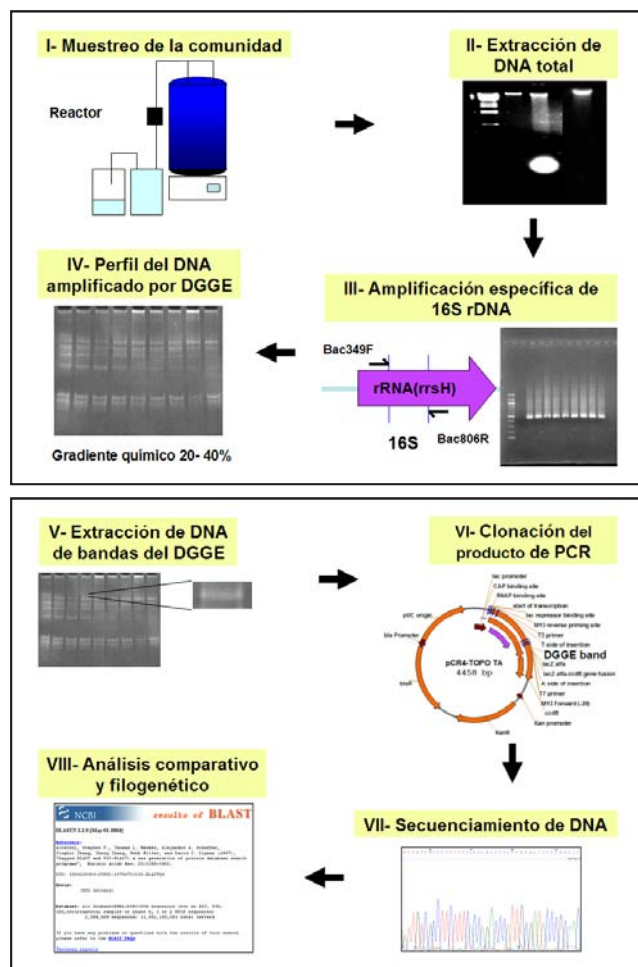


Figura 1. Guía práctica para el estudio de la estructura y dinámica de una comunidad microbiana basado en la genotipificación del 16S rDNA. Los números I a VIII indican la secuencia de pasos para llegar a un análisis tipo DGGE y una identificación por secuenciación del DNA amplificado.

ción directa sin reamplificar el DNA en el vector pCR4-TOPO TA (Invitrogen) (Fig 1.VI). La identificación del microorganismo se establece secuenciando el DNA clonado utilizando BigDye Terminator Kit v3.0 (Applied Biosystems) y analizando en ABI-PRISM Modelo 310 de Perkin Elmer (Fig. 1.VII). Posteriormente se efectúa una comparación utilizando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997) contra las bases de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y del Ribosomal Database Project II (Cole *et al.*, 2005) y un análisis filogenético alineando secuencias selectas con el algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), construyendo árboles utilizando el algoritmo Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) y visualizando con el programa Tree View (Page, R. D. M. 1996) (Fig. 1. VIII).

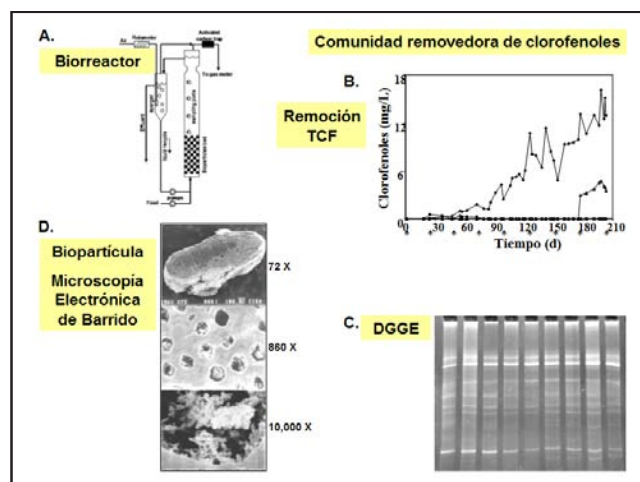


Figura 2. Caracterización de una comunidad removedora de Triclorofenoles. A. Esquema de bioreactor. B. Contenido de clorofenoles en el efluente de un bioreactor de lecho fluidizado alimentado con 2,4,6-Triclorofenol a 80 mg/L. (●), 2,4,6-Triclorofenol; (■), 2,6-Diclorofenol; (□), 4-Chlorofenol; (▲), Phenol. C. Perfil de DGGE de muestras tomadas los días indicados por las flechas verticales. D. Microfotografías de biopartículas de carbón activado conteniendo las biopelículas.

Estudios de consorcios utilizando esta metodología, han permitido identificar exitosamente los miembros predominantes de asociaciones de bacterias hidrocarbonoclastas, de reactores de lecho fluidizado anaerobio que remueven 2,4,6-Triclorofenol (Fig. 2A); de reactores de ambientes metanogénicos que remueven percloroetileno de efluentes contaminados; y de consorcios de gránulos del probiótico Kéfir (Fig. 3A). En el caso de la comunidad que remueve eficientemente clorofenoles (Fig. 2B), las biopartículas con soporte de carbón activado, exhibieron una notable diversidad de bacterias al microscopio electrónico de barrido (Fig. 2D), que se mantuvo estable a lo largo del estudio de acuerdo al análisis tipo DGGE (Fig. 2C). Las bacterias identificadas pertenecen a los géneros *Dehalobacter* sp., *Syntrophobotulus* sp., *Propionobacterium* sp. y *Methanosaeta* sp., entre otros. El consorcio microbiano residente de los granos de Kéfir, mostró también una diversidad morfológica unicelular interesante tanto a la observación microscópica de luz visible de tinciones de Gram (Fig. 3B), como a la observación al microscopio electrónico de barrido (Fig. 3D). El análisis comparativo tipo DGGE de varias cepas de gránulos, reveló que su composición es muy semejante (Fig. 3C) y la identificación ha revelado la presencia de *Saccharomyces* sp., y de *Lactobacillus* sp. La experiencia práctica de caracterización de comunidades microbianas aplicando nuestro método basado en la genotipificación del 16S rDNA, muestra su conveniencia para caracterizar la estructura de la comunidad e identificar los microorganismos presentes.

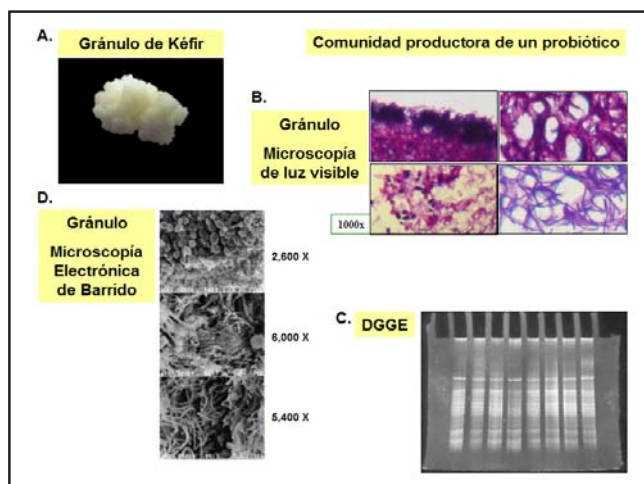


Figura 3. Caracterización de una comunidad productora de leche fermentada. A. Gránulo de Kéfir. B. Observación microscópica de tinción de Gram de cortes tipo histológico observándose diversas morfologías gram positivas. C. Perfil de DGGE de ocho diferentes cepas de gránulos de Kéfir. D. Microfotografía de barrido un gránulo en el que se observan cocos, bacilos y levaduras.

AGRADECIMIENTOS

JGM agradece la colaboración de la QFB. Sirenia González González, Unidad de Microscopia Electrónica y de la M en C. Guadalupe Aguilar González, Unidad de Ácidos Nucleicos del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Unidad Zacatenco.

REFERENCIAS

1. Aguilera, A., F. Gomez, E. Lospitao & R. Amils. 2006. A molecular approach to the characterization of the eukaryotic communities of an extreme acidic environment: Methods for DNA extraction and denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* Feb 1; [Epub ahead of print].
2. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
3. Burr, M. D., S. J. Clark, C. R. Spear & A. K. Camper. 2006. Denaturing gradient gel electrophoresis can rapidly display the bacterial diversity contained in 16S rDNA clone libraries. *Microb Ecol.* Apr 28; [Epub ahead of print]
4. Cole, J. R., B. Chai, R. J. Farris, Q. Wang, S. A. Kulam, D. M. McGarrell, G. M. Garrity, & J. M. Tiedje. 2005 The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research.* 33:D294-D296.
5. García-Mena, J. 2004. Molecular biology tools for the characterization of microbial communities. In "Environmental Biotechnology and Engineering"- 2004. H. M. Poggi-Varaldo, E. Ríos-Leal, F. Esparza-García, J. García-Mena, I. Sastre-Conde, D. Zitomer, H. Macarie, and C. Garibay-Orijel (Eds.) Proceedings of the First International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering. Mexico City, Mexico; September 6-8, 2004. ISBN 970-94112-0-9. 1 IMEBE-001.
6. Muyzer, G., E. C. de Waal & A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.
7. Page, R. D. M. 1996. Tree view: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biological Sciences* 12:357-358.
8. Saitou, R. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
9. Takaku, H., S. Kodaira, A. Kimoto, M. Nashimoto, & M. Takagi. 2006. Microbial communities in the garbage composting with rice hull as an amendment revealed by culture-dependent and -independent approaches. *J. Biosci. Bioeng.* 101:42-50.
10. Thompson, J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-80.

Biodegradación de BTEX acoplada a la reducción anaerobia de óxidos metálicos insolubles

Elías Razo-Flores,* Wilverth R. Villatoro-Monzón**

* División de Ingeniería Ambiental y Manejo de Recursos Naturales, IPICYT, San Luis Potosí.

** Instituto Politécnico Nacional. México. D.F. erazo@ipicyt.edu.mx

La oxidación microbiana es decisiva para la eliminación de contaminantes del ambiente, así mismo la reducción desasimilativa de óxidos metálicos insolubles como

el Fe(III) y el Mn(IV), constituye el más reciente y menos explorado de los tipos de respiración anaerobia en la naturaleza. Estos óxidos metálicos se encuentran presentes

en acuíferos, principalmente del tipo confinado (Have-man *et al.*, 2005; Petrunic *et al.*, 2005), y pueden jugar un papel muy importante en la biodegradación de contaminantes orgánicos, como los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y los isómeros del xileno). Estos compuestos son constituyentes importantes de las gasolinas y son liberados al ambiente principalmente mediante fugas o derrames en los tanques de almacenamiento y, debido a su relativamente alta solubilidad, contaminan fácilmente acuíferos y sedimentos asociados. Los BTEX son compuestos de interés ambiental porque se ha demostrado que son altamente tóxicos y carcinogénicos aún a bajas concentraciones.

En este trabajo se reporta la biodegradación de BTEX acoplada a la reducción anaerobia de Fe(III) y Mn(IV), tanto en experimentos en lote como en continuo, usando un sedimento con un largo historial de contaminación por hidrocarburos. Adicionalmente, se estudió la diversidad y la dinámica de las comunidades microbianas en el sedimento empleando técnicas de biología molecular (PCR-DGGE).

Se realizaron dos experimentos en lote que se llevaron a cabo en botellas serológicas de 120 ml con medio mineral salino y como inóculo se adicionó sedimento proveniente del río Rhin (Wageningen, Holanda). Se agregaron cristales amorfos de FeOOH y MnO₂ a una concentración en exceso de la estequiométrica (Puig-Grajales *et al.*, 2000). Los BTEX fueron analizados por cromatografía de gases y la producción de Fe(II) y Mn(II) fue determinada colorimétricamente con reactivos Hach en una cámara anaerobia. El experimento en continuo se llevó a cabo utilizando benceno como sustrato en una columna de 1.8 l inoculada con sedimento del río Rhin y mezclado con cristales amorfos de MnO₂. La concentración de benceno fue determinada en el influente y efluente, mientras que la producción de Mn(II) fue determinada en el efluente. La producción de CO₂ fue determinada por desplazamiento de una solución salina. Los experimentos tanto en lote como en continuo se efectuaron a 30°C. Para identificar los microorganismos y poder determinar la diversidad y la dinámica de las comunidades microbianas en el sedimento se emplearon técnicas de PCR, DGGE, clonación y secuenciación.

Todos los BTEX fueron degradados a diferentes tiempos en ambos experimentos, sin embargo es importante destacar la degradación de xilenos bajo condiciones de reducción de Mn(IV). La degradación de los isómeros del xileno no había sido reportada antes bajo condiciones de reducción de Mn(IV), sin embargo, en este trabajo, fueron degradados consecutivamente en dos cinéticas. En la primera cinética el *o*-xileno fue degradado en más tiempo

(269 días) que con respecto al *m*- y *p*-xileno (186 días). La velocidad de degradación (VD) del *o*-xileno fue de 0.17 μ M/d, mientras que para los otros isómeros fue en promedio de 0.25 μ M/d. En una segunda cinética, a la cual se cambió medio mineral agotado por medio fresco dejando decantar los sólidos, la VD del *o*-xileno fue de 0.53 μ M/d, mientras que para los otros isómeros fue cercana a 0.90 μ M/d. El CO₂ recuperado con respecto a los xilenos degradados fue en promedio del 80% tal como se presenta en la Tabla 1.

En el mismo sentido, también se estudió la degradación de los isómeros del xileno bajo condiciones de reducción de Fe(III). En la primera cinética el *o*- y *m*-xileno fueron degradados en 275 y 280 días, con una VD cercana a 0.18 μ M/d, mientras que el *p*-xileno fue degradado en más tiempo (445 días) y con una VD de 0.11 μ M/d. En la segunda cinética las velocidades de degradación fueron considerablemente mayores para todos los isómeros. En la Tabla 2 se presentan los resultados de la degradación de los isómeros del xileno bajo condiciones de reducción de Fe(III). Bajo estas condiciones los isómeros fueron degradados consecutivamente en las dos cinéticas y la cantidad de CO₂ recuperada fue en promedio del 80%. La degradación anaerobia de los xilenos bajo condiciones de reducción de Fe(III) ha sido reportada previamente (Phelps y Young, 2001). A la fecha, no se ha reportado cepa alguna que sea capaz de degradar a los isómeros del xileno bajo condiciones de reducción de Fe(III).

El patrón de bandas obtenido por la técnica de DGGE para los experimentos en lote se presenta en la Figura 1. Las diferencias que presentaron los patrones de bandas para cada uno de los aceptores finales de electrones y de los compuestos aromáticos sugieren que existieron diferentes microorganismos involucrados en los procesos de degradación de BTEX. En principio, esos microorganismos podrían estar relacionados con la diversidad de las condiciones ensayadas y serían influenciados por el compuesto aromático a degradar, así como por el aceptor final de electrones. No obstante, la comunidad del cultivo que biodegrada tolueno con Fe(III) (carril 2) y el cultivo que biodegrada etilbenceno con Mn(IV) (carril 4) presentaron un patrón de bandas similar, por lo tanto se podría deducir que se desarrollaron las mismas comunidades microbianas, a pesar de que se utilizaron compuestos aromáticos y aceptores finales de electrones diferentes. Es importante señalar que es probable que no todos los microorganismos que se encuentran en los sistemas tengan la capacidad de degradar a los aromáticos, pueden ser solamente tolerantes a ellos y metabolizar a intermediarios comunes como benzoato o acetato.

Tabla 1. Valores netos de las cinéticas de degradación de los isómeros del xileno bajo condiciones de reducción de Mn(IV).

Compuesto	Sustrato degradado	Mn(II) producido	Relación Mn (II)/Sustrato	Velocidad degradación ($\mu\text{M/d}$)	Eficiencia de degradación (%)	CO ₂ recuperado (%)
Primera cinética						
<i>o</i> -xileno	42.3	980	23 ^a (21) ^b	0.17	87	79
<i>m</i> -xileno	44.7	980	22 (21)	0.26	94	82
<i>p</i> -xileno	43.4	1011	23 (21)	0.25	91	78
Segunda cinética						
<i>o</i> -xileno	40.9	885	22 (21)	0.53	89	81
<i>m</i> -xileno	45.7	963	21 (21)	0.92	96	84
<i>p</i> -xileno	42.1	941	22 (21)	0.89	88	80

^a Relación experimental^b Relación teórica**Tabla 2.** Valores netos de las cinéticas de degradación de los isómeros del xileno bajo condiciones de reducción de Fe(III).

Compuesto	Sustrato degradado (μM)	Fe(II) producido (μM)	Relación Fe (II)/sustrato	Velocidad degradación ($\mu\text{M/d}$)	Eficiencia de degradación (%)	CO ₂ recuperado (%)
Primera cinética						
<i>o</i> -xileno	48.1	2224	46 ^a (42) ^b	0.18	99	79
<i>m</i> -xileno	43.9	1873	43 (42)	0.17	92	79
<i>p</i> -xileno	45.6	1991	44 (42)	0.11	91	80
Segunda cinética						
<i>o</i> -xileno	39.8	1742	44 (42)	1.1	82	83
<i>m</i> -xileno	45.3	1889	42 (42)	1.3	86	81
<i>p</i> -xileno	44.9	1896	42 (42)	1.3	84	81

^a Relación experimental^b Relación teórica

Los cultivos que biodegradan benceno (carril 3) y *o*-xileno (carril 6) bajo condiciones de reducción de Fe(III), presentaron menos bandas en comparación con los otros compuestos analizados, lo cual podría estar relacionado con una mayor dificultad inherente en la degradación de estos dos compuestos, desarrollando comunidades microbianas menos diversas.

Los patrones de las bandas de los carriles 1, 4, 7, 8 y 9, obtenidos bajo que se refieren a las condiciones de reducción de Mn(IV) y los obtenidos en los carriles 2, 3, 5 y 6, bajo condiciones de reducción de Fe(III), tuvieron diferente movilidad electroforética, probablemente como un reflejo de la diversidad de los microorganismos involucrados en la degradación de BTEX (aunque es posible que no todos participen directamente en la degradación). Adicionalmente, los cultivos con *o*-, *m*- y *p*-xileno (carriles 7, 8 y 9) bajo condiciones de reducción de Mn(IV) tuvieron un patrón de bandas diferente, a pesar de que son compuestos químicamente similares. Esto podría indicar que comunidades microbianas diferentes están involucradas en la degradación de los isómeros del xileno.

Respecto a los experimentos en régimen continuo, la columna anaerobia fue percolada con flujo ascendente y mantenida en operación por cerca de 170 días. El benceno en el influente tenía una concentración de 64 μM . Se consideraron dos periodos de operación de la columna: el periodo 1 se refiere al inicio de las operaciones de la columna, su estabilización y funcionamiento continuo hasta el día 104, momento en el que se tomó una muestra de sedimento para el análisis molecular de la diversidad microbiana involucrada en el proceso de degradación. En el periodo 2 se estabilizó el funcionamiento de la columna a condiciones similares a las que se tenían antes de la toma de muestra.

En el periodo 1 la eficiencia de remoción de benceno inicial fue de 55% y fue aumentando gradualmente hasta alcanzar un valor de 95.2% a los 104 días de operación continua. El estado de equilibrio dinámico se alcanzó transcurridos 55 días de operación, con una eficiencia de remoción de benceno promedio de 93.8%. Durante el estado de equilibrio dinámico se recuperó en promedio 732 μM de Mn(II) y 322 μM de CO₂, lo que

correspondió a una recuperación de 82 y 90% con respecto a los valores estequiométricos.

Respecto a la degradación de BTEX acoplada a la reducción de Mn(IV), solamente se tiene el reporte de Langenhoff *et al.* (1997) con un cultivo de enriquecimiento denominado LET-13 capaz de biodegradar tolueno, aunque los autores no encontraron actividad metabólica sobre el benceno. Existen algunos reportes de la degradación anaerobia del benceno bajo condiciones de reducción de Fe(III) utilizando inóculos derivados de acuíferos contaminados con derivados del petróleo (Lovley *et al.*, 1994; Kazumi *et al.*, 1997; Caldwell y Suflita, 2000), así mismo se ha demostrado su degradación utilizando sustancias húmicas (Lovley *et al.*, 1996; Anderson y Lovley, 1999), y también se ha reportado su degradación *in situ* (Anderson *et al.*, 1998; Rooney-Varga *et al.*, 1999). Se han relacionado algunos microorganismos pertenecientes al género *Geobacter* con la reducción de aceptores metálicos como el Fe(III) y la degradación de compuestos monoaromáticos (Lovley *et al.*, 1993). A la fecha no se conoce cultivo puro capaz de degradar al benceno bajo condiciones de reducción de Mn(IV).

El análisis por técnicas moleculares PCR-DGGE del sedimento extraído de la columna y comparado con el del sedimento mostró que existe una diferencia importante entre ambas muestras, lo cual sugiere que se presentaron cambios importantes en las poblaciones microbianas durante la operación de la columna (Fig. 2). El análisis del patrón de bandas del gel indicó que la muestra de la columna (carril 1) presentó cierta diferencia respecto al sedimento sin tratamiento (carril 2).

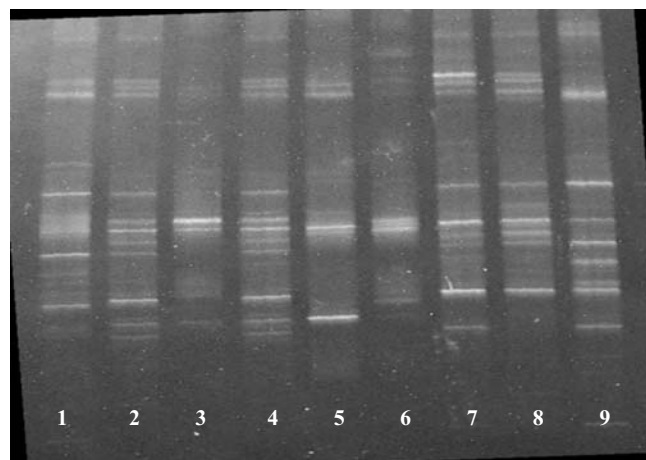


Figura 1. Patrón de bandas obtenidas por DGGE de la cinética de degradación de tolueno y Mn(IV) [1], tolueno y Fe(III) [2]; benceno y Fe(III) [3]; etilbenceno y Mn(IV) [4], etilbenceno y Fe(III) [5], o-xileno y Fe(III) [6], o-xileno y Mn(IV) [7]; m-xileno y Mn(IV) [8], p-xileno y Mn(IV) [9].

El principal cambio observado fue la aparición de una banda prominente, marcada como clona W22, aunque también se observaron cambios en las intensidades de algunas bandas. Las bandas prominentes en el gel se cortaron, reamplificaron y clonaron. Cuatro clonas seleccionadas y designadas como B7, B10, IB2 y W22 fueron secuenciadas y comparadas en la base de datos del GenBank utilizando el programa BLAST. La clona W22 se relaciona con un 99% de similitud con *Propionibacterium*.

Se sabe que la reducción de óxidos de Fe(III) y Mn(IV) en suelos y sedimentos puede ser realizada indirectamente por diversos microorganismos. *Propionibacterium freudenreichii*, una bacteria anaerobia no reductora de Fe(III), es capaz de canalizar electrones de la oxidación anaerobia a través de ácidos húmicos durante su metabolismo para reducir Fe(III), sugiriendo que la capacidad de reducción disimilatoria de metales puede no estar exclusivamente relacionada a microorganismos reductores de Fe (Benz *et al.*, 1998). Aunque el mecanismo mencionado puede ser responsable de la biodegradación anaerobia del benceno en nuestro sistema, es claro que se conoce muy poco acerca de las reacciones biológicas donde se encuentran involucrados aceptores de electrones pobremente solubles como los óxidos metálicos.

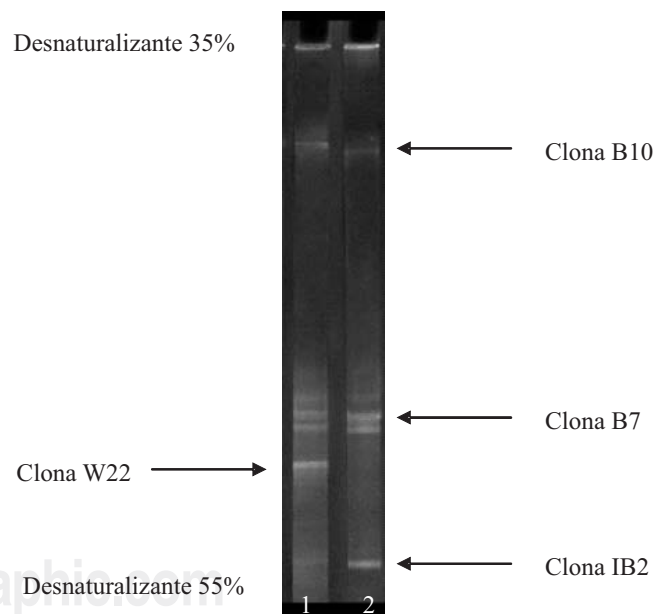


Figura 2. Patrón de bandas de la columna anaerobia (1) y del sedimento original (2) en el gel de acrilamida al 6% por la técnica de DGGE. Las flechas indican las bandas que fueron cortadas y posteriormente clonadas y secuenciadas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (31537-B) y por el Instituto Mexicano del Petróleo (D.00037). Los autores agradecen la colaboración de la M. en C. Elia Velásquez Mejía así como los valiosos comentarios del Dr. Hugo Ramírez Saad.

REFERENCIAS

1. Anderson, R. T. & D. R. Lovley. 1999. Naphthalene and benzene degradation under Fe(III)-reducing conditions in petroleum-contaminated aquifers. *Bioremediation J.* 3:121-135.
2. Anderson, R. T., J. N. Rooney-Varga, C. V. Gaw & D. R. Lovley. 1998. Anaerobic benzene oxidation in the Fe(III) reduction zone of petroleum-contaminated aquifers. *Environ. Sci. Technol.* 32:1222-1229.
3. Benz, M., B. Schink & A. Brune. 1998. Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermentative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4507-4512.
4. Caldwell, M. E. & J. M. Suflita. 2000. Detection of phenol and benzoate as intermediates of anaerobic benzene biodegradation under different terminal electron-accepting conditions. *Environ. Sci. Technol.* 34:1216-1220.
5. Haveman, S.A., E.W.A. Swanson, G. Voordouw, & T.A. Al. 2005. Microbial populations of river-recharged Fredericton aquifer. *Geomicrobiol. J.* 22:311-324.
6. Kazumi, J., M. E. Caldwell, J. M. Suflita, D. R. Lovley & L.Y. Young. 1997. Anaerobic degradation of benzene in diverse anoxic environments. *Environ. Sci. Technol.* 31:813-818.
7. Langenhoff, A., D. L. Brouwers-Ceiler, J. H. L. Engelberting, J. J. Quist, J. G. P. N. Wolkenfelt, A. J. B. Zehnder & G. Schraa. 1997. Microbial reduction of manganese coupled to toluene oxidation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22:199-127.
8. Lovley, D. R., J. C. Woodward & F. H. Chapelle. 1994. Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe(III) ligands. *Nature* 370:128-131.
9. Lovley, D. R., J. C. Woodward & F. H. Chapelle. 1996. Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe(III) forms. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:288-291.
10. Lovley, D. R., S. J. Giovanonni, D. C. White, J. E. Champine & E. Phillips. 1993. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch. Microbiol.* 159:336-344.
11. Petrunic, B. M., K. T. B. MacQuarrie, & T. A. Al. 2005. Reductive dissolution of Mn oxides in river-recharged aquifer: a laboratory column study. *J. Hydrol.* 301:163-181.
12. Phelps, C. D. & L. Y. Young. 2001. Biodegradation of BTX under anaerobic conditions: a review. *Adv. Agron.* 70: 329-357.
13. Puig-Grajales, L., N. Tan, F. van der Zee, E. Razo-Flores & J. A. Field. 2000. Anaerobic biodegradability of fuel oxygenates and alkylphenols in the presence of alternative electron acceptors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:692-697.
14. Rooney-Varga, J. N., R. T. Anderson, J. L. Fraga, D. Ringelberg & D. R. Lovley. 1999. Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3056-3063.

Correspondencia:

César Hernández-Rodríguez
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN.
D.F., México.
E-mail: chdez38@hotmail.com