

# Diversidad bacteriana en un biorreactor de lecho fluidificado durante el tratamiento de agua contaminada con nafta

S. L. ARA-ROJAS<sup>1\*</sup>, A. MASSOL-DEYÁ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Jorge Basadre Grohoman. Av. Miraflores S/N, Tacna-Perú;

<sup>2</sup>Recinto Universitario de Mayagüez, Universidad de Puerto Rico, Mayagüez-Puerto Rico PR 00681

\*Correspondencia. E-mail: lilliana\_ara@hotmail.com

## RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación fue determinar la diversidad bacteriana del proceso de biorremediación de agua contaminada con nafta en un biorreactor de lecho fluidificado en el Recinto Universitario de Mayagüez, de la Universidad de Puerto Rico. El aislamiento y la caracterización de las colonias bacterianas del sistema de biorremediación fueron realizados en medio R<sub>2</sub>A. Las pruebas morfológicas incluyeron la determinación de la morfología celular y de las colonias, y la reacción frente a la coloración de Gram. Las propiedades fisiológicas se determinaron usando el sistema Biolog® y sobre la base de la habilidad para desarrollar en medio mínimo con nafta como única fuente de carbono. La caracterización molecular se llevó a cabo por BOX-PCR y por análisis de secuencia del ADN<sub>r</sub> 16S mediante la técnica de ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis). De los 162 morfotipos de colonias aislados, 75% fueron bacilos gram-negativos, 19% bacilos gram-positivos, 5% cocos gram-negativos y 1% cocos gram-positivos. Según el análisis ARDRA, estos morfotipos se distribuyeron en 90 grupos genéticos, de los cuales 53% incluyeron cepas con crecimiento en nafta. Las 86 cepas que crecieron en nafta presentaron 52 patrones de amplificación, los que a través de BOX-PCR se agruparon en 50 grupos metabólicamente no relacionados. El alto nivel de diversidad microbiana observado en el reactor permitió la remoción del contaminante y, al parecer, fue importante para la operación estable y eficiente del sistema.

**Palabras clave:** biorremediación, biodegradación de nafta, bacteria, BOX-PCR, ARDRA

## ABSTRACT

**Bacterial diversity in a fluidized bed bioreactor (FBR) treating gasoline-contaminated groundwater.** The main objective of this research project was to determine the bacterial diversity during the process of bioremediation of water contaminated with gasoline in a fluidized bed reactor at Mayagüez, PR. Isolation and characterization of bacterial populations from the bioremediation system was performed on R<sub>2</sub>A medium. Morphological tests included cellular and colonial shape and reaction to Gram coloration. Physiological properties were determined by using carbon utilization profiles (Biolog®) and by the ability of axenic cultures to use gasoline as the sole carbon source. Molecular characterization was performed by BOX-PCR and 16S rDNA sequence analysis (ARDRA). From a total of 162 distinctive isolates, 75% were gram-negative bacilli, 19% gram-positive bacilli, 5% gram-negative cocci and 1% gram-positive cocci. The 162 axenic cultures corresponded to 90 different genetic groups; 53% of which included strains with growth in gasoline as sole carbon source. The 86 strains capable of growing in gasoline corresponded to 52 different amplification patterns in BOX-PCR; which were not metabolically related (Biolog® system). The high degree of microbial diversity in the FBR allowed efficient and stable hydrocarbon removal throughout the operation of the system.

**Key words:** bioremediation, gasoline biodegradation, bacteria, BOX-PCR, ARDRA

## INTRODUCCIÓN

La contaminación de aguas subterráneas por productos del petróleo es reconocida como un serio problema para la calidad de este vital fluido. Debido a su hidrosolubilidad y a su elevada toxicidad, los componentes de la nafta han sido clasificados como contaminantes primarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (19, 20). En Puerto Rico existen más de 12 000 tanques soterrados y se estima que más de 800 sufrieron fisuras y liberaron hidrocarburos al ambiente durante las décadas pasadas.

La mayoría de los hidrocarburos de la nafta son biodegradables en una gran variedad de ambientes. Las opciones de limpieza que dependen de una biodegradación natural, en términos generales, pueden ser categorizadas como biorremediación pasiva, la que requiere monitoreo pero ninguna intervención externa, y soluciones de ingeniería, que requieren alteraciones físicas y/o químicas del lugar para aumentar o estimular el proceso natural de biodegradación (3).

La biorremediación eficiente de contaminantes hidrocarbonados por comunidades microbianas es uno de los mayores retos para los especialistas en ecología

microbiana y los ingenieros de procesos, debido a que las soluciones de biorremediación están basadas en la conjunción de la ingeniería mecánica con la diversidad biológica y su funcionalidad. Sin embargo, mientras que el diseño y la implementación de soluciones por procesos de ingeniería están relativamente bien establecidos, se carece de una descripción precisa de la diversidad microbiana y su funcionalidad, lo cual limita la eficiencia de la biorremediación. Conocer la diversidad estructurada en un proceso de biorremediación, su estabilidad y duración durante el manejo del mismo son las claves fundamentales para monitorear y predecir la eficiencia de la biorremediación (22).

Dentro de un programa de remoción de tanques soterrados, en el año 2001 se descubrió en el Recinto Universitario de Mayagüez, Universidad de Puerto Rico (UPRM), la existencia de un plumacho de contaminación con nafta en el área del parque automotor. Por tal motivo la UPRM inició en el lugar un proyecto de biorremediación que se extendió durante 18 meses. Allí se instalaron: a) un sistema de recuperación de producto libre, que removió más de 80 galones de producto libre; b) un sistema de ventilación en múltiples pozos a través de la zona impactada, para bioestimular la remoción de hidrocarburos del suelo; y c) un reactor de lecho fluidificado (cuyo material de fijación microbiana fue carbón activado) para la biorremediación *on site* del agua contaminada.

Aun cuando existe abundante literatura científica sobre procesos de biorremediación de ambientes contaminados con petróleo y sus derivados, la gran mayoría de los estudios hace referencia a la optimización de procesos de ingeniería y a la estandarización del metabolismo de estos contaminantes por determinadas especies de bacterias, pero muy pocos hacen referencia a la diversidad bacteriana presente en procesos de biorremediación *in situ* u *on site*, y ninguno de ellos corresponde al área del Caribe.

El propósito de nuestra investigación fue determinar la composición y dinámica de la comunidad bacteriana (cultivable) degradadora de nafta presente en el biorreactor de lecho fluidificado, para establecer un mejor monitoreo y una mayor eficiencia del proceso de biorremediación *on site* de agua contaminada con nafta en el Recinto Universitario de Mayagüez y sentar un precedente para el Caribe. Asimismo, con este estudio se recuperaron cepas bacterianas degradadoras de nafta que podrían usarse para bioaumentar otros procesos de biorremediación de hidrocarburos en esta área u otras áreas geográficas con condiciones ambientales similares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La biorremediación de agua contaminada con nafta se realizó en un biorreactor de lecho fluidificado, que consistió en una columna de 5 l de PVC de 10 cm de diámetro y 150 cm de longitud. Esta unidad fue operada con flujo ascendente de 0,2 a 0,5 litros por minuto. El interior fue empacado con aproxima-

damente 500 g (peso seco) de carbón activado de un diámetro geométrico de 0,7 mm. El agua contaminada fue bombeada del subsuelo a un tanque de equalización y suplementada con oxígeno (7 a 10 mg/l) antes de su ingreso al biorreactor, donde tuvo un tiempo de retención hidráulica de aproximadamente 20 min.

### Recuento y aislamiento bacteriano

La enumeración bacteriana fue realizada mediante diluciones seriadas de muestras de agua del afluente, del interior y del efluente del biorreactor, así como de muestras del carbón activado. La extracción de bacterias de las muestras de carbón activado se realizó mediante el método descrito por Massol-Deyá *et al.* (10), y el recuento de la flora bacteriana, como unidades formadoras de colonia (UFC), se realizó en medio R<sub>2</sub>A cuya composición en g/l fue: extracto de levadura, 0,5; proteosa peptona, 0,5; hidrolizado de caseína, 0,5; glucosa, 0,5; almidón, 0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,03; MgSO<sub>4</sub> anhidro, 0,024; piruvato sódico, 0,3; y agar-agar, 15,0. Se incubó durante 48 horas a 25 °C.

### Caracterización microbiana

Las colonias aisladas fueron caracterizadas morfológica, fisiológica y genéticamente mediante la coloración de Gram, el crecimiento en un medio mínimo suplementado con nafta como única fuente de carbono y el análisis de secuencia del ADNr 16S mediante la técnica de ARDRA. Aquellos cultivos capaces de crecer en medios con nafta fueron tipificados de acuerdo con sus propiedades metabólicas mediante el sistema Biolog® y desde el punto de vista molecular por BOX-PCR.

### Determinación del crecimiento en nafta como única fuente de carbono

De cada cepa se obtuvo un inóculo de aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/ml, del que se usaron alícuotas de 20 µl para inocular placas con medio mínimo de Bushnell-Hass (BH: 0,2 g/l de MgSO<sub>4</sub>; 0,02 g/l de CaCl<sub>2</sub>; 1,0 g/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,0 g/l de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,05 g/l de FeCl<sub>3</sub> y 15,0 g/l de agar agar), medio Bushnell-Hass suplementado con nafta al 1% como única fuente de carbono (BHG) y medio R<sub>2</sub>A. Una de las placas de BH fue incubada en una atmósfera con vapores de nafta, mientras que otra se incubó en una atmósfera sin vapores de nafta. Lo mismo se hizo al ensayar el medio BHG. Todas las placas fueron incubadas a 25 °C en aerobiosis y en oscuridad durante 3 a 10 días.

### Extracción de ADN de las cepas bacterianas

A partir de sedimentos bacterianos de cada cultivo axénico, se extrajo ADN utilizando el equipo comercial de QIAGEN® DNAeasy™ Tissue Kit (Valencia, CA). La verificación se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en solución amortiguadora Tris ácido acético EDTA (TAE) con 1 µl de colorante (*loading dye*) 6x (Promega®, G 1881), en una cámara de electroforesis Sub-Cell modelo 192 (Bio-Rad Laboratories Inc, CA) a una intensidad de corriente de 75 voltios durante 2 a 3 h. Como marcador se utilizó el fago λ cortado con la enzima *Hind* III. La comprobación de las bandas de ADN se hizo visualmente por tinción del gel con bromuro de etidio (0,5 µg/ml durante 30 minutos) y observación en transiluminador de radiación UV modelo M20 equipado con un monitor SONY® blanco y negro modelo SSM-930.

### Agрупamiento por el método de ARDRA

Todos los cultivos aislados fueron caracterizados mediante ARDRA. Para la amplificación del ADNr 16S se hizo reaccionar por cada cultivo 2,5 mM de cloruro de magnesio, 30 µg de albúmina sérica bovina (BSA), 5 µl de solución amortiguadora para PCR, mezcla de desoxirribonucleótidos con 2,5 mM de cada uno, 40 pmol del *primer* 8F- 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (2) y del *primer* 1392R- 5'-ACGGGCGGT GTGTACA-3' (1), 5 µl de *Taq* polimerasa 70 a 100 ng de ADN y agua destilada para completar a 50 µl el volumen de reacción. La amplificación se realizó en un termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Perkin

Elmer Life and Analytical Sciences Inc, MA) con un programa de 1 minuto a 94 °C, 35 ciclos de 1 minuto a 92 °C, 2 minutos a 52 °C y 2 minutos a 72 °C, y una extensión final de 6 minutos a 72 °C.

La visualización del fragmento amplificado se hizo por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Confirmada la amplificación del ADNr 16S, se cortó con las enzimas de restricción *HaeIII*, *HinfI* y *RsaI* (Promega®) colocando por cada tipo de enzima 10 µl del ADNr 16S que contenía aproximadamente 1 µg de ADN; 1,5 µl de amortiguador enzimático (10X); 0,2 µl de BSA y 0,5 µl de enzima de restricción (20 U/µl) para un volumen final de 15 µl. Esta solución fue incubada a 37 °C durante 3 horas. La separación se hizo por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% con el plásmido pGEM cortado con *HaeIII* como marcador. Los patrones de bandas generados fueron visualizados y fotografiados luego de teñir con bromuro de etidio. Las fotografías digitales fueron analizadas con Gel-Pro Analyzer™ (Media Cybernetics Inc, Bethesda, MD) para obtener el tamaño de cada una de las bandas. Los datos generados en Gel-Pro fueron transcritos en una matriz binomial y analizados en SYSTAT 9.0® (Systat Software Inc., CA).

#### Agrupamiento por BOX-PCR

La amplificación y tipificación de las secuencias repetitivas de tipo AR1-5'-CTAC GGCAAGGCGACGCT-3' (12) de las cepas se logró haciendo reaccionar por cada muestra: 0,4 µg de BSA; 2,5 µl de dimetil sulfóxido al 10%; 0,2 µl de Tween 20; 5 µl de amortiguador GR 5X, mezcla de dNTPs con 2,5 mM de cada uno, 40 pmol de primer Box AR1, 2,5 unidades de *Taq* polimerasa, 50 ng de ADN y agua destilada para un volumen final de 25 µl. La amplificación se realizó con un programa de un período inicial de desnaturalización de 7 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 52 °C y 8 minutos a 65 °C, y una extensión final de 15 minutos a 65 °C. La separación fue en gel de agarosa Metaphor® al 2,5% en TAE, y se empleó el plásmido pGEM cortado con *HaeIII* como marcador. Los patrones de bandas generados fueron visualizados y fotografiados luego de teñir con bromuro de etidio. Las fotografías digitales también fueron analizadas con Gel-Pro Analyzer™ para obtener datos del tamaño de cada una de las bandas. Los datos generados en Gel-Pro fueron transcritos en una matriz binaria y llevados al programa SYSTAT 9.0® para realizar el análisis de grupo.

#### Perfil de utilización de fuentes únicas de carbono

Para esta prueba, una colonia de cada cultivo fue transferida a una placa con medio Luria Bertani (Difco, Detroit, MI) cuya composición fue: triptona, 10 g/l; extracto de levadura, 5 g/l; NaCl, 10 g/l y agar, 15 g/l; tras lo cual se incubó a 25 °C durante 3 a 5 días. A partir de este nuevo cultivo se preparó una suspensión densa con aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/ml, que sirvió como inóculo para una microplaca Biolog® GN/GP (Biolog Inc, Hayward, CA) de 96 pocillos, que se incubó a 25 °C. Después de 24 a 48 horas de incubación, el desarrollo de color fue medido como densidad óptica a 590 nm, usando un lector automático de placas (Tmax Molecular Device, Biolog Inc, Hayward, CA). Los datos fueron generados usando el MicroLog 3N software (Biolog Inc, Hayward, CA) y convertidos en una matriz binaria, con la cual se hicieron los análisis de grupos y se generaron dendrogramas usando el programa SYSTAT 9.0®.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso de biorremediación de agua contaminada con nafta en el Recinto Universitario de Mayagüez utilizando un biorreactor de lecho fluidificado (BCAR), permitió la descontaminación del acuífero impactado. La unidad de biorremediación operó de manera discontinua con un paso de recirculación de 160 días, durante los cuales

50.000 litros de agua subterránea fueron tratados y reinyectados una vez que se confirmó la remoción de hidrocarburos. El proceso implicó un total de 33 tandas; cada tanda se caracterizó por una operación microaerófila a 25 °C, pH neutro, una remoción del 90% (en promedio) del contaminante luego del primer paso del agua por la unidad de tratamiento y una eficiencia del 99,9% luego de la recirculación.

Durante este proceso de biorremediación la comunidad bacteriana del reactor estuvo representada por una densidad aproximada de 10<sup>12</sup> UFC/ml, distribuida entre la superficie del carbón activado, donde formó una biopelícula, y el agua contenida en el reactor, como puede observarse en la Tabla 1.

En los sistemas de biorremediación se emplea carbón activado como medio de soporte o fijación para una comunidad bacteriana debido a las propiedades absorbentes y adsorbentes de este material (8). Por sus propiedades absorbentes, el carbón activado suele emplearse para remediar físicamente aire y agua contaminados con productos volátiles, pero posee la desventaja de que, en forma rápida se alcanza un punto de saturación, el que según Daifullah y Girgis (4) suele alcanzarse al tercer día de remediación, a partir del cual se requiere de un proceso de recuperación o desaturación. Esto es evitado con el desarrollo en la superficie del carbón de una comunidad dedicada a degradar el contaminante absorbido (8). En el BCAR se usó carbón activado de superficie rugosa y alto grado de porosidad, características que Harendranath *et al.* (8) y Massol-Deyá *et al.* (10) señalan como idóneas para la absorción de contaminantes y la fijación bacteriana; sin embargo, el tipo de carbón utilizado permitió la fijación de una población estable de sólo 10<sup>4</sup> UFC/g de carbón, lo que representa el 0,1% de la población del afluente (10<sup>7</sup> UFC/ml en promedio) que

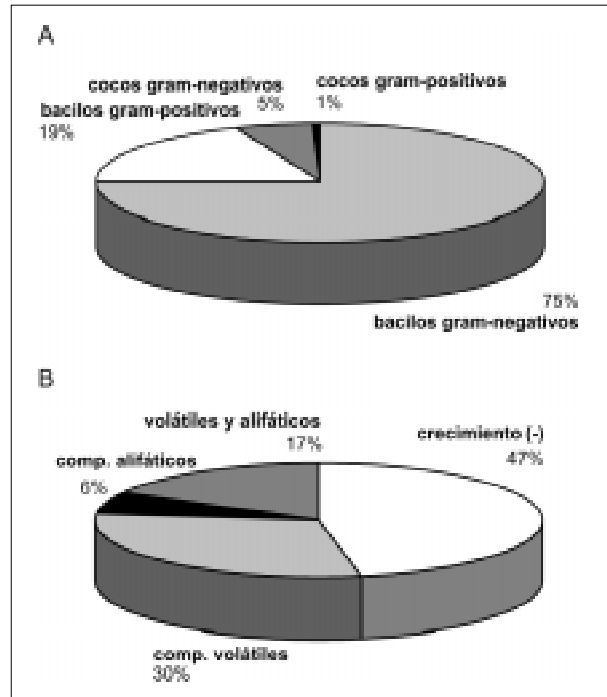
**Tabla 1.** Recuento de la comunidad bacteriana (UFC/ml) presente en el proceso de biorremediación de agua contaminada con nafta.

Día	UFC/ml			
	Afluente	Biorreactor		Efluente
		Agua	Carbón Activado	
1	2x10 <sup>6</sup>	6x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>2</sup>
4	5x10 <sup>6</sup>	4x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>3</sup>
9	2x10 <sup>6</sup>	7x10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>3</sup>
22	3x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>5</sup>	7x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>4</sup>
36	8x10 <sup>7</sup>	3x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>4</sup>
37	2x10 <sup>7</sup>	9x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>5</sup>
41	1x10 <sup>8</sup>	2x10 <sup>7</sup>	4x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>
42	1x10 <sup>8</sup>	8x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>6</sup>
45	2x10 <sup>8</sup>	5x10 <sup>8</sup>	4x10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>7</sup>
53	2x10 <sup>9</sup>	7x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>4</sup>	4x10 <sup>7</sup>

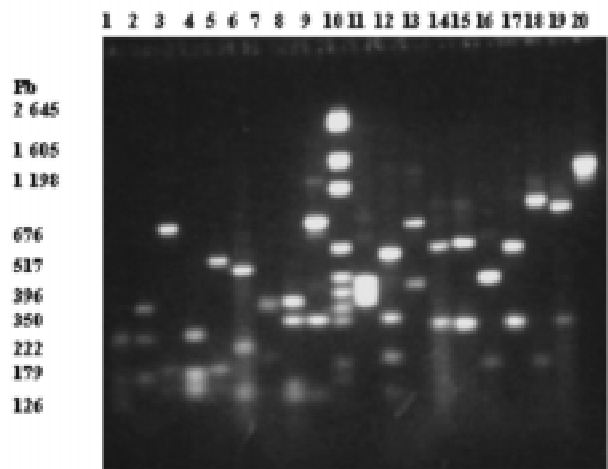
actuó como inóculo natural. Estas densidades resultan ser pobres si se comparan con la informada por Massol-Deyá *et al.* (10), quienes con un afluente con  $10^7$  UFC/ml obtuvieron una población de  $10^9$  a  $10^{10}$  UFC/g de carbón activado. Esto pudo deberse a algún tipo de inhibición por características del carbón o por la poca cantidad de oxígeno disuelto presente en el sistema. Si bien no se obtuvieron grandes densidades bacterianas en la superficie del carbón activado, se registró la formación de una biopelícula flotante que no ha sido informada para otros procesos en reactores con carbón activado como material de fijación microbiana. Si tomamos en cuenta que esta biopelícula flotante estuvo constituida por una comunidad bacteriana de entre  $10^6$  a  $10^9$  UFC/ml (agua del biorreactor) y la sumamos a la establecida en el carbón ( $10^4$ ), tendríamos una población promedio de  $10^{12}$  UFC/reactor, la que resulta similar a la obtenida por otros investigadores, como Massol-Deyá *et al.* (10).

Las comunidades bacterianas establecidas en ambientes contaminados con hidrocarburos del petróleo o en unidades de tratamiento poseen una gran diversidad morfológica, fisiológica y genética (6, 7, 11, 16, 21), como la observada en este trabajo. De la población del BCAR se aislaron y caracterizaron 162 morfotipos de colonias que definieron una comunidad microbiana compuesta tanto por cocos como por bacilos gram-positivos y gram-negativos; con predominio de bacilos gram-negativos (Figura 1a). El 53% de los cultivos creció en medios mínimos suplementados con nafta como única fuente de carbono, utilizando componentes volátiles, alifáticos o ambos (Figura 1b). El 47% restante se trataría de cepas tolerantes a la nafta, dado que la biodegradación en sistemas naturales del petróleo y sus derivados ocurre a través de la acción de poblaciones microbianas mixtas y bajo condiciones que influyen la presencia o efectividad del consorcio degradador natural. La comunidad microbiana que se establece en el interior de ecosistemas contaminados tiende a estar dominada por organismos capaces de utilizar y/o sobrevivir la contaminación tóxica, y su diversidad puede verse influida por la complejidad de las mezclas químicas presentes y por el lapso que las poblaciones han estado expuestas (9).

La diversidad genética de los aislamientos fue verificada mediante ARDRA. De cada reacción de amplificación con los iniciadores universales 8F y 1932R se obtuvo un fragmento de 1500 pb. La digestión de estos fragmentos generó patrones de restricción constituidos por 2 a 7 bandas de entre 100 a 1100 pb (establecidos por comparación con el marcador pGEM cortado con *Hae*III), como se muestra en la Figura 2. Allí se observan los productos de restricción del ADNr 16S de las primeras cepas aisladas del agua del biorreactor (BW por sus siglas en inglés) identificadas como BW7, BW8, BW9, BW10, BW12 y BW16 cortadas con las enzimas *Hae*III (calles 1 a 6), *Hin*fl (calles 7 a 9 y 11 a 13) y *Rsa*I (calles 14 a 19), respectivamente.



**Figura 1.** Distribución de las cepas aisladas del BCAR por su (a) morfología y reacción frente a la coloración de Gram y (b) crecimiento en medio mínimo con nafta como única fuente de carbono.



**Figura 2.** ARDRA del ADNr 16S de seis cepas cortado con *Hae*III (calles 1 a 6), *Hin*fl (calles 7 a 9 y 11 a 13) y *Rsa*I (calles 14 a 19). Calle 10, marcador (pGEM cortado con *Hae*III); calle 20, control (ADNr 16S sin cortar). A la izquierda se muestra el tamaño en pb de cada una de las bandas del marcador.

Con la información derivada de los patrones de restricción del ADNr 16S de los 162 cultivos se generó un dendrograma (Figura 3). Para establecer el número de unidades taxonómicas operacionales (UTO) en que se diferencian los patrones de bandas generados, se tomó un valor de corte de 0,2 DE (distancia euclidiana). Los

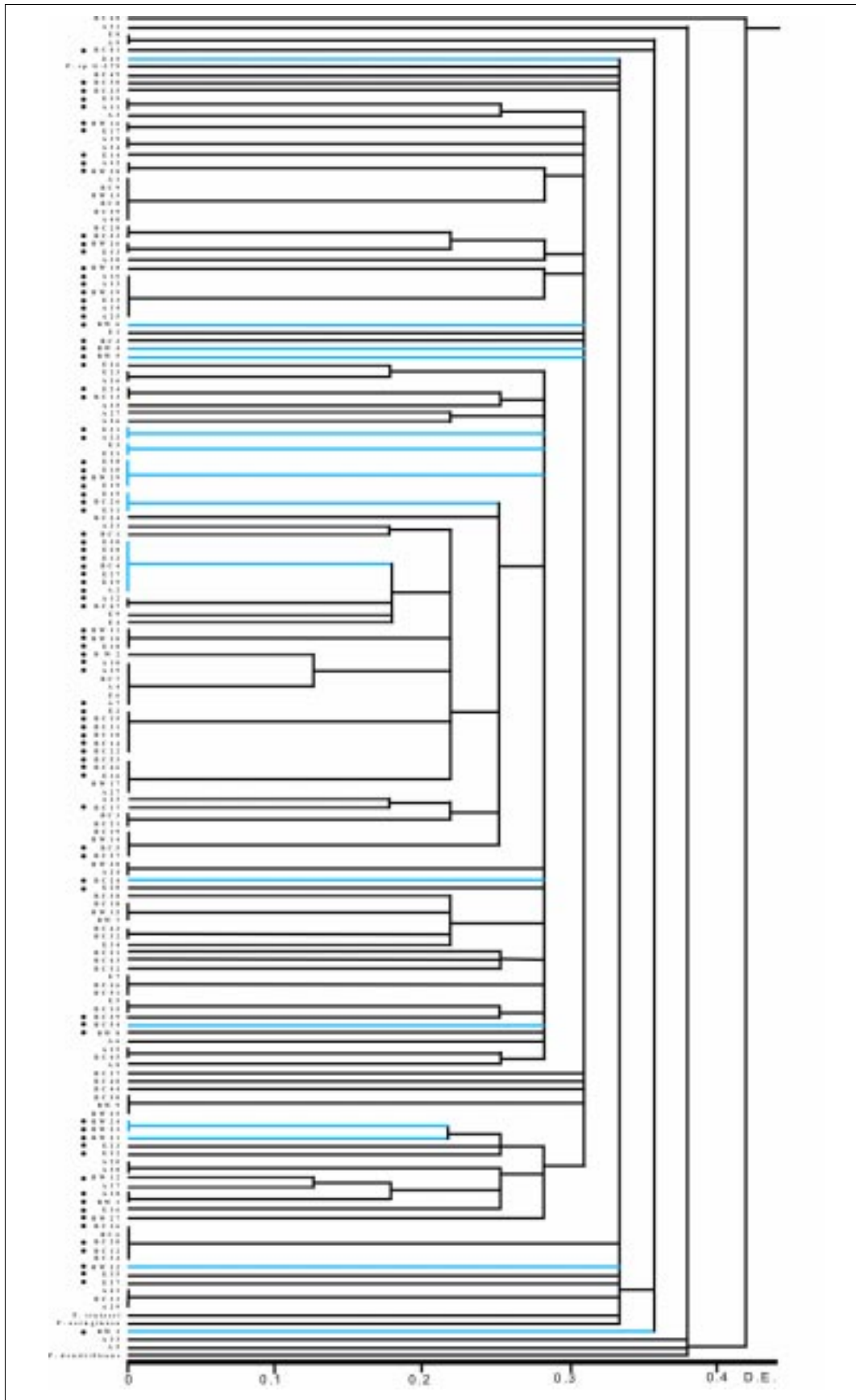


Figura 3. Análisis de grupo de patrones ARDR de 163 cultivos bacterianos aislados del biorreactor. (●) Cepas con crecimiento en nafta como única fuente de carbono, (—) cepas gram-positivas, D.E.: distancia euclidiana.

cultivos se diferenciaron en 91 UTO que se agruparon en 90 grupos distintos, de los cuales el 40% estaban compuestos por dos o más cultivos (grupos de amplia distribución o frecuencia) y el 60% restante correspondía a grupos particulares (especialistas). El 53% (48 grupos) incluyen cultivos con crecimiento en nafta como única fuente de carbono y el 16% (14 grupos) incluyen cultivos gram-positivos. Ninguno de los UTO mostró analogía con las cuatro especies de *Pseudomonas* cuyos patrones de ARDRA para las tres enzimas de restricción utilizadas fueron tomados como patrones de comparación.

El análisis de ARDRA se basa en la generación de patrones de bandas cuyo número y tamaño dependen de la presencia o ausencia de sitios de restricción en el interior de los genes de ADNr 16S; patrones que son usados como criterio para estimar diversidad genética (18). Esta técnica tiene tres limitaciones: genera una cantidad restringida de datos a partir de las moléculas de ADNr 16S (sólo usa sitios de restricción), no permite establecer si dos patrones iguales se deben a sitios de restricción con igual ubicación en las moléculas de ADN de las que proceden, y genera inconsistencias topológicas en los dendrogramas a causa de la limitada capacidad discriminadora de las enzimas de restricción con respecto a la extensa variedad de organismos que ocurren naturalmente (12, 18). Por lo tanto, al igual que en el caso de Massol-Deyá *et al.* (11) y de Rodríguez (15), los resultados de ARDRA sólo se han usado para establecer una

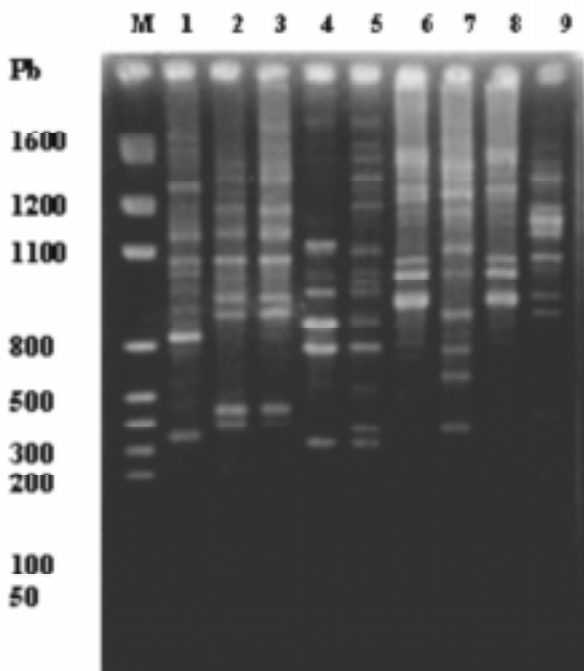
medida de diversidad entre los organismos recuperados y una diferenciación presuntiva en grupos genéticos cuyos integrantes pueden pertenecer a una o más especies.

De los cultivos con crecimiento en medio mínimo suplementado con nafta, 66 fueron gram-negativos y 20 gram-positivos; estas cepas fueron caracterizadas mediante la amplificación por BOX-PCR de las regiones repetitivas de tipo AR1 presentes en su genoma. La Figura 4 muestra el producto de BOX-PCR de 9 cepas aisladas del afluente. Mientras algunas cepas generan un mismo patrón de bandas y, por ende, corresponden a un mismo genotipo de BOX-PCR (calles 2 y 3; 6 y 8), otras poseen patrones distintos.

El método de BOX-PCR, al igual que ARDRA, se basa en la amplificación de segmentos de ADN de acuerdo con la distribución de secuencias de tipo BOX del cromosoma y posee una mayor capacidad discriminadora entre los diversos organismos de una comunidad (15). Esto debido a que amplifica regiones de ADN interespecíficas, repetitivas, altamente conservadas y presentes en múltiples copias a través del genoma bacteriano. Se basa en amplificaciones que se traducen en patrones de bandas cuyo tamaño y número caracterizan a las cepas y las diferencian de otras (15, 17).

El análisis de BOX-PCR de las 86 poblaciones degradadoras de nafta revela una alta diversidad en la comunidad, lo que se traduce en la presencia de 52 genotipos diferentes de BOX-PCR que se distribuyeron en 50 grupos (Figura 5). El 69% de éstos se establecieron en el biorreactor (cepas BW y BC), el 23% se aislaron del efluente (cepas E), donde también se observó la biopelícula, y sólo un 8% (2 genotipos de BOX-PCR), que únicamente se aisló del afluente (cepas A), no se estableció como miembro de la comunidad del reactor. Tres de los patrones de BOX-PCR obtenidos mostraron identidad con las cepas usadas como patrón: (BW4 con *Bacillus cereus*, BC23 con *Pseudomonas stutzeri* y E35 con *P. aeruginosa*).

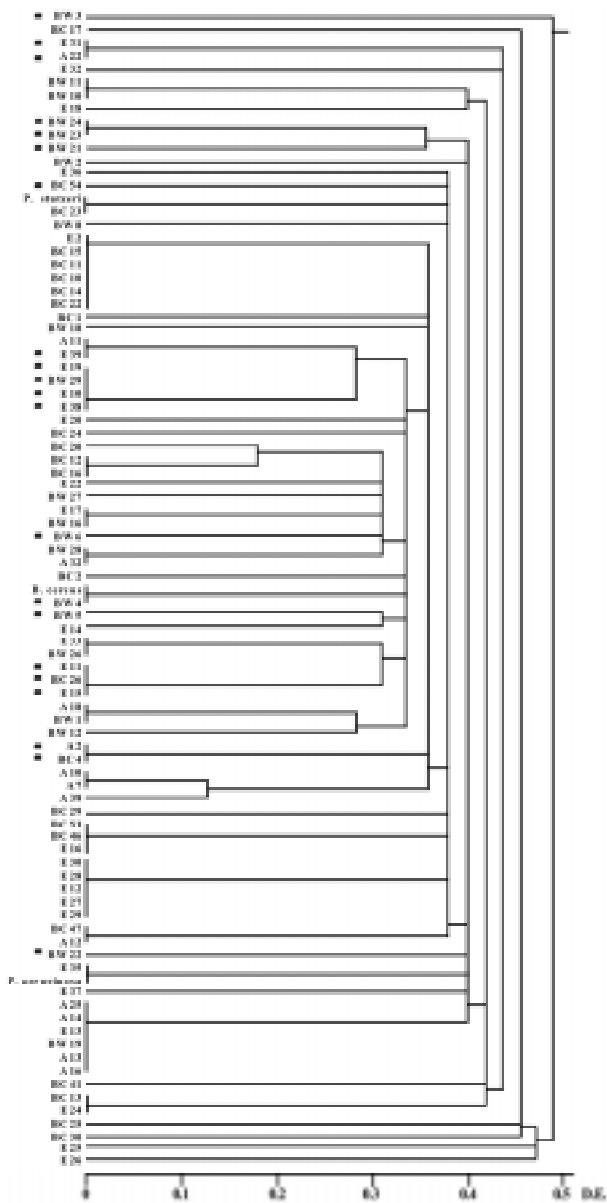
Los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* han sido ampliamente asociados a la degradación de hidrocarburos. El género *Bacillus* pertenece a la subdivisión *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* de los Firmicutes, la que ha sido asociada a degradación de hidrocarburos por Dojka *et al.* (5), Ficker *et al.* (6), Greene *et al.* (7) y Röling *et al.* (16) al aislarlos o utilizarlos en ambientes contaminados por hidrocarburos. El género *Pseudomonas* pertenece a la subdivisión  $\gamma$  de las Proteobacterias. Las cuatro subdivisiones de las Proteobacterias ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ ) han sido frecuentemente asociadas a la degradación de hidrocarburos del petróleo por tener entre sus miembros a especies aisladas de ambientes contaminados con hidrocarburos o de sistemas usados en la recuperación de éstos (5, 7, 9, 16, 21). Algunas de estas especies, como *Pseudomonas putida*, son usadas para estudios de metabolismo de hidrocarburos (23).



**Figura 4.** BOX-PCR del genoma de nueve cepas con crecimiento en medio mínimo suplementado con nafta como única fuente de carbono. La calle M corresponde al marcador pGEM. (Cortado con *HaeIII*).

Los diferentes genotipos de BOX-PCR fueron posteriormente caracterizados por el método de identificación bacteriana Biolog®, el que mostró que las 52 poblaciones no están metabólicamente relacionadas. El 70% de las cepas gram-negativas (Figura 6) y el 75% de las gram-positivas (Figura 7) no pudieron ser identificadas por este método.

El sistema Biolog® permite la identificación de poblaciones bacterianas sobre la base de sus perfiles de utilización de fuentes de carbono y su comparación con una base de datos. El bajo porcentaje de identificación (70% para gram-negativas y 75% para gram-positivas) de este sistema con los aislamientos del BCAR puede deberse a



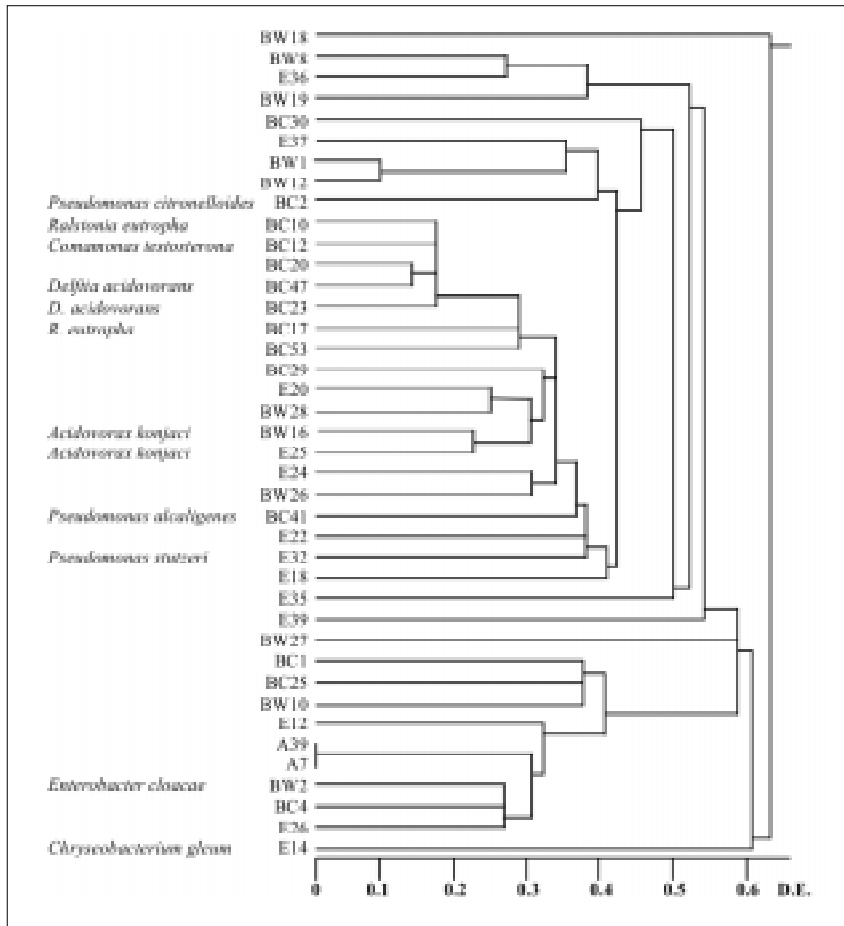
**Figura 5.** Análisis de grupo de los patrones de BOX-PCR de las cepas degradadoras de hidrocarburos aisladas del biorreactor. (■) gram-positivas. D.E.: distancia euclidiana.

que la base de datos aún no cuenta con información para ellas. En el grupo de las gram-negativas, Biolog® identificó 11 cultivos como pertenecientes a 9 especies de 8 géneros diferentes; BC47 y BC23 fueron identificados como la misma especie, al igual que lo fueron BW16 y E35; pero éstas fueron mantenidas como entidades diferentes, lo que implicaría que aun siendo de la misma especie son cepas con diferente capacidad metabólica. Además, el resultado de BOX-PCR establece que estas cepas poseen genotipos diferentes.

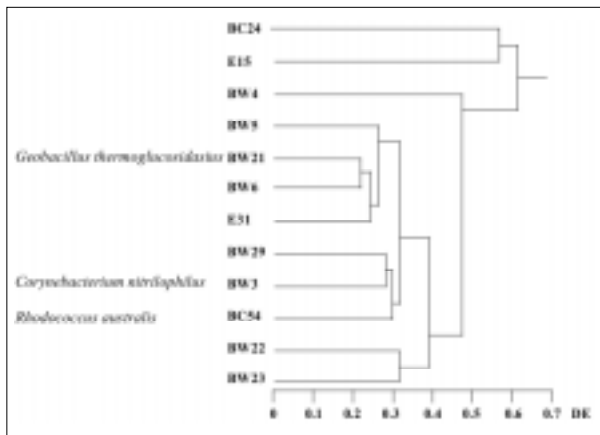
En la Figura 6, las cepas comprendidas entre BC10 y BW26 pertenecerían a la subdivisión  $\beta$  de las Proteobacterias, la cual incluye a los cuatro géneros bacterianos identificados en este grupo del dendrograma. Otro grupo de Proteobacterias presente es la subdivisión  $\gamma$ , a la que pertenecen los géneros *Pseudomonas* y *Enterobacter*, también identificados por este sistema. La cepa E14 fue identificada como la especie *Chryseobacterium gleum*, que pertenece a la división *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* de las bacterias verdes sulfurosas; bacterias que Dojka *et al.* (5) identificaron como miembros de la comunidad bacteriana presente en un acuífero contaminado con solventes hidrocarbonados y clorados y, por ende, con probable capacidad degradadora de estos contaminantes.

En el grupo de los gram-positivos el sistema Biolog® identificó a tres de las 12 cepas (Figura 7) como pertenecientes a las especies *Corynebacterium nitrilophilus* (BW3) *Geobacillus thermoglucosidasius* (BW21) y *Rhodococcus australis* (BC54). Los géneros *Corynebacterium* y *Rhodococcus* pertenecen a la familia *Corynebacteriaceae*, que incluye bacilos gram-positivos (Firmicutes) con una morfología irregular y un alto contenido de GC en su ADN (15). Poblaciones de esta familia han sido frecuentemente aisladas de ambientes así como de unidades de tratamiento de agua contaminados con hidrocarburos (5, 7, 16). Asimismo, Strauss *et al.* (19) comunicaron el aislamiento de *C. nitrilophilus* a partir de una biopelícula formada en un biofiltro de compost de pino usado para remover tolueno de agua contaminada.

*Geobacillus thermoglucosidasius* es descrito como un bacilo termófilo que crece entre 37 y 75 °C, aerobio o anaerobio facultativo, de distribución ubicua, que tiene al suelo por hábitat (24) y que no ha sido relacionado con ambientes contaminados con hidrocarburos de manera particular. Otras especies del mismo género y muy relacionadas genéticamente con esta especie han sido aisladas por Nazina *et al.* (13) a partir del agua de campos petrolíferos de Rusia, Kazakhstan y China, y por Poli *et al.* (14) a partir de compost, y han sido tipificadas como bacterias degradadoras de hidrocarburos del petróleo que soportan altas temperaturas y que por su metabolismo oxidativo generan grandes daños corrosivos a los tanques de almacenaje. Por lo tanto, la cepa BW21 podría ser una especie del género *Geobacillus* diferente de la



**Figura 6.** Dendrograma de cepas gram-negativas con crecimiento en nafta, basado en Biolog® GN. D.E.: distancia euclidiana.



**Figura 7.** Dendrograma de cepas gram-positivas con crecimiento en nafta, basado en Biolog® GP. DE: distancia euclidiana.

indicada por Biolog® y muy relacionada con las informadas por Nazina *et al.* (13) y Poli *et al.* (14).

La identificación a través del sistema Biolog® y la tipificación genética mediante ARDRA y BOX-PCR han

definido a la comunidad bacteriana del biorreactor como una comunidad degradadora de nafta muy diversa desde el punto de vista fisiológico y genético (de hecho, de ella se aislaron 50 genotipos BOX-PCR con primer AR1 degradadores de nafta), con especies de por lo menos tres divisiones bacterianas (*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, Proteobacteria y Firmicutes); con predominio de Proteobacterias y una fuerte presencia de Firmicutes.

El alto nivel de diversidad microbiana observada en el reactor parece ser importante para la operación estable y eficiente del sistema. Un mejor entendimiento del comportamiento biótico permite mejorar y optimizar estas unidades de tratamiento.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Bacheon DS, Araujo R, Molina M, Hodson RE. Microbial community dynamics and evaluation of bioremediation strategies in oil-impacted salt marsh sediment microcosms. *J Ind Microbiol Biotech* 2001; 27: 72-9.
2. Coates JD, Ellis DJ, Blunt-Harris EL, Gaw CV, Roden EE, Lovley DR. Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 1504-9.



3. Chapelle FH. Ground-water microbiology and geochemistry. Wiley, New York, 1993, p. 264-94.
4. Daifullah AAM, Girgis BS. Impact of surface characteristics of activated carbon on adsorption of BTEX. Colloids and surfaces A: Physicochem Eng Aspects 2002; 214: 181-93.
5. Dojka MA, Hugenholtz P, Haack SK, Pace NR. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 3869-77.
6. Ficker M, Krastel K, Orlicky S, Edwards E. Molecular characterization of a toluene-degrading methanogenic consortium. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 5576-85.
7. Greene EA, Kay JG, Jaber K, Stehmeier LJ, Voordouw G. Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. Appl Environ Microbiol 2000; 66: 5282-9.
8. Harendranath CS, Anuja K, Singh A, Gunaseelan A, Satish K, Lala K. Immobilization in fixed film reactors: An ultrastructural approach. Water Sci Technol 1996; 33: 7-15.
9. Macnaughton SJ, Stephen JR, Venosa AD, Davis GA, Chang Y-J, White DC. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 3566-74.
10. Massol-Deyá A, Whallon J, Hickey RF, Tiedje JM. Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. Appl Environ Microbiol 1995; 61: 769-77.
11. Massol-Deyá A, Weller R, Rios-Hernández L, Zhou JZ, Hickey RF, Tiedje JM. Succession and convergence of biofilm communities in fixed-film reactors treating aromatic hydrocarbons in groundwater. Appl Environ Microbiol 1997; 63: 270-6.
12. Miteva V, Selenska-Pobell S, Mitev V. Random and repetitive primer amplified polymorphic DNA analysis of *Bacillus sphaericus*. J Appl Microbiol 1999; 86: 928-36.
13. Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova AE, et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen.nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermo-catenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51: 433-46.
14. Poli A, Romano I, Caliendo G, Nicolaus G, Orlando P, Falco A, et al. *Geobacillus teobii* subsp.decanicus, subso.nov; a hydrocarbon-degrading heavy metal resistant bacterium from host compost. J Gen Appl Microbiol 2006; 52: 223-34.
15. Rodríguez CM. Diversity of aerobic toluene-degrading bacteria from tropical soils. Tesis para el grado de Master of Science, 1998; Recinto Universitario de Mayagüez, Universidad de Puerto Rico.
16. Roling WFM, van Breukelen MB, Braster M, Lin B, van Verseveld HW. Relationship between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 4619-29.
17. Seurink S, Verstraete W, Siciliano SD. Use of 16S-23S rRNA intergenic spacer region PCR and repetitive extragenic palindromic PCR analysis of *Escherichia coli* isolates to identify nonpoint fecal sources. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 4942-50.
18. Stackenbrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Bact 1994; 44: 846-9.
19. Strauss JM, Pleiss CA, Riedel KHJ. Empirical model for biofiltration of toluene. J Environ Engin 2000; 126: 644-8.
20. Tsao CW, Song HG, Bartha R. Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 4924-9.
21. Watanabe K, Kodama Y, Sytutsubo K, Harayama S. Molecular characterization of bacterial population in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. Appl Environ Microbiol 2000; 66: 4803-9.
22. Whiteley AS, Bailey MJ. Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. Appl Environ Microbiol 2000; 66: 2400-7.
23. Yu H, Kim BJ, Rittmann BE. The roles of intermediates in biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene by *Pseudomonas putida* F1. Biodegradation 2001; 12: 455-63.
24. Zeigler DR. The genus *Geobacillus*. *Bacillus* Genetic Stock Center: Catalog of Strains; 7<sup>ma</sup> ed. Vol. 3, 2001. Columbus, Ohio 43210, USA.