

# INCORPORACIÓN DE ALCANOS POR BACTERIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS MEDIADA POR UNA PROTEÍNA DE 70 KDa UNIDA A MEMBRANAS DURANTE LA BIODEGRADACIÓN DE COMBUSTIBLE DIESEL

José Díaz, Cristina Ricoy, Carlos Moreno, Valeria Ricoy, Víctor Pérez y Oscar Valbuena

## RESUMEN

La contaminación de aguas superficiales y suelos por hidrocarburos es consecuencia del incremento de la demanda de petróleo y sus derivados como fuentes energéticas. La remediación de estos hábitats puede efectuarse por bacterias autóctonas, proceso que requiere el paso de las moléculas hidrocarbonadas a través de la membrana celular. En este estudio se reporta que la degradación de combustible diesel (CD) por *Pseudomonas luteola* PB6 y *Escherichia coli* DH5aT, cultivadas en un medio mínimo mineral suplementado con CD 1% v/v (MMDM), depende de una proteína de 70kDa (p70) asociada a membranas. *E. coli* DH5a no creció en este medio. Datos gravimétricos indicaron una degradación promedio del CD de ~29% en incubaciones de 120h. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas reveló que la degradación fue selectiva para al menos los 20 alcanos más abundantes presentes en CD, alcanzándose valores de 87-89% luego de 96h de incubación. *P. luteola* PB6, *E. coli* DH5aT y *E. coli* DH5a, en caldo nutritivo, no expresaron p70. No obstante, lisados de *P. luteola* PB6 y *E. coli* DH5a, degradaron CD en un grado similar a como lo hicieron cultivos de *P. luteola* y *E. coli* DH5aT. Estos datos indican la intervención de p70 en el transporte de alcanos en la membrana bacteriana externa. Más aun, la incapacidad de *E. coli* DH5a para crecer en MMDM es debida a la ausencia de p70 en la célula y no a la ausencia de las enzimas implicadas en el metabolismo de alcanos.

La contaminación de aguas superficiales y suelos por hidrocarburos es consecuencia del incremento de la demanda de petróleo y sus derivados como fuentes energéticas. La remediación de estos hábitats puede efectuarse por bacterias autóctonas, proceso que requiere el paso de las moléculas hidrocarbonadas a través de la membrana celular. En este estudio se reporta que la degradación de combustible diesel (CD) por *Pseudomonas luteola* PB6 y *Escherichia coli* DH5aT, cultivadas en un medio mínimo mineral suplementado con CD 1% v/v (MMDM), depende de una proteína de 70kDa (p70) asociada a membranas. *E. coli* DH5a no creció en este medio. Datos gravimétricos indicaron una degradación promedio del CD de ~29% en incubaciones de 120h. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas reveló que la degradación fue selectiva para al menos los 20 alcanos más abundantes presentes en CD, alcanzándose valores de 87-89% luego de 96h de incubación. *P. luteola* PB6, *E. coli* DH5aT y *E. coli* DH5a, en caldo nutritivo, no expresaron p70. No obstante, lisados de *P. luteola* PB6 y *E. coli* DH5a, degradaron CD en un grado similar a como lo hicieron cultivos de *P. luteola* y *E. coli* DH5aT. Estos datos indican la intervención de p70 en el transporte de alcanos en la membrana bacteriana externa. Más aun, la incapacidad de *E. coli* DH5a para crecer en MMDM es debida a la ausencia de p70 en la célula y no a la ausencia de las enzimas implicadas en el metabolismo de alcanos.

## Introducción

La explotación y refinación de petróleo, como la producción de plásticos y polímeros usualmente contamina ambientes naturales (Kanaly y Harayama, 2000; Harayama *et al.*, 2004; Hearn *et al.*, 2008). Tal contaminación es persistente y se bioacumula en hábitats naturales (Korda *et al.*, 1997; Aitken *et al.*, 1998; Saadoun, 2002; Alquati *et al.*, 2005; Mancera-López *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009). Afortunadamente, varios microorganismos autóctonos capaces de degradar hidrocarburos han sido aislados y caracterizados de ambientes acuáticos (Das y Chandran, 2011), marinos (Head *et al.*, 2006; Chikere *et al.*, 2009) y terrestres (Leahy y Colwell, 1990;

Palittapongarnpim *et al.*, 1998). Mediante estos procesos los microorganismos, además de satisfacer sus requerimientos metabólicos, pueden actuar como agentes biorremediadores en hábitats contaminados (Sanseverino *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 2008).

Cualquier molécula o ión a ser utilizado por los microorganismos debe ser incorporado al medio intracelular, proceso que implica una interacción física de la membrana bacteriana y el material a ser metabolizado (Nikaido, 2003; Hearn *et al.*, 2008, 2009). En bacterias Gram negativas se han descrito dos sistemas membranosos: la membrana plasmática, que delimita el citoplasma bacteriano, y la membrana externa, en contacto con el medio externo. El espacio entre ambas membranas,

que contiene agua, proteínas, carbohidratos, lípidos e iones, es denominado espacio periplásmico (Koch, 1997; Black, 2004).

La incorporación de material exógeno por bacterias es mediada por transportadores proteicos localizados en la membrana externa; el paso de moléculas hidrofílicas al espacio periplásmico es efectuado por porinas (Black, 2004; Shulties *et al.*, 2006; Darcan *et al.*, 2009; Hearn *et al.*, 2009), mientras que proteínas especializadas, canales proteicos, permiten el transporte de materiales hidrofóbicos (Van den Berg, 2010; Lepore *et al.*, 2011). Posteriormente, proteínas periplásmicas específicas transfieren las moléculas a proteínas unidas a la membrana plasmática, para finalmente liberar el material en el citoplasma bacteriano

(Koch, 1997), donde sistemas enzimáticos degradan o utilizan el material incorporado (Black, 2004; Wentzel *et al.*, 2007; Rojo, 2009).

Varios estudios han demostrado que proteínas FadL están implicadas en el transporte de moléculas hidrofóbicas por bacterias Gram negativas. La participación de estas proteínas unidas a membranas ha sido reportada en el transporte de benceno, tolueno, etilbenceno, xileno (BTEX) y ácidos grasos de cadena larga por cepas de *Pseudomonas*, *Ralstonia picketti* PKO1 y *Escherichia coli* (Ginsburg *et al.*, 1984; Black *et al.*, 1985; Kahng *et al.*, 2000; Shulties *et al.*, 2006; Hearn *et al.*, 2008, 2009).

Experimentos previos de nuestro laboratorio demostraron que *E. coli* DH5a, trans-

**PALABRAS CLAVE / Alcanos / Biodegradación / Combustible Diesel / *E. coli* DH5aT / *P. luteola* PB6 / Transporte de Alcanos /**

Recibido: 24/09/2012. Modificado: 12/06/2013. Aceptado: 14/06/2013.

**José Díaz.** Licenciado en Biología, Universidad de Carabobo (UC), Venezuela.

**Cristina Ricoy.** Licenciada en Biología, UC, Venezuela.

**Carlos Moreno.** Licenciado en Biología, UC, Venezuela. Pro-

fesor Dpto. de Biología FACYT, y Unidad de Biotecnología Aplicada (UBA) Universidad de Carabobo.

**Valeria Ricoy.** Licenciada en Biología, UC, Venezuela.

**Víctor Pérez.** Licenciado en Química, UC, Venezuela.

**Oscar Valbuena.** Licenciado en Biología, Universidad Central de Venezuela. Ph.D. University of Pennsylvania, EEUU. Profesor, UC, Venezuela. Dirección:

Departamento de Biología y Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas (CIMA), Universidad de Carabobo, Venezuela. e-mail: ovalbuena@uc.edu.ve

# ALKANE INCORPORATION BY HYDROCARBON DEGRADATING BACTERIA MEDIATED BY A 70kDa PROTEIN ATTACHED TO MEMBRANES DURING THE FUEL DIESEL BIODEGRADATION

José Díaz, Cristina Ricoy, Carlos Moreno, Valeria Ricoy, Víctor Pérez e Oscar Valbuena

## SUMMARY

The hydrocarbon contamination of surface waters and land is the consequence of an increased demand of petroleum and its derivatives as sources of energy. Remediation of these contaminated habitats can be achieved by indigenous microorganisms, a process requiring passage of hydrocarbon molecules across the cellular membrane. In this work the degradation of diesel fuel by a *Pseudomonas luteola* PB6 strain and a transformed *Escherichia coli* DH5aT, when cultured in a mineral medium supplemented with 1% v/v DF (MMDM), depended on a 70kDa polypeptide (p70) associated to membranes. The *E. coli* DH5a non transformed strain did not grow in this medium. Gravimetric data indicated a DF average degradation of ~29% after 120h incubation. Gas chromatography coupled

with mass spectrometry revealed that the degradation was selective for at least the 20 more abundant alkanes present in DF, reaching 87-89% levels, after 96h bacterial treatment. *P. luteola* PB6, *E. coli* DH5aT and *E. coli* DH5a, when grown in nutritive broth, did not express p70. However, when bacterial lysates from *P. luteola* PB6 and *E. coli* DH5a were incubated in MMDM, DF was degraded to the same degree as *P. luteola* PB6 and *E. coli* DH5aT cells did it. These data support the involvement of p70 in the transport of alkanes across the bacterial outer membrane. Moreover, the *E. coli* DH5a inability for growing in MMDM is due to the absence of p70 in this bacterial strain, but not to the absence of the intracellular enzymes involved in the metabolism of alkanes.

# INCORPORAÇÃO DE ALCANOS POR BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBONETOS MEDIADA POR UMA PROTEÍNA DE 70kDa UNIDA A MEMBRANAS DURANTE A BIODEGRADAÇÃO O COMBUSTÍVEL DIESEL

José Díaz, Cristina Ricoy, Carlos Moreno, Valeria Ricoy, Víctor Pérez e Oscar Valbuena

## RESUMO

A contaminação, por hidrocarbonetos, de águas superficiais e solos é consequência do incremento da demanda de petróleo e seus derivados como fontes energéticas. A remediação destes habitats pode efetuar-se por bactérias autóctones, processo que requer a passagem das moléculas hidrocarbonadas a través da membrana celular. Neste estudo se relata que a degradação de combustível diesel (CD) por *Pseudomonas luteola* PB6 e *Escherichia coli* DH5aT, cultivadas em um meio mínimo mineral suplementado com CD 1% v/v (MMDM), depende de uma proteína de 70kDa (p70) associada a membranas. *E. coli* DH5a não cresceu neste meio. Dados gravimétricos indicaram uma degradação do CD de ~29% em média nas incubações de 120h. A cromatografia de gases acoplada a espectrometria de

massas revelou que a degradação foi seletiva para pelo menos os 20 alcanos mais abundantes presentes em CD, alcançando-se valores de 87-89% depois de 96h de incubação. *P. luteola* PB6, *E. coli* DH5aT e *E. coli* DH5a, em caldo nutritivo, não expressaram p70. No entanto, lisados de *P. luteola* PB6 e *E. coli* DH5a, degradaram CD em um grau similar ao realizado por cultivos de *P. luteola* e *E. coli* DH5aT. Estes dados indicam a intervenção de p70 no transporte de alcanos na membrana bacteriana externa. Mais ainda, a incapacidade de *E. coli* DH5a para crescer em MMDM é devida à ausência de p70 na célula e não à ausência das enzimas implicadas no metabolismo de alcanos.

formada por un plásmido de 11kpb aislado de *P. luteola* PB6, creció en un medio mínimo mineral suplementado con combustible diesel (CD) 1% v/v (MMDM). El perfil polipeptídico de la cepa transformada (*E. coli* DH5aT) y de la no transformada (*E. coli* DH5a) difirieron básicamente por la presencia de un polipéptido de 70kDa en la cepa transformada y su ausencia en la no transformada (Ricoy, 2011).

El objetivo de este trabajo fue elucidar la función de la proteína p70 en el proceso de biodegradación del combustible diesel. A tal efecto, mediante patrones polipeptídicos de frac-

ciones subcelulares bacterianas y análisis de los hidrocarburos presentes en el combustible por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, se propone el mecanismo de acción de p70 expresada por *P. luteola* durante la biodegradación del CD.

## Materiales y Métodos:

### Cepas bacterianas

*Pseudomonas luteola* PB6, cepa Gram negativa aislada de suelos contaminados con petróleo provenientes de Bachaquero, estado Zulia, Venezuela (Boulé, 2008); *Escherichia coli*

DH5aT, cepa Gram negativa, transformada con un plásmido aislado de *P. luteola* PB6 (Ricoy, 2011) y *Escherichia coli* DH5a, cepa Gram negativa (Hanahan, 1983), fueron donadas por el Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Venezuela.

### Cultivos bacterianos

*I- Etapa de Activación.* Inóculos (asadas) de cada cepa bacteriana fueron transferidos de cuñas de agar a 50ml de caldo nutritivo (CN) conteniendo 5g·l<sup>-1</sup> de peptona, 3g·l<sup>-1</sup> de extracto de carne y 8g·l<sup>-1</sup> de

NaCl. Los sistemas fueron incubados a 37°C en aerobiosis y agitación constante (165rpm) durante 24h.

*II- Etapa de aclimatación.* Alícuotas (1ml) de los cultivos anteriores fueron adicionadas a 50ml de CN o MMDM, el último conteniendo las siguientes sustancias: CaCl<sub>2</sub> 1% m/v (500µl); CuSO<sub>4</sub> 1% m/v (100µl); FeSO<sub>4</sub> 0,5% m/v (2000µl); MgSO<sub>4</sub> 1% m/v (200µl); ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1% m/v (500µl); NaCl 1% m/v (500µl); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% m/v (100µl); 10 ml de CD (equivalentes a 0,5ml o 0,33g de CD por cada 50ml de medio) y el volumen necesari-

rio de tampón fosfato 0,1M, pH 7,4 para completar un litro. Los dos sistemas se incubaron a 32°C, en aerobiosis y agitación constante (165rpm).

**III etapa de evaluación.** Alícuotas de 1ml de los cultivos bacterianos aclimatados se inocularon en 50ml de CN y MMDM: Estos sistemas fueron incubados y agitados bajo las condiciones antes descritas. El crecimiento bacteriano fue seguido por mediciones espectrofotométricas a 540nm, cada 8h durante dos días o cada 24h durante cinco días para los cultivos en CN y MMDM, respectivamente.

#### Crecimiento bacteriano en placas de agar

Alícuotas de cultivos CN fueron diluidos (1:10) con agua destilada estéril y 0,5ml de estas diluciones se extendieron sobre placas de agar (23g·l<sup>-1</sup>)/CN. Después de 24-48h de incubación a 37°C, las colonias bacterianas fueron observadas en microscopio estereoscópico.

#### Preparación de fracciones bacteriales

Volúmenes (12,5ml) de cultivos bacterianos CN y MMDM se adicionaron a un volumen igual del respectivo medio de cultivo. Luego de 24h de incubación a 32°C, las células se obtuvieron por centrifugación a 20000g durante 15min. Una porción del sedimento bacteriano (BC) y el sobrenadante (CM) se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso. Otra porción del sedimento bacteriano se sometió a lisis de acuerdo al siguiente procedimiento (Sambrook y Russell, 2001): las células se resuspendieron en tampón de lisis (NaCl 500mM, Tris/HCl 20mM, 2-mercaptoetanol 1mM, imidazol 5mM, tritón X-100 0,1% m/v y EDTA 100mM, pH 8) y después de 10min en reposo, a temperatura ambiente, se aplicaron tres ciclos de sonicación de 45s de duración cada uno, seguidos por 10s en reposo

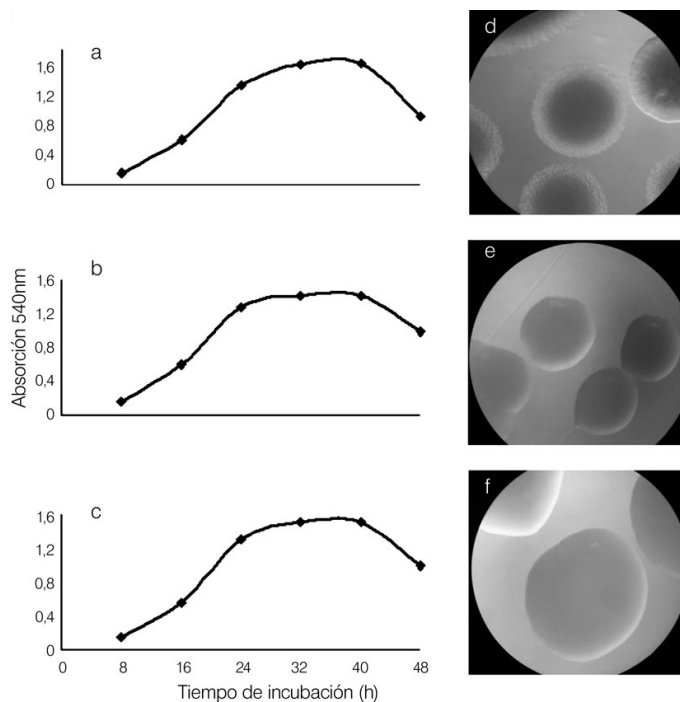


Figura 1. Curvas de crecimiento y morfologías de las colonias bacterianas cultivadas en CN. a y d: *Pseudomonas luteola* PB6; b y e: *Escherichia coli* DH 5αT; c y f: *Escherichia coli* DH 5α.

sobre hielo, empleando un sonicador (*Ultrasonic Cell Disrupter*, VirSonic 100). Las muestras se centrifugaron a 47000g durante 15min a 4°C, obteniéndose dos fracciones, los sobrenadantes (contenido citoplasmático; CC) y los precipitados (membranas; BM), que fueron almacenados a -20°C.

#### Patrones polipeptídicos

Las fracciones obtenidas anteriormente (CC y BM), se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 7,5% en condiciones desnaturizantes (Laemmli, 1970). La electroforesis se realizó a 100V, a temperatura ambiente, durante 60-90min en un equipo Bio Rad Mini Protean II.

#### Determinación del consumo de CD por las bacterias

Cultivos bacterianos (50ml) en MMDM fueron incubados durante 24,

48, 72, 96 y 120h en las condiciones establecidas en la sección sobre cultivos bacterianos. Los cultivos se mezclaron con 10ml de hexano, se agitaron vigorosamente durante 5min en embudos de separación, y después de 10min en reposo, las fases acuosas se sometieron a otro paso de extracción. Las fases orgánicas se mezclaron y se evaporaron a 80°C en vasos de precipitados previamente tarados. El CD se determinó por gravimetría y el residuo se disolvió en hexano. También se procesaron cultivos bacterianos a tiempo cero.

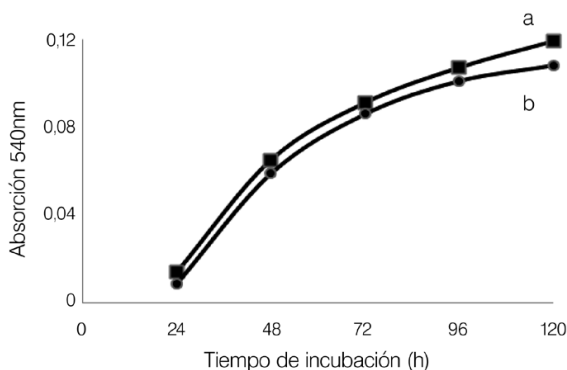


Figura 2. Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas cultivadas en MMDM. a: *Pseudomonas luteola* PB6; b: *Escherichia coli* DH5αT.

#### Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)

Los extractos en hexano provenientes de cultivos bacterianos a t=0 y 96h de tratamiento bacteriano se analizaron de acuerdo al método ASTM 2425, en un equipo Agilent Technologies (cromatógrafo 6890N/espectrómetro 5973) con un detector FID y una columna HP5MS (dimetilo 95%, bifenilo polixiloxano 5%) de 30m de longitud, 0,25mm de diámetro interno y 0,25µm de espesor de capa, utilizándose He como gas de arrastre con flujo de 1ml·min<sup>-1</sup>. Las temperaturas iniciales y finales del horno fueron 50 y 240°C, respectivamente, y la corrida se efectuó durante 30min. Alícuotas de 1µl de extractos orgánicos provenientes de cultivos bacterianos, hexano y CD puro fueron analizadas. La estimación cuantitativa de alcanos se realizó mediante el programa NIST (*National Institute of Standards and Technology*).

#### Resultados

Los patrones de crecimiento y la morfología de las cepas bacterianas en CN se muestran en la Figura 1. El crecimiento bacteriano alcanzó valores similares y máximos (1,4-1,6 unidades de absorbancia; ua) a las 24h de incubación (Figuras 1a, b, c), entrando a la fase estacionaria a las 32h de incubación y alcanzando la fase de muerte a las 48h.

Las Figuras 1d, e y f muestran que las colonias bacterianas, observadas con un microscopio de luz (40×), tienen similar morfología. Sin embargo, cuando las cepas se transfirieron a medio MMDM, *E. coli* DH5α no creció, mientras que *P. luteola* PB6 y *E. coli* DH5αT sí crecieron, exhibiendo una fase de laten-

TABLA I  
CONSUMO DE COMBUSTIBLE DIESEL POR  
CEPAS BACTERIANAS

Tiempo de incubación (h)	0	24	48	72	96	120
Cepas	Combustible diesel consumido (g)					
<i>P. luteola</i> PB6	0	0,027	0,039	0,062	0,079	0,092 (27,9)*
<i>E. coli</i> DH5αT	0	0,029	0,038	0,057	0,075	0,088 (26,7)*
<i>E. coli</i> DH5α	0	0	0	0	0	0

\* Números en paréntesis indican el porcentaje de combustible diesel consumido.

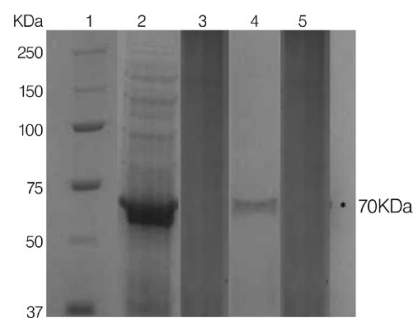


Figura 3. Patrones polipeptídicos de las cepas bacterianas cultivadas en MMDM y su respectivo medio de cultivo. 1: marcador de peso molecular; 2 y 3: *Pseudomonas luteola* PB6 y su medio de cultivo libre de células, respectivamente; 4 y 5: *Escherichia coli* DH5αT y su medio de cultivo libre de células, respectivamente.

cia de 24h, seguida de una fase de crecimiento exponencial de 24-120h, sin establecerse la fase de muerte (Figura 2). El máximo crecimiento alcanzó valores de 0,1 ua, lo cual fue mucho más bajo que los niveles obtenidos en cultivos CN.

El consumo de CD por las bacterias en MMDM se muestra en la Tabla I. Un incremento progresivo de la degradación de CD fue detectado en las incubaciones de *P. luteola* PB6 y *E. coli* DH5αT, consumiéndose 0,092 y 0,088g de CD a las 120h de incubación, respectivamente, indicando que el 27,9 y 26,7% m/m del CD inicialmente presente fue metabolizado por las bacterias. Como se indicó previamente, *E. coli* DH5α no consumió CD.

Los patrones polipeptídicos electroforéticos de las fracciones BC (células) y

CM (medio de cultivo usado por las bacterias) cuando *P. luteola* PB6 y *E. coli* DH5αT crecieron en MMDM, se muestran en la Figura 3. Las fracciones CM no mostraron polipéptidos, mientras en las BC fueron detectados varios polipéptidos, entre ellos uno correspondiente a 70kDa. Este polipéptido también fue detectado en las fracciones BM (membranas) de ambas cepas bacterianas (Figura 4), pero estuvo ausente en las fracciones CC (citoplasma).

Cuando las tres cepas bacterianas, *P. luteola* PB6, *E. coli* DH5αT y *E. coli* DH5α fueron cultivadas en CN, p70 no fue detectado en las fracciones MB (Figura 5) ni en CC (datos no mostrados).

La determinación del tipo de hidrocarburo degradado por las bacterias se realizó en extractos orgánicos

(hexano) obtenidos de incubaciones bacterianas en MMDM, mediante CG/EM. En los cromatogramas obtenidos (datos no mostrados) se detectaron al menos 20 máximos correspondientes a alcanos los cuales después del tratamiento bacteriano disminuyeron. En la Tabla II se detallan los alcanos detectados y su abundancia, en CD puro y después del tratamiento bacteriano. Por inspección de la

tabla, tres diferentes situaciones se pueden establecer entre los alcanos degradados: 1) un primer grupo de alcanos totalmente degradados por ambas cepas bacterianas (nonadecano, 3,6-dimetildecano, heptadecano, 6-propiltridecano, 9-octilheptadecano, nonacosano y 3-oxa-6-tio-2,7-dis-

lactano); 2) un segundo grupo, totalmente degradado por una cepa bacteriana y parcialmente degradado por la otra cepa (undecano, dodecano, 2, 6, 10, 14-tetrametilhexadecano y heptacosano); y 3) un tercer grupo, parcialmente degradado por ambas cepas bacterianas (tridecano, 2, 6, 10-trimetildodecano, tetradecano, pentadecano, hexadecano, heptadecano y 2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano). Los niveles de remoción de alcanos después del tratamiento bacteriano variaron entre 77,79 y 100% (promedio 89,0%) y entre 63,42 y 100% (promedio 86,8%) para los sistemas con *P. luteola* PB6 y *E. coli*

DSH5αT, respectivamente. Los valores indicaron que el CD fue degradado a nivel de 87-89% por las bacterias. Finalmente, cuando lisados preparados de *P. luteola* PB6 (crecida en MMDM) y *E. coli* DH5α (crecida en CN) fueron incubados en MMDM, el CD fue degradado a niveles del 33% (*P. luteola*) y 28,8% (*E. coli* DH5α), valores similares a como lo hicieron *P. luteola* PB6 y *E. coli* DH5αT en MMDM.

## Discusión

Las curvas de crecimiento de las tres cepas bacterianas en CN mostraron comportamientos similares, alcanzando valores máximos a las 24h de incubación (Figuras 1a, b y c), lo cual implica que la incorporación del plásmido de *P. luteola* PB6 a *E. coli* DH5α aparentemente no afectó las propiedades metabólicas básicas de la bacteria. La morfología de las colonias (Figuras 1d, e y f) corroboran esta situación. Cuando las bacterias fueron transferidas a MMDM, *E. coli* DH5α no creció y aunque *P. luteola* PB6 y *E. coli* DH5αT cre-

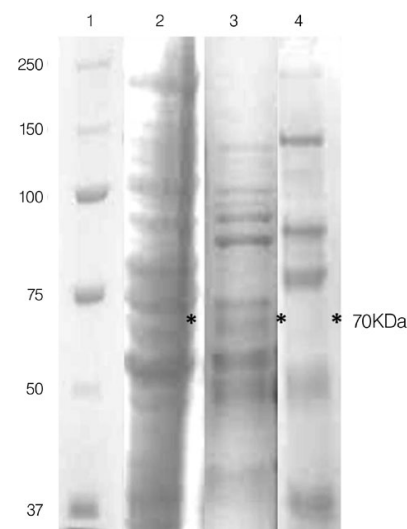


Figura 5. Patrones polipeptídicos de las fracciones membranas de bacterias cultivadas en CN. 1: marcador de peso molecular, 2: *Pseudomonas luteola* PB6, 3: *Escherichia coli* DH5αT, 4: *Escherichia coli* DH5α.

TABLA II  
COMPONENTES HIDROCARBONADOS DEL COMBUSTIBLE DIESEL ANTES  
Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO BACTERIANO

Tiempo de retención (min)	Hidrocarburos	Combustible diesel puro	Área	
			<i>P. luteola</i> /MMDM *	<i>E. coli</i> DH5aT/MMDM *
8,05	Undecano	1347450	152493 (88,68)	0 (100)
9,99	Dodecano	1821353	267095 (85,34)	0 (100)
11,80	Tridecano	2916254	369046 (87,35)	515805 (82,31)
13,11	2,6,10-Trimetil dodecano	1023309	223530 (78,16)	287498 (71,91)
13,50	Tetradecano	3481468	5678628 (83,69)	807951 (76,79)
14,49	Nonadecano	2112657	0 (100)	0 (100)
15,08	Pentadecano	4120048	914957 (77,79)	1507298 (63,42)
16,58	Hexadecano	4236807	807526 (80,94)	1315928 (68,94)
17,28	3,6-Dimetildecano	1748013	0 (100)	0 (100)
17,99	Heptadecano	4152672	859850 (79,29)	1329756 (67,98)
18,07	2,6,10,14-Tetrametilpentadecano	3050885	640926 (78,99)	959987 (68,53)
19,34	Heptadecano	3612957	0 (100)	0 (100)
19,46	2,6,10,14-Tetrametilhexadecano	2319393	0 (100)	719142 (68,99)
20,61	6-Propiltridecano	3012094	0 (100)	0 (100)
21,83	Pentadecano	2586812	533877 (79,36)	882413 (65,89)
22,99	Heptacosano	2199294	438675 (80,05)	0 (100)
24,11	Heptacosano	1642426	324721 (80,23)	0 (100)
25,26	9-Octilheptadecano	1128324	0 (100)	0 (100)
26,65	Nonacosano	749631	0 (100)	0 (100)
30,31	3-Oxa-6-tio-2,7-disilactano	4230745	0 (100)	0 (100)

\* Números en paréntesis indican el porcentaje de remoción del componente después de 96 horas de tratamiento bacteriano.

cieron, el crecimiento se redujo a 0,1 ua, mostrando una fase de latencia de 24h y una prolongada fase de crecimiento exponencial observada hasta 120h de cultivo. El descenso en la biomasa en MMDM respecto a las incubaciones en CN es probablemente debido al tipo de moléculas presentes en los medios de cultivo. CN contiene moléculas biodegradables, fáciles de metabolizar y comunes a todo tipo celular. Contrariamente, en MMDM, el material carbonado (hidrocarburos) está constituido por moléculas más difícilmente metabolizables, las cuales son degradadas lentamente y, como consecuencia, la división celular se deprime y la fase exponencial de crecimiento se mantiene por lapsos de tiempo más largos, pero la biomasa se reduce. Aun así, varias cepas bacterianas degradadoras de CD han sido aisladas y caracterizada por otros autores (Obire y Nwaubeta, 2001; Saadoun, 2002; López *et al.*, 2006; Singh y Lin, 2008; Adeline *et al.*, 2009; Shukor *et al.*,

2009; Yousofi-Kebra *et al.*, 2009; Olagide y Ogbeifun, 2010). El promedio de degradación de CD, cercano a 29% (Tabla I), fue más bajo que el contenido de alcanos determinado en este estudio por CG/EM (48,47%; Tabla II); sin embargo, el análisis CG/EM indicó que los alcanos fueron degradados hasta un nivel de 87-89% después de 96h de tratamiento bacteriano. Las diferencias en los patrones de degradación de CD (Tabla II) por *P. luteola* PB6 y *E. coli* DH5aT pudiesen ser explicados por los sistemas enzimáticos implicados en el proceso degradativo (Rojo, 2009). Así, es posible que algunas enzimas implicadas en el proceso, específicas para un grupo particular de alcanos, sean isoenzimas con diferentes constantes de velocidad para el paso enzimático que ellas catalizan. Esta situación podría ser relevante cuando una cepa bacteriana degrada totalmente alcanos y la otra lo hace parcialmente. La presencia de isoenzimas ha sido bien demostrada en varias vías

metabólicas en bacterias (Nelson y Cox, 2000). La degradación de alcanos por bacterias ha sido descrita en muchas instancias por otros laboratorios (Throne-Holst *et al.*, 2007; Wentzel *et al.*, 2007; Binazadeh *et al.*, 2009; Rojo, 2009; Sivaraman *et al.*, 2011).

Los perfiles polipeptídicos demostraron que p70 es expresada solamente en MMDM (Figura 5), indicando que el gen p70 responde a la presencia de CD en el medio de cultivo, lo cual implica que el polipéptido es un producto inducible, situación que ha sido descrita para otros géneros bacterianos (Kahng *et al.*, 2000; Rojo, 2009). La ausencia de p70 en MMDM, después de su uso por las bacterias, indicó que éste no es excretado al medio y que debe estar localizado en la célula. En efecto, el polipéptido fue detectado en la fracción membranosa y estuvo ausente del contenido citoplasmático bacteriano (Figuras 3 y 4).

La degradación de CD por lisados de *E. coli* DH5a in-

cubados en MMDM demostró que los sistemas enzimáticos encargados de la degradación del hidrocarburo están presentes en la célula bacteriana. Por lo tanto, la incapacidad de *E. coli* DH5a en metabolizar CD es debida a la ausencia de p70 en su membrana. Adicionalmente, experimentos previos en nuestro laboratorio evidenciaron que la cepa de *E. coli* DH5a, luego de un proceso de transformación con un plasmido proveniente de *P. luteola* (que contiene el gen que codifica para la p70), es capaz de crecer en un medio suplementado con diesel como única fuente de carbono (Ricoy *et al.*, 2012). La masa molecular aparente del polipéptido es mayor a lo reportado para proteínas transportadoras de hidrocarburos en *Pseudomonas*, *E. coli* y *Ralstonia*, la cual ha sido estimada en 46-49kDa (Black, 1991; Kasai *et al.*, 2001; Van den Berg *et al.*, 2004; Hearn *et al.*, 2008). Los datos obtenidos indican la participación de p70 en la incorporación de alcanos en las cepas estudiadas, y probablemente p70 actúa como un transportador o canal proteico inducido en estas bacterias.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Luís Medina (CIMA-UC), David Vega y José Jiménez (Departamento de Química, FACYT-UC) y a Luís Amaíz (Departamento de Biología, FACYT-UC) por sus acertadas críticas y sugerencias; a Darío Valbuena por las figuras y tablas. Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC), Venezuela (ayuda menor AM-0478-10).

#### REFERENCIAS

- Adeline SY Ting, Carol HC Tan, Aw CS (2009) Hydrocarbon degradation by isolated *Pseudomonas lundensis* UTARFP2. *Mal. J. Microbiol.* 5: 104-108.

- Aitken MD, Strigfellow WT, Nagel RD, Kagunga C, Chen SH (1998) Characterization of phenanthrene degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can. J. Microbiol.* 44: 743-752.
- Alquati C, Papachini M, Riccardi C, Spicaglia S, Bestetti G (2005) Diversity of naphthalene degrading bacteria from a petroleum contaminated soil. *Ann. Microbiol.* 55: 237-242.
- Binazadeh M, Karimi IA, Zhi L (2009) Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp Moj-3449. *Enz. Microbiol. Technol.* 45: 195-222.
- Black PN, Kianian SF, Di Russo CC, Nunn WD (1985) Long chain fatty acid transport in *Escherichia coli*. Cloning, mapping and expression of the FadL gene. *J. Biol. Chem.* 260: 1780-1785.
- Black PN (1991) Primary sequence of the *Escherichia coli* FadL gene encoding an outer protein required for long chain fatty acid transport. *J. Bacteriol.* 173: 435-442.
- Black JG (2004) *Microbiology, Principles and Explorations*. 6ª ed. Wiley, Nueva York, EEUU. pp. 82, 103, 136.
- Boulé N (2008) *Perfil Plasmídico y Características Biológicas de la Flora Bacteriana Implícada en la Degradación de Hidrocarburos Pesados del Suelo, en la Estación de PDVSA de Bachaquero, Estado Zulia, Venezuela*. Tesis. Universidad de Carabobo, Venezuela. 55 pp.
- Chikere CB, Okpokwasili GG, Ichiaker O (2009) Characterization of hydrocarbon utilizing bacteria in tropical marine sediments. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 2541-2544.
- Das N, Chandran P (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol. Res. Int.* 2011: 1-13.
- Darcan C, Özikanga R, Idil O, Flint KP (2009) Viable but not culturable state (VBNC) of *Escherichia coli* related to EnvZ under the effect of pH, starvation and osmotic stress in seawater. *Pol. J. Microbiol.* 58: 307-317.
- Ginsberg CL, Black PN, Nunn WD (1984) Transport of long chain fatty acids in *Escherichia coli*: identification of a membrane protein associated with the FadL gene. *J. Biol. Chem.* 259: 8437-8443.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Harayama S, Kasai Y, Hara A (2004) Microbial communities in oil contaminated seawater. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 205-214.
- Hearn EM, Patel DR, Van den Berg B (2008) Outer-membrane transport of aromatic hydrocarbons as a first step in biodegradation. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA.* 105: 8601-8606.
- Hearn E, Patel D, Lepore B, Indic M, Van den Berg B (2009) Transmembrane passage of hydrophobic compounds through a protein channel wall. *Nature* 182: 2059-2067.
- Head IM, Jones DM, Rösling WFM (2006) Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 163-182.
- Kahng HY, Eyrne AM, Olsen RH, Kukor JJ (2000) Characterization and role of tbox in utilization of toluene by *Ralstonia pickettii* PK01. *J. Bacteriol.* 182: 1232-1242.
- Kanaly R, Harayama S (2000) Biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182: 2059-2067.
- Kasai Y, Inoue J, Harayama S (2001) The ToL plasmid pWWG xy/N gene product from *Pseudomonas putida* is involved in m-xylene uptake. *J. Bacteriol.* 183: 6662-6666.
- Koch AL (1997) Microbial physiology and ecology of slow growth. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 61: 305-318.
- Korda A, Santas P, Tenente A, Santas R (1997) Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, *in situ* treatments and commercial microorganisms currently used. *Appl. Env. Microbiol.* 48: 677-686.
- Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leahy JG, Colwell RR (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54: 305-315.
- Lepore BW, Indic M, Pham H, Hearn EM, Patel DR, Van den Berg B (2011) Ligand gated diffusion across the bacterial outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108: 10121-10126.
- López J, Quintero G, Guevara A, Jaimes D, Gutiérrez S, García J (2006) Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova* 4: 82-90.
- Mancera-López ME, Rodríguez-Casasola MT, Ríos-Leal E, Esparza-García F, Chávez-Gómez R, Rodríguez-Vázquez R, Barrera-Cortés J (2007) Fungi and bacteria isolated from two highly polluted soils for hydrocarbon degradation. *Acta Chim. Slov.* 54: 201-209.
- Nelson DL, Cox MM (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3ª ed. Worth, Nueva York, EEUU. 840 pp.
- Nikaido N (2003) Molecular basis of outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 593-656.
- Obire O, Nwaubeta O (2001) Biodegradation of refined petroleum hydrocarbons in soil. *J. Appl. Sci. Env. Manag.* 5: 43-46.
- Olagide PO, Ogbeifun LB (2010) Hydrocarbon biodegrading potentials of *Proteus vulgaris* strain isolated from fish samples. *Amer. J. Appl. Sci.* 7: 922-928.
- Palittapongarnpim M, Pokethitiyook P, Upatham ES, Tangbanluekal L (1998) Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic. *Biodegradation* 9: 83-90.
- Pérez R, Camacho J, Gómez J, Ábalos M, Viñas M, Cantero D (2008) Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *CENIC Cienc. Biol.* 39: 45.
- Ricoy C (2011) *Degradación de Combustible Diesel Comercial por Bacterias Aisladas de Suelos Contaminados con Petróleo*. Tesis. Universidad de Carabobo, Venezuela. pp. 48-50.
- Ricoy C, Boulé N, Amaiz L, Torcuatti E, Medina L, Valbuena O, Fernández Z (2012) Transferencia de la capacidad degradadora de combustible diesel a *Escherichia coli* DH5a por plásmidos de bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo. *Interciencia* 37: 671-677.
- Rojo F (2009) Degradation of alkanes by bacteria. *Env. Microbiol.* 11: 2477-2490.
- Saadoun I (2002) Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel. *J. Bas. Microbiol.* 42: 420-428.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press Nueva York, EEUU. 1558 pp.
- Sanseverino J, Applegate B, King J, Saylor G (1993) Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene and anthracene. *Appl. Env. Microbiol.* 59: 1931-1937.
- Shukor MY, Hassaan NAA, Jusoh AZ, Perumel N, Shamaan NA, McCormack W, Syed MA (2009) Isolation and characterization of a *Pseudomonas* diesel degrading strain from Antarctica. *J. Env. Biol.* 30: 1-6.
- Shulties DD, Purdy MD, Bauch CH, Wiener MC (2006) Outer membrane active transport: structure of the BTuB-TonB complex. *Science* 312: 1396-1399.
- Singh C, Lin J (2008) Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 1927-1932.
- Sivaraman C, Ganguly A, Nikolausz M, Mutnuri S (2011) Isolation of hydrocarbonoclastic bacteria from bilge oil contaminated water. *Int. J. Env. Sci. Tech.* 8: 461-470.
- Sun N, Wang H, Lin J, Qi Y (2009) Study of petroleum hydrocarbons under chemical biological degradation in contaminated soils. *Env. Sci. Inf. Applicat. Technol.* 1: 162-166.
- Throne-Holst M, Wentzel A, Ellingsen TE, Kotlar HK, Zotchev SB (2007) Identification of novel gene involved in long chain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp strain DSM17874. *Appl. Env. Microbiol.* 73: 3227-3332.
- Van den Berg B, Black N, Clemmons WU Jr, Rapoport TA (2004) Crystal structure of long-chain fatty acid transport FadL. *Science* 304: 1506-1509.
- Van den Berg B (2010) Going forward laterally transmembrane passage of hydrophobic molecules through protein channel walls. *ChemBiochem* 11: 1339-1343.
- Yousofi-Kebria DY, Khodadadi A, Ganjidoust H, Badkoubis I, Amoozegar MA (2009) Isolation and characterization of a novel native *Bacillus* strain capable of degrading diesel fuel. *Int. J. Env. Sci. Tech.* 6: 435-442.
- Wang ZY, Gao DM, Li FM, Zhao J, Xin YZ, Simkins S, Xing BS (2008) Petroleum hydrocarbon degradation potential of soil bacteria native to the Yellow river delta. *Pedosphera* 18: 707-716.
- Wentzel A, Ellingsen T, Kotlar HK, Zotchev SB, Throne-Holst M (2007) Bacterial metabolism of long chain n-alkanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 1209-1221.