
TRANSFERENCIA DE LA CAPACIDAD DEGRADADORA DE COMBUSTIBLE DIESEL A *Escherichia coli* DH5α POR PLÁSMIDOS DE BACTERIAS AISLADAS DE SUELOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO

CRISTINA RICOY, NICOLÁS BOULÉ, LUÍS AMAÍZ, ESTHER TORCUATTI, LUÍS MEDINA, OSCAR VALBUENA y ZORAIDA FERNÁNDEZ

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue dirigido a dos aspectos: 1) el aislamiento de cepas bacterianas autóctonas, provenientes de suelos contaminados con petróleo, capaces de crecer en medios minerales mínimos suplementados con antraceno o combustible diesel como únicas fuentes de carbono y 2) la transferencia de la actividad degradadora de diesel a *Escherichia coli* DH5α, después de su transformación por plásmidos presentes en las cepas autóctonas aisladas. En este trabajo se describe el aislamiento y caracterización de siete cepas bacterianas, identificadas mediante galerías API, asignadas a los géneros *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas* y *Burkholderia*. En *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Burkholderia* se detectó, por electroforesis en geles de agarosa, un plásmido de 11Kpb, ausente en *Sphingomonas*, que al ser incorporado mediante procesos de

electroporación a *E. coli* DH5α le transfirió la capacidad de crecer en el medio suplementado con combustible diesel. Las cepas transformadas de *E. coli* DH5α y *P. luteola*, cultivadas en medios suplementados con diesel, expresaron un polipéptido de 70KDa detectado por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, el cual no se expresó en *E. coli* DH5α sin transformar crecida en caldo Luria. Los datos sugieren que el polipéptido de 70KDa, posiblemente codificado por el plásmido de 11Kpb, pudiese funcionar como un transportador de moléculas hidrocarbonadas tipo diesel desde el medio de cultivo al interior de la célula bacteriana. Este tipo de estrategias experimentales pudiesen constituir herramientas biotecnológicas para mejorar las capacidades degradadoras de hidrocarburos por cepas bacterianas presentes en ambientes naturales.

La contaminación de ambientes naturales por petróleo es principalmente consecuencia de un inadecuado manejo de los depósitos de desechos de la industria petrolera y los accidentes que ocurren en los sitios de su explotación (Kanaly y Harayama, 2000). En Venezuela, particularmente en el estado Zulia, la contaminación por petróleo y sus derivados, y los riesgos

asociados a ella, son elevados y preocupantes. El petróleo es una mezcla heterogénea de compuestos orgánicos, principalmente hidrocarburos alifáticos, aromáticos y heterocíclicos, de variado tamaño y estructura (Harayama *et al.*, 1999).

En general, la contaminación por hidrocarburos es persistente y está presente en suelos, sedimentos marinos, aguas marinas y lacustres (Aitken *et al.*,

1998; Harayama *et al.*, 1999; Kasai *et al.*, 2002; Saadoun, 2002; Alquati *et al.*, 2005; Mancera-López *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008, 2009; Sun *et al.*, 2009), en ambientes antárticos (Ma *et al.*, 2006; Shukor *et al.*, 2009), efluentes industriales (Mishra *et al.*, 2009), en peces (Olajide y Ogbeifun, 2010) y en desechos vegetales (Song, 2009; Arulazhagan *et al.*, 2010). Especies bacterianas autóctonas capaces de degradar hidrocar-

PALABRAS CLAVE / Biodegradación / Combustible Diesel / *E. coli* DH5α / Plásmidos / *Pseudomonas* /

Recibido: 03/09/2011. Modificado: 17/09/2012. Aceptado: 20/09/2012.

Cristina Ricoy. Licenciada en Biología, Universidad de Carabobo (UC), Venezuela.

Nicolás Boulé. Licenciado en Biología, UC, Venezuela.

Luís Amaíz. Licenciado en Química y, M.Sc. en Ingeniería Ambiental, UC, Venezuela.

Esther Torcuatti. Licenciada en Química, UC, Venezuela.

Luís Medina. Licenciado en Biología, Universidad Central de Venezuela (UCV). Doctor en Biología Celular, Université de Grenoble, Francia. Profesor, UC, Venezuela.

Oscar Valbuena. Licenciado en Biología, UCV, Venezuela. Ph.D. en Biología Molecular, University of Pennsylvania, EEUU. Profesor, UC, Venezuela. Dirección: Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas (CIMA-UC), Valencia, Venezuela. e-mail: ovalbuena@uc.edu

Zoraida Fernández. Licenciada en Biología, UCV, Venezuela. M.Sc. en Entomología Médica, Universidade Federal de Paraná, Brasil. Doctora en Salud Pública y Epidemiología, Universidade de São Paulo, Brasil. Profesora, UC, Venezuela.

buros han sido aisladas de suelos y sedimentos marinos impactados por petróleo (Atlas y Bartha, 1972; Leahy y Colwell, 1990; Bracho *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2006; Adeline *et al.*, 2009).

Las actividades enzimáticas de alta especificidad implicadas en estos procesos degradativos están codificadas en el cromosoma bacteriano y las de baja especificidad en plásmidos. Estas últimas degradan benzoatos metilados, xilenos, tolueno y benceno (Carney y Leary, 1989; Kasai *et al.*, 2001). La capacidad degradadora de hidrocarburos requiere además de enzimas citosólicas, de la presencia en la membrana externa de la pared bacteriana de proteínas transportadoras (porinas/permeasas), que faciliten la incorporación de los hidrocarburos al espacio periplasmático (Black, 1991; DiRusso y Black, 2004; Van den Berg *et al.*, 2004; Van den Berg, 2005; Hearn *et al.*, 2008).

En este trabajo se describe el aislamiento de cepas bacterianas provenientes de suelos contaminados con petróleo, capaces de crecer en medios mínimos minerales suplementados individualmente con antraceno y combustible diesel, y la transferencia de ésta última capacidad a *E. coli* DH5a (Hanahan, 1983), bacteria no degradadora de hidrocarburos, mediante transformación con plásmidos obtenidos de estas cepas.

Materiales y Métodos

Toma de muestras

En la estación Bachaque-ro, Estado Zulia, de Petróleos de Venezuela, S.A. (PDVSA) se recolectaron mediante el uso de barrenos y en bolsas plásticas desinfectadas, muestras de suelo contaminados con petróleo, provenientes de dos áreas (pilas) diferentes de dicha estación. La temperatura se midió *in situ* y posteriormente las muestras fueron almacenadas y trasladadas bajo refrigeración al Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo (DB-FACYT-UC), Valencia, Venezuela. El pH de las muestras se determinó en un equipo BP 3001 (Trans Instruments, Singapur).

Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas

Porciones de 1g de suelo contaminado con petróleo se mezclaron con 50ml de caldo nutritivo (HiMedia, India), incubándose los sistemas a 32°C por 24h, en aerobiosis. Alícuotas de estos cultivos fueron transferidos nuevamente a caldo nutritivo, determinándose la absorbancia a 540nm, en un espectrofotómetro Genesys II

(Spectronic Instruments, RU) a las 0 y 72h, bajo las condiciones señaladas previamente. Posteriormente, alícuotas de estos cultivos se adicionaron a un medio mineral mínimo (Ricoy, 2010) constituido por CuSO₄ 1% (0,1ml), CaCl₂·2H₂O 1% (0,5ml), FeSO₄·7H₂O 0,5% (2ml), MgSO₄·7H₂O 1% (0,5ml), ZnSO₄·7H₂O 1% (0,5ml), NaCl 1% (0,5ml), (NH₄)₂SO₄ 1% (0,1ml) por litro de tampón fosfato 0,1M; pH 7,5 y 0,5g de antraceno (medio MMMA), o 10ml de combustible diesel comercial (medio MMMD), como únicas fuentes de carbono. Todas las sales y el antraceno fueron de grado analítico y el combustible diesel se adquirió de estaciones de gasolina locales. Los sistemas se incubaron a 32°C, midiendo la absorbancia diariamente a 540nm durante 10-15 días de incubación en aerobiosis. Volúmenes de 1ml provenientes de colonias crecidas en MMMA se diluyeron por factores de 10 sembrándose en placas de agar nutritivo para el aislamiento y caracterización de colonias. La identificación de las cepas bacterianas se estableció mediante las Galerías API 20NE y 20E (bioMerieux, Francia). Las colonias aisladas en MMMA fueron posteriormente crecidas individualmente en el mismo medio, procediéndose de igual manera.

Cultivo de cepas bacterianas en placas de agar suplementadas con antraceno o diesel

Placas de agar MMM, una vez solidificadas, fueron tratadas de acuerdo a uno de dos protocolos: 1) Se nebulizó con una solución de antraceno 0,05% en acetona (agar MMMA) y el exceso de solvente se evaporó en estufa a 32°C (Kiyohara *et al.*, 1982; Cho y Kim, 2001). Las placas se inocularon con las cepas aisladas cultivadas en solución de NaCl 0,85% (Forbes *et al.*, 2004), incubándose en una estufa Thermo Scientific (EEUU) a 32°C y observándose periódicamente durante 15 días, hasta la aparición de colonias. La degradación de antraceno se evidenció (Cho y Kim, 2001) por la aparición de halos claros alrededor de las colonias, al iluminar los cultivos con un transiluminador (modelo TM-36; UVP Chromatovue, EEUU). 2) Sobre la placa de agar se extendió 0,1ml de combustible diesel (agar MMMD). Seguidamente se inoculó, por extensión, 50µl del cultivo bacteriano (descrito más adelante) y se incubó por 1-3 días en estufa a 32°C, hasta la aparición de colonias.

Aislamiento de plásmidos

Bacterias provenientes de cultivos en caldo MMMA o colonias crecidas en placas de agar MMMA y

MMMD y del sistema de transformación se procesaron para obtener el ADN plasmídico (Kado y Liu, 1981). Las bacterias se resuspendieron en 200µl de tampón de lisis constituido por etilendiamino acetato de sodio (EDTA) 25mM, Tris/hidroximetil amino metano (trizma base)/HCl 25mM, sacarosa 10%, lizosima 10mg·ml⁻¹, pH 8, suplementado con 5µl de RNasa. Después de 10min a temperatura ambiente, se agregó 300µl de solución alcalina de dodecil sulfato de sodio (SDS) 1% y NaOH 0,2M, dejándose en reposo sobre hielo por 5min. Una vez la solución se tornó transparente, se adicionó 400µl de acetato de amonio 7,5M y luego de 5min sobre hielo, la solución se centrifugó por 10min a 8000g. El sobrenadante se mezcló con 700µl de isopropanol y luego de 2min se centrifugó a 10000g por 5min lavándose el precipitado con 300µl de etanol 70% v/v. El precipitado obtenido por centrifugación se secó y se resuspendió en 30µl de agua. De esta preparación, 15µl de cada lisado bacteriano fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa 0,7% a 100V por 1h, en un equipo BioRad (EEUU), visualizándose con el transiluminador las bandas plasmídicas. Paralelamente se usó un marcador de pesos moleculares (DNA-ladder, Promega, EEUU).

Transformación de *E. coli* DH5a por plásmidos bacterianos

La cepa de *E. coli* fue suministrada por el Laboratorio de Biotecnología, DB-FACYT-UC, y fue mantenida en caldo nutritivo (HiMedia) o en placas de agar nutritivo.

Preparación de E. coli DH5a competente. Una colonia de *E. coli* resuspendida en 10ml de caldo Luria (LB) fue sometida al procedimiento necesario para adquirir el estado de competencia (Sambrook y Russell, 2001a), el cual se describe a continuación: a la suspensión bacteriana, se adicionó 100µl de solución I (MgCl₂ 1M, MgSO₄ 1M) incubándose durante una noche a 37°C en una estufa Thermo Scientific. Un ml de este cultivo se agregó a 50ml de medio LB, adicionándose 0,5ml de solución I y se agitó por 2-3h a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una absorbancia de 0,3-0,4 unidades. Después de reposo por 10min sobre hielo, se centrifugó durante 7min a 5000g en una centrifuga Spectrafuge 16M (Labnet, EEUU) y el sedimento bacteriano se resuspendió en 2ml de solución de CaCl₂ constituida por CaCl₂ 60mM, glicerol 15% v/v, ácido N,N-bis-etanol sulfónico (PIPES) 10mM, pH 7. Luego de centrifugación por 7min a 5000g el sedimento bacteriano se resus-

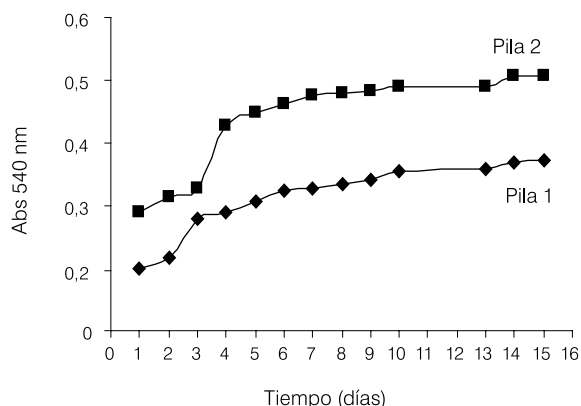


Figura 1. Crecimiento de la población bacteriana proveniente de las pilas 1 y 2, luego de 15 días de incubación, en medio mínimo mineral con antraceno 0,05% como única fuente de carbono.

pendió en 2ml de solución CaCl_2 y se conservó a -80°C .

Inserción del plásmido en *E. coli DH5a*. Alícuotas de 100 μl de bacterias competentes congeladas, obtenidas con el protocolo previo, se adicionaron a la cubeta de electroporación (0,2cm), añadiéndose 10 μl de ADN plasmídico obtenido según se describió arriba, proveniente de las cepas bacterianas crecidas en MMMD. Finalmente, en un electroporador (Gene Pulser, MX Cell Bio Rad, EEUU), un pulso de 10V, 200 Ω y 25 μF fue aplicado por 4-5ms (Sambrook y Russell, 2001b).

Viabilidad de *E. coli DH5a transformada* (*E. coli DH5aT*). Volúmenes de 5 μl de los sistemas de electroporación se diluyeron hasta 50 μl con medio LB, sembrándose en placas de agar MMMD e incubados en estufa a 32°C , observándose la formación de colonias durante 24, 48 y 72h. Como control negativo se utilizó una dilución de *E. coli DH5a* (sin transformar) sembrada en el mismo agar. Para posteriores estudios, las colonias de *E. coli DH5aT* se resuspendieron en caldo MMMD y se crecieron por 24h a 32°C .

Perfiles polipeptídicos de las cepas bacterianas

Preparación de extractos de proteínas. Alícuotas de 2ml de los cultivos bacterianos autóctonos y transformados, previamente crecidos en caldo MMMD, y *E. coli DH5a* en caldo nutritivo, se centrifugaron a 5000g durante 7min y el sedimento se resuspendió en 60 μl de tampón de lisis (Tris 25mM, EDTA 25mM, sacarosa 10%, lizosima 10mg $\cdot\text{ml}^{-1}$, pH 8). La suspensión fue sometida a sonicación en un disruptor ultrasónico de células, VirSonic 100, aplicando 17W por tres ciclos de 6-10s. La solución sonicada obtenida constituyó la muestra proteica a ser analizada

por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

Separación electroforética de proteínas. Alícuotas de 15 μl de los extractos proteicos bacterianos se mezclaron con 5 μl de tampón de aplicación de muestra 4 \times , se calentaron por 3min en agua hirviendo y se enfriaron sobre hielo. La electroforesis se efectuó en un equipo Bio-Rad, Mini Protein II, en geles de poliacrilamida al 10%, aplicando 100V por 60-90min (Laemmli, 1970). Simultáneamente fueron analizados patrones de peso molecular 8Bio Rad, Cat. No. 161-0363).

Determinación del combustible diesel consumido

Cultivos bacterianos (50ml) de las cepas PB6, RB2 y BB7 en MMMD, incubados por 72h bajo las condiciones señaladas en 'aislamiento y caracterización de cepas', se mezclaron con 10ml de hexano, agitándose vigorosamente por 10min. Luego de reposo para permitir la separación de las fases se separó la fase orgánica. El proceso de extracción se repitió una vez más y las fases orgánicas se mezclaron, transfiriéndose seguidamente a vasos de precipitados previamente tarados. Los extractos orgánicos se evaporaron en estufa a 80°C y el combustible diesel residual se determinó en una balanza analítica. Un sistema control (MMMD sin inóculo bacteriano) también fue procesado (Ricoy, 2011).

Resultados

Condiciones de las muestras de suelo

La temperatura y pH de las muestras (pilas) 1 y 2 fueron de 33°C y 7,98; y de 32°C y 7,50 respectivamente.

Crecimiento bacteriano, aislamiento de colonias e identificación de cepas

El crecimiento de los cultivos bacterianos en caldo MMMA se muestra en la Figura 1, alcanzándose valores máximos de 0,30 y 0,5 unidades de absorbancia (ua) a los 9 días de incubación en los sistemas provenientes de las pilas 1 y 2, respectivamente. La fase estacionaria se alcanzó, en ambos cultivos, a los 15 días de incubación. De las poblaciones bacterianas obtenidas previamente, mediante estrías en placas de agar nutritivo se obtuvieron colonias cuyas características morfológicas se detallan en la Tabla I. Del cultivo de la pila 1 se aislaron cinco morfotipos (1-5) y dos morfotipos de la pila 2 (6 y 7). Todas las cepas fueron bacilos Gram negativos, con variadas morfologías y colores. De los siete morfotipos, tres fueron asignados al género *Pseudomonas*, dos a *Sphingomonas*, uno a *Rhizobium* y uno a *Burkholderia*. El crecimiento de estas cepas en caldo MMMA se muestra en la Figura 2. Las cepas 2 (*R. radiobacter*, RB2) y 6 (*P. luteola*, PB6) mostraron las mayores tasas de crecimiento, las cepas 1 (*P. luteola*, PB1), 3 (*S. paucimobilis*, SB3), 4 (*P. luteola*, PB4) y 5 (*S. paucimobilis*, SB5) mostraron crecimiento muy moderado, y la cepa 7 (*B. cepacia*, BB7) mostró crecimiento mínimo. En to-

TABLA I
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS BACTERIANAS AISLADAS EN MUESTRAS DE SUELO PROVENIENTES DE LA ESTACIÓN DE PDVSA DE BACHAQUERO, ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Morfotipo	Especie	Caracterización macro y micromorfológica
1	<i>Pseudomonas luteola</i>	Colonias transparentes de borde irregular. Bacilos Gram -, pequeños, aglomerados.
2	<i>Rhizobium radiobacter</i>	Colonias de color naranja de borde liso. Bacilos Gram -, medianos, delgados, aglomerados
3	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Colonias de color amarillo de borde liso. Bacilos Gram -, muy pequeños, delgados, aglomerados.
4	<i>Pseudomonas luteola</i>	Colonias de color verde grama de borde liso. Bacilos Gram -, grandes, intermedios, no agrupados
5	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Colonias de color blanco de borde liso. Bacilos Gram -, muy pequeños, delgados, aglomerados
6	<i>Pseudomonas luteola</i>	Colonias de color verde claro de borde liso. Bacilos Gram -, medianos, intermedios, no agrupados
7	<i>Burkholderia cepacia</i>	Colonias de color verde de borde liso. Bacilos Gram -, medianos, delgados no agrupados

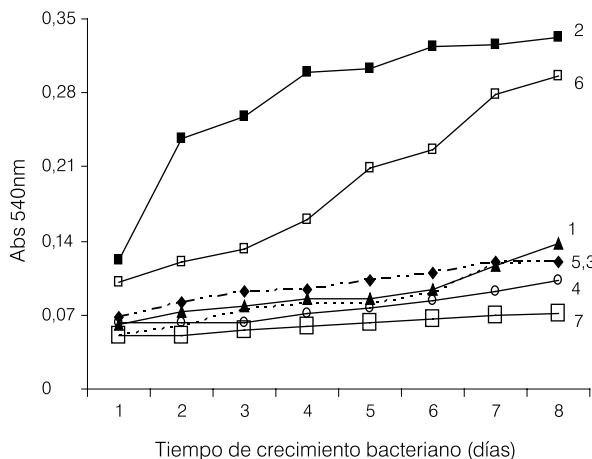


Figura 2. Curvas de crecimiento bacteriano de los morfotipos aislados de las pilas 1 y 2. Los números ubicados en la parte derecha indican el morfotipo aislado. Las bacterias fueron incubadas en MMMA y a 32°C por 10 días.

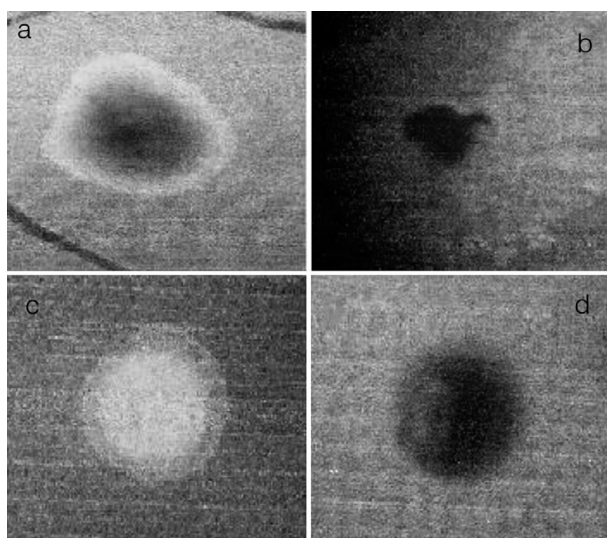


Figura 3. Colonias bacterianas en placas de agar MMMA. a: *Pseudomonas luteola*, b: *Rhizobium radiobacter*, c: *Sphingomonas paucimobilis*, d: *Burkholderia cepacia*.

dos los casos el crecimiento fue progresivo hasta los 8 días, alcanzando valores cercanos a 0,3ua (cepas RB2 y PB6); 0,1ua (cepas PB1, SB3, PB4 y SB5) y 0,05ua (cepa BB7). En la Figura 3 se muestra la morfología de las cepas RB2, SB5, PB6 y BB7 en agar MMMA, las cuales al iluminarse con luz UV presentaron halos claros indicativos de la actividad degradadora de antraceno.

El crecimiento de las cepas PB6, RB2 y BB7 en caldo MMMD mostró valores máximos de 0,08-0,1ua a las 48-72h de incubación, manteniendo la fase estacionaria hasta las 240h, sin mostrar fase de muerte (Figura 4). El consumo de combustible diesel, por estas cepas, determinado por gravimetría, alcanzó valores de 13,7; 12,3 y 10,7% m/m, de la cantidad inicial de combustible en MMMD (0,33g equivalentes a 0,5ml de combustible diesel

en 50ml de medio) respectivamente, mientras en el sistema control (MMMD, sin inoculo bacteriano) no hubo consumo del hidrocarburo (datos no mostrados).

Aislamiento de ADN plasmídico

La Figura 5 muestra las bandas correspondientes al ADN plasmídico aislado de las cepas bacterianas crecidas en placas de agar MMMA. En las cepas RB2, PB6 y BB7 se detectó una banda con una masa molecular aparente de 11Kpb, señal que no fue detectada en la cepa SB5 a pesar de su crecimiento en medio con antraceno. En la Figura 6 se observa la presencia de plásmidos provenientes de bacterias crecidas en agar MMMD, de nuevo en las cepas PB6 y BB7 se detectó una banda en la región correspondiente a 11Kpb, la cual no fue detectada en RB2.

Caracterización de *E. coli* DH5 α T

Las cepas transformadas fueron evaluadas en términos de: 1) su crecimiento (viabilidad) en medios complementados con combustible diesel, 2) por la presencia del plásmido después de la electroporación, y 3) por los perfiles

polipeptídicos de las cepas bacterianas.

La Figura 7 (a, b y c) muestra el crecimiento, en placas de agar MMMD, de las cepas de *E. coli* DH5 α y sus transformantes *E. coli* DH5 α T (PB6) y *E. coli* DH5 α T (BB7), transformadas con material plasmídico proveniente de PB6 y BB7 respectivamente, observándose colonias aisladas indicativas de su viabilidad, mientras que *E. coli* no transformada (sometida a electroporación en ausencia de material plasmídico) no creció en tales condiciones (Figura 7a).

La Figura 8 indica la presencia de bandas de ADN plasmídico en la región corres-

pondiente a 11Kpb en las cepas de *E. coli* transformadas y su ausencia en *E. coli* DH5 α no sometida a transformación.

La Figura 9 corresponde a los perfiles polipeptídicos de la cepa autóctona PB6, *E. coli* sin transformar y de las cepas transformadas, evidenciándose en todas ellas múltiples bandas polipeptídicas con masas moleculares comprendidas entre 10 y 225KDa, incluida una banda ubicada en la zona de 70KDa, la cual no fue detectada en la cepa *E. coli* sin transformar.

Discusión

El crecimiento en caldo MMMA de las poblaciones bacterianas aisladas de las dos pilas indica que subpoblaciones bacterianas presentes en las muestras son capaces de degradar antraceno, manteniendo un crecimiento estacionario en el lapso de 5-16 días de incubación (Figura 1). El pH y temperatura de las pilas (7-8 y 32-33°C, respectivamente) parecen favorecer la presencia de cepas bacterianas autóctonas degradadoras de hidrocarburos, tal como ha sido reportado por otros autores (Kastner *et al.*, 1998). Las poblaciones bacterianas detectadas en ambas pilas resultaron no homogéneas, aislándose cinco morfotipos de la pila 1 y dos de la pila 2. *Pseudomonas* (PB1, PB4, PB6) se detectó en ambas muestras, *Sphingomonas* (SB3 y SB5) y *Rhizobium* (RB2) únicamente en la pila 1, y *Burkholderia* (BB7) en la pila 2. Es de hacer notar que estos suelos contaminados se encuentran en vertederos sin ninguna protección, a cielo abierto, expuestos a lluvias,

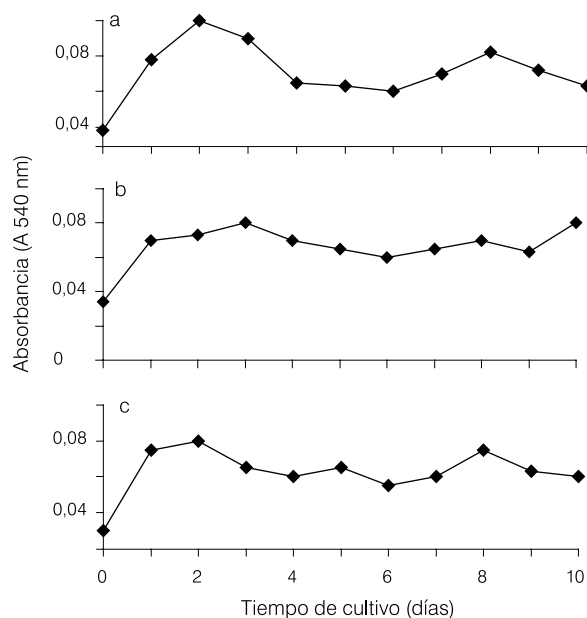


Figura 4. Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas en medio MMMD. a: *Pseudomonas luteola*, b: *Rhizobium radiobacter*, c: *Burkholderia cepacia*

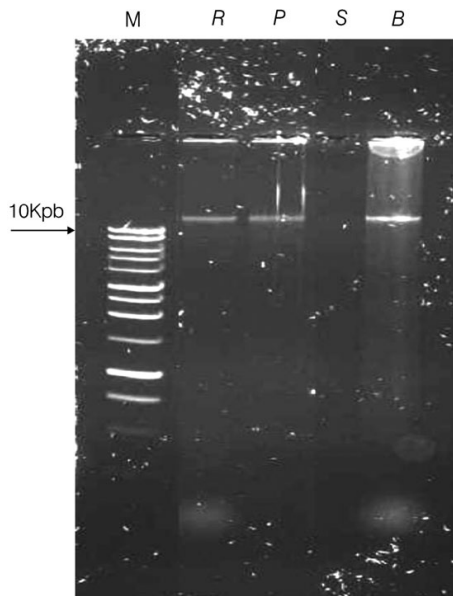


Figura 5. Electroforesis en geles de agarosa de los plásmidos provenientes de los géneros bacterianos aislados. M: marcador de peso molecular, R: *Rhizobium*, P: *Pseudomonas*, S: *Sphingomonas*, B: *Burkholderia*.

sol y vientos, y su tiempo de almacenamiento en el vertedero no es el mismo, todo lo cual podría justificar las diferencias encontradas en las poblaciones bacterianas aisladas.

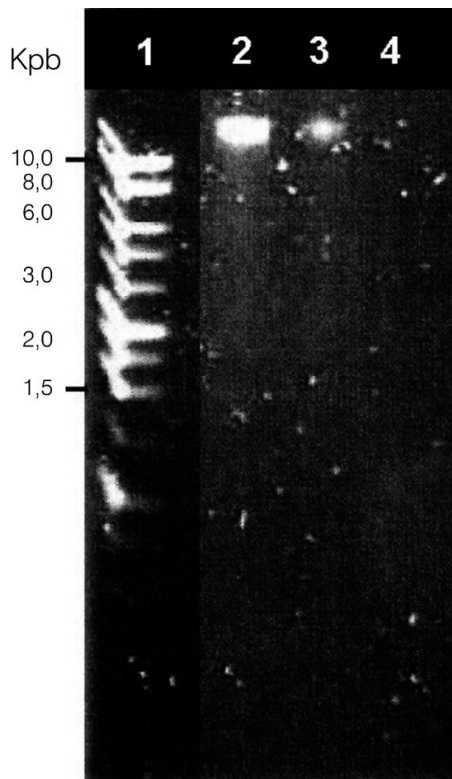


Figura 6. Plásmidos bacterianos provenientes de cultivos en placas de agar MMMd. 1: marcadores de peso molecular, 2: *Pseudomonas luteola*, 3: *Burkholderia cepacia*, 4: *Rhizobium radiobacter*.

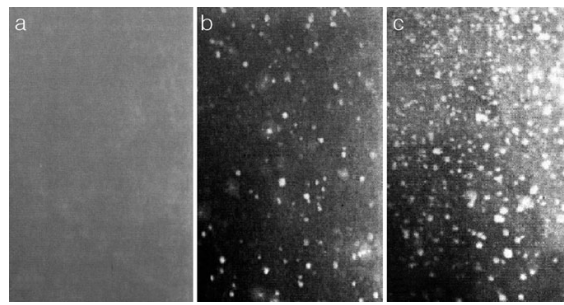


Figura 7. Crecimiento bacteriano de *E.coli* DH5α y sus transformantes en placas de agar agar MMMd. a: *E. coli* DH5α, b: *E. coli* DH5αT (PB6), c: *E.coli* DH5αT (BB7).

La tasa de crecimiento bacteriano de las cepas individuales en presencia de antraceno (Figura 2) mostró ser variable. Una de las cepas de *P. luteola* (PB6) y *R. radiobacter* (RB2) mostraron altas tasas de crecimiento, mientras que otras crecieron muy moderadamente (PB1, PB4 y RB5). En el caso de *Sphingomonas* (SB3 y SB5), ambas cepas provenientes de la pila 1 crecieron de manera similar y moderada, e igual comportamiento fue observado en las cepas de *Pseudomonas* (PB1 y PB4). Contrariamente, la cepa PB6 de *Pseudomonas* (proveniente de la pila 2), creció abundantemente. Esta variabilidad metabólica ha sido reportada por otros autores en diferentes géneros bacterianos (Perna *et al.*, 2001; Tattelin *et al.*, 2005; Hogg *et al.*, 2007) y se ha asumido que las diferentes capacida-

des se deben a modificaciones inducidas en el genoma de los individuos por las condiciones ambientales. Tal situación ha conducido a establecer el concepto de pangenoma, definido como el conjunto de todas las variantes genómicas presentes en una especie bacteriana (Tattelin *et al.*, 2005). El crecimiento en hidrocarburos policíclicos aromáticos ha sido reportado previamente en varios géneros bacterianos (Kiyohara *et al.*, 1982; Cho y Kim, 2001; Kasai

et al., 2002; Bracho *et al.*, 2004; Riccardi *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2009, Arulazhagan *et al.*, 2010.). Análogamente, el uso por bacterias de combustible diesel como fuente de carbono también ha sido constatado (Saadoun, 2002; Obire y Nwaubeta, 2001; Wang *et al.*, 2008, 2009; Adeline *et al.*, 2009; Shukor *et al.* 2009; Olajide y Ogbeifun, 2010)

EL ADN plasmídico (Figura 5) proveniente de colonias bacterianas, crecidas en agar MMMa (Figura 3), mostró en tres de las muestras analizadas una banda de 11Kpb, la cual no se detectó en *Sphingomonas*. La similitud de la masa molecular de estos plásmidos en diferentes géneros bacterianos, colonizadores de un mismo hábitat, probablemente indica que mediante procesos de conjuga-

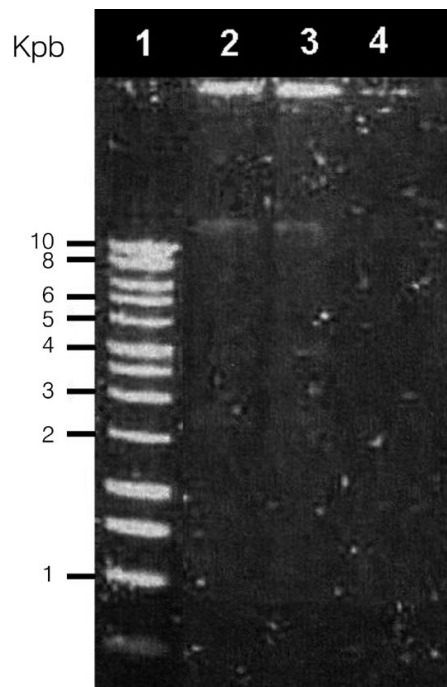


Figura 8. Plásmidos de *E. coli* DH5α y sus transformantes. 1: marcadores de peso molecular, 2: *E. coli* DH5αT (PB6), 3: *E. coli* DH5αT (BB7), 4: *E. coli* DH5α (sin transformar).

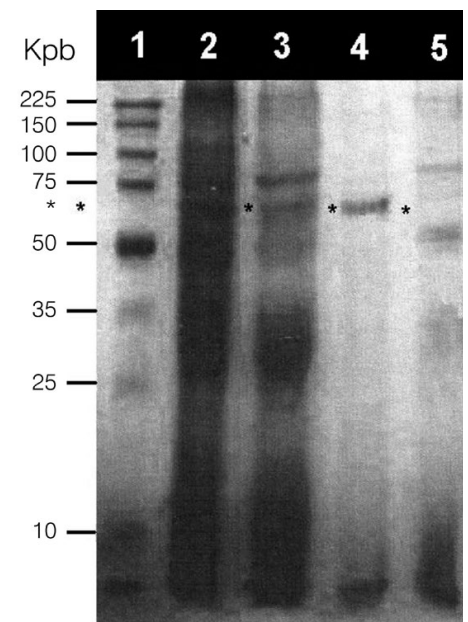


Figura 9. Perfiles polipeptídicos de cepas bacterianas autóctonas, *E. coli* y transformantes. 1: marcadores de peso molecular, 2: *Pseudomonas luteola*, 3: *E. coli* DH5αT (PB6), 4: *E. coli* DH5αT (BB7), 5: *E. coli* DH5α (sin transformar).

ción/transformación se pudiese efectuar la transferencia horizontal de capacidades genéticas, lo cual dotaría a los individuos presentes en ese hábitat de la capacidad degradadora de hidrocarburos (Ochman *et al.*, 2000; Dobrindt *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2006) haciendo a la población bacteriana total mas adaptada a su particular hábitat. La presencia de plásmidos en bacterias degradadoras de hidrocarburo ha sido descrita en varios géneros bacterianos (Kado y Liu, 1981; Sanseverino *et al.*, 1993; Cho y Kim, 2001; Ma *et al.*, 2006; Olajide y Ogbeifun, 2010).

La capacidad degradadora de combustible diesel de las cepas aisladas se evaluó considerando que este derivado de petróleo es uno de los contaminantes más usuales del ambiente, particularmente en zonas pobladas (estaciones de expendio de combustible, talleres mecánicos, estacionamientos para vehículos de transporte pesado, carreteras, entre otras). La viabilidad de las cepas autóctonas en caldo MMMD se constató por las curvas de crecimiento (Figura 4) y por el consumo de combustible diesel. La adquisición de la propiedad degradadora de diesel por las cepas de *E. coli* transformadas se correlacionó con el crecimiento en MMMd (Figura 7), la presencia del plásmido de 11Kpb en ambos transformantes (Figura 8) y la presencia de un polipéptido de 70KDa, detectado por electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 9). En contraposición, *E. coli* sin transformar no consumió el hidrocarburo y el plásmido y polipéptido no fueron detectados en los análisis efectuados. Estos datos, tomados en conjunto, tienden a indicar que el plásmido de 11Kpb presente en las cepas autóctonas codifica un polipéptido de 70KDa implicado de alguna manera en la degradación del combustible diesel. Este polipéptido podría funcionar como un transportador de membrana que facilite la incorporación del hidrocarburo al interior bacteriano, para su posterior metabolización por sistemas enzimáticos intracelulares. Polipéptidos con funciones de transportador de moléculas hidrocarbonadas, con pesos moleculares de 46KDa han sido reportados previamente para *Pseudomonas putida* y *Ralstonia picketti* (Kasai *et al.*, 2001; Hearn *et al.*, 2008) y de 48,8KDa para *E. coli* (Black, 1991; Van den Berg *et al.*, 2004). Estudios de esta naturaleza, además de generar conocimiento básico sobre los mecanismos moleculares que median la degradación de compuestos xenobióticos, podrían contribuir al mejoramiento de cepas bacterianas destinadas a la biorremediación de ambientes naturales contaminados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Carlos Martínez T por sus críticas y sugerencias, y a Darío Valbuena por la preparación del manuscrito.

REFERENCIAS

- Adeline SY, Tin Carol HC, Aw CS (2009) Hydrocarbon degradation by isolate *Pseudomonas lundensis* UTARFP2. *Mal. J. Microbiol.* 5: 104-108.
- Ahmed MMM, Hafez EL, El-Saani MA (2009) Biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by recombinant bacteria containing Alasan gene. *Int. J. Env. Polut.* 38: 15-424.
- Aitken MD, Stringfellow 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.
- Arulazhagan P, Vasudevan N, Yeom IT (2010) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment. *Int. J. Env. Sci. Tech.* 7: 639-652.
- Atlas R, Bartha R (1972) Degradation and mineralization of petroleum in seawater: limitation by nitrogen and phosphorous. *Biotechnol. Bioeng.* 14: 309-317.
- 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.
- Bracho M, Díaz L, Soto L (2004) Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas* sp. *Ciencia 12*: 269-275.
- Carney B; Leary J (1989) Novel alterations in plasmid DNA associated with aromatic hydrocarbon utilization by *Pseudomonas putida* R5-3. *Appl. Env. Microbiol.* 55: 1523-1530.
- Cho JC, Kim SJ (2001) Detection of megaplasmid from polycyclic aromatic hydrocarbon degrading *Sphingomonas* sp. strain KS14. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 503-506.
- Díaz L, Dupont L, Atencio L (2006) Perfil plasmídico de bacterias aisladas de sedimento contaminado con petróleo, estado Zulia, Venezuela. *Bol. Cent. Inv. Biol.* 40: 133-148.
- DiRusso CC, Black PN (2004) Bacterial long chain fatty acid transport. Gateway to a fatty acid responsive signaling system. *J. Biol. Chem.* 279: 49563-49566.
- Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 414-424.
- Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS (2004) *Bayley & Scott Diagnóstico Microbiológico*. 11ª ed. Panamericana. Madrid, España. 237 pp.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Harayama S, Kishira H, Kasai Y, Shutsubo K (1999) Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 63-70.
- Hearn EM, Patel DR, van der Berg B (2008) Outer membrane transport of aromatic hydrocarbons as a first step in biodegradation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 105: 8601-8606.
- Hogg JS, Hu FZ, Janto B, Bolssy R, Hayes J, Keefe R, Post C, Ehrlich GD (2007) Characterization and modeling of the *Haemophilus influenzae* core and supragenomes based on the complete genomic sequences of Rd and 12 clinical nontypeable strains, *Genome Biol.* 8: R103.
- Kado C, Liu S (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365-1373.
- Kanally 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.
- Kasai Y, Kishira H, Harayama S (2002) Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in marine environment. *Appl. Env. Microbiol.* 68: 5625-5663.
- Kastner M, Breuer-Jammali M, Marro B (1998) Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAHs-degrading bacteria introduced into soil. *Appl. Env. Microbiol.* 64: 359-462.
- Kiyohara H, Nagao K, Yana K (1982) Rapid screen for bacteria degrading water-soluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Env. Microbiol.* 43: 454-457.
- Kumar M, León V, De Sisto Materano A, Ilzins OA, Galindo-Castro I, Fuenmayor SL (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. IR1. *Z. Naturforsch. 61c*: 203-212.
- Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leahy JG, Colwell RR (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 54: 305-315.
- Ma Y, Wang L, Shao Z. (2006) *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria isolated from Antarctic oils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. *Env. Microbiol.* 8: 455-465.
- Mancera-López ME, Rodríguez-Casasola MT, Ríos-Leal E, Esparza-García F, Chávez-Gómez B, Rodríguez-Vásquez R, Barrera-Cortés J (2007) Fungi and bacteria isolated from two highly polluted soils for hydrocarbon degradation. *Acta Chim. Slov.* 54: 201-209.
- Mishra A, Ahmad R, Kaistha S (2009) Characterization of aromatic hydrocarbon degrading bacteria isolated from effluents of thermal power. *Trends Biosci.* 2009: 39-41.
- Obire O, Nwaubeta O (2001) Biodegradation of refined petroleum hydrocarbons in soil. *J. Appl. Sci. Env. Manag.* 5: 43-46.
- Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405: 299-304.
- Olagide PO, Ogbeifun LB (2010) Hydrocarbon biodegrading potentials of *Proteus vulgaris* strain isolated from fish samples. *Am. J. Appl. Sci.* 7: 922-928.
- Perna NT *et al.* (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409: 529-533.
- Riccardi C, Papacchini M, Mansi A, Ciervo A, Petrucca A, La Rosa G, Marianelli C, Mus-

- cillo M, Marcelloni AM, Spicaglia S (2005) Characterization of bacterial population coming from a soil contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) able to degrade pyrene in slurry phase. *Ann. Microbiol.* 55: 85-90.
- Ricoy C (2011) *Degradación de Combustible Diesel Comercial por Bacterias Provenientes de Suelos Contaminados con Petróleo*. Tesis. Universidad de Carabobo. Venezuela. 75 pp.
- 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 (2001a) Protocol 25. Preparation and transformation of *E. coli* using calcium chloride. En *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, EEUU. pp 1.116-1.118.
- Sambrook J, Russell DW. (2001b). Protocol 25. Preparation and transformation of *E. coli* using calcium chloride. En *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, EEUU. pp 1.119-1.122.
- Sanseverino J, Applegate B, King J (1993) Plasmid mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene and anthracene. *Appl. Env. Microbiol.* 59: 1931-1937.
- Shukor MY, Hassan NAA, Jusoh AZ, Perumal N, Shamaan NA, McCormack WP, Syed MA (2009) Isolation and characterization of a *Pseudomonas* diesel degrading strain from Antarctica: *J. Env. Biol.* 30: 1-6.
- Song YS (2009) Characterization of aromatic hydrocarbon degrading bacteria isolated from pine litter. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 37: 333-339.
- Sun N, Wang H, Lin J, Qi Y (2009) Study of petroleum hydrocarbons under chemical biological degradation in contaminated soils. *Env. Sci. Inf. Appl. Technol.* 1: 162-166.
- Tattelin H *et al.* (2005) Genomic analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial pan-genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 13950-13955.
- Van den Berg B (2005) The FadL family: unusual transporters for unusual substrates. Review. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15: 401-407.
- Van den Berg B, Black PN, Clemons WMJr, Rapoport TA (2004) Crystal structure of long-chain fattyacid transport FadL. *Science* 304: 1506-1509.
- 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.
- Wang Z, Zhao J, Li F, Baoshan X, Gao DM (2009) Petroleum hydrocarbon degradation potential of autochthonous bacteria from saline soil. *J. Agro. Sci.* 2009-7.

TRANSFER OF THE DIESEL FUEL DEGRADING CAPACITY TO *Escherichia coli* DH5 α BY PLASMIDS ISOLATED FROM PETROLEUM CONTAMINATED SOIL BACTERIA

Cristina Ricoy, Nicolás Boulé, Luís Amaíz, Esther Torcuatti, Luís Medina, Oscar Valbuena and Zoraida Fernández

SUMMARY

This study was focalized on two principal aims: 1) the search for indigenous bacterial strains isolated from petroleum contaminated soils and capable of growing in minimal mineral media supplemented with anthracene or diesel fuel as sole carbon sources, and 2) the transfer of the diesel fuel degrading capacity to *Escherichia coli* DH5 α by plasmids from the isolated indigenous strains. In this paper, seven isolated bacterial strains are described and assigned, according to the API identification system, to the genera *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas* and *Burkholderia*. Plasmids from *Pseudomonas*, *Rhizobium* and *Burkholderia*, with an 11Kbp apparent molecular mass, were detected by agarose gel electrophoresis, but not from *Sphingomonas*.

E. coli DH5 α was able to grow on diesel fuel medium after electroporation mediated transformation with the 11Kbp plasmids. *P. luteola* and the transformed *E. coli* DH5 α , growing on diesel fuel media, expressed a 70KDa polypeptide, detected by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, which was absent in the non-transformed *E. coli* DH5 α strain grown in Luria broth. The data suggest that the 70KDa polypeptide, probably encoded by the 11Kbp plasmid, is involved in the uptake of diesel fuel type molecules from the extracellular medium to the internal periplasmic bacterial space. This kind of experimental strategies might constitute biotechnological tools for improving the degradative capabilities of bacterial strains present in natural environments.

TRANSFERÊNCIA DA CAPACIDADE DEGRADADORA DE COMBUSTÍVEL DIESEL A *Escherichia coli* DH5 α POR PLASMÍDEOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLOS CONTAMINADOS COM PETRÓLEO

Cristina Ricoy, Nicolás Boulé, Luís Amaíz, Esther Torcuatti, Luís Medina, Oscar Valbuena e Zoraida Fernández

RESUMO

O objetivo deste estudo foi orientado a dois aspectos: 1) o isolamento de cepas bacterianas autóctones provenientes de solos contaminados com petróleo, capazes de crescer em meios minerais mínimos suplementados com antraceno ou combustível diesel como únicas fontes de carbono e 2) a transferência da atividade degradadora de diesel a *Escherichia coli* DH5 α , depois de sua transformação por plasmídeos presentes nas cepas autóctones isoladas. Neste trabalho se descreve o isolamento e caracterização de sete cepas bacterianas, identificadas mediante galerias API, designadas aos gêneros *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas* e *Burkholderia*. Em *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Burkholderia* se detectou, por eletroforeses em gel de agarose, um plasmídeo de 11Kpb, ausente em *Sphingomonas*, que ao ser incorporado mediante processos de eletroporação a

E. coli DH5 α lhe transferiu a capacidade de crescer no meio suplementado com combustível diesel. As cepas transformadas de *E. coli* DH5 α e *P. luteola*, cultivadas em meios suplementados com diesel, expressaram um polipeptídeo de 70KDa detectado por eletroforeses em gel desnaturante de poliácridamida, o qual não se expressou em *E. coli* DH5 α sem transformar crescida em caldo Luria. Os dados sugerem que o polipeptídeo de 70KDa, possivelmente codificado pelo plasmídeo de 11Kpb, pudesse funcionar como um transportador de moléculas hidrocarbonadas tipo diesel desde o meio de cultivo ao interior da célula bacteriana. Este tipo de estratégias experimentais poderiam constituir ferramentas biotecnológicas para melhorar as capacidades degradadoras de hidrocarbonetos por cepas bacterianas presentes em ambientes naturais.