



CASA ABIERTA AL TIEMPO

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
DE LA SALUD

✓ AISLAMIENTO DE PLASMIDOS EN BACTERIAS QUE DEGRADAN HIDROCARBUROS DE TRES REGIONES OCEANICAS DEL PAIS //

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

Lic. en Biol. Exp. **FAUSTO YAÑEZ SORIA**

MEXICO, D. F.

MARZO DE 1995

24-VI-02 P. 54

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa cuenta con el apoyo del CONACyT, según convenio PFPN/66/92, por considerarsele con nivel de excelencia.

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

Agradezco a CONACyT el apoyo económico otorgado durante mis estudios, mediante una beca vitalicia con número de registro 81597.

La realización del presente trabajo de tesis tuvo lugar en las instalaciones del laboratorio de Microbiología Marina en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); bajo la dirección de los siguientes investigadores:

TUTOR: Dr. Jorge Romero Jarero
Responsable del Laboratorio de Microbiología Marina del
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, U.N.A.M.

ASESOR: Dr. Faustino Rodríguez Romero
Responsable del Laboratorio de Genética de Organismos
Acuáticos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología,
U.N.A.M.

ASESOR: Dr. Javier Barrios González
Investigador Titular "C", Depto. de Biotecnología,
Laboratorio de Metabolitos Secundarios Microbianos,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (U.A.M.I).

D E D I C A T O R I A

A mis padres Josefina y Fausto, por su cariño y gran apoyo.

A mi esposa Lorena, por su estímulo y comprensión.

A mi hija Berenice Lorena, que día a día me da fuerza y alegría para seguir adelante.

A mis hermanos, por su comprensión y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Romero Jarero, por su dirección en el desarrollo de ésta tesis, por su apoyo constante y por su amistad.

Al Dr. Faustino Rodriguez Romero, por su asesoría, gran apoyo y disposición para la discusión en el trabajo.

Al Dr. Javier Barrios González, por las sugerencias aportadas en el mejoramiento del desarrollo experimental.

A la .M. en C. Irma Wong Chang, por su apoyo desinteresado, su gran amistad y su participación en el desarrollo de esta tesis.

A la M. en C. Ana Berta Montero, por su análisis crítico del trabajo desarrollado y por las excelentes fotografías tomadas.

A la Dra. Laura María Ongay, por su gentileza al facilitar el transiluminador y la cámara fotográfica con la que se obtuvieron las fotografías de los geles y por sus valiosas sugerencias para llevar a cabo las electroforésis.

A la Dra. Pilar Negrete, por su valiosa ayuda en el establecimiento de la identificación bacteriana.

A la Dra. Ma. Concepción Gutierrez R., por el apoyo otorgado para la edición final del trabajo.

A todas aquellas personas que de una forma u otra participaron en el desarrollo del presente trabajo.

ANEXO 1
Copia de la tesis de Irma Wong Chang

**AISLAMIENTO DE PLASMIDOS EN BACTERIAS QUE DEGRADAN
 HIDROCARBUROS DE TRES REGIONES OCEANICAS DEL PAIS**

I N D I C E

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
I.- ANTECEDENTES	
I.1.- El petróleo.....	4
I.2.- Susceptibilidad a la biodegradación.....	4
I.3.- Aspectos químicos en la biodegradación del petróleo.....	6
A) n-alcanos.....	6
a) Mecanismo I	
b) Mecanismo II	
c) Mecanismo III	
B) Hidrocarburos alicíclicos.....	6
C) Hidrocarburos aromáticos.....	7
I.4.- Bacterias que degradan petróleo.....	7
I.5.- Modelo para explicar la biodegradación de hidrocarburos.....	8
I.6.- Tipos de plásmidos que intervienen en la biodegradación de hidrocarburos.....	9
I.7.- Rutas biodegradativas.....	10
I.8.- Métodos para aislamiento de plásmidos.....	12
JUSTIFICACION.....	14
HIPOTESIS.....	14

OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	15
II.- DESARROLLO METODOLOGICO.....	16
II.1.- Selección de las muestras.....	16
II.2.- Aislamiento de bacterias en medio sólido.....	18
A).- Medio Zobell sólido.....	18
B).- Medio a base de sílica gel.....	18
C).- Medio LB para bacterias resistentes a antibióticos.....	18
II.3.- Obtención de cultivos puros.....	18
II.4.- Proliferación celular.....	19
II.5.- Aislamiento de plásmidos.....	19
A).- Plásmidos de cepas resistentes a antibióticos utilizadas como re- ferencia.....	19
B).- Plásmidos de cepas hidrocarbono- clásticas.....	20
II.6.- Identificación de los plásmidos de acuerdo con su movilidad electroforé- tica relativa.....	21
II.7.- Relación entre regiones y plásmidos.....	21
II.8.- Identificación bacteriana.....	21
III.- RESULTADOS.....	22
III.1.- Selección de las muestras.....	22
III.2.- Aislamiento de bacterias en medio	

sólido.....	26
III.3.- Obtención de cultivos puros.....	26
III.4.- Proliferación bacteriana.....	28
III.5.- Aislamiento de plásmidos.....	28
III.6.- Identificación de los plásmidos de acuerdo con su movilidad electroforé- tica relativa.....	41
III.7.- Plásmidos de acuerdo con la región del país.....	44
III.8.- Identificación bacteriana.....	44
IV.- DISCUSION.....	48
IV.1.- Selección de las muestras.....	48
IV.2.- Aislamiento de bacterias en medio sólido.....	49
IV.3.- Obtención de cultivos puros.....	50
IV.4.- Proliferación bacteriana.....	51
IV.5.- Aislamiento de plásmidos.....	52
A).- Cepas de referencia.....	52
B).- Cepas de bacterias hidrocarbono- clásticas.....	54
IV.6.- Identificación de los plásmidos de acuerdo con su movilidad electroforé- tica relativa.....	55
IV.7.- Plásmidos de acuerdo con la región del país.....	55
IV.8.- Identificación bacteriana.....	56
V.- CONCLUSIONES.....	57
VI.- PERSPECTIVAS.....	58
VII.- APENDICE.....	59

A).- Medio Zobell.....	59
B).- Medio mineral concentrado.....	59
C).- Medio diluido para bacterias hidro- carbonoclasticas.....	59
D).- Medio a base de sílica gel.....	60
E) - Método de Sykora y col., (1989) para "abortar" plásmidos.....	60
F).- Zonas de localización de las muestras.....	61
VIII.- LITERATURA CITADA.....	62

RESUMEN.

La biodegradación de hidrocarburos en ambientes marinos es realizada por diversos tipos de microorganismos, principalmente bacterias del género *Pseudomonas*. Muchas de estas bacterias contienen elementos extracromosomales llamados plásmidos que contienen la información genética para sintetizar algunas enzimas de las rutas metabólicas para la degradación de diferentes tipos de hidrocarburos.

Estos plásmidos degradativos son de elevado peso molecular, generalmente por arriba de los 20 MDa pudiendo presentarse solos como el OCT específico para n-alcános; o fusionados como el TOL^{*}-K, un plásmido específico para tolueno (TOL^{*}) y un plásmido conjugativo sexual (K).

El objetivo de este trabajo es identificar los tipos de plásmidos presentes en bacterias que degradan hidrocarburos en muestras colectadas en ambientes marinos con base en su peso molecular y de acuerdo con la región del país (Golfo de México, Istmo de Tehuantepec y Chimeneas Hidrotermales en la cuenca de Guaymas en Sonora).

Se aislaron 37 cepas que crecieron en medio selectivo para bacterias hidrocarbonoclasticas, cada una de estas cepas fue sometida a un proceso de aislamiento de plásmidos y las muestras obtenidas fueron corridas electroforéticamente en geles de agarosa al 0.6%, aplicando una diferencia de potencial de 80 V. Se utilizaron como plásmidos de referencia el TP116 (143 MDa), R27 (112 MDa) y el RP4 (36-38 MDa); contenidos todos ellos en una cepa bacteriana silvestre resistente a los antibióticos kanamicina y estreptomycin.

Los datos obtenidos revelan que existe una similitud en cuanto al tipo de plásmidos y la región del país. En las muestras del Golfo de México se han encontrado plásmidos de los tipos CAM-OCT > 100, CAM 150 y TOL^{*}-K; en la Chimeneas Hidrotermales, los tipos CAM-OCT > 100, CAM 150, SAL 42 y SAL 51 o NAH; mientras que en el Istmo de Tehuantepec, unicamente se encontró un plásmido del tipo CAM-OCT > 100.

También se muestra que en regiones de mayor contaminación con petróleo, al igual que en una región en la que se están produciendo hidrocarburos, el número de plásmidos degradativos es mayor que en una región menos impactada por hidrocarburos.

Se realizaron 29 pruebas bioquímicas practicadas a 30 de las cepas obtenidas con ello, se demostró que la mayoría de estas cepas pertenecen al género *Pseudomonas*.

INTRODUCCION.

Se cree que la tierra se formó hace 4500-4800 millones de años, cuando su atmósfera reductora consistía probablemente de vapor de agua, metano, sulfuro de hidrógeno y dióxido de carbono. El periodo de evolución química ha continuado por cerca de un tercio de la historia de la tierra, seguida por la evolución biológica después del nacimiento de la vida primitiva.

Los primeros organismos pudieron haber sido heterótrofos anaeróbicos. Posteriormente, la predominancia pasó a organismos capaces de asimilar dióxido de carbono usando compuestos azufrados de hidrógeno primero y después agua como donador de hidrógeno con la ayuda de la luz del sol. La atmósfera gradualmente se tornó oxidadora debido a la liberación de oxígeno molecular. Entonces, durante el último tercio de la historia de la tierra, predominaron los organismos aerobios conteniendo la maquinaria capaz de proporcionar energía usando la molécula de oxígeno como aceptora de hidrógeno. Los compuestos de carbono fueron utilizados como fuentes de energía.

La mineralización del carbono orgánico es ampliamente llevada a cabo por microorganismos. Los compuestos aromáticos y materiales insolubles en agua son descompuestos aeróbicamente, y la etapa inicial de la descomposición es catalizada por una enzima oxigenasa, que requiere oxígeno molecular. Así, es razonable asumir que los sistemas de biodegradación aerobia para compuestos orgánicos son componentes relativamente nuevos de los sistemas enzimáticos. Microorganismos que están ampliamente distribuidos en el suelo y en ambientes acuosos muestran tales habilidades degradativas; por ejemplo, las versátiles actividades del género *Pseudomonas* son bastante conocidas, su amplio rango de actividades bioquímicas no es dependiente de la especificidad de especies, sino que es específica de cepas y los resultados experimentales indican que no hay reversión en el fenotipo cuando una célula bacteriana ha perdido una actividad. Estas observaciones condujeron al descubrimiento de los plásmidos degradativos (también conocidos como plásmidos metabólicos) (Yano, K., 1980).

Como componentes extracromosomales, los plásmidos ayudan a determinar los fenotipos de cepas bacterianas particulares. El estudio de los plásmidos involucrados en el metabolismo de hidrocarburos provee algunas perspectivas en cuanto a la funcionalidad de ellos y su transferencia a las células hijas y determinar nuevas propiedades celulares; así como la función que los plásmidos han tenido en la evolución de cepas bacterianas mejor adaptadas (Shapiro y col., 1980).

Virtualmente todos los ecosistemas marinos contienen bacterias degradadoras de hidrocarburos, estas comprenden menos del 1% de la comunidad bacteriana en ambientes sin contaminación, pero generalmente se incrementan del 1 al 10% después de que al ambiente ha sido contaminado con petróleo. Varios hidrocarburos son degradados por estos microorganismos en diferentes porcentajes. Algunos hidrocarburos asfálticos no son degradados, afortunadamente esos hidrocarburos son insolubles en agua o se unen a materiales sólidos, así que no se encuentran biológicamente disponibles, por lo que no son tóxicos para los organismos marinos.

El bióxido de carbono y la biomasa celular producidos por los microorganismos a partir de hidrocarburos degradables pueden ser aprovechados por consumidores de detritos y constituyen los productos finales de los procesos de degradación biológica (Atlas, 1993).

A partir del descubrimiento de que diversos tipos de microorganismos pueden llevar a cabo la fragmentación o degradación de varios tipos de hidrocarburos en diferentes ambientes, los estudios referentes al tema se han incrementado. Los microorganismos con tales capacidades biodegradativas son de amplia distribución en el suelo y en ambientes acuosos, y exhiben tales habilidades degradativas; como por ejemplo, las versátiles actividades del género *Pseudomonas*.

I.-ANTECEDENTES

I.1.-EL PETROLEO

El petróleo es un producto natural, resultado de la conversión anaeróbica de la materia orgánica a altas temperaturas y presiones. Existen varios cientos de componentes individuales en el petróleo crudo y la composición de este varía según su origen (hidrocarburos alifáticos, alicíclicos, aromáticos, etc., tabla I).

Tabla I.-Constituyentes del petróleo (Morrison y Boyd, 1973).

COMPUESTO	NUMERO DE CARBONOS
Gas	C1-C4
Eter de Petróleo	C5-C6
Ligroina (Nafta Ligera)	C6-C7
Gasolina Natural	C5-C10 y Cicloalcanos
Kerosén	C12-C18 y Aromáticos
Gasóleo	C12 y Superiores
Aceite Lubricante	Probablemente Cadenas Largas Unidas a Estructuras Cíclicas
Asfalto o Coque de Petróleo	Estruct. policíclicas

I.2.-SUSCEPTIBILIDAD A LA BIODEGRADACION.

Muchos de los hidrocarburos están sujetos a la biodegradación pero en porcentajes relativamente bajos. La susceptibilidad a la biodegradación, por una parte, está en función del tipo y tamaño de molécula de hidrocarburo. Los n-alcanos de longitud de cadena intermedia (C10-C24) son degradados rápidamente. Alcanos de cadena corta resultan tóxicos para muchos microorganismos, pero generalmente estos hidrocarburos se evaporan rápidamente. Alcanos de cadena muy larga presentan una mayor resistencia a la biodegradación (peso molecular entre 500-600). Los componentes alicíclicos son frecuentemente incapaces de servir como única fuente de carbono para el crecimiento microbiano, a menos que tenga una cadena alifática suficientemente larga. Los componentes

aromáticos, son degradados más lentamente que los alcanos, lo anterior se muestra en la tabla II.

En estudios realizados sobre derrames de petróleo en ambientes marinos se ha encontrado que el porcentaje de degradación depende de un gran número de factores, incluyendo el estado de dispersión del petróleo (**Floodgate**, 1972). Las principales fuerzas que limitan la biodegradación del petróleo contaminante en el mar son: baja temperatura del agua, escasez de nutrientes minerales (especialmente nitrógeno y fósforo), agotamiento de oxígeno disuelto en el agua y áreas pelágicas sin contaminación previa o escasez de microorganismos degradadores de hidrocarburos, tabla III.

Tabla II.-Susceptibilidad a la biodegradación de acuerdo con el tipo de hidrocarburos (**Floodgate**, 1972).

LONGITUD DE LA CADENA	BIODEGRADACION
Muy Corta (C2-C4)	Generalmente tóxicos. No son degradados
Corta (C5-C9)	Lenta
Media-Larga	Rápida
Muy Larga (500-600 de PM.)	Muy difíciles
Alicíclicos	Generalmente ausente
Aromáticos	Menor que la de los n-alcanos

AGUA COORDINACION DE SERVICIOS
 DOCUMENTACION Y BIBLIOTECA

Tabla III.-Factores que Limitan la Biodegradación del Petróleo en el Mar (**Floodgate**, 1972).

-Baja temperatura del agua.
-Escasez de nutrientes minerales (N y P) principalmente.
-Agotamiento de oxígeno disuelto en el agua.
-Áreas pelágicas sin contaminación previa.
-Escasez de microorganismos hidrocarbonoclasticos.

I.3.- ASPECTOS QUIMICOS EN LA BIODEGRADACION DEL PETROLEO.

A) Ataque Sobre n-Alcanos.

El ataque inicial sobre los n-alcanos ocurre por uno de tres mecanismos posibles:

a) Mecanismo I.

El ataque por medio de una enzima oxidasa al grupo metilo terminal formando un alcohol primario, que posteriormente es oxidado a un aldehído y después a un ácido graso. Este mecanismo de ataque primario es el más frecuente. Ocasionalmente, ambos grupos metilo terminales son oxidados de esta manera, resultando la formación de un ácido dicarboxílico. Esta variación descrita como *omega*-oxidación o diterminal, es una de las posibles formas para bloquear la *beta*-oxidación debido a la ramificación de la cadena carbonada.

b) Mecanismo II.

Este mecanismo involucra una deshidrogenación directa resultando un 1-alcano, que es metabolizado a un alcohol, a un aldehído, y finalmente a un ácido graso. Esta ruta es muy importante ya que en ausencia de oxígeno molecular, la biodegradación del alcano no se ha observado.

c) Mecanismo III.

El tercer mecanismo involucra la formación de un alquil hidróxido, que es convertido directamente a un ácido graso saltándose la etapa de alcohol y aldehído. Una vez formado el ácido graso, es metabolizado vía *beta*-oxidación. Algunas bacterias atacan los alcanos subterminalmente, el oxígeno es insertado en un átomo de carbono dentro de la cadena a un lado del extremo. De esta manera, primero se forma un alcohol secundario, que por oxidación es metabolizado a una cetona y finalmente a un éster. El enlace éster es roto proporcionando un alcohol primario y después un ácido graso, metabolizado posteriormente por la vía de la *beta*-oxidación.

B) Ataque sobre hidrocarburos alicíclicos.

Los hidrocarburos alicíclicos sin grupo metilo terminal son biodegradados a través de un mecanismo similar al anterior (mecanismo III para n-alcanos). En el caso del ciclohexano, la hidroxilación por medio de una enzima

oxidasa conduce a la formación de un alcohol alicíclico. La deshidrogenación proporciona una cetona, y una oxidación posterior inserta un átomo de oxígeno en el anillo y se forma una lactona. El hidroxilo es oxidado en secuencia a un aldehído y a un carboxilo. El ácido dicarboxílico resultante es metabolizado vía *beta*-oxidación.

Se han encontrado microorganismos que pueden crecer en ciclohexano, de esta manera deben ser capaces de llevar a cabo toda la secuencia de degradación. Más frecuentemente, los microorganismos capaces de convertir el ciclohexano a ciclohexanona son incapaces de lactonizar y abrir el anillo y *vice versa*, en consecuencia, el cometabolismo tiene una gran importancia en la biodegradación de hidrocarburos alicíclicos.

C) Ataque sobre hidrocarburos aromáticos.

Los hidrocarburos aromáticos son oxidados a catecol en una o varias etapas. El anillo aromático dihidroxilado es abierto mediante el rompimiento oxidativo orto resultando un ácido *cis-cis* mucónico. El ácido es metabolizado a un ácido *beta*-cetoadípico y a su vez roto oxidativamente a los intermediarios comunes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos; ácido succínico y acetyl CoA.

Alternativamente el anillo de catecol puede ser abierto por un rompimiento *meta* proporcionando semialdehído 2-hidroxi-*cis-cis*-mucónico. El metabolismo posterior conduce a la formación de ácido fórmico, ácido pirúvico y acetaldehído. (Friede y col., 1972).

I.4.- BACTERIAS QUE DEGRADAN PETROLEO.

Diversos tipos de bacterias llevan a cabo la biodegradación de hidrocarburos, las bacterias acetogénicas pueden llevar a cabo una biodegradación de productos de la oxidación aeróbica de hidrocarburos, transformándolos en acetato, CO₂ y H₂ (Davydova-Charakhch'yan y col., 1992), tabla IV.

Los microorganismos más estudiados en la biodegradación de hidrocarburos son los del género *Pseudomonas*, en especial *P. putida*. Algunas cepas de *P. putida* y *P. aeruginosa* crecen a expensas de alcanos de 6-10 átomos de carbono sólo cuando contienen ciertos plásmidos del grupo IncP-2 (Grund y col., 1975; Neider y Shapiro, 1975)

Tabla IV.- Géneros de bacterias marinas conocidos hasta 1988 que pueden utilizar hidrocarburos como fuente de carbono (Schwartz y Leathen, 1976; ⁺Girard, 1988).

<i>Corynebacteria</i>	⁺ <i>Beneckea</i>
<i>Actinomyces</i>	⁺ <i>Brevibacterium</i>
<i>Micromonospora</i>	⁺ <i>Proactinomyces</i>
<i>Streptomyces</i>	⁺ <i>Pseudobacterium</i>
<i>Mycobacterium</i>	⁺ <i>Spirillum</i>
<i>Nocardia</i>	⁺ <i>Vibrio</i>
<i>Methanomonas</i>	
<i>Pseudomonas</i>	
<i>Acinetobacter</i>	
<i>Micrococcus</i>	
<i>Flavobacter</i>	
<i>Alkaligines</i>	
<i>Bacillus</i>	
<i>Arthrobacter</i>	
<i>Achromobacter</i>	

I.5.-MODELO PARA EXPLICAR LA BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS.

Resultados obtenidos por Benson y col., (1979), establecen las características de la oxidación de alcanos en *P. putida*. En estos estudios, se propone la partición espontánea de las moléculas de hidrocarburo en el interior de la bicapa de la membrana citoplasmática sin la intervención de un sistema de transporte específico (Mira y col., 1977). Una vez disuelta en la membrana que está en contacto con el citoplasma, la molécula difunde lateralmente hasta que se une con la alcano hidroxilasa, la cual se encuentra en contacto con la rubredoxina citoplasmática. La hidroxilación ocurre a expensas del O₂ y del NADH, y el aldehído reducido entra al citoplasma o es deshidrogenado también en la bicapa para formar un ácido graso. El carbono

del ácido graso es asimilado por las enzimas de la beta-oxidación que se encuentran solubles en el citoplasma (figura 1).

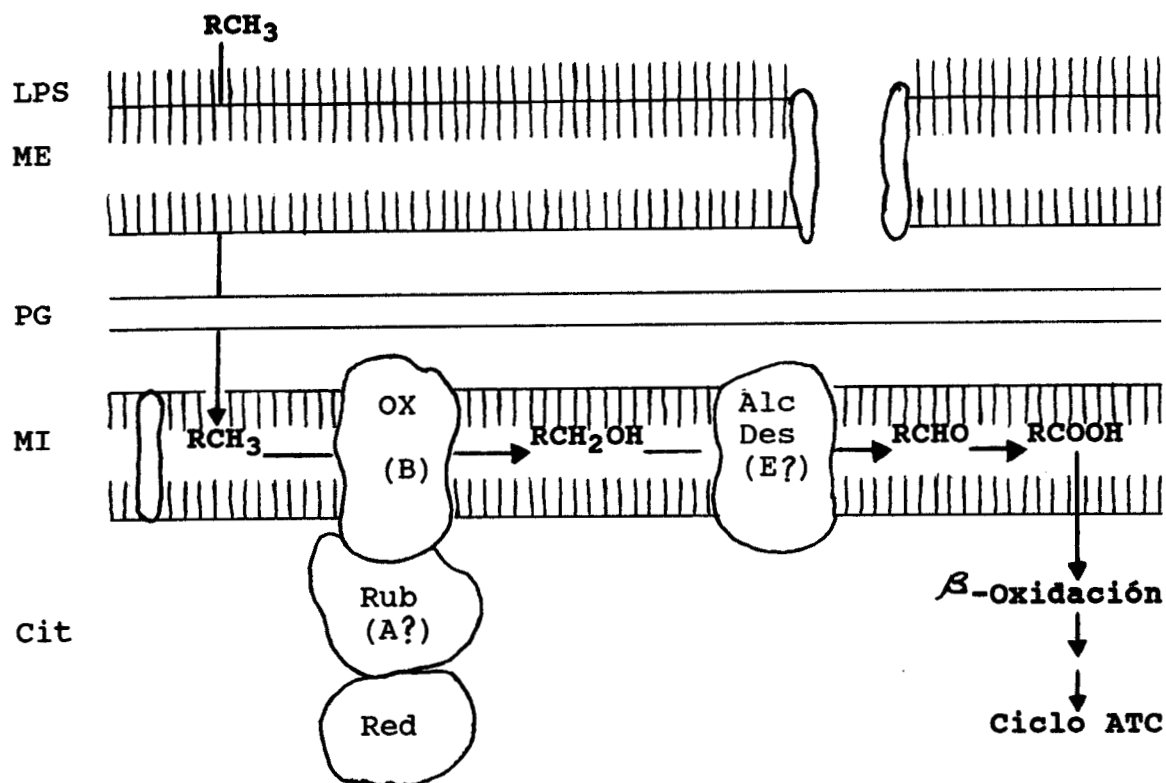


Figura 1.- Modelo que explica la biodegradación de hidrocarburos. Benson y col., 1979.

1.6.-TIPOS DE PLÁSMIDOS QUE INTERVIENEN EN LA BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS.

Los plásmidos son clasificados de acuerdo a su incompatibilidad. Los plásmidos que contienen parte de la información para degradar hidrocarburos, como los que degradan el alcanfor CAM, y n-alcanos OCT están dentro del grupo IncP-2. Los plásmidos que degradan naftalenos y tolueno NAH Y TOL están en el grupo IncP-9, por lo que no hay una relación directa entre la existencia independiente de un plásmido y la ruta metabólica fenotípicamente codificada en él, todos estos plásmidos fueron aislados originalmente de cepas de *P. putida* (tabla V).

El TOL es el más estudiado de los plásmidos degradadores de hidrocarburos aromáticos y provee un buen ejemplo de las interacciones hospedero-plásmido en varios niveles. Los genes de la oxidación de tolueno a piruvato y acetaldehído

pueden ser transferidos de *P. putida* a *Escherichia coli*. Sin embargo, estas células de *E. coli* Tol⁺ no crecen sobre tolueno, xilenos o sus intermediarios, aunque alguna oxidación puede ser detectada por la excreción de metabolitos coloreados en el medio (Jacoby y col., 1978; Nakazawa y col., 1978)

Tabla V.-Plásmidos que determinan la biodegradación de hidrocarburos en *Pseudomonas putida* (Sakaguchi y Okanishi, 1980).

Plásmido	Moléculas que Degradan	Peso Molecular (Mda)
CAM	Alcanfor	92, 150
OCT	n-Alcanos	> 100
NAH	Naftaleno	35, 51
TOL	Toluenos y Xilenos	63, 76-78
TOL*	ND	28
TOL	ND	48
TOL*-K	Toluenos y Xilenos	105
SAL	Salicilatos	42, 51

ND.-No Determinado

I.7.- RUTAS BIODEGRADATIVAS.

En las figuras 2 y 3 se presentan las rutas de biodegradación de compuestos aromáticos y para n-alcanos respectivamente, mostrando que parte de la información está contenida en los plásmidos y otra parte en el genoma bacteriano.

Recientemente Eaton y Chapman, (1992) reinvestigaron las reacciones involucradas en el metabolismo bacteriano del naftaleno a salicilato, para ello usaron la recombinación bacteriana que contiene genes clonados del plásmido NAH7. Para lograr lo anterior, células intactas de *P. aeruginosa* PA01 conteniendo fragmentos del ADN que codifican para las tres primeras enzimas de la ruta fueron incubadas con naftaleno. Cuando las células de *P. aeruginosa* PA01 conteniendo el plásmido pRE630 o un plásmido más pequeño, el

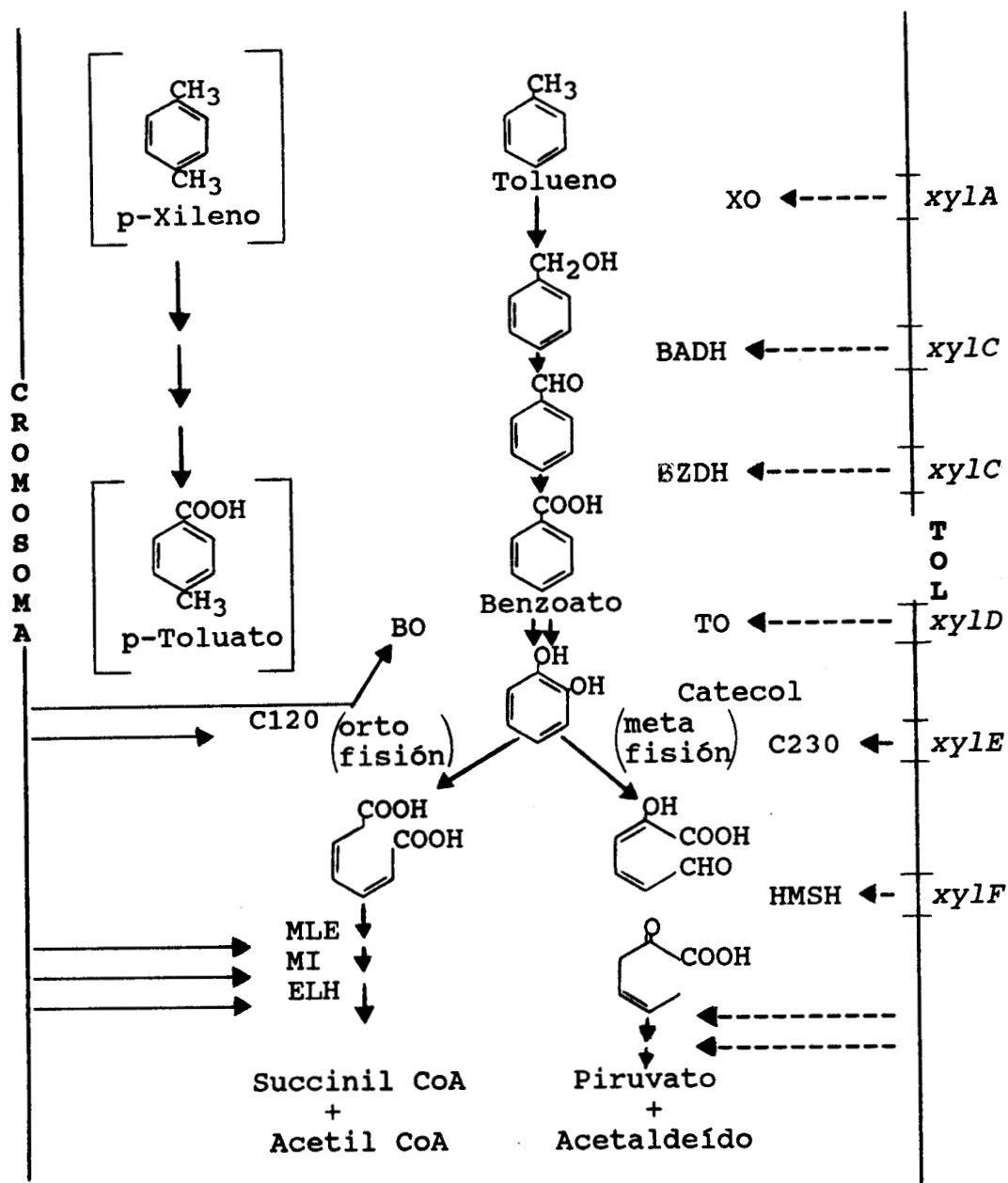


Figura 2. Ruta de oxidación para el Tolueno. Shapiro y col., 1980.

- XO= Xileno oxidasa
- BO= Benzoato oxidasa
- TO= Toluato oxidasa
- C120= Catecol 1,2-oxigenasa
- ELH= Lactona enol hidrolasa
- HMSH= 2-semialdehído hidromuconico hidrolasa
- BADH= Benzil alcohol deshidrogenasa
- BZDH= Benzaldehído deshidrogenasa
- MLE= Enzima muconato lactonizante
- MI= muconolactona isomerasa
- C230= Catecol 2,3-oxigenasa

pRE696 fueron incubadas durante 16 horas con naftaleno, transformaron este compuesto en un producto que fue extraído de los sobrenadantes acidificados usando dietil éter y posteriormente identificado como ácido salicílico.

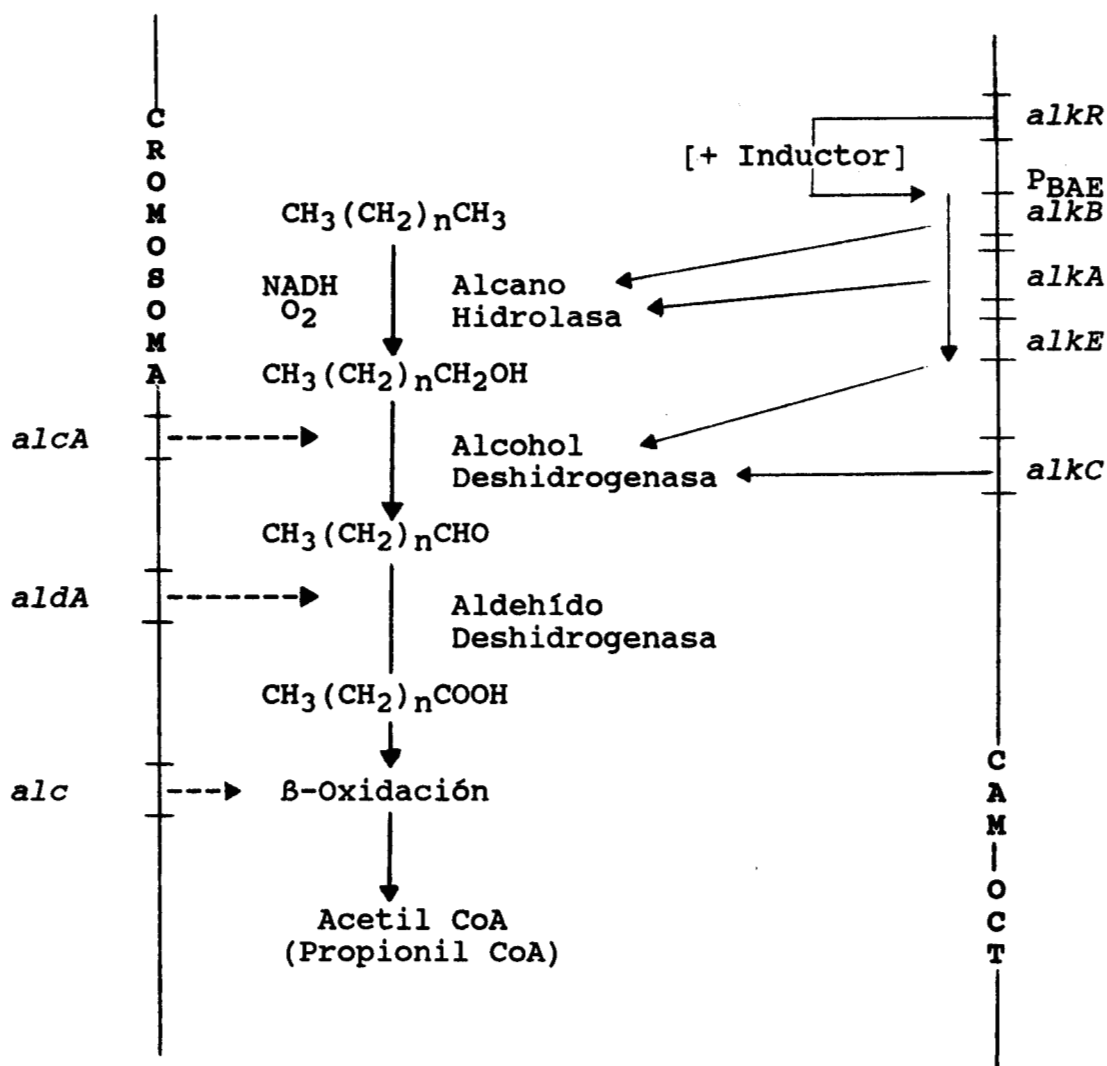


Figura 3.-Ruta de degradación para n-alcenos. Shapiro y col., 1980.

I.8.- MÉTODOS PARA AISLAMIENTO DE PLASMIDOS.

Varios plásmidos que se encuentran en cepas de *P. putida* y *P. aeruginosa* son frecuentemente difíciles de aislar, con lo que se ha promovido el desarrollo de protocolos adaptados específicamente para tal motivo. Con métodos que dependen de

la precipitación selectiva de complejos cromosomales empleando centrifugación a alta densidad o bien, por precipitación salina, los plásmidos grandes no permanecen en el sobrenadante, con lo que se tiene que incrementar el volumen celular. Otros métodos emplean una etapa de rompimiento del ADN cromosomal, que puede ayudar a liberar el plásmido. El ADN del plásmido es separado por centrifugación en equilibrio de densidad con cloruro de cesio-bromuro de etidio.

Fenewald y col., (1978) empleando endonucleasas de restricción encontraron que el ADN de plásmidos de cepas de *Pseudomonas* revelan pesos moleculares superiores a los 200 MDa para todos los plásmidos del grupo IncP-2 que examinaron. La fragmentación del ADN del plásmido no es sorprendente debido a su complejidad genética.

Birnboim y Doly, (1979) desarrollaron un método para el aislamiento de plásmidos, este es simple y permite el análisis empleando electroforésis en geles de agarosa. El método se basa en una desnaturalización alcalina del ADN cromosomal de alto peso molecular, mientras que el ADN circular covalentemente cerrado permanece en ese estado. El control del pH se lleva a cabo sin la necesidad de usar un potenciómetro. Después de la neutralización del pH, el ADN cromosomal se renaturaliza para formar una masa insoluble, permaneciendo el ADN de los plásmidos en el sobrenadante. Se han extraído pequeños y grandes plásmidos empleando este método.

JUSTIFICACION.

Los datos encontrados por Lizárraga-Partida y col., (1991) en el Golfo de México (altos índices de bacterias hidrocarbonoclasticas con respecto a bacterias heterótrofas totales), conducen a pensar que una intensa biodegradación de hidrocarburos está dándose en el área más importante del país en lo que se refiere a extracción de petróleo, y que es conducida por el sinergismo de factores bióticos y abióticos. El establecimiento de este tipo de zonas en diferentes regiones, encontradas no sólo en el Golfo de México, plantean la posibilidad de desarrollar un estudio encaminado a lograr establecer cuales son las bacterias y el tipo de plásmidos que les confieren la capacidad de poder degradar hidrocarburos, así como el tipo de moléculas que son degradadas.

Por otra parte, el hecho de que los plásmidos de aparición natural en diversas bacterias varíen marcadamente cuando provienen de hospederos aislados en diferentes regiones, plantea la necesidad de llevar a cabo un estudio referente a la identificación de este tipo de bacterias y su relación con plásmidos involucrados en la degradación del petróleo.

HIPOTESIS.

Se ha establecido que la biodegradación de los diferentes hidrocarburos presentes en ambientes marinos está en función del tipo de microorganismos, del tipo de plásmidos presentes en ciertas bacterias y de factores físicos y químicos del medio. De acuerdo con lo anterior, se propone la existencia de diferencias en el tipo de plásmidos contenidos en las bacterias relacionadas con la biodegradación del petróleo que se encuentran en diferentes regiones marinas del país.

OBJETIVO GENERAL.

Comparar los tipos de plásmidos presentes en las especies bacterianas que degradan hidrocarburos en ambientes marinos de tres regiones diferentes del país; Golfo de México, Istmo de Tehuantepec y chimeneas hidrotermales en la Cuenca de Guaymas en el estado de Sonora.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1.-Determinar la susceptibilidad a la biodegradación de una muestra de petróleo crudo proveniente del pozo Ixtoc I (localizado en la Sonda de Campeche), empleando las diferentes muestras bacterianas colectadas en cada una de las regiones en estudio.

2.- Obtener cepas puras de bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos que sean aisladas de las tres regiones marinas del país.

3.- Determinar la presencia o ausencia de plásmidos en las diferentes cepas obtenidas.

4.- Establecer los tipos de plásmidos presentes en las diferentes cepas de acuerdo con el peso molecular estimado.

5.- Establecer diferencias entre las regiones marinas y el tipo de plásmidos presentes en las cepas bacterianas.

6.- Determinar el tipo de bacterias presentes en las muestras en estudio.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

- I.- Selección de las muestras.
- II.- Aislamiento de microorganismos en medio sólido.
- III.- Resiembra hasta obtener cepas puras.
- IV.- Proliferación celular.
- V.- Aislamiento de plásmidos.
- VI.- Identificación de los plásmidos de acuerdo con su movilidad electroforética relativa.
- VII.- Relación entre regiones y el tipo de plásmidos.
- VIII.- Identificación bacteriana.

II.-DESARROLLO METODOLOGICO.

II.1.- SELECCION DE LAS MUESTRAS.

Durante esta etapa de selección se tomaron en cuenta 245 muestras de las tres regiones en estudio. De estas 180 correspondieron a la región del Golfo de México, 47 a la región del Istmo de Tehuantepec y 18 a la región de las Chimeneas Hidrotermales en la cuenca de Guaymas en el estado de Sonora.

Las muestras fueron inoculadas en viales de 20 ml de capacidad conteniendo 10 ml de medio Zobell líquido (esterilizado a 15 lb durante 20 min), específico para bacterias marinas, y colocados en incubadora a 30 °C durante 48 horas. De las muestras que presentaron crecimiento, fueron inoculados 200 µl de cada una de ellas en medio diluido para bacterias degradadoras de petróleo (10 ml por vial, más 50 µl de petróleo crudo), esterilizado a 10 lb durante 30 min.

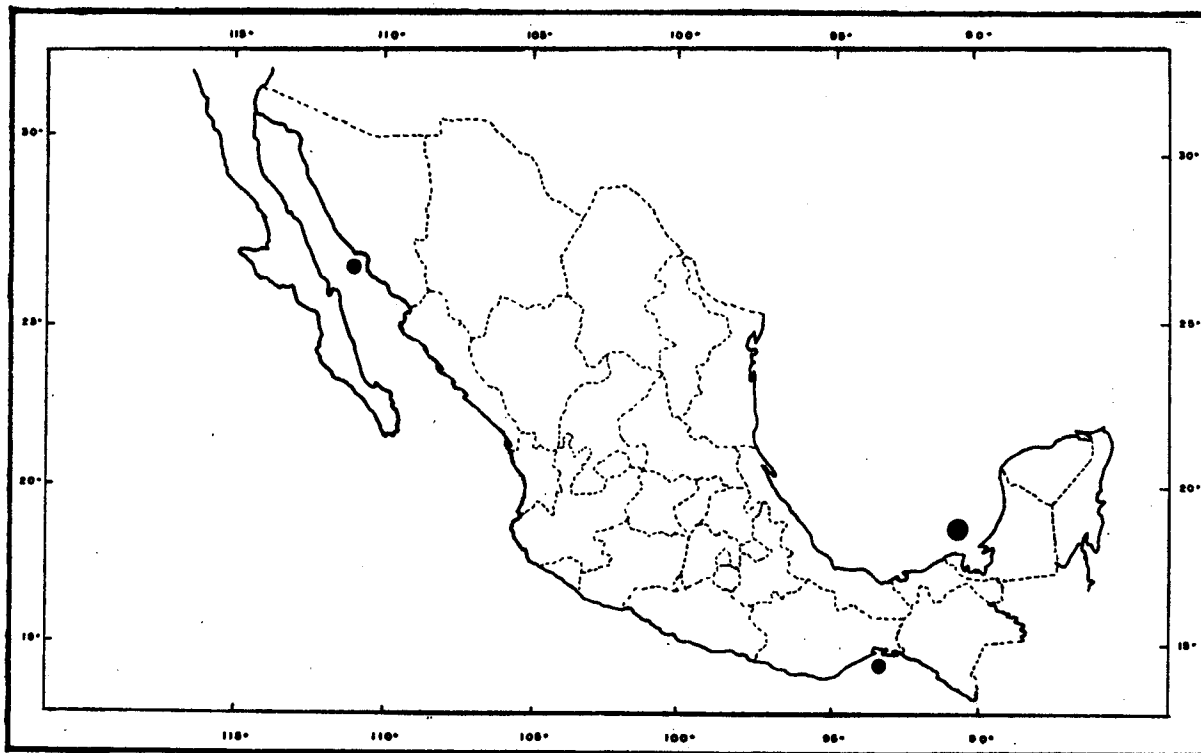
De las muestras del Golfo de México, 70 fueron seleccionadas por sus evidencias de degradar hidrocarburos; 5 fueron de la región del Istmo y 17 fueron de las Chimeneas Hidrotermales. Cabe aclarar que la selección se llevó a cabo con muestras que estuvieron en medio mineral concentrado, y como única fuente de carbono petróleo crudo del pozo petrolero Ixtoc I, este petróleo crudo fue del tipo Maya (pesado).

En la figura 4 se presenta la localización de las zonas de procedencia de las muestras seleccionadas. En la región del Golfo de México se recolectó a una profundidad de 10 m, excepto para la muestra de sedimento (S-35), que fue colectada a 60 m de profundidad; la localización de los muestreos fue: Latitud 18° 30' a 20 ° N y Longitud 90° 30' a 93° 30' W; las fechas de los muestreos fueron del 28 de Mayo al 12 de Junio de 1991.

La muestra seleccionada (287 a) de la región del Istmo de Tehuantepec fue colectada el 26 de Julio de 1992 frente a las costas de Salina Cruz a una Latitud de 16° 3' N y Longitud de 95° 14' W, a una prundidad de 30 m.

Las tres muestras seleccionadas de la región de las chimeneas hidrotermales fueron colectadas a una Latitud de 21° N y 109° W. La muestra 2347 fue colectada el 18 de Marzo de 1991 a una profundidad de 1700 m; la 2348 se colectó el 20 de Marzo del mismo año a una profundidad de 2500 m y finalmente, la muestra 2349 fue colectada el 21 de marzo a 2615 m de profundidad (Holger, 1991). En el apéndice se presenta una tabla de localización de las zonas de muestreo.

La biodegradación se midió por el grado de emulsión formada en cada una de las muestras. Este grado de emulsión se tomó como +, ++ o +++ (ver figuras 1 y 2 en resultados); siendo las tres cruces las que muestran un mayor grado de emulsión. Esta evaluación se llevó a cabo cada 10 días después de la inoculación. Cabe señalar que las muestras fueron colocadas en agitación a 150 rpm durante 6-8 horas diarias en promedio a temperatura ambiente (agitador Psycrotherm modelo G 27 de New Brunswick Scientific CO., Inc.). El análisis se realizó durante 2 meses, aunque las muestras han seguido degradando hidrocarburos durante varios meses más.



ZONAS DE MUESTREO ●

Figura 4.- Localización de las zonas de muestreo.

II.2.- AISLAMIENTO DE BACTERIAS EN MEDIO SOLIDO.

A) MEDIO ZOBELL SOLIDO.

De las muestras que degradaron petróleo, se tomaron 200 μ l para ser sembrados en cajas de Petri con medio Zobell sólido, se colocaron en incubadora a 28 °C durante 24-72 horas, dependiendo del crecimiento que se determinó en las cajas.

B) MEDIO A BASE DE SILICA GEL.

También se elaboró un medio sólido a base de sílica gel como soporte inerte, para sembrar en este medio en caso de que algunas bacterias pudieran degradar el agar (ver apéndice).

C) MEDIO LB PARA BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIOTICOS.

Este medio LB (Luria Bertani) se empleó exclusivamente para crecer cepas bacterianas que son resistentes a antibióticos (R-27, I53, J53, PSC 101 y H1040). De cada una de estas cepas, se tomó una asada y se inoculó en cada frasco que contuvo 10 ml de medio LB líquido estéril, suplementado con los antibióticos Kanamicina (50 μ g/ml) y estreptomycin (25 μ g/ml), y se colocaron en incubadora a 30 °C durante 48 horas. Después, se tomaron 400 μ l de estos cultivos y se inocularon en cajas de Petri con medio LB sólido estéril, se colocaron en incubadora a 30 °C durante 48 horas y se guardaron a 4 °C hasta su uso posterior.

II.3.- OBTENCION DE CULTIVOS PUROS.

Durante esta etapa se llevaron a cabo varias resiembras y diluciones de cada una de las muestras, hasta que en un análisis al microscopio de contraste de fases (Zeiss 473014-9901) se encontraran separados los tipos bacterianos presentes en cada muestra. Durante esta etapa se empleó el medio Zobell sólido descrito anteriormente.

Los factores que se tomaron en cuenta para determinar cuales son los tipos bacterianos que se tuvieron en cada muestra fueron de tipo morfológico, tanto a nivel microscópico como macroscópico (tamaño, forma, densidad vista al microscopio, movimiento, presencia de esporas, presencia o ausencia de inclusiones).

Posteriormente a cada cepa se le practicó la tinción de Gram, para establecer con base en esta prueba el tipo de

bacteria de que se trata. Cada una de estas cepas se guardó en viales conteniendo 7 ml de medio Zobell sólido colocado de forma inclinada y sembrando por estría. Las cepas crecidas de esta manera se conservaron en refrigeración a una temperatura de 4 °C hasta ser utilizadas para la determinación de la presencia de plásmidos en ellas y para realizar pruebas bioquímicas para poder establecer el tipo bacteriano de cada una de las cepas aisladas.

II.4.- PROLIFERACION CELULAR.

Cada una de las cepas fueron pasadas a medio Zobell líquido, incubadas a 28 °C durante 48 horas hasta alcanzar una densidad de proliferación adecuada. Después, 200 µl de estos cultivos fueron inoculados en viales con 10 ml de medio mineral para bacterias hidrocarbonoclasticas como se indicó anteriormente, se colocaron 50 µl de petróleo crudo a cada vial y se colocaron en agitación (150 rpm). Después de 10 días, 400 µl de estos cultivos fueron inoculados en cajas de Petri con medio Zobell sólido, se incubó de 24 a 48 horas, según el crecimiento que se observó.

II.5.- AISLAMIENTO DE PLASMIDOS (Birnboim y Doly, 1979).

A).- PLASMIDOS DE CEPAS RESISTENTES A ANTIBIOTICOS UTILIZADAS COMO REFERENCIA.

De los cultivos en medio LB sólido se tomaron 5 asadas con la ayuda de un asa estéril y fueron colocadas en un tubo Eppendorf de 1.5 ml de capacidad (previamente esterilizado) conteniendo 1 ml de medio LB líquido. Se homogeneizó agitando en mezcladora (Super-Mixer 1290 de Lab-Line Instruments, Inc.) a velocidad media, se centrifugó durante 15 s en microcentrífuga (Brinkmann modelo 5414). Posteriormente se removió cuidadosamente el sobrenadante con la ayuda de una pipeta Pasteur y se resuspendió la pastilla en 100 µl de una solución de lisozima a una concentración de 2 mg/ml, esta solución contiene además 50 mM de sacarosa, 10 mM de Na₂EDTA y 25 mM de Tris-HCl, pH 8.0 (Potenciómetro Corning modelo 7). Posteriormente se agitó en mezcladora y se incubó durante 30 min a 0 °C. Se agregaron 200 µl de una solución alcalina conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS), esta solución se preparó con NaOH 0.2N y 1% de (SDS). Se agitó en mezcladora cuidadosamente y se colocó a 0 °C durante 5 min. Posteriormente se agregaron 150 µl de solución de acetato de sodio 3 M ajustando el pH a 4.8 con ácido acético glacial, se mezcló por inversión cuidadosa durante unos segundos y se colocó a 0 °C durante 60 min,

después se centrifugó durante 5 min en microcentrífuga. El sobrenadante fue transferido a un segundo tubo Eppendorf y se agregó 1 ml de etanol frío y se colocó a -20°C durante 30 min. El precipitado fue colectado por centrifugación durante 2 min, se removió el sobrenadante y la pastilla fue disuelta en $100\ \mu\text{l}$ de una solución de acetato de sodio $0.1\ \text{M}/0.05\ \text{M}$ de Tris-HCl pH 4.8. Después se reprecipitó con 2 volúmenes de etanol frío y se colocó a -20°C durante 10 min. Se colectó el precipitado por centrifugación como antes y la pastilla fue disuelta en $40\ \mu\text{l}$ de agua destilada y se agregaron $10\ \mu\text{l}$ de solución amortiguadora de muestra 5X (sacarosa al 25%, acetato de sodio 5 mM, azul de bromofenol al 0.05% y SDS al 0.1%). De 7 a $10\ \mu\text{l}$ de estas muestras obtenidas fueron aplicados a geles de agarosa al 0.6% en amortiguador de corrida (40 mM de Tris, 20 mM de acetato de sodio, 2 mM de Na_2EDTA , pH 7.8 ajustado con ácido acético glacial) para el análisis electroforético.

Después de llevar a cabo la electroforésis a 80 V en celdas para electrofóresis MINI-SUB CELL de $7 \times 10\ \text{cm}$ y WIDE MINI-SUB CELL de $10 \times 15\ \text{cm}$, ambas de BIO RAD, con peines de 5, 10 y 30 pozos, y una fuente de poder regulada Savant Instruments Inc. modelo CVR 300. Los geles fueron teñidos y revelados con una solución de bromuro de etidio disuelto en agua destilada a una concentración de $0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ durante 15 min.

Una vez llevada a cabo el revelado de los geles, estos fueron colocados sobre una superficie negra para poder irradiarlos con una lámpara de luz UV (Raytech modelo LS-88, 115V, 0.16 A), a longitudes de onda larga y corta (250-320 nm y 320-400 nm respectivamente). Esto se hizo con el fin de hacer un exámen preliminar de los geles antes de ser llevados para ser analizados en un transiluminador equipado con cámara fotográfica.

Las fotografías de los geles fueron tomadas empleando un transiluminador Foto/Prep Fotodyne modelo 3-3500 equipado con cámara fotográfica Polaroid Instantánea modelo MP 4⁺, gentilmente facilitados por la Dra. Laura Ma Ongay del Departamento de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se utilizaron cartuchos de película Polaroid 667.

B).- PLASMIDOS DE CEPAS HIDROCARBONOCLASTICAS.

De una manera similar a lo que se realizó con las cepas resistentes a antibióticos, las cepas que corresponden a las bacterias degradadoras de petróleo fueron tratadas con el método de Birnboim H.C. y Doly J. (1979), sólo que en este caso se utilizó medio Zobell líquido y sólido. Las electroforésis fueron llevadas a cabo teniendo en cada uno

de los geles, una muestra de la cepa H1040 para poder comparar las distancias de migración del ADN de los plásmidos que contiene esta cepa y las distancias de migración en los pozos que contienen cada una de las cepas hidrocarbonoclasticas aisladas.

II.6.-IDENTIFICACION DE LOS PLASMIDOS DE ACUERDO CON SU MOVILIDAD ELECTROFORETICA RELATIVA.

222472

Los pesos moleculares de los plasmidos obtenidos serán presentados en tablas de acuerdo con el número de cepa y la región del país.

II.7.- RELACION ENTRE REGIONES Y PLASMIDOS.

Se construirá una tabla donde se muestren los tipos de plásmidos que resulten después de hacer una comparación entre los pesos moleculares estimados y los reportados en la literatura para poder establecer la similitud de plásmidos en cuanto a regiones.

II.8.- IDENTIFICACION BACTERIANA.

Se construirá también una tabla en la que se muestre el tipo de bacteria para cada una de las cepas aisladas. Para lo anterior, a cada una de las cepas se le practicarán las pruebas bioquímicas que están incluidas en el sistema de identificación **api Rapid 20 E** de los laboratorios bioMérieux Vitek, Inc., y algunas pruebas complementarias que fueron recomendadas.

III.- RESULTADOS.

III.1.- SELECCION DE LAS MUESTRAS.

En las tablas VI y VII se presentan las características de las muestras de cada una de las regiones de estudio que mostraron evidencias de haber degradado petróleo crudo. Unicamente se presentan las tablas de la región del Golfo de México y de la región de las Chimeneas Hidrotermales de la Cuenca de Guaymas, lo anterior es debido a que en la región del Istmo de Tehuantepec, se encontró que sólo una muestra (287 a) presentó un leve indicio de degradación del petróleo.

Tabla VI.- Muestras con actividad biodegradadora en el Golfo de México.

MUESTRA	DILUCION	CANTIDAD	GRADO DE EMULSION
8	-1	6	+++
"	-2	3	++
"	-3	4	++
95	-1	4	+++
"	-2	4	+++
"	-3	3	++
9-3	-2	3	+
9	-1	3	+
"	-2	2	+
"	-3	4	+
9-1	-2	4	+
9-3	-2	2	+
7-1	-2	4	+
7-2	-2	3	+
7-3	-2	1	+
85	-1	2	+++

Tabla VI, continuación.

"	-2	3	+
E-20	-1	3	+++
E-22	-1	3	+
"	-2	3	+
35	-3	1	+
42	-4	2	++

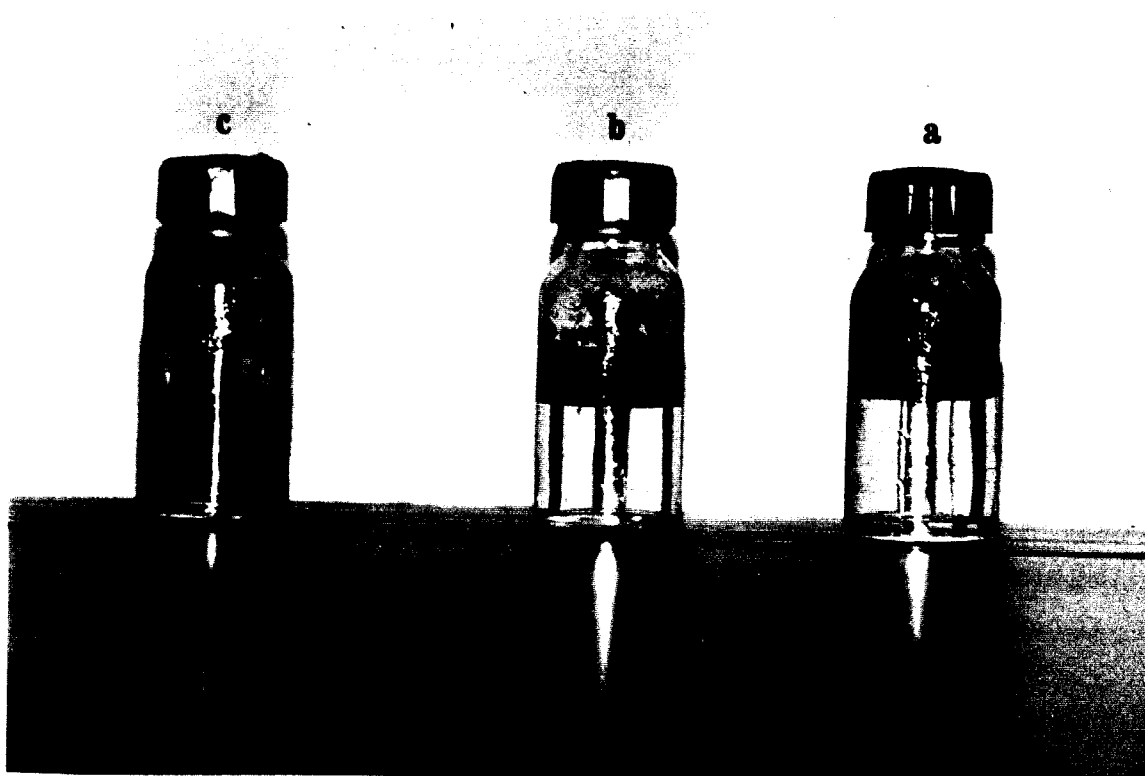
La mayoría de las muestras del Golfo de México que fueron seleccionadas, presentan un grado de emulsión bajo. Unicamente se tomaron 12 de estas muestras para seguir trabajando con ellas, más adelante se presentará una tabla en la que se presentan las muestras que se eligieron para el aislamiento de plásmidos.

Tabla VII.- Muestras con actividad biodegradadora en las Chimeneas Hidrotermales en la cuenca de Guaymas Sonora.

MUESTRA	DILUCION	CANTIDAD	GRADO DE EMULSION
2347	-1	2	+++
"	-2	3	+++
2348	-1	2	+++
"	-2	2	+++
"	-3	2	+++
2349	-1	1	++
"	-2	2	++
"	-3	3	+++

Contario a lo que se obtuvo en las muestras del Golfo de México, en las muestras de las Chimeneas Hidrotermales, se presentó un grado de emulsión bastante alto, por lo que se tomaron las muestras 2349 (-3); 2347 (-2) y la 2348 (-1) para seguir con el proceso de aislamiento de plásmidos.

Cabe señalar que después de los primeros 10 días de haber inoculado las muestras en el medio selectivo para bacterias degradadoras de petróleo, se registraron notorias evidencias del proceso degradativo, observándose una fragmentación de la capa de petróleo y una disminución del mismo; además, el medio inicialmente transparente, con el pasar de los días se observó turbio. Después de varios meses de haber hecho lo anterior, se pudo observar que en las muestras seleccionadas (tabla VIII), la degradación continúa, ya que al agitar los viales que contienen estas muestras, se puede apreciar que el grado de emulsión ha aumentado en algunas de ellas, esto es, se observan ahora gotas mucho más pequeñas en las muestras marcadas como ++ y +++ (figuras 5 y 6).



COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

Figura 5.- Grado de emulsión del petróleo producido por bacterias hidrocarbonoclasticas. a) No hubo degradación, b) Control, c) Degradación escasa (+).



Figura 6.- Grado de emulsión producido por bacterias hidrocarbonoclasticas. a) Degradación muy evidente (+++), b) Control, c) Degradación evidente (++) .

Tabla VIII.- Muestras seleccionadas para el aislamiento de plásmidos.

MUESTRA	DILUCION	REREGION
95	-1	Golfo de México
9-3	-2	"
8	-1	"
9-1	-2	"
7-1	-2	"
7-2	-2	"
85	-2	"

Tabla VIII, continuación.

E-20	-2	"
E-22	-2	"
S-35	-3	"
42	-4	"
2347	-2	Chimeneas Hidrotermales
2348	-1	"
2349	-3	"
287 a	-1	Istmo de Tehuantepec

III.2.- AISLAMIENTO DE BACTERIAS EN MEDIO SOLIDO.

De las 15 muestras seleccionadas, todas mostraron un crecimiento adecuado y se observó también que ninguna degradó el sustrato, es decir, en las muestras no se encuentran bacterias agarolíticas. Debido a lo anterior, se acordó no utilizar el medio a base de sílica gel en esta etapa y sólo se empleará sí durante la etapa de aislamiento de cepas se determinara que es más adecuado su uso.

III.3.- OBTENCION DE CULTIVOS PUROS.

En la tabla IX se muestran las características de cada una de las bacterias aisladas, como lo son: color y forma de la colonia, apariencia al microscopio, presencia o ausencia de espora, movimiento, etc.

Tabla IX.- Características de las cepas aisladas.

MUESTRA	CEPA	APAR.	INCLUS.	MOV.	GRAM	ARREGLO	FORMA
95	1	CE	No	Muy Rápido	-	S	b
"	2	CRG1	No	Muy Rápido	-	S	b
9-3	3	CR	No	Ligero	-	S, CV	b
"	4	CRP	No	Rápido	-	I	cb

Tabla IX, continuación.

"	5	TRPl	No	Vibrátil	-	CV	b
8	6	CTE	No	Muy Rápido	-	S, C2-4	b
"	7	CRMr	No	Ligero	-	S, C2-3	b
9-1	8	COE	No	Ligero	-	S, C2	b
"	9	CRP	No	Ligero Vib	-	S, C2	b
"	10	ARP	No	Ligero	-	S, C2	b
7-1	11	CRER	No	Muy Rápido	-	S, C2	b
"	12	CRM	No	Muy Rápido	-	CV	b*
7-2	13	CRI	No	Rápido Vib	-	C2-6	b+
"	14	CRM1	No	Ligero	-	C2-4	b
85	15	CTE	No	Ligero	-	S	b
S35	16	COE	No	Muy Rápido	-	S, C2-4	b
"	17	AORGl	No	Ligero Vib	-	S	b
"	18	CEr	No	Ligero Vib	-	S	b
"	19	CRPE	No	Muy Móvil	-	S	b
44	20	CRI	No	Ligero Vib	-	S	b
"	21	CE1	No	Ligero Vib	-	S, C2	b
E20	22	RRP	No	Ligero	-	S	cb
"	23	CRGr	Si	Rápido Vib	-	CV	b
"	24	CRM	No	Rápido	-	S	b*
E22	25	CE1	Si	Ligero	-	S	b*
2349	26	CRM	No	Ondulante	-	CI	cb
"	27	CRTER	No	Rápido Lin	-	S, C2	b
2848	28	CT	Si	Rápido Vib	-	S	b
2347	29	CT	No	Ond Vib	-	S, C2	b
"	30	CE1	No	Sum Rápido	-	S, C2-4	b

R27 o **TP117** y **RP4**, cuyos pesos moleculares son 143 Mda **Grindley y col.**, (1973); 112 Mda **Grindley y col.**, (1973) y 38-36 Mda **Meyers y col.**, (1976) respectivamente. Como se puede observar, la cepa H1040 contiene los tres plásmidos mencionados anteriormente. Esta cepa así como las demás, tiene la característica de ser enterobacteria de tipo silvestre y resistente a los antibióticos Kanamicina y Estreptomicina.

En esta fotografía se observa también el plásmido **R27** que se encuentra en las cepas R27 y J53 (carriles B y C respectivamente) y que aparece como una banda localizada a la altura de la banda central de la cepa H1040. En la cepa I53 (carril D), aparece una banda entre la que corresponde a la del plásmido **TP116** y la correspondiente a la del **R27**, el peso molecular de esta banda de acuerdo con la gráfica mostrada en la figura 9 es de 132 Mda.

En la figura 8, se muestra una fotografía de un gel en el que se presentan las cepas R27 (línea A), H1040 (líneas B y E), PSC101 (línea C), I53 (línea D). Nuevamente en la cepa H1040 se presentan las tres bandas correspondientes a los plásmidos **TP116**, **R27** y **RP4**. La cepa PSC101 parece tener dos plásmidos; uno alrededor de 110 Mda y otro de 120 Mda.

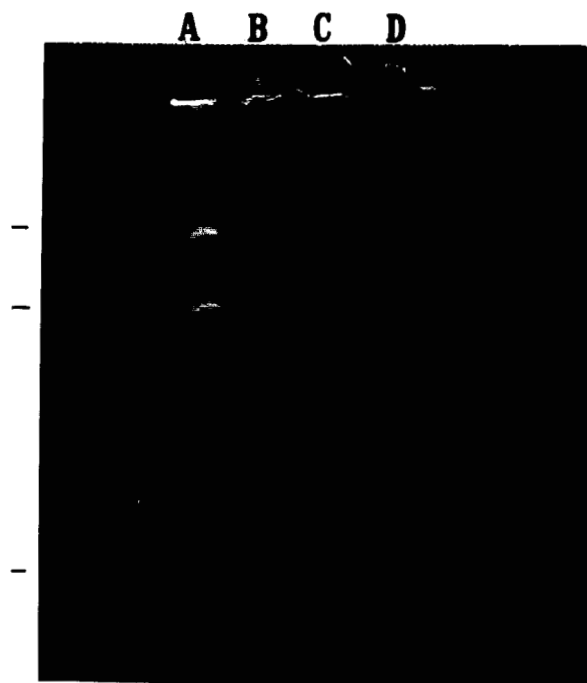


Figura 7.- Gel de agarosa sujeto a electroforésis. A) cepa H1040; B) cepa R27; C) cepa J53; D) cepa I53. En A la banda superior corresponde al plásmido **TP116**; la segunda banda corresponde al **R27**; la tercer banda no se ha determinado a que plásmido corresponde (74 MDa), y la banda inferior corresponde al **RP4**.

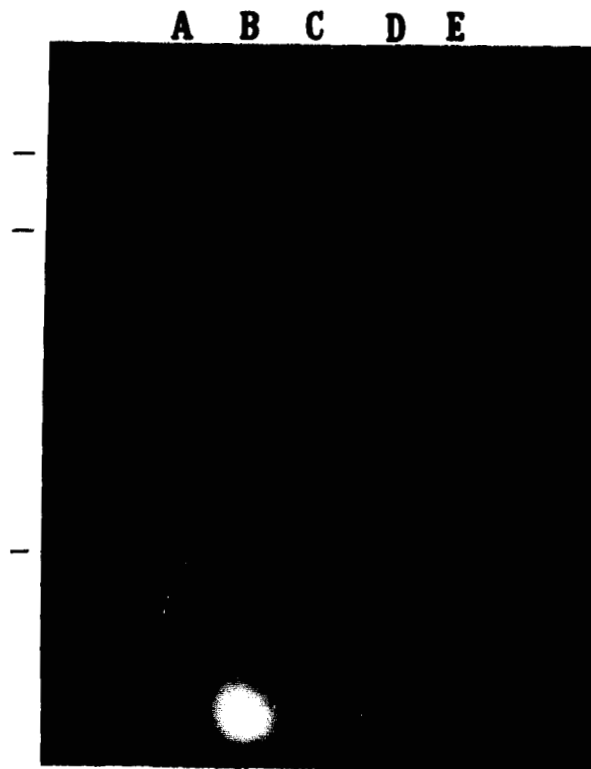


Figura 8.- Fotografía de un gel de agarosa sujeto a electrofóresis. A) cepa R27, B) cepa H1040, C) cepa PSC 101, D) cepa J53 y E) cepa H1040. Las características del gel y las condiciones de la electroforésis fueron similares a las del gel de la figura 7.

En la figura 9 se muestra una gráfica del logaritmo de la movilidad relativa (eje X) y el peso molecular en MDa (eje Y) y que es el resultado del análisis de 7 geles de electroforésis, provenientes de 4 preparaciones distintas y que corresponden a geles similares a los de las figuras 7 y 8. La recta de la gráfica fue ajustada con el método de mínimos cuadrados. Los parámetros de regresión lineal fueron: Pendiente (a) = -205.46×10^6 ; Ordenada al origen (b) = 2.06×10^8 ; Coeficiente de correlación (r) = 0.98.

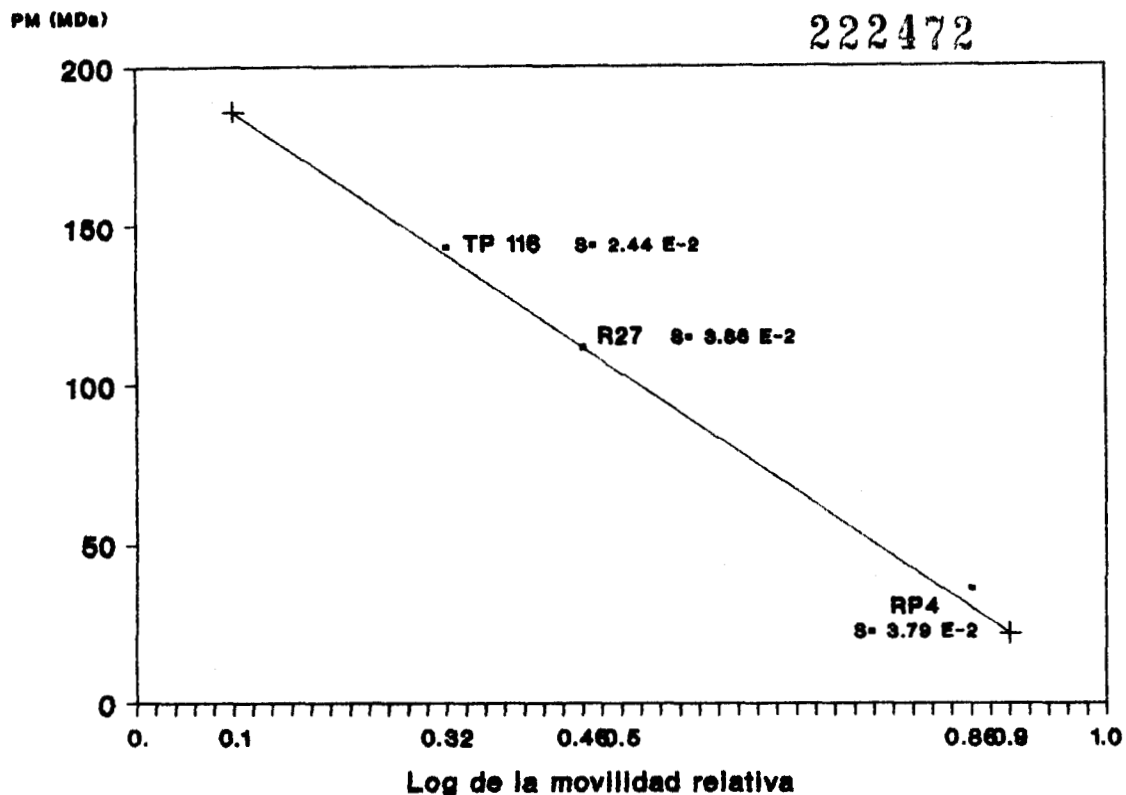


Figura 9.- Logaritmo de la movilidad relativa del ADN de los plásmidos TP116, peso molecular de 143 MDa; R27, peso molecular de 112 MDa y RP4 peso molecular de 36 MDa.

Una vez que fueron obtenidos los geles con los plásmidos de referencia, estos fueron sometidos a electroforesis junto con preparaciones de cultivos de bacterias hidrocarbonoclasticas. En la figura 10 se muestra la fotografía de un gel en el que se corrieron las preparaciones de las cepas de referencia H1040 (líneas A y J) y R27 (línea B). En las líneas C, D, E, F, G, H e I se corrieron las preparaciones correspondientes a los cultivos

de bacterias hidrocarbonoclasticas 1, 2, 3, 4, 5, 11 y 12, que pertenecen a las muestras 95 (1 y 2); 9-3 (3, 4 y 5) y 7-1 (11 y 12), tres de las muestras del Golfo de México. La ecuación de regresión lineal para este gel fue $Y = -205.46 \times 10^6 (X) + 206.43 \times 10^6$.

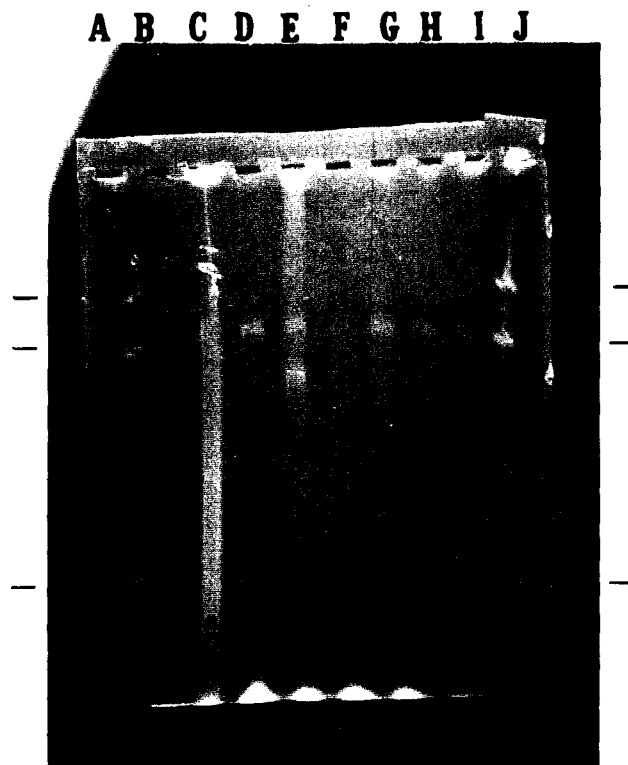


Figura 10.- Electroforésis del ADN de los plásmidos TP116, R27 y RP4 (líneas A y J), R27 (línea B) y de las muestras 95, cultivos 1 y 2 (líneas C y D); 9-3, cultivos 3, 4 y 5 (líneas E, F y G) y 7-1, cultivos 11 y 12 (líneas H e I).

En la tabla X se presentan los datos de el número de bandas y de los pesos moleculares calculados a partir de las distancias de migración relativas y de la ecuación de regresión lineal $Y = -205.46 \times 10^6 (X) + 206.43 \times 10^6$, obtenida a partir de las bandas de referencia que se observan en las líneas A y J.

Tabla X.- Número de bandas y los pesos moleculares estimados encontrados en 7 cultivos bacterianos provenientes de 3 muestras del Golfo de México.

POZO	CEPA	MUESTRA	Nº BANDAS	PESO MOLECULAR (MDa)
1	H1040	H1040	3	35.89, 110.68 y 143.35
2	R27	R27	1	106.76
3	1	95	1	123.01
4	2	95	1	123.01
5	3	9-3	2	98.11, 123.01
6	4	9-3	1	103.09
7	5	9-3	1	102.09
8	11	7-1	1	103.27
9	12	7-1	1	103.27
10	H1040	H1040	3	35.89, 110.60 y 143.35

Como se puede apreciar en los datos de la tabla X, los pesos moleculares estimados de la forma descrita anteriormente, revelan que para la cepa de referencia, los tres plásmidos poseen pesos muy similares a los que se mencionan en las referencias y que son 143, 112 y 36 MDa respectivamente (Hansen y Olsen, 1978). Además, los cultivos 1-3 presentan un plásmido de 123 MDa, al igual que los cultivos 4, 5, 11 y 12 presentan un plásmido de 102-103 MDa; mientras que el cultivo 3 revela además un plásmido de 98 MDa.

En la figura 11 se presenta la fotografía de un gel en el que se incluyeron además de la cepa de referencia, los cultivos restantes correspondientes a la región del Golfo de México, es decir; muestra 8 (6 y 7), muestra 9-1 (8-10), muestra 7-2 (13 y 14), muestra 85 (15), muestra S35 (16-19), muestra 44 (20 y 21), muestra E20 (22-24) y la muestra E22 (25). Las líneas que corresponden a los pozos 1, 2, 5, 9, 11, 14, 20, 23, 25 y 30 no contuvieron muestra alguna.

Los pozos 10 y 24 contuvieron la cepa de referencia H1040, y las muestras de los cultivos fueron colocados como se muestra en la tabla XI.

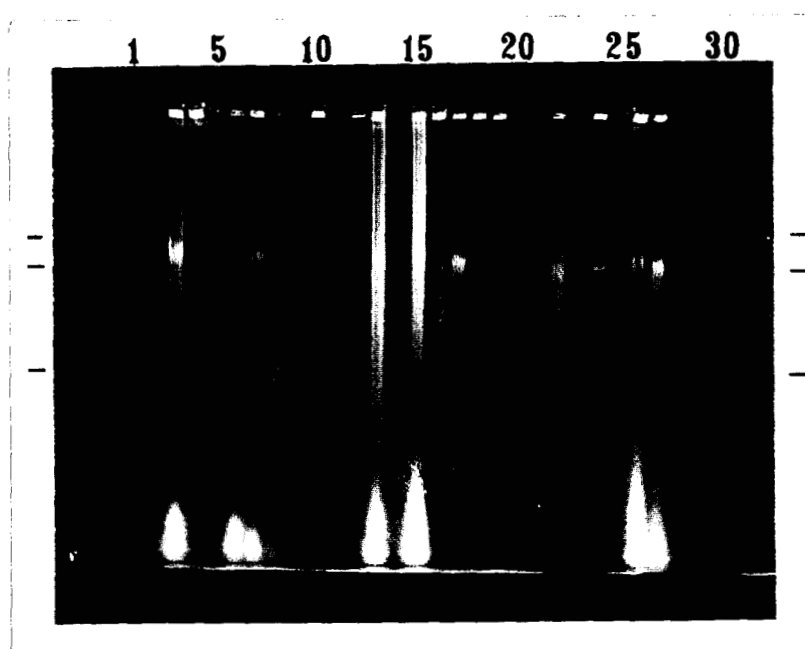


Figura 11.- Gel de electroforésis de 8 muestras de cultivos que corresponden a la región del Golfo de México. Cepa de referencia pozos 10 y 24. Muestra 8, cultivos 6-7 (pozos 3-4); muestra 9-1, cultivos 8-10 (pozos 6-8); muestra 7-2, cultivos 13-14 (pozos 12-13); muestra 85 cultivo 15 (pozo 15); muestra S35 cultivos 16-19 (pozos 16-19); muestra 44 cultivos 20-21 (pozos 21 y 22); muestra E20 cultivos 22-24 (pozos 26-28) y muestra E22 cultivo 25 (pozo 29). Los pozos 1, 2, 5, 9, 11, 14, 20, 23, 25 y 30 no contuvieron muestra.

Tabla XI.- Número de bandas y los pesos moleculares estimados de 18 cultivos bacterianos provenientes de 8 muestras del Golfo de México.

POZO	CEPA	MUESTRA	BANDAS	PESO MOLECULAR (MDa)
3	6	8	1	116.85
4	7	8	0	0
6	8	9-1	1	108.36
7	9	9-1	1	116.36
8	10	9-1	1	102.69
10	H1040	H1040	6	38.21, 51.27, 70.04,

Tabla IX, continuación.

				109.71, 139.08 y
				179.86
12	13	7-2	2	108.32, 146.72
13	14	7-2	0	0
15	15	85	0	0
16	16	S35	1	107.41
17	17	S35	1	107.41
18	18	S35	2	107.41, 140.81
19	19	S35	1	106.72
21	20	44	0	0
22	21	44	2	102.69, 140.81
24	H1040	H1040	6	37.10, 48.29, 67.94,
				109.55, 138.22 y
				175.60
26	22	E20	1	110.41
27	23	E20	1	108.32
28	24	E20	0	0
29	25	E22	0	0

Los cultivos 7, 14, 15, 20, 24 y 25 no mostraron banda en diferentes preparaciones como se muestra en la figura 11 y en la tabla XI. Lo anterior se presentó a pesar de haber realizado 3 preparaciones distintas con diferentes cultivos en medio sólido. Los cultivos anteriores mostraron bandas similares en un gel en el que se incluyeron algunas de éstas cepas de las tres regiones en estudio.

Sí se analizan detenidamente los datos de la tabla XI, se notará que los pesos moleculares estimados para los plásmidos encontrados caen dentro de los valores de 102, 108, 110, 116, 140 y 146 MDa para las muestras del Golfo de México analizadas. Al comparar estos valores con los mostrados en la tabla X, los cuales corresponden también a

algunas de las muestras de la misma región, se encuentra que son muy similares entres si, a pesar de tratarse de corridas electroforéticas diferentes. La ecuación de regresión lineal empleada para estimar los pesos moleculares en la tabla XI, fue la siguiente: $Y = -3.18 \times 10^8 (X) + 2.7 \times 10^8$.

En la figura 12 se muestra la fotografía de un gel de electroforésis en el que se colocaron preparaciones de cultivos provenientes de muestras de las regiones de las Chimeneas Hidrotermales y la muestra del Istmo de Tehuantepec.

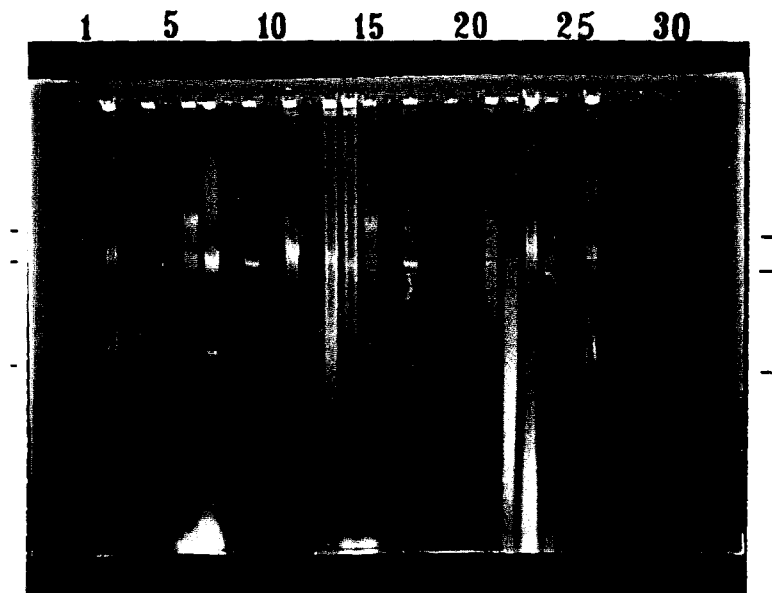


Figura 12.- Gel de electroforésis para las muestras de las Chimeneas Hidrotermales y para la muestra del Istmo de Tehuantepec. Cepa de referencia pozos 2, 9 17 y 26 (plásmidos TP 116, R27 y RP4 bandas 2, 3 y 6 respectivamente). Muestra 2349, cultivos 26(I), 26 y 27 (pozos 4, 6 y 7); muestra, 2348 cultivo 28 (pozo 11); muestra 2347, cultivos 29-31 (pozos 13-15); muestra 287a, cultivos 32-36 (pozos 21-24). Los pozos 1, 3, 5, 8, 10, 12, 16, 18, 19, 25, 27 y 30 no contuvieron muestra.

Los cultivos 32-34 no mostraron banda alguna, estos corresponden a la muestra proveniente de la región del Istmo

de Tehuantepec (tabla XII). Durante todo el proceso de aislamiento de plásmidos, nos percatamos de que en la muestra 26, existían 2 tipos bacterianos diferentes, por lo que se le denominó a uno de ellos 26 (I) y al otro 26, como se señala en la figura 12 y en la tabla XII. Los pozos que no se han incluido en la tabla no contenían muestra.

Tabla XII.- Número de bandas y pesos moleculares estimados para los cultivos de las 3 muestras de las Chimeneas Hidrotermales y para la muestra del Istmo de Tehuantepec.

POZO	CEPA	MUESTRA	BANDAS	PESO MOLECULAR (MDa)
2	H1040*	H1040*	3	55.14, 117.29, 174.77
4	26(I)	2349	1	157.79
6	26	2349	2	117.36, 158.99
7	27	2349	3	43.34, 50.72, 117.36
9	H1040	H1040	6	39.41, 55.70, 64.72, 111.82, 146.15 y 186.61
11	28	2348	1	118.07
13	29	2347	1	118.07
14	30	2347	1	111.82
15	31	2347	1	151.41
17	H1040	H1040	5	39.41, 55.70, 64.72, 111.82 y 146.15
20	32	287a	0	0
21	33	287a	0	0
22	34	287a	0	0
23	35	287a	1	120.93
24	36	287a	1	113.88
26	H1040*	H1040*	3	46.77, 113.19, 177.7

* Indica que el cultivo de esta cepa se cosechó después de una semana de haber sido sembrado.

La ecuación que se empleó para la estimación de los pesos moleculares del gel de la figura 12 fue $Y = -3.33 \times 10^8 (X) + 2.88 \times 10^8$.

Un aspecto que se puede observar en los datos de la tabla XII, es que la cepa control, después de varias veces de haber sido inoculada en medio LB líquido suplementado con los antibióticos Kanamicina y Estreptomina, empezó a mostrar bandas que no se habían notado en las primeras preparaciones, lo cual nos lleva a pensar lo siguiente: los dos antibióticos provocan la aparición de bandas nuevas y que la resistencia a antibióticos por parte de esta cepa se ha incrementado, esto se ha comprobado en los cultivos al empezar a notar colonias rugosas y colonias lisas, siendo que inicialmente sólo se presentaban colonias de aspecto liso. Aunque al hacer preparaciones de ambas colonias, se observan patrones de bandas muy similares.

O bien, la forma de los plásmidos ha sido alterada pudiéndose tratar de una mezcla de plásmidos de la forma circular covalentemente cerrada (CCC), cadenas abiertas, (OC), cadenas lineales abiertas (COL) o incluso dímeros de ellos.

Otro hecho que se debe recalcar es que al llevar a cabo la siembra en cajas de Petri empleando la técnica del rastrillado con triángulo de vidrio, para tener un cultivo en placa lo suficientemente abundante y llevar a cabo varias preparaciones, tanto para la cepa control, como para las cepas de bacterias hidrocarbonoclasticas los plásmidos se encuentran presentes en función del tiempo después de haber sido sembradas en medio sólido; es decir, la aparición de las bandas en los geles disminuye en cantidad e intensidad de acuerdo con los días en que se cosecha después de haberse llevado a cabo la siembra, esto se puede apreciar en la fotografía de la figura 12. La cepa control en ésta fotografía (pozos 2 y 26), marcada H1040* en la tabla XII es una muestra de lo anterior.

Con el objeto de validar lo anterior, se corrió un gel de electroforésis (figura 13) en el que se colocaron algunos de los cultivos de bacterias hidrocarbonoclasticas en los que no se han observado bandas, y en los que si las hay. También este gel contiene diferentes preparaciones de la cepa de referencia cosechada a 1, 2, 3 y 4 días después de haberse sembrado en cajas de Petri sin antibióticos. El aislamiento de plásmidos en este caso, fue llevado a cabo el mismo día de cosecha y la preparación se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta llevarse a cabo la electroforésis.

En este mismo gel se presenta en los pozos 2, 9, 28 y 30 la cepa H1040 tratada con naranja de acridina de acuerdo con el método propuesto por Sykkora y col., (1989), un agente que provoca que los plásmidos contenidos en los cultivos

bacterianos sean "abortados" (ver apéndice). Los datos proporcionados por esta electroforésis se muestran en la tabla XIII. En ella al igual que en las tablas anteriores, los pozos que no se incluyen no contenían muestra. La ecuación de regresión lineal que se obtuvo de acuerdo con la movilidad de los plásmidos de la cepa control fue la siguiente: $Y = -2.3 \times 10^8 (X) + 2.3 \times 10^8$.

Por último, cabe señalar que todas las preparaciones de aislamiento de plásmidos fueron tratadas con RNasa pancreática de bovino tipo I-AS a una concentración final de $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, con excepción de las preparaciones mostradas en las fotografías de las figuras 7 y 8.

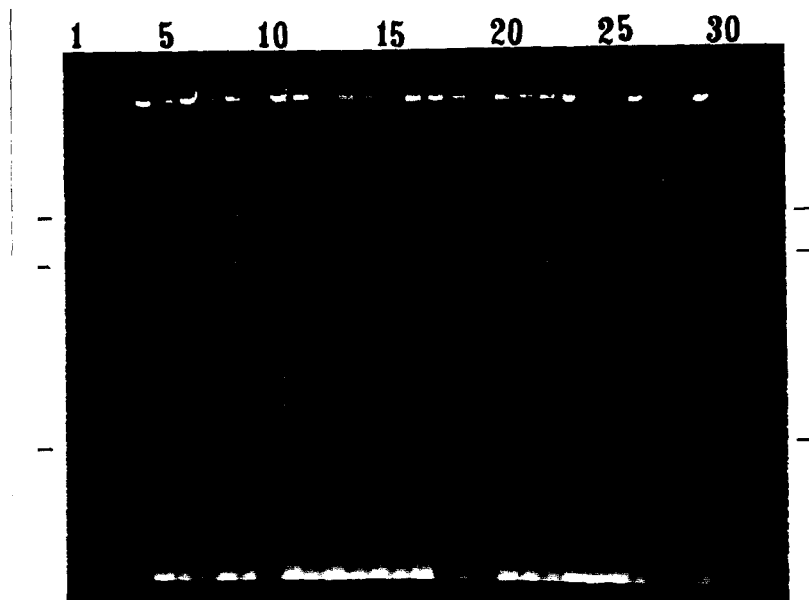


Figura 13.- Fotografía de un gel de electroforésis en el que se presenta el comportamiento de las cepas de referencia en función del tiempo de cosecha y aislamiento de plásmidos. También se presentan algunos cultivos de cepas hidrocarbonoclastica en los que no ha habido aparición de plásmidos y algunos cultivos en los que si han aparecido. Cepa H1040, cultivos 1, 2, 3 y 4 (pozos 8, 14, 22 y 29); cepa H1040 tratada con naranja de acridina (pozos 2, 9, 28 y 30). Los pozos 1 y 3 no contuvieron muestra.

Tabla XIII.- Número de bandas y pesos moleculares estimados para las preparaciones del gel mostrado en la figura 13.

POZO	CEPA	MUESTRA	BANDAS	PESO MOLECULAR (MDa)
2	H1040 ⁺	H1040	0	0
4	19	S35	1	107.93
5	20	44	0	0
6	21	44	1	137.87
7	22	E20	1	110.65
8	H1040 ¹	H1040 ¹	4	33.41, 56.46, 111.10 y 142.80
9	H1040 ⁺	H1040	0	0
10	19	S35	0	0
11	21	44	1	133.74
12	17	S35	1	107.49
13	22	E20	1	111.82
14	H1040 ¹	H1040 ²	4	33.91, 53.58, 109.73 y 141.54
15	23	E20	1	108.83
16	15	85	0	0
17	16	S35	1	108.83
18	17	S35	1	108.83
19	18	S35	1	108.83
20	19	S35	1	108.83
21	20	44	0	0
22	H1040 ¹	H1040 ³	4	34.06, 54.09, 110.65 y 139.69
23	7	8	0	0

Tabla XIII, continuación.

24	8	9-1	1	106.29
25	10	9-1	1	98.98
26	8	9-1	1	106.93
27	10	9-1	1	98.98
28	H1040 ⁺	H1040	0	0
29	H1040	H1040 ⁴	3	37.59, 56.73 y 109.73
30	H1040 ⁺	H1040	0	0

⁺ Indica que la cepa ha sido tratada con naranja de acridina de acuerdo con el método de Sykkora y col., (1989).

III.6.- IDENTIFICACION DE LOS PLASMIDOS DE ACUERDO CON SU MOVILIDAD ELECTROFORETICA RELATIVA.

En las siguientes tablas se muestran los pesos moleculares evaluados en cepas bacterianas de las tres regiones, y el tipo de plásmidos al que pertenecen de acuerdo con esta evaluación.

En la tabla XIV se muestran los pesos moleculares de los plásmidos que se encontraron en los cultivos de la región del Golfo de México.

Tabla XIV.- Plásmidos de acuerdo con el peso molecular evaluado en cultivos de bacterias hidrocarbonoclasticas del Golfo de México.

CULTIVO	PESO MOLECULAR (MDa)	TIPO DE PLASMIDO
1	123	CAM-OCT> 100
2	123	CAM-OCT> 100
3	98, 123	TOL [*] -k, CAM-OCT> 100
4	103	CAM-OCT> 100 ó TOL [*] -K
5	102	CAM-OCT> 100 ó TOL [*] -K
6	117	CAM-OCT> 100

Tabla XIV continuación.

7	--	222472
8	108	CAM-OCT> 100
9	116	CAM-OCT> 100
10	103	CAM-OCT> 100 ó TOL*-K
11	103	CAM-OCT> 100 ó TOL*-K
12	103	CAM-OCT> 100 ó TOL*-K
13	108, 147	CAM-OCT> 100 ó TOL*-K
		CAM 150
14	--	
15	--	
16	107	CAM-OCT> 100 ó TOL*-K
17	107	CAM-OCT> 100 ó TOL*-K
18	107, 141	CAM-OCT> 100 ó TOL*-K,
		CAM-OCT> 100 ó CAM 150
19	107	CAM-OCT> 100 ó TOL*-K
20	--	
21	103, 141	CAM-OCT> 100 ó TOL*-K,
		CAM-OCT> 100 ó CAM 150
22	110	CAM-OCT> 100 ó TOL*-K
23	108	CAM-OCT> 100 ó TOL*-K
24	--	
25	--	

Como se aprecia en la tabla XIV, de acuerdo con los valores estimados del peso molecular de los plásmidos que aparecieron en los cultivos de la región del Golfo de México, se observa que dichos plásmidos corresponden al tipo CAM > 100, ó al OCT > 100, los cuales, de acuerdo con la literatura (Chakrabarty, A.M., 1980; Yano, K., 1980), poseen pesos moleculares que no han sido determinados, o bien, el

CAM 150, con un peso molecular de 150 MDa (Yano, K., 1980; Chakrabarty, A.M., 1976). También de acuerdo con los pesos moleculares mostrados se encuentra un plásmido del tipo TOL*-K, que es un plásmido en el que se han fusionado el TOL* (28 MDa) y el K (sinónimo de P o FPo, 62-70 MDa), un factor conjugativo sexual.

Este plásmido (TOL*) fusionado, tiene su origen a partir de la disociación del plásmido TOL (76 MDa) en el TOL (48 MDa), que es transferible, pero no contiene el gen *tol*, y el TOL* (28 MDa), teniendo el gen *tol*, ambos plásmidos son segregados y se cointegran en *Pseudomonas putida*. Las bacterias que crecen en benzoato como única fuente de carbono retienen sólo el plásmido TOL (Yano, K., 1980).

En la tabla XV se presentan los datos encontrados en las muestras provenientes de las Chimeneas Hidrotermales y de la muestra del Istmo de Tehuantepec, referente al peso molecular evaluado y la clase de plásmidos encontrados.

Tabla XV.- Plásmidos de acuerdo con el peso molecular evaluado en cultivos de bacterias hidrocarbonoclasticas de las Chimeneas Hidrotermales y del Istmo de Tehuantepec.

CULTIVO	PESO MOLECULAR (MDa)	TIPO DE PLASMIDO
26	117, 158	CAM-OCT> 100, CAM-OCT> 100
26(I)	158	CAM-OCT > 100
27	43, 51, 117	SAL 42, SAL 51 o NAH, CAM-OCT> 100
28	118	CAM-OCT> 100
29	118	CAM-OCT> 100
30	112	CAM-OCT> 100
31	151	CAM-OCT> 100, CAM 150
32*	--	
33*	--	
34*	--	
35*	121	CAM-OCT> 100
36*	114	CAM-OCT> 100

* Istmo de Tehuantepec.

La tabla XV muestra la predominancia de los plásmidos del tipo CAM-OCT > 100 y la aparición de los SAL 42 (42 MDa) y SAL 51 (51 MDa). Estos plásmidos especifican una ruta biodegradativa completa incluyendo una ruta *meta* funcional. Al igual que el CAM, los plásmidos SAL son transducibles por el fago pf16 y los transductantes son capaces de transferir los plásmidos SAL.

III.7.-PLASMIDOS DE ACUERDO CON LA REGION DEL PAIS.

De acuerdo con los datos encontrados se tiene que para las tres regiones en estudio, la información para degradar petróleo se encuentra en los plásmidos del tipo CAM-OCT (tabla XVI). La presencia del plásmido OCT conduce a la célula bacteriana a crecer con n-alcenos tales como hexano, octano, decano, etc. Los análisis enzimáticos han mostrado que existe una enzima alcano hidroxilasa que inicia la oxidación monoterminal de la cadena de alcano, y los ácidos grasos resultantes son degradados exclusivamente por la beta-oxidación a través de la formación de acetyl y propionil-coenzima A. La existencia de un plásmido codificando la actividad alcohol-deshidrogenante muestra una considerable redundancia genética en los plásmidos degradativos. Es posible que tales redundancias correspondan a genes cromosomales conocidos que podrían haber proporcionado una recombinación entre el CAM y el OCT para formar el plásmido CAM-OCT fusionado (Chakrabarty, A.M., 1976).

Tabla XVI.- Plásmidos de acuerdo con la región en estudio.

REGION	TIPO DE PLASMIDO
Golfo de México	CAM-OCT > 100, CAM 150 y TOL*-K
Chimeneas Hidrotermales	CAM-OCT > 100, CAM 150, SAL 42 y SAL 51 o NAH
Istmo de Tehuantepec	CAM-OCT > 100

III.8.-IDENTIFICACION DE LAS BACTERIAS PRESENTES EN LAS MUESTRAS.

Se realizaron 29 pruebas bioquímicas para 30 de los cultivos bacterianos (Golfo de México y Chimeneas Hidrotermales), se empleó el sistema *api Rapid 20 E* de los

laboratorios bioMérieux Vitek, Inc. En la tabla XVII se muestran los resultados obtenidos de este análisis.

Tabla XVII.- Evaluación bioquímica para la identificación de los cultivos de bacterias hidrocarbonoclasticas de la región del Golfo de México y de las Chimeneas Hidrotermales en la cuenca de Guaymas, Sonora.

	O	A	L	O	C	H	I	T	V	G	G	M	S	R	S	M	A	A	O	M	T	C	C	M	M	M	M				
	N	D	D	D	I	S	R	D	N	P	E	L	A	N	O	H	A	E	M	R	X	C	C	R	R	S	S	S	S		
	P	H	C	C	T	E	A	D	L	U	N	O	R	A	C	L	Y	A	O	B	F	F	R	R	B	B	B	B			
	G																		N	S	D	D	F	F	O	O	O				
																										D	D	F	F	A	A
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-			
2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+			
3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+			
4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+			
5																															
6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+			
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+			
8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+			
9																															
10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-			
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+		
12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+		
13	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+		
14	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+		
15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-		
16	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-		
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+		
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	

LISTA DE ABREVIATURAS

ONPG	Beta-Galactosidasa
ADH	Arginina deshidrolasa
LDC	Lisina descarboxilasa
ODC	Ornitina descarboxilasa
CIT	Citrato
H ₂ S	Acido sulfhídrico
URE	Urea
TDA	Triptofano desaminasa
IND	Indol
VP	Voges-Proskauer (Piruvato, Creatinina)
GEL	Gelatinasa
GLU	Glucosa
MAN	Manosa
INO	Inocitol
SOR	Sorbitol
RHA	Ramanosa
SAC	Sacarosa
MEL	Melibiosa
AMY	Amilasa
ARA	Arabinosa
OX	Oxidasa
McCON	Mac Conkey
TCBS	(Selectivo para Vibrios)
*CRFD	Caldo Rojo fenol dextrosa
CRFD	Caldo rojo fenol dextrosa (prod. gas)
MSRFD	Medio semi sólido rojo fenol dextrosa
*MSRFD	MSRFD evaluado en la superficie
MSBOFA	Medio basal OF de Hugh y Lifson aerobio
MSBOFAn	Medio basal OF de Hugh y Lifson anaeróbico

Finalmente, en la tabla XVIII se muestran los tipos bacterianos encontrados en los cultivos manejados de las regiones del Golfo de México y de las Chimeneas Hidrotermales. Las identificaciones fueron hechas de acuerdo con los datos proporcionados por las pruebas bioquímicas señaladas anteriormente. La predominancia de bacterias del género *Pseudomonas* es evidente, por lo que podemos afirmar que la biodegradación de hidrocarburos en las estas regiones es llevada a cabo por el género *Pseudomonas*.

Las identificaciones de los géneros bacterianos de la región del Istmo de Tehuantepec no se realizaron debido a que el número de cepas encontrados en la muestra, así como la escasa degradación del petróleo (sólo 2 de las 5 cepas mostraron alguna evidencia, y un plásmido, del tipo CAM-OCT > 100).

Tabla XVIII.-Bacterias encontradas en las muestras de las regiones del Golfo de México y de las Chimeneas Hidrotermales (con base en las pruebas bioquímicas señaladas en la tabla XVII)[‡]

CULTIVO	TIPO BACTERIANO
1	<i>Pseudomonas spp</i>
2	<i>Pseudomonas spp</i>
3	<i>Aeromonas calco</i> var. <i>Lwoffii</i>
4	<i>Pseudomonas spp</i>
5	No se determinó
6	<i>Pseudomonas spp</i>
7*	<i>Pseudomonas stutzeri</i> o <i>P. spp</i>
8	<i>Pseudomonas spp</i>
9	No se determinó
10	<i>Aeromonas calco</i> var. <i>Lwoffii</i>
11	<i>Pseudomonas spp</i>
12	<i>Pseudomonas spp</i>
13	<i>Pseudomonas spp</i>
14	<i>Pseudomonas spp</i>
15	<i>Pseudomonas spp</i>
16	<i>Pseudomonas spp</i>
17	<i>Pseudomonas spp</i>
18	<i>Pseudomonas spp</i>
19	<i>Pseudomonas spp</i>
20	<i>Pseudomonas spp</i>
21	<i>Pseudomonas spp</i>
22	<i>Pseudomonas spp</i>
23	<i>Pseudomonas spp</i>
24	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
25*	<i>Pseudomonas stutzeri</i> o <i>P. spp</i>
26	<i>Pseudomonas spp</i>
27	<i>Pseudomonas spp</i>
28*	<i>Pseudomonas stutzeri</i> o <i>P. spp</i>
29	<i>Pseudomonas spp</i>
30	<i>Pseudomonas spp</i>
31*	<i>Pseudomonas stutzeri</i> o <i>P. spp</i>
32	<i>Pseudomonas spp</i>

[‡] Indica que a las cepas identificadas como *Pseudomonas spp*, se les deben practicar las pruebas de reducción de nitratos y nitritos y la de tinción de flagelos.

* Indica que debe realizarse tinción de flagelos.

IV.- DISCUSION

IV.1.- SELECCION DE LAS MUESTRAS.

Las muestras de las tres regiones en estudio, desde que fueron colectadas, permanecieron almacenadas durante varios meses sin agitación, en obscuridad, y a temperatura ambiente. El porcentaje de degradación era muy bajo, y en un análisis al microscopio se notó un pobre crecimiento bacteriano en varias de las muestras seleccionadas al azar para el análisis descrito. Las muestras fueron transferidas al medio Zobell líquido, selectivo para bacterias marinas, de esta manera se pudo contar con muestras en las que la población bacteriana fue mucho mayor.

El muestreo fue llevado a cabo de 15 a 24 meses antes de empezar a trabajar con las muestras colectadas. Uno de los problemas que posiblemente se pudo haber presentado es que desde el tiempo transcurrido hasta el momento de resiembra en el medio selectivo, la población bacteriana pudo haber sufrido pérdidas en cuanto al número de especies bacterianas en dichas poblaciones y/o una pérdida a nivel genotípico y fenotípico en las bacterias que permanecieron viables. Esto puede afirmarse ya que las bacterias hidrocarbonoclasticas generalmente no son microorganismos que presenten espora, por lo que no cuentan con un mecanismo de resistencia que les permita sobrevivir en condiciones adversas.

Otro aspecto que se debe señalar es que estas muestras de poblaciones bacterianas, a pesar de que provienen de ambientes marinos con diferentes grados de impactación con hidrocarburos, y que posiblemente el tipo de petróleo que se utilizó durante los experimentos citados en este trabajo, no fue el mismo en cuanto a tipos de hidrocarburos y cantidad de los mismos, presentaron un adecuado crecimiento en lo que se refiere a la proliferación bacteriana después de haber sido resembradas en un medio de cultivo recientemente preparado. Lo mencionado antes junto con el hecho de que las condiciones en el laboratorio no son las mismas que las del ambiente marino del que fueron colectadas las muestras y que son totalmente diferentes (en especial en el caso de las muestras de la región de las Chimeneas Hidrotermales, donde los muestreos fueron llevados a cabo entre 1700 y 2615 metros de profundidad, a enormes presiones si consideramos que la presión aumenta 1 atmósfera por cada 10 metros de profundidad); pudiera pensarse que existen pérdidas en individuos de las poblaciones bacterianas.

Sin embargo, los datos obtenidos en el proceso de selección de las muestras nos indica que muchas de ellas presentaron un adecuado grado de emulsificación del petróleo a pesar del tiempo transcurrido después de su colecta. Creemos que principalmente las condiciones de agitación (6-8

horas diarias en promedio a 150 rpm), más que otros factores como lo son la luz, la temperatura e incluso la concentración de sales minerales, ayudó a recuperar las poblaciones de bacterias hidrocarbonoclásticas. Esto es confirmado por el hecho de que en aproximadamente 10 días las muestras que fueron seleccionadas mostraron claras evidencias del proceso degradativo, aunque no se determinó el contenido de hidrocarburos totales antes y después de los experimentos.

No hay que perder de vista que se trata de bacterias de tipo silvestre, que no han sido caracterizadas ni identificadas hasta antes de éste trabajo, y que únicamente fueron 15 muestras diferentes de la región del Golfo de México, 3 de las Chimeneas Hidrotermales y 1 del Istmo de Tehuantepec, partiendo de un total de 245, como se indicó anteriormente. A pesar de que no se trata de muestras que en un momento pudieran representar significativamente el total de comunidades bacterianas, si nos proporciona una idea de la incidencia de bacterias hidrocarbonoclásticas en diferentes ambientes marinos.

Existe un marcado comportamiento en el proceso degradativo de acuerdo con las regiones, es decir; el 8.33% del total de muestras del Golfo de México presentan emulsión del petróleo, el 2.12% del total de muestras del Istmo de Tehuantepec, y el 16.66% del total de las muestras de las Chimeneas Hidrotermales. Estos datos corresponden en un principio con la hipótesis de que las áreas con mayor grado de impactación presentan un índice más alto de bacterias hidrocarbonoclásticas en relación con las bacterias heterótrofas totales ODB/VHB propuesto por Atlas (1981) en regiones del Artico y por Lizárraga-Partida y col. (1990) para el Golfo de México.

IV.2.- AISLAMIENTO DE BACTERIAS EN MEDIO SOLIDO.

Se tienen antecedentes surgidos en nuestro grupo de trabajo de que en muestras de agua colectadas en ambientes marinos, pueden existir grupos bacterianos que degradan agar, esto es; degradan el soporte que generalmente se emplea para hacer crecer y aislar muestras o cepas de diferentes tipos bacterianos (Romero, 1993). Como nuestro objetivo principal requería que se trabajara con cepas aisladas, se desarrolló un método a base de sílica gel como soporte inerte con el fin de evitar una posible degradación de dicho soporte. Este medio presentó la ventaja de que podía mezclarse con pequeñas cantidades de petróleo crudo (10 μ l) por caja de Petri, sin que llegase a formar una solución. Desgraciadamente este medio en condiciones de incubación a 30 °C, a los pocos días empieza a agrietarse y

a perder consistencia. Otra desventaja es que la muestra sembrada en él, al carecer de agitación, el proceso de biodegradación puede tardar varias semanas, o incluso meses.

Sí la incubación se realiza a temperatura ambiente, el medio a base de sílica gel empieza a presentar pérdida de agua a las pocas horas, continuando este proceso hasta que en pocos días el soporte ha perdido consistencia, por lo que resulta imposible lograr el crecimiento de colonias aisladas de bacterias hidrocarbonoclasticas.

El medio Zobell sólido empleado resultó adecuado para nuestros fines ya que ninguna de las muestras presentó en su población bacterias agarolíticas, y sí un crecimiento rápido y adecuado para continuar con el proceso de aislamiento de cepas. Un problema que se puede presentar al llevar a cabo el aislamiento de las cepas es que sí se realizan varias diluciones y resiembras, con el fin de aislar colonias solas, las cepas pudieran perder parte de la información que se busca obtener, al tratarse de un medio no específico para bacterias hidrocarbonoclasticas.

IV.3.- OBTENCION DE CULTIVOS PUROS.

Las características en cuanto a forma, color, apariencia y tamaño de las colonias aisladas fueron criterios que en un primer análisis resultaron adecuados para establecer las diferencias para los diversas especies bacterianas presentes en cada una de las muestras.

El análisis posterior de las características microscópicas, constituyó un segundo criterio para aislar las cepas. En este examen se anotaron las características más sobresalientes de cada uno de los cultivos obtenidos. Resultaron de gran importancia los datos de forma y tamaño de la bacteria, la presencia o ausencia de endoespora, presencia o ausencia de movimiento, así como el tipo de movimiento y la forma en que se presentan en cuanto a si se trata de bacterias solas o en arreglos lineales o agrupaciones e incluso cualquier tipo de agrupación.

De los resultados obtenidos y que se presentan en la tabla IX, resultan de especial interés los datos de movimiento, presencia o ausencia de endoespora, tinción de Gram y tipo en cuanto a forma de la bacteria por las siguientes razones:

1).- Sin excepción, todas las bacterias de los 37 cultivos presentaron movimiento, desde ligero hasta muy rápido, ondulante y/o vibrátil.

2).- Todas las bacterias de los diferentes cultivos excepto el marcado con el número 34 y que pertenece a la región del Istmo de Tehuantepec no contienen espora.

3).- Todas bacterias en los diferentes cultivos menos el 35, perteneciente a la región del Istmo de Tehuantepec son del tipo Gram (-).

4).- Sólo 3 cultivos (1,4 y 22) mostraron bacterias con apariencia del tipo de cocobacilos, todas las demás son de forma típica de bacilo. Algunas de estas presentan polimorfismo en tamaño o forma.

Cada uno de los cultivos anteriores, fue colocado en medio selectivo para bacterias hidrocarbonoclasticas como se describió en metodología. De esta manera se trató de evitar que la bacteria pudiera perder la información para degradar hidrocarburos, si es que ésta información se encuentra en plásmidos, ya que la frecuencia de transmisibilidad para estos elementos extracromosomales es muy baja, generalmente del orden de 10^{-3} a 10^{-8} para diferentes tipos bacterianos como lo mencionan (Chakrabarty, 1972; Rheinwald y col., 1973; Chakrabarty y col., 1973; Dunn y Gunsalus, 1973).

222472

IV.4.- PROLIFERACION BACTERIANA.

Como se citó antes, los tipos bacterianos aislados si no son colocados inmediatamente en el medio selectivo para bacterias hidrocarbonoclasticas, pueden perder su capacidad biodegradadora, y no volver a recuperarla (Chakrabarty y col., 1976). Entonces, a partir de esta etapa los cultivos que se utilizaron para el aislamiento de plásmidos se mantuvieron en estas condiciones, y se siguen manteniendo con resiembras en medio nuevo cada 3 meses (sólo las más eficientes en cuanto a biodegradación).

Dos hechos resultaron ser relevantes durante esta etapa: por una parte, el proceso biodegradativo de cada una de las cepas aisladas resultó ser para la mayoría de los cultivos evidentemente más lento, con excepción de los cultivos de las cepas 12 y 23, los cuales mostraron una considerable emulsión del petróleo en sólo 3 días. Esto sugiere por otro lado, que existe un efecto de cooperación de los diferentes tipos bacterianos presentes en la población de cada una de las muestras, resultando por consiguiente ser más eficaz una muestra que un sólo tipo bacteriano para llevar a cabo el proceso degradativo.

Lo anterior también pudo deberse a que al estar separados los diferentes tipos bacterianos, las moléculas de hidrocarburos presentes en el petróleo, resultaron ser demasiadas en cuanto a diversidad y complejidad para que una

sola cepa bacteriana pueda llevar a cabo un adecuado proceso biodegradativo, o bién; pudiera pensarse en un efecto inhibitorio para una cepa en particular debido al tipo de petróleo utilizado.

También se piensa que las dos cepas que al parecer son más eficientes para degradar petróleo son el resultado de tener estas cepas en condiciones de laboratorio, principalmente de las diferentes resiembras en medio selectivo llevadas a cabo.

IV.5.- AISLAMIENTO DE PLASMIDOS.

A) Cepas de Referencia.

Uno de los factores que resultó ser de gran importancia en esta etapa fue que se pudo contar con algunas cepas bacterianas que se utilizaron como referencia. Se trabajó en un principio con 5 de estas cepas, todas estas fueron aisladas por personal del Laboratorio de Biología Marina en Woods Hole Mass. U.S.A., siendo todas ellas enterobacterias, resistentes a antibióticos y de tipo silvestre.

En las figuras 7 y 8 se muestran las fotografías de 2 geles de agarosa después de haber efectuado la electroforésis de las diferentes cepas mencionadas, sometidas al proceso de aislamiento de plásmidos de acuerdo con el método de **Birnboim y Doly** (1979). Dos modificaciones fueron practicadas a este método, por una parte, en vez de inocular tubos de microcentrífuga conteniendo 1 ml de medio específico para la especie bacteriana de que se trata e incubarla a 30 °C durante 24 horas, lo que se hizo fue sembrar las cepas empleando la técnica de rastrillado en cajas de Petri conteniendo medio sólido, teniendo de esta manera un cultivo masivo que nos permitió contar con cantidades suficientes de células bacterianas y así poner de manifiesto la presencia de plásmidos.

Esta modificación al método se hizo necesaria ya que en nuestros primeros geles empleando estas cepas de referencia, las bandas que esperábamos ver eran muy débiles y difíciles de observar en cualquiera de las dos longitudes de onda (corta y larga) con las que cuenta el traniluminador (fotografías no mostradas).

La segunda modificación consistió en que se utilizaron geles de agarosa al 0.6%, en vez de 0.8% como lo recomiendan **Birnboim y Doly** (1979); esto se realizó ya que el peso molecular (PM) de los plásmidos tanto de los que proporcionan resistencia a antibióticos como los degradativos está por lo general por arriba de los 12 MDa. **Maniatis y col.**, (1982) recomiendan utilizar concentraciones

de agarosa de 0.5% a 0.6% para moléculas de ADN de gran tamaño.

La elección de este método se decidió con base en el hecho de que por problemas técnicos, la metodología propuesta por Hansen y Olsen (1978) para el aislamiento de grandes plásmidos no fue posible. El método de Birnboim y Doly es simple y el principio es el de una desnaturalización alcalina selectiva para el ADN cromosomal de alto PM, mientras que el ADN circular covalentemente cerrado (CCC) no es afectado, no se necesita monitorear el pH, y una renaturalización posterior del pH, renaturaliza el ADN cromosomal para formar una masa insoluble, mientras que el ADN del plásmido permanece en el sobrenadante.

Con base en los datos de los geles correspondientes a las cepas de referencia analizadas, se construyó una gráfica que nos permitió establecer la seguridad y la reproducibilidad del método, así como elegir cual de las 5 cepas sería utilizada como referencia. La gráfica es el resultado de 7 geles distintos producto de 4 preparaciones distintas para la cepa H1040, la que mostró tener 3 plásmidos de PM conocido; el TP116 (143 MDa), R27 (112 MDa) y RP4 (36-38 MDa) de acuerdo como lo señalan Hansen y Olsen (1978).

A pesar de que no se llevó a cabo la cuantificación del ADN que se tuvo en cada preparación, los geles mostraron bandas claramente distinguibles para las preparaciones que contienen plásmidos, y que de acuerdo con nuestros objetivos nos proporcionan la información requerida.

Lo comentado anteriormente nos permite asegurar que los plásmidos obtenidos conservan la estructura CCC y constituyen referencias adecuadas para comparar la movilidad electroforética relativa para los plásmidos degradativos aislados. No se descarta la posibilidad de que pequeñas cantidades de ADN de la forma circular abierta (OC), dímeros de la forma CCC o incluso de cadena abierta lineal (OCL) puedan estar presentes en todas las preparaciones.

Pruebas adicionales que pudieran confirmar la presencia de ADN de cadena abierta, como lo sería tratar las formas CCC con nucleasas para introducir regiones de cadena simple y posteriormente tratarlas con soluciones alcalinas para disminuir cantidades de forma CCC y aumentar las formas OC y OCL quedan fuera del alcance del presente trabajo.

En varias de nuestras preparaciones de aislamiento de plásmidos se puede apreciar que existe un "barrido" a lo largo del camino seguido por las preparaciones después de las electroforésis, y puestas de manifiesto posteriormente en el revelado con la solución de bromuro de etidio, hecho que nos indica que las preparaciones obtenidas con la

metodología empleada pueden contener pequeñas cantidades de ADN cromosomal roto y/o pequeñas cantidades de ARN de bajo peso molecular e incluso puede ser debido a una elevada concentración de ADN de plásmidos. Hay que señalar que sólo las preparaciones de los geles mostrados en las figuras 7 y 8 señaladas anteriormente no fueron tratadas con RNasa.

B) Cepas de Bacterias Hidrocarbonoclasticas.

En los geles que contienen las preparaciones de cepas de bacterias hidrocarbonoclasticas, se presentan nuevamente algunas de las características descritas en las fotografías de los geles correspondientes a las cepas control antes descritos, es decir; se presenta en varias de las preparaciones el efecto de "barrido" y presencia de manchas al final de los geles. Sin embargo, se puede apreciar que no todas las cepas presentan plásmidos, en especial las de la región del Istmo de Tehuantepec, ya que en diferentes preparaciones no se apreciaron bandas en los geles.

La mayoría de las cepas sólo contienen un plásmido, todos con PM por debajo de los 143 MDa, a excepción de las cepas 26, 26(I) y 31 que muestran plásmidos de 159, 158 y 151 MDa respectivamente. Las evaluaciones son el resultado de haber realizado extrapolaciones teniendo como base los plásmidos de referencia, por lo que se tiene que recalcar que se debe tener cuidado en particular con estas estimaciones, ya que una extrapolación puede proporcionar datos falsos.

De acuerdo con el grado de emulsión del petróleo mostrado por algunos de los cultivos, se pensó que el número de plásmidos presentes en estos sería mayor. Sin embargo, lo que se observó es que no existe relación entre el grado de emulsión y la cantidad de plásmidos presentes en una cepa, esto confirma lo que se señaló en una sección anterior; parece existir un efecto cooperativo entre los diferentes tipos bacterianos presentes en las muestras, y cuando estas bacterias son separadas y aisladas como cepas, la eficiencia en el proceso biodegradativo disminuye. Sin embargo, las cepas 12 y 23 presentaron un grado de emulsión bastante alto en las mismas condiciones de cultivo que las demás. Esto sugiere que en algunas bacterias la información para sintetizar las enzimas involucradas en la degradación del petróleo no solo se encuentran en plásmidos, sino que tal información se puede encontrar presente en su totalidad en el cromosoma bacteriano.

Las bandas de ADN que revelan la presencia de plásmidos en las fotografías de los geles mostrados y que contienen cepas de bacterias hidrocarbonoclasticas, al igual que la cepa de bacterias resistentes a antibióticos, presentaron ADN de la forma CCC; las siguientes observaciones soportan

lo anterior: la curva de regresión lineal mostrada en resultados muestra que los puntos experimentales se encuentran muy cerca de la misma, sugiriendo que los plásmidos se encuentran en la misma configuración, la forma CCC. Si cualquiera de ellos no tuviera la forma CCC, su movilidad se vería sumamente alterada y no se observaría la linealidad que se aprecia en la gráfica.

IV.6.- IDENTIFICACION DE LOS PLASMIDOS DE ACUERDO CON SU MOVILIDAD ELECTROFORETICA RELATIVA.

Con base en los datos proporcionados por Chakrabarty (1980) y Yano (1980), el PM para los plásmidos presentes en las cepas de bacterias hidrocarbonoclásticas, sugerimos que para la región del Golfo de México se tienen los plásmidos tipo CAM-OCT > 100 ó TOL*-K para todas las cepas que poseen plásmidos en esta región, y únicamente 3 cepas (13, 18 y 21) muestran el plásmido CAM 150, revelando que la distribución de estos tipos bacterianos es amplia en esta región, si consideramos que las muestras fueron colectadas en diferentes puntos.

Para la región de las Chimeneas Hidrotermales, se presenta también el plásmido tipo CAM-OCT > 100 en todas las cepas y únicamente la cepa 27 presenta el SAL 42 y el SAL 51 ó NAH, y la cepa 31 el CAM 150.

La región del Istmo de Tehuantepec mostró ser la más pobre en cuanto a presencia de plásmidos degradativos, sólo se encontró en 2 cepas el tipo CAM-OCT > 100.

Hay que aclarar que estas son las primeras evaluaciones de este tipo que se realizan con cepas de bacterias hidrocarbonoclásticas silvestres siendo necesario llevar a cabo otras pruebas, como lo es el tratar los plásmidos aislados con enzimas de restricción para poder emplear marcadores de peso molecular conocido y tener de esta manera otro criterio para la identificación.

IV.7.- PLASMIDOS DE ACUERDO CON LA REGION DEL PAIS.

Resultan evidentes las diferencias y similitudes entre las tres regiones en cuanto a las clases de plásmidos; las tres regiones muestran bacterias que contienen el tipo CAM-OCT > 100. Este hecho es relevante ya que muestra la amplia distribución que tiene éste plásmido, pudiéndose encontrar presente en bacterias en aguas superficiales y también a grandes profundidades; así como también en regiones con diferentes grados de impactación por hidrocarburos. Lo

anterior nos sugiere que éste plásmido es de los primeros en ser transferidos de una célula bacteriana a otra, o bien, pudiera ser un plásmido que en condiciones adversas sería de los últimos en ser perdidos por una especie bacteriana en condiciones ambientales libres de la presencia de hidrocarburos.

En la región de las Chimeneas Hidrotermales parece existir una mayor diversidad en cuanto a la clase y número de plásmidos degradativos, se encontró que algunas cepas contienen el SAL 42 y el SAL 51 ó NAH que no se encontraron en las otras regiones. Estos plásmidos son específicos para salicilatos y naftalenos respectivamente, es decir; ambos pueden degradar moléculas de hidrocarburos aromáticos con 1 o más anillos bencénicos, solo que el SAL 42 y SAL 51 atacan moléculas parcialmente degradadas.

IV.8.- IDENTIFICACION DE LAS CEPAS BACTERIANAS.

Las 29 pruebas bioquímicas practicadas a 30 de las 37 cepas revelaron la presencia del género *Pseudomonas spp* en casi todas ellas. Sólo las cepas 3 y 10 pertenecen a la bacteria *Aeromonas calco* var. *Lwoffii*. Esto nos confirma lo que se conoce casi desde los primeros estudios referentes al tema en diferentes regiones y ambientes del mundo. *Pseudomonas* y en especial *P. putida* son las bacterias que por lo general llevan a cabo el proceso biodegradativo. Sin embargo el género *Aeromonas* no se ha encontrado que posea tal información y tampoco que posea plásmidos degradativos.

Lo anterior no deja de ser de gran interés ya que es el primer reporte en el que se encuentran tales características degradativas en el género *Aeromonas* llevandonos a pensar que la lista de géneros bacterianos que pueden llevar a cabo el proceso biodegradativo va en aumento.

V.- CONCLUSIONES.

Este primer estudio referente a la presencia de plásmidos en bacterias hidrocarbonoclasticas provenientes de diferentes ambientes marinos, nos permite establecer lo siguiente:

1.- El contenido de plásmidos en bacterias hidrocarbonoclasticas no fue tan amplio en lo que se refiere a diversidad como se esperaba.

2.- En 6 de las 25 cepas provenientes de la región del Golfo de México y en 3 de las 5 cepas del Istmo de Tehuantepec no se detectaron plásmidos con el método empleado, todas las demás mostraron al menos uno.

3.- Varios tipos bacterianos encontrados en este trabajo no requieren la presencia de plásmidos para poder sobrevivir en un medio con petróleo como única fuente de carbono.

4.- El efecto cooperativo que puede existir en los diferentes tipos bacterianos presentes en una población ha quedado de manifiesto, ya que sólo 2 de las 37 cepas mostraron por sí solas ser sumamente eficientes para degradar una muestra de petróleo crudo, a pesar de que sólo presentan un plásmido.

5.- Existe una relación directa entre el número de plásmidos presentes en muestras de una región y el grado de impactación con hidrocarburos. La región marina en teoría menos contaminada (Istmo de Tehuantepec) mostró por una parte, una escasez de bacterias hidrocarbonoclasticas, y por otra un plásmido del tipo CAM-OCT > 100.

6.- Dos hechos inesperados se tuvieron: por una parte todas las cepas que mostraron contener plásmidos poseen el tipo CAM-OCT > 100; y por otra la presencia de este plásmido resultó ser independiente de la región oceánica de procedencia.

7.- De acuerdo con lo reportado en la literatura el género *Pseudomonas* resultó estar presente en este estudio en casi todas las cepas aislada.

8.- Las cepas 3 y 10 de la región del Golfo de México, de acuerdo con las pruebas bioquímicas realizadas, resultaron ser la bacteria *Aeromonas calco* var. *Lwoffii*. Este es el primer reporte acerca de la capacidad que posee este género de poder degradar hidrocarburos

VI.- PERSPECTIVAS.

La necesidad de contar con cepas de bacterias hidrocarbonoclasticas autóctonas que sean eficientes en los procesos biodegradativos, que no sean un factor que altere la comunidad bacteriana de una región específica y además, que sean microorganismos capaces de llevar a cabo el proceso de biorremediación de una manera más eficaz en ambientes marinos contaminados con hidrocarburos, abre la posibilidad de llevar a cabo diversos proyectos que continuen con el trabajo aquí iniciado.

La creación y desarrollo de proyectos que permitan obtener información ya no a nivel ecológico, sino a niveles bioquímicos y moleculares de un fenómeno relativamente poco estudiado de los mecanismos de acción de los procesos biodegradativos de hidrocarburos en ambientes marinos hacen necesario continuar con este tipo de estudios.

Por otra parte, el desarrollo de estos estudios ayudarían a comprender la importancia que tienen los plásmidos degradativos en cepas bacterianas en diferentes ambientes marinos con el fin de establecer con criterios más precisos el grado de contaminación por hidrocarburos de una región en particular.

VII.-APENDICE.

A).-MEDIO ZOBELL LIQUIDO (Zo Bell, 1946).

Cantidades para preparar 1 l.

- 1.0 g de extracto de levadura.
- 5 g de polipeptona.
- 1 ml de FeCl_3 al 1.2%.
- 200 ml de medio mineral concentrado.
- 800 ml de H_2O destilada.
- Ajustar el pH a 7.5.
- Esterilizar a 15 lb durante 15 min.

Para preparar medio sólido, se agregan 15 g de agar bacteriológico. El pH se ajusta antes de ser agregado el agar.

B).-MEDIO MINERAL CONCENTRADO (Lyman y Fleming, 1940).

(sales para preparar 20 l).

-NaCl.....	58.75 g
- Na_2SO_4	9.75 g
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12.40 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.50 g
- NH_4NO_3	1.80 g
-KCl.....	1.65 g
- NaHCO_3	0.48 g
-KBr.....	0.24 g
- KH_2PO_4	0.225 g
- H_3BO_3	0.065 g
- $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.06 g
-NaF.....	0.0075 g

C).-MEDIO DILUIDO PARA BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTICAS.

- 800 ml de H_2O destilada.
- 200 ml de medio mineral concentrado.
- 1 ml de FeCl_3 al 1.2%.
- Ajustar el pH a 7.5.
- 10 ml de tris-HCl (amortiguador 1 M).
- 50 μl de petróleo crudo para cada vial con 10 ml de medio.
- Esterilizar a 10 lb durante 30 min.

D).-MEDIO A BASE DE SILICA GEL.

Después de haber intentado varias formas y métodos para preparar geles a base de meta silicato de sodio o de silica gel, se ensayó un método, el cual es una combinación del de

Funk y Krulwich, (1964); Walker y Colwell, (1976) y Seki, (1973).

a) Solución de sílica gel.

- 10 g de sílica gel en polvo (923, 100-200 mesh).
- Disolver en 100 ml de solución de NaOH al 7% (calentar).
- Ajustar el pH a 11.0.

b) Solución salina (500 ml).

- 1.0 g de KNO_3 .
- 0.5 g de $MgSO_4$.
- Ajustar el pH a 3.0.

c) Emulsión de petróleo crudo.

- 90 ml de H_2O destilada.
- 10 ml de petróleo crudo del pozo Ixtoc I.
- 60 μ l de Tween 80.
- Agitar en mezcladora durante 10 min.

d) Solución de ácido fosfórico al 20% en agua destilada.

Nota.- Todas las soluciones son esterilizadas a 10 lb durante 30 min, excepto la sol de sílica gel, la cual será pasada a través de filtros de 0.25 μ m de diámetro de poro.

Para preparar las placas de cultivo conteniendo medio de crecimiento, se mezclan volúmenes iguales de las soluciones a y b, se agregan 0.5 ml de emulsión de petróleo, se mezcla bien. Esta mezcla es vertida a las cajas de Petri y se agrega un volumen de ácido fosfórico que corresponde al 10% del volumen final. Se agita rápidamente. La gelificación se alcanza en 1 minuto aproximadamente. El pH final del medio es de alrededor de 8.0.

E).-METODO PARA "CURAR O ABORTAR" PLASMIDOS CONTENIDOS EN CEPAS BACTERIANAS. (Sykora y col., 1989)

Cada cepa de bacterias se incuba en el medio específico (LB para bacterias resistentes a antibióticos y medio Zobell para bacterias hidrocarbonoclasticas) y se incuban a 37 °C durante 18 horas. Se realiza una dilución 1:100 en 10 ml de medio líquido y se incuba por 3 horas a 37 °C. Se diluye nuevamente la cepa 1:100 en 5 ml de medio con naranja de acridina a una concentración de 500 μ g/ml. Se incuba por 4 horas a 37 °C en oscuridad. Finalmente se siembra la cepa en agar con cada uno de los antibióticos, o con la muestra de petróleo (medio líquido para bacterias hidrocarbonoclasticas).

F).-ZONAS DE PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS.

Localización de procedencia de las muestras.

REGION	MUESTRA	PROF. (m)	LAT. N	LONG. W
Golfo de México (Mayo-Junio, 1991)	95	10	18° 32'	92° 52'
	9-3	10	18° 41'	92° 26'
	8	10	18° 44'	92° 12'
	9-1	10	18° 41'	92° 26'
	7-1	10	18° 48'	91° 50'
	7-2	10	18° 48'	91° 50'
	85	10	18° 25'	91° 42'
	E-20	10	19° 40'	91° 25'
	E-22	10	19° 20'	91° 47'
	S-35	10	19° 27'	92° 0'
	42	10	19° 32'	92° 13'
Istmo de Tehuantepec. (Julio de 1992)	287 a	30	16° 3'	95° 14'
				222472
Chimeneas Hidrotermales (Marzo de 1991)	2347	1700	21°	109°
	2348	2500	21°	109°
	2349	2615	21°	109°

VIII.-LITERATURA CITADA.

Atlas R.M. (1981). **Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective.** Microb. Rev. 45. pp. 180-209.

Atlas R.M. (1993). **Bacteria and bioremediation of marine oil spills.** Oceanus. 36. 2. pp. 71.

Benson S., Oppici M., Shapiro J. y Fennewald M. (1979). **Regulation of membrane peptides by the Pseudomonas plasmid alk regulon.** J. Bacteriol. 140. pp. 754-762.

Birnboim H.C. y Doly J. (1979). Nucl. Acid. Res. 7. 6. pp. 1513-1526.

Chakrabarty A.M. (1972). **Genetic basis of the biodegradation of salicylate in Pseudomonas.** J. Bacteriol. 112. pp. 815-823.

Chakrabarty A.M., Chou G. y Gunsalus I.C. (1973). **Genetic regulation of octane dissimilation plasmids in Pseudomonas.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70. pp. 1137-1140.

Chakrabarty A.M. (1976). **Plasmids in Pseudomonas** Ann. Rev. Genet. 10. pp. 7-30.

Chakrabarty A.M. (1980). **Plasmids and dissimilation of synthetic environmental pollutants.** En Plasmids and Transposons. Ed. Academic Press Inc. New York. pp. 21-30.

Davydodova-Charakhch'yan I.A., Mileeva A.N., Mityushina L.L. y Belyaev S.S. (1992). **Acetogenic bacteria from oil fields of Tataria and western Siberia.** Microbiol. 6. pp. 208-215.

Dunn N.W. y Gunsalus I.C. (1973). **Transmissible plasmids coding early enzymes of naphthalene oxidation in Pseudomonas putida.** J. Bacteriol. 144. pp. 974-979.

Eaton W.R. y Chapman J.P. (1992). **Bacterial metabolism of naphthalene: Construction and use of recombinant bacteria**

to study ring cleave of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. J. Bacteriol. 174. pp. 7542-7554.

Fennewald M., Prevatt W., Meyer R. y Shapiro J. (1978). Isolation of IncP-2 plasmid DNA from *Pseudomonas aeruginosa*. Plasmids. 1. pp. 164-173.

Floodgate G.D. (1972). Biodegradation of hydrocarbons in the sea. En Water Pollution Microbiology. Mitchell R. (ed). London-New York. Wiley and Sons. pp. 153-171.

Friede J., Guiere P., Gholson R.K. y Gaude F. (1972). Assessment of biodegradation potential for controlling oil spills on the high seas. Offi. Res. Dev. Washington D.C. 15 pp.

Funk B.H. y Krulwich A.T. (1964). Preparation of clear silica gels that can be streaked. J. Bacteriol. 88. pp. 1200-1201.

Girard R.R. (1988). Biodegradación microbiana del petróleo en ecosistemas acuáticos. Petroleos Mexicanos. Gerencia de control y coordinación ambiental. pp. 56.

Grindley N.D.F., Humphreys G.O. y Anderson E.S. (1973). Molecular studies of R factor compatibility groups. J. Bacteriol. 115. pp. 387-398.

Grund A., Shapiro J., Fennewald M., Bacha P. Leahy J., Markbreiter K., Neider M. y Toepfer M. (1975). Regulation of alkane oxidation in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 123. pp. 546-556.

Hansen B.J. y Olsen H.R. (1978). Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5. J. Bacteriol. 135. pp. 227-238.

Holger W.J. (1991). Microbial transformations at deep sea hydrothermal vents. R/V Atlantis II (Voyage Nº 125, Legs 22 and 23) and DSR/S Alvin (Dive Series 2347 to 2349). Woods Hole Oceanographic Institution. Woods Hole, Massachusetts, 02543, U.S.A. pp 45.

Jacoby J.A., Rogers J.E., Jacob A.E. y Hedgers R.W. (1978). **Trasposition of Pseudomonas toluene-degrading genes and expression in Escherichia coli.** Nature. 274. pp. 179-180.

Lizárraga-Partida L.M., Izquierdo-Vicuña F.B. y Wong-Chang I. (1990). **Marine oil degrading bacterial related to oil inputs and surface currents in the western caribbean sea.** Oil Chem. Poll. 7. pp. 271-281.

Lizárraga-Partida M.L., Izquierdo-Vicuña F.B. y Wong-Chang I. (1991). **Marine bacteria on the Campeche bank oil field.** Mar. Pollut. Bull. 22. pp.401-405.

Lyman J. y Fleming R.H. (1940). **Composition of sea water.** J. Mar. Res. 3. pp. 134-146.

Maniatis T., Fritsch E.F. y Sambrook J. (1982). **Molecular Cloning. A laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory. pp 150-160.

Meyers J.A., Sanchez D., Elwell L.P. y Falkow S. (1976). **Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid.** J. Bacteriol. 127. pp. 1527-1537.

Mira Y., Okazaki M., Hamada S.I., Marakawa S.I. y Yugen R. (1977). **Assimilation of liquid hydrocarbon by microorganisms I. Mechanism of hydrocarbon uptake.** Biotech. Bioeng. 13. pp. 701-714.

Morrison R.T. y Boyd R.N. (1973). **Química Orgánica.** Fondo Educativo Interamericano. México D.F. pp. 90.

Nakazawa T.E., Hayashi T., Ebina Y. y Nakazawa A. (1978). **Isolation of TOL and RP4 recombinants by integrative suppression.** J. Bacteriol. 134. pp.270-277.

Neider M. y Shapiro J. (1975). **Physiological function of the Pseudomonas putida PpG6 (Pseudomonas oleovorans) alkane hydroxylase: monoterminial oxidation of alkanes and fatty acids.** J. Bacteriol. 122. pp. 93-98.

Rheinwald J.G., Chakrabarty A.M. y Gunsalus I.C. (1973). **A transmissible plasmids controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70. pp. 885-889.

Romero J.J. (1993). Comunicación personal.

Sakaguchi K. y Okanishi M. (1980). **Degradative plasmids: Aspects of microbial evolution.** En Molecular Breeding and Genetics of Applied Microorganisms. Kodesha LTD y Academic Press Inc. pp. 47-60.

Seki H. (1973). **Silica gel medium for enumeration of petroleumlytic microorganisms in the marine environment.** Appl. Microbiol. 26. 3. pp. 318-320.

Shapiro J.A., Benson S. y Fennewald M. (1980). **Genetics of plasmid-determined hydrocarbon oxidation.** En Plasmids and Transposons. Environmental effects and maintenance mechanisms. Ed. Colin Stuttard and Kenneth R. Rozee. Academic Press Inc. New York. pp. 1-19.

Stanisich A.V. y Richmond H.M. (1975). **Gene transfer in the genus *Pseudomonas*.** En Genetics of Genus *Pseudomonas*. Ed. Clark P.H. y Richmond H.M. John Willey and Sons ed. London. pp. 163-190.

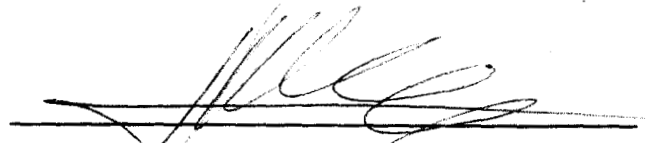
Sykkora P., Foltynova Z. y Smitálova K. (1989). **A kinetic model for plasmid curing.** Plasmids. 21. (2). pp. 85-98.

Walker J.D. y Colwell R.R. (1976). **Enumeration of petroleum degrading microorganisms.** Appl. Environ. Microbiol. 31. pp. 198-207.

Yano K. (1980). **Degradative plasmids: Aspect of microbial evolution.** En Molecular Breeding and Genetics of Applied Microorganisms. Ed. Sakaguchi K. y Okanishi M. Academic Press. Kodansha Ltd. pp. 47-60.

Zo Bell C.E. (1946). **Action of microorganisms on hydrocarbons.** Bacteriol. Rev. 10. pp. 1-49.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 10 de marzo de 1995.



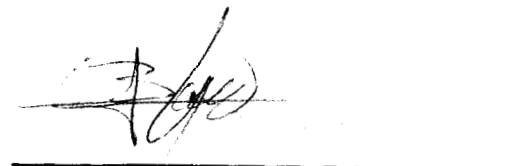
Dr. Jorge M. Romero Jarero

TUTOR



Dr. Faustino Rodríguez Romero

ASESOR



Dr. Javier Barrios González

ASESOR

