

DINÁMICA DE POBLACIONES BACTERIANAS Y ACTIVIDAD DESHIDROGENASA DURANTE LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELO RECIÉN CONTAMINADO E INTEMPERIZADO CON HIDROCARBUROS

Jorge ORTÍZ-MAYA¹, Erika ESCALANTE-ESPINOSA¹, Reyna Lourdes FÓCIL-MONTEERRUBIO¹, Hugo César RAMÍREZ-SAAD² e Ildefonso Jesús DÍAZ RAMÍREZ^{1*}

¹ División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Kilómetro 0.5, Carretera Villahermosa-Cárdenas, Villahermosa, Tabasco, México, C. P. 86039

² Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Ciudad de México, México, C. P. 04960

*Autor para correspondencia: idrxanum@gmail.com

(Recibido noviembre 2015; aceptado agosto 2016)

Palabras clave: actividad enzimática, DGGE, restauración de suelos, secuenciación

RESUMEN

Se evaluó la actividad deshidrogenasa y la dinámica de poblaciones bacterianas nativas en suelo contaminado con hidrocarburos durante su biorremediación por bioestimulación y atenuación natural. Se realizaron ensayos a escala mesocosmos, en la que se compararon dos condiciones: 1) contaminación reciente (28 días) y 2) intemperización (entre 28 a 56 días), con suelo artificialmente contaminado (30 000 mg de hidrocarburos totales de petróleo /kg suelo). Se estimó la riqueza de las comunidades bacterianas con base en los perfiles genómicos generados mediante electroforesis en gel con gradiente de desnaturalizantes (DGGE, por sus siglas en inglés). Además, se identificaron las poblaciones por secuenciación de las bandas dominantes en los perfiles de DGGE. La evolución de la biodegradación se estimó a través de la actividad deshidrogenasa durante los ensayos. El análisis molecular de los extractos de ADN, reveló una riqueza de genotipos similar en ambos tratamientos recién contaminados y una disminución importante de este parámetro por efecto de intemperismo. Los niveles máximos de actividad de la enzima se presentaron en el suelo recién contaminado-bioestimulado (3146.84 µg de iodo-nitro-formazan (INF)/g) en comparación con el suelo recién contaminado bajo atenuación natural (1160.19 µg INF/g). Para los suelos intemperizados, la actividad deshidrogenasa disminuyó en comparación con los demás tratamientos. Se determinó una comunidad bacteriana estable a lo largo del tiempo en el suelo intemperizado, mientras que la adición de nutrientes favoreció el incremento de la riqueza de genotipos tanto en los suelos recién contaminados como en los intemperizados. Se identificó la presencia de bacterias hidrocarbonoclastas (*Burkholderia*, *Pelobacter*) en todos los tiempos de muestreo en ambos tratamientos.

Key words: enzymatic activity, DGGE, soil restoration, sequencing

ABSTRACT

Dehydrogenase activity and composition of the native microbial community were evaluated in hydrocarbon-contaminated soil during its bioremediation by biostimulation

and natural attenuation. Mesocosms-scale essays were set up, comparing conditions of recent contamination (28 days) and weathering (28-56 days) with artificially contaminated soil (30000 mg of total petroleum hydrocarbons /kg soil). The richness of the bacterial communities was estimated based on the genomic profiles generated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis (DGGE). In addition, populations were identified by sequencing of the dominant bands in DGGE profiles. The evolution of the biodegradation was addressed through soil dehydrogenase activity during the essays. The molecular analysis of DNA extracts revealed similar genotype richness in both newly contaminated treatments, while a significant decrease of this parameter was observed in weathered treatments. The maximum levels of enzyme activity occurred in the newly contaminated-biostimulated soil (3146.84 µg iodo-nitro-formazan (INF)/g) compared to the contaminated soil under natural attenuation (1160.19 µg INF/g). For weathered soils, dehydrogenase activity decreased compared to the other treatments. It was determined a stable over time bacterial community in the weathered soil, while the addition of nutrients favored increases of genotype richness in newly contaminated and weathered soils. Hydrocarbonoclastic bacteria (*Burkholderia*, *Pelobacter*) were identified in all sampling times in both treatments.

INTRODUCCIÓN

El suelo alberga por unidad de volumen la mayor biodiversidad y número de microorganismos. Se ha calculado que tan sólo un gramo de suelo fértil puede contener hasta 1×10^{10} células procariotas y varios miles de especies diferentes. En particular, se estima que en el caso de los procariotas pueden encontrarse entre 2000 y 18000 genomas bacterianos diferentes por gramo de suelo (Daniel 2011). Esto representa una fuente de compuestos, enzimas y un alto potencial metabólico. En el suelo la diversidad y fisiología de las poblaciones presentes está determinada por su complejidad estructural, la disponibilidad de nutrientes y sus diferentes condiciones físicas y químicas (Das y Dash 2014). La determinación de la estructura de las comunidades microbianas se ha usado para estudiar distintos procesos, tales como: dinámica de sucesiones poblacionales, identificación de poblaciones predominantes y eficiencia de procesos de biorremediación (Viñas et al. 2005). En particular, el análisis de fragmentos del gen 16S ARNr por métodos moleculares, como la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalizantes y el análisis de restricción de fragmentos terminales polimórficos (DGGE, T-RFLP, por sus siglas en inglés), en combinación con la determinación de enzimas clave del metabolismo microbiano (deshidrogenasas, lipasas, oxigenasas), respiración, contenido de biomasa (Kumar 2013) y número de microorganismos (Castro-Mancilla et al. 2013), se han considerado parámetros útiles para el monitoreo de procesos y estrategias de biorremediación (Simarro et al. 2013).

En México uno de los mayores problemas ambientales es la contaminación por hidrocarburos en suelos y ecosistemas acuáticos. Particularmente

en el periodo 2000 – 2013, el estado de Tabasco ocupó el segundo lugar en derrames de hidrocarburos confirmados (30 %) y primer lugar en derrames no confirmados (50 %) (CNH 2014), entre los que se identifican sitios recién contaminados (< 1 mes) y suelos intemperizados con un largo historial de contaminación. En suelos tropicales contaminados de la región, se ha determinado una alta mineralización aeróbica, así como una elevada actividad de enzimas como deshidrogenasa y lipasa, lo cual es considerado como una evidencia de actividad y presencia de poblaciones nativas degradadoras, en respuesta a la presencia de hidrocarburos (Rivera-Cruz et al. 2002, Díaz-Ramírez et al. 2013, Riveroll-Larios et al. 2015). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la dinámica de las comunidades bacterianas y su relación con la actividad deshidrogenasa durante la biorremediación de un suelo recién contaminado con hidrocarburos, e intemperizado-contaminado, bajo condiciones de atenuación natural y bioestimulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo y colecta de suelo

Se recolectaron muestras de suelo no contaminado (SNC) en un predio de uso ganadero en el municipio de Cunduacán, Tabasco (18°0'4.73" N; 93°8'5.61" O). Se seleccionaron tres puntos de muestreo en los que se extrajeron bloques de suelo (40 cm³). Las muestras se tamizaron (Ø 2.38 mm) y mezclaron para su caracterización física y química. En cada punto también se tomaron muestras de 25 g que se almacenaron en tubos estériles (50 mL) y se mantuvieron en refrigeración (4 °C) para su

análisis dentro de las 24 h posteriores al muestreo. La caracterización física y química del suelo se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000 (SEMARNAT 2000).

Tratamientos y condiciones experimentales

Para el ensayo de biorremediación el SNC se contaminó artificialmente con petróleo crudo de fracción media a una concentración ~30 000 mg/kg. Este suelo recién contaminado (SRC) se aireó a temperatura ambiente (72 h) para permitir la evaporación de compuestos volátiles.

Se prepararon unidades experimentales de acrílico (13 cm × 13 cm × 13 cm) con 1 kg de suelo cada una, divididas en los siguientes tratamientos (por triplicado): a) atenuación natural (AN), que constó de SRC, b) bioestimulación (BE), SRC adicionado con fertilizante Triple 17 (Nutrigarden™) para obtener una relación C:N = 15, c) testigo que constó de SNC.

El suelo en las unidades experimentales se humectó inicialmente al 40 % de su capacidad de campo (w/w), se conservó la humedad (~27 %) con la adición periódica de agua destilada. Estas unidades experimentales se mantuvieron bajo condiciones controladas en el laboratorio (25 - 30 °C).

Paralelamente, se prepararon unidades experimentales similares, al aplicar al SRC dos tratamientos en condiciones de intemperización: a) suelo intemperizado en atenuación natural (IAN) y b) suelo intemperizado en bioestimulación (IBE), preparado de manera similar que el tratamiento BE. La intemperización consistió en exposición solar (8 h/día) por 28 días, con temperaturas entre 30 y 35 °C.

En la primera etapa de monitoreo se tomaron muestras los días 0, 7, 14, 21 y 28 (ver condiciones abajo), para los tratamientos AN, BE y SNC. Los tratamientos IAN e IBE fueron mantenidos sin perturbar al inicio del ensayo (28 días). Ambos tratamientos intemperizados fueron monitoreados cada 7 días a partir del día 28, se determinó la actividad deshidrogenasa de forma inmediata y se mantuvieron a 4 °C (entre 24 a 72 h) en tubos estériles para la extracción del ADN y determinación del número de microorganismos.

Determinación de actividad deshidrogenasa y análisis microbiológicos

En los días señalados se tomaron muestras de 0.5 g de suelo (peso seco) y se colocaron en tubos estériles (15 mL), adicionando 2 mL de solución amortiguadora tris base (1 M, pH 7.0) y 2 mL de cloruro de iodo nitro-tetrazolio (INT, 5 mM, PROMEGA®) como aceptor alterno de electrones. Los tubos se incubaron por 24 h a 35 °C. El iodo-nitro-formazan (INF) producido

fue extraído con acetona y para determinar su concentración, el extracto filtrado (0.2 µm, Millipore™) fue analizado en un espectrofotómetro de UV-visible modelo Evolution 220 (Thermo Scientific®) a 493 nm (Neto et al. 2007). Para la cuantificación del producto de la reacción se preparó una curva estándar con INF (PROMEGA®) en las siguientes concentraciones: 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 µg INF/mL de acetona.

La cuenta total bacteriana (unidades formadoras de colonias, UFC/g) se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Lorch et al. (1995), con agar soya y tripticaseína (AST, Bioxon, México). Las placas preparadas se incubaron a 35 °C y el conteo de colonias se realizó después de 48 h.

Extracción de ADN microbiano del suelo

Para la extracción de ADN se pesaron 1.5 g de suelo seco de cada muestra y se colocaron en tubos con 3.5 mL de NaH₂PO₄ (0.1 M) y lisozima (10 mg/mL, pH 4.5), bajo agitación (100 rpm), durante 1 h. De cada tubo se tomaron tres alícuotas (1 mL) y se trataron de acuerdo con el procedimiento descrito por Rojas-Herrera et al. (2008). Los extractos de ADN así obtenidos, se visualizaron por electroforesis en agarosa (1 %) con bromuro de etidio (10 mg/mL) como agente de tinción. el ADN Se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm (µDrop™ Plate, Multiskan Go, Thermo Scientific®).

Amplificación del ADN y electroforesis en gel con gradiente de desnaturalizantes

El ADN extraído de las diferentes muestras de suelo se usó como templado para la amplificación de la región V6-V8 del gen 16S ARNr basados en el procedimiento descrito por Díaz-Ramírez et al. (2008).

El análisis por electroforesis en gel con gradiente de desnaturalizantes (DGGE, por sus siglas en inglés) de los amplicones obtenidos se realizó de acuerdo con Muyzer et al. (1996), utilizando un gradiente de desnaturalización de 30 - 60 %. La electroforesis se realizó con el sistema DGGE-2001 (CBS Scientific®) con amortiguador TE 1 X (60 °C/16 h, 85 V). La tinción del gel y conservación se realizó de acuerdo a Sanguinetti et al. (1994).

Identificación de poblaciones microbianas por secuenciación

Las bandas predominantes de los geles de DGGE se cortaron y colocaron en 30 µL de agua desionizada (4 °C/72 h). A partir del sobrenadante se re-amplificó el ADN extraído del gel bajo las condiciones descritas anteriormente, pero utilizando el iniciador 968f modificado (sin la cola de guanina-citosina). Los

amplicones obtenidos se purificaron con el sistema Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA®) y enviados para su secuenciación en un sistema automatizado (MacroGen Inc. Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) a través de su herramienta básica de búsqueda local de alineamiento (BLAST, por sus siglas en inglés) (Zhang et al. 2000).

Análisis estadísticos

Para estimar la correlación entre la actividad deshidrogenasa (INF/g de suelo) y el número de microorganismos (UFC/g) se realizó un análisis de correlación de Pearson para los valores obtenidos en los diferentes tiempos de muestreo.

Para determinar la riqueza de genotipos (bandas observadas), se utilizó el estimador estadístico no paramétrico de Chao2 (Gotelli y Chao 2013) conforme está implementado en el programa EstimateS V. 9.1.0 (Colwell 2013): $Chao2 = S_{obs} + Q_1 * (Q_1 - 1) / 2 * (Q_2 + 1)$. Donde: S_{obs} = número de bandas observadas, Q_1 = bandas únicas que aparecen en un solo tiempo de muestreo y Q_2 = bandas comunes que aparecen en dos o más tiempos de muestreo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron los cambios en la composición y actividad biológica de la comunidad microbiana nativa de un suelo contaminado artificialmente a lo largo de un ensayo de biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo. Se estimó la respuesta en condiciones de contaminación reciente e intemperización, bajo atenuación natural y bioestimulación. La selección del SNC para el estudio se basó en su ubicación en un área de alta actividad petrolera y ganadera, donde frecuentemente se presentan derrames de hidrocarburos (Riveroll-Larios et al. 2015). Este suelo tiene uso como pastizal con zacate estrella (*Cynodon plectostachyus*) como especie dominante. Las características físicas y químicas fueron: materia orgánica 3.71 %, carbono orgánico 2.15 %, potasio, calcio, magnesio y sodio (0.37, 32.94, 6.86, 0.28 Cmol/kg, respectivamente), pH 7.5, humedad 21.6 % y conductividad eléctrica 0.46 dS/m. De acuerdo con su textura, la clasificación correspondió a un suelo arcilloso-limoso con condiciones aptas para su aprovechamiento agropecuario.

El ensayo se enfocó en la determinación de la riqueza de genotipos bacterianos en perfiles genómicos y la identificación de poblaciones dominantes

a partir de las bandas de DGGE observadas durante el ensayo. La actividad de la enzima deshidrogenasa se consideró como una medida de la actividad degradadora y se correlacionó con el número de microorganismos presentes.

Dinámica de la comunidad microbiana nativa en el ensayo de biorremediación de hidrocarburos

El análisis de los perfiles de DGGE para el suelo bajo atenuación natural (**Fig. 1- AN**), reveló un conteo de bandas compuesta por hasta 25 genotipos, de las cuales 57 % correspondieron a genotipos comunes entre los cinco tiempos de muestreo (**Fig. 1**, flechas). En el caso del suelo bioestimulado (**Fig. 1**, BE), se obtuvo un conteo de bandas con 22 genotipos, con 47 % de bandas comunes en los primeros 7 días del ensayo y 23 % al final (T = 28 días). En el SNC se presentaron 22 bandas que corresponden a la comunidad bacteriana nativa previo a la adición de contaminantes.

A partir de los perfiles genómicos de este ensayo se realizó una curva de acumulación de genotipos correspondientes a la riqueza estimada (S_{Chao2}) de poblaciones bacterianas (**Fig. 2**). De acuerdo con estimador de Chao2 (**Fig. 2a**), los valores de riqueza de genotipos (número bandas), fueron similares en condiciones de bioestimulación y atenuación natural (sin adición de nutrientes). Además, en ambos tratamientos la riqueza presentó un comportamiento creciente durante el ensayo, lo que corresponde a la aparición de poblaciones microbianas diferentes, observadas como bandas únicas, a lo largo del tiempo de muestreo (**Fig. 1, AN y BE**). Este comportamiento, puede reflejar dependencia de algunas poblaciones a la disponibilidad de fuentes de carbono, derivadas de la biotransformación de la mezcla de hidrocarburos, llevada a cabo por poblaciones microbianas más versátiles (bandas comunes). Cambios en la composición de las comunidades microbianas y selección de poblaciones durante la biodegradación se han reportado previamente utilizando análisis comparativo de los perfiles genómicos e intensidad de bandas a través del tiempo, en presencia de hidrocarburos y en diferentes tipos de tratamiento en suelo (Maila et al. 2005, Supaphol et al. 2006). Para el suelo IAN en el periodo analizado (28 a 56 días), la riqueza estimada (S_{Chao2}) para ambos tratamientos intemperizados (**Fig. 2b**), presentó valores elevados, observándose de 8 – 11 genotipos estimados para IAN y de 14 – 22 para IBE.

Villarreal et al. (2004) en su estudio sobre análisis de la biodiversidad, señalaron que la estimación de genotipos a través del índice de Chao2 se basa en la

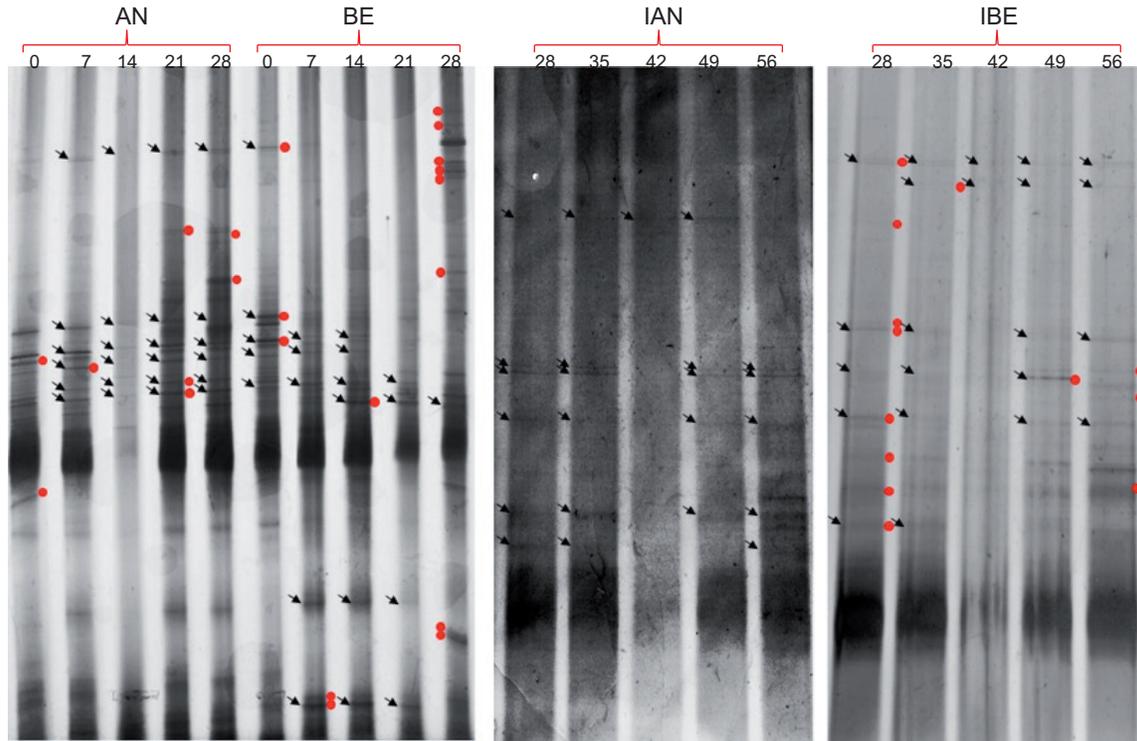


Fig. 1. Perfiles genómicos obtenidos por electroforesis en gel con gradiente de desnaturalizantes durante el ensayo con suelo artificialmente contaminado con hidrocarburos, aplicando diferentes tratamientos: AN-suelo recién contaminado con atenuación natural, BE-suelo recién contaminado-bioestimulado, IAN-suelo intemperizado con atenuación natural, IBE-suelo intemperizado-bioestimulado. Las flechas indican las bandas comunes entre los tiempos de muestreo. Los puntos representan las bandas seleccionadas para secuenciación

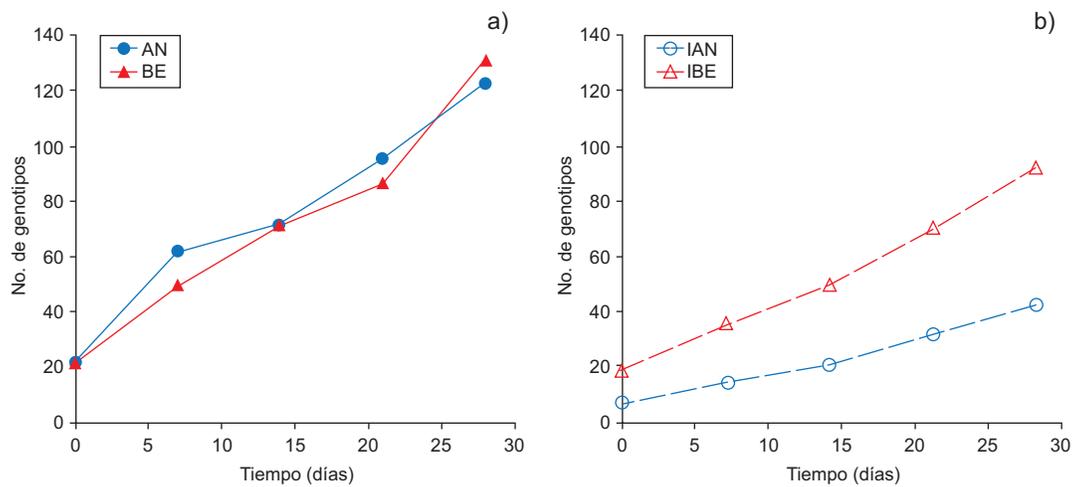


Fig. 2. Riqueza estimada (S_{Chao2}) de genotipos en el ensayo con suelo artificialmente contaminado con hidrocarburos aplicando diferentes tratamientos: a) AN-suelo recién contaminado con atenuación natural, BE-suelo recién contaminado-bioestimulado; b) IAN-suelo intemperizado con atenuación natural, IBE-suelo intemperizado-bioestimulado

proporción entre el número de bandas únicas (raras) y el número de bandas comunes, lo cual explicaría la estimación superior observada en el monitoreo.

La riqueza de genotipos obtenida en los tratamientos AN y BE (**Fig. 2a**) al final del tratamiento, no presentó diferencias significativas ($p < 0.05$), lo cual

reveló que el número de poblaciones bacterianas presentes en ambos suelos recién contaminados fue presumiblemente independiente de la adición de nutrientes. Qiao et al. (2014) encontraron un comportamiento similar con un suelo altamente contaminado con hidrocarburos (63 000 mg/kg) tras la adición de nutrientes inorgánicos, observando el crecimiento simultáneo de diferentes especies microbianas heterótrofas, lo que previno el crecimiento de poblaciones bacterianas dominantes. Los patrones de bandas similares en los perfiles genómicos obtenidos para el AN y BE, reflejan la tolerancia de las poblaciones bacterianas nativas a la presencia de hidrocarburos, así como su posible capacidad para utilizar estos contaminantes como fuente de carbono y energía (Colla et al. 2014).

En general, los suelos contaminados-intemperizados presentaron una riqueza de especies menor, comparados con los suelos recién contaminados, siendo notoria la disminución en la riqueza a través del tiempo de muestreo. Genovese et al. (2014), atribuyeron este comportamiento a la presión de selección ejercida por los contaminantes sobre una comunidad microbiana en SNC, hacia una comunidad formada por microorganismos degradadores y/o resistentes a los hidrocarburos.

Actividad biológica global en el ensayo de biodegradación de hidrocarburos

La actividad deshidrogenasa durante el ensayo de biorremediación con suelo recién contaminado y suelo en condiciones de intemperie se muestra en la **figura 3**. La actividad deshidrogenasa al inicio del monitoreo en el SNC fue de 941.7 $\mu\text{g INF/g}$ suelo

seco y el número de bacterias heterótrofas fue de 2.7×10^7 UFC/g suelo seco. Estos valores se consideraron como iniciales para los tratamientos AN y BE. Para el tratamiento BE, se registró una alta actividad deshidrogenasa durante todo el tiempo de monitoreo (28 días), siendo cinco veces mayor en comparación al SNC y tres veces respecto al registrado para el tratamiento AN (**Fig. 3a**). El número de bacterias se incrementó en un orden de magnitud en el BE (2.9×10^8 UFC/g suelo; T = 28 días) respecto al valor inicial, reflejando el efecto positivo de la adición de nutrientes que favoreció el incremento tanto del número de microorganismos como de la actividad enzimática. Los resultados de la AN y BE son comparables con los registrados en muestras de suelo adyacente al estudiado en el presente trabajo, pero contaminado con hidrocarburos (20 400 mg/kg), donde se obtuvieron valores de $\sim 1.2 \times 10^7$ UFC/g suelo (Riveroll-Larios et al. 2015).

En el IBE (**Fig. 3b**) la actividad deshidrogenasa mantuvo niveles elevados, en los primeros 14 días de monitoreo (28 a 42 días). Posteriormente, se redujo en 50 % ($\sim 1\ 900$ $\mu\text{g INF/g}$) respecto a los valores máximos registrados, lo que corresponde a un número de microorganismos de $\sim 8.8 \times 10^7$ UFC/g (T = 14 días). En general, la actividad deshidrogenasa para el IBE fue tres veces superior respecto a la registrada para el suelo IAN. Éstos resultados sugieren que la bioestimulación favoreció el incremento en la actividad metabólica, lo que coincide con los datos de riqueza registrados bajo condiciones de intemperización.

En un ensayo paralelo, a partir del contenido de hidrocarburos iniciales y finales de estos suelos,

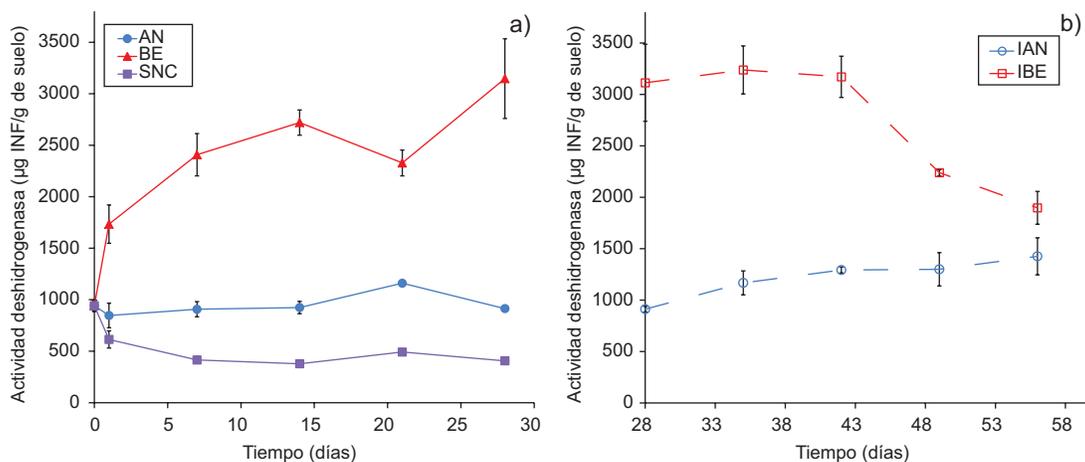


Fig. 3. Actividad deshidrogenasa (mg INF/g de suelo) durante el ensayo con suelo artificialmente contaminado con hidrocarburos aplicando diferentes tratamientos: a) AN-suelo recién contaminado con atenuación natural, BE-suelo recién contaminado-bioestimulado; b) IAN-suelo intemperizado con atenuación natural, IBE-suelo intemperizado-bioestimulado

González-Díaz (2014) determinó un nivel de biodegradación de 25.4 % para el suelo BE y 13.0 %, para el suelo bajo AN, después de 28 días de tratamiento. Mientras que, la remoción fue de 25.5 % para el suelo IBE y 19 % para el suelo IAN al final del periodo de 84 días de tratamiento. Estos valores de biodegradación corresponden con la mayor actividad deshidrogenasa observada en el periodo inicial del monitoreo (**Fig.3a**). En el caso de los suelos sometidos a intemperización, éstos alcanzaron un nivel similar de remoción pero mucho tiempo después.

A través del análisis de correlación de Pearson (r), se determinó una correlación positiva entre el número de microorganismos y la actividad deshidrogenasa, en los suelos recién contaminados e intemperizado-contaminados ($r = 0.7$). Udosen y Okon (2014) reportaron una correlación positiva similar, así como un incremento en la actividad de esta enzima en suelos contaminados con petróleo, en comparación con suelos no contaminados. Así mismo, Yan et al. (2013) demostraron valores de correlación positiva ($r = 0.568$) entre la actividad deshidrogenasa y la degradación de hidrocarburos con cepas aisladas de un suelo sin exposición previa a hidrocarburos. Los resultados de la actividad deshidrogenasa (**Fig. 3**) y su correlación con el contenido de microorganismos, sugiere que el uso de esta enzima es adecuado para el monitoreo del proceso de biodegradación de hidrocarburos.

Identificación de genotipos microbianos nativos en suelo contaminado

La identificación taxonómica de las bandas predominantes recuperadas de los perfiles genómicos de los diferentes tratamientos analizados y SNC (**Fig. 1**, puntos) se muestra en el **cuadro I**. De las siete bandas secuenciadas en los suelos recién contaminados, tres se encontraron presentes en el SNC (RC2, RC3, RC13). Estas bandas pertenecen a miembros de la comunidad bacteriana nativa que persistieron después de la adición de los hidrocarburos. Entre los géneros identificados destacaron *Pelobacter* y *Nocardioides*, que se encontraron en todos los tiempos de muestreo, tanto en el tratamiento AN como en el BE. Las bandas RC18 y RC22 correspondieron a genotipos únicos que aparecieron en el tiempo final del tratamiento BE (T = 28 días), entre los que se pudieron reconocer los géneros *Desulfuromonas* y *Nocardioides* que poseen varios miembros reportados como degradadores de hidrocarburos, presentes en ambientes con bajas concentraciones de oxígeno y alta salinidad (Dastager et al. 2009, Kim et al. 2014). Esto sugiere un cambio en la estructura de la comunidad microbiana con la adición de nutrientes, ya que estas bandas no coinciden con ninguna de las observadas en el SNC. Mientras que la adición de hidrocarburos al suelo no modificó significativamente la composición inicial de la comunidad microbiana nativa, ya que, de las 22

CUADRO I. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS PARCIALES DEL GEN 16S ARNR PROVENIENTES DE BANDAS RECUPERADAS DE LOS PERFILES GENÓMICOS OBTENIDOS DE SUELOS RECIÉN CONTAMINADOS E INTEMPERIZADOS CON HIDROCARBUROS, APLICANDO DIFERENTES TRATAMIENTOS INDICADOS COMO: AN-SUELO RECIÉN CONTAMINADO CON ATENUACIÓN NATURAL, BE-SUELO RECIÉN CONTAMINADO-BIOESTIMULADO, IBE-SUELO INTEMPERIZADO-BIOESTIMULADO

Banda	Tratamiento	Secuencias identificadas en GenBank			% de identificación*	Referencia**
		No. de acceso	Grupo filogenético (clase)	Género		
RC2	BE	NR_102848.1	Betaproteobacteria	Burkholderia	89 %	Ajao et al. 2014
RC3	AN, BE	NR_075013.1	Proteobacteria	Pelobacter	87 %	Kotlar et al. 2011
RC8	AN	NR_041671.1	Clostridia	Desulfosporosinus	80 %	Kuppardt et al. 2014
RC13	AN, BE	NR_044982.2	Actinobacteria	Nocardioides	86 %	Jung et al. 2002
RC17	BE	NR_074925.1	Bacilli	Staphylococcus	97 %	Shukor et al. 2009
RC18	BE	NR_026407.1	Deltaproteobacteria	Desulfuromonas	83 %	Kim et al. 2014
RC22	BE	NR_044234.1	Actinobacteria	Nocardioides	90 %	Dastager et al. 2009
IC4	IBE	NR_075009.1	Deltaproteobacteria	Geobacter	88 %	Rooney-Varga et al. 1999
IC8	IBE	NR_074291.1	Betaproteobacteria	Bordetella	85 %	Wang et al. 2007
IC9	IBE	NR_113732.1	Betaproteobacteria	Bordetella	80 %	Meenakshisundaram y Bharathiraja 2014

*Para la identificación de las bandas se consideraron como criterios: a) un valor esperado de coincidencias (valor-E) menor a 1×10^{-6} (NHGRI 2015), b) un porcentaje de identificación calculado por la herramienta básica de búsqueda local de alineamiento (BLAST, por sus siglas en inglés) superior al 80 % (Aburto y Ball 2009)

**La bibliografía citada corresponde a trabajos donde se identificaron estos géneros como degradadores de hidrocarburos

bandas observadas en el SNC, 16 persistieron en el tratamiento con AN a lo largo del tiempo de muestreo, así como 14 bandas durante el tratamiento BE.

Para los suelos intemperizados, se recuperaron las bandas correspondientes al tratamiento IBE. De las 13 bandas seleccionadas para su reamplificación y posterior secuenciación, tres fueron identificadas a nivel de género (**Cuadro I**), entre las cuales *Geobacter* y *Bordetella* se observaron también en el SNC. Estas bandas también corresponden a géneros con especies bacterianas reportadas como degradadoras de diferentes tipos de hidrocarburos.

De los grupos filogenéticos presentados en el **cuadro I**, los géneros de la clase Betaproteobacteria fueron los más frecuentes, al encontrarse en los tratamientos recién contaminados e intemperizados. Las bandas IC8 e IC9 persistieron durante el tratamiento IBE, la identificación de ambos microorganismos correspondió con géneros reportados previamente como degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Wang et al. 2007, Meenakshisundaram y Bharathiraja 2014). Entre las bandas dominantes identificadas en los suelos recién contaminados, destacan también las correspondientes a la clase Actinobacteria, al registrarse en los perfiles de forma ocasional una banda (RC22) atribuida a *Nocardioi-des*. En contraste, la banda RC13 también identificada como *Nocardioi-des*, se observó en todos los tiempos de muestreo de los tratamientos bajo AN y BE. La ausencia de poblaciones bacterianas pertenecientes a esta clase en el tratamiento IBE puede deberse a que muchas de ellas son degradadoras de alcanos de cadena intermedia (C10-C18), los cuales pudieron agotarse durante los primeros 28 días antes de la toma de muestras (Díaz-Ramírez et al. 2008).

CONCLUSIONES

La evaluación de la actividad deshidrogenasa combinada con la determinación de la estructura y dinámica de las comunidades bacterianas permitió demostrar una alta actividad biológica de los microorganismos nativos y un incremento gradual de la riqueza de poblaciones bacterianas en respuesta a la presencia de los contaminantes y a la bioestimulación. En contraste, en el suelo bajo atenuación natural la intemperización propició una comunidad bacteriana estable con un incremento gradual de la actividad de la enzima deshidrogenasa. Las bandas dominantes identificadas pertenecieron a la clase Betaproteobacteria y Actinobacteria. En general, esta estrategia permitió valorar el potencial de

biodegradación y dinámica de la comunidad procariota durante la biorremediación de hidrocarburos en suelo.

REFERENCIAS

- Aburto A. y Ball A.S. (2009). Bacterial population dynamics and separation of active degraders by stable isotope probing during benzene degradation in a BTEX-impacted aquifer. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 25 (3), 147-156.
- Ajao A.T., Yakubu S.E., Umoh V.J. y Ameh J.B. (2014). Enzymatic studies and mineralization potential of *Burkholderia cepacia* and *Corynebacterium kutscheri* isolated from refinery sludge. *J. Microbiol. Res.* 4 (2), 29-42. DOI: 10.5923/j.microbiology.20140402.01
- Castro-Mancilla Y.V., Castro-Meza B.I., Garza-Requena F.R., Rivera-Ortiz P., Heyer-Rodríguez L. y Ortiz-Carrizales Y.P. (2013). Variación de las poblaciones microbianas del suelo por la adición de hidrocarburos. *Terra Latinoamericana* 31(3), 221-230.
- Colla T.S., Andreatza R., Bücken F., Souza M.M., Tramon-tini L., Prado G.R., Frazzon A. P.G., Camargo F.A.O. y Bento F.M. (2014). Bioremediation assessment of diesel-biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (4), 2592-2602. DOI: 10.1007/s11356-013-2139-2
- Colwell R.K. (2013). EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species from samples, version 5. User's guide and application [en línea]. <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates> 05/04/2015.
- CNH (2014). Derrames y fugas: reporte de derrames de petróleo crudo al primer semestre de 2014. Comisión Nacional de Hidrocarburos [en línea]. <http://www.cofemersimir.gob.mx/expediente/19411/mir/41723/anexo/3027511> 20/04/2014.
- Daniel R. (2011). Soil-based metagenomics. En: *Handbook of molecular microbial ecology II: Metagenomics in different habitats* (F. J. de Bruijn, Ed.). Wiley-Blackwell, Nueva Jersey, EUA, pp. 81-92.
- Das S. y Dash R. (2014). Microbial bioremediation: A potential tool for restoration of contaminated areas. En: *Microbial biodegradation and bioremediation* (S. Das, Ed.). Elsevier Insight. Londres, Reino Unido, pp. 1-21.
- Dastager S.G., Pandey A., Lee J.C., Li W. J. y Kim C.J. (2009). Polyphasic taxonomy of novel Actinobacteria showing macromolecule degradation potentials in Bigeum Island, Korea. *Curr. Microbiol.* 59 (1), 21-29. DOI: 10.1007/s00284-009-9397-8
- Díaz-Ramírez I.J., Escalante-Espinosa E., Adams R., Fócil-Monterrubio R.L. y Ramírez-Saad H. (2013). Hydrocarbon biodegradation potential of native and exogenous

- microbial inocula in mexican tropical soils. En: Biodegradation of hazardous and special products (R. Chamy y F. Rosenkranz, Eds.). InTech, Rijeka, Croatia [en línea]. <http://www.intechopen.com/books/biodegradation-of-hazardous-and-special-products/hydrocarbon-biodegradation-potential-of-native-and-exogenous-microbial-inocula-in-mexican-tropical-s> 05/03/2014.
- Díaz-Ramírez I.J., Escalante-Espinosa E., Favela-Torres E., Gutiérrez-Rojas M. y Ramírez-Saad H. (2008). Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE. *Int. Biodet. Biodeg.* 62 (1), 21-30. DOI: 10.1016/j.ibiod.2007.11.001
- Genovese M., Crisafi F., Denaro R., Cappello S., Russo D., Calogero R., Santisi S., Catalfamo M., Modica A., Smedile F., Genovese L., Golyshin P.N., Giuliano L. y Yakimov M.M. (2014). Effective bioremediation strategy for rapid *in situ* clean up of anoxic marine sediments in mesocosm oil spill simulation. *Front. Microbiol.* 5 (162), 1-14. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00162
- González-Díaz V. (2014). Evaluación de la actividad biológica y potencial de biodegradación de un suelo contaminado por hidrocarburos. Tesis de Licenciatura. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México, 87 pp.
- Gotelli N.J. y Chao A. (2013). Measuring and estimating species richness, species diversity, and biotic similarity from sampling data. En: *Encyclopedia of biodiversity* Vol. 5 (S. A. Levin, Ed.). Academic Press. University of Minnesota, EUA, pp. 195-211.
- Jung C.M., Broberg C., Giuliani J., Kirk L.L. y Hanne L.F. (2002). Characterization of JP-7 jet fuel degradation by the bacterium *Nocardioides luteus* strain BAFB. *J. Basic Microbiol.* 42 (2), 127-131. DOI: 10.1002/1521-4028(200205)42:2<127::AID-JOBM127>3.0.CO;2-C
- Katsivela E., Moore E.R.B., Maroukli D., Strömpl C., Pieper D. y Kalogerakis N. (2005). Bacterial community dynamics during in-situ bioremediation of petroleum waste sludge in landfarming sites. *Biorremediation* 16 (2), 169-180. DOI: 10.1007/s10532-004-4883-y
- Kim S.J., Park S.J., Cha I.T., Min D., Kim J.S., Chung W.H., Chae J.C., Jeon C.O. y Rhee S.K. (2014). Metabolic versatility of toluene-degrading, iron-reducing bacteria in tidal flat sediment, characterized by stable isotope probing-based metagenomic analysis. *Environ. Microbiol.* 16 (1), 189-204. DOI: 10.1111/1462-2920.12277
- Kotlar H.K., Lewin A., Johansen J., Throne-Holst M., Haverkamp T., Markussen S., Winnberg A., Ringrose P., Aakvik T., Ryeng E., Jakobsen K., Drabløs F. y Valla S. (2011). High coverage sequencing of DNA from microorganisms living in an oil reservoir 2.5 kilometres subsurface. *Environ. Microbiol. Rep.* 3 (6), 674-681. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2011.00279.x
- Kumar S., Chaudhuri S. y Maiti S.K. (2013). Soil dehydrogenase enzyme activity in natural and mine soil – a review. *Middle-East J. Sci. Res.* 13 (7), 898-906. DOI: 10.5829/idosi.mejsr.2013.13.7.2801
- Kuppardt A., Kleinsteuber S., Vogt C., Lüders T., Harms H. y Chatzinotas A. (2014). Phylogenetic and functional diversity within toluene-degrading, sulphate-reducing consortia enriched from a contaminated aquifer. *Microb. Ecol.* 68 (2), 222-234. DOI: 10.1007/s00248-014-0403-8
- Lorch H.J., Benckieser G. y Ottow J.C.G. (1995). Basic methods for counting microorganisms in soil and water. En: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. (K. Alef y P. Nannipieri, Eds.) Academic Press, London, Reino Unido, pp. 146-161.
- Maila M.P., Randima P., Surridge K., Drønen K. y Cloete T.E. (2005). Evaluation of microbial diversity of different soil layers at a contaminated diesel site. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 55 (1), 39-44. DOI: 10.1016/j.ibiod.2004.06.012
- Meenakshisundaram M. y Bharathiraja C. (2014). Isolation and molecular identification of hydrocarbon degrading bacteria from oil contaminated soils from Tamilnadu. *Indian J. Appl. Res.* 4 (7), 39-42.
- Muyzer G., Hottentrager S., Teske A. y Wawer C. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. En: *Molecular microbial ecology manual* Vol. 3.4.4 (A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas y F. J. de Bruijn, Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos, pp. 1-23.
- Neto M., Ohannessian A., Delolme C. y Bedell J.P. (2007). Towards an optimized protocol for measuring global dehydrogenase activity in storm-water sediments. *J. Soils Sediments.* 7 (2), 101-110. DOI: 10.1065/jss2007.02.206
- NHGRI (2015). Bioinformatics: Finding functions. National Human Genome Research Institute. [en línea]. <http://www.genome.gov/25020002> 05/06/2015
- Qiao J., Zhang C., Luo S. y Chen W. (2014). Bioremediation of highly contaminated oilfield soil: Bioaugmentation for enhancing aromatic compounds removal. *Front. Environ. Sci. Eng.* 8 (2), 293-304. DOI: 10.1007/s11783-013-0561-9
- Rivera-Cruz M.C., Ferrera-Cerrato R., Volke-Haller V., Fernández-Linares L. y Rodríguez-Vázquez R. (2002). Poblaciones microbianas en perfiles de suelos afectados por hidrocarburos del petróleo en el estado de Tabasco, México. *Agrociencia* 36 (2), 149-160.

- Riveroll-Larios J., Escalante-Espinosa E., Fócil-Monterrubio R.L. y Díaz-Ramírez I.J. (2015). Biological activity assessment in Mexican tropical soils with different hydrocarbon contamination histories. *Water Air Soil Poll.* 226 (10), 353.
DOI: 10.1007/s11270-015-2621-1
- Rojas-Herrera R., Narváez-Zapata J., Zamudio-Maya M. y Mena-Martínez M.E. (2008). A simple silica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments. *Mol. Biotechnol.* 40 (1), 13-17.
DOI: 10.1007/s12033-008-9061-8
- Rooney-Varga J.N., Anderson R.T., Fraga J.L., Ringelberg D. y Lovley D.R. (1999). Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (7), 3056-3063.
- Sanguinetti C.J., Dias-Neto E. y Simpson A.J.G. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17 (5), 915-919.
- SEMARNAT (2000). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación. 23 de abril del 2003.
- Shukor M.Y., Dahalan F.A., Jusoh A.Z., Muse R., Shamaan N.A. y Syed M.A. (2009). Characterization of a diesel-degrading strain isolated from a hydrocarbon-contaminated site. *J. Environ. Biol.* 30 (1), 145-150.
- Simarro R., González N., Bautista L.F. y Molina M.C. (2013). Assessment of the efficiency of in situ bioremediation techniques in a creosote polluted soil: change in bacterial community. *J. Hazard. Mater.* 262, 158- 167.
DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.08.025
- Supaphol S., Panichsaktapana S., Trakulnaleamsai S., Tungkananuruk N., Roughjanajirapa P. y O'Donnell, A.G. (2006). The selection of mixed microbial inocula in environmental biotechnology: Example using petroleum contaminated tropical soils. *J. Microbiol. Methods.* 65 (3), 432-441.
DOI: 10.1016/j.mimet.2005.09.001
- Udosen, I.J. y Okon O.G. (2014). Microbial load and enzyme activities of microorganisms isolated from waste oil contaminated soil in Akwa Ibom state, Nigeria. *Int. J. Res.* 1 (8), 405-414.
- Villarreal H., Álvarez M., Córdoba S., Escobar F., Fagua G., Gast F., Mendoza H., Ospina M. y Umaña A.M. (2004). Métodos para el análisis de datos: una aplicación para resultados provenientes de caracterizaciones de biodiversidad. En: Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad (C.M. Villa, Ed.). Programa de Inventarios de Biodiversidad, Instituto de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia, pp. 187-226.
- Viñas M., Sabaté J., Espuny M.J. y Solanas A.M. (2005). Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (11), 7008-7018.
DOI: 10.1128/AEM.71.11.7008-7018.2005
- Wang F., Grundmann S., Schmid M., Dörfler U., Roherer S., Munch J.C., Hartmann A., Jiang X. y Schroll R. (2007). Isolation and characterization of 1,2,4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil. *Chemosphere* 67 (5), 896-902. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.11.019
- Yan S., Wang Q., Qu L. y Li C. (2013). Characterization of oil-degrading bacteria from oil-contaminated soil and activity of their enzymes. *Biotech. Eq.* 27 (4), 3932-3938. DOI: 10.5504/BBEQ.2013.0050
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. y Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences, *J Comput. Biol.* 7 (1-2), 203-14.
DOI: 10.1089/10665270050081478