

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**



**Seguimiento de la comunidad bacteriana en suelos
contaminados por hidrocarburos durante su tratamiento en
biorreactores de fase semisólida.**

TESIS

Para obtener el grado de:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

Presenta:
I.B.I José Félix Aguirre Garrido

COMITÉ TUTORIAL

Director de tesis	Dr. Octavio Loera Corral
Asesor	Dr. Hugo Ramírez Saad ¹
Asesor	Dra. María del Refugio Trejo Hernández ²

Departamento de Biotecnología UAM-Iztapalapa. Avenida San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina C.P. 09340, México D.F.

¹Departamento de Sistemas Biológicos UAM-Xochimilco, Calzada del hueso 1100. Colonia Villa Quietud, C.P. 04960, México D.F.

²Laboratorio de Biotecnología ambiental del centro de investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Enero 2005

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el Padrón Nacional de Posgrado de CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el No. de registro 0471-O”

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“Seguimiento de la comunidad bacteriana en suelos contaminados por hidrocarburos durante su tratamiento en biorreactores de fase semisólida.”

PRESENTÓ

I.B.I José Félix Aguirre Garrido

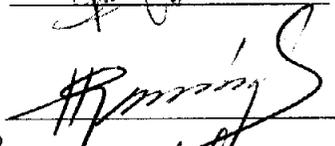
Director:

Dr. Octavio Loera Corral
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



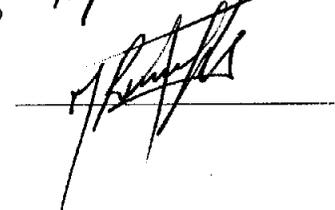
Asesor:

Dr. Hugo Cesar Ramírez Saad
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco



Asesor:

Dra. María del Refugio Trejo Hernández
Universidad Autónoma del Estado de Morelos



Jurado:

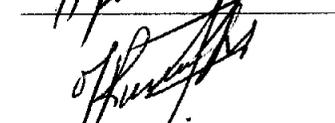
Dra. Florina Ramírez Vives (Presidente).
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Dr. Hugo Cesar Ramírez Saad (Secretario).
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco



Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Vocal).
Universidad Autónoma del Estado de Morelos



Dr. Cesar Hugo Hernández Rodríguez (Vocal).
*Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional*



“Ellos Nunca Sabrán de lo que somos capaces”

A MI FAMILIA ELVIRA Y EDWIN.

A MIS PAPAS BENJAMÍN, RICARDO, RAYMUNDO.

A MIS AMIGOS

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO

A MIS BUZOS

AL MAR

AL ROCK AND ROLL

AL EZLN

A LOS QUE NUNCA CREYERON EN MI

INDICE

RESUMEN	i
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hidrocarburos en México.....	2
1.2 Características de los hidrocarburos.....	3
1.3 Contaminación por hidrocarburos.....	4
1.4 Biodegradación de hidrocarburos.....	5
1.4.1 Biorremediación.....	6
1.4.2 Bioaumentación.....	7
1.4.3 Bioestimulación.....	8
1.5 Diversidad Microbiana en suelos.....	8
1.6 Biomarcadores Moleculares.....	9
1.6.1 El gen 16S rRNA bacteriano.....	10
1.7 Cuenta microbiana.....	11
1.8 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	12
1.9 DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante)	13
1.10 Aplicaciones de PCR y DGGE.....	14
1.11 Análisis de restricción enzimática REA (<i>Restriction Enzyme Analysis</i>)	14
II. JUSTIFICACIÓN	15
III. OBJETIVOS	18
IV. HIPÓTESIS	20
V. METODOLOGÍA	22
5. Colaboraciones.....	23
5.1 Características del suelo.....	23
5.2 Unidades Experimentales.....	24
5.2.1 Solución Mineral M9.....	25
5.3 Unidades Formadoras de Colonias.....	25
5.4 Extracción de DNA a partir de cepas aisladas.....	28
5.5 Electroforesis en gel de agarosa 1% p/v.....	29
5.6 Extracción de DNA del suelo.....	30

5.7 Amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
5.8 Análisis de restricción enzimática (PCR-REA)	33
5.9 Amplificación por PCR para la región V6-V8 del gen 16S rRNA.....	34
5.10 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)	35
VI. RESULTADOS	40
6. Cinéticas de Biodegradación.....	41
6.1 Unidades Formadoras de colonias (UFC).....	42
6.2 Aislamiento y selección de cepas.....	45
6.3 Extracción de DNA de las Cepas aisladas.....	46
6.4 Amplificación del gen 16S rRNA de las cepas aisladas.....	47
6.5 Análisis de restricción enzimática (PCR-REA).....	48
6.6 Amplificación de la región variable V6-V8 del gen 16S rRNA de las cepas aisladas.....	50
6.7 Extracción de DNA de los Consorcios.....	51
6.8 Amplificación del gen 16S rRNA para todos los microorganismos presentes en las muestras.	53
6.9 Amplificación de la región variable V6-V8 del 16S rRNA para todos los microorganismos presentes en las muestras.	54
6.10 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)	55
VII. CONCLUSIONES	60
VIII. BIBLIOGRAFÍA	62
IX. ANEXOS	68

RESUMEN

Los problemas de contaminación derivados de la explotación de recursos naturales como el petróleo hacen necesario la implementación de tecnologías eficientes y baratas para tratar los lugares contaminados, una de estas posibles soluciones es la biorremediación que utiliza enzimas y microorganismos para la remoción de los compuestos contaminantes. Una de las estrategias para hacer más eficiente la biorremediación en suelos es la bioestimulación que básicamente consiste en la adición de nutrientes y aceptores de electrones para favorecer la actividad biológica de los microorganismos. Una de las formas de evaluar la respuesta de la comunidad bacteriana a la bioestimulación es mediante cuenta en placa o unidades formadoras de colonias (UFC), y que en adición permite obtener aislados de los distintos sistemas en tratamiento. El uso de técnicas de biología molecular como el análisis de amplicones con enzimas de restricción (PCR-REA) y la electroforesis en gel con gradiente desnaturante DGGE, nos permiten evaluar con mayor eficacia el comportamiento de los microorganismos que intervienen en la biotransformación de compuestos contaminantes. El objetivo de este trabajo fue comparar las poblaciones bacterianas de suelos contaminados con hidrocarburos, tratados en distintos biorreactores en fase semisólida con y sin bioestimulación, así como tipificar los aislados hidrocarbonoclastas más abundantes en cada tratamiento.

Los conteos se llevaron a partir de tres reactores de tambor rotatorio de fase semisólida; el reactor E1 con 150 g de carga sin bioestimulación, E2 con 150 g de carga y bioestimulación con solución mineral M9, E3 con bioestimulación de solución mineral M9 y 5000 g de carga en el sistema.

El número de cuentas viables aumenta significativamente ($P > 0.005$) en los sistemas bioestimulados tanto en los medios para bacterias hidrocarbonoclastas y totales. Se aislaron 31 cepas en medio para bacterias hidrocarbonoclastas para las diferentes muestras, tomando las características morfológicas de las colonias. Estos aislados se sometieron a la extracción de DNA y posteriormente a las pruebas de PCR-REA, en donde basados en los patrones de restricción se formaron 18 grupos de cepas.

Del análisis del consorcio y cepas con la metodología de DGGE, con respecto al tiempo se observan cambios en los patrones de bandas, conforme se lleva a cabo la biodegradación en los 3 experimentos, en la comparación de los sistemas bioestimulados y sin bioestimar también se encontraron algunos cambios en las bandas de un experimento a otro y de los 18 grupos de cepas utilizadas, sólo dos cepas la 1 y 8 coinciden con alguna banda de los consorcios.

I. INTRODUCCIÓN

I. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

1.1 HIDROCARBUROS EN MEXICO

Uno de los grandes problemas que ha tenido la humanidad en su historia reciente es la contaminación. La creciente explotación de los recursos naturales y la contaminación que esto conlleva han sido uno de los mayores retos a los que se enfrentan las nuevas generaciones de profesionistas. Los enfoques más plausibles deben encontrar un equilibrio entre las tecnologías más baratas y las más limpias, es decir que tengan el menor impacto ecológico posible; así como la búsqueda de nuevas tecnologías que permitan la descontaminación de todo tipo de entornos.

La exploración petrolera en México actualmente puede dividirse en varias etapas: a) Trabajos de reconocimiento; b) Trabajos de detalles; c) Estudios para la localización de pozos exploratorios; y d) Análisis de los resultados obtenidos para programar la perforación de nuevos pozos (Secretaría de energía, 2002)

Los trabajos de reconocimiento se encargan de estudiar las condiciones geológicas de un área para estimar las posibilidades de que contenga hidrocarburos. Incluyen exploraciones fotogeológicas, de geología superficial y estudios físicos de gravimetría, magnetometría y sismología regional. La información obtenida en las exploraciones geológicas y geofísicas se analiza cuidadosamente para decidir los sitios donde deben perforarse los pozos exploratorios. Durante la perforación de estos pozos, geólogos y paleontólogos estudian las muestras de roca cortadas por el pozo, haciendo periódicamente mediciones geofísicas dentro del mismo. Los resultados de estos estudios definen las capas del subsuelo que contienen hidrocarburos y de las cuales puede extraerse petróleo (Saval, 1995). Las actividades exploratorias se encauzan al objetivo de descubrir mayores reservas y evaluar las posibilidades petrolíferas de nuevas regiones.

En México el desarrollo de los energéticos hizo necesario en los últimos años la localización de nuevos yacimientos. Para tales fines, a las técnicas ya establecidas se incorporaron métodos más avanzados y novedosos como la geoquímica en trabajos de geología superficial y el sistema sismográfico de dimensión tridimensional en la plataforma marina de Campeche.

El desarrollo petrolero y el crecimiento de esa industria en México han colocado a PEMEX como la séptima empresa productora de petróleo en el mundo, con una producción de 3.3 millones de barriles diarios (Secretaría de Energía México, 2002). Al 1 de enero de 2004 las reservas totales de petróleo en México ascendieron a 34,388.9 millones de barriles, cifra que representa el 71.6 por ciento de las reservas remanentes totales de hidrocarburos. Nuevos yacimientos se han encontrado en el golfo de México, con este descubrimiento las reservas aumentarían a 102 mil millones de barriles, lo que colocaría al país por arriba de productores de Medio Oriente como Emiratos Árabes Unidos que tiene 97 mil 800 o Kuwait o Irán que poseen 94 mil y 89 mil 700 millones, respectivamente. (PEMEX, 2004)

1.2 CARACTERISTICAS DE LOS HIDROCARBUROS

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos, que son compuestos presentes en la naturaleza, formados por átomos de carbono e hidrogeno. Se considera a los hidrocarburos de petróleo como una mezcla compleja de gases, líquidos y sólidos, existiendo pequeñas mezclas de nitrógeno, oxígeno y azufre, además de contener compuestos de hierro, níquel, vanadio y otros metales (PEMEX, 1988). En la Tabla 1.2.1 se muestra el contenido de hidrocarburos que contiene el petróleo, siendo los hidrocarburos saturados los que se encuentran en mayor proporción. PEMEX obtiene tres variedades de petróleo crudo. La composición y características de estos tres tipos de petróleos se aprecian en la Tabla 1.2.2.

Hidrocarburo	Algunos compuestos representativos	Porcentaje %
SATURADOS	Metano, etano, butano, hexano.	44

AROMATICOS	Benceno, tolueno, xileno, etilbenceno, naftaleno.	17
RESINAS	Piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos.	14
ASFALTENOS	Ácido nafténico, metilporfirinas.	25

Tabla.-1.2.1 Contenido aproximado de los principales hidrocarburos en el petróleo (PEMEX, 2001).

Nombre	Características
Istmo	Petróleo ligero, con densidad de 33.6 grados API y 1.3% de contenido de azufre en peso
Maya	Petróleo pesado, con densidad de 22 grados API y 3.3 % de contenido de azufre en peso
Olmecca	Petróleo superligero, con densidad de 39.3 grados API y 0.8% de contenido de azufre en peso

Tabla.-1.2.2 Variedades de petróleo crudo mexicano para exportación. (PEMEX, 2000)

1.3 CONTAMINACION POR HIDROCARBUROS

Las diferentes actividades industriales que efectúa PEMEX en distintas zonas del país, generan una gran cantidad de contaminantes debido a: la emisión de humos, polvos, gases, y descargas de aguas residuales generadas durante la perforación de pozos petroleros, por la extracción de líquidos, por su refinación y producción de petroquímicos. Además, la transportación de petróleo crudo y productos refinados por buques tanque y tuberías en donde se producen derrames de petróleo. (Ver Tabla 1.3)

Derrames al suelo durante 2001	Incidencia	Barriles
PEMEX exploración y explotación (PEP)	403	14,160
PEMEX refinación (PR)	67	43,493
Totales	470	57,653

Tabla.-1.3 Residuos anuales generados por los procesos de Refinación y Petroquímica de Petróleos Mexicanos. (PEMEX, 2001)

La contaminación de los suelos por hidrocarburos altera considerablemente las características físico-químicas del mismo, produciendo marcados efectos en el resto del ecosistema, al aumentar la mortandad de microorganismos, plantas y animales.

En los estados de Campeche, Tabasco, Veracruz y Chiapas se encuentran las reservas de petróleo más grandes de nuestro país, por lo que la diversidad que representa cada zona de extracción conlleva a que cada sitio tenga características de suelo diferente como: contenido de materia mineral, materia orgánica, agua, aire y poblaciones diferentes de microorganismos. La complejidad y especificidad que representa cada suelo contaminado, por su estructura, características fisicoquímicas y biológicas, así como por la gran variedad de los contaminantes, requiere por lo general, de trenes de tratamiento específicos. Los métodos tradicionales de remediación de estos sitios se basan en tecnologías que se han desarrollado en los últimos 20 años como tratamientos físicos y químicos para reducir la concentración de hidrocarburos en los sitios.

1.4 BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

La biodegradación de hidrocarburos en suelos es una alternativa que puede emplearse tanto para el tratamiento como para la disposición final de los residuos producidos por las refinerías de petróleo. En la actualidad se ha comenzado a comprender que la capacidad de autodepuración de los suelos es restringida y que las actividades de la comunidad microbiana, responsable de la biodegradación, se reprimen con la incorporación masiva e irracional de residuos, ya sea por las altas concentraciones que retrasan su degradación o por su condición de residuos peligrosos (Pozzo Ardizzi y col, 1996). La biodegradación de hidrocarburos compite con técnicas físicas para tratar los sitios contaminados con hidrocarburos, por ejemplo la excavación de los sitios contaminados, técnica que se utiliza pero tiene la desventaja de ser costosa y no produce ningún cambio físico en los contaminantes presentes en el suelo (Betts W, 1991)

1.4.1 BIORREMEDIACION

La biorremediación se ocupa de la utilización de sistemas biológicos, tales como enzimas y microorganismos, para producir rupturas o cambios moleculares en contaminantes y sustancias de importancia ambiental en suelos, aguas y aire, generando compuestos de menor o ningún impacto ambiental. Estas degradaciones o cambios ocurren usualmente en la naturaleza, sin embargo, la velocidad de tales cambios es baja. Mediante una adecuada manipulación, estos sistemas biológicos pueden ser optimizados para aumentar la velocidad de cambio o biotransformación y así usarlos en sitios con una elevada concentración de contaminantes. En general, las manipulaciones involucran desde la producción e inmovilización de enzimas en determinados soportes, hasta cambios genéticos a algunas cepas bacterianas. La incorporación de los hidrocarburos en las membranas de los microorganismos juega un papel determinante en la biotransformación de los hidrocarburos, a ácidos grasos. (Rodgers y col, 2000) La biorremediación en fase semisólida ha surgido como una alternativa atractiva para el tratamiento de sitios contaminados con elevadas concentraciones de hidrocarburos de petróleo, se caracteriza porque facilita la desorción del contaminante de las partículas del suelo, aumenta su biodisponibilidad y mejora el proceso de degradación microbiano (Pradhan y col, 1998). En Europa se reportan alrededor de 350 000 sitios contaminados al año, en donde la utilización de surfactantes, se ve limitada por la poca penetración de éstos en el suelo en tratamientos in-situ, la biorremediación ofrece ventajas en cuanto al costo del tratamiento (Troquel y col, 2002).

Las técnicas de biorremediación pueden ser clasificadas según el tratamiento y a la fase usada. Se denomina biorremediación *in situ* cuando el suelo contaminado se trata en el lugar, el sitio permanece prácticamente inalterado durante el tratamiento mientras que en la biorremediación *ex situ* el suelo es retirado y trasladado hasta una unidad de tratamiento.

El tratamiento es efectuado en fase sólida si el suelo es tratado sobre un lecho especialmente preparado y no hay líquido libre. Por el contrario se denomina fase barro cuando se lleva en un reactor y se forma barro entre el suelo y agua. La biorremediación in-situ es una de la tecnologías mas promisorias para tratar suelos, en este caso la acciones que se siguen están encaminadas a mejorar la remoción de hidrocarburos que se lleva a cabo de manera natural , con la adición de nutrientes o microorganismos (Troquet y col, 2002) En general existen dos

estrategias para ayudar a un ecosistema a remediarse: la primera es agregar nutrientes para estimular las poblaciones naturales y así aumentar su actividad y la segunda es introduciendo microorganismos exógenos dentro del ecosistema como forma de remediación. En los procesos de biorremediación se utilizan ampliamente dos estrategias para acelerar la biodegradación de los contaminantes: la bioaumentación y la bioestimulación.

1.4.2 BIOAUMENTACION

La bioaumentación es la inoculación del suelo y entornos cerrados (biorreactores, tanques, depósitos) con microorganismos nativos, foráneos o modificados genéticamente, para promover y acelerar una actividad biológica específica, como puede ser la degradación de un contaminante.

La bioaumentación es teóricamente atractiva para el tratamiento de suelos en donde la cantidad de contaminantes es elevada. En la bioaumentación es importante conocer que microorganismos están presentes a diferentes concentraciones de contaminantes, para esto se pueden utilizar técnicas moleculares como PCR y DGGE. (Kazuya y col, 1998), las cuales se describen mas adelante. La adición de consorcios o microorganismos nativos al suelo contaminado proporciona la ventaja de una adaptación más rápida en comparación con la adición de microorganismos ajenos a éste, además de presentar una resistencia mayor a las variaciones del ambiente (Mishra y col, 2001)

1.4.3 BIOESTIMULACION

La bioestimulación consiste en la adición de nutrientes así como la introducción de oxígeno, u otros aceptores de electrones al sitio contaminado, para favorecer e intensificar la actividad

biológica de los microorganismos que se encuentran presentes en él. Su uso se recomienda cuando el sitio contaminado carece de los nutrientes necesarios para soportar el crecimiento microbiano. (Christodoulatos y Koutsospyros 1998; Riser-Roberts, 1998). En trabajos reportados se observan cambios en la diversidad de microorganismos presentes en un consorcio que remueve hidrocarburos así como un cambio significativo en los porcentajes de remoción al adicionar nutrientes en el suelo (Roling, y col, 2002)

1.5 DIVERSIDAD MICROBIANA EN SUELOS

La recuperación de un ambiente contaminado con hidrocarburos por medio de la biorremediación exige un adecuado estudio y caracterización de los microorganismos que, una vez probada su actividad hidrocarbonoclasta, podrían emplearse para acelerar los procesos de biodegradación.

La diversidad, dinámica natural de los microorganismos presentes en el suelo y su inaccesibilidad es uno de los mayores impedimentos para desarrollar tecnologías que puedan ser aplicadas en el campo, esto requiere un entendimiento de los procesos fundamentales en la ecología microbiana del suelo, conociendo las relaciones existentes entre los microorganismos, los procesos biológicos de éstos, la dinámica que presentan éstos en el suelo, además de la composición y parámetros fisicoquímicos de los suelos. Debido a todos esos factores gran parte de los microorganismos presentes en el suelo no pueden ser cultivados. Alrededor de solo 1 a 10% de los microorganismos totales en el suelo pueden ser cultivados (Muyzer y col, 1993), el uso de técnicas de biología molecular ayuda a entender la composición microbiana de un suelo, así como la dilucidar en la dinámica presente (Amanm, 1995). Estudios actuales muestran que el análisis de marcadores moleculares como el 16S rRNA el gen que codifica el 16S rDNA facilitan el seguimiento de una población en particular (Muyzer y De Waal, 1993).

En estudios de biorremediación de suelos se han reportado cambios en las bandas del DGGE asociadas a diferentes microorganismos con respecto a cambios en las concentraciones de los hidrocarburos, decreciendo en número a medida que los contaminantes aumentan (Duarte y col, 2000). En otros estudios se ha demostrado también que los nutrientes como oxígeno, nitrógeno y fósforo presentes en los procesos de biorremediación (Leahy & Colwell, 1990), son un factor limitante en la biorremediación, a concentraciones elevadas se puede presentar eutrofización; una concentración elevada de nutrientes que lleva a un deterioro del sistema, y a concentraciones bajas de nutrientes se observan remociones limitadas de hidrocarburos, observándose un cambio en el patrón de bandas en el DGGE al alterar la concentración de estos nutrientes (Röling y col, 2002)

1.6 BIOMARCADORES MOLECULARES

La utilización de marcadores moleculares que permitan la caracterización de los microorganismos presentes en la degradación de hidrocarburos, nos permite tener una visión más clara de las poblaciones microbianas involucradas. Son biomoléculas, particulares a un grupo microbiano y con las cuales se puede obtener una buena diferenciación.

Muchos investigadores han realizado estudios utilizando los genes rDNA como marcadores moleculares, para detectar poblaciones microbianas, así como para describir la estructura de comunidades microbianas en diferentes ambientes.

Otros estudios realizados en Alemania emplean biomarcadores moleculares para caracterizar poblaciones microbianas que degradan metano en el suelo (Henckel. y col, 2000). Estas investigaciones combinan el uso de marcadores de lípidos y de genes como marcadores. (MacNaughton. y col, 1999)

1.6.1 El gen 16S rRNA bacteriano

Los tres genes ribosomales en bacterias codifican para tres moléculas de RNA (16S, 23S y 5S) y constituyen parte de la estructura del ribosoma. Algunos estudios han mostrado que dentro del genoma de todos los procariotas se encuentra el gene 16S, con regiones conservadas y regiones variables como lo muestra la Fig. 1.6.1 (Kazuya y col, 1998; Andrew. y col, 2000; Robert. y col, 2000; Allison. y col, 2001). Esta característica le transfiere una importante utilidad, como biomarcador, ya que se encuentra presente en todos los organismos. Algunas regiones de este gen poseen una alta conservación estructural y funcional y útiles en la diferenciación de organismos lejanos filogenéticamente mientras que las regiones variables útiles en la detección de organismos, filogenéticamente cercanos.

Por estas características, la secuencia de estas biomoléculas se pueden utilizar para la construcción de árboles filogenéticos. En las bacterias, este gen posee alrededor de 1.5 kp

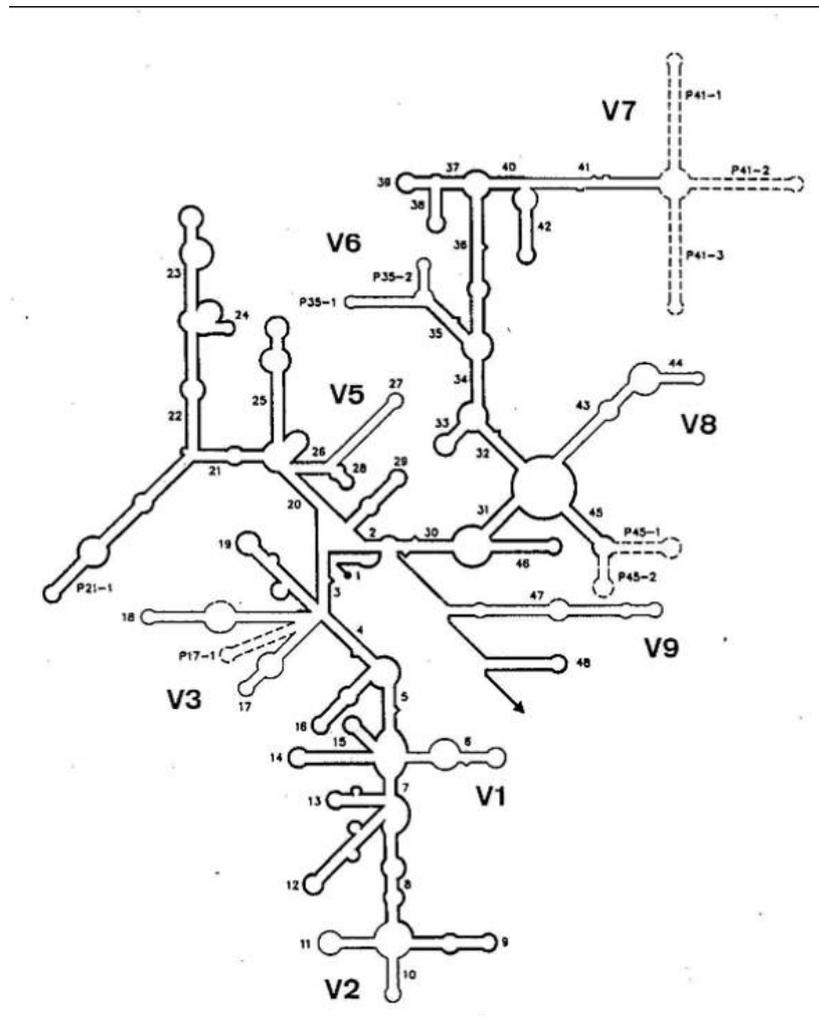


Figura 1.6.1.- Diagrama de la estructura secundaria del gen 16S rDNA de *E. coli*, en la presente tesis se trabajó con las regiones variables V6 a V8

1.7 Cuenta Microbiana

El crecimiento de una población microbiana se mide siguiendo los cambios en el número de células o el peso de la biomasa celular. Existen diversos métodos para contar el número de células para estimar la masa celular dependiendo del microorganismo que se trate.

El número de colonias obtenido en un conteo de microorganismos viables depende no solamente del tamaño del inóculo, sino también del medio de cultivo y las condiciones de

incubación empleadas. Para representar el resultado más claramente, el conteo de microorganismos viables a menudo se expresan como unidades formadoras de colonias en lugar de células viables (Madigan y col, 1999).

Algunos géneros bacterianos degradadores de hidrocarburos reportados: *Achromobacter*, *Actinomycetes*, *Agrobacterium*, *Acidivorax*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Beijerinckia*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Marinobacter*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sarcina*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Vibrio*, *Xanthobacter* y *Xanthomonas* (Prince, 2003)

1.8 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Actualmente se utilizan técnicas de biología molecular como la PCR como herramienta para la amplificación de genes o fragmentos específicos de DNA, incrementando notablemente nuestras posibilidades de detección.

El PCR (*Polimerase Chain Reaction*) es una técnica de duplicación (amplificación) exponencial de DNA ó RNA. Se utiliza como enzima a la *Taq*-polimerasa proveniente de la bacteria *Thermos aquaticus*, un cebador o primer que se une a la región de material genético que se desea duplicar y nucleótidos que la enzima *Taq*-polimerasa va uniendo. El proceso de duplicación consta de tres etapas principales, la desnaturalización, el alineamiento y la síntesis.

Algunos estudios señalan que la adición de albúmina sérica bovina en la reacción de PCR, favorece las condiciones de amplificación disminuyendo el efecto de inhibidores, como los ácidos húmicos, haciendo mas eficiente la reacción (Romanowski, 1993)(Creader C, 1996). La reacción de PCR permite amplificar genes o fragmentos de genes que se pueden utilizar para la identificación de microorganismos del suelo (Bruce y col. 1992).

1.9 DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturante)

Otra herramienta, el DGGE (*Denaturing Gradient gel electrophoresis*), nos permite separar fragmentos previamente amplificados por PCR, que presentan diferencias mínimas en su secuencia de nucleótidos.

Esta técnica se basa en la migración diferencial de las moléculas de DNA a través de un gel de poliacrilamida que contiene concentraciones crecientes de agentes desnaturantes como formamida ó urea (Kazuya y col, 2000). Esta diferencia puede ser de un solo nucleótido. La desnaturalización total del DNA se evita uniendo al DNA un broche o *clamp* de guanina y citosina (G-C) que impide la desnaturalización total.

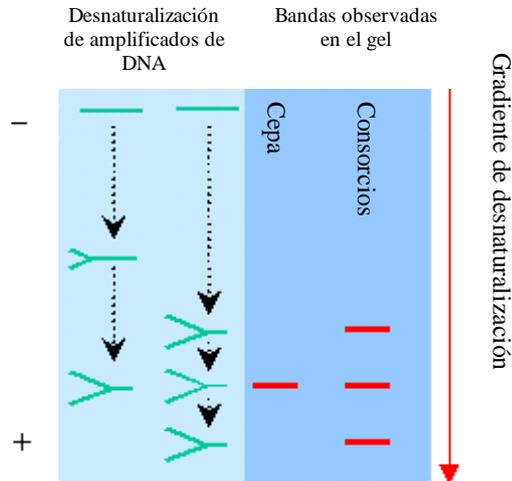


Figura 1.9.- Principio del gel en gradiente desnaturante

1.10 Aplicaciones de PCR y DGGE

A continuación se muestran ejemplos de la utilización de estas técnicas de biología molecular: Para conocer la estructura, distribución y diversidad de microorganismos presentes en la biorremediación de fenol en una planta industrial se utilizaron PCR del 16 rDNA y DGGE (Andrew y col, 2000). Algunos investigadores combinan la utilización de PCR y DGGE con técnicas para la extracción de DNA, para caracterizar microorganismos presentes en pastizales ingleses (Robert. y col, 2000, Allison. y col, 2001).

Estudios realizados en la universidad de Nueva Delhi en la India, muestran los efectos de adición de microorganismos para estimular la biorremediación in-situ de un suelo contaminado con hidrocarburos y el seguimiento de este sistema utilizando técnicas de biología molecular como DGGE y PCR-REA.(Mishra S y col, 2001)

Algunas investigaciones se han llevado a cabo en suelos contaminados con hidrocarburos que además contienen altas concentraciones de azufre, utilizando técnicas de DGGE y PCR para identificar los microorganismos más representativos en la degradación de compuestos azufrados, en especial cuando la mayor parte de ellos no son cultivables por técnicas convencionales (Frois y col, 2001).

1.11 Análisis de restricción enzimática REA (*Restriction Enzyme Analysis*)

El estudio del genoma de los microorganismos es un componente central utilizado para el entendimiento de la biología. La digestión enzimática, rompe al DNA genómico en fragmentos más pequeños para su posterior análisis. Los mapas de restricción son útiles, porque nos ayudan a entender el orden de los genes o la organización de los cromosomas en el genoma de un microorganismo originando diferencias en el arreglo y composición de uno a otro. De allí una importante aplicación de estos mapas de restricción, la tipificación. La tipificación permite discriminar cepas originalmente identificadas como la misma especie,

gracias a que variaciones en un solo nucleótido pueden dar origen a patrones de restricción distintos.

III. OBJETIVOS

3 OBJETIVO GENERAL

Evaluar por técnicas moleculares los cambios en las comunidades bacterianas presentes en suelos mexicanos contaminados por hidrocarburos durante su tratamiento en biorreactores.

3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

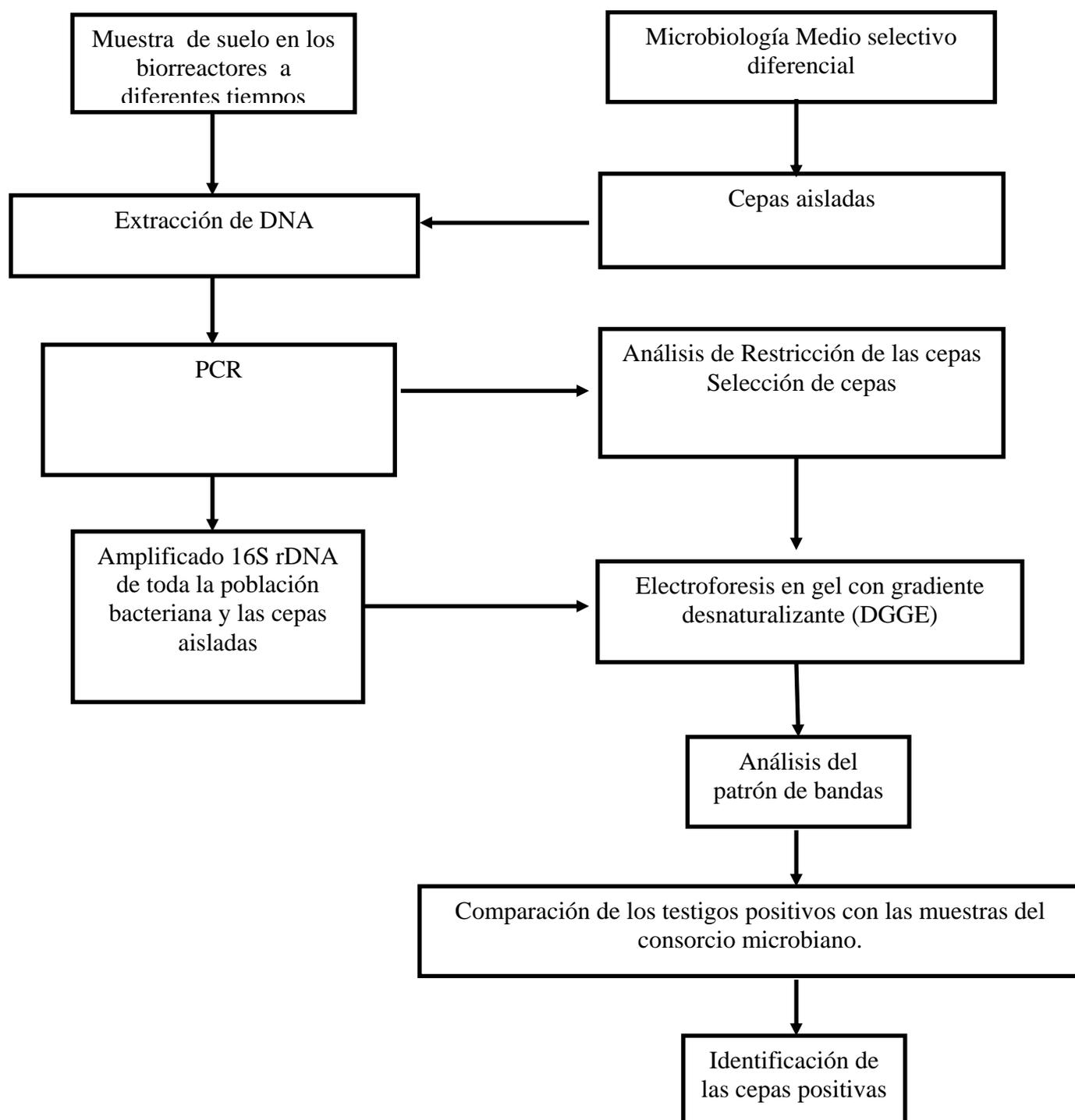
- Cuantificar las bacterias totales e hidrocarbonoclastas durante el tratamiento en biorreactores de suelos mexicanos contaminados por hidrocarburos.
- Aislar y tipificar cepas hidrocarbonoclastas del consorcio microbiano estudiado.
- Estandarizar las técnicas de extracción de DNA de las muestras de los suelos.
- Identificar la relación existente entre las bandas de especie de microorganismos dominantes detectadas por DGGE en un consorcio microbiano, con la degradación de los hidrocarburos.

IV. HIPOTESIS

4. HIPOTESIS

La dinámica de poblaciones microbianas de un suelo contaminado con hidrocarburos, se puede seguir a través del uso de técnicas moleculares. Además de que se podrá identificar los aislados hidrocarbonoclastas con más participación en la remoción de hidrocarburos. Esto permitirá conocer con más detalle su relación con las cinéticas de remoción en un biorreactor.

4.1 Estrategia Experimental



V. METODOLOGIA

5. Colaboraciones

El estudio que se realizó estuvo asociado con trabajos en paralelo realizados en el laboratorio de biotecnología ambiental del centro de investigación en biotecnología en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) a través del proyecto FIES 98-30-VI, el Centro de investigaciones y estudios superiores del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) y la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Unidades Iztapalapa y Xochimilco. Las muestras de los biorreactores se obtuvieron directamente en la UAEM en colaboración con la química Karla Patricia Mayolo Deloisa.

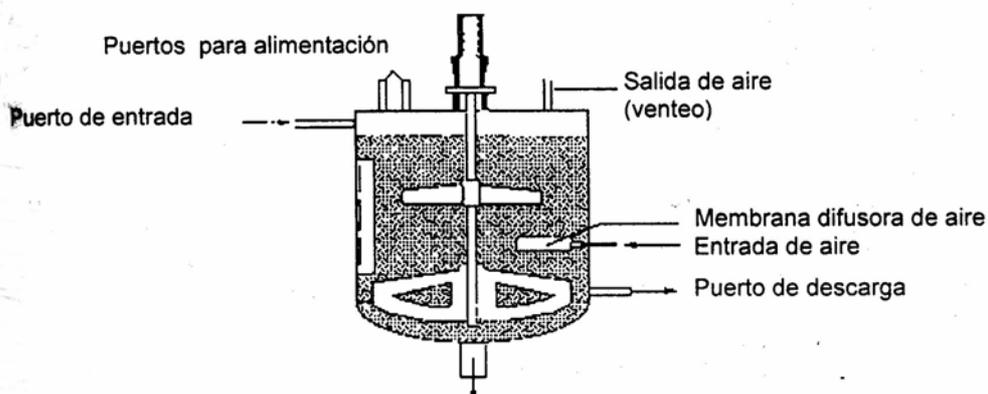


Figura 5.- Biorreactor agitado para biorremediación en fase semisólida (Modificado de Brox, 1993)

5.1 Características del suelo

Las muestras de suelo con las que se trabajaron provienen del campo X de Poza Rica Veracruz con una extensión de 7,874 m², campo en el que se intemperizan suelos contaminados con hidrocarburos. La contaminación de esta zona por desechos de hidrocarburos tiene aproximadamente 30 años, este suelo presenta una concentración de hidrocarburos de 65,000 ppm aproximadamente. El suelo colectado se tamizó en malla de 0.8 mm para homogenizar el tamaño de partícula, se muestreo también suelo control sin contaminación de hidrocarburos, cercano al campo X (datos proporcionados el laboratorio de biotecnología ambiental del centro de investigación en biotecnología en la UAEM).

Parámetro	Suelo
Materia Orgánica (%)*	15.7 ± 0.87
Carbono Orgánico Total (%)*	9.1
Nitrógeno Total (%)*	0.18
Fósforo (%)*	0.11
Arena (%)*	42.3
Limos (%)*	56.6
Arcilla (%)*	0.99
Textura *	Migajón-Limoso
PH **	7.9 ± 0.05
Humedad Relativa (%)**	5.66 ± 0.23
Densidad Aparente (g/cm ³)**	1.10 ± 0.001
Densidad Real (g/cm ³)**	2.14 ± 0.1
TPHs (ppm)**	64794 ± 550

Tabla 5.1 * Datos determinados por el IMP, ** Datos determinados por la UAEM

5.2 Unidades Experimentales

Para los estudios de biorremediación se hicieron tres experimentos en el laboratorio de biorremediación de la Universidad Autónoma de Morelos, en el primero (**E1**) se colocaron en frascos tipo Mason Jar de 500 mL 150 g de suelo 70 % con un porcentaje de humedad del 30 % p/p (se adicionó agua de la llave estéril), dentro de un sistema rotatorio a 20 rpm, temperatura de 25 °C (figura 5.1) Los muestreos se realizaron a tiempo inicial y tiempo final (15 días), se hicieron controles abióticos con cloruro de mercurio al 5% y para cada punto se tuvieron dos repeticiones. En el segundo (**E2**) se colocaron en frascos tipo Mason Jar de 500 mL, 150 g de suelo con un porcentaje de humedad del 30%, dentro de un sistema rotatorio a 20 rpm, 25 °C, se adicionó la solución mineral M9 (en lugar de agua) descrita posteriormente como parte del tratamiento de bioestimulación, controles abióticos con 2.5% p/p de HgCl₂, los muestreos se realizaron a tiempo inicial, a los 7 días, 15 días, 21 días y tiempo final 30 días, solo hubo una repetición de este experimento. Finalmente se montó el tercer experimento (**E3**) con bioestimulación (presencia de solución mineral M9 aportando 30 % de humedad al suelo seco) y 5000 g de carga de suelo en un biorreactor de 20L, aireación constante de 1 mL de aire/min, agitación de 20 rpm y 25 °C y sin repetición. El muestreo se llevó a cabo al tiempo inicial a los 7, 15, 21 y 30 días (Fig. 5.2).



Figura 5.1 Frascos tipo Mason Jar de los experimentos E1 y E2



Figura 5.2 Biorreactor de fase semisólida en donde se llevo a cabo el experimento E3

5.2.1 Solución Mineral M9

La solución M9 tuvo la siguiente composición por cada 500 mL de agua desionizada: 9g de NaHPO_4 ; 4.5g KH_2PO_4 ; 0.75g de NaCl ; 1.5g de NH_4Cl ; 3mL de NaSO_4 1M y 0.15 mL de CaCl_2 1M.

5.3 Unidades Formadores de Colonias

El conteo de microorganismos viables UFC/g se hizo de acuerdo a Alef y Nannipieri (1995), usando medio nutritivo para microorganismos totales, descrito mas adelante y

medio para microorganismos hidrocarbonoclastas, del campo X de Poza Rica contaminado con hidrocarburos.

Reactivos

- 1.- Solución salina isotónica (NaCl al 0.85%), esterilizar a 15 PSI durante 15 min.
- 2.- Medio para bacterias totales (Agar Nutritivo)

Composición	g/L
Peptona de carne	5.0
Extracto de carne	3.0
Agar-Agar	12

- 3.- Medio Mineral para bacterias hidrocarbonoclastas

Composición	g/L
Agar Noble	1.5 % p/v
KH ₂ PO ₄	0.4
K ₂ HPO ₄	1.6
NH ₄ Cl	1.5
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.17
Na ₂ SO ₄	0.609
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.045
Solución mineral*	1 mL

* Solución mineral

Composición	g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	5.1
MnCl ₂ .2H ₂ O	0.66
NaCl	1.0
FeCl ₃ .6H ₂ O	1.0
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.1
CuCl ₂	0.01
ZnCl ₂	0.06
AlCl ₃	0.05
H ₃ BO ₃	0.01
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.04

Todos los medios y las soluciones se esterilizan por 15 min a 15 psi

La cuenta en placa de microorganismos hace referencia a las células viables capaces de crecer en un medio de cultivo sólido. Normalmente se reporta el número de unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro de suelo. Los medios utilizados en el presente trabajo fueron el medio nutritivo para bacterias totales y el medio mineral para bacterias hidrocarbonoclastas, en ambos medios se utilizaron diluciones seriadas para el plaqueo y conteo. A continuación se describe la metodología seguida para el cultivo de los microorganismos totales e hidrocarbonoclastas presentes en las muestras.

Se pesó un gramo de suelo de los tres diferentes experimentos con sus repeticiones, así como de los controles abióticos con HgCl_2 creados por las características de este compuesto de alta toxicidad y así probar que las remociones de hidrocarburos dependían de la presencia de los microorganismos en el suelo y las muestras de suelo sin contaminantes. Se colocó en frascos que contienen 99 mL de solución isotónica (NaCl al 0.85%), se mantuvo la muestra en agitación durante 30 min. A continuación se tomó 1 mL de esta solución y se agregó al primer tubo con 9 mL de solución isotónica, se agitó por un minuto en el vórtex, de éste tubo se tomó 1 mL y se colocó en otro tubo con 9 mL de solución isotónica. El procedimiento se repitió hasta tener una dilución de 10^{-7} .

Para las cajas Petri con agar nutritivo, se inocularon las diluciones por triplicado, con la ayuda de una varilla en “L” se distribuyó el inóculo en el medio de cultivo. Para las cajas con medio mineral para bacterias hidrocarbonoclastas, se colocó un papel impregnado con crudo maya, en la parte superior de la caja, como lo muestra la Fig. 5.3. En este medio se reinocularon las cepas encontradas para que los microorganismos que crecieran tomando exclusivamente como fuente de carbono al petróleo impregnado en el papel filtro. Los conteos se llevaron a cabo a las 48 hrs. y a las 96 hrs.

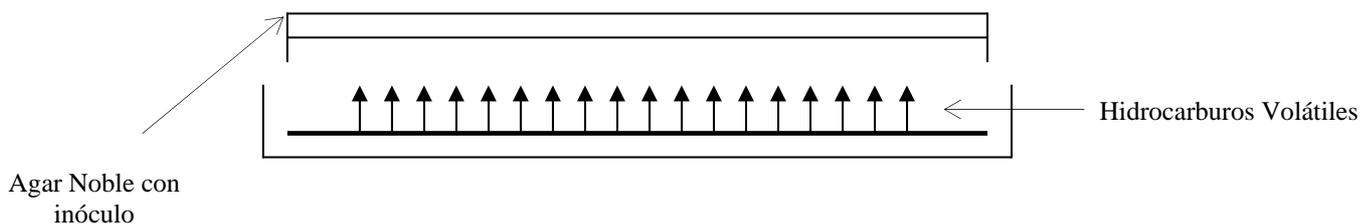


Figura 5.3 Esquema de las cajas Petri para el cultivo de microorganismos hidrocarbonoclastas

5.4 Extracción de DNA a partir de cepas aisladas

La extracción de DNA de las cepas que se aislaron de los diferentes biorreactores nos permitió tipificar a los microorganismos que se encontraban en el suelo, y en la técnica de DGGE se usaron como testigos positivos para la comparación con las muestras de DNA de la población total.

La extracción del DNA de las cepas aisladas se llevó a cabo con el kit de extracción de DNA WIZARD de Promega en los siguientes pasos como lo indica el manual de extracción del kit.

1. Adicionar 1 mL de cultivo a un tubo de microcentrifugación de 1.5 mL
2. Centrifugar a 13,000 rpm durante 2 min, descartar el sobrenadante, si las bacterias son Gram-positivas, proceder al paso 3, para bacterias Gram-negativas, proceder al paso 6
3. Resuspender el botón celular en 480 μ l de solución EDTA al 50 mM
4. Adicionar 60 μ l de solución de lisozima a 10 mg/mL y mezclar.
5. Incubar la muestra a 37° C durante 45 min, Centrifugar por 2 min a 13,000 rpm y remover el sobrenadante.
6. Adicionar 600 μ l de solución de lisis nuclear, agitar la muestra.
7. Incubar a 80 ° C por 5 min, enfriar a temperatura ambiente.
8. Adicionar 3 μ l de solución de RNAasa (4 mg/mL), al lisado celular mezclar invirtiendo el tubo
9. Incubar a 37° C durante 45 min, enfriar a temperatura ambiente.

10. Adicionar 200 μ l de solución de precipitación de proteínas a la solución que contiene el lisado celular con la RNAasa, mezclar vigorosamente a alta velocidad durante 20 seg.
11. Incubar la muestra en hielo durante 5 min.
12. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 min.
13. Transferir el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL que contenga 600 μ l de isopropanol.
14. Mezclar, hasta la aparición de la masa visible de DNA.
15. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 min.
16. Decantar el sobrenadante, adicionar 600 μ l de etanol al 70 % a temperatura ambiente y mezclar invirtiendo el tubo para lavar el botón de DNA
17. Centrifugar a 13,000 durante 2 min, retirar el etanol.
18. Secar el tubo con papel absorbente y dejar secar el DNA en una corriente de aire durante 15 min
19. Adicionar 100 μ l de solución de rehidratación de DNA, incubar a 65 ° C por una hora o toda la noche a 4° C.
20. Visualizar en un gel de agarosa al 1 %.

5.5 Electroforesis en gel de agarosa 1% p/v

Los extractos de DNA se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa de las cepas provenientes de los suelos y de los consorcios, la electroforesis en gel de agarosa es el procedimiento por el cual pudimos visualizar los extractos que obtuvimos de DNA de las cepas y de los consorcios, así como los productos de amplificación por PCR y los productos obtenidos después de la digestión de los fragmentos, en el análisis de restricción, como se detallará mas adelante. El bromuro de etidio tiene una alta afinidad

por el DNA y al exponerse a luz UV emite un haz de luz fácilmente reconocido por la cámara de transiluminación, indicando la presencia de DNA.

Preparación del gel de agarosa al 1% para electroforesis

El procedimiento inició con el pesado de 0.25 g de agarosa y se adicionó 25 mL de TAE, para obtener una concentración del 1% p/v, se calentó en microondas hasta disolución de la agarosa, se dejó enfriar y se adiciono 1 µl de solución de bromuro de etidio (10 mg/ml), que se homogenizó antes de vaciar en el recipiente el gel, se colocó el peine en el gel y se esperaron 20 min. hasta que solidificó el gel y se retiró el peine. En la cámara de electroforesis se adicionó amortiguador TAE (1x) hasta que el gel quedó cubierto. Para depositar las muestras en el gel se mezclaron 1 µl de amortiguador de carga y 5 µl de la muestra, y se pusieron dentro del carril en el gel. Para determinar el tamaño de las muestras se colocó 3 µl del marcador de peso molecular más 1 µl del amortiguador de carga. Finalmente para el corrimiento de las muestras se conectó la fuente de poder ajustada a 100 V por 15 min y se visualizó el gel con un transiluminador de UV.

5.6 Extracción de DNA del suelo

La técnica de extracción de DNA Lisozima-SDS-Bead Beating, combina tres formas posibles de extraer DNA. La lisis enzimática (lisozima), por surfactante (SDS) y mecánica (Bead-Beater). Por la complejidad de la muestra que se trabajó se decidió escoger la combinación de estas tres técnicas técnica para garantizar una cantidad elevada y representativa de la misma (Wade y col, 1996)

5.6.1 Reactivos

1. Solución TE pH 8 Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM a pH 8
2. Amortiguador de fosfato de sodio 120mM pH 8
3. Solución de NaCl 5 M
4. Solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico a pH 8 (25:24:1)
5. Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1)
6. Solución de fenol a pH 8
7. Amortiguador TAE 50X
8. Amortiguador TAE 1 X
9. Solución de EDTA 50 mM
10. Lisozima 10 mg/mL
11. Solución de acetato de sodio 2M pH 5.2
12. Solución de Bromuro de etidio 10mg/mL
13. Dodecil Sulfato de sodio (SDS) al 20 %
14. Amortiguador de carga al gel (Azul de bromofenol al 0.25% p/v, sacarosa al 40% p/v y xileno cianol al 0.25 p/v)
15. Etanol al 100% y 70%

5.6.2 Procedimiento

Se usaron 600 mg de suelo, a esta cantidad de muestra se adicionaron 600 µl de amortiguador fosfato de sodio 120 mM pH 8 en un tubo de polipropileno del Bead-Beater, después se homogeneizó en el mini Bead-Beater durante 10 s, al concluir este tiempo se adicionaron 40 µl de una solución de 10 mg/ml de lisozima a la suspensión del suelo, y se homogeneizó e incubó durante 15 min a 37 °C. A continuación se transfirieron las muestras a hielo, se adicionaron 600 mg de perlas de zirconia/silica de 0.1 mm de diámetro y se mezcló 3 veces durante 30 s en el mini Bead-Beater a 4000 rpm con intervalos de 15 a 30 s en cada tiempo al concluir estos pasos se adicionaron 600 µl de solución de SDS al 20% y se mezcló en el mini Bead-Beater por 5 s a 4000 rpm, las muestras se transfirieron a hielo por una hora y 15 min a temperatura ambiente para llevar a cabo la lisis con el SDS,

después de este paso se colocaron 400 µl de la solución de fenol pH 8 al lisado obtenido en el paso anterior, se mezcló en el vórtex y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. Recuperándose la fase acuosa en un tubo limpio, se regreso a la mezcla de suelo con fenol y adicióno 1 mL de amortiguador de fosfato de sodio 120 mM pH 8, después se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 5 min y recuperándose nuevamente la fase acuosa colocando esta fase en el mismo tubo que contenía a la fase acuosa anterior. Se realizó la extracción de la fase acuosa con 600 µl de solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico saturado 10 mM a pH 8 (25:24:1), se recuperó la fase acuosa, si entre ambas fases se observaba una nata blanca, se realizaba la extracción de la fase acuosa con igual volumen de solución de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1.

La precipitación del DNA se llevó a cabo adicionando 0.1 volumen de solución de NaCl 5 M y dos volúmenes de etanol al 100%, después se conservó a -80 °C durante 20 min o a -20 °C toda la noche. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante para lavar el precipitado con etanol al 70% frío y se dejó secar el botón en aire. Para resuspender el precipitado se utilizó 100 µl de amortiguador TE pH 8 estéril. Finalmente se visualizaron los productos de extracción en gel de agarosa al 1% con la metodología que se describe anteriormente.

5.7 Amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación exponencial del DNA por PCR, permitió obtener una cantidad suficiente de muestra para poder llevar a cabo los análisis subsecuentes.

5.7.1 Amplificación del gen del 16S rRNA

Iniciadores para el gen del 16S rRNA

8 for 5' AGACTTTGATCMTGGCTCAG 3'

1492 rev 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'

Condiciones de la reacción de PCR para el gen 16S rRNA

Componentes de la reacción	Concentración final	Para 25 µl de reacción
----------------------------	---------------------	------------------------

Agua MQ	Variable	17.30 μ l
Amortiguador 10x	1 x	2.50 μ l
MgCl ₂	1.5 mM	1.50 μ l
dNTP's	10 mM de cada dNTP	0.5 μ l
Iniciador 8 for	6.6 pmol/ μ l	1.0 μ l
Iniciador 1492 rev	6.6 pmol/ μ l	1.0 μ l
<i>Taq</i> polimerasa 5 U/ μ l	1 U/ μ l	0.2 μ l
DNA molde	0.25 mg/reacción	1 μ l

Tabla 5.7.1 Componentes para una reacción de 25 μ l, la concentración final utilizada de la enzima *Taq* polimerasa fue de 1 U/ μ l

5.7.2 Condiciones para el termociclador para la reacción de PCR para el gen 16S rRNA.

A continuación se describen las condiciones para el termociclador

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	5 min
Desnaturalización	94°C	30 seg
Alineamiento	52°C	20 seg
Alargamiento	68°C	40 s 35 ciclos del paso 2 al 4
Alargamiento final	68°C	7 min

5.8 Análisis de restricción enzimática (PCR-REA)

El análisis de restricción enzimática nos permitió hacer una discriminación del total de cepas aisladas, agrupando a las cepas con los mismos patrones de restricción, disminuyendo la cantidad de cepas a utilizar para los comparativos en los geles de DGGE

Se requiere tener la muestra de DNA en una concentración de 0.2 a 1.5 μ g/ μ l

1. Adiciona 16.3 μ l de agua desionizada estéril a un tubo estéril.
2. Agregar amortiguador específico para la enzima que se va a utilizar.
3. Agregue 2 μ l de albúmina serica bovina acetilada, en una concentración de 10 μ g/ μ l
4. Adicionar 1 μ l de la muestra de DNA a una concentración de 1 μ g/ μ l.
5. Mezclar y adicionar 5 U de la enzima de restricción.
6. Mezclar y centrifugar a máxima velocidad en un tubo que contiene el DNA con la enzima de restricción.

7. Incubar a 37^a C de 1 a 4 horas
8. Visualizar las bandas de DNA en un gel de agarosa a una concentración de 1.5 %, teñido con bromuro de etidio y visualizando en un transiluminador UV.

Las enzimas que se utilizaron reconocen secuencias de 4 pares de bases, disminuyendo la cantidad de secuencias repetidas aumentando la probabilidad de que tales sitios se encuentren en el gen 16S rRNA, sus sitios de corte se muestran a continuación

<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>MsP</i> I
GG CC	GCG C	C CGG
CC GG	C CGC	GGC C

5.9 Amplificación por PCR para la región V6-V8 del gen 16S rRNA

Este paso se utilizó para la amplificación de DNA del consorcio aislado de las muestras y las cepas de bacterias aisladas.

Iniciadores para la región V6-V8 del gen 16S rRNA

GC 968 for

5'-GCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGAACGCGAAGAACCCTTACC-3'

UNI 1401 rev

5'- GCGTGTGTACAAGACCC -3'

5.9.4 Condiciones de la reacción de PCR para la región V6-V8 del gen 16S rRNA

Componentes de la reacción	Concentración final	25 µl de reacción
Agua MQ	Variable	17.30 µl
Amortiguador 10x	1 x	2.50 µl
MgCl ₂	1.5 mM	1.50 µl
dNTP's	10 mM de cada dNTP	0.5 µl
Iniciador GC 968 for	6.6 pmol/µl	1.0 µl

Iniciador UNI 1401 rev	6.6 pmol/ μ l	1.0 μ l
<i>Taq</i> polimerasa 5 U/ μ l	1 U/ μ l	0.2 μ l
DNA molde	0.25 mg/reacción	1 μ l

Tabla 5.9.4 Componentes para una reacción de 25 μ l, la concentración final utilizada de la enzima *Taq* polimerasa fue de 1 U/ μ l

5.9.5 Condiciones para el termociclador

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	5 min
Desnaturalización	94°C	30 seg
Alineamiento	55°C	20 seg
Alargamiento	68°C	40 s 35 ciclos del paso 2 al 4
Alargamiento final	68°C	7 min

5.10 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

La técnica de DGGE nos permitió obtener geles de poliacrilamida con bandas representativas de la región V6-V8 del gen 16S rRNA de los consorcios, asociadas cada una a un microorganismo diferente en especie y grupo, estos patrones de bandas se analizaron para obtener un estimado de la dinámica de poblaciones del suelo además de obtener un comparativo con las bandas de la región V6-V8 del gen 16s rRNA para las cepas aisladas.

5.10.1 Reactivos

1. Amortiguador TAE 50x

Pesar 242 g de Tris base, agregar aproximadamente 500 mL de agua destilada, 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 M a pH 8 y aforar con agua destilada a 1 L.

2. Solución desnaturizante 0 %

Mezclar 50 mL de solución acrilamida-bisacrilamida (37.5:1) al 40 %, agregar 2.5 mL de amortiguador TAE 50x, adicionar 5 mL de glicerol y aforar a 250 mL de agua destilada.

3. Solución desnaturalizante 100 %

Pesar 105.4 g de urea, agregar 50 mL de solución de archilamida-bisacrilamida (37.5:1), adicionar 100 mL de formamida y mezclar hasta que se disuelva la urea, agregar 5 mL de amortiguador TAE 50 x, adicionar 5 mL de glicerol y aforar con agua destilada hasta 250 mL.

4. Solución de Carlos 8x para fijar.

Mezclar 200 mL de etanol al 96 %, con 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua destilada.

5. Solución de Carlos de preservación.

Mezclar 50 mL de etanol 96 % con 20 mL de glicerol y 130 mL de agua destilada.

6. Solución para fijar

Se toma 50 mL de solución de Carlos 8x y agregar 350 mL de agua destilada.

7. Solución para la tinción de plata.

Pesar 0.4 g de nitrato de plata y se disuelve en 200 mL de solución para fijar

8. Solución de revelado

Pesar 10 mg de NaBH_4 y adicionar 200 mL de NaOH al 1.5 %, disolver y agregar 750 μl de formaldehído.

9. Solución de Persulfato de amonio (APS) al 10 %

10. Amortiguador TAE 1x

Se toman 20 mL de solución TAE 50x y se diluye a 1000 mL con agua destilada

El equipo de DGGE es marca Bio-RA D. Code (Universal Mutational Detection System)

5.10.2 Porcentajes de desnaturalización

A continuación se presenta la tabla de los rangos de los porcentajes de desnaturalización, con la cual se hicieron varios geles para probar el rango en el cual visualizábamos la mayor cantidad de bandas posibles, el porcentaje utilizado en este trabajo fue de 42-50%.

% Desnaturalizante	Volumen Final mL	Solución Desnaturalizante 0 % mL	Solución Desnaturalizante 100 % mL	Temed μl	APS μl
0	6	6	-----	6	18
36	12			12	38
38	12			12	38
40	12	7.20	4.8	12	38
42	12	6.95	5.05	12	38
44	12	6.70	5.30	12	38
46	12	6.50	5.50	12	38
48	12	6.25	5.75	12	38
50	12	6.00	6.00	12	38
52	12	5.75	6.25	12	38
54	12	5.50	6.50	12	38
56	12	5.30	6.70	12	38
58	12			12	38

5.10.3 Preparación del gel

El procedimiento para la preparación del gel se describe a continuación, el proceso involucra la preparación del gel de poliacrilamida con el gradiente desnaturalizante y la carga en los pozos del gel con las muestras.

Para comenzar se limpiaron los vidrios (160 mm de largo y 1 mm de espesor) y los espaciadores con etanol 96 % y agua bidestilada, al concluir la limpieza se pusieron unas gotas de agua bidestilada al gel bond para determinar el lado hidrofóbico, en este lado las gotas corren libremente, este lado se pega al vidrio con agua bidestilada, la parte inferior del gel bond se ajustó a la orilla inferior del vidrio. Se eliminó el exceso de agua que quedó entre el vidrio y el gel bond.

Los espaciadores se colocaron junto con el vidrio pequeño, una vez concluido esto se colocaron los broches de cada lado de los vidrios, se alinearon los vidrios y se puso vaselina en la parte baja de los vidrios y en la banda de goma, los broches se ajustaron con las perillas a la base. Se colocó la manguera de llenado con la aguja en la parte media de los vidrios.

Se prepararon las soluciones de acrilamida-biscrilamida, la solución 0 %, la baja y la alta una vez que las soluciones estuvieron preparadas se colocaron en tubos con hielo, se adicionó y mezcló el Temed (N,N,N,N',N'- tetrametil-etilenodiamonio), mezclándose. Una vez concluido este punto se adicionaron 38 μ l de APS (Persulfato de amonio al 10 %) a la solución alta, se mezcló y se colocó en el primer compartimiento de la cámara de mezclado, asegurándose que las llaves de ambos compartimientos estuvieran cerradas y que la bomba peristáltica estuviera apagada. Lo mismo se repitió para la solución baja adicionándose 38 μ l de APS a la solución baja, se mezcló y se colocó en el segundo compartimiento.

A continuación se prendió la bomba peristáltica y ajustándose a una velocidad baja para evitar un vaciado disperejo del gel, las llaves de los dos compartimientos se abrieron al mismo tiempo para tener un mezclado uniforme y formar adecuadamente el gradiente deseado. Cuando los compartimientos se vaciaron se cerraron las llaves se limpió el exceso de gel en la cámara de alta y se colocó la solución 0% adicionándose previamente a esta 18 μ l de APS. Nuevamente se prendió la bomba peristáltica en velocidad baja. Al finalizar la adición de esta solución se colocó el peine, dejando solidificar por 2 horas. Se preparó el amortiguador TAE 1x y se llenó el recipiente del DGGE, se encendió el aparato de DGGE alrededor de 2 horas antes de utilizarlo para alcanzar la temperatura de 60° C. Las muestras de productos de amplificación de la región de V6-V8 del gen 16S rRNA se prepararon mezclándose con el amortiguador de carga. Por último se colocaron los vidrios con el gel de acrilamida en el recipiente del DGGE, poniendo las muestras preparadas en los carriles del gel y ajustando la fuente de poder a 200V durante 5 min y posteriormente a 85V por 16 horas.

5.10.4 Tinción de plata del gel de poliacrilamida

Después del corrimiento de los geles de DGGE se realizó la tinción de los geles para observar los patrones de bandas invisibles hasta ese momento. La metodología que se utilizó se describe a continuación.

Se retiraron los broches y los vidrios, desprendiendo el gel del vidrio con cuidado de no dañarlo quedando el gel de acrilamida unido al gel bond se colocó el gel en una charola metálica y se agregaron 200 mL de “solución para fijar”, agitándose a 26 rpm durante 3 min, se retiró la solución de fijado almacenándose para su posterior utilización. Al terminar esto se adicionó la “solución de plata” 200 mL y se agitó por 10 min a 26 rpm. El gel y la charola se lavaron con agua bidestilada, se agitó el gel a 26 rpm durante 2 min con agua bidestilada desechando el exceso de plata.

Se colocó el gel en la charola de revelación, adicionándose unos 20 mL de solución de revelación, se enjuagó el gel y se desechó la solución de revelación. Se adicionó el resto de la “solución de revelación” y se agitó a 26 rpm, el tiempo de agitación se prolongó hasta tener una buena observación de las bandas de DNA, desechando la solución de revelación al concluir este tiempo. La solución de fijado recuperada se adicionó, se agitó por 5 min a 26 rpm, al concluir este paso se desechó la solución de fijado y se enjuagó el gel con agua bidestilada por 3 min, se retiró el agua y se colocó la solución de preservación al gel agitándose a 26 rpm por 7 min.

Una vez concluido lo anterior se retiró el gel de la charola y se colocó sobre un vidrio de soporte. Para una mejor preservación se le colocó una hoja de celofán humedecida con la solución de preservación, finalmente se secó el gel a 35 °C por 12 horas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. Cinéticas de Biodegradación

Las cinéticas de biodegradación en los tres experimentos se realizaron en el laboratorio de biotecnología ambiental del centro de investigación en biotecnología de la UAEM por la química Karla Patricia Mayolo Deloisa. Como se observa en los resultados obtenidos, los microorganismos en el experimento sin bioestimular (E1) solo degrada alrededor de un 5.3% de los TPHs, mientras que en los experimentos bioestimulados con la solución mineral M9 (E2 y E3) se alcanzaron valores de 10 y 10.43% respectivamente que comparados con estudios similares realizados en el mismo laboratorio representan un porcentaje de remoción bajo, Mishra S y col (2001) reportan valores de remoción de 48.5 % aproximadamente en condiciones similares y con valores de remoción reportados de 38% - 48% por Pérez B, (2004).

Reactor	Tiempo	TPHs mg/g de suelo	Degradación (%)
E1	To	63.88 ± 0.57	5.3
	Tf (15 días)	60.50 ± 0.92	
E2	To	64.89 ± 0.12	10
	T1 (7 días)	63.40 ± 0.34	
	T2 (15 días)	59.47 ± 1.14	
	T3 (21 días)	58.40 ± 0.80	
E3	To	64.61 ± 1.25	10.58
	T1 (7 días)	61.38 ± 0.30	
	T2 (15 días)	58.25 ± 0.33	
	T3 (21 días)	57.77 ± 0.62	

Tabla 6.- Datos de biodegradación para los 3 reactores E1 sin bioestimular, E2 y E3 bioestimulados.

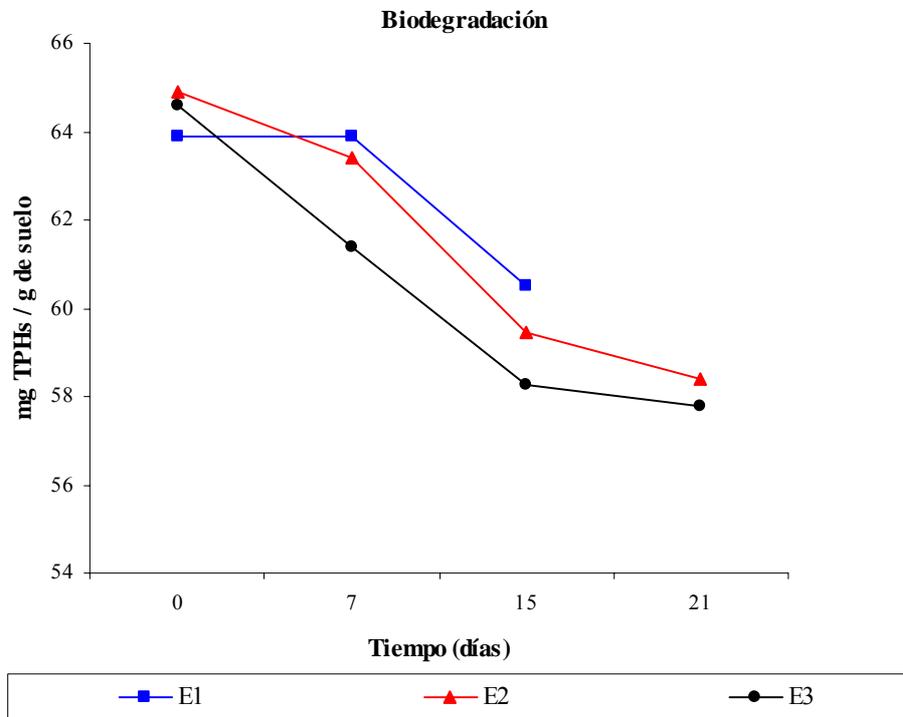


Fig. 6. Cinética de biodegradación para los tres experimentos E1 sin bioestimar, E2 y E3 bioestimulados

6.1 Unidades Formadoras de colonias (UFC).

Bacterias Totales

Para conocer la cantidad de microflora presente en el suelo se realizó una cuenta viable. En la tabla 6.1 se presentan las UFC utilizando el medio para bacterias totales, para los tres experimentos llevados a cabo. En los experimentos bioestimulados (E2 y E3), el conteo de unidades formadoras de colonias fue significativamente mayor ($P > 0.05$), con respecto al experimento sin bioestimar E1, en todos los tiempos a excepción del inicial, teniendo una diferencia máxima de 20%. En los experimentos que contenían $HgCl_2$ no se observó crecimiento en ninguno de los medios utilizados.

Tiempo (días)	E1 (UFC/g de suelo)	E2 (UFC/g de suelo)	E3 (UFC/g de suelo)
0	3.38×10^4 (<i>2.99x10³</i>)	4.6×10^4 (<i>7.07x10³</i>)	2.44×10^4 (<i>2.19x10³</i>)
7	3.38×10^4 (<i>2.99x10³</i>)	8.88×10^5 (<i>1.11x10⁴</i>)	4.80×10^5 (<i>5.65x10⁴</i>)
15	7.67×10^5 (<i>5.24x10⁴</i>)	2.7×10^6 (<i>4.22x10⁵</i>)	3.24×10^6 (<i>5.32x10⁵</i>)
21		5.74×10^6 (<i>2.72x10⁶</i>)	4.65×10^6 (<i>3.53x10⁵</i>)
30		4.6×10^6 (<i>5.71x10⁵</i>)	9.45×10^6 (<i>4.94x10⁵</i>)

Tabla 6.1.- Cuentas Viables por gramo de suelo en medio para bacterias totales, el experimento E1 solo se mantuvo en operación por 15 días. Los experimentos E2 y E3 tuvieron 30 días de operación. Las desviaciones estándar se muestran en cursivas.

Bacterias Hidrocarbonoclastas

En la tabla 6.1.1 se muestran los resultados de cuenta bacteriana utilizando el medio para bacterias hidrocarbonoclastas. Para los experimentos E2 y E3 el conteo fue también significativamente mayor ($P > 0.05$) con respecto al experimento sin bioestimular E1, en todos los tiempos, a excepción del inicial, con un porcentaje máximo de diferencia del 20%. Utilizando este medio para los controles con $HgCl_2$ tampoco hubo crecimiento.

Tiempo (días)	E1 (UFC/g de suelo)	E2 (UFC/g de suelo)	E3 (UFC/g de suelo)
0	2.42×10^3 (<i>3.54x10²</i>)	6.15×10^3 (<i>1.54x10³</i>)	6×10^3 (<i>7.07x10²</i>)
7	2.42×10^3 (<i>3.54x10²</i>)	1.16×10^5 (<i>7.5x10³</i>)	2.75×10^5 (<i>3.53x10⁴</i>)
15	7.58×10^4 (<i>8.65x10³</i>)	3.74×10^5 (<i>2.08x10⁴</i>)	3.12×10^5 (<i>1.76x10⁴</i>)
21		2.55×10^5 (<i>4.75x10⁴</i>)	4.48×10^5 (<i>3.81x10⁴</i>)
30		4.22×10^5 (<i>5.26x10⁴</i>)	4.92×10^5 (<i>4.94x10⁴</i>)

Tabla 6.1.1.- Cuentas viables por gramo de suelo en medio para bacterias hidrocarbonoclastas, en el experimento E1 solo se practicaron dos muestreos T_0 y T_{15} días.

En la figura 6.1 se integran los resultados de la cuenta bacteriana obtenida en los medios para microorganismos totales e hidrocarbonoclastas para los tres experimentos.

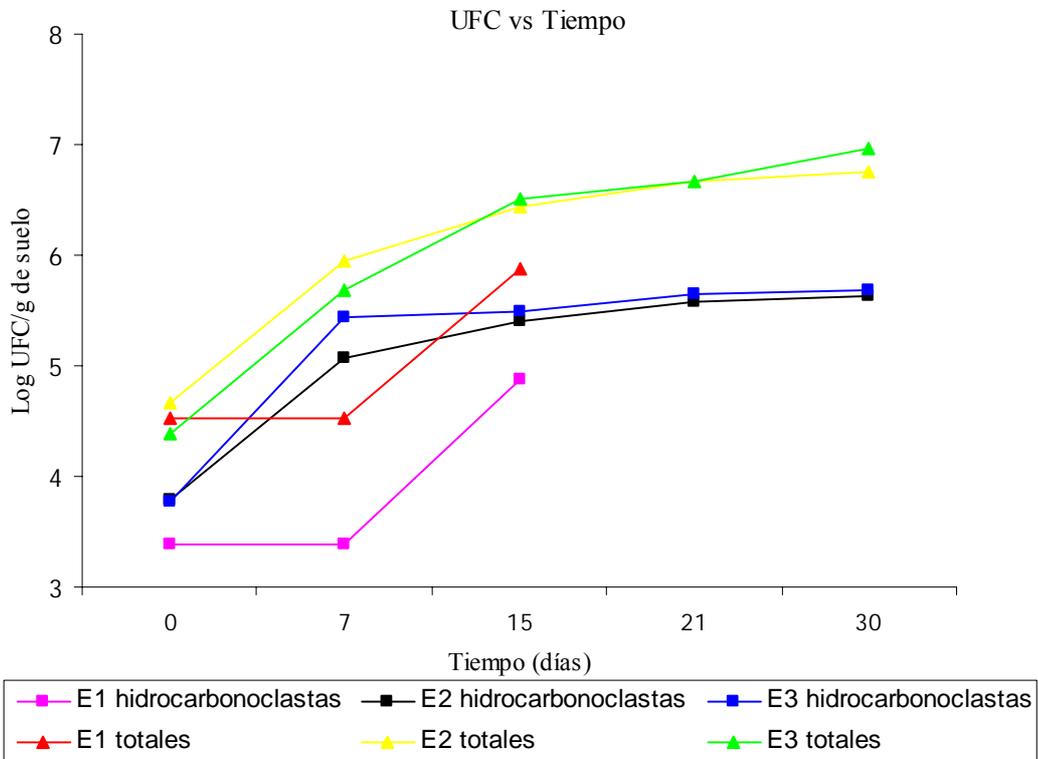


Figura 6.1.- Cuentas viables para bacterias totales e hidrocarbonoclastas, durante el tratamiento en biorreactores E1 experimento sin bioestimar, (150 g de carga), E2 experimento bioestimulado, (150 g de carga), E3 experimento bioestimulado, (5000 g de carga).

Los métodos tradicionales de microbiología como el cultivo de microorganismos en diversos medios tienen limitantes por el número de microorganismos que crecen en éstos, datos reportados hablan de que solo de 0.1% a un 10% de todos los microorganismos presentes en el suelo pueden ser cultivados con los medios utilizados (Curl, 1996). A pesar de estas limitantes las unidades formadoras de colonias nos arrojan resultados importantes para comparar el número de microorganismos en estos suelos, los cuales reciben diferentes tratamientos en busca de mejorar la biotransformación de los hidrocarburos. En estudios similares de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos se reporta un aumento significativo de las cuentas microbianas en sistemas bioestimulados con bagazo de caña (Pérez B y col, 2004)

6.2 Aislamiento y selección de cepas.

De los tres experimentos E1, E2 y E3 se aislaron 31 cepas basados en las características morfológicas de las colonias, tanto en medios para microorganismos totales como hidrocarbonoclastas.

Muestra	Cepa	Características	Gram
To	1	Blanca grande Circular	+
E11To	3	Amarilla Plana	+
E3To	4	Amarilla Cóncava	-/+
E11Tf	5	Blanca Convexa	-
Control sin Hidrocarburos	6	Naranja Cóncava	+
E24-1	7	Roja Convexa	-
E22-1	8	Roja Plana	-
E32	10	Naranja Halo Blanco Plana	-/+
To	11	Naranja Plana	-
E12To	13	Rosa Cóncava	-
E13To	14	Naranja Redonda	-
E13Tf	17	Amarilla Redonda	+
E24-1	18	Blanca Cóncava	-/+
E22-2	20	Amarilla Convexa	-
E23-1	21	Amarilla Plana	-
E31	22	Blanca Plana	-
E11To	23	Rosa Convexa	-
Control sin Hidrocarburos	24	Naranja Plana	-/+
E11Tf	26	Naranja Cóncava	+
E23-1	30	Blanca Redonda	+
E2o-1	31	Blanca estratificada	-/+
E21-1	32	Naranja Clara Plana	-/+
E2o-1	37	Blanca Cóncava	-
E21-1	38	Blanca Redonda	-
E22-2	41	Naranja Convexa	-
E3To	44	Blanca Redonda	-
E3To	45	Blanca Cóncava	-
E32	48	Naranja Plana	-
E32	49	Naranja Redonda	-
E33	50	Naranja Convexa	-
E33	51	Naranja Plana	-

Tabla 6.2.- Las cepas aisladas de los tres experimentos E1, E2 y E3 a diferentes tiempos, además de dos cepas aisladas de los muestras controles que no están contaminadas con hidrocarburos. Tinción Gram. (-) negativa, (+) positiva y (-/+) variable. El criterio para la nomenclatura de las cepas, solo fue asignando un numero consecutivo sin importar el experimento, para facilitar su manejo.

De los 31 aislados 20 resultaron Gram negativos coincidiendo con lo reportado en la bibliografía para este tipo de suelos (Macnaughton *et al*, 1999). Las cepas aisladas se sometieron al análisis de PCR-REA para su tipificación.

6.3 Extracción de DNA de las Cepas aisladas.

De las 31 cepas seleccionadas se realizó la extracción de DNA, por medio de un kit comercial “Wizard” de Promega, esta referido en la sección 5.4 de la Metodología . El tamaño promedio del material genético obtenido fue de aproximadamente 21000 pb. En la figura 6.3 se muestra el corrimiento de 5 μ L del producto obtenido de extracción de 15 de las cepas. En todos casos se pudo extraer DNA de las cepas.

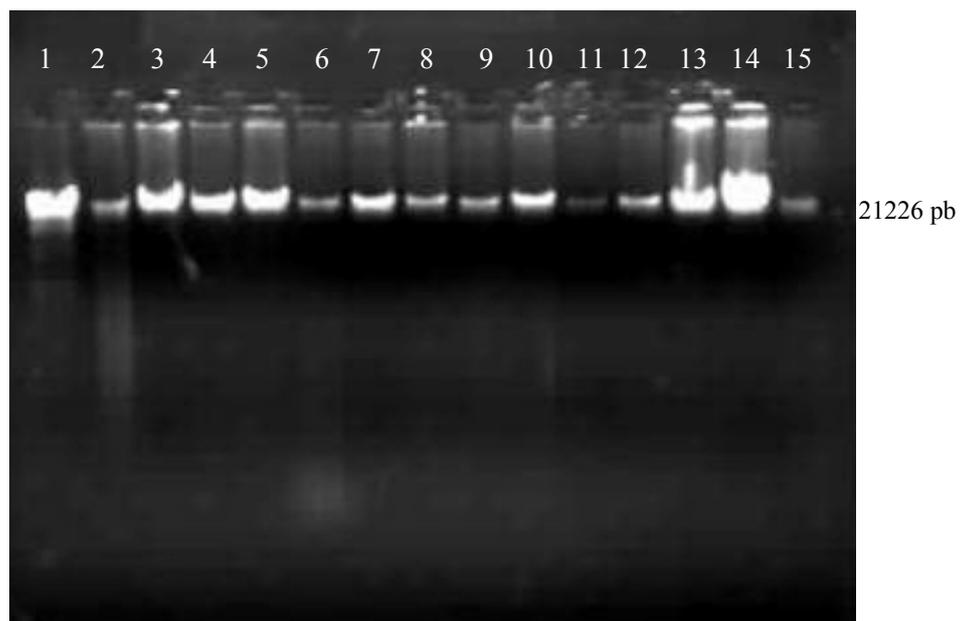


Figura 6.3.- Muestras de DNA extraído de las cepas aisladas **1-** Cepa 1, **2-** Cepa 3, **3-** Cepa 4, **4-** Cepa 5, **5-** Cepa 6, **6-** Cepa 7-Cepa 8, **8-** Cepa 10, **9-** Cepa 11, **10-** Cepa 13, **11-** Cepa 24, **12-** Cepa 17, **13-** Cepa 18, **14-** Cepa 20, **15-** Marcador peso molecular fago λ digerido

6.4 Amplificación del gen 16S rRNA de las cepas aisladas.

En todas las cepas se amplificó el gen 16S rRNA de aproximadamente 1542 pb en *E. coli* (Muyzer y col, 1996), los productos de amplificación de estas cepas se utilizaron posteriormente para hacer el análisis de restricción. En las figuras 6.4.1 y 6.4.2 se observan los productos de amplificación del gen 16S rRNA, los geles se cargaron con 5 µL de muestra.

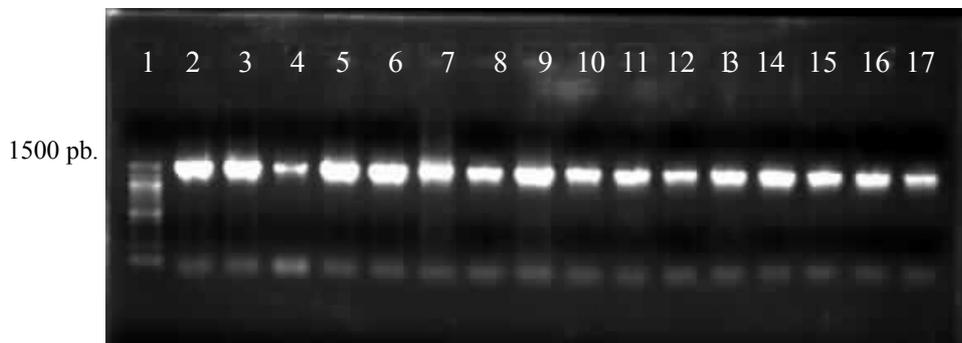


Figura 6.4.1.- 1- Marcador de peso molecular 100 bp ladder, 2-Cepa 1, 3-Cepa 3, 4-Cepa 4, 5-Cepa 5, 6-Cepa 6, 7-Cepa 7, 8-Cepa 8, 9-Cepa 10, 10-Cepa 11, 11-Cepa 13, 12-Cepa14, 13-Cepa 17, 14-Cepa 18, 15-Cepa 20, 16-Cepa 21, 17-Cepa 22

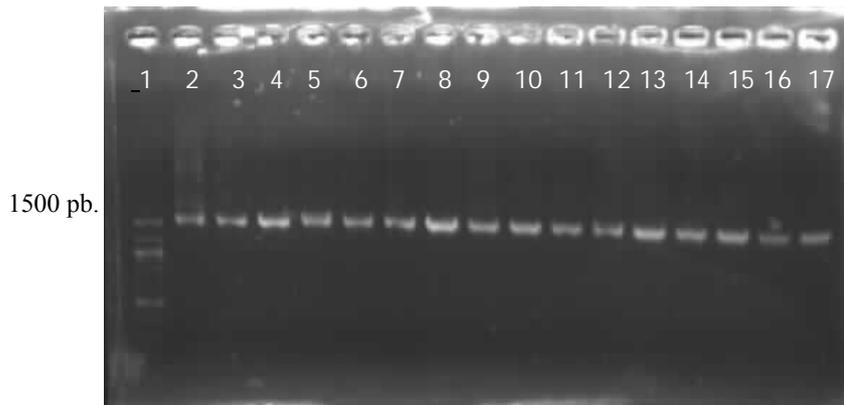


Figura 6.4.2.- 1- Marcador de peso molecular 100 bp ladder, 2-Cepa 22, 3- Cepa 23, 4-Cepa 24, 5-Cepa 26, 6-Cepa 30, 7-Cepa 31, 8-Cepa 32, 9-Cepa 37, 10-Cepa 38, 11-Cepa 41, 12-Cepa 44, 13-Cepa 45, 14-Cepa 48, 15-Cepa 49, 16-Cepa 50, 17-Cepa 51.

6.5 Análisis de restricción enzimática (PCR-REA)

Con los productos de amplificación del gen 16S rRNA de las cepas se llevó a cabo e análisis de restricción utilizando las enzimas de restricción *Hae* III, *Hha* I y *Msp* I. Estas tres enzimas reconocen sitios de cortes de 4 pares de bases, aumentando la probabilidad de encontrar estas secuencias en el fragmento amplificado del 16 S rRNA y con ello las variaciones aún de un nucleótido entre las cepas analizadas.

Utilizando la enzima *Hae* III no se detectaron sitios de corte, sin embargo a partir de los patrones de bandas (figura 6.5) con las dos enzimas restantes (*Hha* I y *Msp* I) se agruparon a las cepas como lo muestra la Tabla 6.4. Las cepas con los mismos patrones de bandas se fueron agrupando, para cada una de las enzimas utilizadas, algunas como es el caso de la cepa 1 coincidieron en diferentes patrones de bandas para ambas enzimas.

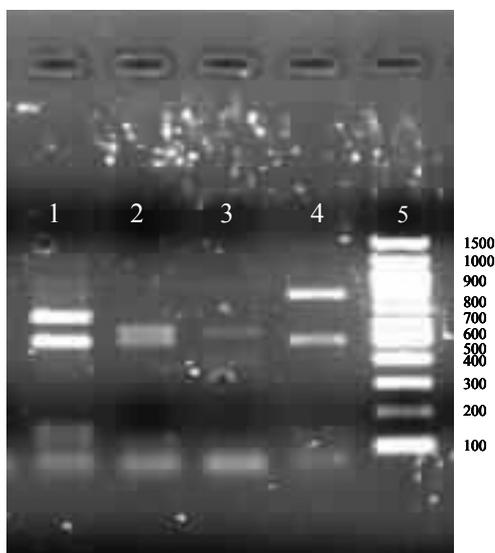


Figura 6.5.- Patrones de restricción con la enzima *Msp* I 1- Ceba 17, 2-Ceba 1, 3-Ceba 8, 4-Ceba 24, 5- Marcador 100 bp ladder.

Enzima	Grupos de cepas										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Hha</i> I	21-17	13-30-31	3-6		1	5-20	8	7	10	-	-
	50- 51	32-37-38-44	11-14 -18			22-23					
<i>Msp</i> I		45- 48 -49	41-24								
	31- 17	11-13		30	1	3-10	5-20	7	8-21	32	37
	38-44-45-48	14-18-24 -41					22-23				
	49-50-51										

Tabla 6.4.- Con los patrones de bandas del análisis de restricción se ordenó a las cepas en 11 grupos. Los números dentro de cada grupo muestran a las cepas que comparten los mismos patrones de restricción.

Tomando en cuenta que de ambas enzimas solo coincidieron algunas cepas en sus patrones de restricción formamos un total de 18 grupos.

Grupo	Cepas
1	1
2	7
3	5, 20, 22, 23.
4	38, 44, 45, 48, 49.
5	50,51
6	21
7	11,14, 18, 24, 41
8	3,6
9	8
10	32
11	37
12	13
13	30
14	31
15	4
16	10
17	17
18	26

Tabla 6-5.- Grupos formados después de la comparación de los 2 patrones de restricción.

Basados en esta técnica (PCR-REA) se pudieron agrupar las 31 cepas aisladas en 18 grupos de restricción, en los que la mayoría contenía solo una cepa (tabla 6.5). Aquellas cepas dentro del mismo grupo de restricción se consideraron iguales, estas se utilizaron para la amplificación

de las regiones variable V6-V8 los productos de esta amplificación se probaron en el DGGE como controles positivos.

6.6 Amplificación de la región variable V6-V8 del gen 16S rRNA de las cepas aisladas.

El tamaño del gen 16S rRNA (1542 pb) no es apropiado para la capacidad de resolución en los geles de DGGE por lo que se busco amplificar una región de este gen más pequeña y que conservara su variabilidad. Una región que cumple con las características de variabilidad y además de un tamaño adecuado es la región V6- V8 (460 pb) (Kazuya y col, 2000)(Muyzer G y col 1996). Los productos de amplificación para algunas cepas se aprecian en la figura 6.6

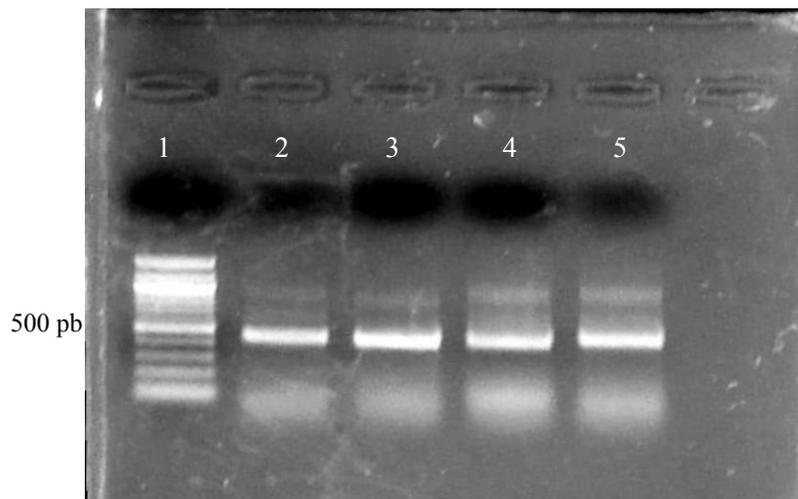


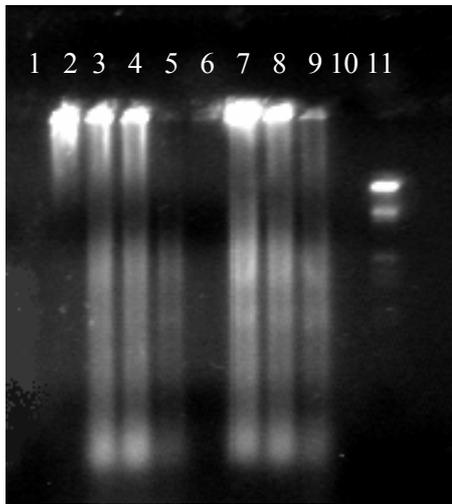
Figura 6.6.- Amplicones obtenidos de las región V6-V8 de las cepas **1-** Marcador 100 bp ladder, **2-** Cepa 17, **3-** Cepa 1, **4-** Cepa 8, **5-** Cepa 24.

6.7 Extracción de DNA de los Consorcios

La ruptura mecánica de las células para la extracción del DNA (Bead-Beating, prensa francesa, etc.) es efectiva tomando en cuenta la cantidad de DNA que se extrae (5µg -10µg de DNA por gramo de suelo) aunque la formación de quimeras de DNA puede ser mayor debido a la fragmentación que implica este rompimiento mecánico (Muyzer y col, 1996). Por el contrario la lisis enzimática de las células no presenta problemas por alta fragmentación pero la cantidad de DNA extraído es limitada (Van Elsas y col, 1995). La extracción de DNA a través de la combinación del rompimiento mecánico de las células y lisis enzimática (Lisozima- SDS- Bead Beating) proporciona una buena cantidad de DNA de alto peso molecular como lo muestran las Figuras 6.7.1, 6.7.2 y 6.7.3 que corresponden a los experimentos E1, E2 y E3, respectivamente. Para la extracción de DNA de los suelos solo se utilizaron 600 mg de lodo (70% suelo problema seco 30% agua) una cantidad pequeña en comparación con otros estudios, Wade y col(1996) utilizan una cantidad de 55 g de suelo cuando este no se encuentra homogéneo y 10 g cuando está homogéneo, Posteriormente, Duarte y col(2001) utilizaron 2 g de suelo para realizar extracciones de material genético, el suelo que se utilizó en este trabajo se secó y tamizó para homogenizarlo antes de introducirlo a los sistemas de estudio, por lo que considerando la referencia anterior el presente estudio utiliza una cantidad baja de suelo, con la ventaja de trabajar con una muestra representativa y que esto implique una reducción en los costos de los reactivos y materiales empleados en la extracción de DNA

Solo en los controles negativos con HgCl₂ la cantidad de DNA que se extrajo no es apreciable. El tamaño del DNA en todos los casos se encuentra por arriba de 21226 pb, aunque debido al rompimiento mecánico utilizado se observa DNA de peso molecular bajo en forma de barrido.

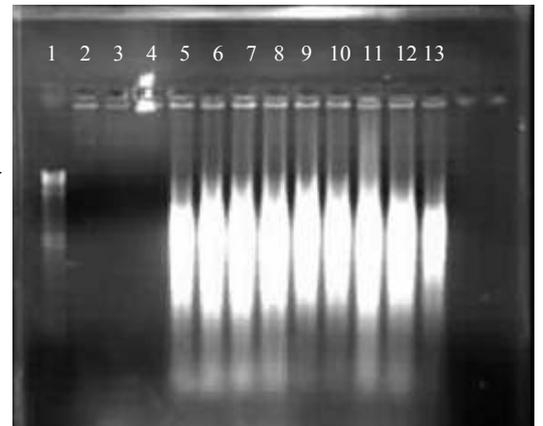
Resultados y Discusión



21226 pb.
7421 pb.

Figura 6.7.1 Extracción de DNA para microorganismos totales del Experimento 1 **1-** (C1To) Control 1 con HgCl₂ tiempo inicial, **2-** (E11To) Experimento 1 al tiempo inicial, **3-** (E12To) Repetición 1 del experimento 1 al tiempo inicial, **4-** (E13To) Repetición 2 del experimento 1 a tiempo inicial, **5-** Control sin HTP's, **6-** (C1Tf) Control 1 con HgCl₂ después de 15 días, **7-** (E11Tf) Experimento 1 después de 15 días, **8-** (E12Tf) Repetición 1 del experimento 1 después de 15 días, **9-** (E13Tf) Repetición 2 del experimento 1 después de 15 días, **10-** Control sin HTP's después de 15 días, **11-** Marcador peso molecular fago λ digerido

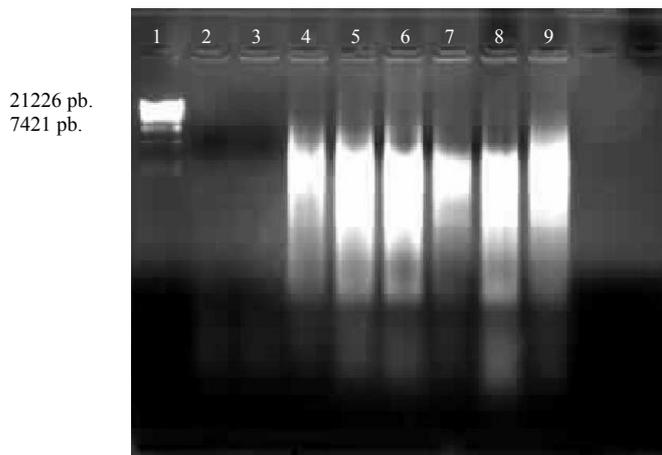
Figura 6.7.2 Extracción de DNA para microorganismos totales del Experimento 2 **1-** Marcador peso molecular, **2-** (C2To) Control con HgCl₂ del experimento 2 al tiempo inicial, **3-** (C2T1) Control con HgCl₂ del experimento 2 después de 7 días, **4-** (C2T3) Control con HgCl₂ después de 21 días, **5-** (E2o-1) Experimento 2 tiempo inicial, **6-** (E21-1) Experimento 2 tiempo 7 días, **7-** (E22-1) Experimento 2 tiempo 15 días, **8-** (E23-1) Experimento 2 tiempo 21 días, **9-** (E24-1) Experimento 2 tiempo final 30 días, **10-** (E2o-2) Repetición 1 experimento 2 tiempo inicial, **11-** (E21-2) Repetición 1 experimento 2 tiempo 7 días, **12-** (E22-2) Repetición 1 experimento 2 tiempo 15 días, **13-** (E23-2) Repetición 1



21226 pb.
7421 pb.

Figura 6.7.3 Extracción de DNA para microorganismos totales del Experimento 2 *Experimento 3.*

1- Marcador peso molecular, **2-** (C3To) Control con HgCl₂ experimento 3 tiempo inicial, **3-** (C3Tf) Control con HgCl₂ experimento 3 tiempo final 30 días, **4-** (E3To) Experimento 3 tiempo inicial, **5-** (E3T1) Experimento 3 tiempo 7 días, **6-** (E3T2) Experimento 3 tiempo 15 días, **7-** (E3T3) Experimento 3 tiempo 21 días, **8-** (E3T4) Experimento 3 tiempo 30 días, **9-** Control sin HTP's.



21226 pb.
7421 pb.

6.8 Amplificación del gen 16S rRNA para todos los microorganismos presentes en las muestras.

Dado que las sustancias húmicas normalmente presentes en el suelo son coextraídos con los ácidos nucleicos y estos inhiben o disminuyen la actividad de las polimerasas utilizadas en la PCR (Tebbe y col 1993), se requiere de aditivos en la reacción, el uso de proteínas como la albúmina bovina sérica (BSA), reduce los efectos de inhibición (Friederich y col, 1993), por lo que se probó la BSA en las reacciones de PCR haciendo más eficiente esta técnica, como lo muestra la Figura 6.8.1

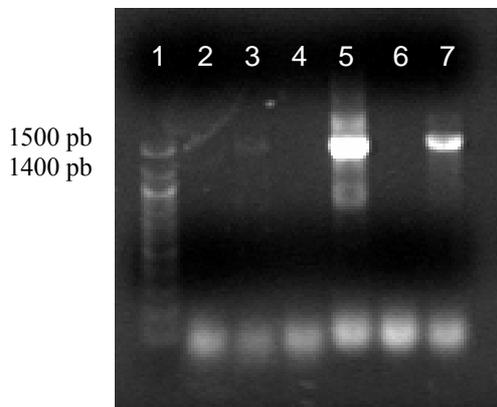


Figura 6.8.1 Amplificación del gen 16S rRNA de los microorganismos totales 1- Marcador peso molecular 100 bp Ladder, 2- Control HgCl₂ sin albúmina, 3- Control HgCl₂ con albúmina, 4- (E11To) Experimento 1 tiempo inicial sin BSA, 5- (E11To) Experimento 1 tiempo inicial con BSA, 6- (E3To) Experimento 3 tiempo inicial sin BSA, 7- (E3To) Experimento 3 tiempo inicial con BSA.

A todos los productos de extracción de los consorcios en los diferentes experimentos se amplificó el gen 16S rRNA solo en los controles que contenían HgCl₂, no se pudo obtener producto. La Figura 6.8.2 muestra los productos de amplificación del gen 16S rRNA con un peso molecular de alrededor 1500 pb.



Figura 6.8.2.- Productos de amplificación del gen 16S rRNA de los consorcios 1- Control positivo (Cepa 1), 2- Control Negativo (agua), 3- (C1To) Control Experimento 1 con HgCl₂, 4- (E11To) Experimento 1 tiempo inicial, 5- (E12To) Repetición experimento 1 tiempo inicial, 6-(E13To) Repetición 2 experimento 1 tiempo inicial, 7- (E11Tf) Experimento 1 tiempo final 15 días, 8- Marcador 100 bp ladder

6.9 Amplificación de la región variable V6-V8 del 16S rRNA para todos los microorganismos presentes en las muestras.

La variabilidad del amplicón V6-V8 se utiliza como huella genómica de microorganismos que se encuentran presentes en sistemas de biotransformación (Muyzer y col, 1996). Los productos de extracción de DNA de los consorcios, también se amplificaron en este trabajo con albúmina (BSA) las figuras 6.9.1 y 6.9.2 muestran los productos obtenidos.

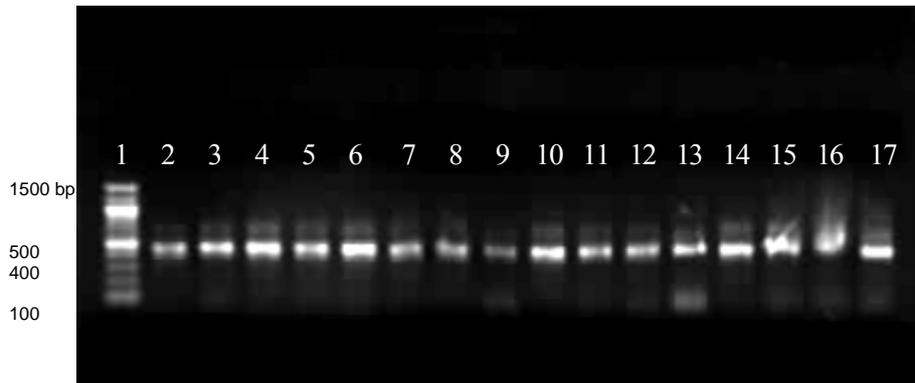


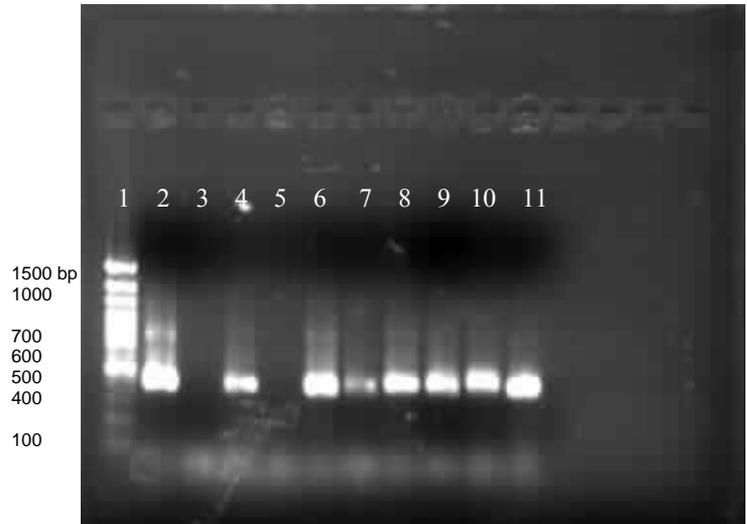
Figura 6.9.1.- Productos de amplificación de la región variable V6-V8 del gen 16S rRNA de los consorcios en los tres experimentos.

1-Marcador 100 bp ladder **2-** (E11To) Experimento 1 tiempo inicial **3-** (E12To) Repetición 1 del experimento 1 tiempo inicial, **4-** (E13To) Repetición 2 del experimento 1 tiempo inicial, **5-** (E11Tf) Experimento 1 tiempo final 15 días, **6-** (E12Tf) Repetición 1 del experimento 1 tiempo final 15 días, **7-** (E13Tf) Repetición 2 del experimento 1 tiempo final 15 días, **8-** (E2o-1) Experimento 2 tiempo inicial, **9-** (E21-1) Experimento 2 tiempo 7 días, **10-** (E22-1) Experimento 2 tiempo 15 días, **11-** (E23-1) Experimento 2 tiempo 21 días, **12-** (E24-1) Experimento 2 tiempo final 30 días, **13-** (E3To) Experimento 3 tiempo inicial, **14-** (E3T1) Experimento 3 tiempo 7 días, **15-** (E3T2) Experimento 3 tiempo 15 días, **16-** (E3T3) Experimento 3 tiempo 21 días, **17-** (E3T4) Experimento 3 tiempo final 30 días.

Estos productos se utilizaron en el DGGE para obtener el patrón de bandas de los consorcios presentes a los distintos tiempos de muestreo de los biorreactores.

Figura 6.9.2.- Productos de amplificación de la región variable V6-V8 del gen 16S rRNA de los consorcios en los tres experimentos.

1-Marcador 100 bp ladder 2- Control positivo (Cepa 1) 3- Control negativo (Agua), 4- (E11To) Experimento 1 tiempo inicial, 5- (E11Tf) Experimento 1 tiempo final 15 días, 6- (E12Tf) Repetición 1 experimento 1 tiempo final 15 días, 7- (E13Tf) Repetición 2 experimento 1 tiempo final 15 días, 8- (E11To) Experimento 1 tiempo inicial, 9- (E12To) Repetición 1 experimento 1 tiempo inicial, 10- (E13To) Repetición 2 experimento 1 tiempo inicial, 11- Suelo control sin hidrocarburos.



6.10 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

La identificación de los microorganismos presentes en la biotransformación de los hidrocarburos es a menudo una tarea difícil, algunos de ellos pueden ser discriminados a nivel de Clase mediante microscopía electrónica, pero en la mayoría de los casos no es posible hacer una identificación a más bajos niveles taxonómicos como género y especie. Por otro lado, solo un pequeño porcentaje de estas especies puede crecer en cultivo, y además no hay garantía de que los organismos aislados en cultivo sean los dominantes en la comunidad natural (Wayne y col, 1987). Una de las razones de lo anterior podría ser la interdependencia entre los microorganismos presentes en el suelo y otra el conocimiento de las condiciones reales bajo las que los microorganismos crecen, (Muyzer & Smalla, 1998)

La aproximación por técnicas moleculares basadas en análisis filogenéticos de secuencias de rRNA tales como la clonación y secuenciación, y técnicas de fingerprinting como la de Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), han sido alternativas que permiten caracterizar con más detalle la diversidad de las comunidades bacterianas.

Además de las características morfológicas, tinción de Gram. y patrones de PCR-REA presentados anteriormente, mediante el DGGE se hallaron diferencias adicionales para las cepas aisladas. Esto dio pauta para analizar ahora los consorcios a través del DGGE. En la Figura 6.10.1 se observa el gel de DGGE para algunas de las cepas aisladas.

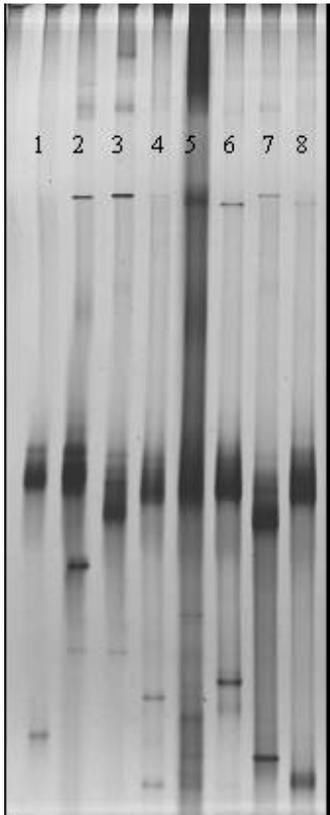


Figura 6.10.1.- Productos de amplificación de la región variable V6-V8 del gen 16S rRNA de las cepas en DGGE con un porcentaje de desnaturalización de 44 – 52 %.
1- Cepa 1, 2- Cepa 6, 3- Cepa 11, 4- Cepa 22, 5- Consorcio El To, 6- Cepa 8, 7- Cepa 21, 8- Cepa 51

Al inicio del estudio, se utilizaron gradientes desnaturalizantes de formamida-urea de alrededor de 40-60 % de desnaturalizantes valores reportados por Kawai y col(2002), ajustándose posteriormente a valores de 42-50 % de desnaturalizantes.

El comparativo de los consorcios en los diferentes experimentos se analizó en DGGE. El cambio en el patrón de bandas para los experimentos a distintos tiempos se puede observar en la Figura 6.10.2, el rectángulo muestra la zona del gel en donde se distinguen la mayor cantidad de cambios en los patrones de bandas.

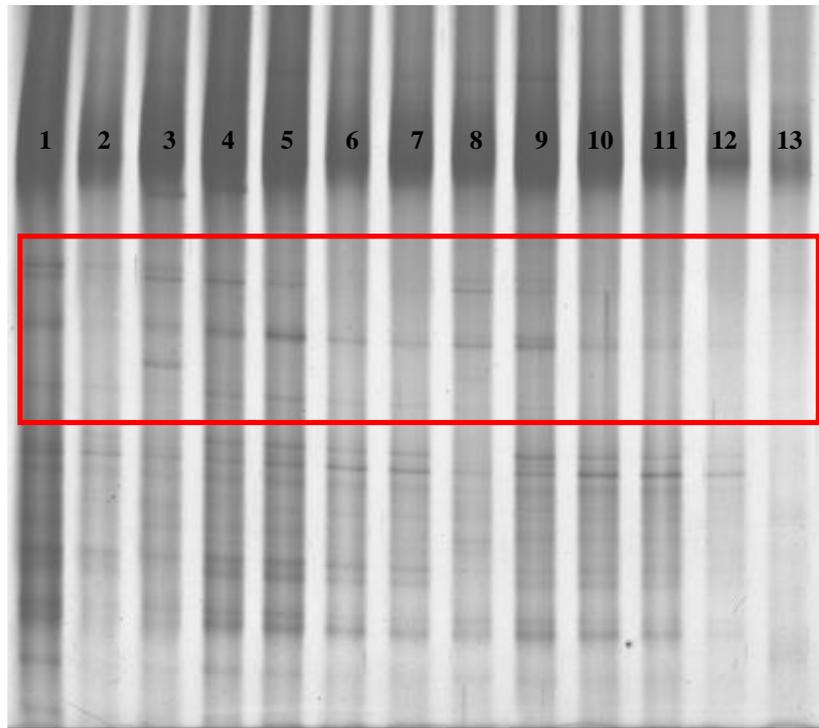


Figura 6.10.2.- Productos de amplificación de la región variable V6-V8 del gen 16S rRNA de los consorcios en DGGE con un porcentaje de desnaturalización de 42 – 50 %.

1- E11To, 2- E11Tf, 3- E20-2, 4- E21-2, 5- E22-2, 6- E23-2, 7- E24-2, 8- E3To, 9- E3T1, 10- E3T2, 11- E3T3, 12- E3T4, 13- Suelo control sin hidrocarburos.

Analizando los carriles dentro del rectángulo rojo 1 y 2 de la Figura 6.10.2, se observan los cambios en los patrones de bandas para el E1 del tiempo inicial con respecto al tiempo final. Del carril 3 al 7 los cambios en los patrones de bandas para el experimento E2 bioestimulado y finalmente del 8 al 12 para el E3 bioestimulado. En el caso del carril 13 las bandas no son definidas.

Con los amplicones de la región V6-V8 de las cepas y de los consorcios se hicieron geles de DGGE, encontrándose que la cepa uno y la ocho coinciden con alguna de las bandas de los consorcios como lo muestran las figuras 6.10.3 y 6.10.4. Esto fue reproducible, ya que se hicieron varios geles en donde en todos los casos las bandas de las cepas 1 y 8 coincidieron con alguna banda de los mismos consorcios.

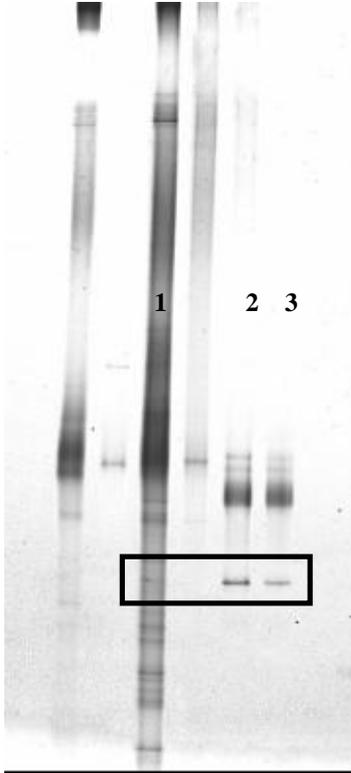
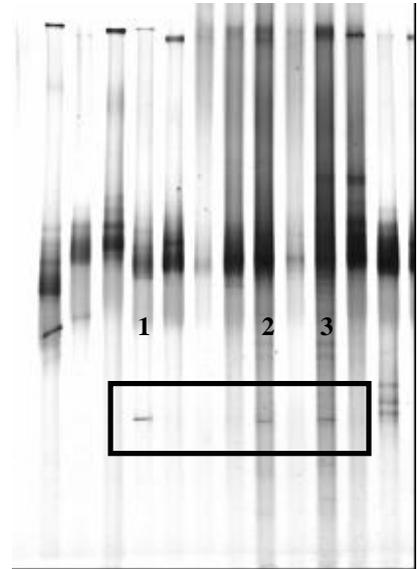


Figura 6.10.3.- Productos de amplificación de la región variable V6-V8 del gen 16S rRNA de los consorcios y cepa 1 en DGGE con un porcentaje de desnaturalización de 42 – 50 %. Cepa 1 en DGGE
1- E11To, **2-** Cepa 1, **3-** Cepa 1.

Figura 6.10.4 .- Productos de amplificación de la región variable V6-V8 del gen 16S rRNA de los consorcios y cepa 8 en DGGE con un porcentaje de desnaturalización de 42 – 50 %. La Cepa 8 en DGGE que coincide con bandas de los consorcios.
1- Cepa 8, 2- E11Tf, 3- E20-2.



Las dos cepas aisladas de los consorcios nativos son de gran importancia, ya que son microorganismos hidrocarbonoclastas y que se encuentran presentes en la biotransformación de los hidrocarburos, a diferentes condiciones experimentales, según lo muestra el DGGE lo anterior es relevante, ya que pueden ser usadas en estudios de bioaumentación en suelos contaminados por hidrocarburos en México. Además este trabajo contribuyó para conocer características como la morfología colonial, su tinción gram, su patrón de PCR-REA.

VII. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

La adición de la solución mineral M9 para bioestimar aumento la cuenta de viables en placa en los dos medios(nutritivo e hidrocarbonoclasta) utilizados ($P.<0.05$).

Con el análisis de restricción, de las 31 cepas aisladas por sus morfologías coloniales se separaron en 18 grupos, facilitando los estudios posteriores de comparación con los consorcios, disminuyendo el numero total de cepas a probar.

La extracción estandarizada de DNA de los consorcios, nos proporciono material genético susceptible de ser amplificado por PCR.

Existen cambios (bandas aparecen y desaparecen) en los patrones de bandas en el DGGE conforme avanza el tiempo en las cinéticas de biodegradación.

Se observan cambios (algunas bandas aparecen otras desaparecen) en los patrones de bandas en el DGGE de los experimentos bioestimulados en comparación con los experimentos sin bioestimar relacionando estos cambios con un cambio en la población de los microorganismos presentes en cada experimento.

Se encontró que las bandas en el DGGE de las cepas 1 y 8 coinciden con las bandas de los consorcios bioestimulados y sin bioestimar

VIII. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFIA

Allison E. McCaig, L. Anne G, and James I. 2001. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S Ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10). 4554-4559.

Alef K, Nannipieri P. 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*, Ed Academic Press. 120-124

Amann R, Ludwig W, Schleifer H. 1995. Phylogenetic identification and in-Situ detection of individual microbial cells Without Cultivation. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (11) 143-169.

Andrew S. Whiteley and Mark J. Bailey. 2000. Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system, *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (6) 2400-2407.

Betts W. 1991. *Biodegradation : Natural and synthetic materials*. Springer-Verlag. 23-25.

Bruce K, Hiorns W, Holban J, Osborn A, Strike P, Ritchie D.1992. Amplification of DNA from populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Applied Environmental Biotechnology*. 58 (9) 3413-3416

Carol Creader. 1996. Relief of amplification inhibition with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (3) 1102-1106

Christodoulatos. C. Koutsospyros, A. 1998 *Bioslurry reactors. Biological Treatment of Hazardous Wastes*. Ed John Wiley & , Inc. 69-101.

Curl, E. 1996. *The Rhizosphere*. Ed Springer-Verlag 92-99.

Duarte G, Soares A, Seldin L, de Araujo W, Jan Dirk van E. 2000. Extraction of Ribosomal RNA and Genomic DNA from Soil for studying the diversity of the Indigenous Bacterial Community. *Journal of Microbiology Methods*. 32. 21-29.

Duarte G, Soares A, Seldin L, de Araujo W, Jan Dirk van E. 2001. Analysis of bacterial community structure in sulfurous- oil- containing soils and detection of species Carrying Dibenzothiophene Desulfurization (dsz) Genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(3) 1052-1062

Henckel T, Jäckel U, Schnell S, Conrad R. 2000. Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, (5), 1801-1808.

Iwabuchi N, Sunairi M, Urai M, Itoh C, Anzai H, Nakajima M, Harayama S. 2002. Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rodochrous* S2 Stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by Indigenous Marine Bacteria. *Applied and Environmental Biotechnology*. 68(5), 2337-2343.

Kazuya W, Kanako W, Yumiko K, Kazuaki S, Shigeaki H. 2000. Molecular Characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (11), 4803-4809.

Kazuya W, Yamamoto S, Hino S, y Harayama S. 1998. Population dynamics of phenol-degrading bacteria in activated sludge determined by gyrB-Targeted quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (4) 1203-1209.

Kazuya W, Maki T, Hiroyuki F, and Shigeaki H. 1998a . Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge *Applied and Environmental Microbiology*, 1998. 4396-4402, 64, (11), 4369-4402.

Kawai M, Matsutera E, Kanda H, Yamaguchi N, Tani K, Nasu M. 2001. 16S Ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and Denaturig Gradient gel Electrophoresis. 68 (2). 699-704

MacNaughton S, Stephen J, Venosa A, Gregory A, Davis, Yun-Juan Chang, David C. 1999. White microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (8) .3566-3574.

Madigan J, Barlough J, Reubel G, Vredevoe L, Miller P, Rikihisa Y. 1999. Detection of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, in fresh water stream snails (Pleuroceridae: *Juga* spp.). *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (8). 2888-2893

Mishra S, Jyot J, Kuhad R, Lal B. 2001. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(4). 1675-1681.

Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, Santegoeds C, Schäfer H, Wawer C. 1998. Denaturing Gradient gel Electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Molecular Microbial Ecology Manual*. 3.4.4; 1-27.

Muyzer G, Hottenträger S, Teske A, Wawer C. 1996. denaturing Gradient Gel electrophoresis of PCR-Amplified 16S r DNA A new molecular approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Microbial Ecology Manual*. 3.4.4; 1-23.

Muyzer G, De Waal E. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polimerase chain reaction-amplified genes coding for 16S r RNA. *Applied Environmental Biotechnology*. 59 (6). 695-700

Perez Armendáriz B, Loera O, Fernandez L, Esparza F, Rodriguez R. 2004. Biostimulation of microorganisms from sugarcane bagasse pith for the removal of weathered hydrocarbon from soil. *Letters in Applied Microbiology*. 38 373-377

Pozzo Ardizzi MG, Manacorda AM, Altamirano G, Pellejero G, Aschkar G, Pozzo Ardizzi MC, Lizzi F. 1996. Biodegradación de residuos de petróleo por bioaumentación de bacterias nativas de suelos regionales. *Gerencia Ambiental*, 393.

Pradhan, S. Liu, B.Y. Srivastava, V. 1998. Slurry phase bioremediation of hazardous material: bioslurry reactor application. *Bioremediation Principles and Practice. Bioremediation Technologies (Vol3)*. Ed Technomic Publishing Corporation, Inc463-478.

Riser-Roberts, E. 1998. Remediation of petroleum contaminated soils. Biological, physical and chemical processes. Lewis Publishers.

Robert I. Andrew S. Whiteley, O'Donnell A, Bailey M. 2000. Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. Applied and Environmental Microbiology , 66, (12), 5488-5491

Rodgers R, Blumer E, Emmett M, Marshall A. 2000. Efficacy of bacterial Bioremediation: demonstration of complete incorporation of hydrocarbons into membrane phospholipids from *Rhodococcus* hydrocarbon degrading bacteria by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron Resonance Mass Spectrometry. Environmental Science Technology. 34. 535-540

Röling WF, Milner M, Jones D, Lee K, Daniel F, Swannell R, Head I. 2002. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. Applied and Environmental Microbiology. 68 (11), 5537-5548.

Saval BS. 1995. Acciones para la remediación de suelos en México. Segundo simposio Internacional sobre contaminantes del agua y suelo. Instituto de Ingeniería. UNAM.

Tebbe C, Vahjen W. 1993. Interference in humic acids extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA form bacteria and yeast. Applied and Environmental Microbiology. 59 (8). 2657-2665.

Troquet J, Larroche C, Dussap CG. 2002. Evidence for the occurrence of a oxygen limitation during soil bioremediation by solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 13 Pp 103-112.

Van Elsas J, Smalla K.1995. Extraction of microbial community DNA from soils. Molecular Microbial Ecology Manual. 1.3.3 1-11.

Wade H, Stapleton R, Saylor G. 1996. Direct extraction of microbial DNA from soils and sediments. Molecular Microbial Ecology Manual. 1.3.2; 1-9

Wayne LG, Brenner D, Colwell R, Grimont P, Kandler O, Krichevsky M, Moore C, Moore W, Murray R, Stackebrandt E, Starr M, Trüper H. 1987. Report of Ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal Systematic Bacteriology* 37. 463-464

8.1 SITIOS DE INTERNET

<http://www.pemex.gob.mx>.

<http://www.energia.gob.mx>

IX. ANEXOS

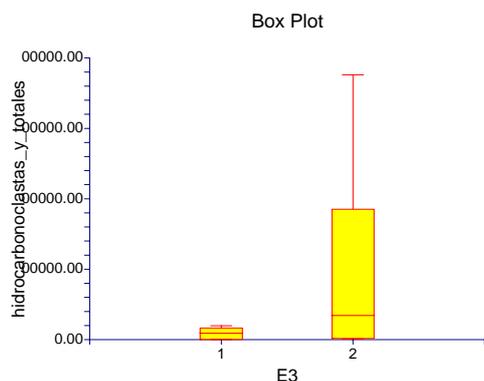
Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 1 24/04/03 04:35:26 p.m.
 Database C:\Mis documentos\felix\seminarios\UFCfelix.S0
 Response hidrocarbonoclastas_y_totales

Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0.05)
Skewness Normality of Residuals	3.0797	0.002072	Reject
Kurtosis Normality of Residuals	2.8401	0.004510	Reject
Omnibus Normality of Residuals	17.5511	0.000154	Reject
Modified-Levene Equal-Variance Test	9.2693	0.005581	Reject

Box Plot Section



Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: E3		1	Yes	S(A)	S+sA
S(A)		24	No		S(A)

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

Analysis of Variance Table

Source	Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: E3		1	3.412287E+13	3.412287E+13	8.03	0.009172*	0.776131
S(A)		24	1.019605E+14	4.248354E+12			
Total (Adjusted)		25	1.360834E+14				
Total		26					

* Term significant at alpha = 0.05

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 2 24/04/03 04:35:26 p.m.
 Database C:\Mis documentos\felix\seminarios\UFCfelix.S0
 Response hidrocarbonoclastas_y_totales

Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

Hypotheses

Ho: All medians are equal.
 Ha: At least two medians are different.

Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0.05)
Not Corrected for Ties	1	5.933596	0.014855	Reject Ho
Corrected for Ties	1	5.937656	0.014821	Reject Ho
Number Sets of Ties	2			
Multiplicity Factor	12			

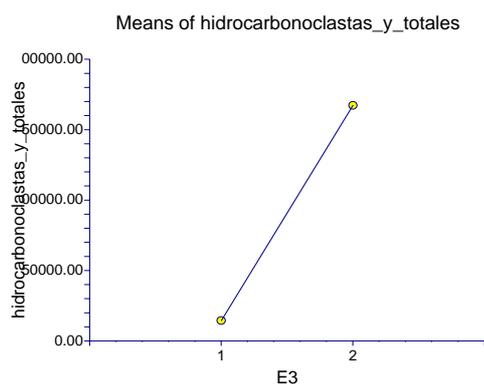
Group Detail

Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
1	13	128.00	9.85	-2.4359	255000
2	13	223.00	17.15	2.4359	883000

Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	26	1362207		104785.2
A: E3				
1	13	216599.2	571661.1	111814.1
2	13	2507816	571661.1	2403030

Plots of Means Section



Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 3 24/04/03 04:35:26 p.m.
 Database C:\Mis documentos\felix\seminarios\UFCfelix.S0
 Response hidrocarbonoclastas_y_totales

Bonferroni (All-Pairwise) Multiple Comparison Test

Response: hidrocarbonoclastas_y_totales
 Term A: E3

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=24 MSE=4.248354E+12 Critical Value=2.063899

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	13	216599.2	2
2	13	2507816	1

Bonferroni (With Control) Multiple-Comparison Test

Response: hidrocarbonoclastas_y_totales
 Term A: E3

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=24 MSE=4.248354E+12 Critical Value=2.063899

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	13	216599.2	2
2	13	2507816	1

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: hidrocarbonoclastas_y_totales
 Term A: E3

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=24 MSE=4.248354E+12

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	13	216599.2	2
2	13	2507816	1

Fisher's LSD Multiple-Comparison Test

Response: hidrocarbonoclastas_y_totales
 Term A: E3

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=24 MSE=4.248354E+12 Critical Value=2.063899

Group	Count	Mean	Different From Groups
-------	-------	------	-----------------------

Anexos

1	13	216599.2	2
2	13	2507816	1

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 4 24/04/03 04:35:26 p.m.
 Database C:\Mis documentos\felix\seminarios\UFCfelix.S0
 Response hidrocarbonoclastas_y_totales

Newman-Keuls Multiple-Comparison Test

Response: hidrocarbonoclastas_y_totales
 Term A: E3

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=24 MSE=4.248354E+12

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	13	216599.2	2
2	13	2507816	1

Scheffe's Multiple-Comparison Test

Response: hidrocarbonoclastas_y_totales
 Term A: E3

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=24 MSE=4.248354E+12 Critical Value=2.063899

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	13	216599.2	2
2	13	2507816	1

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: hidrocarbonoclastas_y_totales
 Term A: E3

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=24 MSE=4.248354E+12 Critical Value=2.918809

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	13	216599.2	2
2	13	2507816	1

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 5 24/04/03 04:35:26 p.m.
Database C:\Mis documentos\felix\seminarios\UFCfelix.S0
Response hidrocarbonoclastas_y_totales

Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test

hidrocarbonoclastas_y_totales	1	2
1	0.0000	2.4367
2	2.4367	0.0000

Regular Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600

Bonferroni Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600