



Universidad Autónoma Metropolitana-*Iztapalapa*
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**“Estudio de los mecanismos de remoción de hexadecano
por los cultivos puros y mixtos derivados de un
consorcio bacteriano”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN
BIOTECNOLOGÍA**

Presenta:

I.B.I. Olivia Tzintzun Camacho

Director: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Asesor interno: Dr. Octavio Loera Corral

Asesor externo: Dr. Hugo César Ramírez Saad

Septiembre de 2012

**“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana
está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del
CONACYT, con la referencia 001466”**

México D.F. a 27 de Septiembre del 2012

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

**"Estudio de los mecanismos de remoción de hexadecano por los cultivos
puros y mixtos derivados de un consorcio bacteriano"**

que presentó

I.B.I. Olivia Tzintzun Camacho

Comité Tutorial:

Director: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Asesor: Dr. Octavio Loera Corral

Asesor: Dr. Hugo César Ramírez Saad

Jurado:

Presidente: Dr. Ernesto Faveila Torres

Secretario: Dr. Octavio Loera Corral

Vocal: Dr. Hugo César Ramírez Saad

Vocal: Dr. Rafael Vázquez Duhalt

The image shows four handwritten signatures, each placed over a horizontal line. The top signature is in black ink and is partially obscured by a diagonal line. The second signature is in blue ink. The third and fourth signatures are in black ink. The lines are horizontal and extend across the width of the signature area.

“Hay dos maneras de difundir la luz... ser la lámpara que la emite, o el espejo que la refleja”.

Lin Yutang (1895-1976)
Escritor y filólogo chino.

Agradecimientos

A mi familia:

Por su apoyo incondicional a lo largo de esta etapa importante en mi vida, por sus esfuerzos y por su amor.

A Carlos Francisco Moreno Cruz:

Por ser una persona muy especial en mi vida, por el amor brindado y el apoyo incondicional.

Al Dr. Mariano Gutiérrez Rojas:

Por dirigir esta tesis, por los conocimientos académicos brindados y por el entusiasmo transmitido para ser de mí una persona enamorada de la ciencia.

A mis asesores, Dr. Octavio Loera y Hugo C. Ramírez Saad:

Por contribuir al desarrollo de esta tesis y por los conocimientos brindados para ser de mí una mejor estudiante.

A los doctores Ernesto Favela Torres y Rafael Vázquez Duhalt:

Por sus invaluable aportaciones para mejorar esta tesis durante su revisión.

A Tania:

Por el apoyo brindado durante la escritura de mi artículo científico y por sus excelentes consejos durante el desarrollo de mi tesis.

Al Dr. Sergio Huerta Ochoa:

Por permitirme trabajar con él en el Servicio social y darme cuenta que la investigación es maravillosa.

A la Dra. Alejandra Serrato Díaz:

Por su asesoría en las técnicas de Biología Molecular y por permitirme trabajar en su laboratorio.

A Félix Aguirre:

Por su apoyo y asesoría en las técnicas de Biología Molecular.

A mi gran amiga Bety:

Por su amistad a lo largo de todo este tiempo, por su apoyo y consejos.

A mis más grandes amigos:

Carlos, Nayeli, Vicky, Karina Domínguez, Hugo, Rox y muy especial a Inés Aloma Vicente que a pesar de la distancia sigue apoyándome y mostrándome su cariño.

A mis compañeros del laboratorio W103 y W108:

Por su apoyo y amistad a lo largo de todos estos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología:

Por el apoyo financiero durante la realización de este trabajo, a través de la beca otorgada

Índice general

Resumen	12
Abstract	14
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. Sitios contaminados con hidrocarburos.....	20
2.2. Degradación microbiana de hidrocarburos por cultivos puros y mixtos	21
2.3. Principales rutas de biodegradación de alcanos.....	23
2.4. Sistemas enzimáticos que intervienen en la degradación de alcanos	24
2.5. El papel de la hidrofobicidad celular en la degradación de hidrocarburos.....	27
2.6. El papel de los biosurfactantes en la degradación de hidrocarburos	28
2.7. Mecanismos de remoción de alcanos	31
2.8. Alcance del estudio	33
3. JUSTIFICACIÓN.....	35
4. HIPÓTESIS.....	37
5. OBJETIVOS.....	39
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	41
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
7.1. Medios de cultivo	45
7.2. Aislamiento de las cepas bacterianas	45
7.3. Identificación molecular de las cepas bacterianas.....	45
7.3.1. Extracción de DNA.....	45
7.3.2. Amplificaciones por PCR y DGGE.....	46
7.3.3. Análisis de secuencias	46
7.4. Cinéticas de degradación por cultivos puros y mixtos	46
7.5. Identificación de genes catabólicos.....	47
7.5.1. Gen <i>alkB</i>	47
7.5.2. Estabilidad del gen <i>alkB</i>	48
7.5.3. Gen <i>alkM</i>	49
7.6. Pruebas para la detección y cuantificación de biosurfactantes.....	50
7.6.1. Tensión superficial	50
7.6.2. Colapso de la gota	50
7.6.3. Desplazamiento del petróleo	50
7.7. Métodos analíticos	51

7.7.1. Crecimiento bacteriano.....	51
7.7.2. Concentración de hexadecano.....	51
7.7.3. Hidrofobicidad celular.....	51
7.7.4. Capacidad de pseudosolubilización.....	52
7.7.5. Capacidad de emulsificación.....	52
7.8. Análisis estadísticos.....	52
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	53
8.1. Aislamiento de las cepas bacterianas.....	54
8.2. Identificación molecular de las cepas bacterianas.....	55
8.3. Degradación de hexadecano por cultivos puros.....	56
8.4. Identificación de genes catabólicos.....	59
8.5. Detección y cuantificación de biosurfactantes.....	63
8.5.1. Cambios en la tensión superficial.....	63
8.5.2. Prueba del colapso de la gota.....	64
8.5.3. Prueba del desplazamiento del petróleo.....	65
8.6. Biosurfactantes como fuente de carbono.....	68
8.7. Degradación de hexadecano por cultivos mixtos.....	69
8.8. Mecanismos de remoción de hexadecano por <i>A. bouvetii</i>	72
8.9. Mecanismos de remoción de hexadecano por cultivos mixtos.....	75
8.9.1. Remoción de hexadecano por el cultivo <i>Xanthomonas sp.</i> + <i>A. bouvetii</i>	75
8.9.2. Remoción de hexadecano por el consorcio bacteriano.....	78
9. CONCLUSIONES.....	81
10. RECOMENDACIONES.....	84
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
12. ANEXOS.....	98
Anexo 1. Secuencias de los genes ribosomales RNAr 16S.....	99
Anexo 2. Secuencia del gen <i>alkM</i> en <i>A. bouvetii</i>	101
Anexo 3. Artículo de investigación.....	102

Índice de figuras

Figura 2.3.1. Principales rutas metabólicas en la degradación de alcanos.....	24
Figura 2.4.1. Estructura del sistema enzimático alcano monooxigenasa.....	25
Figura 6.1. Estrategia experimental global para el desarrollo de la tesis.	43
Figura 7.5.2.1. Esquema de trabajo para determinar la estabilidad del gen <i>alkB</i> en quince generaciones de los cultivos bacterianos creciendo en AST.....	48
Figura 8.1.1. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas bacterianas aisladas.....	54
Figura 8.2.1. Amplificación de la región variable V6-V8 del gen RNAr 16S.....	55
Figura 8.2.2. Patrones de corrimiento de la región V6-V8 del gen RNAr 16S en DGGE.	55
Figura 8.3.1. Cinéticas de los cultivos puros durante la degradación de HXD.....	58
Figura 8.4.1. Amplificación del gen <i>alkB</i> en las cepas bacterianas.....	59
Figura 8.4.2. Amplificación del gen <i>alkB</i> a lo largo de quince generaciones (G) de <i>Xanthomonas</i> sp. creciendo en medio AST.....	60
Figura 8.4.3. Amplificación del gen <i>alkB</i> en las cepas del consorcio después de seis meses de crecer en AST.....	61
Figura 8.4.4. Amplificación del gen <i>alkM</i> en las cepas del consorcio empleando una temperatura de hibridación de 54°C.....	62
Figura 8.4.5. Amplificación del gen <i>alkM</i> en <i>A. bouvetii</i> empleando una temperatura de hibridación de 58°C.....	62
Figura 8.5.1.1. Cinéticas de la tensión superficial de los cultivos puros durante la degradación de HXD.....	64
Figura 8.5.2.1. Resultados de la prueba del colapso de la gota para <i>A. bouvetii</i> a lo largo de 15 días de cultivo.....	65
Figura 8.5.3.1. Relación entre el área de petróleo desplazada con la concentración de Tween 20.....	66
Figura 8.5.3.2. Resultados de la prueba del desplazamiento del petróleo empleando los sobrenadantes de los cultivos de <i>A. bouvetii</i> a diferentes tiempos de muestreo.	67
Figura 8.5.3.3. Cinética de producción de biosurfactantes por <i>A. bouvetii</i> durante la degradación de HXD.....	67
Figura 8.6.1. Resultados del crecimiento de las cepas bacterianas empleando como fuente de carbono el biosurfactante producido por <i>A. bouvetii</i>	69
Figura 8.7.1. Cinéticas de los cultivos mixtos.....	71

Figura 8.8.1. Propiedades del cultivo de <i>A. bouvetii</i> durante la degradación de HXD.....	74
Figura 8.9.1.1. Propiedades del cultivo <i>Xanthomonas</i> sp.+ <i>A. bouvetii</i> durante la degradación de HXD.....	77
Figura 8.9.1.2. Propiedades del consorcio bacteriano durante la degradación de HXD .	79

Índice de tablas

Tabla 2.1.1. Estrategias para la biorremediación de suelos contaminados.....	21
Tabla 2.2.1. Principales géneros microbianos capaces de utilizar alcanos como fuente de carbono.....	22
Tabla 2.4.1. Identificación de diferentes sistemas enzimáticos que intervienen en la degradación de alcanos.....	26
Tabla 2.6.1. Clasificación de los biosurfactantes en función de su estructura química y de los microorganismos que los producen.....	30
Tabla 2.8.1. Análisis de los trabajos publicados y citados en los últimos 30 años relacionados con la degradación de hidrocarburos.....	34
Tabla 7.5.1.1. Componentes de la reacción de PCR para amplificar el gen <i>alkB</i>	47
Tabla 7.5.1.2. Condiciones para la amplificación del gen <i>alkB</i> por PCR.....	48
Tabla 7.5.3.1. Componentes de la reacción de PCR para amplificar el gen <i>alkM</i>	49
Tabla 7.5.3.2. Condiciones para la amplificación del gen <i>alkM</i> por PCR.....	49
Tabla 8.2.1. Identificación de las cepas bacterianas mediante la secuenciación del gen RNAr 16S.....	56

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar los mecanismos de remoción de hexadecano (HXD) empleados por los cultivos puros y mixtos, derivados de un consorcio bacteriano, durante la degradación de HXD. Las cepas bacterianas se aislaron de muestras de un biorreactor de columna de burbujas, operado en ciclos secuenciales de 14 días, con HXD como única fuente de carbono y energía. El biorreactor fue inicialmente inoculado con una suspensión bacteriana aislada de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam, una planta nativa que crece cerca de una refinería de petróleo en operación en el Estado de Veracruz. Se aislaron cuatro cepas bacterianas y fueron identificadas mediante la secuenciación del gen ribosomal RNAr 16S como: *Xanthomonas* sp. UAM58, *Acinetobacter bouvetii* UAM25, *Shewanella* sp. UAM38 y *Defluviobacter lusatiensis* UAM86.

Los estudios de degradación de HXD se desarrollaron en botellas serológicas (125 mL) con 50 mL de medio mineral salino (MMS), 13 g/L de HXD, y un inóculo de 1×10^6 UFC/mL. Los cultivos se desarrollaron por triplicado (30°C; 200 rpm; 15 días) realizando un muestreo a los 0, 2, 5, 10 y 15 días de cultivo. Las variables de respuesta analizadas fueron: la concentración de HXD, el crecimiento bacteriano, la hidrofobicidad celular, la capacidad de pseudosolubilización y emulsificación del HXD.

Con el propósito de conocer los sistemas enzimáticos involucrados en la oxidación del HXD se investigaron diferentes genes catabólicos mediante PCR. En esta etapa se logró identificar los genes *alkB* y *alkM*.

Los biosurfactantes se detectaron mediante las siguientes pruebas: tensión superficial, colapso de la gota y desplazamiento de la gota del petróleo. Esta última prueba también fue empleada para determinar, indirectamente, la concentración de biosurfactantes expresada como equivalentes de Tween 20.

Al cabo de 15 días de cultivo se encontró que la capacidad para degradar HXD fue diferente para cada cepa por separado. Se observó que la eficiencia de degradación de HXD fue significativamente mayor para *A. bouvetii* (72±4%), seguida de *Xanthomonas* sp. (46±4%) y *D. lusatiensis* (40±6%). *Shewanella* sp. no fue capaz de utilizar HXD como única fuente de carbono y energía. Se identificaron los genes que codifican para la alcano monooxigenasa en los cultivos puros y se identificó el gen homólogo *alkM* en *A. bouvetii*. Además, *A. bouvetii* fue la única cepa del consorcio productora de biosurfactantes

alcanzando una máxima concentración a los 5 días (0.17 ± 0.03 g/L de equivalentes de Tween 20).

Con base en la capacidad de degradación de HXD de los cultivos puros, se diseñaron y evaluaron cuatro cultivos mixtos. Se observó un incremento en la degradación de HXD, particularmente, en los cultivos *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii* ($74 \pm 7\%$) y el consorcio bacteriano, constituido por las cuatro cepas ($79 \pm 3\%$).

Los mecanismos de remoción de HXD se evaluaron en el cultivo puro de *A. bouvetii*, el cultivo mixto integrado por *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii* y el consorcio, debido a su alta eficiencia de degradación de HXD. Se consideraron las cinéticas de hidrofobicidad celular, la capacidad de pseudosolubilización y emulsificación de HXD para determinar los mecanismos de remoción. Los resultados indicaron que *A. bouvetii* empleó tanto el contacto directo como la remoción mediada por biosurfactantes para la degradación de HXD. En el caso de los cultivos *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii* y el consorcio bacteriano, ambos mecanismos tomaron lugar; pero la remoción facilitada por biosurfactantes fue predominante al finalizar el tiempo de cultivo. En particular, en el consorcio la emulsificación fue predominante después de los 5 días de cultivo.

Por lo tanto, los cambios en la hidrofobicidad celular y el grado de pseudosolubilización o emulsificación, fueron factores clave para la remoción de sustratos hidrofóbicos por los cultivos puros y mixtos evaluados. Además las asociaciones poblacionales entre las cepas del consorcio bacteriano, jugaron un papel importante en los mecanismos de remoción de HXD.

Este trabajo es el primer estudio que muestra la capacidad degradadora de hidrocarburos de *D. lusatiensis* y *A. bouvetii*. Asimismo, este estudio revela a *A. bouvetii* como una cepa productora de biosurfactantes.

Finalmente, este trabajo contribuye a entender los mecanismos de remoción de hidrocarburos entre cultivos bacterianos puros y mixtos.

Abstract

The aim of this study was to determine the mechanisms of hexadecane (HXD) uptake among pure and mixed cultures, derived from a bacterial consortium, during of HXD transformation. Bacterial strains were isolated from samples a bubble column reactor operated in sequential batch, with HXD as sole carbon source and energy. The bioreactor was initially inoculated with a bacterial suspension obtained from rhizosphere of *Cyperus Laxus* Lam, a native plant able to grow in a highly contaminated swamp adjacent to an operating refinery in Veracruz. Four bacterial strains were isolated and identified by nucleotide sequence analysis (16S rRNA gene). The bacterial strains were identified as *Xanthomonas* sp., *Acinetobacter bouvetii*, *Shewanella* sp. and *Defluviobacter lusatiensis*.

Biodegradation assays were conducted in 125 mL serological bottles containing a saline mineral medium (SMM), HXD (13 g/L) and an inoculum of 1×10^6 CFU /mL. Cultures were performed in triplicate (30°C; 200 rpm; 15 days) and sampled at 0, 2, 5, 10 and 15 days. Analyses of residual HXD, bacterial growth, cell surface hydrophobicity, pseudosolubilization and emulsification capacity were determined.

In order to determine enzymatic systems involved in the HXD degradation, we identified different catabolic genes by PCR. As a result, we identified the *alkB* and *alkM* genes.

Biosurfactants were detected by the following methods: surface tension, collapsed drop and oil spreading. Biosurfactant concentration was indirect determined by the oil spread method and expressed as equivalents of Tween 20.

After 15 days growth, HXD was degraded by the pure cultures of *A. bouvetii* (72±4%), *Xanthomonas* sp. (46±4%) and *D. lusatiensis* (40±6%), but not by *Shewanella* sp. We identified the *alkM* gene in *A. bouvetii*. In addition, *A. bouvetii* was the only biosurfactant producer, reaching a maximum concentration at 5 days (0.17 ± 0.03 g/L equivalents of Tween 20).

Based on degrading abilities of pure cultures, we tested four mixed cultures. As a result, the mixed cultures showed and enhanced HXD degradation, particularly with the culture *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii* (74±7%) and the bacterial consortium (79±3%).

Since *A. bouvetii*, the culture with *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii* and the consortium were the best degraders, the mechanisms of HXD uptake were determined. The kinetics of cell surface hydrophobicity, the pseudosolubilization and emulsification capacities were considered to characterize the uptake mechanisms. Our findings showed that *A. bouvetii* combined both direct contact and biosurfactant-mediated uptake. For the culture

Xanthomonas sp.+*A. bouvetii* and the consortium both mechanisms took place; however, the biosurfactant-mediated uptake was predominant at the end of culture time. Particularly, the emulsification was predominant in the consortium after 5 days.

The changes in the cell surface hydrophobicity and the pseudosolubilization and emulsification extent were key factors for the hydrophobic substrate degradation. Also, associations among members of the consortium, played an important role in the uptake mechanisms by the mixed cultures.

This is the first report of *D. lusatiensis* and *A. bouvetii* as hydrocarbon degrader strains and reveals *A. bouvetii* as a biosurfactant producer. Our results contribute to understand the HXD uptake mechanisms by pure and mixed cultures.

1. INTRODUCCIÓN

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos que se libera continuamente en el ambiente debido al mal manejo durante la extracción, transporte y procesamiento, ocasionando la contaminación del suelo y agua (Holliger *et al.*, 1994). La biorremediación es la principal estrategia empleada para la eliminación de los contaminantes orgánicos presentes en el ambiente (Das y Chandran, 2010). Por lo tanto, se han aislado y evaluado diferentes microorganismos con capacidad para degradar petróleo, y se han utilizado como inoculantes para la biorremediación de suelos contaminados (Ito *et al.*, 2008).

El interés por estudiar los microorganismos degradadores de hidrocarburos, especialmente alcanos, ha permitido caracterizar a detalle sus mecanismos de remoción. En este sentido, la mayoría de los estudios se enfocan en cultivos bacterianos puros (Bouchez-Naïtali *et al.*, 1999; Vasileva-Tonkova *et al.*, (2008); y son menos los estudios donde se determinan los mecanismos de remoción en cultivos mixtos.

Desde 1955 Zobell reportó la degradación de hidrocarburos y desde entonces se ha publicado un gran número de artículos científicos al respecto. Sólo en los últimos 30 años, las publicaciones enfocadas a la degradación de hidrocarburos comprenden a nivel mundial, más de 23 000 artículos (Base de datos: *ISI Web of knowledge*). En el 2008 se observó un incremento en las publicaciones relacionadas con la caracterización de los mecanismos de remoción de hidrocarburos basándose en la hidrofobicidad celular y la capacidad de los cultivos para producir biosurfactantes. Estos temas ganaron interés y en el 2011 se registró un máximo en las publicaciones enfocadas a evaluar el papel de la hidrofobicidad celular y de los biosurfactantes sobre la degradación de hidrocarburos.

Por lo tanto, este trabajo se centra en determinar los mecanismos de remoción de hexadecano (HxD) empleados por los cultivos puros y mixtos, derivados de un consorcio bacteriano, durante la degradación de HxD.

En este trabajo se realizó una revisión bibliográfica acerca de los conceptos y antecedentes relacionados con la degradación de hidrocarburos por cultivos bacterianos puros y mixtos. Particularmente, se realizó una revisión acerca de la ruta de degradación y los principales sistemas enzimáticos involucrados en la oxidación de alcanos. Así como, el papel de la hidrofobicidad celular y la producción de biosurfactantes en la degradación de sustratos hidrofóbicos. Los diversos aspectos de esta revisión bibliográfica se resumen en el capítulo 2. Asimismo, al finalizar este capítulo se incluyó un análisis de las publicaciones relacionadas con la degradación de hidrocarburos en los últimos 30 años. En el capítulo 3 se presenta el planteamiento del problema de estudio, así como la

justificación que motivó el desarrollo de la investigación. La hipótesis del trabajo, los objetivos y la estrategia experimental empleada se detallan en los capítulos 4 al 6.

Los aspectos relacionados con los materiales y métodos utilizados se resumen en el capítulo 7. De manera general, el aislamiento de las cepas bacterianas se realizó a partir de muestras de un biorreactor de columna de burbujas, operado en ciclos secuenciales de 14 días, con HXD como única fuente de carbono y energía. A lo largo de este estudio se realizó la caracterización e identificación de las cuatro cepas bacterianas aisladas mediante la secuenciación del gen ribosomal RNAr 16S y se evaluó la capacidad de degradación de HXD de los cultivos puros.

Para entender la capacidad metabólica de los cultivos puros, se identificaron los genes catabólicos *alkB* y *alkM*. Por otra parte, los biosurfactantes fueron detectados mediante tres pruebas: tensión superficial, colapso de la gota y desplazamiento de la gota de petróleo. Esta última prueba fue útil para cuantificar la concentración de biosurfactantes.

Considerando las capacidades metabólicas de las cepas, se diseñaron cuatro cultivos mixtos y se evaluó su capacidad para degradar HXD. Posteriormente, se determinaron y compararon los mecanismos de remoción de HXD de los cultivos puros y mixtos seleccionados.

Los resultados obtenidos y la discusión de los mismos se presentan en el capítulo 8 de este trabajo. En los capítulos subsecuentes se presentan las conclusiones generales, las recomendaciones y las referencias bibliográficas. Finalmente, el artículo científico producto de este trabajo, se incluyó en la sección de anexos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sitios contaminados con hidrocarburos

El petróleo y sus derivados son la principal fuente de energía para las industrias y la vida diaria del ser humano. Sin embargo, las fugas y derrames son frecuentes durante el proceso de exploración, producción, refinación, transporte y almacenamiento del petróleo (Das y Chandran, 2011). La liberación de los hidrocarburos en el medio ambiente es la principal causa de contaminación de suelos y aguas (Holliger *et al.*, 1994); particularmente, la contaminación del suelo con hidrocarburos causa daños masivos a la flora y fauna existente. Por tal motivo, se han empleado diferentes técnicas para la remediación de los suelos contaminados con hidrocarburos. Estas técnicas incluyen la incineración de los contaminantes, la evaporación, dispersión y lavado. Sin embargo, estas tecnologías son costosas y no necesariamente aseguran la mineralización, esto es, la transformación hasta las formas más oxidadas, de los contaminantes (Das y Chandran, 2010).

La biorremediación es una tecnología viable y de bajo costo, es definida como el conjunto de técnicas que se centran en el uso de microorganismos para degradar los contaminantes presentes en el medio a formas menos tóxicas. El proceso se lleva a cabo por microorganismos nativos o que pueden ser aislados de otros sitios contaminados (Vidali, 2001). En la Tabla 2.1.1., se muestran las diferentes estrategias usadas para la biorremediación de los suelos contaminados, y se pueden dividir de manera general en estrategias de biorremediación *in situ* y *ex situ*. La biorremediación *in situ*, se refiere a tratamientos que no requieren del traslado del suelo contaminado como: el bioburbujeo, bioventeo y la bioaumentación. Mientras que en la biorremediación *ex situ*, el suelo es trasladado a un lugar fuera del sitio, y se le maneja en un sistema controlado como una celda de *landfarming* o algún tipo de biorreactor (Bongkeun *et al.*, 2000).

Tabla 2.1.1. Estrategias para la biorremediación de suelos contaminados.

Estrategias	Tecnología	Ventajas	Desventajas
<i>In situ</i>	Bioburbujeo. Bioventeo. Bioaumentación.	Más rentable. Relativamente pasivo. Atenuación natural. Tratamiento para suelo y agua.	Limitaciones ambientales. Tiempos prolongados. Dificultades para monitorear.
<i>Ex situ</i>	Labranza del suelo. Composteo. Biopilas.	Rentable. Bajos costos.	Requiere espacio. Tiempos prolongados. Control de pérdidas abióticas. Problemas de transferencia de masa.
	Biorreactores: Reactores de lodos. Reactores líquidos.	Cinéticas de degradación rápidas. Optimización de parámetros. Incremento en la transferencia de masa. Uso efectivo de inoculantes y surfactantes.	Requiere excavación del suelo. Se requiere un capital alto de inversión. Altos costos de operación

*Adaptada de Vidali, 2001.

2.2. Degradación microbiana de hidrocarburos por cultivos puros y mixtos

Por su composición química, los hidrocarburos del petróleo se dividen en cuatro clases: alifáticos, aromáticos, asfaltenos (fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres y porfirinas, destacando que todos estos compuestos pueden estar conjugados en una sola macromolécula), y resinas (piridinas, quinoles, carbazoles, sulfóxidos y amidas) (Das y Chandran, 2011).

La biodegradación es definida como el proceso mediante el cual los microorganismos transforman o alteran (a través de reacciones de óxido-reducción) la estructura química de los contaminantes en el ambiente (EPA, 2009). La biodegradación de los hidrocarburos del petróleo es un proceso complejo que depende de la estructura molecular y de la concentración de los hidrocarburos en los sitios contaminados. Se conocen varios factores que inciden en la degradación de los hidrocarburos pero uno de los más importantes es su baja biodisponibilidad para los microorganismos. La biodisponibilidad es definida como el grado de interacción de los compuestos o

contaminantes con los microorganismos (Harms *et al.*, 2010). Por lo tanto, los hidrocarburos del petróleo difieren entre sí por su susceptibilidad al ataque microbiano, la susceptibilidad de los hidrocarburos a la degradación generalmente es considerada en el siguiente orden: alcanos lineales> alcanos ramificados> aromáticos pequeños> ciclo alcanos> hidrocarburos aromáticos policíclicos. Cabe destacar que los hidrocarburos de alto peso molecular, generalmente, hidrocarburos aromáticos policíclicos no son completamente mineralizados (Ulrici, 2000). Particularmente, los alcanos son hidrocarburos saturados y son los principales constituyentes del petróleo en un 20 a 25% (Ulrici, 2000), de aquí la importancia de estudiar y entender la biodegradación, sus alcances y consecuencias. El hexadecano (HXD) es considerado como un compuesto modelo representativo de los alcanos y en este trabajo también fue utilizado como una molécula modelo.

Se ha aislado y reportado un gran número de microorganismos con la capacidad para degradar hidrocarburos. En la Tabla 2.2.1., se muestran los principales géneros microbianos que son capaces de utilizar alcanos como única fuente de carbono y energía. Como se aprecia, los alcanos son degradados principalmente por bacterias, hongos y levaduras, destacando los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas* como los más estudiados (van Beilen *et al.*, 2003; Throne-Holst *et al.*, 2007).

Tabla 2.2.1. Principales géneros microbianos capaces de utilizar alcanos como fuente de carbono.

Bacterias	Levaduras	Hongos	Algas
<i>Achromobacter</i>	<i>Candida</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Prototheca</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cladosporium</i>	
<i>Alcanivorax</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Corollasporium</i>	
<i>Alcaligenes</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Cunninghamella</i>	
<i>Bacillus</i>	<i>Pichia</i>	<i>Dendryphiella</i>	
<i>Brevibacterium</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Fusarium</i>	
<i>Burkholderia</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Gliocladium</i>	
<i>Corynebacterium</i>	<i>Sporobolomyces</i>	<i>Lulworthia</i>	
<i>Flavobacterium</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Penicillium</i>	
<i>Mycobacterium</i>	<i>Trichosporon</i>	<i>Varicospora</i>	
<i>Nocardia</i>	<i>Yarrowia</i>	<i>Verticillium</i>	
<i>Pseudomonas</i>			
<i>Rhodococcus</i>			
<i>Sphingomonas</i>			
<i>Streptomyces</i>			

* Adaptada de van Beilen *et al.*, 2003.

La degradación de hidrocarburos puede llevarse a cabo por cultivos microbianos puros y cultivos mixtos. En su mayoría, los microorganismos son aislados de sitios contaminados y son utilizados como inóculos encaminados a la biorremediación (Supaphol *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2008). Inclusive, se ha reportado el diseño y la evaluación de los cultivos mixtos para degradar diferentes fracciones del petróleo (Ghazali *et al.*, 2004; Díaz-Ramírez *et al.*, 2008).

Las ventajas de emplear cultivos mixtos en lugar de cultivos puros para la degradación de hidrocarburos han sido demostradas, y los beneficios son atribuidos a los efectos sinérgicos que se establecen entre los diferentes miembros de los consorcios microbianos (Mukred *et al.*, 2008). Las interacciones poblacionales que se establecen en un consorcio microbiano y los mecanismos de degradación pueden ser complejos; es posible que algunas especies remuevan los metabolitos producidos por otras bacterias, o bien, algunas especies sean capaces de degradar compuestos que fueron oxidados parcialmente (Ghazali *et al.*, 2004). Además, la presencia de diferentes capacidades metabólicas en un cultivo mixto, favorece la degradación de un rango amplio de hidrocarburos. Por consiguiente, es importante considerar las rutas metabólicas y los sistemas enzimáticos que poseen las cepas para diseñar los cultivos mixtos.

2.3. Principales rutas de biodegradación de alcanos

En la ruta de degradación de alcanos, la alcano monooxigenasa es la enzima clave que cataliza la oxidación inicial del metilo terminal del sustrato produciendo un alcohol primario: el 1-alcohol. Posteriormente, el alcohol primario es oxidado hasta la obtención del ácido graso correspondiente y metabolizado siguiendo la β -oxidación (Whyte *et al.*, 2002).

En la Figura 2.3.1., se muestra la ruta de la oxidación terminal de los alcanos y la ruta de la oxidación subterminal. Los alcanos de cadena corta son metabolizados también por una oxidación subterminal (Ashraf *et al.*, 1994); donde el alcohol secundario se transforma a una cetona, para después ser oxidada por una monooxigenasa del tipo Baeyer-Villiger a un éster. El éster es hidrolizado por una esterasa a un alcohol y a un ácido graso. En algunos casos ambos extremos del alcano son oxidados y se produce un ácido dicarboxílico, generalmente esta reacción se lleva a cabo en levaduras y bacterias (Scheller *et al.*, 1998). Algunos ejemplos de este tipo de oxidación se ha reportado en *Penicillium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y más recientemente en *Rhodococcus* sp. Q15 (van Beilen *et al.*, 2003).

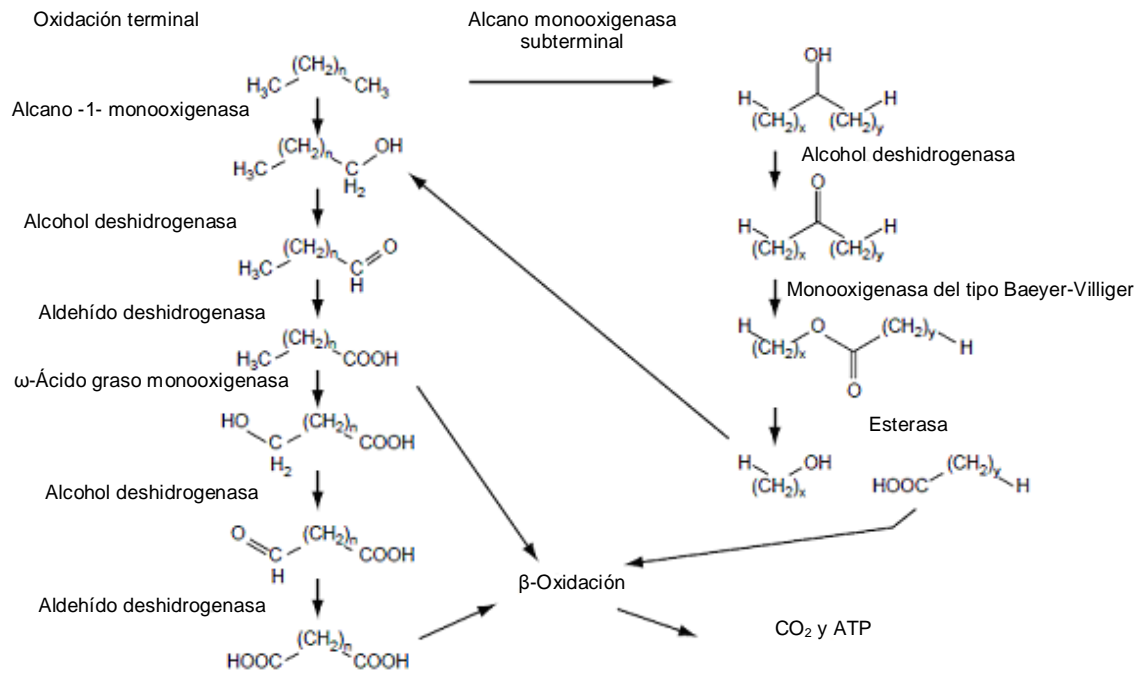


Figura 2.3.1. Principales rutas metabólicas en la degradación de alcanos.

2.4. Sistemas enzimáticos que intervienen en la degradación de alcanos

Son varias las enzimas involucradas en la degradación de alcanos. La alcano monooxigenasa unida a la membrana fue la primera que se estudió y fue descubierta en *Pseudomonas oleovorans* (Baptist *et al.*, 1963). Posteriormente la cepa se renombró como *Pseudomonas putida*. Los estudios bioquímicos demostraron que el sistema alcano monooxigenasa está integrado por una alcano hidroxilasa (AlkB) y una cadena de transferencia de electrones que contiene a dos proteínas solubles: la rubredoxina (AlkG) y la rubredoxina reductasa (AlkT) (Whyte *et al.*, 2002). La rubredoxina reductasa es la enzima responsable de la transferencia de electrones a partir del NADH a la rubredoxina, empleando como cofactor al FAD y después los electrones se transfieren a la alcano hidroxilasa como se muestra gráficamente en la Figura 2.4.1.

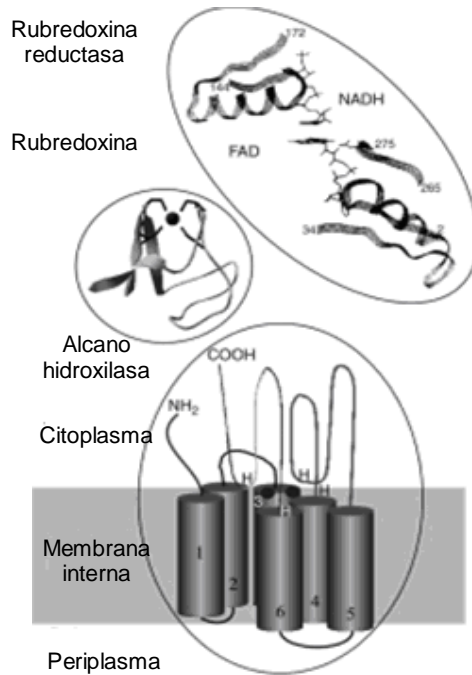


Figura 2.4.1. Estructura del sistema enzimático alcano monooxigenasa.

Dependiendo de la longitud de la cadena del alcano se requiere un sistema enzimático específico para iniciar la oxidación del sustrato. Se han reportado tres categorías principales: (i) para alcanos de C1-C4, la metano monooxigenasa, (ii) para alcanos de C5-C16, la alcano monooxigenasa y el citocromo P450, y (iii) para alcanos con una cadena mayor a C17 las enzimas son aún desconocidas (van Beilen *et al.*, 2007). La identificación de los tres grupos enzimáticos en diferentes géneros bacterianos se presenta en la Tabla 2.4.1. Como se observa la alcano monooxigenasa, el citocromo P450 y las dioxigenasas son los sistemas enzimáticos que poseen los principales géneros bacterianos degradadores de alcanos como: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* y *Alcanivorax*. El interés por entender el metabolismo de los alcanos ha conducido a desarrollar estudios bioquímicos y análisis de los genes que codifican para los sistemas alcano monooxigenasa (*alkB*) y citocromo P450 (van Beilen *et al.*, 2003).

Tabla 2.4.1. Identificación de diferentes sistemas enzimáticos que intervienen en la degradación de alcanos.

Sistema enzimático	Longitud de la cadena	Microorganismo	Referencia
Metano monooxigenasa	C1-C8; alcanos halogenados, alquenos, cicloalcanos.	<i>Methylococcus</i> , <i>Methylosinus</i> , <i>Methylocystis</i> , <i>Methylomonas</i> , <i>Methylocella</i> .	McDonald <i>et al.</i> , 2006
Metano monooxigenasa	C1-C5; alcanos halogenados, alquenos.	<i>Methylococcus</i> , <i>Methylosinus</i> , <i>Methylocystis</i> , <i>Methylobacter</i> , <i>Methylomonas</i> , <i>Methylomicrobium</i> , etc.	McDonald <i>et al.</i> , 2006)
Alcano monooxigenasa (AlkB)	C5-C16; alcanos, ácidos grasos, alquilbencenos.	<i>Acinetobacter</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> , etc.	van Beilen <i>et al.</i> , 2003
Citocromo P450 en eucariotes (CYP52, Clase II)	C10-C16; alcanos, ácidos grasos.	<i>Candida maltosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> .	lida <i>et al.</i> , 2000
Citocromo P450 en bacterias (CYP153, Clase I)	C5-C16; alcanos, cicloalcanos.	<i>Acinetobacter</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Sphingomonas</i> , etc.	van Beilen <i>et al.</i> , 2006
<i>Dioxygenasa</i>	C10-C30, alcanos.	<i>Acinetobacter</i> sp. M-1	Maeng <i>et al.</i> , 1996.

* Adaptada de van Beilen y Funhoff, 2007.

En la última década, se han identificado más de 60 genes homólogos del gen *alkB* (alcano hidroxilasa) en diferentes cepas bacterianas, en donde las secuencias correspondientes a estos genes presentan una alta diversidad entre ellos (van Beilen *et al.*, 2003; van Beilen y Funhoff, 2007). Por ejemplo, el gen *alkM* es un homólogo de *alkB* y se ha identificado en el género *Acinetobacter*. Ratajczak *et al.*, (1998) fueron los primeros en analizar la organización estructural de los genes involucrados en la degradación de alcanos en *Acinetobacter* sp. ADP1. Los resultados de las homologías indicaron que *alkM* pertenece a una nueva familia de proteínas. Inclusive se han detectado varias copias del gen *alkM* en *Acinetobacter* sp DSM 17874, como *alkMa* y *alkMb* sugiriendo que estos genes están involucrados en la degradación de alcanos en un rango de 10 a 20 átomos de carbono (Throne-Holst *et al.*, 2007).

La identificación de los genes de la alcano monooxigenasa (*alkB* y *alkM*) se ha realizado en diferentes sitios contaminados para analizar la distribución y presencia de microorganismos con la capacidad para degradar hidrocarburos (Vomberg y Kliner, 2000). Inclusive, la identificación de estos genes también se ha realizado en ambientes

marinos bajo condiciones extremas. Los resultados sugieren que se requieren más estudios para la identificación de nuevos genes involucrados en la degradación de alcanos (Kuhn *et al.*, 2009).

2.5. El papel de la hidrofobicidad celular en la degradación de hidrocarburos

La mayoría de los microorganismos degradadores de hidrocarburos poseen enzimas intracelulares y para comenzar la biodegradación se requiere de la difusión del sustrato, desde la fase orgánica a la fase acuosa y después atravesar la pared celular y la membrana. La adhesión de las células a las gotas de hidrocarburos puede minimizar la distancia de difusión y facilitar la difusión de los sustratos hidrofóbicos al interior de las células microbianas (Abbasnezhad *et al.*, 2011). Por lo tanto, la alta hidrofobicidad celular es un prerrequisito para la remoción de alcanos por contacto directo (Bredholt *et al.*, 2002). La hidrofobicidad celular es definida como la afinidad bacteriana a superficies hidrofóbicas (Sanin, 2003).

Cabe destacar que los constituyentes de las superficies celulares influyen en la hidrofobicidad de las células, estos incluyen: las fimbrias celulares, la proteína M/ácido lipoteicoico, proteína A, prodigiosina, glucosiltransferasa, proteínas de la membrana externa, oligosacáridos, lípidos de la membrana externa y la gramicidina (Abbasnezhad *et al.*, 2011). Por ejemplo, *Acinetobacter venetianus* (formalmente *Acinetobacter calcoaceticus*) cepa RAG-1 es capaz de adherirse a las gotas de hidrocarburos mediante fimbrias celulares (Rosenberg *et al.*, 1982). En otros trabajos se ha reportado que las cadenas de ácido micólico influyen en los cambios de hidrofobicidad celular de bacterias corineformes y *Rhodococcus* spp, así como en su capacidad de adhesión a superficies hidrofóbicas (Bendinger *et al.*, 1993).

Por otra parte, se conocen compuestos con actividad de superficie denominados biosurfactantes que son capaces de unirse a las superficies celulares y modificar la hidrofobicidad celular (Neu, 1996). En la última década varios estudios han demostrado los cambios en la hidrofobicidad celular debido a los biosurfactantes durante la degradación de hidrocarburos. Por ejemplo, Al-Tahhan *et al.*, (2000) demostraron que los biosurfactantes del tipo ramnolípidos causaron la liberación de los lipopolisacáridos de la membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa*, ocasionando un incremento en la hidrofobicidad celular. Más tarde, Hua *et al.*, (2003) al evaluar el cambio en el potencial zeta de la superficie celular, demostraron que los biosurfactantes producidos por *Candida antarctica* modificaron su hidrofobicidad celular.

Estudios recientes se han enfocado a evaluar la hidrofobicidad celular de los microorganismos degradadores de hidrocarburos y determinar el papel que juega en la degradación. Por ejemplo, Obuekwe *et al.*, (2007) evaluaron la hidrofobicidad celular de varias generaciones de *Paenibacillus* sp. R0032A y *Burkholderia cepacia* que normalmente son poblaciones hidrofóbicas, y observaron una disminución en la hidrofobicidad celular a lo largo de las diferentes generaciones y como consecuencia en la degradación del petróleo, HXD y fenantreno.

Cabe destacar que los cambios en la hidrofobicidad de los cultivos bacterianos puros han sido ampliamente estudiados, pero para cultivos mixtos son pocos los estudios. Por ejemplo, Obuekwe *et al.*, (2009) observaron una fuerte correlación entre la hidrofobicidad celular y la biodegradación de hidrocarburos por cultivos bacterianos puros. De igual manera, Kaczorek *et al.*, (2008) reportaron una correlación entre la modificación de la hidrofobicidad celular y la degradación de hidrocarburos, observando diferencias muy marcadas entre bacterias y levaduras. Sin embargo, Owsianiak *et al.*, (2009) no encontraron una correlación entre la hidrofobicidad celular y la biodegradación de diesel por 218 consorcios microbianos. En el caso de Cavalca *et al.*, (2008) observaron cambios en la hidrofobicidad celular de dos cultivos bacterianos mixtos y de sus aislados; concluyendo que estos cambios pudieron estar relacionados con la degradación del fenantreno. Además destacaron que las modificaciones en la hidrofobicidad de los cultivos mixtos no fueron tan evidentes como en los aislados. Por lo tanto, los cambios en la hidrofobicidad celular de los cultivos mixtos es un fenómeno complejo y difícil de explicar. Owsianiak *et al.*, (2009) mencionan que varios factores pueden influir, tales como: la presencia de cepas con diferente hidrofobicidad celular, la biodisponibilidad del sustrato y los mecanismos de remoción que prevalezcan. Por consiguiente, resultaría interesante estudiar las estrategias que emplean los integrantes de un cultivo mixto frente a sustratos hidrofóbicos. Así como los factores físicos que modifican la hidrofobicidad celular tanto de los cultivos puros como mixtos.

2.6. El papel de los biosurfactantes en la degradación de hidrocarburos

Los biosurfactantes son moléculas anfifílicas, es decir, poseen una porción hidrofílica y una porción hidrofóbica. Se caracterizan por tener propiedades de superficie que modifican la tensión superficial e interfacial. Forman emulsiones que permiten solubilizar la fase orgánica, como los hidrocarburos, en la fase acuosa que los contiene (Desai y Banat, 1997).

Los biosurfactantes tienen ventajas con respecto a los surfactantes químicos debido a su baja toxicidad, alta biodegradabilidad y mejor compatibilidad con el medio ambiente. Además, los biosurfactantes poseen una alta selectividad y actividad a temperaturas altas (50°C), así como a valores de pH en un rango de 4.5 a 9.0 y altas concentraciones salinas (50 g/L de NaCl) (Ron y Rosenberg, 2001).

Se conocen diferentes métodos para la detección de cepas productoras de biosurfactantes, Desai y Banat, (1997) distinguieron cuatro métodos rápidos: la prueba del colapso de la gota, la técnica de cromatografía en capa fina, métodos colorimétricos y la estimación del índice de emulsificación (*E-24*). Todos los métodos de detección de biosurfactantes dependen de la estructura química del biosurfactante.

Los biosurfactantes se clasifican en cuatro grupos dependiendo de su estructura química, y se detallan en la Tabla 2.6.1. Como se aprecia en la Tabla 2.6.1., se distinguen biosurfactantes de cuatro tipos: a) glicolípidos, b) lipopéptidos y proteínas, c) fosfolípidos y ácidos grasos y d) biosurfactantes poliméricos. Se conocen casos particulares de biosurfactantes como las vesículas y fimbrias en *A. calcoaceticus*. Además se aprecia que la mayor parte de los microorganismos producen glicolípidos (Desai y Banat, 1997).

Las funciones de los biosurfactantes dependen de su estructura química y se conocen dos mecanismos principales de acción: (i) modificar la hidrofobicidad celular, y (ii) promover la solubilización del sustrato, que incluye la pseudosolubilización y emulsificación (Bouchez-Naïtali y Vandecasteele, 2008; Vasileva-Tonkova *et al.*, 2008). La pseudosolubilización se refiere al incremento de la concentración de los hidrocarburos en la fase acuosa mediante la formación de micelas (rodeadas por una capa externa hidrofílica) sin llegar a la formación de emulsiones. Este mecanismo favorece la transferencia de los hidrocarburos a las células hidrofílicas (Bouchez-Naïtali y Vandecasteele, 2008). Por otra parte, la emulsificación consiste en el incremento del área superficial de la fase de los hidrocarburos mediante la formación de micelas hasta generar una emulsión, y es un mecanismo desarrollado por las células hidrofóbicas (Bouchez-Naïtali y Vandecasteele, 2008).

Tabla 2.6.1. Clasificación de los biosurfactantes en función de su estructura química y de los microorganismos que los producen.

Tipo de biosurfactantes	Microorganismo que lo produce
Glicolípidos	
Ramnolípidos	<i>P. aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas</i> sp.
Trehalolípidos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
	<i>Nocardia erythropolis</i>
	<i>Mycobacterium</i> sp.
Soforolípidos	<i>Torulopsis bombicola</i>
	<i>T. apicola</i>
	<i>T. petrophilum</i>
Celobiolípidos	<i>Ustilago zeaе, U. maydis</i>
Lipopéptidos y lipoproteínas	
Lipopéptidos	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>P. fluorescens</i>
Surfactina	<i>B. subtilis</i>
Gramicidina	<i>B. brevis</i>
Ácidos grasos y fosfolípidos	
Ácidos grasos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lípidos neutros	<i>N. erythropolis</i>
Fosfolípidos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Biosurfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carbohidratos-proteínas- lípidos	<i>P. fluorescens</i>
	<i>Debaryomyces polymorphis</i>

*Adaptada de Desai y Banat, 1996.

Los biosurfactantes que modifican la hidrofobicidad celular, se unen a la parte hidrofóbica de la capa externa de la superficie celular. En el caso de las bacterias Gram positivas, los biosurfactantes se unen a la pared celular y en las bacterias Gram negativas, los biosurfactantes se unen a la membrana externa (Neu, 1996).

Diversos estudios han demostrado que la modificación de la hidrofobicidad celular se debe a la presencia de los biosurfactantes, que en su mayoría son del tipo de los ramnolípidos (Al-Tahhan *et al.*, 2000; Hua *et al.*, 2003). Sin embargo, Bredholt *et al.*, (2002) observaron que los bioemulsificantes producidos por *Rhodococcus* sp. 094 eran los responsables de modificar su hidrofobicidad celular al emplear diferentes hidrocarburos. Por consiguiente, tanto biosurfactantes como bioemulsificantes pueden modificar la hidrofobicidad celular de las cepas.

Dentro de los estudios relacionados a la pseudosolubilización y emulsificación de los hidrocarburos, Goswami *et al.*, (1994) reportaron que *Pseudomonas cepacia* N1 produjo glicoproteínas específicas relacionadas con la pseudosolubilización del HXD; mientras la emulsificación del HXD estuvo relacionada con la actividad de las lipoproteínas. Más tarde, Bredholt *et al.*, (2002) demostraron que los bioemulsificantes responsables de las modificaciones en la hidrofobicidad celular de *Rhodococcus* sp. 094, también estuvieron involucrados en la emulsificación de diferentes constituyentes del petróleo. Recientemente, Bouchez-Naïtali *et al.*, (2008) evaluaron las capacidades de pseudosolubilización y emulsificación de los biosurfactantes producidos por *Pseudomonas aeruginosa* GL1 y *Rhodococcus equi* Ou2 al crecer en HXD, y concluyeron que el papel de los biosurfactantes dependió de la hidrofobicidad celular.

Por lo tanto, el estudio detallado de los modos de acción de los biosurfactantes puede ayudar a explicar su papel en la degradación de hidrocarburos; así como a definir los mecanismos de remoción de alcanos, tanto en cultivos bacterianos puros como en cultivos mixtos.

2.7. Mecanismos de remoción de alcanos

Las tasas de remoción de los hidrocarburos en medios acuosos son limitadas por su alta hidrofobicidad y baja solubilidad en agua, por ejemplo la solubilidad del hexadecano en agua a 25°C es de 9×10^{-4} mg/L (Abalos *et al.*, 2004). La remoción y utilización de sustratos hidrofóbicos requiere de adaptaciones fisiológicas específicas y las bacterias han desarrollado diferentes estrategias para la interacción con este tipo de compuestos. Particularmente, Bouchez-Naïtali *et al.*, (1999) estudiaron y seleccionaron las propiedades fisiológicas de diferentes bacterias para definir los mecanismos de remoción

de HXD. Los criterios fueron: la tensión superficial e interfacial, la hidrofobicidad, y la producción de biosurfactantes. Por lo tanto, para alcanos de cadena larga se han reportado dos mecanismos generales de remoción: (i) el contacto directo (también conocido como contacto interfacial), consiste en el contacto de las células con las gotas de hidrocarburos, y (ii) la remoción mediada por la producción de biosurfactantes, que tiene como objetivo incrementar la concentración de los hidrocarburos en la fase acuosa (Bouchez-Naïtali *et al.*, 2001; van Hamme y Ward, 2001).

Relacionado con el contacto directo, se han distinguido dos tipos de interacciones: la adhesión de las células con gotas muy pequeñas de hidrocarburos solubles, donde la remoción del sustrato generalmente es por difusión o por transporte activo (Naoyuki *et al.*, 2004). La segunda interacción, es la adhesión de células hidrofóbicas con gotas más grandes de hidrocarburos (Beal y Betts, 2000).

Diversos estudios se han centrado en la caracterización de los mecanismos de remoción de HXD por cultivos puros. Por ejemplo, Bouchez-Naïtali *et al.*, (1999), concluyeron que la remoción de HXD por contacto directo fue el mecanismo predominante en el 47% de las cepas evaluadas. En otro estudio, Noordman y Janssen, (2002) demostraron que los ramnolípidos estimularon la remoción de HXD por *Pseudomonas aeruginosa* UG2, indicando que la remoción mediada por biosurfactantes fue el mecanismo predominante. Por otra parte, Beal y Betts (2000) reportaron que tanto el contacto directo como la remoción mediada por biosurfactantes fueron evidentes en la remoción de HXD por *Pseudomonas aeruginosa* PG201. De manera similar, Vasileva-Tonkova *et al.*, (2008) reportaron que cerca del 67% de las cepas bacterianas evaluadas emplearon ambos mecanismos para la remoción de HXD.

En cuanto a estudios relacionados con la caracterización de los mecanismos de remoción de hidrocarburos por cultivos mixtos, Cavalca *et al.*, (2008) observaron cambios en la hidrofobicidad celular de dos cultivos mixtos y de sus aislados durante la degradación de fenantreno y HXD, sugiriendo que el contacto directo fue importante para la remoción de sustratos hidrofóbicos. Recientemente, Kaczorek *et al.*, (2008), demostraron que la modificación en la hidrofobicidad celular del cultivo mixto constituido por *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. dependió de la adición de ramnolípidos y saponinas, sugiriendo que tanto el contacto directo como la remoción mediada por biosurfactantes se desarrollaron. Por otra parte, Owsianiak *et al.*, (2009) reportaron que la efectividad en la remoción mediada por biosurfactantes en un cultivo mixto, depende de la especificidad de los microorganismos y no del tipo de biosurfactante, es decir, de las propiedades fisiológicas

y de las asociaciones poblacionales que se establecen entre los miembros de un cultivo mixto.

El uso de cultivos mixtos para la biodegradación de hidrocarburos es cada vez más frecuente. Sin embargo, la caracterización de los mecanismos de remoción en estos cultivos resulta difícil, debido a que se utilizan sistemas multiespecies. Por lo tanto, el estudio detallado de las capacidades metabólicas de cada uno de los integrantes del cultivo y la evaluación de las propiedades fisiológicas (hidrofobicidad celular y producción de biosurfactantes) de los aislados, podría ayudar a definir los mecanismos de remoción de hidrocarburos por cultivos mixtos.

2.8. Alcance del estudio

La biodegradación de hidrocarburos es un tema ampliamente estudiado, en la Base de datos: *ISI Web of Knowledge* se registraron 23 117 publicaciones en este tema desde 1982 hasta 2012. En la Tabla 2.8.1. se presenta un análisis de los trabajos publicados y citados relacionados con la degradación de hidrocarburos por cultivos puros y mixtos. Se muestran también los trabajos orientados a evaluar el papel de la hidrofobicidad celular y de los biosurfactantes en la degradación de hidrocarburos. En este análisis se incluye el índice h , es un factor que indica el número de publicaciones con respecto a un tema, citado el mismo número de veces. Como se muestra en la Tabla 2.8.1., se registra un gran número de publicaciones relacionadas con la degradación de hidrocarburos por cultivos puros (262) y mixtos (412). El empleo de cultivos mixtos ha sido creciente, y los trabajos han alcanzado el mayor número de citas en el 2011 (900 citas), lo que indica que es un tema relevante y actual. Uno de los retos en la degradación de hidrocarburos es la caracterización de los mecanismos de remoción empleando cultivos mixtos, ya que, desde hace más de 50 años se han estudiado estos mecanismos pero en cultivos puros. Cabe destacar que la investigación de los mecanismos de remoción se retomó en el 2008, alcanzando el mayor número de citas en el 2010. De igual forma, el tema de los biosurfactantes ha ganado interés en los últimos años, de aquí la importancia de identificar nuevas cepas bacterianas productoras de biosurfactantes.

En México se ha registrado un total de 159 publicaciones enfocadas a la degradación de hidrocarburos. Las primeras publicaciones datan desde 1995 y el mayor número de artículos publicados se alcanzó en el 2010. Cabe destacar que 3 de estas publicaciones incluyen la evaluación de los biosurfactantes, y 10 trabajos demuestran las ventajas de emplear cultivos mixtos para la degradación de hidrocarburos. La mayoría de estos

trabajos se han desarrollado en instituciones como la UNAM, UAM, Cinvestav-IPN, la Universidad Autónoma de Chihuahua y el IMP. Sin embargo, no se conocen trabajos relacionados a la caracterización de los mecanismos de remoción de hidrocarburos en México. De aquí la importancia de estudiar a detalle la degradación de hidrocarburos por cultivos mixtos considerando la hidrofobicidad celular, las actividades metabólicas de los cultivos y la capacidad para producir biosurfactantes.

Tabla 2.8.1. Análisis de los trabajos publicados y citados en los últimos 30 años relacionados con la degradación de hidrocarburos.

Palabra de búsqueda	Total de publicaciones	Total de citas	Año de la primera publicación	Año de mayor publicación	Año de mayor número de citas	Índice h
<i>Hydrocarbon degradation</i>	23 117					
<i>Hydrocarbon degradation AND pure cultures</i>	262	7811	1976	2004 (7 publicaciones)	2011 (800 citas)	47
<i>Hydrocarbon degradation AND mixed cultures</i>	412	9362	1976	2008 (8 publicaciones)	2010- 2011 (900 citas)	50
<i>Hydrocarbon degradation AND cell surface hydrophobicity</i>	91	1326	1995	2011 (12 publicaciones)	2011 (250 citas)	20
<i>Hydrocarbon degradation AND biosurfactants</i>	295	5859	1984	2011 (24 publicaciones)	2010- 2011 (900 citas)	43
<i>Mechanisms of hexadecane uptake</i>	25	671	1986	2008 (3 publicaciones)	2010 (100 citas)	11
<i>Hydrocarbon degradation AND Mexico</i>	159	1591	1995	2010 (9 publicaciones)	2010- 2011 (250 citas)	21

3. JUSTIFICACIÓN

La remediación de sitios contaminados con hidrocarburos es de gran interés en México por ser un país con actividad petrolera. Los derrames de petróleo son frecuentes durante la extracción, procesamiento y transporte. Ante esto, la biorremediación se constituye como una alternativa viable aceptada a nivel mundial. El empleo de cultivos mixtos bacterianos ofrece varias ventajas en comparación con los cultivos puros, debido a que coexisten diferentes capacidades metabólicas. Por tal motivo, el interés por diseñar y obtener consorcios bacterianos con potencial degradador es cada vez mayor.

Las cepas bacterianas emplean diferentes estrategias para la degradación de hidrocarburos dada su naturaleza hidrofóbica, tales como: la producción de biosurfactantes y la modificación en sus propiedades de superficie. Inclusive estas estrategias pueden cambiar en presencia de otras cepas bacterianas. En el caso de los cultivos puros, las enzimas involucradas en la oxidación de los hidrocarburos, las propiedades de superficie (hidrofobicidad celular) y los mecanismos de remoción de hidrocarburos se han estudiado a detalle. Sin embargo, los estudios enfocados a evaluar los factores que intervienen en la degradación de hidrocarburos por cultivos mixtos son escasos. La mayoría de los trabajos se enfocan a diseñar cultivos mixtos y evaluar su capacidad de degradación, sin caracterizar las capacidades individuales de los miembros y estudiar los mecanismos de remoción que utiliza el conjunto de microorganismos. Esto ha ocasionado que el diseño de los cultivos mixtos, empleados para la biorremediación, no siempre sea eficiente.

Por lo tanto, el conocimiento de la capacidad de degradación de hidrocarburos y las propiedades fisiológicas de los cultivos puede ayudar a seleccionar cultivos mixtos eficientes y utilizarlos en la biorremediación de sitios contaminados.

4. HIPÓTESIS

Los cambios en la hidrofobicidad celular, la producción y actividad de los biosurfactantes determinan las diferencias en los mecanismos de remoción de hexadecano empleados por los cultivos puros y mixtos.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los mecanismos de remoción de hexadecano empleados por los cultivos puros y mixtos, derivados de un consorcio bacteriano, durante la degradación de hexadecano.

Objetivos particulares

- Identificar las cepas que integran el consorcio bacteriano mediante la secuenciación del gen ribosomal RNAr 16S.
- Evaluar la degradación de HXD por cultivos puros y mixtos derivados de un consorcio bacteriano.
- Identificar diferentes genotipos del gen *alk* en los cultivos puros derivados del consorcio bacteriano.
- Identificar las cepas productoras de biosurfactantes y evaluar la capacidad de los biosurfactantes para pseudosolubilizar y emulsificar HXD.
- Evaluar los cambios en la hidrofobicidad celular de los cultivos puros y mixtos durante la degradación de HXD.
- Determinar los mecanismos de remoción de HXD en los cultivos puros y mixtos.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El trabajo experimental comenzó con el aislamiento de las cepas bacterianas a partir del muestreo de un biorreactor de columna de burbujas, inoculado con una suspensión bacteriana aislada de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam. Posteriormente, se realizó la identificación bacteriana mediante la secuenciación del gen RNAr 16S.

Como parte de los objetivos particulares de este proyecto, se evaluó la degradación de HXD tanto de los cultivos puros como mixtos y se generó un conjunto de cinéticas de degradación de HXD y crecimiento bacteriano. En el caso de los cultivos puros, se identificaron los genes catabólicos *alkB* y *alkM*. Además, se emplearon diferentes métodos para detectar y cuantificar los biosurfactantes producidos.

Con base en los resultados obtenidos de los cultivos puros y mixtos, se evaluaron las propiedades fisiológicas de los cultivos considerando: los cambios en la hidrofobicidad celular y la capacidad de los biosurfactantes para pseudosolubilizar y emulsificar HXD. Finalmente, se determinaron y compararon los mecanismos de remoción de HXD entre los cultivos puros y mixtos.

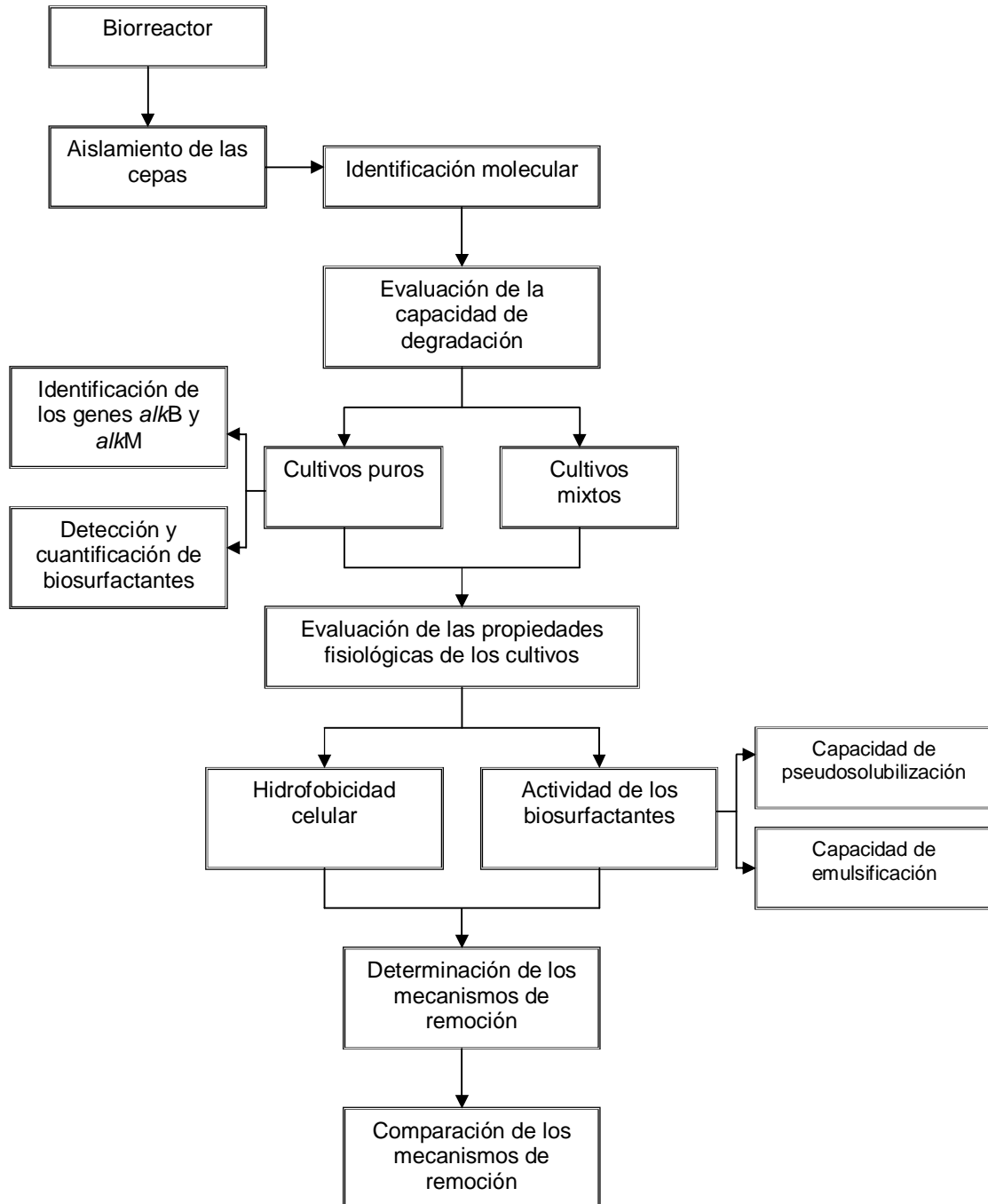


Figura 6.1. Estrategia experimental global para el desarrollo de la tesis.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Medios de cultivo

Para el aislamiento y propagación de las cepas bacterianas se empleó agar soya tripticaseína (AST, Bioxon) y caldo nutritivo (CN, Bioxon). Los estudios de degradación de HXD se llevaron a cabo empleando medio mineral salino (MMS) descrito por Lizardi, (2007). Los componentes del medio fueron (en g/L): NaNO₃, 6.75; K₂HPO₄, 2.15; KCl, 1.13; MgSO₄ ·7H₂O, 1.10; HXD, 13 (HXD grado reactivo 99% Sigma Aldrich) y agua destilada estéril. El pH inicial fue ajustado a 6.5 con una solución de HCl 1N. Los medios fueron esterilizados en una autoclave a 121°C durante 15 min.

7.2. Aislamiento de las cepas bacterianas

Se tomaron muestras (10 mL) de un biorreactor de columna (1.0 L) operado en ciclos secuenciales de 14 días con HXD como única fuente de carbono y energía (Quijano *et al.*, 2010). El biorreactor fue inoculado inicialmente con una suspensión bacteriana aislada de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam, una planta nativa capaz de crecer en un pantano contaminado con residuos petroleros (270 000 ppm de hidrocarburos totales del petróleo) cerca de una refinería en operación en el sur del Estado de Veracruz, México (Gallegos-Martínez *et al.*, 2000). Las muestras del biorreactor se diluyeron empleando solución salina al 0.85%. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 100 µL y se sembraron en cajas de Petri con medio AST. Las cajas se incubaron a 30°C y se observó el crecimiento bacteriano después de 48 h. Las colonias con morfología diferente fueron resembradas para obtener las cepas puras. Se obtuvieron cuatro cepas bacterianas y se depositaron en la colección de cultivos microbianos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, ENCB-IPN WDCM449.

7.3. Identificación molecular de las cepas bacterianas

7.3.1. Extracción de DNA

Las cepas bacterianas aisladas se sembraron de manera independiente en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL del medio CN. Los cultivos se incubaron (30°C; 200 rpm; 48 h) en un agitador cerrado rotatorio (Shaker Series I 26; New Brunswick Scientific Co. NY, USA). El DNA se extrajo con el kit comercial Wizard (Promega, Madison, WI, USA). El DNA aislado se resuspendió en buffer TE (Tris-HCl [10 mM] y EDTA [1 mM], pH

8.0) y se conservó a -20°C hasta su uso. Los extractos de DNA se visualizaron en geles de agarosa.

7.3.2. Amplificaciones por PCR y DGGE

Con el objetivo de analizar las diferencias en los operones *rrn* y confirmar que las cuatro cepas eran diferentes, se realizó la amplificación de la región V6-V8 del gen RNAr 16S (470 pb) utilizando el método y las condiciones descritas por Ramírez-Saad *et al.*, (2000). Los productos se visualizaron por DGGE basándose en el procedimiento de Muyzer *et al.*, (1996); mientras que la tinción y la conservación del gel fue realizada de acuerdo a las técnicas de Sanguinetti *et al.*, (1994). Posteriormente, se realizó la amplificación casi completa del gen RNAr 16S (aproximadamente 1450 pb) utilizando los *primers* y condiciones descritas por Ramírez-Saad *et al.*, (2000). Los productos seleccionados para secuenciación se purificaron con el kit comercial System Montage SEQ Cleanup (Millipore Corp, Billerica, MA, USA).

7.3.3. Análisis de secuencias

Los productos del gen RNAr 16S fueron secuenciados por servicios externos (Macrogen Inc., Korea) y las secuencias se analizaron con las siguientes herramientas bioinformáticas: (i) *Identify tool* del *Ez Taxon Server*, versión 2.1 (Chun *et al.*, 2007); (ii) *Classifier tool* del Ribosomal Database Project-II Release 9 (Cole *et al.*, 2009). Posteriormente, para buscar las similitudes de las secuencias se utilizó el programa Mega versión 2.1 (Kumar *et al.*, 2008). Finalmente, las secuencias se registraron en el GenBank.

7.4. Cinéticas de degradación por cultivos puros y mixtos

Los estudios de degradación se desarrollaron en botellas serológicas de 125 mL con 50 mL de MMS inoculadas con volúmenes variables de los cultivos puros (previamente cultivadas en CN) para obtener una concentración inicial de 1×10^6 UFC/mL. Los preinóculos se sembraron en el medio CN debido a que una de las cepas no fue capaz de crecer en HXD como única fuente de carbono y energía. Se diseñaron cultivos mixtos de dos, tres o cuatro cepas en las siguientes proporciones: 1:1, 1:1:1 o 1:1:1:1, y se mezclaron los volúmenes de los preinóculos (20-30 μ L de cada cultivo) para obtener una concentración total inicial de 1×10^6 UFC/mL. Los cultivos puros y mixtos se incubaron en

un agitador rotatorio (30°C; 200 rpm; 15 días) y se tomaron muestras a los 0, 2, 5, 10 y 15 días. En todas las muestras se determinó el crecimiento celular, la concentración de HXD, la hidrofobicidad celular, la capacidad de pseudosolubilización y emulsificación. Los análisis se realizaron por triplicado y se emplearon botellas serológicas sin inóculo como controles negativos.

7.5. Identificación de genes catabólicos

7.5.1. Gen *alkB*

La extracción del DNA de los cultivos bacterianos y de *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 (empleada como control positivo) se realizó bajo las condiciones descritas en la sección 7.3.1. En seguida, se realizó la amplificación del gen *alkB* por PCR, el volumen de la reacción fue de 25 µL y se utilizaron los *primers* y las condiciones descritas por Vomberg y Klinner, (2000). En la Tabla 7.5.1.1 se muestran los componentes de la reacción de PCR y en la Tabla 7.5.1.2 las condiciones para obtener un producto de amplificación de 870 pb.

Los extractos de DNA y productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1%, la electroforesis se desarrolló a 90V durante 1.5 h. Posteriormente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 µg/mL) y se visualizaron en un fotodocumentador a 254 nm (Mod. UVP Bioluminescence Systems).

Tabla 7.5.1.1. Componentes de la reacción de PCR para amplificar el gen *alkB*.

Componente	Volumen
PCR Master Mix 2X (50 U/mL Taq DNA polimerasa 100 µM de cada dNTP's 3 mM MgCl ₂)	12.5 µL
<i>Primer forward alkB2-1e</i> (10 µM)*	1.54 µL
<i>Primer reverse alkB-ri</i> (10 µM)**	1.74 µL
DNA molde	1- 2 µL
Agua libre de nucleadas	Ajustar a 25 µL

Secuencias de los *primers*:

**alkB2-1e* 5'- TGG CCG GCT ACT CCG ATG ATC GGA ATC TGG - 3'

***alkB2-ri* 5'- CGC GTC CTG ATC CGA GTG CCG CTG AAG GTG - 3'

Tabla 7.5.1.2. Condiciones para la amplificación del gen *alkB* por PCR.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
Desnaturalización inicial	94°C	1 min	1
Desnaturalización	94°C	1 min	30
Alineamiento	50°C	1 min	
Extensión	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

7.5.2. Estabilidad del gen *alkB*

La evaluación de la presencia y estabilidad del gen *alkB* a lo largo de varias generaciones de los cultivos bacterianos fue realizada en nuestro laboratorio por Miton, (2008). En la Figura 7.5.2.1 se muestra, de manera esquemática, las diferentes etapas que se utilizaron en estos experimentos. Los cultivos bacterianos se sembraron en cajas de Petri con el medio AST, después se extrajo el DNA de la primera generación y se realizó la amplificación del gen *alkB*. Posteriormente, los cultivos fueron sembrados varias ocasiones hasta obtener quince generaciones en cajas con medio AST, se repitió la extracción y la amplificación del gen *alkB* en cada una de las generaciones.

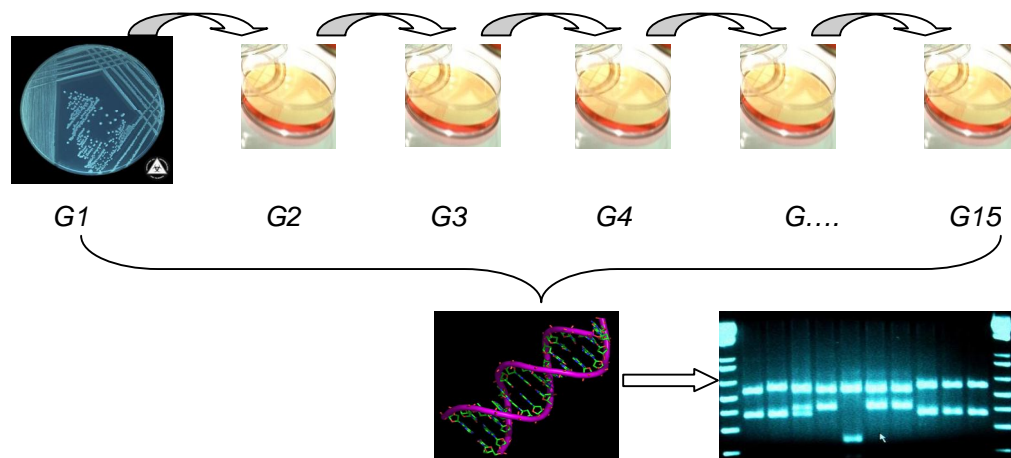


Figura 7.5.2.1. Esquema de trabajo para determinar la estabilidad del gen *alkB* en quince generaciones de los cultivos bacterianos creciendo en AST.

7.5.3. Gen *alkM*

La amplificación del gen *alkM* se desarrolló por PCR utilizando como DNA molde los extractos de los cultivos bacterianos. El volumen de la reacción fue de 25 μL y se diseñaron *primers* degenerados, basándose en la secuencia de los genes *alkM* de cepas del género *Acinetobacter*. En la Tabla 7.5.3.1 se muestran los componentes de la reacción de PCR y en la Tabla 7.5.3.2 las condiciones para obtener un producto de amplificación de 900 pb.

Los extractos de DNA y productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1%, la electroforesis se desarrolló a 110V durante 20 min. Posteriormente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se visualizaron en un fotodocumentador a 254 nm (Kodak EDAS 290, Mod. MEB-20).

Tabla 7.5.3.1. Componentes de la reacción de PCR para amplificar el gen *alkM*.

Componente	Volumen
Agua mili Q	18.3 μL
Buffer 10X (contiene MgCl_2)	2.5 μL
dNTP's (10mM de cada dNTP)	1 μL
Primer forward <i>alkM</i> -2	1 μL
Primer reverse <i>alkM</i> - 1r	1 μL
Taq DNA polimerasa	0.2 μL
DNA molde	1 μL

Tabla 7.5.3.2. Condiciones para la amplificación del gen *alkM* por PCR.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
Desnaturalización inicial	94°C	10 min	1
Desnaturalización	94°C	1 min	35
Alineamiento	54, 58°C	1 min	
Extensión	72°C	1 min	1
Extensión final	72°C	7 min	

7.6. Pruebas para la detección y cuantificación de biosurfactantes

7.6.1. Tensión superficial

La tensión superficial de los cultivos se determinó con un tensiómetro de burbuja (SensaDyne; Chem-Dyne Research Corporation; Arizona, USA) a una temperatura constante de 25°C y se emplearon como fluidos de referencia agua destilada y etanol.

7.6.2. Colapso de la gota

Una técnica cualitativa para determinar la presencia de biosurfactantes fue el colapso de la gota y se determinó mediante el método de Bodour y Miller-Maier, (1998) con las siguientes modificaciones: en una placa de poliestireno (12.7 x 8 cm) con 96 micropocillos (8 mm de diámetro) se aplicó una fina capa de aceite lubricante 15W-40 (10 µL por micropocillo). La placa se colocó a temperatura ambiente durante 24 h; transcurrido el tiempo se colocaron 10 µL de los cultivos bacterianos en cada uno de los micropocillos. La presencia de biosurfactantes fue positiva cuando se observó la dispersión de la gota en el micropocillo, y negativo cuando la gota quedó intacta. Se utilizó como testigo negativo la gota de agua destilada.

7.6.3. Desplazamiento del petróleo

La concentración de biosurfactantes en los caldos de cultivo se cuantificó de acuerdo al método descrito por Morikawa *et al.*, (2000) con las siguientes modificaciones: se adicionaron 25 µL de petróleo crudo Maya (cortesía del Instituto Mexicano del Petróleo) a una caja Petri con 25 mL de agua destilada, para formar una fina capa de petróleo. Posteriormente, se agregaron 10 µL del cultivo sobre la superficie de petróleo. La actividad de los biosurfactantes fue determinada como el área de petróleo desplazada y se correlacionó con la concentración de biosurfactantes empleando el surfactante químico Tween 20 (Hycel, México). Se preparó una curva estándar de Tween 20 en un rango de concentraciones de 0.03 a 0.66 g/L, todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

7.7. Métodos analíticos

7.7.1. Crecimiento bacteriano

Se realizaron cuentas viables de cada una de las muestras empleando cajas Petri con AST. Las cajas se incubaron a 30°C y el conteo de las colonias se realizó después de 48 h. El crecimiento bacteriano se expresó como unidades formadoras de colonia (UFC).

7.7.2. Concentración de hexadecano

Las muestras de los cultivos puros y mixtos se centrifugaron en tubos Corex a 8 000 rpm durante 30 min (Eppendorf; Centrifuge 5810 R; Hamburgo, Alemania). Posteriormente, se realizó una extracción líquido-líquido de los sobrenadantes (35 mL) con una mezcla de hexano-acetona (1:1 v/v) en embudos de separación. La mezcla hexano-acetona fue utilizada porque se obtuvieron eficiencias de extracción del 98%. La extracción se desarrolló empleando una proporción sobrenadante-muestra 1:1 (v/v). Los embudos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 min hasta la separación visible de las fases (acuosa y orgánica). El HXD recuperado fue cuantificado por cromatografía de gases (Varian; Star 3900 GC; California, USA) empleando un detector de ionización de flama y una columna AT-1HT (15 m x 0.25 mm x 0.10 µm, Alltech Heliflex, Illinois, USA). Se empleó helio como gas acarreador (30 mL/min; 40 psi). El horno fue calentado a 120 °C (30 °C min⁻¹) y después se alcanzó una temperatura de 150°C (10°C min⁻¹) y 170°C (15°C min⁻¹), el volumen de inyección fue de 2 µL.

7.7.3. Hidrofobicidad celular

La hidrofobicidad celular fue definida como la adherencia bacteriana al HXD y fue determinada de acuerdo al método de Bouchez-Naïtali *et al.*, (1999) con las siguientes modificaciones: se tomaron 1.5 mL del cultivo bacteriano y se centrifugaron en tubos Eppendorf (8 000 rpm; 30 min). El *pellet* celular se lavó dos veces con un buffer de fosfatos 1M pH 7 para obtener una suspensión celular y se ajustó la DO_{600nm} a 0.5 (Varian; Cary 50 Con UV-Vis; Santa Clara, CA, USA). Posteriormente, se mezclaron 75 µL de HXD con 1.5 mL de la suspensión celular, se agitó en un vórtex durante 3 min y se

dejó reposar hasta la separación de las fases. Finalmente, se midió la DO_{600nm} de la fase acuosa y la hidrofobicidad celular fue expresada como el porcentaje de adherencia al HXD. Las células se consideraron hidrofílicas cuando la adherencia fue menor al 10%, e hidrofóbicas con una adherencia mayor al 60% (Bouchez-Naïtali *et al.* 1999).

7.7.4. Capacidad de pseudosolubilización

La capacidad de los biosurfactantes para pseudosolubilizar HXD en la fase acuosa se determinó por el método de Bouchez-Naïtali y Vandecasteele, (2008) con las siguientes modificaciones: se mezcló 1 mL de HXD con 10 mL de sobrenadante libre de células y se agitó a una velocidad constante de 200 rpm durante 24 h a 30°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron (8 000 rpm, 3 h) y las fases acuosas se filtraron dos veces (0.22 μ m Nalgene filters). Las fases acuosas fueron extraídas con una mezcla de hexano-acetona (1:1 v/v) y la concentración de HXD pseudosoluble se determinó por cromatografía de gases con las condiciones previamente descritas.

7.7.5. Capacidad de emulsificación

La capacidad de los biosurfactantes para emulsificar HXD se determinó por el método de Bouchez-Naïtali y Vandecasteele, (2008) con las siguientes modificaciones: 1 mL de sobrenadante libre de células se mezcló con 200 μ L de HXD, se agitó en un vórtex durante 2 min y se midió la $DO_{600 nm}$ a las 2 y 24 h.

7.8. Análisis estadísticos

Se realizó el análisis de varianza de los datos empleando un ANOVA de un solo factor ($\alpha \leq 0.5$). Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS Inc.; IBM Company; Chicago, IL, USA), y los resultados se expresaron como la media de tres réplicas y su correspondiente desviación estándar.

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1. Aislamiento de las cepas bacterianas

Se aislaron cuatro cepas bacterianas de un biorreactor operado en ciclos secuenciales, con HXD como única fuente de carbono. En la Figura 8.1.1, se muestran las características macroscópicas y microscópicas de cada cepa aislada. Con base en los resultados de la tinción de Gram, se observó que las cuatro cepas fueron bacilos Gram negativos. Cabe destacar que la cepa UAM58 se caracterizó por formar colonias amarillas translúcidas, mientras que la cepa UAM25 formó colonias blancas y viscosas. Las colonias anaranjadas translúcidas correspondieron a la cepa UAM38 y las colonias cremosas a la cepa UAM86.

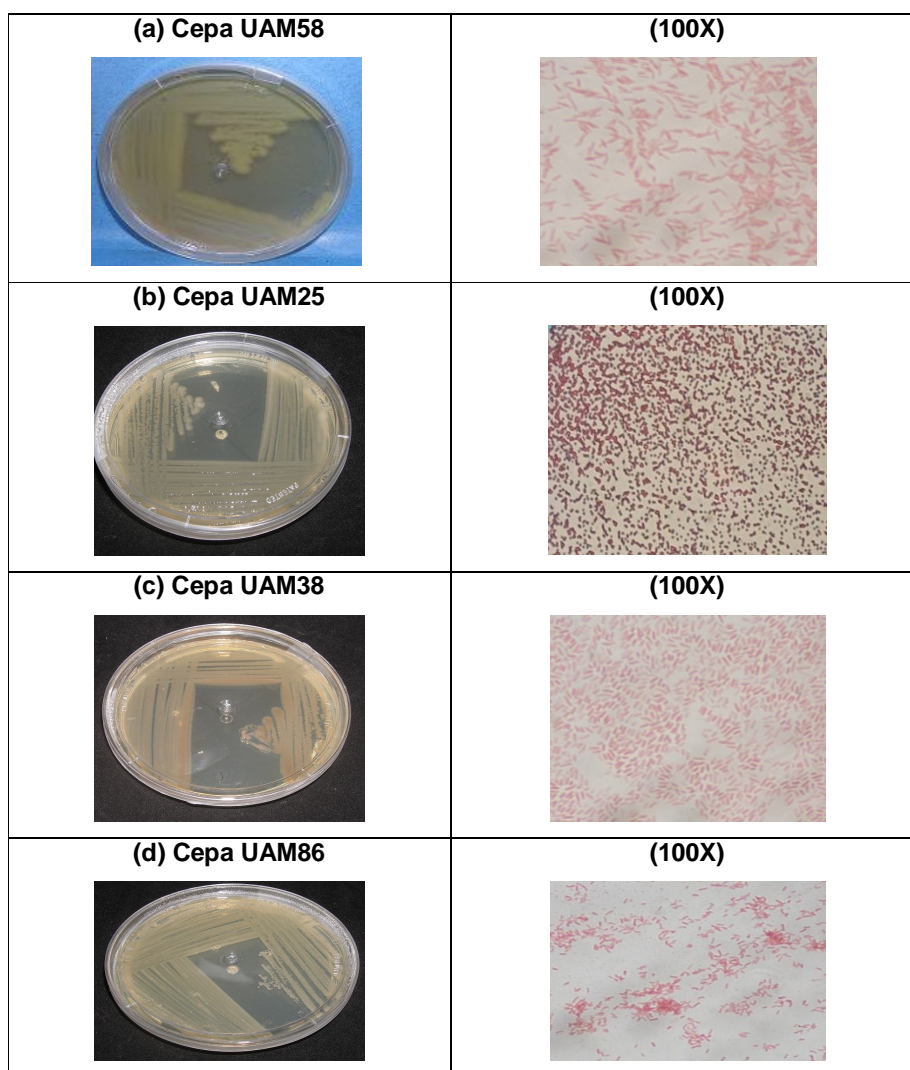


Figura 8.1.1. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas bacterianas aisladas. **(a)** Cepa UAM58; **(b)** Cepa UAM25; **(c)** Cepa UAM38; **(d)** Cepa UAM86.

8.2. Identificación molecular de las cepas bacterianas

La comparación de las secuencias de los genes ribosomales RNAr 16S permite establecer las relaciones filogenéticas entre los organismos procariotes. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en la taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (Rodicio y Mendoza, 2004). El RNAr ribosomal es altamente conservado, pero contiene variaciones que se concentran en zonas específicas. Las regiones variables del RNAr se encuentran de la región V1 a la región V9 (Rodicio y Mendoza, 2004).

Con el propósito de verificar que las cuatro cepas fueran diferentes se amplificó la región variable V6-V8 del gen RNAr 16S (Figura 8.2.1.) y se analizó el patrón de corrimiento de los amplicones en DGGE. En la Figura 8.2.2, se muestran los perfiles de DGGE para cada una de las cepas y se observó un patrón de corrimiento diferente para cada una de las cepas indicando la variabilidad entre ellas.

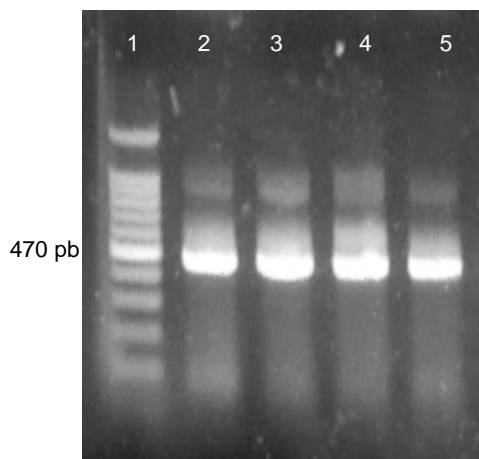


Figura 8.2.1. Amplificación de la región variable V6-V8 del gen RNAr 16S. Carriles: 1. Marcador de peso molecular (100 pb ladder); 2. Cepa UAM58; 3. Cepa UAM25; 4. Cepa UAM38; 5. Cepa UAM86.

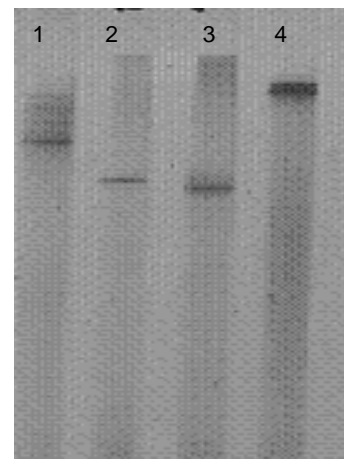


Figura 8.2.2. Patrones de corrimiento de la región V6-V8 del gen RNAr 16S en DGGE. Carriles: 1. Cepa UAM58; 2. Cepa UAM25; 3. Cepa UAM38; 4. Cepa UAM86.

Con el objetivo de asignar el género y especie a las cepas bacterianas, se realizó el análisis de las secuencias del gen RNAr 16S (ver Anexo 1) basándose en la propuesta de Roselló-Mora y Amman, (2001). Esta propuesta indica que para poder asignar el género, el porcentaje de similitud entre la secuencia de entrada y la secuencia más cercana debe ser mayor al 95%; mientras que para asignar la especie debe ser mayor al 97.5%. Como resultado, se identificaron dos cepas a nivel de especie y dos a nivel de género (Tabla

8.2.1). De acuerdo a la clasificación bacteriana, las cuatro cepas pertenecen a las Proteobacterias; tres de ellas son de la clase de las Gammaproteobacterias (*Xanthomonas* sp., *Acinetobacter bouvetii* y *Shewanella* sp.); mientras *Defluviobacter lusatiensis* es una Alfabroteobacteria.

Tabla 8.2.1. Identificación de las cepas bacterianas mediante la secuenciación del gen RNAr 16S.

Cultivo	Número de colección WDCM449	Número de acceso al GenBank	Longitud (pb)	Secuencia con mayor similitud	Similitud (%)
<i>Xanthomonas</i> sp. cepa UAM58	<u>ENCB-MG-075</u>	<u>HQ424444</u>	1458	<i>X. pisi</i> (<u>Y10758</u>)	97.3
<i>Acinetobacter bouvetii</i> cepa UAM25	<u>ENCB-MG-076</u>	<u>HQ424441</u>	1425	<i>A. bouvetii</i> (<u>AF509827</u>)	99.1
<i>Shewanella</i> sp. cepa UAM38	<u>ENCB-MG-077</u>	<u>HQ424443</u>	1438	<i>S. putrefaciens</i> (<u>X81623</u>)	97.2
<i>Defluviobacter lusatiensis</i> cepa UAM86	<u>ENCB-MG-078</u>	<u>HQ424442</u>	1386	<i>D. lusatiensis</i> (<u>AJ132378</u>)	99.8

8.3. Degradación de hexadecano por cultivos puros

Con el objetivo de determinar la capacidad de las cepas bacterianas para degradar HXD y entender su papel dentro del consorcio bacteriano, se evaluó el consumo de HXD por cada uno de los cultivos puros. Como se muestra en la Figura 8.3.1a, se observó una rápida disminución en la concentración de HXD por *Xanthomonas* sp. y *D. lusatiensis* durante los primeros 2 días de cultivo. Sin embargo, después de los 5 días no se observaron diferencias significativas en el consumo. En el caso de *A. bouvetii*, se observó una remoción constante de HXD entre los 5 y 10 días alcanzando una concentración mínima de HXD (4 ± 0.4 g/L) al finalizar el tiempo de cultivo. Por el contrario, *Shewanella* sp. no fue capaz de degradar HXD. Al finalizar los 15 días de cultivo, la eficiencia más alta de degradación de HXD se observó con *A. bouvetii* ($72 \pm 4\%$) seguida de *Xanthomonas* sp. ($46 \pm 4\%$) y *D. lusatiensis* ($40 \pm 6\%$). En la Figura 8.3.1b, se muestran los perfiles de crecimiento para las tres cepas que degradaron HXD, como se observa el crecimiento de *A. bouvetii* fue significativamente mayor en comparación con el resto de las cepas ($1.3 \pm 0.04 \times 10^9$ UFC/mL). En el caso particular de *Xanthomonas* sp. y

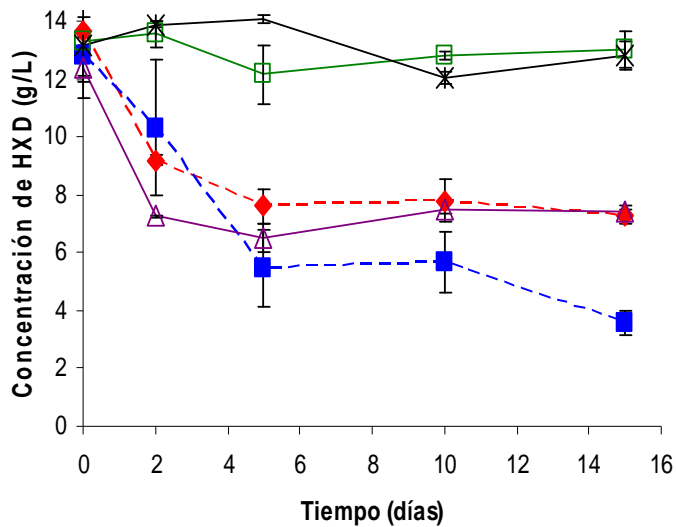
D.lusatiensis se observó una fase de muerte después de los 10 días. En todos los cultivos se observó que tanto el consumo de HXD como el crecimiento se detuvieron a los 5 días, probablemente por la baja biodisponibilidad del HXD en la fase acuosa. En estudios previos empleando el mismo consorcio bacteriano, Quijano (2006) en matraces y en biorreactor de columna de burbujas, demostró que el HXD fue el sustrato limitante como consecuencia de su baja biodisponibilidad. En estudios recientes, Lizardi-Jiménez *et al.*, (2012) evaluaron simultáneamente las tasas de transferencia de oxígeno y HXD a lo largo del tiempo de cultivo en un biorreactor *airlift*, concluyendo que la transferencia del HXD a la fase acuosa fue la limitante. Por lo tanto, las diferencias observadas en el consumo de HXD y la producción de biomasa entre los diferentes cultivos puros evaluados podrían explicarse principalmente por la limitación en la biodisponibilidad del sustrato.

Con base en nuestros resultados *Xanthomonas* sp., *A. bouvetii* y *D.lusatiensis* fueron capaces de utilizar HXD como única fuente de carbono y energía, mientras que *Shewanella* sp. no fue capaz. En comparación con lo reportado para las especies de estos géneros, *Xanthomonas campestris* M12 es capaz de crecer en alcanos con una longitud de cadena de 8 a 16 átomos de carbono (Soon-Young *et al.*, 1994). Asimismo, se han reportado cepas del género *Xanthomonas* como las principales degradadoras de hidrocarburos en suelos contaminados en concentraciones mayores a 200 ppm (Li *et al.*, 2000). Por otra parte, las cepas del género *Acinetobacter* son capaces de degradar diferentes tipos de alcanos en un rango de 10 a 40 átomos de carbono como es el caso de *Acinetobacter* sp. DSM 17874 (Throne-Holst *et al.*, 2007). Sin embargo, la capacidad de degradación de HXD por las cepas del género *Shewanella* es muy bajo, menor al 2% (Gerdes *et al.*, 2005). Por el contrario, *D. lusatiensis* sólo se ha reportado como una cepa degradadora de clorofenol (Fritsche *et al.* 1999) y no hay trabajos relacionados con la degradación de hidrocarburos. De esta manera nuestro trabajo resalta la capacidad de *D. lusatiensis* para degradar HXD. En el caso de *A. bouvetii*, el grupo de la Dra. Emma L. Carr (Carr *et al.*, 2003) en Australia la aislaron por primera vez de muestras de lodos activados generados en plantas de tratamiento de aguas en Victoria, Australia, y la identificaron mediante la secuenciación del RNAr 16S. Es importante mencionar que *A. bouvetii* nunca ha sido reportada como una cepa degradadora de hidrocarburos pero en nuestro trabajo observamos que fue la cepa con una alta eficiencia de degradación, lo que la revela como una cepa con un gran potencial biotecnológico.

Para comprender las capacidades metabólicas de cada uno de los cultivos puros evaluados, sería interesante identificar los sistemas enzimáticos involucrados en la

oxidación del HXD y los mecanismos de remoción empleados para sustratos hidrofóbicos.

(a)



(b)

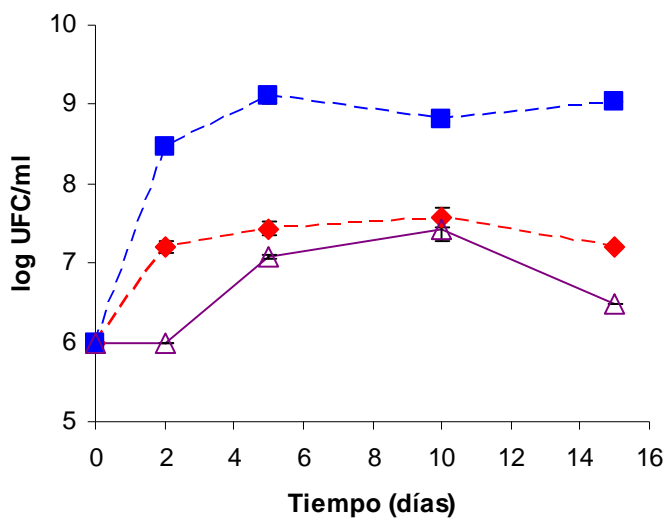


Figura 8.3.1. Cinéticas de los cultivos puros durante la degradación de HXD: **(a)** concentración de HXD, **(b)** crecimiento bacteriano. Cultivos: *Xanthomonas* sp., (-*-♦-*) ; *A. bouvetii*, (-*-■-*) ; *Shewanella* sp., (-□-) ; *D. lusatiensis*, (-△-) ; control abiótico, (-*-).

8.4. Identificación de genes catabólicos

Con el propósito de conocer los fragmentos de DNA que codifican para las enzimas que intervienen en la degradación de HXD, se realizó la identificación de los genes *alkB* y *alkM* en los cultivos puros. En la Figura 8.4.1, se muestra el gel correspondiente a la identificación del gen *alkB* en las cuatro cepas y en el control positivo *P. oleovorans*. Como resultado, sólo se observó un amplicón de 870 pb en *P. oleovorans* y en *Xanthomonas* sp. Al realizar la secuenciación de los amplicones correspondientes a *alkB*, sólo se obtuvo un fragmento de 435 pb con una similitud del 93% con el gen *alkB* en *Xanthomonas campestris* pv ATCC 33913. Estos resultados sugieren la presencia de la alcano monooxigenasa en *Xanthomonas* sp. con lo que se podría explicar su capacidad para degradar HXD.

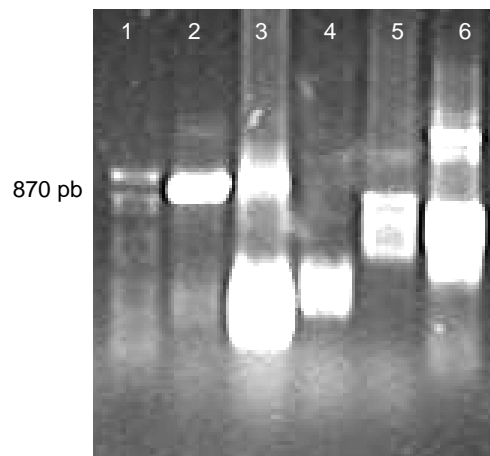


Figura 8.4.1. Amplificación del gen *alkB* en las cepas bacterianas. Carriles: **1.** Marcador de peso molecular (100 pb ladder); **2.** *P. oleovorans* ATCC 29347; **3.** *Xanthomonas* sp.; **4.** *A. bouvetii*; **5.** *Shewanella* sp.; **6.** *D. lusatiensis*.

La alcano monooxigenasa unida a la membrana se identificó por primera vez en *P. oleovorans* (Baptist *et al.*, 1963; van Beilen *et al.*, 1994) pero después la cepa se renombró como *Pseudomonas putida* (van Beilen *et al.*, 2001). La mayoría de los genes que codifican para las enzimas que interviene en la degradación de alcanos en especies de *Pseudomonas*, se encuentran en plásmidos y no forman parte del cromosoma. Por ejemplo, Lee *et al.*, (1996) estudiaron a detalle los genes *alk* que se encuentran organizados en el plásmido OCT en *Pseudomonas maltophilia*, también conocida como

Xanthomonas maltophilia. Posteriormente, Wheelis, (1975) reportaron que el plásmido OCT es inestable y puede perderse después de varias generaciones.

Con el objetivo de analizar la estabilidad del gen *alkB* en *Xanthomonas* sp., se monitoreó la presencia del gen: (i) a lo largo de quince generaciones de *Xanthomonas* sp. creciendo en cajas Petri con AST y (ii) después de seis meses. En la Figura 8.4.2, se muestra la presencia del gen *alkB* a lo largo de las quince generaciones de *Xanthomonas* sp. creciendo en AST pero la amplificación fue inespecífica. Sin embargo, después de seis meses no se observó la amplificación de la banda esperada (Figura 8.4.3.). Nuestros resultados sugieren que el gen *alkB* observado en *Xanthomonas* sp., se encontraba en un plásmido y se perdió después de seis meses de mantenerlo en crecimiento y resiembra en AST. Para determinar si la cepa de *Xanthomonas* sp. conservaba su capacidad para degradar HXD, se realizaron cinéticas de degradación y se observó que *Xanthomonas* sp. fue capaz de degradar HXD. Estos resultados sugieren que *Xanthomonas* sp. probablemente posee otro sistema enzimático que interviene en la oxidación del HXD y para identificarlo es necesario realizar un análisis de los genes que codifican para la oxidación inicial de alcanos particularmente en el género *Xanthomonas*, ya que, los *primers* utilizados para identificar *alkB* se derivaron de *Pseudomonas oleovorans*.

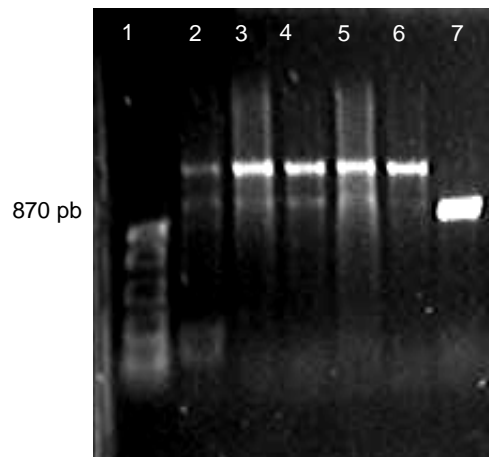


Figura 8.4.2. Amplificación del gen *alkB* a lo largo de quince generaciones (G) de *Xanthomonas* sp. creciendo en medio AST. Carriles: 1. Marcador de peso molecular (100 pb ladder); 2. G3; 3. G7; 4. G11; 5. G13; 6. G15; 7. *P. oleovorans*.

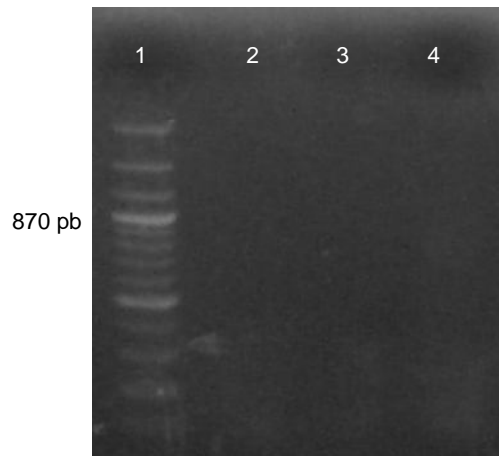


Figura 8.4.3. Amplificación del gen *alkB* en las cepas del consorcio después de seis meses de crecer en AST. Carriles: **1.** Marcador de peso molecular (100 pb ladder); **2.** *Xanthomonas* sp.; **3.** *A. bouvetii*; **4.** *D. lusatiensis*.

Con base en los problemas experimentales observados durante la identificación de *alkB* en *Xanthomonas* sp., se realizó la identificación de genes homólogos como *alkM* utilizando *primers* degenerados. Los *primers* se diseñaron basándose en las secuencias de los genes *alkM* de cepas del género *Acinetobacter*, ya que, en nuestro trabajo se observó que la eficiencia de degradación de HXD en *A. bouvetii* fue significativamente mayor en comparación con el resto de los cultivos mixtos. Los *primers* se diseñaron realizando un alineamiento de las secuencias con la herramienta bioinformática ClustalX2. Posteriormente, se analizaron las regiones más conservadas de las secuencias al inicio y al final del gen *alkM*. Se seleccionaron oligonucleótidos con una longitud de 21 a 22 pb y se realizaron pruebas empleando la herramienta bioinformática DNAMAN. En estas pruebas se calcularon los valores de la temperatura de fusión (T_m), la complementariedad entre los *primers* y la formación de estructuras secundarias. Los *primers* con una diferencia menor a 2°C en el valor de la T_m y con una baja complementariedad entre ellos fueron seleccionados. A continuación se muestran las secuencias de los *primers* degenerados empleados para la amplificación del gen *alkM*.

Primer forward:

alkM-2f 5'- GCG TGA RAT WGA TCG TAA RCG- 3'

Primer reverse:

alkM-1r 5'- GTY GGA TAA GCR TGA TGA TCT G- 3'

Los resultados de la amplificación del gen *alkM* empleando una temperatura de hibridación de 54°C se muestran en la Figura 8.4.4. Como resultado sólo se observó un amplicón de 900 pb en *A. bouvetii*. Por lo tanto, con el fin de corroborar la alineación de los *primers* y la amplificación, se aumentó la temperatura de hibridación a 58°C y se confirmó la amplificación del gen *alkM* en *A. bouvetii* (Figura 8.4.5.).

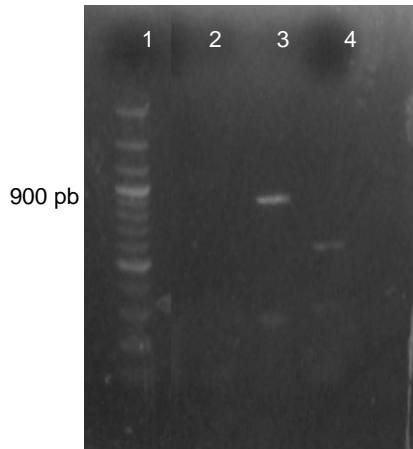


Figura 8.4.4. Amplificación del gen *alkM* en las cepas del consorcio empleando una temperatura de hibridación de 54°C. Carriles: 1. Marcador de peso molecular (100 pb ladder); 2. *Xanthomonas* sp.; 3. *A. bouvetii*; 4. *D. lusatiensis*.

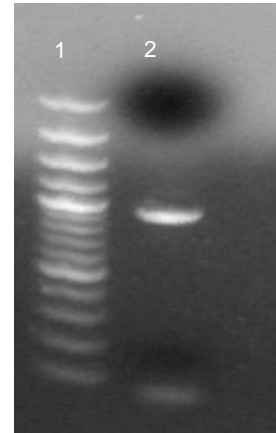


Figura 8.4.5. Amplificación del gen *alkM* en *A. bouvetii* empleando una temperatura de hibridación de 58°C.

Cabe destacar, que en nuestro trabajo fue importante diseñar *primers* degenerados basados en las secuencias de los genes *alkM* de diferentes especies del género *Acinetobacter*; ya que, al emplear los *primers* derivados del gen *alkB* de *P. oleovorans*, no se obtuvo ninguna amplificación. Al realizar el análisis de la secuencia del amplicón de *alkM* en *A. bouvetii* (ver secuencia en Anexo 2), se observó que la secuencia de nucleótidos mostró una similitud del 99% con la alcano hidroxilasa (AlkM) de *Acinetobacter haemolyticus*. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la capacidad de degradación de *A. bouvetii* podría depender de la presencia del gen *alkM*.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, Throne-Holst *et al.*, (2007) estudiaron e identificaron el gen *alkM* en *Acinetobacter* sp. DSM 17874 como un gen homólogo del gen *alkB*. Los genes homólogos son aquellos que se encuentran en especies diferentes pero con expresiones fenotípicas similares. En el caso del género *Acinetobacter*, son varios los sistemas enzimáticos que intervienen en la degradación de alcanos, como el citocromo P450 que es una hidroxilasa terminal. Inclusive se han reportado dioxigenasas que intervienen en la degradación de alcanos de cadena larga (Maeng *et al.*, 1996). Por

otra parte, Ratajczak *et al.*, (1998) identificaron el gen *alkM* en *Acinetobacter* sp. ADP1 y encontraron que este gen es regulado por el gen *alkR*. Asimismo, reportaron que la genética y organización de los genes *alk* en esta cepa es diferente al arreglo del gen *alkB* en *P. oleovorans*. Ratajczak *et al.*, (1998) analizaron la homología entre la secuencia del gen *alkM* y la secuencia de otras hidroxilasas unidas a la membrana y concluyeron que AlkM pertenece a una nueva familia de proteínas.

Por lo tanto, nuestros resultados revelan a *A. bouvetii* como una cepa con una alta capacidad de degradación que posee el gen homólogo *alkM*.

8.5. Detección y cuantificación de biosurfactantes

Con el objetivo de identificar las cepas del consorcio bacteriano que producen biosurfactantes durante la degradación de HXD, se realizaron diferentes pruebas para su detección y cuantificación. A continuación se muestran los resultados de las principales pruebas realizadas a los cultivos puros.

8.5.1. Cambios en la tensión superficial

Los biosurfactantes son compuestos con propiedades de superficie que disminuyen la tensión superficial e interfacial del medio (Satpute *et al.*, 2010). Por consiguiente, se evaluaron los cambios en la tensión superficial de cada uno de los cultivos puros. En la Figura 8.5.1.1, se muestran las cinéticas de la tensión superficial para cada uno de los cultivos durante la degradación de HXD. Como resultado se observó un ligero incremento en la tensión superficial de *A. bouvetii* a los 2 días de cultivo y después una disminución significativa en la tensión superficial de este cultivo (72.1 a 68 ± 0.5 dinas/cm); mientras que para el resto de los cultivos no se observaron cambios significativos a lo largo del tiempo de cultivo. Estos resultados son indicio de que *A. bouvetii* produce un biosurfactante que es capaz de disminuir la tensión superficial después de los primeros 2 días de cultivo.

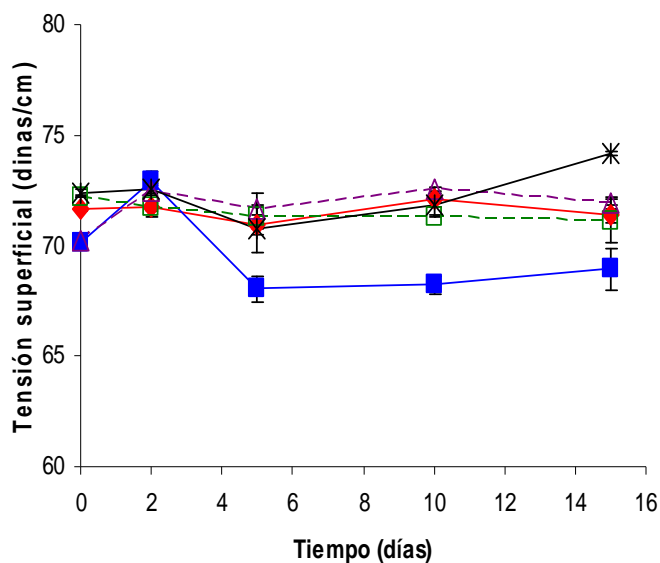


Figura 8.5.1.1. Cinéticas de la tensión superficial de los cultivos puros durante la degradación de HXD. Cultivos: *Xanthomonas* sp., (---♦---); *A. bouvetii*, (---■---); *Shewanella* sp., (---□---); *D. lusatiensis*, (---△---); control abiótico, (---*---).

Entre los compuestos con propiedades de superficie destacan los biosurfactantes y los bioemulsificantes. Los primeros, son generalmente compuestos de bajo peso molecular (glicolípidos y lipopéptidos de cadena corta). Mientras los segundos son compuestos de alto peso molecular. Los bioemulsificantes pueden formar emulsiones y no necesariamente reducen la tensión superficial (Satpute *et al.*, 2010). Esto podría explicar lo observado en nuestros resultados, ya que, la reducción en la tensión superficial por *A. bouvetii* fue menor en comparación con los biosurfactantes producidos por *Acinetobacter* B₂₋₂ creciendo en HXD (0.5% v/v) a un pH de 7.5 y a 25°C; cuya reducción en la tensión superficial fue de 70 a 40 dinas/cm (Espeche *et al.*, 1994).

Por lo tanto, los resultados obtenidos con la prueba de la tensión superficial sugieren que *A. bouvetii* es la única cepa que produce un biosurfactante, cuya capacidad para reducir la tensión superficial es mínima.

8.5.2. Prueba del colapso de la gota

Otra técnica para determinar la presencia y actividad de superficie de los biosurfactantes fue el colapso de la gota. La prueba se realizó para las cuatro cepas bacterianas pero sólo se obtuvieron resultados positivos para *A. bouvetii*. En la Figura 8.5.2.1, se muestran las fotografías correspondientes a las gotas de los sobrenadantes de *A. bouvetii* a lo largo

de los diferentes tiempos de muestreo. En todos los casos se observó el colapso de las gotas y un aumento en su tamaño (0.5-0.8 cm de diámetro), en comparación con la gota testigo de agua destilada (0.3 cm de diámetro).

Se conocen diferentes métodos para la detección de cepas productoras de biosurfactantes y de su actividad. Por ejemplo, Yousseff *et al.*, (2004) evaluaron y compararon diferentes métodos para detectar la producción de biosurfactantes por microorganismos, y reportaron una correlación lineal ($r = -0.82$) entre el método del colapso de la gota y la tensión superficial. Esto concuerda con nuestros resultados, debido a que sólo se observó una disminución en la tensión superficial en los sobrenadantes de *A. bouvetii* y también se obtuvieron resultados positivos en la prueba del colapso de la gota para este cultivo. Estos resultados sugieren que *A. bouvetii* es la única cepa del consorcio bacteriano capaz de producir biosurfactantes durante la degradación de HXD.

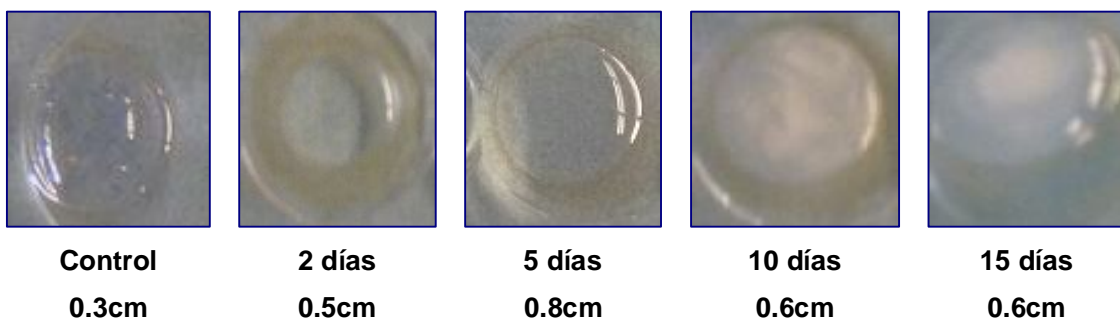


Figura 8.5.2.1. Resultados de la prueba del colapso de la gota para *A. bouvetii* a lo largo de 15 días de cultivo.

8.5.3. Prueba del desplazamiento del petróleo

Con el propósito de cuantificar los biosurfactantes producidos por *A. bouvetii* se empleó la prueba del desplazamiento del petróleo. De acuerdo a Morikawa *et al.*, (2000) el área de desplazamiento del petróleo por una solución que contiene biosurfactantes, es directamente proporcional a la concentración de dos biosurfactantes probados. Por consiguiente, nosotros determinamos de manera indirecta la concentración de los biosurfactantes producidos por *A. bouvetii* empleando Tween 20 como emulsificante modelo. En primer lugar, se realizó una curva estándar de Tween 20 relacionando el área desplazada del petróleo con diferentes concentraciones de Tween 20, se observó que el área desplazada del petróleo aumentó linealmente ($r^2 = 0.9854$) con la concentración de

Tween 20, como se aprecia en la Figura 8.5.3.1. Posteriormente, se realizó la prueba del desplazamiento del petróleo para los sobrenadantes de *A. bouvetii* a los diferentes tiempos de muestreo (Figura 8.5.3.2). En todos los casos se observó el desplazamiento del petróleo obteniéndose una mayor área de desplazamiento a los 5 días de cultivo.

La prueba del desplazamiento del petróleo se realizó para los cuatro cultivos puros, pero sólo se obtuvieron resultados positivos con *A. bouvetii*. Estos resultados demostraron que el método del desplazamiento del petróleo fue útil para determinar la concentración de biosurfactantes de manera indirecta en *A. bouvetii*. De acuerdo a lo reportado por Youssef *et al.*, (2004) la prueba del desplazamiento del petróleo es sensible para detectar bajas concentraciones de biosurfactantes. Mientras que la prueba del colapso de la gota es válida cuando la concentración de biosurfactantes es mayor a 60 mg/L. En nuestro trabajo, se observó una congruencia entre los resultados obtenidos por la técnica del colapso de la gota y el desplazamiento del petróleo.

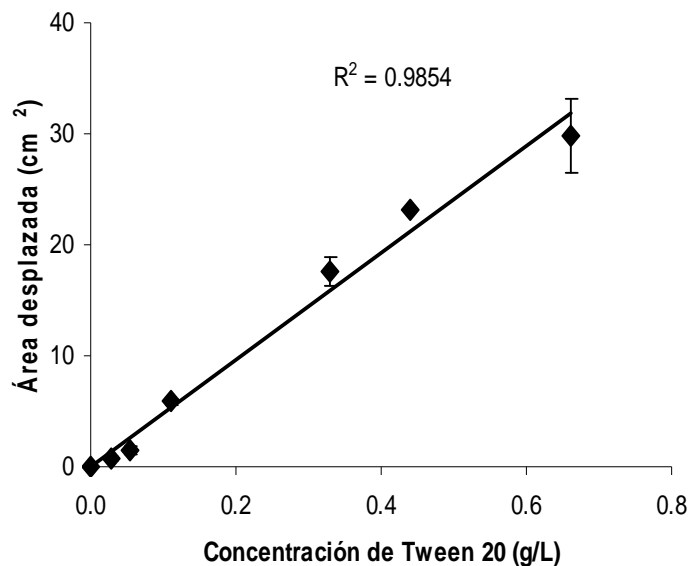


Figura 8.5.3.1. Relación entre el área de petróleo desplazada con la concentración de Tween 20.

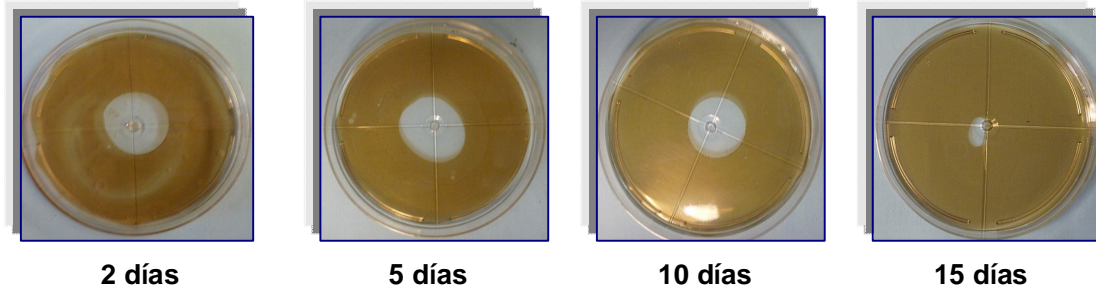


Figura 8.5.3.2. Resultados de la prueba del desplazamiento del petróleo empleando los sobrenadantes de los cultivos de *A. bouvetii* a diferentes tiempos de muestreo.

En la Figura 8.5.3.3 se muestra la cinética de producción de biosurfactantes por *A. bouvetii* expresando la concentración de biosurfactantes como equivalentes de Tween 20. Se observó un aumento en la concentración de biosurfactantes desde los primeros 2 días de cultivo alcanzando un máximo a los 5 días (0.17 ± 0.03 g/L de equivalentes de Tween 20), y después disminuyó.

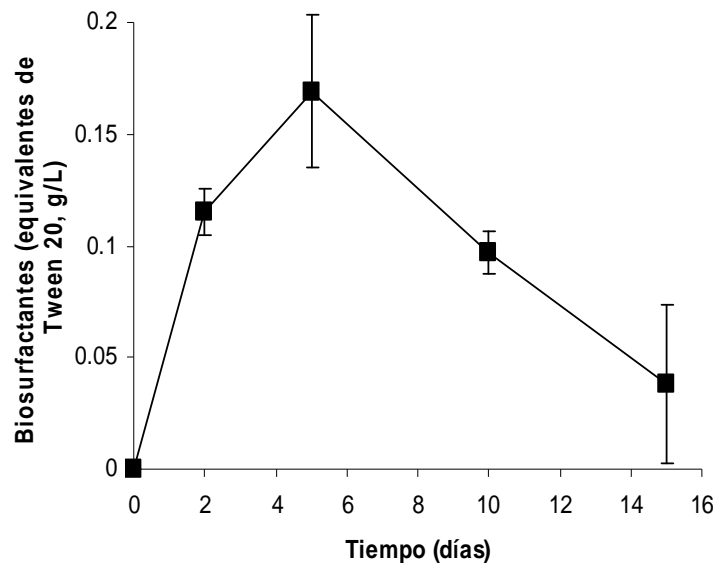


Figura 8.5.3.3. Cinética de producción de biosurfactantes por *A. bouvetii* durante la degradación de HXD.

En general, los biosurfactantes pueden ser producidos durante las primeras fases del crecimiento, o bien, en la fase estacionaria (Ron y Rosenberg, 2001). Se conocen cepas del género *Acinetobacter* que producen emulsificantes durante la fase estacionaria de crecimiento. En particular, el emulsan producido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 puede ser detectado en el cultivo después de las 10 h de crecimiento, y la máxima producción ocurre en la fase estacionaria (Ron y Rosenberg, 2001). Por el contrario, los

biosurfactantes producidos por *Pseudomonas aeruginosa* GL1, que en su mayoría son ramnolípidos, son producidos durante todo el cultivo (Bouchez-Naïtali y Vandecasteele, 2008). En nuestro trabajo se observó que *A. bouvetii* produjo biosurfactantes desde los primeros 2 días de cultivo, sugiriendo que estos compuestos fueron necesarios para la degradación del HXD desde el inicio del cultivo. Sin embargo, después de los 5 días se observó una disminución en la concentración de biosurfactantes (Figura 8.5.3.3).

De acuerdo a lo reportado por Noordman *et al.*, (2000) la presencia de biosurfactantes también puede traer efectos negativos, tales como toxicidad o el empleo de los biosurfactantes como fuente de carbono, ocasionando una disminución en la biodegradación de los hidrocarburos.

En nuestro trabajo, la disminución en la concentración de los biosurfactantes producidos por *A. bouvetii* podría ser explicada por el empleo de estos compuestos como fuente de carbono, de aquí la importancia de evaluar su biodegradabilidad por el cultivo mismo.

8.6. Biosurfactantes como fuente de carbono

En estudios recientes en nuestro laboratorio, Javier-Ramírez (2011) realizó la extracción del biosurfactante producido por *A. bouvetii* y lo evaluó como fuente de carbono para *Xanthomonas* sp., *A. bouvetii*, *Shewanella* sp., y *D. lusatiensis*. Después de 48 h de cultivo, *A. bouvetii* y *D. lusatiensis* crecieron a partir del biosurfactante adicionado; mientras que *Xanthomonas* sp. y *Shewanella* sp. no utilizaron el biosurfactante como única fuente de carbono y energía (Figura 8.6.1). Contra lo esperado, el crecimiento de *D. lusatiensis* fue mayor en comparación con *A. bouvetii* después de 48 h de cultivo.

La degradación de los biosurfactantes es un fenómeno frecuente durante la degradación de hidrocarburos, por ejemplo, Hirata *et al.*, (2009) demostraron que los biosurfactantes del tipo de los soforolípidos, producidos por levaduras, eran fácilmente degradados por ellas mismas. En estudios más recientes, Chrzanowski *et al.*, (2012) evaluaron la degradación de los ramnolípidos en muestras de suelo contaminadas con diesel y biodiesel. Como resultado, los ramnolípidos fueron degradados por un consorcio microbiano, aislado de las muestras del suelo, y se observó la degradación preferencial del biodiesel, seguida de los ramnolípidos y finalmente del diesel. Nuestros resultados sugieren que los biosurfactantes producidos por *A. bouvetii* son fuente de carbono y son indicio de un posible intercambio de metabolitos entre las cepas. Por consiguiente, sería importante estudiar la degradación de HXD cuando *A. bouvetii* se asocia con el resto de

las cepas del consorcio, para entender las asociaciones que se establecen entre las cuatro cepas que integran el consorcio.

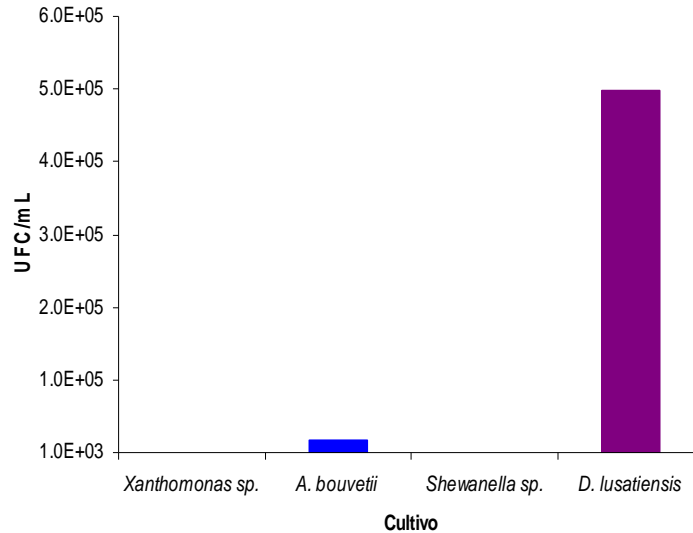


Figura 8.6.1. Resultados del crecimiento de las cepas bacterianas empleando como fuente de carbono el biosurfactante producido por *A. bouvetii*.

8.7. Degradación de hexadecano por cultivos mixtos

Con el objetivo de determinar el tipo de asociaciones que se establecen entre las cepas del consorcio durante la degradación de HXD, se diseñaron y evaluaron cuatro cultivos mixtos. Los cultivos mixtos se diseñaron considerando las capacidades individuales de las cepas, es decir, la presencia de los genes catabólicos (*alkB* o *alkM*) y la producción de biosurfactantes.

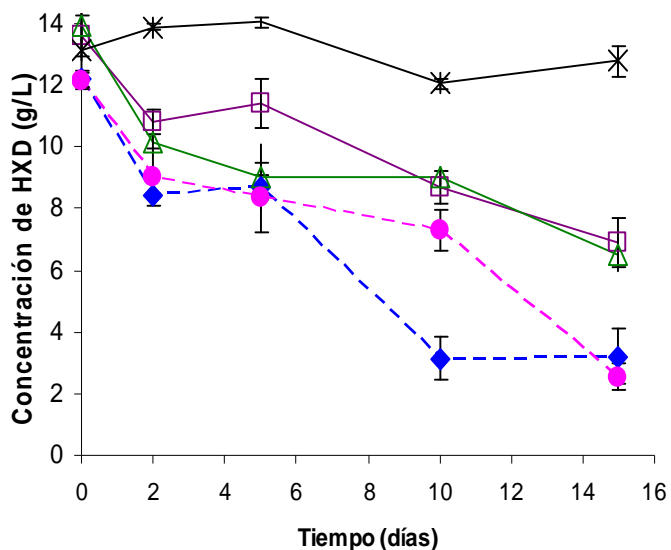
En la Figura 8.7.1a, se muestran las cinéticas de degradación de HXD para cuatro cultivos mixtos. El consumo de HXD fue mayor en el cultivo constituido por *Xanthomonas sp.*+ *A. bouvetii* ($74 \pm 7\%$) y el consorcio bacteriano integrado por las cuatro cepas ($79 \pm 3\%$). El consumo de HXD fue significativamente menor en los cultivos *Xanthomonas sp.*+ *A. bouvetii*+ *Shewanella sp.* ($49 \pm 8\%$) y *Xanthomonas sp.*+ *A. bouvetii*+ *D. lusatiensis* ($52 \pm 4\%$). Se observó que los perfiles de crecimiento, a expensas del consumo de HXD, fueron similares para todos los cultivos mixtos, alcanzando una concentración celular máxima de 2.7×10^9 UFC/mL (Figura 8.7.1.b).

Nuestros resultados indican que el aumento en el consumo de HXD por la asociación *Xanthomonas sp.* y *A. bouvetii* puede explicarse por la cooperación metabólica entre

ambas cepas, ya que, cuando *Xanthomonas* sp. fue co-cultivada con *A. bouvetii* se observó un incremento en la tasa de consumo de HXD a los 10 días. De hecho ambas cepas poseen una alcano hidroxilasa que interviene en la oxidación inicial del HXD, y *A. bouvetii* es capaz de producir biosurfactantes. Probablemente, la complementariedad metabólica entre ambas cepas fue lo que favoreció el consumo de HXD. De acuerdo a lo reportado para las poblaciones bacterianas degradadoras de hidrocarburos, las interacciones sinérgicas involucradas entre ellas pueden ser complejas e implican la remoción sucesiva de los metabolitos producidos por otras especies (Ghazali *et al.*, 2004). En estudios recientes, Kim *et al.*, (2009) reportaron una baja capacidad de degradación de fenantreno por los cultivos puros de *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca* y *Stenotrophomonas maltophilia* pero la degradación por los cultivos mixtos fue mayor al 80% debido a las interacciones sinérgicas.

Por otra parte, la capacidad de degradación del consorcio bacteriano no disminuyó con la incorporación de *Shewanella* sp. y *D. lusatiensis* en comparación con el resto de los cultivos mixtos evaluados. La distribución poblacional en el consorcio bacteriano cambió durante el tiempo de cultivo. Mientras *A. bouvetii* fue predominante durante la mayor parte del tiempo de cultivo, el crecimiento de *Shewanella* sp. y *D. lusatiensis* se incrementó después de 10 días de iniciada la incubación. Estos resultados indican que probablemente *Shewanella* sp. y *D. lusatiensis* utilizaron como fuente de carbono los metabolitos producidos por las especies de más rápido metabolismo, particularmente, los biosurfactantes producidos por *A. bouvetii* como los reportados por Javier-Ramírez *et al.*, (2011). Por lo tanto, estos resultados son un claro indicio de las posibles asociaciones poblacionales y la cooperación metabólica que se establece entre las cepas del consorcio durante la degradación de HXD.

(a)



(b)

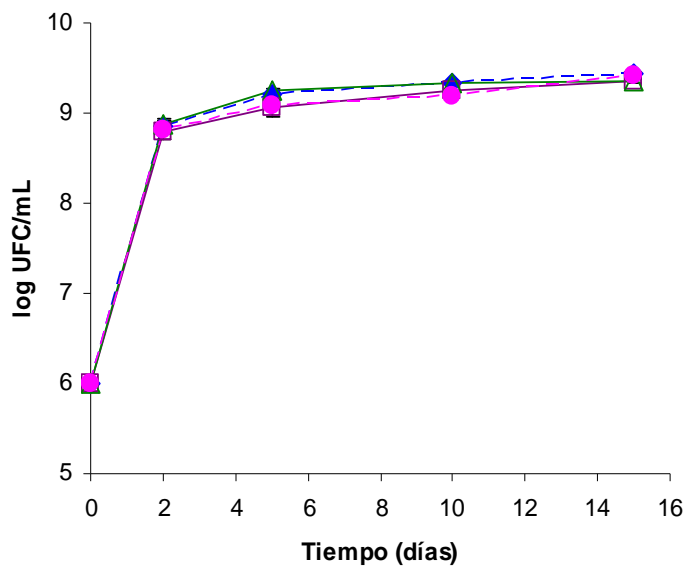


Figura 8.7.1. Cinéticas de los cultivos mixtos: **(a)** concentración de HXD, **(b)** crecimiento bacteriano. Cultivos mixtos: *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii*, (---♦---); *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii*+*Shewanella* sp., (—□—); *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii*+*D. lusatiensis*, (—△—); consorcio, (---●---); control abiótico, (—*—).

8.8. Mecanismos de remoción de hexadecano por *A. bouvetii*

Con el objetivo de determinar los mecanismos de remoción empleados por *A. bouvetii* durante la degradación de HXD, se evaluaron los cambios en la hidrofobicidad celular y la capacidad de los biosurfactantes para pseudosolubilizar y emulsificar HXD. En esta etapa del trabajo, *A. bouvetii* fue seleccionada por ser la única cepa productora de biosurfactantes y la mejor degradadora de HXD. La hidrofobicidad celular se evaluó como la capacidad de adherencia de las células a sustratos hidrofóbicos y se relacionó con el consumo de HXD.

Como se observa en la Figura 8.8.1a, las células de *A. bouvetii* que sirvieron de inóculo y crecieron en el medio CN mostraron un carácter hidrofílico ($6.2 \pm 2\%$ de adherencia al HXD). Sin embargo, cuando el cultivo creció en HXD adquirió un carácter hidrofóbico ($80 \pm 7\%$ de adherencia al HXD) que se mantuvo hasta los 10 días, y después la hidrofobicidad disminuyó. Cabe resaltar que durante el periodo en que se mantuvo la máxima hidrofobicidad se observó el mayor consumo de HXD por *A. bouvetii*, sugiriendo una estrecha relación entre los dos fenómenos. Se conocen diferentes factores que modifican la hidrofobicidad celular tales como la fuerza iónica, el pH, la temperatura y la presencia de iones polivalentes (Zikmanis *et al.*, 2007; Baoyu *et al.*, 2008). Inclusive se ha considerado la inserción de moléculas anfifílicas (como biosurfactantes) en las superficies celulares como factores importantes que podrían modificar la hidrofobicidad celular (Hua *et al.*, 2003). Por ejemplo, Bredholt *et al.*, (2002) observaron cambios en la hidrofobicidad celular de *Rhodococcus* sp. 094 al crecer en diferentes hidrocarburos incluyendo el HXD; y demostraron que los bioemulsificantes producidos por este cultivo fueron los responsables de modificar su hidrofobicidad celular.

En estudios más recientes, Zhao *et al.*, (2011) evaluaron el efecto de la adición de ramnolípidos sobre los cambios en la hidrofobicidad celular de *Bacillus subtilis* BUM, *P. aeruginosa* P-CG3 y de la combinación de ambos cultivos, encontrando que los ramnolípidos se adsorbían en las superficies celulares aumentando la hidrofobicidad en *P. aeruginosa* CG3 y disminuyéndola en *B. subtilis* BUM.

En el caso de *A. bouvetii*, los cambios en la hidrofobicidad celular posiblemente fueron inducidos por cambiar la fuente de carbono del medio CN, que contiene un sustrato soluble al medio que contiene HXD, un sustrato insoluble. Con respecto a los cambios observados después de los 2 días de cultivo, probablemente se deben a la inserción de los biosurfactantes en las superficies celulares de *A. bouvetii*.

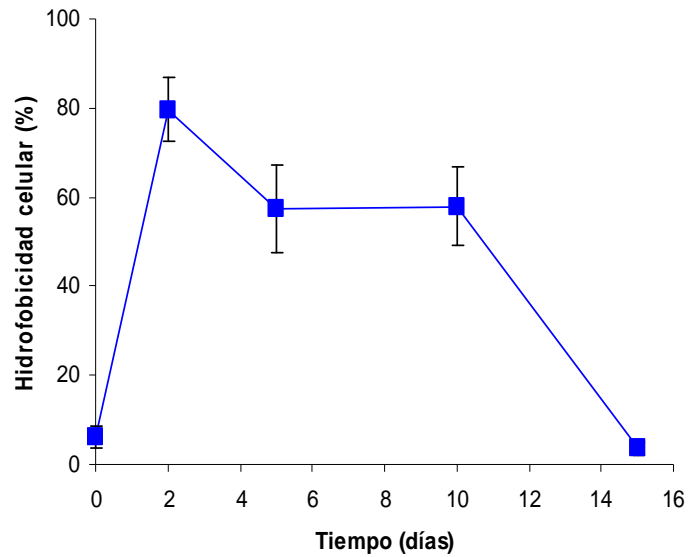
Por otra parte, los biosurfactantes poseen la capacidad de promover la pseudosolubilización y emulsificación del sustrato, por consiguiente, en este trabajo se evaluaron ambas capacidades. Se observó que la concentración de HXD pseudosoluble en los cultivos de *A. bouvetii* aumentó a lo largo del tiempo de cultivo alcanzando una máxima concentración de 1.2 ± 0.1 g/L a los 10 días (Figura 8.8.1b). Por otra parte, la capacidad de los biosurfactantes para emulsificar HXD incrementó durante los primeros 5 días y se mantuvo sin cambios significativos hasta finalizar el cultivo (Figura 8.8.1b). Cabe destacar que las emulsiones formadas fueron estables hasta por 24 h al no observar cambios en los perfiles de emulsificación a las 2 y 24 h.

Con base en los resultados de las cinéticas de hidrofobicidad celular y la capacidad de los biosurfactantes para pseudosolubilizar y emulsificar HXD; nuestros resultados sugieren que tanto el contacto directo como la remoción mediada por los biosurfactantes fueron los mecanismos que *A. bouvetii* empleó para la remoción del HXD. Los mecanismos de remoción de hidrocarburos por cultivos puros han sido ampliamente estudiados y se ha reportado que la emulsificación y la adherencia bacteriana, son las principales estrategias de las cepas del género *Acinetobacter* para incrementar el contacto con los hidrocarburos. Por ejemplo, Rosenberg *et al.*, (1982) observaron que las fimbrias de *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 juegan un papel importante en la adherencia a las gotas de HXD. Además, *A. calcoaceticus* RAG-1 es capaz de producir bioemulsificadores de alto peso molecular como el emulsan en presencia del petróleo crudo (Ron y Rosenberg, 2002).

Las propiedades fisiológicas de los cultivos juegan un papel importante para determinar la predominancia de un mecanismo de remoción. Por ejemplo, Bouchez-Naitali y Vandecasteele, (2008) encontraron que la naturaleza hidrofóbica de *Rhodococcus equi* Ou2 favoreció la remoción de HXD por contacto directo aún y cuando también fue capaz de producir biosurfactantes. De manera similar, Al-Tahhan *et al.*, (2000) reportaron que el contacto directo fue el mecanismo predominante por cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. En estudios recientes enfocados a la caracterización de los mecanismos de remoción de alcanos, cerca del 67% de las bacterias emplearon ambos mecanismos para la remoción de HXD (Vasileva-Tonkova *et al.*, 2008), similar a lo que se observó con *A. bouvetii*.

En nuestro trabajo se demostró que los cambios en la hidrofobicidad celular y la pseudosolubilización y emulsificación del HXD, fueron factores clave para incrementar la remoción de HXD por *A. bouvetii*. Evaluar estos factores cuando *A. bouvetii* es cultivada con otras cepas podría ayudar a entender los mecanismos de remoción que se desarrollan en los cultivos mixtos.

(a)



(b)

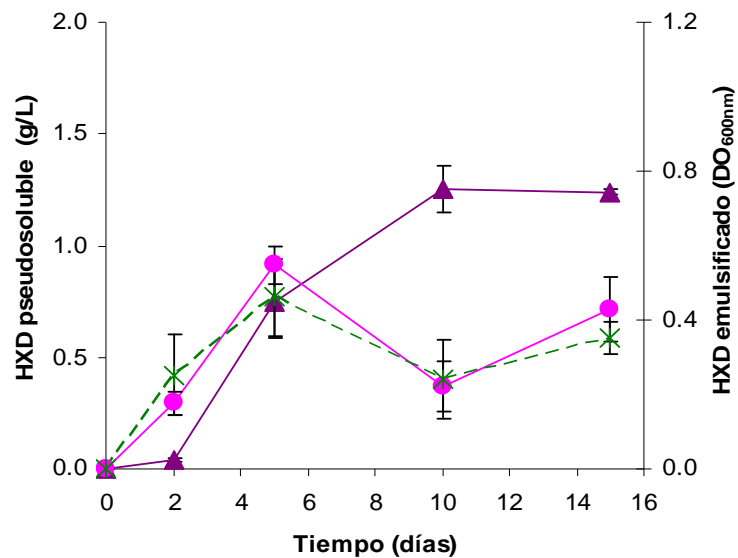


Figura 8.8.1. Propiedades del cultivo de *A. bouvetii* durante la degradación de HXD: (a) hidrofobilidad celular (—■—) y (b) actividad de los biosurfactantes. HXD pseudosoluble, (---▲---); HXD emulsificado después de 2h, (—●—); HXD emulsificado después de 24h, (---×---).

8.9. Mecanismos de remoción de hexadecano por cultivos mixtos

Con el propósito de determinar y comparar los mecanismos de remoción de HXD cuando *A. bouvetii* se asoció con otras cepas bacterianas, se evaluó la hidrofobicidad celular y la capacidad de solubilización de los biosurfactantes en los cultivos *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii* y el consorcio bacteriano. Ambos cultivos mixtos se seleccionaron por presentar un consumo de HXD mayor al 70%. A continuación se muestran los resultados para cada cultivo mencionado.

8.9.1. Remoción de hexadecano por el cultivo *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii*

En la Figura 8.9.1.1a, se muestran los cambios en la hidrofobicidad celular de la asociación *Xanthomonas* sp.+ *A. bouvetii* a lo largo del tiempo de cultivo. De manera similar al comportamiento de *A. bouvetii* en cultivos puros, se observó una inducción en el carácter hidrofóbico al inicio del cultivo posiblemente debido al cambio de la fuente de carbono, es decir, de células creciendo en el medio CN a células expuestas a HXD. Como consecuencia se observó un máximo en la hidrofobicidad celular a los 2 días ($68 \pm 9\%$ de adherencia al HXD). A diferencia de *A. bouvetii*, el cultivo *Xanthomonas* sp.+ *A. bouvetii* se mantuvo hidrofílico durante la mayor parte del tiempo de cultivo.

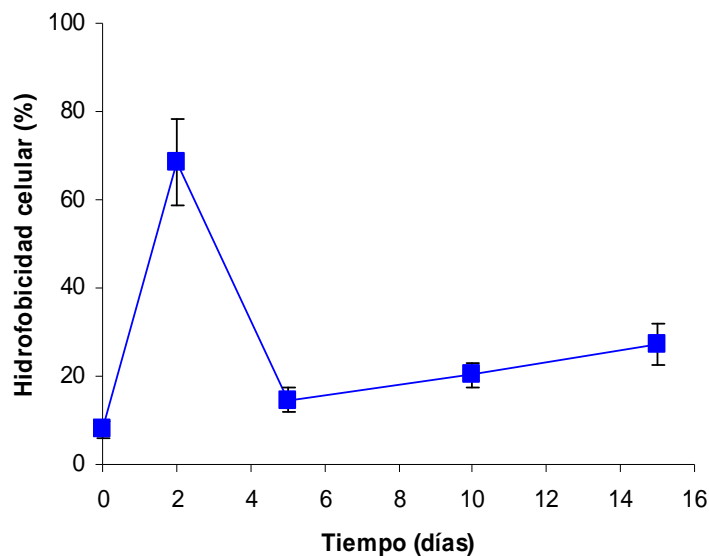
Por otra parte, en el cultivo *Xanthomonas* sp.+ *A. bouvetii* se observó un incremento en la concentración de HXD pseudosoluble desde los primeros 2 días (0.6 ± 0.02 g/L), y después no se observaron cambios significativos (Figura 8.9.1.1b). En cuanto a la capacidad de los biosurfactantes para emulsificar, se observó un aumento en la emulsificación del HXD durante los primeros 2 días, y después no se observaron cambios. Las emulsiones formadas también fueron estables por al menos 24 h. En comparación con *A. bouvetii*, la capacidad de pseudosolubilización por *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii* fue menor y la capacidad de emulsificación fue muy similar.

Nuestros resultados sugieren que tanto el contacto directo como la remoción mediada por biosurfactantes fueron los mecanismos utilizados por el cultivo *Xanthomonas* sp.+ *A. bouvetii* para la remoción de HXD durante los primeros 2 días de cultivo. Además, la remoción mediada por biosurfactantes resultó ser el mecanismo predominante después de los 2 días de cultivo, al observarse un claro carácter hidrofílico. En términos generales, la pseudosolubilización es el modo de acción predominante de los biosurfactantes

cuando las células son hidrofílicas, ya que, se forman micelas hidrofílicas que favorecen la transferencia de los hidrocarburos con las células hidrofílicas (Vasileva-Tonkova *et al.*, 2008). Cabe destacar que Bouchez-Naitali y Vandecasteele, (2008) distinguieron las capacidades de pseudosolubilización y emulsificación de los biosurfactantes producidos por cepas hidrofílicas e hidrofóbicas, pero esta distinción no ha sido estudiada en cultivos mixtos. En nuestro trabajo, se observó que tanto la pseudosolubilización como la emulsificación se desarrollaron en el cultivo *Xanthomonas* sp.+ *A. bouvetii*, aún y cuando el cultivo se mantuvo hidrofílico la mayor parte del tiempo. Estos resultados sugieren que el principal mecanismo de acción de los biosurfactantes fue la solubilización del sustrato, y en menor medida la modificación de la hidrofobicidad celular. Observaciones similares fueron reportadas por van Hamme y Ward, (2001) al evaluar el efecto de la adición del surfactante químico Igepal CO-630, sobre la degradación de petróleo por la asociación entre *Pseudomonas* sp. JA5-B45 y *Rhodococcus* sp. F9-D79. El surfactante químico modificó los mecanismos de remoción de los cultivos puros. En el caso de *Pseudomonas* sp. JA5-B45 el surfactante promovió la emulsificación del petróleo, mientras que en *Rhodococcus* sp. F9-D79 la capacidad para adherirse a las gotas de hidrocarburo disminuyó.

En nuestro trabajo, se observaron diferencias muy marcadas en los mecanismos de remoción entre *A. bouvetii* y el cultivo *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii*, sugiriendo que la complementariedad entre ambas cepas influyó positivamente en el mecanismo de remoción mediado por biosurfactantes. A partir de estos resultados decidimos evaluar los mecanismos de remoción por el consorcio.

(a)



(b)

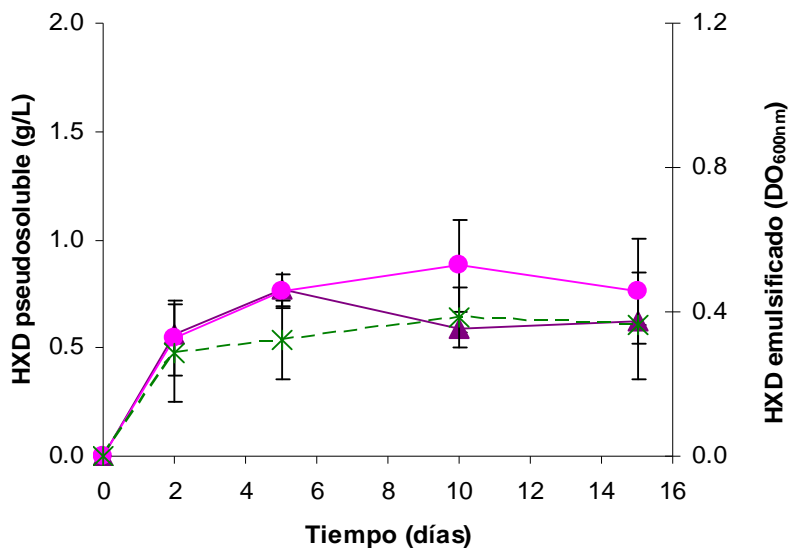


Figura 8.9.1.1. Propiedades del cultivo *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii* durante la degradación de HXD: **(a)** hidrofobicidad celular (—■—) y **(b)** actividad de los biosurfactantes. HXD pseudosoluble, (---▲---); HXD emulsificado después de 2h, (—●—); HXD emulsificado después de 24h, (---*---).

8.9.2. Remoción de hexadecano por el consorcio bacteriano

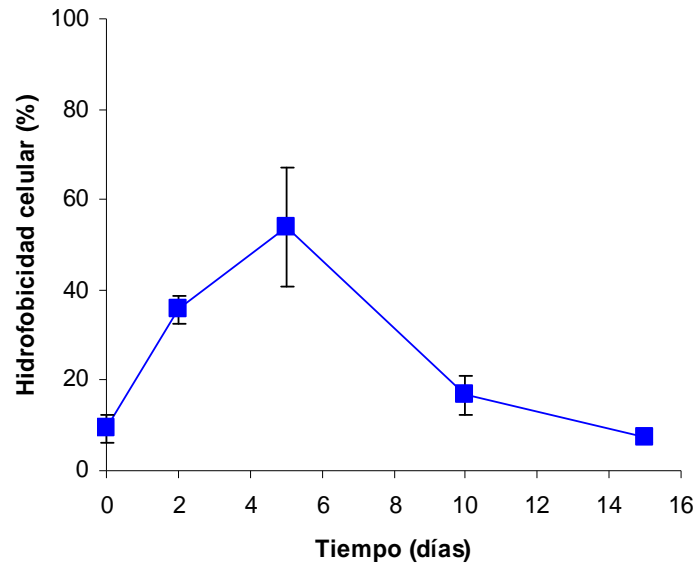
Con el propósito de entender los mecanismos de remoción que se desarrollan por el consorcio bacteriano, se evaluaron los cambios en la hidrofobicidad celular y las capacidades de los biosurfactantes para pseudosolubilizar y emulsificar HXD.

En la Figura 8.9.2.1a, se muestra la cinética de hidrofobicidad celular del consorcio bacteriano durante la degradación de HXD. Inicialmente, en el inóculo se observó un carácter hidrofílico ($9 \pm 3\%$ de adherencia) al crecer en el medio CN. Sin embargo, cuando el cultivo fue expuesto a HXD se observó una inducción del carácter hidrofóbico, alcanzando una máxima capacidad de adherencia a los 5 días del $54 \pm 3\%$. En comparación con *A. bouvetii*, el consorcio bacteriano mantuvo este estricto carácter hidrofílico después de los 5 días de cultivo (menor al 30% de adherencia). Nuestros resultados indican que la hidrofobicidad celular de *A. bouvetii* se modificó por la presencia de las otras tres cepas bacterianas. Las modificaciones en las propiedades de superficie de los cultivos mixtos son complejas y varios factores podrían intervenir tales como: (i) la presencia de especies bacterianas con una hidrofobicidad diferente, (ii) las asociaciones poblacionales, y (iii) la posible degradación de los compuestos que modifican la hidrofobicidad, es decir, la degradación de los biosurfactantes.

En cuanto a la actividad de los biosurfactantes producidos por el consorcio bacteriano (Figura 8.9.2.1b), se observó que la capacidad de pseudosolubilización alcanzó un máximo a los 10 días (1.2 ± 0.01 g/L) y después disminuyó. Asimismo, se observó un incremento significativo en la emulsificación del HXD a lo largo del tiempo de cultivo. Cabe destacar que la capacidad de emulsificación observada en el consorcio fue mayor en comparación con *A. bouvetii* y el cultivo *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii*.

Nuestros resultados sugieren que tanto el contacto directo como la remoción mediada por los biosurfactantes, fueron los mecanismos empleados por el consorcio durante los primeros 5 días de cultivo, y la remoción mediada por los biosurfactantes resultó ser predominante después de los 5 días; al observarse un claro aumento en la capacidad de emulsificación en el medio.

(a)



(b)

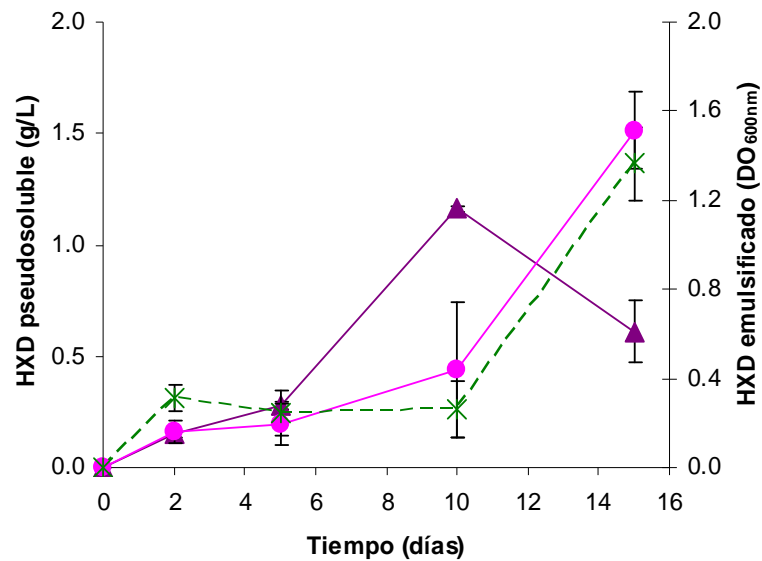


Figura 8.9.1.2. Propiedades del consorcio bacteriano durante la degradación de HXD: **(a)** hidrofobicidad celular (—■—) y **(b)** actividad de los biosurfactantes. HXD pseudosoluble, (---▲---); HXD emulsificado después de 2h, (—●—); HXD emulsificado después de 24h, (---*---).

Los mecanismos de remoción de hidrocarburos han sido caracterizados principalmente en cultivos puros basándose en la hidrofobicidad celular y la producción de los biosurfactantes (Bouchez-Naïtali *et al.*, 1999; Vasileva-Tonkova *et al.*, 2008). En contraste, los mecanismos de remoción para cultivos mixtos han sido poco estudiados. Recientemente, Kaczorek *et al.*, (2008), demostraron que la modificación en la hidrofobicidad celular del cultivo mixto *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. estuvo influenciada por la adición de ramnolípidos y saponinas. Sin embargo, Owsianiak *et al.*, (2009) no encontraron una correlación entre la hidrofobicidad celular y la degradación de hidrocarburos para 218 consorcios microbianos; concluyendo que además de la hidrofobicidad celular y la producción de biosurfactantes, se conocen otros mecanismos que influyen en los mecanismos de remoción de hidrocarburos. Por ejemplo, Ascon-Cabrera y Lebeault, (1995) observaron que la hidrofobicidad celular de un cultivo mixto, compuesto por *Pseudomonas* cepa SP1 y SP2, *Arthrobacter* sp. AR2 y *Alcaligenes* sp. AL2, estuvo regulada por la dinámica poblacional, ya que la hidrofobicidad celular incrementó conforme aumentó la concentración celular. De manera similar, Cavalca *et al.*, (2008) reportaron que la modulación en la hidrofobicidad celular de dos cultivos mixtos durante la remoción de fenantreno estuvo influenciada por la dinámica poblacional. Con base en nuestros resultados, las diferencias observadas en los mecanismos de remoción de HXD entre los cultivos puros y mixtos dependen de los cambios en la hidrofobicidad celular, en la producción y actividad de los biosurfactantes (pseudosolubilización y emulsificación). Así como en las asociaciones poblacionales que se establecen, basadas en la complementariedad de las capacidades metabólicas. Los resultados de los mecanismos de remoción de HXD entre cultivos puros y mixtos fueron publicados (ver Anexo 3).

9. CONCLUSIONES

Las cepas bacterianas fueron identificadas mediante la secuenciación del gen ribosomal RNAr 16S como: *Xanthomonas* sp. UAM58, *Acinetobacter bouvetii* UAM25, *Shewanella* sp. UAM38 y *Defluviobacter lusatiensis* UAM86.

En este trabajo, se demostró la capacidad de degradación de HXD de los cultivos puros *Xanthomonas* sp. ($46 \pm 4\%$), *A. bouvetii* ($72 \pm 4\%$) y *D. lusatiensis* ($40 \pm 6\%$); mientras que *Shewanella* sp. no fue capaz de crecer en HXD como única fuente de carbono y energía.

Se identificó el gen *alkM* en *A. bouvetii*.

Con base en los resultados de las pruebas: colapso de la gota, el desplazamiento del petróleo y la tensión superficial, *A. bouvetii* fue la única cepa del consorcio bacteriano que produjo biosurfactantes durante la degradación del HXD. Los biosurfactantes se produjeron desde los primeros 2 días de cultivo, alcanzando una máxima concentración a los 5 días (0.17 ± 0.03 g/L de equivalentes de Tween 20).

Se observó un incremento en la degradación de HXD por los cultivos mixtos *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii* ($74 \pm 7\%$) y el consorcio bacteriano ($79 \pm 3\%$), en comparación con el resto de los cultivos mixtos evaluados.

En cuanto a la caracterización de los mecanismos de remoción, *A. bouvetii* empleó tanto el contacto directo como la remoción mediada por biosurfactantes para la degradación de HXD. En el caso del cultivo *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii* ambos mecanismos tomaron lugar, pero la remoción mediada por biosurfactantes fue predominante al finalizar el tiempo de cultivo. De manera similar, en el consorcio ambos mecanismos se desarrollaron, pero la remoción mediada por biosurfactantes fue predominante, especialmente la emulsificación.

Los cambios en la hidrofobicidad celular y el grado de pseudosolubilización o emulsificación, fueron factores clave para la remoción de sustratos hidrofóbicos por los cultivos puros y mixtos evaluados en este estudio.

Las asociaciones poblacionales entre las cepas del consorcio bacteriano jugaron un papel importante en los mecanismos de remoción de HXD por los cultivos *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii* y el consorcio bacteriano.

Este trabajo es uno de los primeros estudios que demuestra la capacidad degradadora de hidrocarburos de *A. bouvetii* y la revela como una cepa productora de biosurfactantes.

Este es el primer reporte que demuestra la capacidad degradadora de hidrocarburos de *D. lusatiensis*.

El presente estudio contribuye a entender los mecanismos de remoción de hidrocarburos entre cultivos bacterianos puros y mixtos.

10. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se proponen las siguientes recomendaciones para estudios posteriores:

Caracterizar químicamente el biosurfactante producido por *A. bouvetii* durante la degradación de HXD, y compararlo con los biosurfactantes reportados.

Evaluar la producción de biosurfactantes por *A. bouvetii* empleando diferentes fuentes de carbono, y evaluar la capacidad de los biosurfactantes para incrementar la degradación de hidrocarburos, o bien, la movilización del petróleo en yacimientos agotados.

Identificar los genes involucrados en la producción de biosurfactantes por *A. bouvetii*.

Caracterizar los mecanismos que emplean los cultivos puros y mixtos evaluados en este trabajo para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos. Evaluar los cambios en la hidrofobicidad celular, la producción de biosurfactantes y la capacidad de pseudosolubilización y/o emulsificación de sustratos hidrófobicos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abalos, A., Viñas, M., Sabaté, J., Manresa, M.A., Solanas, A.M. 2004. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation*, **15** (4): 249-260.

Abbasnezhad, H., Gray, M., Foght, J.M. 2011. Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **92**: 653-675.

Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A., Maier, R.M. 2000. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (8): 3262-3268.

Ascon-Cabrera y Lebeault. 1995. Cell hydrophobicity influencing the activity/stability of xenobiotic-degrading microorganisms in a continuous biphasic aqueous-organic system. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **80** (3): 270-275.

Ashraf, W., Mihdhir, A., Murrell, J.C. 1994. Bacterial oxidation of propane. *FEMS Microbiology Letters*, **122** (1): 1-6.

Baoyu, G., Xiaobiao, Z., Chunhua, X., Qinyan, Y., Weiwei, L., Jincheng, W. 2008. Influence of extracellular polymeric substances on microbial activity and cell hydrophobicity in biofilms. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **83** (3): 227-232.

Baptist, J.N., Gholson, R.K., Coon, M.J. 1963. Hydrocarbon oxidation by a bacterial enzyme system: I. Products of octane oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **69**: 40-47.

Beal, R. y Betts, W.B. 2000. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, **89** (1):158-168.

Bendinger, B., Rijnaarts, H.H.M., Alterndorf, K., Zehnder, A.J.B. 1993. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 3973-3977.

Bodour, A.A. y Miller-Maier, R.M. 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, **32** (3): 273-280.

Bongkeun, S., Norberto, J.P., Häggblom, M. 2000. Isolation and characterization of diverse halobenzoate . degrading denitrifying bacteria from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (8): 3446-3453.

Bouchez-Naïtali, M., Rakatozafy, H., Marchal, R., Leveau, J.Y., Vandecasteele, J.P. 1999. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *Journal of Applied Microbiology*, **86** (3): 421-428.

Bouchez-Naïtali, M., Blanchet, D., Bardin, D., Vandecasteele, J.P. 2001. Evidence for interfacial uptake in hexadecane degradation by *Rhodococcus equi*: the importance of cell flocculation. *Microbiology*, **147** (9): 2537-2543.

Bouchez-Naïtali, M. y Vandecasteele, J.P., 2008. Biosurfactants, a help in the biodegradation of hexadecane? The case of *Rhodococcus* and *Pseudomonas* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24** (9):1901-1907.

Bredholt, H., Bruheim, P., Potocky, M., Eimhjellen, K. Hydrophobicity development, alkane oxidation, and crude-oil emulsification in a *Rhodococcus* species. *Canadian Journal of Microbiology*, **48** (4): 295-304.

Carr, E. L., Kämpfer, P., Patel, B.K.C., Gürtler, V., Seviour, R. J. 2003. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53** (4): 953-963.

Cavalca, L., Rao, M.A., Bernasconi, S., Kolombo, M., Andreoni, V., Gianfreda, L. 2008. Biodegradation of phenanthrene and analysis of degrading cultures in the presence of a

model organo-mineral matrix and of a simulated NAPL phase. *Biodegradation*, **19** (1): 1-13.

Chrzanowski, Ł., Dziadas, M., Ławniczak, Ł., Cyplik, P., Białas, W., Szulc, A., Lisiecki, P., Jelén, H. 2012. Biodegradation of rhamnolipids in liquid cultures: Effect of biosurfactant dissipation on diesel fuel/B20 blend biodegradation efficiency and bacterial community composition. *Bioresource Technology*, **111**: 328-335.

Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., Lim, Y.W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57** (10): 2259-2261.

Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, **37** (1): 141-145.

Das, N. y Chandran, P. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, **2011**: 1-13.

Desai, J.D. y Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **61** (1): 47-64.

Díaz-Ramírez, I.J., Ramírez-Saad, H., Gutiérrez-Rojas, M., Favela-Torres, E. 2003. Biodegradation of Maya crude oil fractions by bacterial strains and defined mixed culture isolated from *Cyperus laxus* rhizosphere soil in a contaminated site. *Canadian Journal of Microbiology*, **49** (12): 755-761.

Díaz-Ramírez, I.J., Escalante-Espinosa, E., Favela-Torres, E., Gutiérrez-Rojas, M., Ramírez-Saad, H. 2008. Design of bacterial defined mixed for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **62** (1): 21-30.

Espeche, M.E., MacCormack, W.P., Fraile, E.R. 1994. Factors affecting growth of an n-hexadecane degrader *Acinetobacter* species isolated from a highly polluted urban river. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **33** (2): 187-196.

Fritsche, K., Auling, G., Andreesen, J.R., Lechner, U. 1999. *Defluviobacter lusatiae* gen. nov., sp. nov., a new chlorophenol-degrading member of the alpha-2 subgroup of Proteobacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, **22** (2): 197-204.

Gallegos-Martínez, M., Gómez-Santos, A., González-Cruz, L., Montes de Oca-García, M.A., Yáñez-Trujillo, L., Zermeño-Eguía Lis, J.A., Gutiérrez-Rojas, M. 2000. Diagnostic and resulting approaches to restore petroleum-contaminated soil in a Mexican tropical swamp. *Water Science and Technology*, **42**:377-384.

Gerdes, B., Brinkmeyer, R., Dieckmann, G., Helmke, E. 2005. Influence of crude oil on changes of bacterial communities in Arctic sea-ice. *FEMS Microbiology Ecology*, **53** (1): 129-139.

Ghazali, F.M., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A.B., Basri, M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **54** (1): 61-67.

Goswami, P., Hazarika, A.K., Singh, H.D. 1994. Hydrocarbon Pseudosolubilizing and Emulsifying Proteins Produced by *Pseudomonas cepacia* N1. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **77** (1): 28-31.

van Hamme, J.D. y Ward, O.P. 2001. Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas* sp. strain JA5-B45 and *Rhodococcus* sp. strain F9-D79 grown on crude oil and effect of a chemical surfactant on them. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (10):4874-4879.

Harms, H., Smith, K.E.C., Wick, L.Y. 2010. Chapter 42: problems of hydrophobicity/bioavailability. In: Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology (Timmis K.N. Ed.). Springer, Berlin, pp. 1439-1450.

- Hirata, Y., Ryu, M., Oda, Y., Igarashi, K., Nagatsuka, A., Furuta, T., Sugiura, M. 2009. Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **108** (2): 142-146.
- Hua, Z., Chen, J., Lun, S., Wang, X. 2003. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. *Water Research*, **37** (17): 4143-4150.
- Iida, T., Sumita, T., Ohta, A., Takagi, M. 2000. The cytochrome P450ALK multigene family of an n-alkane-assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*: cloning and characterization of genes coding for new CYP52 family members. *Yeast*, **16** (12):1077-1087.
- Ito, H., Hosokawa, R., Morikawa, M., Okuyama, H. 2008. A turbine oil-degrading bacterial consortium from soils of oil fields and its characteristics. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **61** (3): 223-232.
- Javier-Ramírez, D. 2011. Extracción del biosurfactante producido por *Acinetobacter bouvetii* y su empleo como fuente de carbono para un consorcio bacteriano. Proyecto de Servicio Social. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. p.p. 1-14.
- Kaczorek, E., Chrzanowski, Ł., Pijanowska, A., Olszanowski, A. 2008. Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: Rhamnolipides and saponins. *Bioresource Technology*, **99** (10): 4285-4291.
- Kim, Y.M., Ahn, C.K., Woo, S.H., Jung, G.Y., Park, J.M. 2009. Synergic degradation of phenanthrene by consortia of newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology*, **144** (4): 293-298.
- Kuhn, E., Bellicanta, G.S., Pellizari, V.H. 2009. New *alk* genes detected in Antarctic marine sediments. *Environmental Microbiology*, **11** (3): 669-673.
- Kumar, S., Dudley, J., Nei, M., Tamura, K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, **9** (4): 299-306.

Lee, N-R., Hwang, M-O., Jung, G-H., Kim, Y-S., Kyung-Hee Min, K-H. 1996. Physical structure and expression of *alkBA* encoding alkane hydroxylase and rubredoxin reductase from *Pseudomonas maltophilia*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **218** (1): 17-21.

Li, G., Huang, W., Lerner, D.N., Zhang, X. 2000. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. *Water Research*, **34** (15): 3845-3853.

Lizardi, J. Manuel Alejandro. 2007. Evaluación del coeficiente de retención de la fase gaseosa como criterio para el escalamiento de un biorreactor de columna de burbujas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. p.p. 1-90.

Lizardi-Jiménez, M.A., Saucedo-Castañeda, G., Thalasso, F., Gutiérrez-Rojas, M. 2012. Simultaneous hexadecane and oxygen transfer rate on the production of an oil-degrading consortium in a three-phase airlift bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, **187**: 160-165.

Maeng, J.H., Sakai, Y., Tani, Y., Kato, N. 1996. Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of *n*-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *Journal of Bacteriology*, **178** (13): 3695-3700.

McDonald, I.R., Miguez, C.B., Rogge, G., Bourque, D., Wendlandt, K.D., Groleau, D., Murrell, J.C. 2006. Diversity of soluble methane monooxygenase-containing methanotrophs isolated from polluted environments. *FEMS Microbiology Letters*, **255** (2): 225-232.

Miton, Charlotte. 2008. *AlkB* gene identification and determination of his stability in a bacterial consortium of *Cyperus laxus* Lam, during the degradation of hexadecane in a bioreactor. Mémoire de stage. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. p.p. 1-35.

Morikawa, M., Hirata, Y., Imanaka, T. 2000. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1488** (3): 211-218.

Mukred, A.M., Hamid, A.A., Hamzah, A., Yusoff, W.M.W. 2008. Development of three bacteria consortium for the bioremediation of crude petroleum-oil in contaminated water. *Journal of Biological Sciences*, **8** (4) 73-79.

Muyzer, G., Hottentrager, S., Teske, A., Wawer, C. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16SrDNA-a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: *Molecular Microbial Ecology Manual* (A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 1-23.

Naoyuki, M., Keisuke, I., Julia, M.F. Murray, R.G. 2004. Saturable, energy-dependent uptake of phenanthrene in aqueous phase by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135. *Applied and Environmental Microbiology*, **70** (1): 363–369.

Neu, T.R. 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological reviews*, **60** (1): 151-166.

Noordman, W.H., Brusseau, M.L., Janssen, D.B., 2000. Adsorption of multicomponent rhamnolipides surfactant to soil. *Environmental Science and Technology*, **34** (5): 832-838.

Noordman, W.H., Janssen, D.B. 2002. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (9): 4502-4508.

Obuekwe, C.O., Al-Jadi, Z.K., Al-Saleh, E.S. 2009. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **63** (3): 273-279.

Owsianiak, M., Szulc, A., Chrzanowski, L., Cyplik, P., Bogacki, M., Agnieszka, K., Olejnik-Schmidt, Heipieper, H.J. 2009. Biodegradation and surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel by 218 microbial consortia are not correlated to cell surface hydrophobicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **84** (3): 545-553.

- Quijano, G., Huerta-Ochoa, S., Gutiérrez-Rojas, M. 2010. Assessment of the limiting step of mass transfer in n-hexadecane biodegradation in a bubble column reactor. *Water Science and Technology*, **62** (4): 906-914.
- Quijano, G. Guillermo. 2006. Evaluación de los coeficientes de transferencia de masa y cinéticos en un biorreactor de tres fases para la degradación de hexadecano. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. p. p.1-89.
- Ramírez-Saad, H.C., Sessitsch, A., de Vos, W.M., Akkermans, A.D.L. 2000. Bacterial community changes and enrichment of uncultured *Burkholderia*-like bacteria induced by chlorinated benzoates in a peatforest soil-microcosms. *Systematic and Applied Microbiology*, **23** (4): 591-598.
- Ratajczak, A., Geißdörfer, W., Wolfgang, H. 1998. Alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 is encoded by *alkM* and belongs to a new family of bacterial integral-membrane hydrocarbon hydroxylases. *Applied and Environmental Microbiology*, **64** (4): 1175-1179.
- Rodicio, M.R., y Mendoza, M.C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, **22** (4): 238-245.
- Ron, E.Z. y Rosenberg, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, **3** (4): 229-236.
- Ron, E.Z., Rosenberg, E. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current opinion in Biotechnology*, **13** (3): 249-252.
- Rosenberg, M., Hayer, E.A., De Larea, J., Rosenberg, E. 1982. Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Applied and Environmental Microbiology*, **44** (4): 929-937.
- Rosselló-Mora, R., Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, **25** (1): 39-67.

Sanguinetti, C.J., Díaz-Neto, E., Simpson, A.J.G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. *Biotechniques*, **17** (5): 915-919.

Sanin, S.L. 2003. Effect of starvation on resuscitation and the surface characteristics of bacteria. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, **38** (8):1517-1528.

Satpute, S.K., Banpurkar, A.G., Dhakephalkar, P.K., Banat, I.M., Chopade, B.A. 2010. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, **30** (2): 1-18.

Scheller, U., Zimmer, T., Becher, D., Schauer, F., Schunck, W.H. 1998. Oxygenation cascade in conversion of *n*-alkanes to α,ω -dioic acids catalyzed by cytochrome P450 52A3. *The Journal of Biological Chemistry*, **273** (4): 32528-32534.

Soon-Young, C., Lee, M-H., Hwang, M-O., Min, K-H. Biodegradation of saturated hydrocarbons by *Xanthomonas campestris* M12. *Korean Journal of Microbiology*, **32** (2): 172-175.

Supaphol, S., Panichsakpatana, S., Trakulnaleamsai, S., Tungkananuruk, N., Roughjanajirapa, P., O'Donnell, A.G. 2006. The selection of mixed microbial inocula in environmental biotechnology: Example using petroleum contaminated tropical soils. *Journal of Microbiological Methods*, **65** (3): 432-441.

Throne-Holst, M., Wentzel, A., Ellingsen, T.E., Kotlar, H-K., Zotchev, S.B. 2007. Identification of novel genes involved in long-chain *n*-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874. *Applied and Environmental Microbiology*, **73** (10): 3327-3332.

Ulrici, W. 2000. Contaminant soil areas, different countries and contaminant monitoring of contaminants. In: Environmental Process II. Soil Decontamination Biotechnology (H. J. Rehm y G. Reed Eds.), vol. 11, 5-42.

U.S. Environmental Protection Agency, 2009, Glossary of technical terms: U.S. Environmental Protection Agency, access date July 21, 2010.

van Beilen, J.B., Wubbolts, M.G., Witholt, B. 1994. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation*, **5** (3-4): 161-174.

van Beilen, J.B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A.G., Röthlisberger, M., Witholt, B. 2001. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane degradation gene clusters and flanking insertion sequences: Evolution and regulation of the *Alk*-genes. *Microbiology*, **147** (6):1621-1630.

van Beilen, J.B., Li, Z., Duetz, W.A., Smits, T.H.M., Witholt, B. 2003. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil and Gas Science and Technology*, **58** (4): 427-440.

van Beilen, J.B., Funhoff, E.G., van Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., Holtackers, R., Röthlisberger, M., Li, Z., Witholt, B. 2006. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (1):59-65.

van Beilen, J.B. y Funhoff, E.G. 2007. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **74** (1): 13-21.

Vasileva-Tonkova, E., Galabova, D., Stoimenova, E., Lalchev, Z. 2008. Characterization of bacterial isolates from industrial wastewater according to probable modes of hexadecane uptake. *Microbiological Research*, **163** (4):481-486.

Vidali, M. 2001. Bioremediation. an overview. *Pure and Applied Chemistry*, **73** (7): 1163-1172.

Vomberg, A. y Klinner, U. 2000. Distribution of *alkB* genes within n-alkane-degrading bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, **89** (2): 339-348.

Wheelis, M.L. 1975. The genetics of dissimilarity pathways in *Pseudomonas*. *Annual Review of Microbiology*, **29**: 505-524.

Whyte, L.G., Schultz, A., van Beilen, J.B., Luz, A.P., Pellizari, V., Labbé, Greer, C.W. 2002. Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. *FEMS Microbiology and Ecology*, **41** (2): 141-150.

Youssef, N.H., Duncana, K.E., Naglea, D.P., Savagea, K.N., Knappb, R.M., McInerney, M.J. 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, **56** (3): 339-347.

Zhao, Z., Selvam, A., Jonathan Woon-Chung Wong, J. W-C. 2011. Effects of rhamnolipids on cell surface hydrophobicity of PAH degrading bacteria and the biodegradation of phenanthrene. *Bioresource Technology*, **102**: 3999-4007.

Zikmanis, P., Shakirova, L., Auzina, L., Andersone, I. 2007. Hydrophobicity of bacteria *Zymomonas mobilis* under varied environmental conditions. *Process Biochemistry*, **42** (4): 745-750.

ZoBell, C.E. 1950. Assimilation of hydrocarbons by microorganisms. *Advances in Enzymology*, 10: 443-486.

12. ANEXOS

Anexo 1. Secuencias de los genes ribosomales RNAr 16S

Xanthomonas sp. (1458pb)

5'AACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCCCATGGGT
GGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATGCATCGGAATCTACTCTGTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACT
TACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGGCCTTGCGCGATTGAATGAGC
CGATGTCGGATTAGCTAGTTGGGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAG
GATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
GACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCCCTT
TTGTTGGGAAAGAAAAGCAGTCGGTTAATACCCGGTTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCT
AACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGC AAGCGTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG
TGCCTAGGTGGTTGTTAAGTCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGG
GCCACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGTGGAAATTCGCCGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATCGGGAGG
AACATCCGTGGCGAAGGCGACTACCTGGCCCAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAA
CAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCCGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCAGCG
AGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAAT
TGACGGGGGCCCGCCAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGGGAAGAACCTTCCTGGT
CTTGACATCCAGGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGG
CTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCTCCTAGTTGC
CAGCACGTAATGGTGGAACTCTAAGGAGACCGCCGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTC
AAGTATCATGCCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTAACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAACC
CGCGAGGGCTAGCCAATCCCAGAAACCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAA
GTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCG
CCCGTACACCAATGGGAGTTTGTTCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACG
GTGTGGCCGATGACT3'

Acinetobacter bouvetii (1425pb)

5'CGCTGGCGGCAGGCTTACACATGCAAGTCGAGCGGGGAAGGGTAGCTTGCTACCTAACCTAGCGGC
GGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATTCCGAAAGGAATGCTAATACC
GCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGACCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATT
AGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGG
AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGG
AGGCTACTCTAGTTAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCC
AGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGCG
GCTGATTAAGTCGGATGTGAAATCCCTGAGCTTAACCTTAGGAATTGCATTGATACTGGTCAGAGT
ATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGC
GAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTATTGGCGCAGCTAA
CGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCCGAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCC
CACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCTTGACATAGTAAG
AACTTTCCAGAGATGATTGGTGCCTTCGGGAACCTTACATACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCTTATTTGCCAGCGGGTTAAGCG
GGAACTTAAGGATACTGCCAGTGACAAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTC AAGTCATCATGGCCCT
TACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGATCAAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAGGATGCTAA
TCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAA
TCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGA
GTTTGTTCACCAGAAGTAGGTAGTCTAACCGTAAGGAGGACGC3'

Shewanella sp. (1438pb)

5'AACGCTGGCGGCAGGCTTACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACATGGGAGTTTACTTCTGAGGTGG
CGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGGATCTGCCAGTCGAGGGGATAACAGTTGGAAACGAC
TGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGGAGGGGACCTTCGGGCCTTCGCGATTGGATGAACCT
AGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGTTCTGAGAGGAT
GATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC
AATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCA
GTAGGGAGGAAAGGGTGTAGCTTAATACGCTATATCTGTGACGTTACCTACAGAAAAAGGACCGGCTAAC
TCCGGTCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGCCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTG
CGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTAGGAATAGCATTTCGAACTGGCG

AACTAGAATCTTGTAAAGGGGGGTAAAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAAT
 ACCGGTGGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
 GGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTCGGAGTTTGGTGTCTTGAACACTGGGC
 TCTCAAGCTAACGCATTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAATGAATTGAC
 GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTG
 ACATCCACAGAATTCGCTAGAGATAGATTAAGTGCCTTCGGAAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTC
 GTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTATTTGCCAGCA
 CGTAATGGTGGGAACTCTAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTC
 ATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGAGTACAGAGGGTTGCAAAGCCGCGA
 GGTGGAGCTAATCTCACAAGCTCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGG
 AATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
 ACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAGAAGTGGGTAGCTTAACCTTCGGGGGGCGCTCAC3'

***Defluviobacter lusatiensis* (1386pb)**

5'CGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTA
 ACGCGTGGGAATCTACCTTTTGTACGGAATAACTCAGGGAACTTGTC TAATACCGTATGTGCCCTTC
 GGGGGAAAGATTTATCGGCAAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACC
 AAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT
 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAG
 TGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAAGCTCTTTTCACGGTGAAGATAATGACGGTAACCGTAGAAGAAGCC
 CCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTGGAATTAAGGGCGT
 AAAGCGCAGTAGGCGGATCGATCAGTTAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGAACTGCCTCTAA
 TACTGTGATCTCGAGTTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCG
 GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG
 CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGAAGCTAGCCGTCGGGCAGTTTACTG
 TTCGGTGGCGCAGTTAACGCATTAAGCTTCCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAATAACTCAAAGG
 AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGCAGAACCTTACCA
 GCCCTTGACATCCCGATCGCGGACAGTGGAGACATTGTCTTCAGTTAGGCTGGATCGGTGACAGGTGC
 TGCATGGCTGTCTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCC
 TTAGTTGCCCTTATTAAGTTAGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGA
 TGACGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCA
 GCGAGACCGCGAGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTG
 CATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC
 ACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGCGCTAACCCGCAAGGGAGGCAGGC
 GACCACGGTA3'

Anexo 2. Secuencia del gen *alkM* en *A. bouvetii*.

Gen alkM en A. bouvetii (945 pb)

5'GACCCGAACGACCGGCCAGCGGGACCGACGTTACGATATTATTGTTGTTCCAGCTATGCTCTGGCATT
GTACGTTGATACTTGCCGTTTGCATCTTTTTGACGTTATTAACCATAGTGTTCAATATAGTTAATAATTTCA
AATAAACTAATGCCATAAAATGCTTGAGTTGTAAATATGGAATTACACCTTTTCCAAATAAACAACCATTTG
AACCATGAAATGCAGCACTCATGCCCAACCTTGTAACTCAATTTCTGTAGACCAGAACTCTTTGCCT
TTACGTTTTAAACGATTGGTTTCAATCTCAATTGCAGATTTTAAAGAACCAATCACTGTACGTGGCCAAAAT
TCGTA AAAAGTCTCTCCATTTGTGAAGACGCTGGATCTTCAGGAGTTCGGCACGCTTATGATGACCGTA
AGGATGTTCAACACGGAAATGGTTATAACCTGTAGGTACCAATGCTAAGTGAGAAAGAATATGATCAATAC
GATCATGTTTATGACTCAACTCGTGTGCCGTATTAATGGCGATACCATTGATCGCACCCATTGAAACACCA
AGCAAAATTTTATCAAGAAAAGAGGTTTCTTTTCGGCTTGTTAAATAACATGCATATAAGTTCGCTGCATAT
TGTAATGGAATAAAGCTTTTTACTAAGCGAGAATAATACGGATCTTTTTCCAGCAATTTAATATCTTCATCG
CTTGATTATTCGCATCTTTACCAATAATCGTATCAATTGTTGGAATGACAATATGTAAAACAATCGGTCCG
CCCAAAGCAAAAATTTCTTTAGGGGGACGTGGTGCAATTGATAACCTGCTAAAATTCCAATTCCAATTA
CAGGTAAAGCTGGGGCTGATGGCCCATAGAAACGTCGAAATTTCTTCTCACACACACACAAAATAAAAA
AACACACCTTAGGCACTA 3'

Anexo 3. Artículo de investigación

***Comparison of mechanisms of hexadecane uptake among pure
and mixed cultures derived from a bacterial consortium***

Olivia Tzintzun-Camacho^a, Octavio Loera^a, Hugo C. Ramírez-Saad^b, Mariano Gutiérrez-
Rojas^{a*}

^a*Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av.
San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, C.P. 09340, D.F., México.*

^b*Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco,
Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Coyoacán, C.P. 04960, D.F., México*

*Corresponding author. Tel.: +52 (55) 58 04 65 05; Fax: +52 (55) 58 04 64 07

e-mail address: mgr@xanum.uam.mx

Present address: Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-
Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, C.P. 09340, D.F.,
México

International Biodeterioration and Biodegradation (2012), **70**: 1-7.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Biodeterioration & Biodegradation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibiod

Comparison of mechanisms of hexadecane uptake among pure and mixed cultures derived from a bacterial consortium

Olivia Tzintzun-Camacho^a, Octavio Loera^a, Hugo C. Ramírez-Saad^b, Mariano Gutiérrez-Rojas^{a,*}

^aDepartamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, C.P. 09340, D.F., México

^bDepartamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Coyoacán, C.P. 04960, D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 January 2012

Received in revised form

30 January 2012

Accepted 31 January 2012

Available online xxx

Keywords:

Uptake mechanisms

Hexadecane

Cell surface hydrophobicity

Biosurfactants

Emulsification

ABSTRACT

Members of a bacterial consortium were isolated from an oil-contaminated site in Veracruz, Mexico and identified as *Xanthomonas* sp., *Acinetobacter bouvetii*, *Shewanella* sp. and *Deftuvibacter lusatiensis*. We compared mechanisms of hexadecane (HXD) uptake by pure and mixed cultures based on cell surface hydrophobicity (CSH), biosurfactant production and emulsification capacity. HXD was removed by the pure cultures of *A. bouvetii* ($72 \pm 4\%$), *Xanthomonas* sp. ($46 \pm 4\%$) and *D. lusatiensis* ($40 \pm 6\%$), but not by *Shewanella* sp. Mixed cultures showed an enhanced HXD removal, particularly with the whole consortium ($79 \pm 3\%$) and when *Xanthomonas* sp. and *A. bouvetii* were combined ($74 \pm 7\%$). *A. bouvetii* was the only biosurfactant producer. Based on removal abilities, the uptake mechanisms were evaluated for *A. bouvetii* and the consortium. Our findings indicated that *A. bouvetii* combined both direct contact and biosurfactant-mediated uptake. For the consortium the two uptake mechanisms took place; however, the emulsification was predominant after 5 days. Differences in the uptake mechanisms by tested cultures suggested that the prevalence of one or another mechanism depends on changes in the CSH, the emulsification extent and associations among strains. Our results contribute to understand the HXD uptake mechanisms by pure and mixed cultures and reveal *A. bouvetii* as a potential biosurfactant producer.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Petroleum is a complex mixture of hydrocarbons that is continuously released to the environment due to its massive use and extraction activities, leading to the contamination of a large number of soils. Microbial degradation has been the main process used to remove organic contaminants from the environment. Therefore, several pure strains and microbial consortia able to degrade hydrocarbons have been isolated from contaminated sites for their utilization as inocula for soil bioremediation purposes (Supaphol et al., 2006; Ito et al., 2008). Also several attempts to design microbial consortia and evaluate their abilities to degrade crude oil have been conducted, as well (Rahman et al., 2002; Ghazali et al., 2004; Díaz-Ramírez et al., 2008). The advantages of using mixed cultures rather than pure cultures for bioremediation purposes have been demonstrated, these benefits are mainly attributed to the synergistic effects of interactions between members of these associations (Mukred et al., 2008).

Although most hydrocarbons are biodegradable, the rates of biodegradation are limited due to their hydrophobicity and low water solubility (9×10^{-4} mg l⁻¹ at 25 °C for hexadecane), which necessitates that microbial cells have specific transport mechanisms (Abalos et al., 2004). For long-chain alkanes, which are practically non-water soluble, two uptake mechanisms are generally considered for degrading microorganisms: (i) interfacial accession (i.e. direct contact of cells with hydrocarbons droplets), which requires a high cell surface hydrophobicity (CSH) and (ii) biosurfactant-mediated hydrocarbon uptake (Bouchez-Naitali et al., 2001; van Hamme and Ward, 2001). For example, Bouchez-Naitali et al. (1999) determined the mechanisms of hydrocarbon uptake by different bacteria and found that the direct interfacial uptake was the most frequent mechanism. Some microorganisms deal with the low solubility of hydrocarbons by excreting biosurfactants, which are compounds that decrease the surface and interface tension. Biosurfactants enhance the hydrocarbon biodegradation by two mechanisms: (i) promoting emulsification of hydrophobic compounds to micelle structures, and (ii) inducing higher cell surface hydrophobicity, thus increasing the direct physical contact between the cell and the poorly water-soluble substrate (Miller, 1995; Vasileva-Tonkova et al., 2008). The

* Corresponding author. Tel.: +52 (55) 58 04 65 05; fax: +52 (55) 58 04 64 07.
E-mail address: mgr@xanum.uam.mx (M. Gutiérrez-Rojas).

production of biosurfactants by HXD-degrading strains is a frequent phenomenon which occurs in microorganisms possessing either hydrophobic or hydrophilic cell surfaces (Bouchez-Naitali and Vandecasteele, 2008).

Some studies have found a correlation between the hydrocarbon degradation and the cell surface changes in pure cultures as a result of the use of surfactants (Kaczorek et al., 2008; Obuekwe et al., 2009). For instance, pure cultures of *Rhodococcus* sp. and *Mycobacterium* sp. have reportedly increased the CSH to facilitate the uptake of hydrophobic substrates (Bredholt et al., 2002; Wick et al., 2002). However, few studies have been focused on the role of CSH in the hydrocarbon degradation by mixed cultures. Recently, Cavalca et al. (2008) reported changes in the CSH of two mixed cultures and their respective isolates, suggesting that the CSH modulation played an important role in the phenanthrene uptake and assimilation. In this context, the wide-spread occurrence of hydrophobic cell-surface character among microbial members of hydrocarbon-degrading populations may be a favorable feature for hydrocarbon-contaminated soil bioremediation (Obuekwe et al., 2009). Also, while the insoluble substrate uptake mechanisms have been studied for pure cultures their contribution is not clear yet for mixed populations and consortia. Therefore, this study was conducted to compare the HXD removal abilities of pure and mixed bacterial cultures and define the HXD uptake mechanisms based on the CSH, the biosurfactant production and emulsification capacity. Our mixed cultures were derived from a bacterial consortium previously isolated from an oil-contaminated site (Díaz-Ramírez et al., 2003).

2. Materials and methods

2.1. Culture media

Trypticasein soy agar (TSA, Bioxon) and nutrient broth (Bioxon) were used to isolate the bacterial strains. Pure and mixed culture assays were conducted using a mineral medium (MM) with the following composition (g l^{-1}): 6.75, NaNO_3 ; 2.15, K_2HPO_4 ; 1.13, KCl; 1.10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 13 g l^{-1} , hexadecane (HXD) (reagent grade 99%, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The initial pH was adjusted to 6.5 with 1N HCl.

2.2. Bacterial strain isolation

Samples from a bubble column reactor operated in sequential batch with HXD as the sole carbon source were used to obtain the bacterial consortium (Quijano et al., 2010). The bioreactor was initially inoculated with a bacterial suspension obtained from the rhizosphere of *Cyperus laxus* Lam, a native plant able to grow in a highly contaminated swamp adjacent to an operating refinery in Veracruz, México (Díaz-Ramírez et al., 2003). Samples from the bioreactor (10 ml) were diluted in a physiological solution and spread on Petri dishes with TSA. Isolated colonies were then transferred and cultivated again on TSA to recover pure colonies. Four morphologically distinct colonies were isolated and identified by nucleotide sequence analysis of the 16S rRNA genes. All isolates were deposited in the ENCB-IPN WDCM449 culture collection and are freely available upon request.

2.3. Bacterial molecular identification

2.3.1. DNA extraction

Obtained bacterial strains were cultured in 125 ml flasks containing 50 ml nutrient broth. The cultures were incubated (30°C ; 200 rpm; 48 h) in a rotary shaker (Shaker Series I 26; New Brunswick Scientific Co. NY, USA). The DNA was extracted from each culture using a Wizard kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the

manufacturer's instructions. Extracted DNA was resuspended in TE buffer and kept at -20°C until its use. DNA extracts were visualized in 1% agarose gels following standard procedures.

2.3.2. PCR amplifications and DGGE

Two PCR amplifications were conducted. To determine possible differences in the *rrn* operons and confirm that the 4 bacterial strains were different, the V6–V8 regions (470 bp) of the 16S rRNA gene was amplified as previously described (Ramírez-Saad et al., 2000). DGGE was conducted according to the method described by Muyzer et al. (1996), while silver staining and gel preservation by following Sanguinetti et al. (1994) techniques. Also, almost the entire 16S rRNA gene was amplified by PCR with primers and conditions described by Ramírez-Saad et al. (2000). The PCR products were purified using a System Montage SEQ Cleanup kit (Millipore Corp, Billerica, MA, USA).

2.3.3. Sequence analysis

Purified PCR products were adjusted according to the conditions required by the sequencing service provider (Macrogen Inc, Korea). Sequence analysis of the 16S rRNA genes from isolates was approached with the following bioinformatic tools: *Identify tool* from Ez Taxon Server, v.2.1 (Chun et al., 2007); *Classifier tool* from the Ribosomal Database Project-II Release 9 (Cole et al., 2009). Similarities were calculated using Mega v.2.1 (Kumar et al., 2008). Sequences were deposited on GenBank under the accession numbers HQ424441 to HQ424444.

2.4. Hexadecane uptake assays by pure and mixed cultures

Separated pure cultures were conducted in 125 ml serological bottles containing MM (50 ml) and were inoculated with variable volumes (enough to adjust to $1 \times 10^6 \text{ CFU ml}^{-1}$) of cultures previously grown on nutrient broth (30°C ; 200 rpm; 48 h). Inocula were conducted on nutrient broth since one of the bacterial strains was not able to grow on HXD as the sole carbon source. Mixed cultures were designed by mixing two, three or four strains and the following ratios: 1:1, 1:1:1 or 1:1:1:1. Variable volumes of inocula of single cultures were mixed to constitute the corresponding mixed culture (final concentration was $1 \times 10^6 \text{ CFU ml}^{-1}$). Both pure and mixed cultures were incubated (30°C ; 200 rpm; 48 h) and sampled at 0, 2, 5, 10, and 15 days. Non-inoculated serological bottles were used as abiotic controls. Analyses of the bacterial growth, residual HXD, cell hydrophobicity and emulsified HXD were conducted. All data were analyzed in triplicate.

2.5. Analytical methods

2.5.1. Bacterial growth and residual hexadecane

Culture growth was determined by viable counts on Petri dishes containing TSA, the dishes were incubated at 30°C and colonies were quantified after 48 h. The bacterial growth was expressed as colony forming units (CFU). The residual HXD was determined by centrifuging samples in Corex tubes at 8000 rpm for 30 min (Eppendorf; Centrifuge 5810 R; Hamburg, Germany). Culture supernatants (35 ml) were liquid–liquid cold extracted in glass-separating funnels by mixing with an equal volume of a hexane–acetone mixture (1:1; v/v). Funnels were left 30 min at room temperature until the phases were separated. The recovered HXD was quantified by gas chromatography (Varian; Star 3900 GC; California, USA) according to Velasco-Alvarez et al. (2011). A flame ionization detector and an AT-1HT column were used ($15 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.10 \mu\text{m}$, Alltech Heliflex, Illinois, USA) with helium as the carrier (30 ml min^{-1} ; 40 psi). The oven was heated to 120°C ($30^\circ\text{C min}^{-1}$), then the temperature was increased to 150°C ($10^\circ\text{C min}^{-1}$) and 170°C ($15^\circ\text{C min}^{-1}$). The sample volume injected was 2 μl .

2.5.2. Biosurfactant production

Biosurfactant concentration in culture broths was detected by the oil spread method according to Morikawa et al. (2000) and modified as follows: 25 μ l of Maya crude oil (Mexican Institute of Petroleum) were added to 25 ml of distilled water on a Petri dish (8.5 cm diameter) to form a thin membrane. Then, 10 μ l of the culture were added to the oil surface. A clear area formed after oil displacement was measured as the biosurfactant activity. This area was finally related to the biosurfactant concentration by using the standard commercial chemical surfactant Tween 20 (Hycl, Mexico). The standard curve was prepared with concentrations of Tween 20 ranging from 0.03 to 0.66 g l⁻¹. All determinations were analyzed by triplicate.

2.5.3. Cell surface hydrophobicity

Bacterial adherence to HXD was determined according to the method proposed by Bouchez-Naïtali et al. (1999) and modified as follows: cultures (1.5 ml) were centrifuged in Eppendorf tubes (8000 rpm; 30 min), then cells were washed twice and resuspended in a phosphate buffer 1 M pH 7. The resulting suspension was then adjusted to an OD_{600nm} of 0.5 (Varian; Cary 50 Con UV–Vis; Santa Clara, CA, USA). Cell suspensions (1.5 ml) were added with HXD (75 μ l) and then vortexed for 3 min. After the phase separation, the optical density (600 nm) was measured in the aqueous phases. The hydrophobicity was expressed as the percentage of adherence to HXD. Cells were considered to be hydrophilic when the adherence to HXD was below 10%, whereas a hydrophobic trait was considered when adherence to HXD was above 60% (Bouchez-Naïtali et al., 1999).

2.5.4. Emulsification capacity

The ability of culture supernatants to emulsify HXD was determined according to the method described by Bouchez-Naïtali and Vandecasteele (2008). Briefly, the cell-free supernatants (1 ml) added with HXD (200 μ l) were vortexed for 2 min, and the optical density (600 nm) was then registered after 2 and 24 h of settling.

2.6. Statistical analyses

All determinations were carried out in triplicate and data were then evaluated by analysis of variance (one-way ANOVA) with a $p \leq 0.5$. All analyses were conducted using the statistical package SPSS v.15.0 (SPSS Inc.; IBM Company; Chicago, IL, USA). Results are expressed as means obtained from three replicates with their corresponding standard deviations.

3. Results

3.1. Bacterial identification

Four morphologically distinct colonies were isolated from bioreactor samples operated in 14-days sequential batch cycles with HXD as the sole carbon source. DGGE profiles of the V6–V8

regions of the 16S rRNA genes of these isolates confirmed that the four strains were different (data not shown). Analyses of the almost full length 16S rDNA nucleotide sequences showed that the strains belonged to different genera in the Phylum Proteobacteria (Table 1). The four strains were Gram negative bacteria, three of which belong to the Gammaproteobacteria class (*Xanthomonas* sp., *Acinetobacter bouvetii* and *Shewanella* sp.), while *Deftuvibacter lusatiensis* is an Alphaproteobacteria.

3.2. Hexadecane uptake by pure cultures

In order to determine the ability of pure strains to remove HXD and understand their role in the consortium, we evaluated the HXD uptake of pure cultures (Fig. 1a). A rapid decline in HXD concentration was observed for *Xanthomonas* sp. and *D. lusatiensis* during the first 2 days; however, after 5 days of culture there were no significant differences in the HXD removal. In the case of *A. bouvetii*, constant removal was observed between 5 and 10 days and the minimum HXD concentration was attained after 15 days (4 ± 0.4 g l⁻¹). In contrast, *Shewanella* sp. was not able to remove HXD. During 15 days of culture, the highest HXD uptake efficiency was achieved for *A. bouvetii* ($72 \pm 4\%$), followed by *Xanthomonas* sp. ($46 \pm 4\%$) and *D. lusatiensis* ($40 \pm 6\%$). A direct relationship between HXD removal and bacterial growth was clearly observed (Fig. 1a and b). Also, a death phase was observed for *Xanthomonas* sp. and *D. lusatiensis* after 10 days of culture.

3.3. Hexadecane uptake by mixed cultures

To elucidate the type of associations involved in the bacterial populations when HXD is removed, four different mixed cultures were designed and their degrading abilities were investigated. The highest values of HXD uptake within 15 days were registered for the mixed culture with *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii* ($74 \pm 7\%$) and for the consortium including the four strains ($79 \pm 3\%$) (Fig. 2a). However, when the mixed culture of *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii* was added with another strain, the HXD uptake efficiency was significantly decreased. In the mixed cultures composed of *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii*+*Shewanella* sp. and by *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii*+*D. lusatiensis*, maximum values of 49 ± 8 and $52 \pm 4\%$, respectively were achieved. Interestingly, while the HXD removal was high for the consortium and the mixed culture with *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii*, the bacterial growth in such cultures was not significantly improved compared to the rest of mixed cultures (Fig. 2b). Total growth profiles (measured as viable counts) were similar for the four mixed cultures, attained about $2.7 \pm 0.06 \times 10^9$ CFU ml⁻¹.

3.4. Biosurfactant production

To detect biosurfactant producing bacterial strains during HXD removal, we tested the oil spread method. The biosurfactant concentration was determined in the culture broth obtained from

Table 1
Identification of a defined bacterial consortium by nucleotide sequence analysis (16S rRNA gene).

Strain	WDCM449 culture collection number	GenBank accession number	Sequence length (bp)	Most related sequence	16S rRNA similarity (%)
<i>Xanthomonas</i> sp. strain UAM58	ENCB-MG-075	HQ424444	1458	<i>X. pisi</i> (Y10758)	97.3
<i>Acinetobacter bouvetii</i> strain UAM25	ENCB-MG-076	HQ424441	1425	<i>A. bouvetii</i> (AF509827)	99.1
<i>Shewanella</i> sp. strain UAM38	ENCB-MG-077	HQ424443	1438	<i>S. putrefaciens</i> (X81623)	97.2
<i>Deftuvibacter lusatiensis</i> strain UAM86	ENCB-MG-078	HQ424442	1386	<i>D. lusatiensis</i> (AJ132378)	99.8

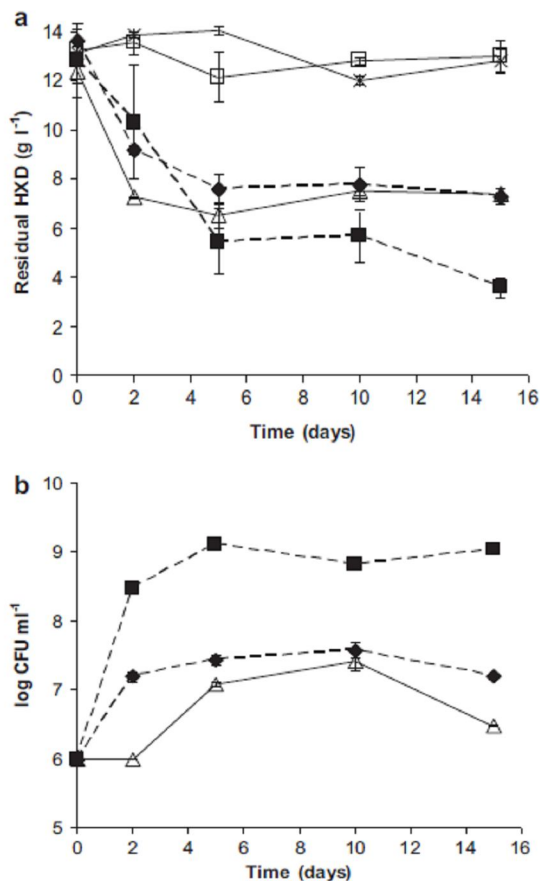


Fig. 1. Pure cultures kinetics: (a) residual HXD, (b) bacterial growth. *Xanthomonas* sp., (—●—); *A. bouvetii*, (---■---); *Shewanella* sp., (—□—); *D. lusatiensis*, (---Δ---); Abiotic control, (—▲—). Each value is the mean of three replicates \pm standard deviations (error bars).

the four bacterial strains grown separately on HXD. *A. bouvetii* was the only strain able to produce biosurfactants during HXD uptake. As shown in Fig. 3, the concentration of biosurfactants produced by *A. bouvetii* increased rapidly during the first 5 days, reaching a maximum value of 0.17 ± 0.03 g l⁻¹ equivalents of Tween 20, and then declined.

3.5. Cell surface hydrophobicity and emulsification capacity in *A. bouvetii*

Since *A. bouvetii* was the only strain that produced biosurfactants and the best degrader, we evaluated its CSH and its ability to emulsify HXD to determine the probable mechanisms of HXD uptake. The CSH was assessed as a measure of the potential cell affinity for hydrophobic substrates and it could be also related to the HXD removal. As shown in Fig. 4a, *A. bouvetii* was hydrophilic ($6.2 \pm 2\%$ adherence) at 0 days, since was pre-grown on nutrient broth (hydrophilic carbon source). However, when the culture was exposed to HXD, the cells acquired a remarkable hydrophobic character ($80 \pm 7\%$ adherence) during the first 2 days period.

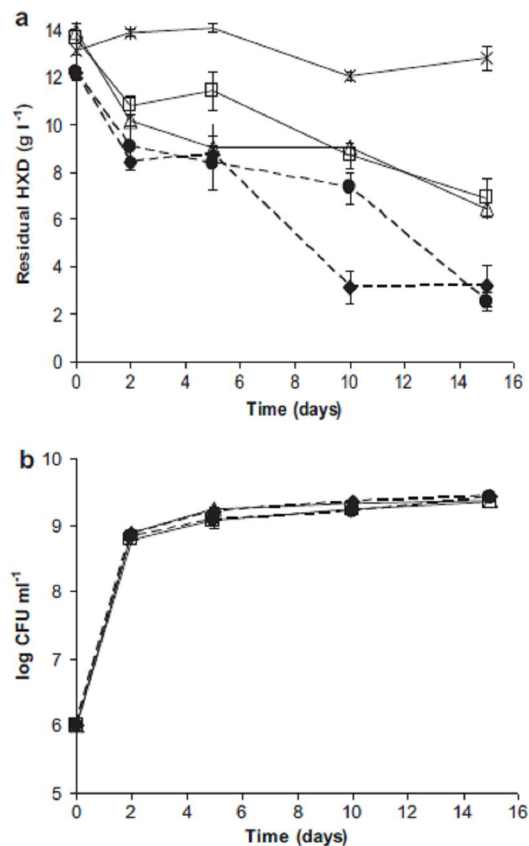


Fig. 2. Mixed cultures kinetics: (a) residual HXD, (b) bacterial growth. *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii*, (—●—); *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii*+*Shewanella* sp., (---□---); *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii*+*D. lusatiensis*, (—Δ—); Consortium, (---●---); Abiotic control, (—▲—). Each value is the mean of three replicates \pm standard deviations (error bars).

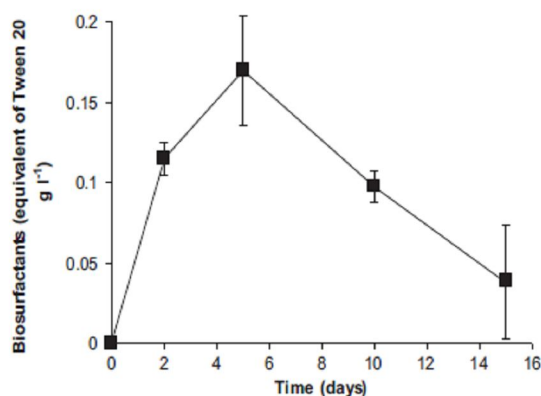


Fig. 3. Kinetic of biosurfactant production by *A. bouvetii* expressed as equivalent of Tween 20 as standard surfactant. Each value is the mean of three replicates \pm standard deviations (error bars).

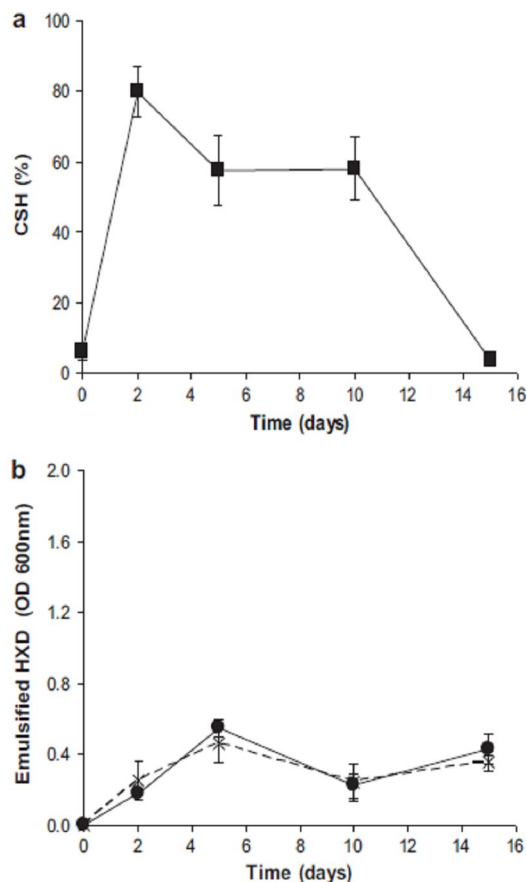


Fig. 4. Culture properties of *A. bouvetii* during HXD consumption: (a) cell surface hydrophobicity (CSH) (—■—) and (b) emulsification capacity. Emulsified HXD after 2 h, (—●—); emulsified HXD after 24 h, (---▲---). Each value is the mean of three replicates \pm standard deviations (error bars).

Although, the culture retained a hydrophobic trait (adherence to HXD above 60%) until 10 days, this character was lost at the end of culture time. Also, emulsifying activity of *A. bouvetii* was observed in the cell-free supernatants at 2 h and 24 h (Fig. 4b). Interestingly, the emulsification capacity increased in the first 5 days, which was retained without significant changes until 15 days. The emulsions formed were stable for at least 24 h.

3.6. Cell surface hydrophobicity and emulsification capacity in the bacterial consortium

In order to determine and compare the mechanisms of HXD uptake when *A. bouvetii* was combined with other strains, we evaluated the CSH and the emulsification capacity of the bacterial consortium (Fig. 5). Initially, the inoculum pre-grown on nutrient broth depicted a hydrophilic trait ($9 \pm 3\%$ adherence). However, when the culture was exposed to HXD a hydrophobic character was observed reaching a maximum cell adhesion to HXD in 5 days ($54 \pm 3\%$). Conversely to *A. bouvetii*, the adherence to HXD persisted below 30% up to the end of culture, i.e. close to hydrophilic trait.

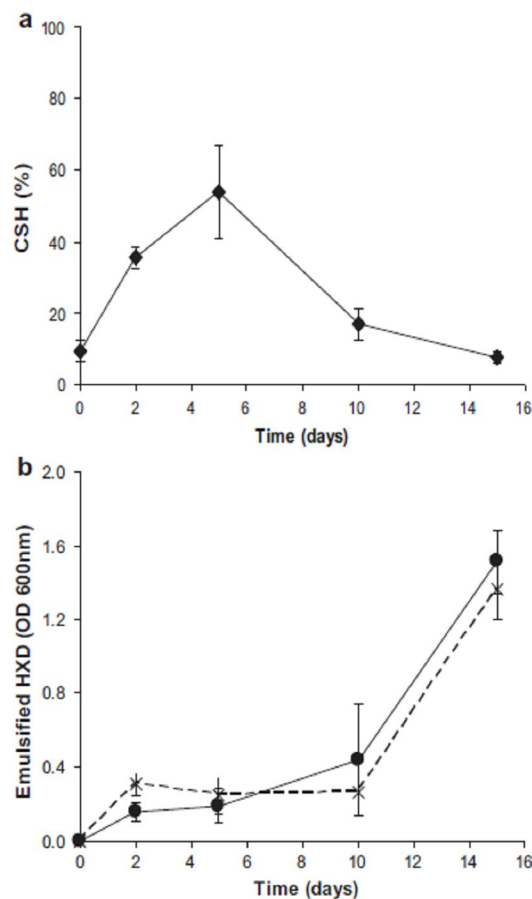


Fig. 5. Culture properties of the bacterial consortium during HXD consumption: (a) cell surface hydrophobicity (CSH) (—●—) and (b) emulsification capacity. Emulsified HXD after 2 h, (—●—); emulsified HXD after 24 h, (---▲---). Each value is the mean of three replicates \pm standard deviations (error bars).

Moreover, the emulsification capacity in the consortium increased after 5 days and was higher than those attained with *A. bouvetii*, resulting in a stable emulsion that persisted even after 24 h.

4. Discussion

Four isolated strains were identified by nucleotide sequence analysis of 16S rRNA genes. The taxonomic levels were determined according to the proposal by Rosselló-Mora and Amann (2001); in which the percentages of similarity between the query sequence and the closest sequence to assign genus and species should be $\geq 95\%$ and 97.5% , respectively. As a result, two strains were identified to the species level and the other two the genus level.

Our findings showed that three of the four strains were able to remove HXD (Fig. 1), some species of *Xanthomonas* (Li et al., 2000) and *Acinetobacter* (Throne-Holst et al., 2007) have been reported to degrade alkanes. The genus *Shewanella* has been found as part of bacterial community in Arctic sea-ice and its HXD-degrading ability has been reported to below 2% (Gerdes et al., 2005). Although,

D. lusatiensis has been identified as a chlorophenol degrader (Fritsche et al., 1999), our results showed that this strain was able to remove HXD. Moreover, *A. bouvetii* was first isolated from activated sludge plants in Victoria, Australia (Carr et al., 2003). To our knowledge *A. bouvetii* was never reported as hydrocarbon degrader and this work reveals its high HXD removal ability.

For the mixed culture with *Xanthomonas* sp.+*A. bouvetii* and the consortium an enhanced HXD removal was attained (Fig. 2). These results suggest that cooperative metabolic activities could be involved among the consortium members, which could facilitate the exchange of metabolic products. In fact, we observed that after 10 days, the co-culture of *Xanthomonas* sp. with *A. bouvetii* significantly enhanced the HXD uptake ($74 \pm 4\%$) compared to uptake when *Xanthomonas* sp. was grown alone ($46 \pm 4\%$). Similarly, Kim et al. (2009) found a low phenanthrene degradation ability by pure bacterial cultures of *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca*, and *Stenotrophomonas maltophilia*, which was notably increased (>80%) when such bacteria were grown as mixed cultures. The synergistic interactions involved during hydrocarbon uptake by mixed cultures may be complex and could imply the successive removal of toxic metabolites of the species preceding (Ghazali et al., 2004). In our work, the HXD removal ability of the bacterial consortium was not affected by the presence of *Shewanella* sp. or *D. lusatiensis* as compared to the rest of mixed cultures tested (Fig. 2). However, the population distribution in the consortium changed during the culture time, while *A. bouvetii* was predominant during 10 days, the growth (total viable counts) of *Shewanella* sp. and *D. lusatiensis* increased after 10 days. These results suggest that *Shewanella* sp. and *D. lusatiensis* could be using as carbon source the partially oxidized metabolites produced by *A. bouvetii* and *Xanthomonas* sp.

In our work, *A. bouvetii* was the only strain able to produce biosurfactants, detected since the first 2 days of culture period (Fig. 3), indicating that these compounds were necessary for the HXD removal since the beginning of the culture. In *Acinetobacter* the production of polysaccharide bioemulsifiers is concurrent with the stationary phase. Particularly, emulsan of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 can be detected in cultures only after 10 h of growth, and maximal production occurs when the culture has progressed into the stationary phase (Ron and Rosenberg, 2001). Conversely, the biosurfactants (rhamnolipids) produced by *Pseudomonas aeruginosa* GL1 (hydrophilic strain) were detected during all the culture (Bouchez-Naïtali and Vandecasteele, 2008).

Based on removal abilities of *A. bouvetii*, the uptake mechanisms were evaluated. Our results indicate that both direct contact and the biosurfactant-mediated uptake took place in the HXD removal by *A. bouvetii* (Fig. 4). The relative distribution of the modes of hydrocarbon uptake by bacteria has been reported and the genus *Acinetobacter* has developed two general strategies for enhancing contact with hydrocarbons: emulsification and adherence. For example, Rosenberg et al. (1982) described numerous fimbriae on the cell surface of *A. calcoaceticus* RAG-1 growing on HXD and suggested that these play a part in achieving adhesion of the cell to hydrocarbon droplets. Also, *A. calcoaceticus* RAG-1 is able to produce a high molecular mass bioemulsifier as emulsan in the presence of crude oil (Ron and Rosenberg, 2002). In the case of *A. bouvetii* its high removal ability could be explained by the changes in the CSH and the emulsification capacity. Several factors can modify the CSH, among these there are environmental conditions such as ionic strength, pH, temperature and the presence of polyvalent ions (Zikmanis et al., 2007; Baoyu et al., 2008). Additionally, the insertion of amphiphilic molecules (such as biosurfactants) in the microbial surface layers can modify the cell surface and make it more hydrophobic (Hua et al., 2003). Our findings showed that changes in the CSH of *A. bouvetii* were initially induced by changing the carbon source at the beginning of culture.

Also, the emulsification capacity, at least during the first 5 days, was a direct consequence of the biosurfactant concentration.

The probable mechanisms of HXD uptake for the consortium were also analyzed and compared to that observed in *A. bouvetii* (Fig. 5). Interestingly, the hydrophobic character of *A. bouvetii* acquired over time was not observed when it was combined with other strains, indicating that the CSH of *A. bouvetii* was affected by the presence of other bacterial species. Our findings suggest that both direct contact and biosurfactant-mediated uptake took place during HXD removal for the consortium and the emulsification appeared to be predominant after 5 days. For pure cultures, the mechanisms of hydrocarbon uptake have been well studied based on the CSH and the biosurfactant production (Bouchez-Naïtali et al., 1999; Vasileva-Tonkova et al., 2008). However, for mixed cultures no correlations between CSH and hydrocarbon biodegradation have been found (Owsianiak et al., 2009). Modifications in the cell surface properties of mixed cultures are complex; probably the presence of different cell surface properties, population distribution and possible degradation of cell surface modifying components by other strains may explain the changes in the CSH of mixed cultures. Our results suggest that the prevalence of one or another mechanism for HXD removal by the consortium strongly depends on the associations among strains. Further studies about the mechanisms of hydrocarbon uptake by microbial consortia are necessary.

In conclusion, our results demonstrate that changes in the CSH and the emulsification degree mediated by biosurfactants are prerequisites for the removal of hydrophobic substrates by bacteria here tested. The associations among bacterial strains play an important role in the mechanisms of HXD uptake by mixed cultures. Our results contribute to the understanding of differences in the modes of hydrocarbon uptake by pure and mixed cultures and show for the first time the HXD removal ability of *A. bouvetii* and *D. lusatiensis*.

Acknowledgments

Authors acknowledge the financial support from CONACyT (The National Council for Science and Technology) and PEMEX-Refinación (The State Oil Industry). Thanks are due to José Félix Aguirre-Garrido and Gloria Maribel Trejo-Aguilar for their valuable technical assistance.

References

- Abalos, A., Viñas, M., Sabaté, J., Manresa, M.A., Solanas, A.M., 2004. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation* 15, 249–260.
- Baoyu, G., Xiaobiao, Z., Chunhua, X., Qinyan, Y., Weiwei, L., Jincheng, W., 2008. Influence of extracellular polymeric substances on microbial activity and cell hydrophobicity in biofilms. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83, 227–232.
- Bouchez-Naïtali, M., Vandecasteele, J.P., 2008. Biosurfactants, a help in the biodegradation of hexadecane? The case of *Rhodococcus* and *Pseudomonas* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 1901–1907.
- Bouchez-Naïtali, M., Rakatozafy, H., Marchal, R., Leveau, J.Y., Vandecasteele, J.P., 1999. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *Journal of Applied Microbiology* 86, 421–428.
- Bouchez-Naïtali, M., Blanchet, D., Bardin, D., Vandecasteele, J.P., 2001. Evidence for interfacial uptake in hexadecane degradation by *Rhodococcus* equi: the importance of cell flocculation. *Microbiology* 147, 2537–2543.
- Bredholt, H., Bruheim, P., Potochy, M., Eimhjellen, K., 2002. Hydrophobicity development, alkane oxidation and crude-oil emulsification in a *Rhodococcus* species. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 295–304.
- Carr, E.L., Kämpfer, P., Patel, B.K.C., Gürtler, V., Seviour, R.J., 2003. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 953–963.
- Cavalca, L., Rao, M.A., Bernasconi, S., Kolombo, M., Andreoni, V., Gianfreda, L., 2008. Biodegradation of phenanthrene and analysis of degrading cultures in the

- presence of a model organo-mineral matrix and of a simulated NAPL phase. *Biodegradation* 19, 1–13.
- Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., Lim, Y.W., 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2259–2261.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 37, 141–145.
- Díaz-Ramírez, I.J., Ramírez-Saad, H., Gutiérrez-Rojas, M., Favela-Torres, E., 2003. Biodegradation of Maya crude oil fractions by bacterial strains and defined mixed culture isolated from *Cyperus laxus* rhizosphere soil in a contaminated site. *Canadian Journal of Microbiology* 49, 755–761.
- Díaz-Ramírez, I.J., Escalante-Espinosa, E., Favela-Torres, E., Gutiérrez-Rojas, M., Ramírez-Saad, H., 2008. Design of bacterial defined mixed for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE. *International Biodeterioration and Biodegradation* 62, 21–30.
- Fritsche, K., Auling, G., Andreesen, J.R., Lechner, U., 1999. *Deffluviobacter lusitiae* gen. nov., sp. nov., a new chlorophenol-degrading member of the alpha-2 subgroup of Proteobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 197–204.
- Gerdes, B., Brinkmeyer, R., Dieckmann, G., Helmke, E., 2005. Influence of crude oil on changes of bacterial communities in Arctic sea-ice. *FEMS Microbiology Ecology* 53, 129–139.
- Ghazali, F.M., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A.B., Basri, M., 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54, 61–67.
- van Hamme, J.D., Ward, O.P., 2001. Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas* sp. strain JA5-B45 and *Rhodococcus* sp. strain F9-D79 grown on crude oil and effect of a chemical surfactant on them. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4874–4879.
- Hua, Z., Chen, J., Lun, S., Wang, X., 2003. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. *Water Research* 37, 4143–4150.
- Ito, H., Hosokawa, R., Morikawa, M., Okuyama, H., 2008. A turbine oil-degrading bacterial consortium from soils of oil fields and its characteristics. *International Biodeterioration and Biodegradation* 61, 223–232.
- Kaczorek, E., Chrzanowski, I., Pijanowska, A., Olszanowski, A., 2008. Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: Rhamnolipides and saponins. *Bioresource Technology* 99, 4285–4291.
- Kim, Y.M., Ahn, C.K., Woo, S.H., Jung, G.Y., Park, J.M., 2009. Synergic degradation of phenanthrene by consortia of newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology* 144, 293–298.
- Kumar, S., Dudley, J., Nei, M., Tamura, K., 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9, 299–306.
- Li, G., Huang, W., Lerner, D.N., Zhang, X., 2000. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. *Water Research* 34, 3845–3853.
- Miller, R.M., 1995. Surfactant-enhanced bioavailability of slightly soluble organic compounds. In: Skipper, H., Turco, R. (Eds.), *Bioremediation Science and Applications*. Soil Science Society of America, Madison, Wis, pp. 33–54.
- Morikawa, M., Hirata, Y., Imanaka, T., 2000. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1488, 211–218.
- Mukred, A.M., Hamid, A.A., Hamzah, A., Yusoff, W.M.W., 2008. Development of three bacteria consortium for the bioremediation of crude petroleum-oil in contaminated water. *Journal of Biological Sciences* 8, 73–79.
- Muyzer, G., Hottentrager, S., Teske, A., Wawer, C., 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA—a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D., de Bruijn, F.J. (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1–23.
- Obuekwe, C.O., Al-Jadi, Z.K., Al-Saleh, E.S., 2009. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63, 273–279.
- Owsianiak, M., Szulc, A., Chrzanowski, L., Cyplik, P., Bogacki, M., Agnieszka, K., Olejnik-Schmidt, Heipieper, H.J., 2009. Biodegradation and surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel by 218 microbial consortia are not correlated to cell surface hydrophobicity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84, 545–553.
- Quijano, G., Huerta-Ochoa, S., Gutiérrez-Rojas, M., 2010. Assessment of the limiting step of mass transfer in n-hexadecane biodegradation in a bubble column reactor. *Water Science and Technology* 62, 906–914.
- Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., Banat, I.M., 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology* 85, 257–261.
- Ramírez-Saad, H.C., Sessitsch, A., de Vos, W.M., Akkermans, A.D.L., 2000. Bacterial community changes and enrichment of uncultured *Burkholderia*-like bacteria induced by chlorinated benzoates in a peatforest soil-microcosms. *Systematic and Applied Microbiology* 23, 591–598.
- Ron, E.Z., Rosenberg, E., 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology* 3, 229–236.
- Ron, E.Z., Rosenberg, E., 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 249–252.
- Rosenberg, M., Hayer, E.A., De Larea, J., Rosenberg, E., 1982. Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 929–937.
- Roselló-Mora, R., Amann, R., 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 39–67.
- Sanguineth, C.J., Díaz-Neto, E., Simpson, A.J.G., 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17, 915–919.
- Supaphol, S., Panichsakpatana, S., Trakulnaleamsai, S., Tungkanuruk, N., Roughjanajirapa, P., O'Donnell, A.G., 2006. The selection of mixed microbial inocula in environmental biotechnology: example using petroleum contaminated tropical soils. *Journal of Microbiological Methods* 65, 432–441.
- Throne-Holst, M., Wentzel, A., Ellingsen, T.E., Kotlar, H.-K., Zotchev, S.B., 2007. Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3327–3332.
- Vasileva-Tonkova, E., Galabova, D., Stoimenova, E., Lalchev, Z., 2008. Characterization of bacterial isolates from industrial wastewater according to probable modes of hexadecane uptake. *Microbiological Research* 163, 481–486.
- Velasco-Alvarez, N., González, I., Damian-Matsumura, P., Gutiérrez-Rojas, M., 2011. Enhanced hexadecane degradation and low biomass production by *Aspergillus niger* exposed to an electric current in a model system. *Bioresource Technology* 102, 1509–1515.
- Wick, L.Y., Ruiz de Munain, A., Springael, D., Harms, H., 2002. Responses of *Mycobacterium* sp. 501T to the low bioavailability of solid anthracene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 378–385.
- Zikmanis, P., Shakirova, L., Auzina, L., Andersone, I., 2007. Hydrophobicity of bacteria *Zymomonas mobilis* under varied environmental conditions. *Process Biochemistry* 42, 745–750.