



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Biológicas

Aislamiento de una *Pseudomonas sp.* que degrada
naftaleno y evaluación preliminar de su utilidad para
bioaumentación

Nº 202

Nadia Szeinbaum

Tutor: Silvia González

Departamento de Investigación
Junio 2006

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular
(INGEBI-CONICET)

Índice

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVO	9
MATERIALES Y MÉTODOS	9
1. OBTENCIÓN DE COLONIAS PURAS	9
1.1. Aislamiento de colonias	9
1.2. Purificación de colonias aisladas	9
2. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA	10
2.1. Extracción de ADN	10
2.2. Análisis de restricción de ADNr amplificado (ARDRA)	10
2.3. Presencia del gen NahAc en las cepas aisladas	10
2.4. Amplificación de secuencias repetitivas intergenicas (rep-PCR)	11
2.5. Secuenciación del gen 16S del ADNr de la cepa NR2	11
3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	12
4. ENSAYO DE BIOAUMENTACIÓN	12
4.1. Preparación de los microcosmos	12
4.2. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)	12
RESULTADOS	14
1. AISLAMIENTO DE COLONIAS	14
2. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA	14
2.1. Análisis de restricción del ADNr amplificado (ARDRA)	14
2.2. Amplificación del gen de la dioxigenasa de naftaleno	15
2.3. Amplificación de secuencias intergénicas repetitivas (rep-PCR)	17
2.4. Secuenciación del gen 16S ARN	17
3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	18
3.1. Caracterización sobre expresión génica	18
3.2. Caracterización morfológica	18
4. EXPERIMENTOS DE BIOAUMENTACIÓN	19
DISCUSIÓN	21
BIBLIOGRAFÍA	24

Abreviaturas

PAHs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

ADN: Acido desoxiribonucléico

ADNr: Acido desoxiribonucléico ribosomal

ADNc: Acido desoxiribonucléico copia

ARNr: Acido ribonucléico ribosomal

Sp.: Especie

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction).

DGGE: Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (Denaturing gradient gel electrophoresis)

EDTA: etilendiamintetraacetato

TRIS: (hidroximetil)amino metano

SDS: dodecil sulfato sódico

BSA: Albúmina sérica bovina

DMSO: dimetil sulfóxido

IPTG: Isopropil-b-D-tiogalato piranósido

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina

UFC: Unidades formadoras de colonias

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

Resumen

En el contexto del estudio de comunidades complejas que participan de la biodegradación de compuestos orgánicos en el tratamiento de efluentes, se aislaron 10 cepas con la capacidad de degradar naftaleno, en medio sólido. A una de ellas, la cepa NR2, se le realizó una caracterización polifásica: por un lado, para caracterizarla genotípicamente, se secuenció un fragmento casi completo del ADN ribosomal 16S correspondiente a la subunidad menor, y se la relacionó con la especie *Pseudomonas putida*. Por otro lado, el cultivo puro se caracterizó fenotípicamente utilizando el sistema de identificación API NE, y se confirmaron los resultados de la secuenciación.

Posteriormente, se monitoreó su evolución en dos tipos de comunidades complejas: una de ellas provenía de los barros de una planta de tratamiento de efluentes de una refinería de petróleo y la otra, de una planta de tratamiento de una planta de elaboración de productos farmacéuticos, que nunca había estado expuesta a hidrocarburos. El estudio de la evolución de las comunidades, bioaumentadas con la cepa NR2 y sin aumentar, se realizó mediante la observación de los productos de la amplificación del fragmento V3 del ADNc de las comunidades, separados en electroforesis de geles desnaturalizantes en gradiente (DGGE). Las muestras de donde se extrajo el RNAr de las comunidades se tomaron en función del tiempo, desde el armado de los microcosmos, hasta el día 26. Por otro lado, se determinó la capacidad de degradación de naftaleno de las comunidades mediante el recuento de UFC en placas con naftaleno como única fuente de carbono.

Se observó que la cepa NR2 no se integró en ninguna de las dos comunidades. Sin embargo, los resultados demostraron que la cepa modificó la estructura de la comunidad proveniente del barro de la refinería de petróleo, y su capacidad de degradar naftaleno, con respecto a la del mismo barro sin bioaumentar. Por otro lado, la cepa NR2 no produjo ninguna alteración en la comunidad proveniente de la planta farmacéutica.

Introducción

Hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs)

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son moléculas que contienen al menos dos anillos de benceno fusionados. Se forman durante la combustión incompleta de materia orgánica, y son generados en grandes cantidades por la industria del aluminio, el hierro y el acero, la industria de la pulpa y el papel, por la incineración de residuos municipales y por el uso de combustible fósil en general (Edlund 2001). La mayor cantidad de PAHs liberados al medioambiente se debe a las emisiones provocadas por la utilización de combustibles fósiles, y en menor parte, a aquellos PAHs producidos a escala industrial, principalmente como material de partida para la síntesis de tinturas, resinas y compuestos farmacéuticos (Edlund 2001). Estos compuestos son termodinámicamente muy estables, lo que los hace persistentes en el medioambiente. La presencia de estos hidrocarburos en el ambiente representa un riesgo para la salud, debido a que son moléculas hidrofóbicas y planas, lo que les permite atravesar la membrana lipídica de la célula. Una vez en el interior celular, sus derivados pueden interactuar con el ADN, y esto les confiere un alto potencial carcinogénico. Por otra parte, en dosis elevadas producen toxicidad crónica y sus efectos se manifiestan, por ejemplo, en daño hepático, o en interferencias en el sistema endócrino de los organismos que están en contacto con ellos (Edlund 2001; Irwin 1997).

El más simple de los PAHs es el naftaleno, que está constituido por dos anillos y ningún grupo sustituyente. Es muy poco soluble en agua (30mg/l a 25°C) y muy volátil, lo que permite que se disipe en forma relativamente fácil; pero es, de todos modos, resistente a la degradación y tóxico.

Degradación biológica del naftaleno

El sendero metabólico aeróbico de la degradación del naftaleno es común a un rango amplio de familias bacterianas y muy similar a las vías de degradación de otros PAHs (Atlas 1981). En general, distintos PAHs parten de vías paralelas por reacciones de oxigenación, catalizadas por mono o dioxigenasas específicas, para luego confluir en un intermediario común hacia el metabolismo central de la célula. Estos intermediarios aromáticos comunes, como el catecol, son dihidrodioles que pueden ser abiertos por intra- o extra-diol dioxigenasas (Diaz 2004).

Los *clusters* catabólicos suelen estar codificados en elementos móviles como los plásmidos y transposones, lo que facilita la transferencia horizontal de los respectivos genes y la rápida adaptación a nuevos

contaminantes. Uno de los plásmidos mejor estudiados, el NAH7, perteneciente a la cepa de *Pseudomonas putida*, G7, comprende tres operones: el primero codifica para las funciones de conversión a salicilato; el segundo, de salicilato a acetaldehído y piruvato vía catecol; el tercero, codifica para genes de regulación, determinada por la concentración de salicilato (Van Hamme et al. 2003).

La vía metabólica comienza con la oxidación del naftaleno a cis-(1R,2S) dihidroxinaftaleno 1,2-dihidrodiol por el sistema enzimático naftaleno dioxigenasa que incorpora oxígeno molecular al anillo aromático. La dioxigenasa de naftaleno presenta un nivel de homología de alrededor del 90% en diferentes organismos (Van Hamme et al. 2003). Este sistema está formado por tres componentes que son esenciales para la actividad enzimática: una reductasa, una ferredoxina con un centro de hierro y azufre, y una flavoproteína Fe-S, compuesta por dos subunidades beta y dos alfa, la subunidad mayor, codificada en el gen NahAc (Van Hamme et al. 2003). Es necesaria la presencia de NADH como dador de electrones (Atlas 1981). A continuación, la oxidación lleva a la formación de catecol, uno de los intermediarios centrales de la degradación de PAHs. Los catecoles son sustratos para otras dioxigenasas que linealizan la molécula, a través del sendero orto, cortando el ciclo entre los dos oxhidrilos, o meta, entre el C2 y C3, y tanto el gentisato como el catecol continúan la vía hasta piruvato, para luego proseguir hacia el metabolismo intermedio.

Los microorganismos asociados a este tipo de degradación del naftaleno son las *Sphingomonas* sp, *Rhodococcus* sp, *Burkholderia* sp. y, en especial, las *Pseudomonas* sp. (Diaz 2004). Varias cepas de *Pseudomonas putida* han sido estudiadas para descifrar el camino metabólico que se encuentra codificado en plásmidos, entre ellos el G7, que se muestra a continuación (basado en la figura que se encuentra en el sitio web http://umbbd.ahc.umn.edu/naph/naph_map.html):

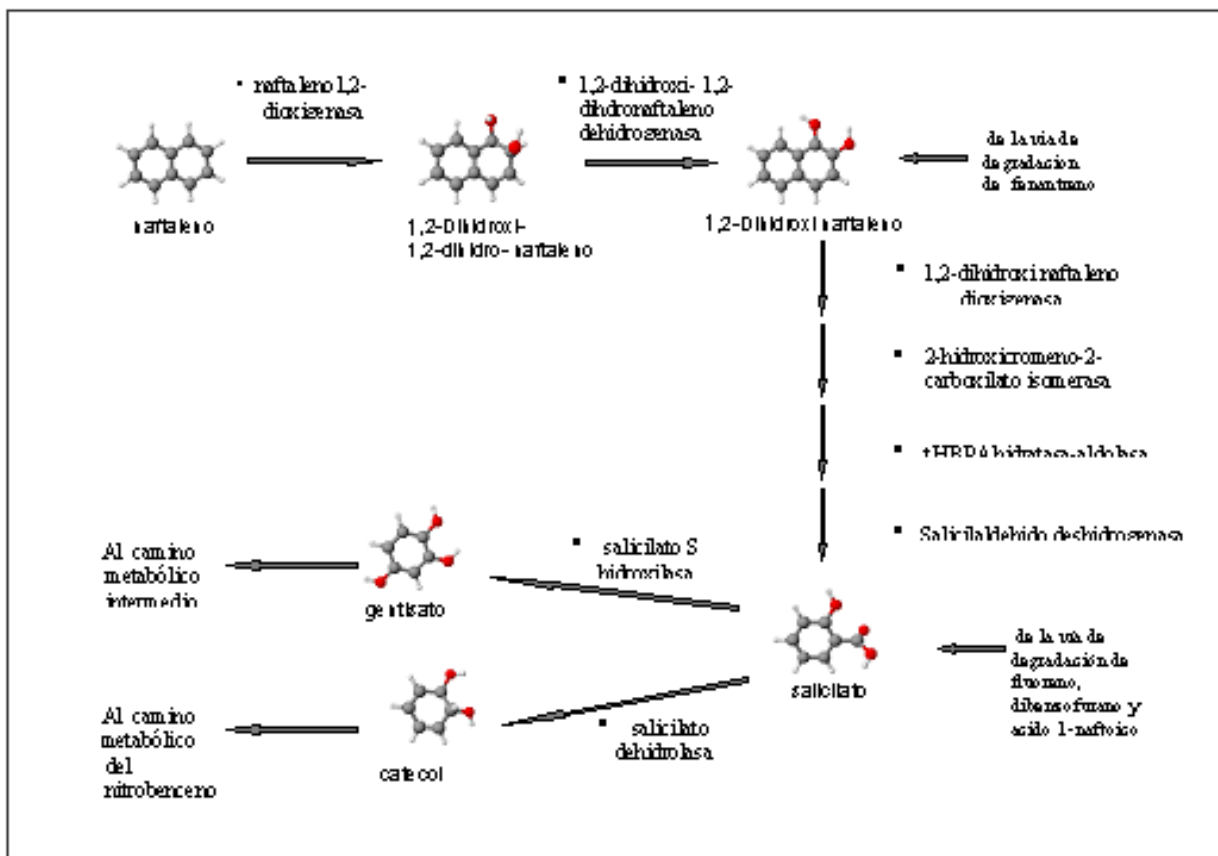


Fig. 1: Camino metabólico de degradación del naftaleno, codificado en el plásmido NAH7 de *Ps. putida* G7. El naftaleno es oxidado a salicilato, y luego puede derivarse al camino metabólico intermedio por su conversión a salicilato, o al camino metabólico del nitrobenzeno, a través de la conversión del salicilato a catecol.

La utilización de microorganismos en el tratamiento biológico de efluentes líquidos

Las plantas de tratamiento emplean métodos físicos, químicos y biológicos para disminuir el contenido orgánico de los efluentes con el propósito de evitar la eutrofización y sepsia que se suele generar cuando la demanda de oxígeno (directamente proporcional al contenido orgánico) supera la concentración de oxígeno disuelto (utilizado en la oxidación de la materia orgánica disuelta). Generalmente, se emplean tratamientos que disminuyen el contenido orgánico hasta un 80-90% (Atlas & Richard 1998). En el tratamiento primario

se separan los residuos en suspensión mediante su sedimentación. Los tratamientos secundarios se utilizan para catalizar la degradación de la materia orgánica soluble empleando un sistema microbiológico complejo. En el caso de reactores de barros activados en particular, el tratamiento secundario puede consistir en una combinación de etapas aeróbicas y anaeróbicas. Al finalizar cada etapa, la biomasa se separa del efluente por decantación, y se recicla para recibir un nuevo volumen afluente. Las comunidades microbianas empleadas en los tratamientos secundarios se componen mayoritariamente de bacterias, responsables de la biodegradación, que conviven con sus depredadores: protozoos (ciliados o flagelados dependiendo de la calidad del barro), hongos, e invertebrados menores como asquelminos (en especial los rotíferos). Las bacterias se pueden encontrar en forma libre, adheridas entre sí mediante polisacáridos que forman *flocs* que se eliminan por decantación, o adheridas a un soporte sólido formando biopelículas. En el caso de una refinería de petróleo, la mayor parte de los hidrocarburos es usualmente eliminada mediante un tratamiento primario de flotación por aire disuelto hasta una concentración aproximada de 10-20mg/l, que luego es reducida por tratamientos biológicos a valores menores a 1mg/l, en una secuencia esquematizada en la figura 2.

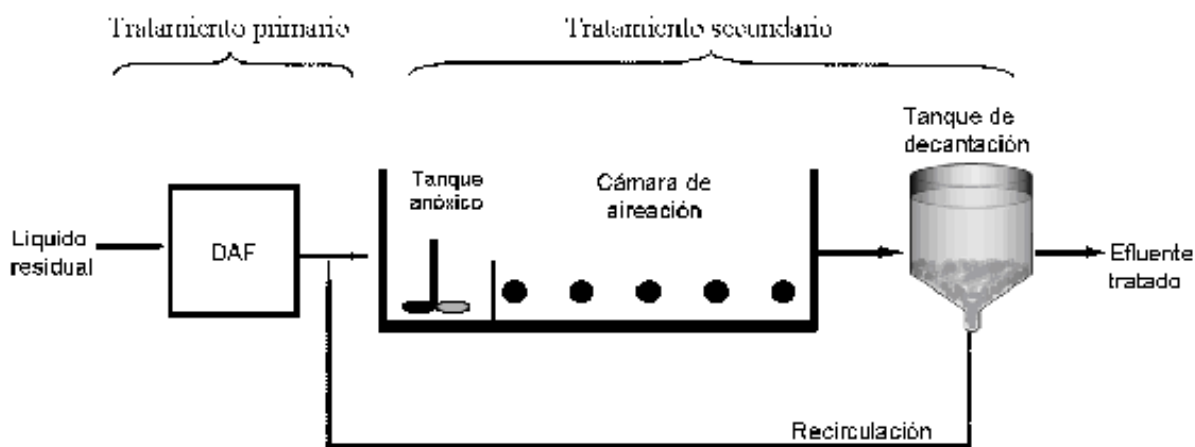


Fig2: Etapas de tratamiento del líquido residual de una refinería de petróleo. La reducción de la materia orgánica del líquido residual comienza con un tratamiento mecánico en el cual el naftaleno es eliminado, en su mayoría, a través de la flotación por aire disuelto (DAF). En el tanque anóxico y en la cámara de aireación, se disminuye aún más el contenido orgánico por la acción de los microorganismos. Finalmente, los barros son separados del efluente tratado en un tanque de decantación.

Estudio de organismos que participan del proceso de biodegradación

En los tratamientos biológicos que tienen como objetivo la depuración de efluentes industriales, es útil poder descifrar los procesos que se llevan a cabo y cuáles son las funciones de cada componente de la comunidad. Esto permitiría encontrar las condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos más aptos para la degradación de los compuestos orgánicos. Los enfoques utilizados hoy en día para acelerar los procesos de degradación son principalmente dos: por un lado, se intenta controlar el ambiente de manera tal que se favorezca el desarrollo de las poblaciones bacterianas que utilizan los hidrocarburos como fuente de carbono (bioestimulación) modificando factores fisicoquímicos tales como la concentración de O_2 , el pH, o cofactores enzimáticos. Por otro lado, la bioaumentación es otra estrategia que consiste en incrementar artificialmente el número de poblaciones benéficas para acelerar los tiempos de disipación del contaminante. La bioaumentación se lleva a cabo agregando un cultivo de bacterias obtenido en el laboratorio a la comunidad ya existente y puede utilizarse una cepa o varias al mismo tiempo. En general, los cultivos se obtienen aislando bacterias de la misma comunidad que se desea bioaumentar mediante un enriquecimiento de una muestra previo al aislamiento, utilizando los compuestos que se desean degradar como fuente de carbono. La preferencia de utilizar como fuente de aislamiento a la comunidad que se necesita aumentar es que se sabe que allí existen bacterias capaces de utilizar la materia orgánica del afluente como fuente de carbono, y eso aumenta las posibilidades de encontrar una cepa que, además de poseer la propiedad de degradar los compuestos de interés, sea capaz de competir adecuadamente para permanecer activa en la comunidad (Bogardt & Hemmingsen 1992; Zengler *et al.* 2002).

Estudios dependientes de cultivo

Gracias al aporte de la biología molecular al estudio de la ecología microbiana se ha ampliado enormemente el número de especies bacterianas descubiertas y se estima que hoy en día entre un 0.1% a un 10%

de ese total se puede tener como cultivo puro en el laboratorio (Head et al. 1998). Este porcentaje tan bajo se debe a que, en general, no se conocen las condiciones compatibles con el desarrollo de cada bacteria, es decir, los requisitos específicos en concentración de nutrientes, sales, condiciones redox, u otros factores determinantes como algunas vitaminas y minerales (Stevenson *et al.* 2004; Zengler *et al.* 2002), o en señales específicas de otras bacterias (Kaeberlein et al. 2002). También se debe a que algunas poblaciones crecen hasta densidades que no se pueden ni medir ni utilizar para su estudio (Kaeberlein et al. 2002; Stevenson et al. 2004), o que las poblaciones que se ven favorecidas en el medio sintético no permiten que crezcan otras de mayor relevancia funcional en el sistema objeto de análisis.

-4-

Las diferentes estrategias utilizadas para el aislamiento en medios sólidos se basan en la imitación de las condiciones naturales: utilizando nutrientes no tradicionales o en baja concentración, o períodos largos de incubación (Bastiaens et al. 2000; Stevenson et al. 2004), y en algunos casos, usando como medio de cultivo aquel de donde se obtuvo el inóculo. La desventaja de este último método es que el medio varía en el tiempo en función de la dinámica de la comunidad, por lo tanto, es un método poco útil si el objetivo es poder tener cultivos de bacterias aisladas en el laboratorio, y así prescindir del sitio de donde se las aisló.

En el caso del aislamiento de bacterias que utilizan PAHs como fuente de carbono, se agrega una dificultad más, que es la de la baja solubilidad en agua de estos compuestos. Diversas estrategias de cultivo aeróbico fueron desarrolladas, todas basadas en el agregado de uno o varios hidrocarburos a un medio mínimo de sales, entre las que se encuentran el rociado de una solución del hidrocarburo en un solvente sobre el cultivo plaqueado, la formación de una película del hidrocarburo mediante la sublimación de éste sobre el cultivo previamente plaqueado y sostenido de forma invertida sobre su vapor (Alley & Brown 2000), el crecimiento de películas bacterianas directamente sobre los cristales del hidrocarburo (Bastiaens et al. 2000), el pre enriquecimiento en un medio líquido con exceso de PAHs y posterior inóculo en un medio sólido (Daane *et al.* 2001; Rockne *et al.* 2000). Más recientemente, se desarrollaron técnicas de alta procesividad basadas en la separación de bacterias por citometría de flujo y cultivos en microplacas (Cho & Giovannoni 2004). La gran variedad de técnicas y métodos utilizados demuestra que no existe un método realmente efectivo para el aislamiento, y que hasta el día de hoy, se está haciendo un gran esfuerzo para obtener las bacterias que cumplen roles importantes en la biodegradación pero que, en su mayoría, sólo se conocen a través de las técnicas moleculares.

Estudios independientes del cultivo

Es necesario estudiar las comunidades bacterianas para poder entender su funcionamiento y poder modificar los factores necesarios para acelerar la biodegradación. La estrategia para estudiar las poblaciones de una comunidad microbiana depende de su cultivabilidad, es decir, de su capacidad de crecer en medios de cultivos sintéticos y en densidades lo suficientemente altas tal que permitan llevar a cabo los estudios necesarios. Los métodos que emplean herramientas de la biología molecular para el estudio de las comunidades *in situ*, consisten fundamentalmente en la obtención y el análisis de la constitución y la expresión génica de la comunidad microbiana, y la consecuente determinación de la identidad de sus componentes, así como, en algunos casos, la relación de la identidad con su función (Wagner 2004).

El marcador genético comúnmente utilizado en la actualidad para estudios moleculares relacionados con la estructura de una comunidad es el ADN_r que codifica para el ARN ribosomal en bacterias. La utilidad del ADN_r reside en que está presente en las tres divisiones en que están agrupados los organismos biológicos, son moléculas muy conservadas en donde los eventos de mutación tienen poca relación con la selección y son raros los casos de deleciones e inserciones o de transferencia lateral (Woese 1987). A su vez, el ADN_r contiene dominios conservados en todos los niveles filogenéticos, así como también secuencias específicas que permiten un grado de resolución a nivel taxonómico de algunos grupos, e incluso existen secuencias específicas descriptas para algunas especies (Head et al. 1998). Además posee suficiente variabilidad en sus secuencias intergénicas como para distinguir grupos muy relacionados (Abdulmawjood & Lammler 1999).

Si bien en la clasificación de especies la hibridación ADN-ADN es el método que provee mayor resolución taxonómica, se suele recurrir a la secuenciación del ADN_r por ser un método más simple, rápido (Stackebrandt & Goebel 1994) y es, por lo tanto, más útil para analizar comunidades *in situ*. En el campo de la ecología microbiana, es tomada como patrón para comparar organismos mediante el ADN_r obtenido directamente de una comunidad y así definir su relación filogenética con las secuencias de las bases de datos. Dentro del ADN_r, el gen más utilizado es el que codifica para la subunidad 16S en bacterias, para el cual existe una mayor cantidad de información disponible en bases de datos que sobre el 23S. La metodología utilizada para la caracterización de la estructura de una comunidad está basada en la amplificación por PCR en conjunto con otras herramientas como ensayos de restricción y electroforesis para separar los

distintos productos en función de diferencias en sus secuencias como DGGE, TGGE, REP-PCR ARDRA (Bakermans & Madsen 2002; Macrae 2000; Wilson *et al.* 1999).

Objetivos

En el tratamiento de efluentes industriales se emplean microorganismos que utilizan su maquinaria enzimática para degradar compuestos orgánicos con el fin de evitar el deterioro de los ecosistemas que lo reciben. El estudio de los microorganismos que componen las comunidades responsables de estos procesos se desarrolla utilizando, en su mayoría, métodos moleculares tanto para estudios hechos sobre cultivos bacterianos puros, como para estudios de comunidades complejas. En este contexto, el propósito de este trabajo fue:

- 1) Aislar bacterias capaces de crecer utilizando naftaleno como única fuente de carbono y energía.
En base a la existencia de una numerosa variedad de técnicas de aislamiento cuyo objetivo es obtener cultivos puros de grupos bacterianos presentes en la comunidad, se optó por elegir una técnica cuyo primer paso fuera el aislamiento de bacterias con la característica deseada, y en segundo lugar, su identificación y caracterización. El aislamiento se realizó a partir de un inóculo de barros activados de una planta de tratamiento de una refinería de petróleo y a la cepa aislada se le realizó una caracterización polifásica.
- 2) Estudiar el desarrollo de la cepa aislada en el contexto de comunidades complejas.
Para ello, se emplearon herramientas de análisis moleculares para monitorear su presencia dentro de un microcosmos conteniendo la comunidad de origen, y otro microcosmos conteniendo una mezcla compleja de microorganismos provenientes de una planta de tratamiento aeróbica que nunca fue expuesta a la presencia de hidrocarburos.

Materiales y métodos

1) OBTENCIÓN DE COLONIAS PURAS

1.1 Aislamiento de colonias

Las bacterias se obtuvieron a partir de una muestra de la cámara de aireación de una planta de tratamiento de barros activados que trata el efluente de una refinería de petróleo. Se enriqueció durante un mes un inóculo obtenido de la refinería, en medio líquido MSA y naftaleno como única fuente de carbono, en una estufa a 28°C, realizándose pasajes a medio fresco cada cuatro días. Se aislaron colonias mediante una técnica que consiste en diluir un volumen de cultivo líquido en medio con agar y una solución de naftaleno en etanol (8,5mg/ml), a 40°C y plaquear la mezcla, luego de un vortexeado, sobre una capa de medio sólido. De esta manera, se logra una distribución homogénea del naftaleno y de las bacterias, la concentración del solvente es baja, y la capa superior contiene el desplazamiento de las colonias que se formaron (Bogardt & Hemmingsen 1992).

La capa inferior se preparó con una concentración de 1,5% p/v de agar, en medio mineral Winogradsky (KH_2PO_4 , 0,25g/l; MgSO_4 , 0,125g/l; NaCl , 0,125g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5mg/l), con el agregado de 0,1g de NH_4NO_3 , y 0.1 ml/l de una solución concentrada de vitaminas (en un volumen final de 50ml: ac. 4 amino benzoico, 2 mg; ácido nicotínico, 4mg; 1-biotina, 0,5mg; pantoteato, 2mg; pirisocina, 6mg; tiamina, 4mg; cianocobalamina, 2mg; ácido lipoico, 0,5 mg; riboflavina, 0,5mg; ácido fólico, 0,2mg).

La capa superior se preparó con una concentración de 0,7% de agar en medio mineral Winogradsky, con el agregado de 2ml/l de una solución concentrada de metales traza (en un volumen final de 100 ml: HCl 6M, 1ml; FeSO_4 , 110mg; MgCl_2 , 7,2mg; H_3BO_3 , 3,6mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 19mg; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2mg; $\text{NaSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,6mg; $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,6mg; ZnCl_2 7mg).

Se plaqueó en esterilidad la mezcla de 3,5ml del medio semisólido, 200 μl de la solución de naftaleno y 10 y 100 μl del cultivo incubado en la botella y 20 y 40 μl del cultivo preenriquecido. Las placas se incubaron en una estufa a 28°C.

1.2 Purificación de colonias aisladas

De las colonias que formaban un halo transparente de degradación, se eligieron 4 de cada morfología. Se las purificó repicándolas y esparciéndolas en placas con medio sólido con vitaminas. Se incubaron en una estufa a 28°C dentro de un desecador, con su fuente de carbono externa al medio, que consistía en un tubo

abierto con naftaleno sólido que saturaba la atmósfera del desecador por efecto de la sublimación. Como control, se inocularon las mismas colonias en placas fuera del desecador.

2.- Caracterización genotípica

2.1 Extracción de ADN

Se picaron las diez colonias y se incubaron en LB líquido, en un tubo de vidrio de 15ml, durante 18 horas a 37°C con agitación.

Lisis celular: Se centrifugó 1ml del cultivo y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 500 μ l de buffer TENP pH= 7,6 (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 10mM NaCl, 1%p/v polivinil pirrolidona, pH=7,6). Se realizó una ruptura química mediante el agregado de 50 μ l de SDS 10% y 100 μ g de RNAsa A y la incubación por 1 h a 37°C, y luego la adición de 60 ng de proteinasa K y la incubación por 1 hora a 37°C. Luego se realizó una disrupción mecánica con 100 μ l de bolitas de circonio-sílice de 0.1mm, en un agitador recíproco a 5000 rpm por 2 minutos totales en intervalos de 30 segundos.

Purificación: Se realizó una extracción mediante el agregado de 1 volumen de fenol equilibrado con Tris-HCl pH=8 y la centrifugación a 13200 rpm por 10 minutos. Se recuperó la fase acuosa, se agregó un volumen de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 13200 rpm por 10 minutos recuperando la fase acuosa.

Precipitación: Se agregaron 0,7 volúmenes de isopropanol frío y 0,1 volúmenes de acetato de amonio 3M, y se incubó por una hora a -20°C. Se centrifugó a 4°C durante 40 minutos a 13200 rpm. Se recuperó el sedimento, se lavó en etanol 70% y se dejó secar. Se resuspendió el ADN en buffer TE pH=8 (10mM Tris-Cl, 1 mM EDTA).

2.2 Análisis de restricción de ADNr amplificado (ARDRA)

El perfil de digestión del gen 16S del ADNr con enzimas de restricción permite identificar diferencias de secuencias de dicho gen, sin necesidad de secuenciarlas en su totalidad, separando los fragmentos formados por electroforesis en gel de agarosa. Dos cepas que presentan perfiles iguales de restricción para 2 enzimas tetraméricas poseen una similitud de más del 95% en sus secuencias de 16S (Moyer et al. 1996).

Amplificación del gen 16S de la subunidad menor

Se amplificó un fragmento de aproximadamente 1500 pb, correspondiente a la secuencia casi completa de la subunidad 16S del ADNr.

Se utilizaron los siguientes *primers* (Godon 1997):

F8 : AGA GTT TAT YMT GGC TCA G

R1509: GNT ACC TTG TTA CGA CTT

Cada tubo de 25 μ l de reacción contenía: buffer de PCR 1X; MgCl₂, 1.25mM; DMSO 5%, 1,25; BSA 0,25; dNTPs 0,2 mM total; *primers* 0,2 μ M de cada uno; Taq ADN polimerasa recombinante, 0,625U.

El programa que se utilizó fue el siguiente: temperatura inicial de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C, 50°C y 72°C de un minuto cada uno, y 10 minutos de extensión final a 72°C.

Digestión con HhaI y Rsa I

La mezcla consistió, en un volumen final de 20 μ l, en: buffer ER (10X), 2 μ l; BSA, 1 μ l, H₂O, HhaI o Rsa I (10U/ μ l), amplicón de 1500pb, 12 μ l.

La enzima HhaI reconoce la secuencia 5'-G C G[^]C-3', y la enzima RsaI, la secuencia 5'-G T[^]A C-3'.

El buffer ER 10X es una solución de Tris-HCl pH=6,8 110mM y acetato de magnesio 77,5mM, y DTT 1,10mM.

La separación de las bandas producidas por la digestión se llevo a cabo por electroforesis en un gel de agarosa 2,5% en TAE 1X, a 85V durante 1,5 horas.

2.3 Presencia del gen NahAc en la cepas aisladas

Se determinó la presencia del gen NahAc, que codifica para la dioxigenasa de naftaleno, en todas las colonias, utilizando *primers* que permiten amplificar un fragmento de casi 500 pb correspondiente a genes NahAc y del tipo NahAc, excluyendo la amplificación de otros genes de dioxigenasas (Bakermans & Madsen 2002; Wilson *et al.* 1999):

Ac114F: CTG GCW WTT YCT CAC YCA T

Ac596R: CRG GTG YCT TCC AGT TG

2.3.1 Curva de temperatura

Para optimizar la reacción de amplificación del gen *NahAc* fue necesario realizar la puesta a punto de la temperatura de reasociación y de la concentración de magnesio sobre un control positivo. Inicialmente, se varió la temperatura de apareamiento de los *primers* entre 43 y 56 °C. El programa utilizado consistió en una primera etapa de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos 94°C por 30 segundos, la temperatura correspondiente durante 1 minuto, 72°C un minuto, y finalmente la etapa de extensión a 72°C por 5 minutos.

2.3.2 Curva de magnesio

A continuación se determinó la concentración óptima de Mg²⁺, haciendo una PCR sobre la misma muestra y variando únicamente la concentración de MgCl₂ entre 1 y 4 mM, con el protocolo indicado anteriormente y utilizando la temperatura de apareamiento de 50°C.

2.3.3 PCR *NahAc* para el ADN de las colonias aisladas

Se utilizó el mismo programa descrito para la curva de temperatura, con la concentración de Mg²⁺ de 3.2 mM y la temperatura de apareamiento de 50°C.

2.4 Amplificación de secuencias repetitivas intergénicas (rep-PCR)

La técnica de Rep-PCR se basa en la amplificación de secuencias repetitivas intergénicas no codificantes, altamente conservadas y presentes en ambos sentidos, como herramienta para diferenciar subespecies o cepas bacterianas. Al amplificar estas secuencias, se generan fragmentos de distinta longitud determinadas por su número y ubicación en el genoma, y al separarlas mediante electroforesis se puede analizar y comparar el patrón que se forma y determinar si dos colonias de bacterias de la misma especie son también cepas iguales (Versalovic et al. 1991).

Reacción de amplificación:

Se amplificaron secuencias BOX, utilizando el primer BOXA1R (de Brujin, en *Molecular Microbial Ecology Manual*) cuya secuencia es complementaria a *boxA*, una de las tres subunidades que componen los elementos BOX:

CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 25µl: Buffer de PCR (10X), 2,5µl; DMSO 5%, MgCl₂ 50mM, dNTPs *primers* 0.012 µg, Taq ADN polimerasa 1U.

El programa utilizado consistió en 2 minutos a 95°C, 30 ciclos de 94°C, 40°C, 65°C durante 30 segundos, 1 y 8 minutos respectivamente, y una etapa de extensión final de 8 minutos a 65°C. Se verificaron los productos de amplificación en un gel de agarosa 2%.

2.5- Secuenciación del gen 16S de la cepa NR2

El producto de la amplificación enzimática del gen 16S casi completo fue purificado a partir un gel de agarosa mediante un método basado en la retención del ADN por sílice.

Se utilizó el vector p-GEM-T, que contiene un gen transcribible de resistencia a ampicilina y el segmento amino terminal de β-galactosidasa del gen *lacZ*, que contiene un sitio de clonado múltiple con extensiones de un nucleótido de timidina en el extremo 3'. Para lograr la ligación del producto de la PCR con el vector p-GEM-T, se preparó una solución con los siguientes reactivos en un tubo eppendorf de 0,5 para un volumen final de 10µl: buffer para ligación rápida 1X; vector pGEM-T 50ng; producto de la PCR, 1,26µl, T4 ADN ligasa, 3U. Se incubó durante toda la noche a 4°C.

Para la transformación, se transfirió un volumen de 50µl de *E. coli* DH10α electrocompetentes a una celda de electroporación de 0,1 cm. Se agregaron 2µl de la solución de ligación, y se sometió a la mezcla a un pulso eléctrico de 2,5kV (BioRad) agregando inmediatamente después 250 µl de medio SOC (2% peptona, 0,5% extracto de levadura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂·6H₂O, 20mM glucosa, pH=7). Se pasó el cultivo a un tubo de polipropileno estéril de 15ml y se incubó durante una hora a 37°C. Luego se inocularon 10µl del cultivo, y 20µl de una solución 1:10 del cultivo en placas de medio sólido LB con 0.1 mg/ml de ampicilina, 625µg por placa de X-Gal como indicador cromogénico y de IPTG como inductor de la expresión de *LacZ*. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C.

Para la purificación de ADN plasmídico se picaron 6 colonias blancas a partir del cultivo en placas, que luego se inocularon en medio LB con ampicilina (100µg/ml) y se incubaron por 16 horas a 37°C con agitación.

Se tomó 1,5 ml del cultivo y se centrifugó a 5000xg durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 300 μ l de solución I (Tris-HCl 50mM pH=8). Luego se agregaron 300 μ l de solución II (NaOH 0,2M; SDS 1%) y al cabo de una incubación de 5 minutos en hielo, se agregaron 300 μ l de solución III fría (3M acetato de potasio, 11% ácido acético glacial) y se incubó en hielo durante 10 minutos.

Para recuperar el ADN plasmídico se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a una velocidad de 13.200 rpm, y se recuperaron 800 μ l del sobrenadante.

Para eliminar ARN, se agregó 10U de RNAsa ONE (Promega) y se incubó durante 2 horas a 37°C.

Se hizo una extracción con 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (37:1) y se centrifugó durante 5 minutos a 13.200 rpm. Se recuperó la fase acuosa, se agregó 1 volumen de isopropanol, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para precipitar el ADN. Se centrifugó durante 30 minutos a 4°C y 13.200 rpm, y se lavó con etanol 70%.

Se verificó la ausencia de ARN en un gel de agarosa 1%.

Para determinar qué clones contenían el fragmento de 1500 pb se llevó a cabo una digestión del plásmido con EcoRI.

Se preparó la mezcla de restricción en un volumen final de 10 μ l: buffer H, 1X; EcoRI, 28U; ADN, 6 μ l. Se incubó durante 13hs a 37°C y se corrió en un gel de agarosa 1% p/v en buffer TAE.

La secuenciación se realizó en un secuenciador automático (Megabase 500), utilizando los *primers* M13F y M13R cuyas secuencias complementarias se encuentran en el vector, y los *primers* 341F 906R, y F704B cuyas secuencias complementarias se encuentran dentro de la secuencia del 16S y corresponden a secuencias conservadas en todo el dominio Bacteria. Se compararon los cromatogramas utilizando el programa *Chromas Lite* y se utilizó el programa *BlastN* para comparar las secuencias con la base de datos del NCBI. Se utilizó el programa el *ClustalX* para el alineamiento de las secuencias y de la construcción del árbol mediante el método de *neighbour joining* con un valor de *bootstrap* de 1000, utilizando como *outgroup* secuencias pertenecientes a beta y epsilon proteobacteria.

3.- Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica se realizó utilizando el sistema de identificación API NE (Biomerieux).

Para ello se picaron colonias crecidas en LB y se inocularon en una solución estéril de NaCl 0.85% hasta lograr un grado de turbidez idéntico a una suspensión de BaSO₄ de concentración equivalente al punto 0,5 del standard McFarland (BaCl₂ 0,048M, 0,5ml; H₂SO₄ 0,18M, 99,5ml). Posteriormente, se inocularon los tubos y las cúpulas según las indicaciones del manual, se incubaron a 28°C y se observaron los resultados a las 24 y 48 horas.

Las muestras fueron observadas frescas en un microscopio con contraste de fases (Leica, modelo DM-HB).

4.-Ensayo de bioaumentación

4.1 Preparación de los microcosmos

Se llevaron a cabo 4 experimentos de bioaumentación: Los experimentos 1 y 2 consistieron en 10ml de barros activados con un contenido de biomasa de 6,7% p/v, proveniente de la cámara de aireación de una planta de tratamiento de una refinería de petróleo, 5ml de un cultivo puro de NR2 y 35ml del sobrenadante del mismo origen formando un microcosmos de un volumen total de 50ml; los experimentos 3 y 4 contenían la misma composición excepto que los barros provenían de una planta que trata los residuos de una planta de elaboración de productos farmacéuticos, y nunca habían sido expuestos a hidrocarburos.

Los 5ml del cultivo contenían un número de 1,7 x10⁶ bacterias, determinado por recuento de las UFC en medio LB sólido.

Se incubaron los tratamientos a 28°C con agitación, y se tomaron muestras de 1ml inmediatamente después del armado de los microcosmos (tiempo 0), y luego a los 2, 8, 16 y 26 días.

4.2 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

Este método se basa en la diferencia de movilidad electroforética en un gel de poliacrilamida entre una molécula de ADN de estructura helicoidal y otra desnaturalizada. La desnaturalización se produce por la combinación de distintos dominios de fusión, es decir, grupos de bases que por su secuencia y %GC son

susceptibles a la desnaturalización a concentraciones crecientes de desnaturalizante, con lo cual se pueden separar fragmentos de ADN de la misma longitud, pero con diferente secuencia. A medida que aumenta la concentración de desnaturalizante, cada dominio de fusión va perdiendo su estructura helicoidal y retarda el movimiento del fragmento hasta frenarlo casi por completo. De esa forma, cada fragmento amplificado migrará hasta una posición definida por su propia secuencia. Los primers utilizados contienen una secuencia inicial de alrededor de 40 nucleótidos G o C y actúan como un dominio de alta temperatura de fusión, evitando la disociación completa.

Extracción de ARN

Se tomó 1ml de cada cultivo con una pipeta plástica lavada con una solución para eliminar RNAsas. Se centrifugó durante 10 minutos a 16000 xg, se lavó con buffer TE y se resuspendió en 800 µl de TE. Se trasvasó a tubos de 2ml con 50 µl de SDS 10% y bolitas de circonio-sílice de 0.1 mm, y se llevó a un volumen final de 2 ml con fenol pH=5.1 para recuperar el ARN. Se procedió a la disrupción mecánica en un agitador recíproco durante 3 minutos en total, en períodos de 30 segundos. Luego se incubó a 65°C por 15 minutos y se centrifugó por 15 minutos a 16000xg, para separar las fases. Se trasvasó la fase acuosa y se hicieron lavados con cloroformo:isoamílico 37:1. Se dejó precipitar 500µl de la fase acuosa durante una hora a -20°C en 2 volúmenes de etanol 100% y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M. Se centrifugó durante media hora, se lavaron las sales con etanol 70% y se resuspendió en agua.

Para eliminar el ADN se incubó durante una hora con buffer para DNAsa 1X y 5U de DNAsa RQ1 (Promega). Luego se extrajo con un volumen de fenol equilibrado a pH=5.1. Se centrifugó durante 15 minutos recuperando la fase acuosa. Luego se procedió a los lavados y precipitación de la misma forma que en la primera purificación del ARN y se resuspendió finalmente en 50 µl de agua.

Transcripción reversa

Para obtener los perfiles de ARNr en los experimentos de bioaugmentación se obtuvo primero el ADNc mediante la acción de la transcriptasa reversa sobre el templado de ARN purificado.

La mezcla de reacción se preparó con los siguientes reactivos en un volumen final de 20µl: Buffer para RT (5X), 4µl; dNTPs (2mM total), 2µl; primer R534 (10µM), 1,2µl; H₂O, 8,8µl; ARN(30ng/µl), 3µl; Transcriptasa Reversa MMLV (Promega), 0.75 U.

La reacción se realizó incubando a 65°C durante 5 minutos, a 37°C durante 1 hora y a 72°C durante 10 minutos.

Amplificación del ADNc

Previo a la realización de electroforesis con gradiente lineal de urea y formamida, se procedió a la amplificación, a partir del ADN, de un fragmento de aproximadamente 200 pb, correspondiente a la región variable V3 del 16S ADNr en las posiciones 341 a 534 de la numeración de *E. coli*.

Los *primers* utilizados fueron los siguientes (Muyzer et al. 1993):

F341GC: CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG
GCA CGC GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG

R534: ATT ACG GCG GCT GCT GG

La amplificación se llevó a cabo en tubos de 0.2 ml con una solución que contenía en un volumen final de 25 µl: buffer para Taq polimerasa recombinante (Invitrogen), 1X; MgCl₂, 1.25mM, dNTPs, 200µM, *primers*, 0,2 µM, Taq ADN polimerasa, 0.625U según el siguiente protocolo de *touchdown* (Hecker & Roux 1996): Desnaturaización a 94°C por 4 minutos, 20 ciclos de 30 segundos de desnaturaización a 94°C, un minuto de apareamiento de los *primers* a 65°C disminuyendo 0.5°C en cada ciclo, y 30 segundos de extensión a 72°C, seguido de 10 ciclos de 30 segundos de desnaturaización a 94°C, apareamiento a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por treinta segundos, y la etapa de extensión final, a 72°C durante cinco minutos.

El producto obtenido se verificó por electroforesis en un gel de agarosa 1%.

Preparación del gel de poli(acrilamida) con gradiente desnaturalizante y condiciones de corrida

El gel de poli(acrilamida) se preparó mezclando en un formador de gradientes (HSI, *Hoefler Scientific Instruments*), 12,5 ml de dos soluciones que contienen en un volumen final de 18ml: buffer TAE 1X; acrilamida:bisacrilamida (37:1), 3,7ml; persulfato de amonio 10%, 230µl; TEMED, 3,5µl; solución desnaturalizante 100%, 6,12ml o 12,6ml. Las soluciones forman un gradiente que parte de una concentración desnaturalizante al 35% y finaliza al 70%, en donde el 100% equivale a una solución de urea 7M y formamida 40% p/v.

Las condiciones de corrida fueron de 3 horas a 200V en un baño a 60°C en TAE 1X, dentro de una cuba para DGGE (CBS, Scientific Co). El revelado se realizó tiñendo con 10µl de Sybr Green (Molecular Probes, Invitrogen) en 100ml de TAE 1X durante 40 minutos y lavando con TAE 1X por 10 minutos, y se fotografió

utilizando el sistema Bio Imaging CCDBIO (Syngene).

Resultados

1. AISLAMIENTO DE COLONIAS

La aparición de colonias formadas utilizando la técnica de las dos capas ocurrió a los tres días. Se observaron tres tipos de colonias y se picaron cuatro de cada morfología, como se encuentra indicado en la tabla 1.

Tipo	Color	Morfología	Tamaño relativo	Nro. de colonias picadas
1	Blanco opaco	Circular	Grande	4 (NR1,2,3 y 4)
2	Blanco mucoso	Circular	Pequeñas	4 (NR5,6,11 y12)
3	Blanco opaco	Circular	Muy pequeñas	4 (NR7,8,9 y 10)

Tabla 1: Características visibles de las colonias aisladas.

Las colonias se repicaron en medio MSA y se incubaron en presencia y ausencia de naftaleno. Excepto las colonias 11 y 12, que crecieron también en las placas control, el resto de las colonias crecieron sólo en presencia de naftaleno. Los análisis de caracterización genotípica se realizaron sobre estas 10 colonias aisladas (NR1-10).

2.- Caracterización genotípica

2.1 Análisis de restricción del ADNr amplificado (ARDRA)

Con el fin de determinar el grado de similitud de las secuencias del ADN ribosomal 16S de las colonias aisladas se realizó una digestión enzimática con las enzimas tetraméricas RsaI y HhaI.

En las figuras 3a y 3b se muestran los productos de la digestión del producto de la amplificación del fragmento casi completo del ADNr 16S de las diez colonias aisladas.

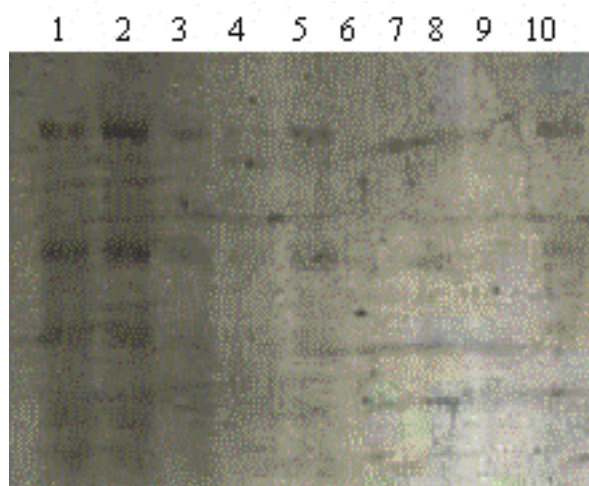


Fig. 3a: Productos de la digestión enzimática de HhaI de los fragmentos casi completos del gen 16S de las colonias aisladas. Se utilizó el ADN genómico extraído de las colonias como templado para amplificar el fragmento casi completo del ADN ribosomal 16 S, y se lo sometió a una digestión con la enzima RsaI. Los productos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa 2% p/v. Las calles 1 a 10 corresponden a las cepas NR1 a NR10.

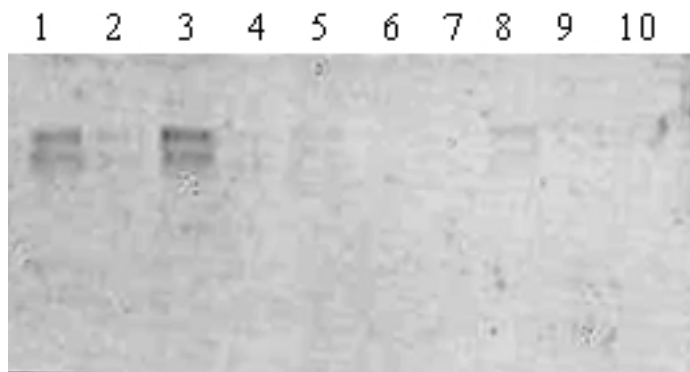


Fig. 3b: Productos de la digestión enzimática con *RsaI* de los fragmentos casi completos del gen 16S de las colonias aisladas. Se realizó una segunda digestión enzimática utilizando la amplificación del fragmento casi completo del gen 16S del ADN ribosomal como sustrato para la enzima *HhaI*. Los productos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa 2% p/v. Calles: 1-10, cepas NR1-10.

En ambas figuras se observa que los fragmentos de restricción tienen el mismo tamaño en todas las cepas, lo que permite inferir que todas poseen la misma secuencia del gen del ARN de la subunidad menor 16S (Moyer et al. 1996).

2.2 Amplificación del gen de la dioxigenasa de naftaleno

Con el propósito de detectar la presencia del gen que codifica para la dioxigenasa de naftaleno, se realizó una PCR sobre el ADN extraído de todas las colonias aisladas.

Las secuencias de los *primers* y las condiciones de la reacción de amplificación se obtuvieron del trabajo de Bakermans (Bakermans & Madsen 2002). Sin embargo, como no se obtuvo producto de amplificación del ADN genómico de las colonias ni del control positivo, se optimizaron las condiciones de reacción modificando la temperatura de apareamiento y la concentración de Mg^{2+} .

Curva de temperatura

La figura 4 muestra el resultado obtenido en la amplificación del gen *NahAc* utilizando distintas temperaturas de reasociación.

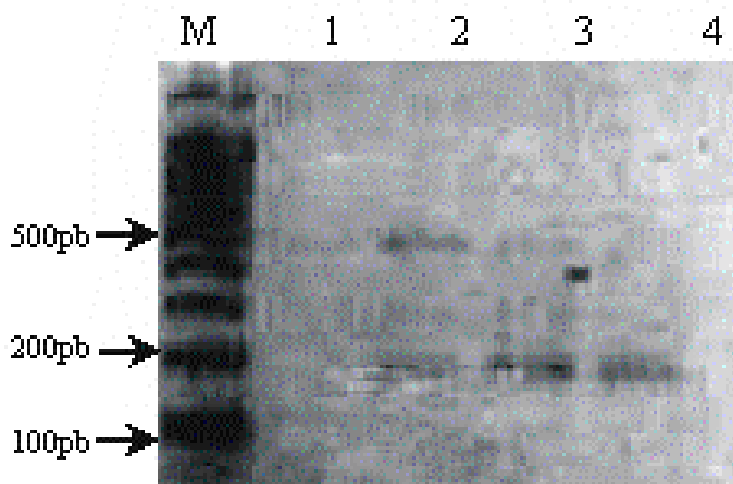


Fig. 4: productos de la amplificación de genes *NahAc* utilizando diferentes temperaturas de apareamiento. Se amplificaron genes *NahAc* y del tipo *NahAc* utilizando como templado el ADN de un control positivo. Los productos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa 1,5% p/v. Las calles corresponden a las siguientes temperaturas: 1, 56°C; 2, 50 °C; 3, 47°C; 4, 43°C. M, marcador de tamaño molecular (100pb).

Teniendo en cuenta la máxima intensidad de la banda del tamaño correspondiente (480 pb) y la mínima intensidad de bandas de productos no específicos, la temperatura óptima de reasociación se eligió como 50°C, que en la figura 4 se observa en la calle 2. La amplificación de otras bandas aparte del producto esperado también se observó en el trabajo de Bakermans (Bakermans & Madsen 2002).

Curva de magnesio

En la figura 5 se muestra el producto de amplificación obtenido utilizando diferentes concentraciones de Mg^{2+} .

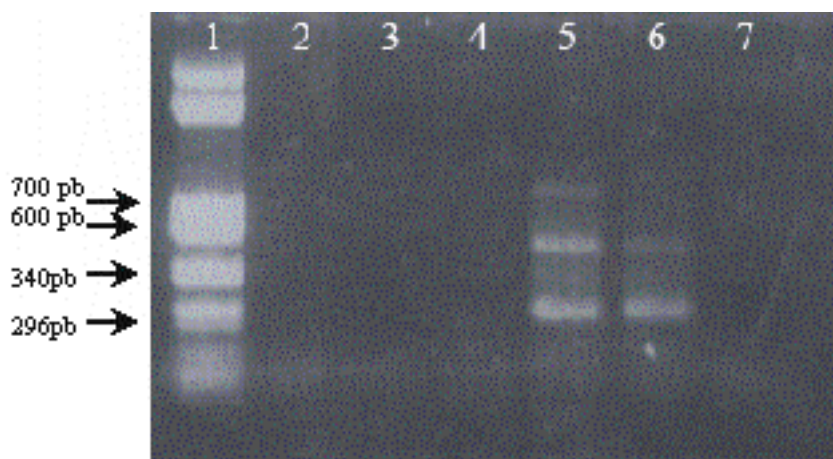


Fig5: Productos de la amplificación por PCR de genes NahAc bajo distintas concentraciones de Mg^{2+} . Se realizó una amplificación de los genes NahAc y similares, sobre el ADN total extraído de un control positivo. Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en un gel de agarosa 1,5% p/v. Calles: 1, marcador de tamaño molecular (p-GEM 3Z (t)); calle 2, 1,5mM; calle 3, 2 mM; calle 4, 2,5mM; calle 5, 3mM; calle 6, 3,5 mM; calle 7, 4mM.

La curva parte de una concentración de 1,5 mM hasta 4mM. Por debajo de una concentración de Mg^{2+} de 3mM no se observa formación del producto. A la concentración de 3,5 mM aumenta la formación del producto no específico en relación al fragmento esperado. Por lo tanto, se empleó una concentración de 3.2 mM de $MgCl_2$ para la reacción de amplificación sobre el ADN de todas las cepas.

Amplificación de genes que codifican para dioxigenasas de naftaleno, sobre todas las cepas.

La figura 6 muestra los resultados de la amplificación del gen NahAc en todas las muestras de ADN extraído de las colonias aisladas utilizando las condiciones de temperatura de apareamiento y concentración de magnesio determinadas como óptimas:

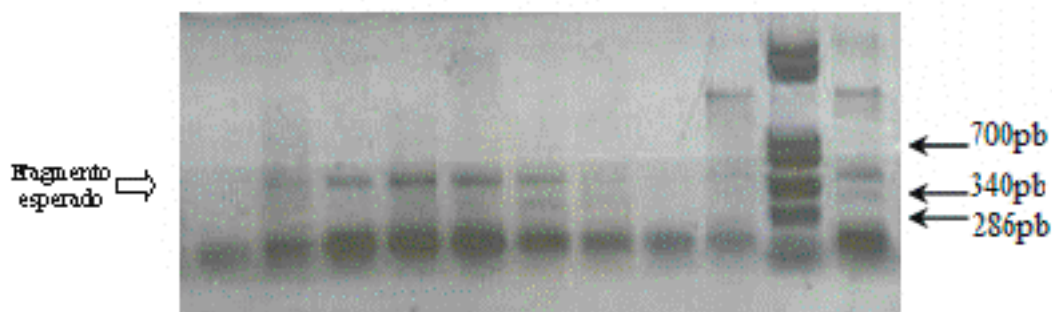


Fig. 6: Productos de amplificación del gen NahAc de todas las colonias aisladas. Los productos se obtuvieron por PCR sobre el ADN total, utilizando 50°C como temperatura de apareamiento, y 3,2mM como concentración de magnesio, y se separaron por electroforesis en un gel de agarosa 1,5% p/v. Calles: 1-9 colonias NR1-9; calle 10, marcador de tamaño (p-GEM); calle 11, colonia 10.

En todas las calles se observa el producto esperado de al rededor de 500pb y en las calles 5, 6, 7, 9 y 11, también un fragmento inespecifico de 300 pb.

2.3 Amplificación de secuencias intergénicas repetitivas (rep-PCR)

Para agrupar las colonias aisladas de acuerdo a su estructura genómica, se realizó la amplificación de secuencias repetitivas intergénicas utilizando en la reacción de PCR los *primers* BOXA1R que permiten amplificar las regiones BOX. Los resultados de la PCR muestran en la figura 7.

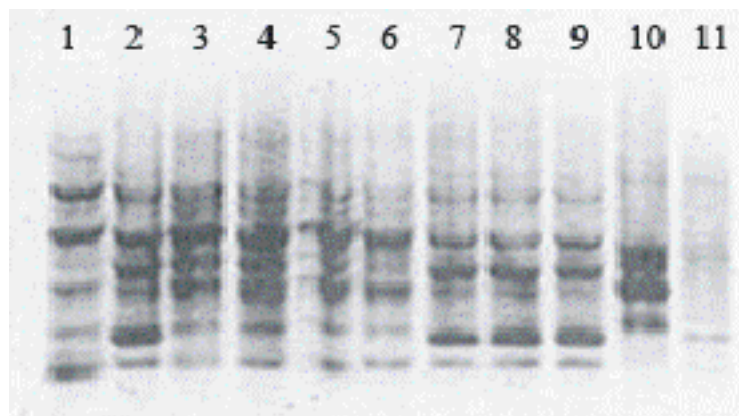


Fig. 7: **Productos de amplificación de secuencias repetitivas presentes en el ADN genómico de las colonias aisladas.** Se extrajo el ADN de las colonias a caracterizar y se utilizó como templado para amplificar las secuencias repetitivas por PCR. Los productos de amplificación fueron separados en un gel de agarosa 3% p/v. Las calles: 1 a 10 corresponden a las cepas NR1 a NR10; la calle 11, a *E. Coli*.

Como muestra la figura 7, teniendo en cuenta la similitud de los patrones, las cepas se pueden organizar en cuatro grupos: las cepas NR 3, 4, 5, 6, las cepas NR 2, 7, 8, y 9, la cepa N1, y la cepa NR 10.

2.4 Secuenciación del gen 16S ARNr

En la figura 8 se muestra el árbol filogenético realizado utilizando el programa ClustalX, mediante el método de *neighbour joining*, y los valores de *bootstrap* mayores de 700 para cada rama.

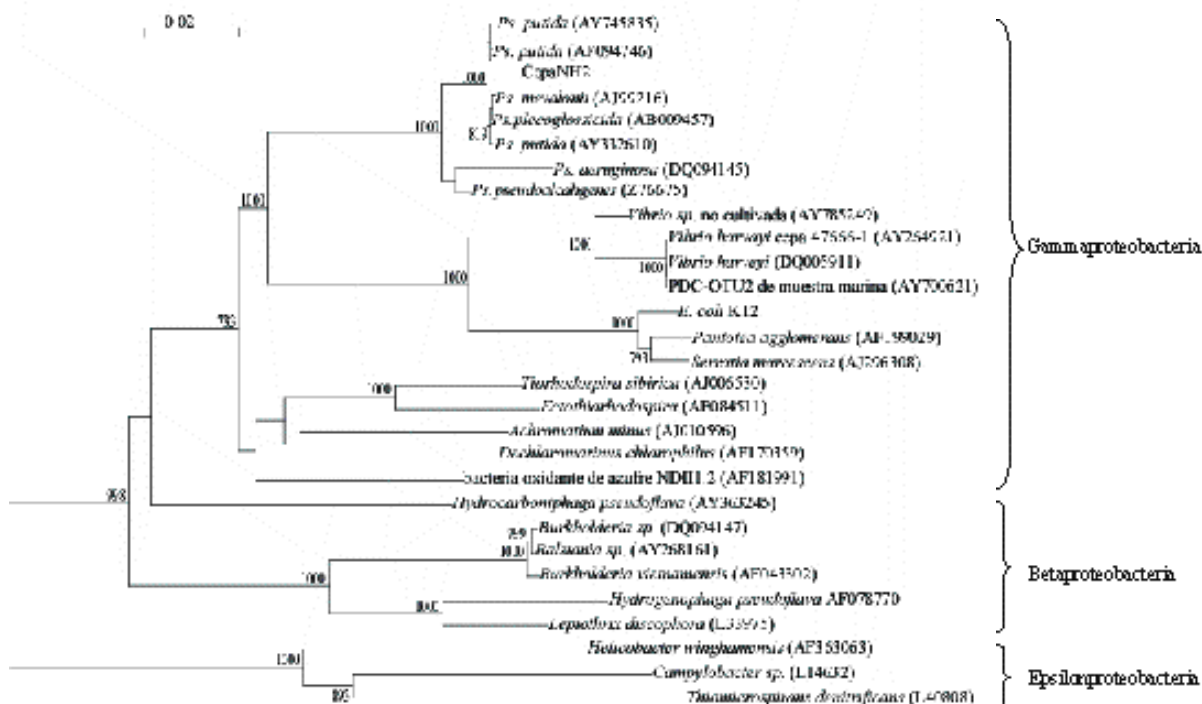


Fig. 8: **Árbol filogenético de las secuencias de ADN ribosomal 16S.** El árbol se construyó al rededor de la secuencia obtenida del ADNr 16S de la cepa NR2, con el programa ClustalX. Se utilizaron secuencias relacionadas, de la clase gammaproteobacteria, y como outgroup, secuencias beta y epsilonproteobacteria.

La secuencia de la subunidad 16S del ARN ribosomal de la cepa NR2 muestra su relación con bacterias correspondientes al género *Pseudomonas* sp., y el árbol filogenético indica su probable afiliación dentro de la especie *Pseudomonas putida*.

3.- Caracterización fenotípica

3.1 Caracterización de expresión génica

API NE

Como método de caracterización fenotípica de la cepa aislada, se realizaron 20 tests de función enzimática y de asimilación del sistema de identificación para no enterobacterias API 20 NE (Biomerieux). Los resultados se muestran en las tablas 2a y 2b.

Tests de función enzimática	Reducción de NO ₃	Arginina dehidrolasa	Ureasa	Acidificación de glucosa	Hidrólisis de esculina	Hidrólisis de gelatina	B-galactosidasa
% Resultados positivos para la <i>Ps. putida</i>	3	88	1	1	0	0	1
Resultado de NR2	+	+	+	-	-	-	-

Tabla 2a: Ensayos de función enzimática. A partir de un cultivo puro de la cepa NR2, se inocularon las 8 celdas correspondientes a los tests de función enzimática del sistema de identificación API NE y los resultados se observaron a las 24 y 48 horas.

Tests de asimilación	glucosa	manosa	gluconato	caprato	malato	citrato	fenil acetato	arabinosa	Manitol	NAG	maltosa	adipato
Resultados positivos para <i>Ps. Putida</i> (%)	99	57	97	99	100	99	58	58	5	0	1	1
Resultado de NR2	+	+	+	+	+	+	--	--	--	--	--	--

Tabla 2b: Ensayos de asimilación. Se inocularon las 12 celdas correspondientes a los tests de asimilación del sistema de identificación API NE con un cultivo puro de la cepa NR2 y se observó el resultado a las 48 horas. Un resultado positivo se consideró tal cuando se produjo un aumento en el grado de turbidez, debido al crecimiento del cultivo por la asimilación de cada sustrato.

De acuerdo a la comparación de los resultados obtenidos para la cepa NR2 con los valores correspondientes de cepas de referencia, los resultados obtenidos confirman que se trata de una *Pseudomonas putida*.

3.2 Caracterización morfológica.

Para caracterizar morfológicamente la cepa NR2 pura se observó una muestra fresca al microscopio de contraste de fases. La figura 9 muestra la microfotografía de un cultivo puro de la cepa.

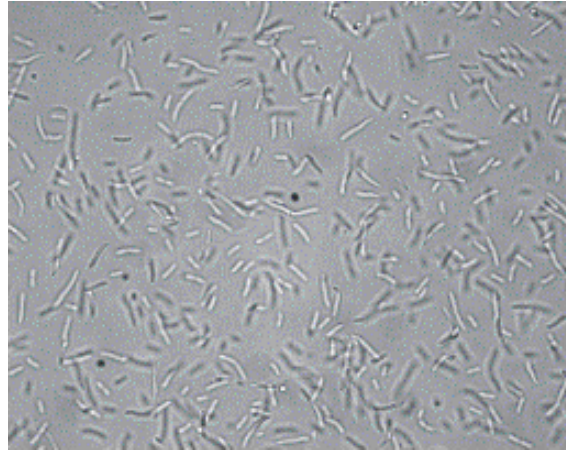


Fig. 9: Imagen obtenida por microscopía de contraste de fases de un cultivo puro de la colonia NR2. A partir de una muestra de la cámara de aireación de la planta de tratamiento del efluente de una refinería de petróleo, se aisló en medio MSA sólido, con naftaleno como fuente de carbono, la colonia correspondiente a la cepa NR2, y luego se obtuvo un cultivo puro líquido de esa cepa, de donde se tomó una muestra para caracterizar su morfología.

La fig. 9 permite observar que las bacterias aisladas son bacilos, morfología propia de las *Pseudomonas* sp.

4.- Experimentos de bioaumentación

Con el propósito de evaluar la supervivencia y la actividad de la cepa NR2 para la utilización de naftaleno como fuente de carbono en dos comunidades complejas se armaron 4 microcosmos: dos de ellos, 1 y 2, contenían la comunidad microbiana de un barro proveniente de la cámara de aireación de una planta de tratamiento del efluente de una refinería de petróleo, y los otros dos microcosmos, 3 y 4, de una planta de elaboración de productos farmacéuticos.

Las figuras siguientes corresponden a microfotografías de los barros tomados de las cámaras de aireación de las plantas de tratamiento de la refinería de petróleo y de la industria farmacéutica que fueron utilizados en los experimentos.

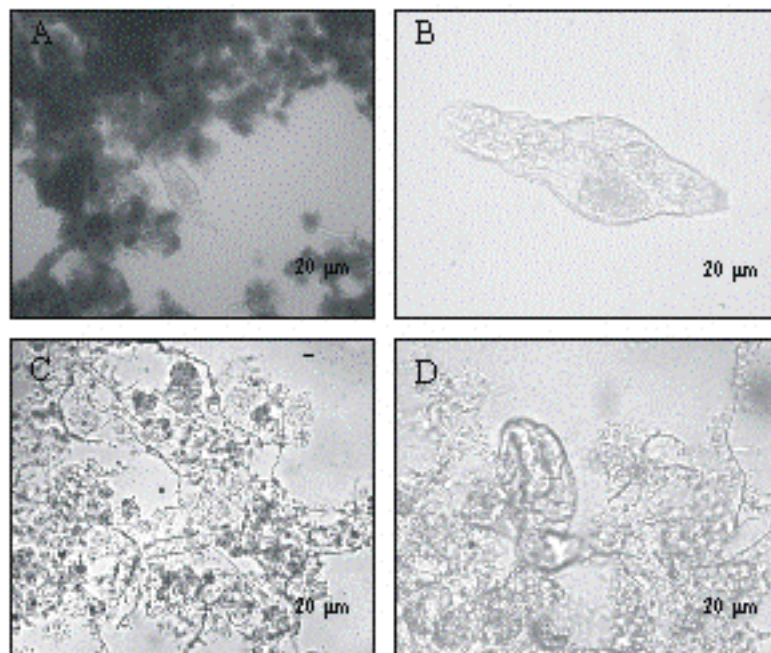


Fig10: Microfotografías representativas de muestras de barro. Los barros se tomaron de la cámara de aireación de la planta de tratamiento de la refinería de petróleo (A, B) y del laboratorio de productos medicinales (C y D) utilizados como inóculos en los experimentos 1-2 y 3-4, respectivamente

Se puede observar la presencia de rotíferos en el barro de la refinería de petróleo (A y B). La figura B presenta un rotífero entre los *flocs*, mucho más densos y oscuros que en el barro filamentososo que se observa en C y D. En la figura D se capturó la imagen de un rotífero en movimiento debido al pastoreo de los filamentos. Aunque estas fotos indican la presencia de depredadores en ambos barros, se observó un número mucho mayor de ellos en el de la planta de tratamiento del laboratorio farmacéutico.

Para evaluar la supervivencia de la cepa aislada se extrajo el ARN ribosomal de las muestras de cada uno de los microcosmos, se obtuvo el ADNc mediante la acción de la transcriptasa reversa y, junto al ADN extraído de la cepa NR2, se amplificó un fragmento correspondiente a la región V3 del ADN ribosomal 16S. Estos fragmentos se separaron en un gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y se comparó el perfil de bandas de los microcosmos, y del cultivo puro de la cepa.

Las figuras 11a y 11b muestran la separación por DGGE de los productos de amplificación del ADNc obtenido de las muestras de los barros que se utilizaron en los experimentos, tomadas en los tiempos que se indican en la figura. El tiempo 0 corresponde a las muestras tomadas inmediatamente luego de la preparación de los microcosmos.

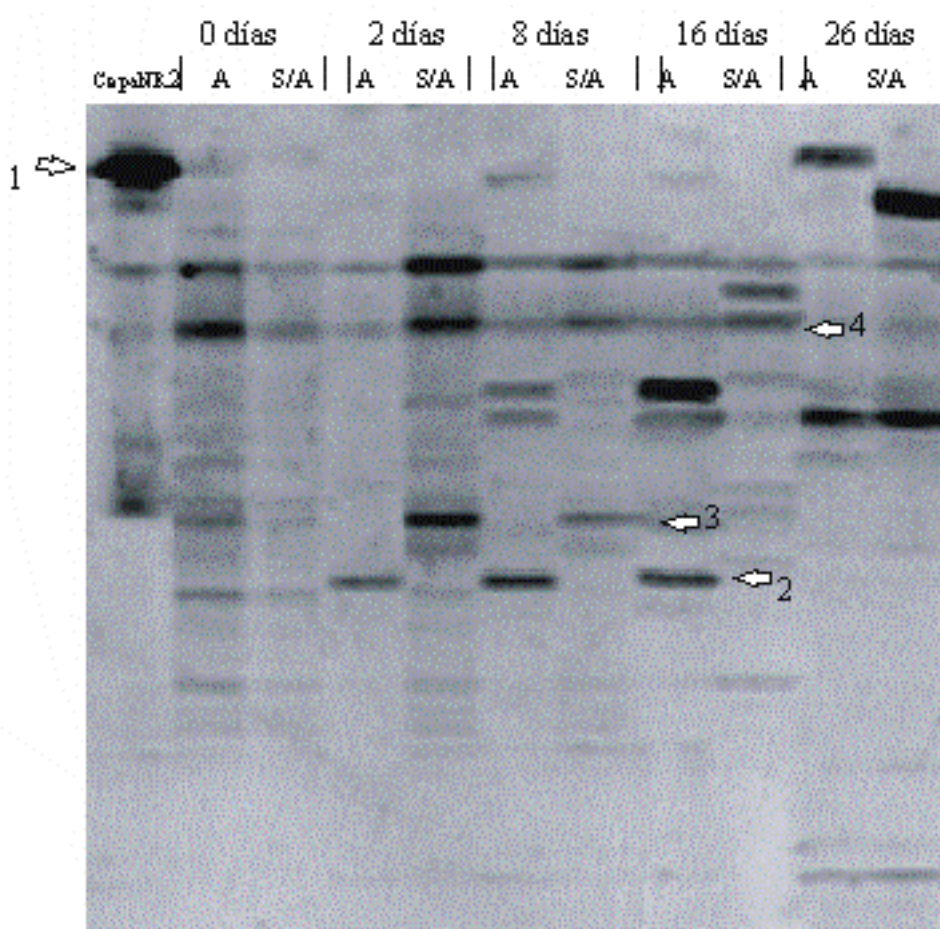


Fig. 11a: DGGE de los barros de la refinería aumentado (A) y sin aumentar (S/A). Se obtuvo el ADNc de las comunidades de los microcosmos 1 y 2, ambas conteniendo el barro originario de la refinería de petróleo, inmediatamente luego del inóculo de la cepa NH2 en el barro del microcosmos 1 (día 0), y luego 2, 8, 16, y 26 días después. Junto con el ADN extraído de un cultivo de la cepa pura NR2, se amplificó la región V3 del ADNr 16S. Los productos se separaron por DGGE.

Como era de esperar, se puede ver que en el día 0 los dos barros comparten la mayoría de las bandas, excepto por la banda perteneciente a la cepa NR2 (banda 1). Al día 2, los barros cambian su estructura y aparecen otras bandas predominantes que persisten hasta el día 16 (bandas 2 y 3), que migran a distintas distancias. La banda 4 aparece en el día 8 y se mantiene hasta el final del experimento.

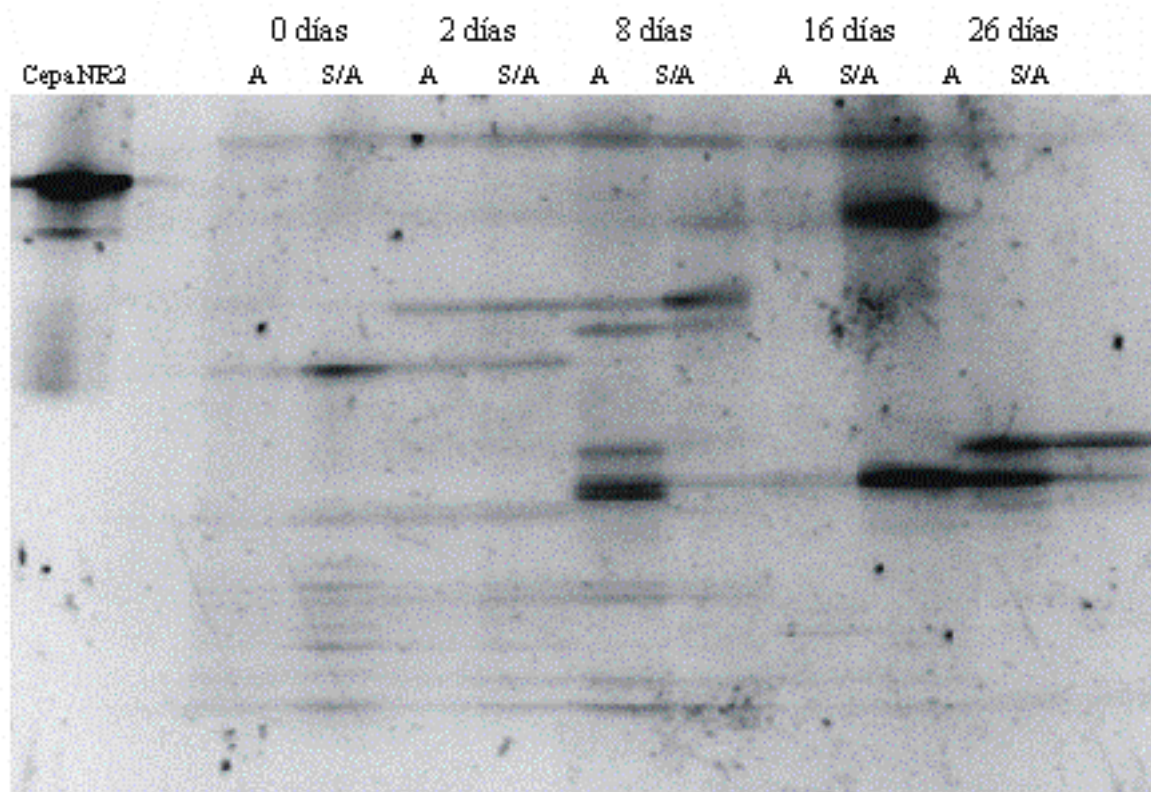


Fig. 11b: DGGE de la cepa NR2 pura y los barros del laboratorio aumentado (A) y sin aumentar (S/A). Se obtuvo el ADNc a partir del ARNr extraído de los microcosmos 3 y 4 en los tiempos que se indican en la figura. El tiempo 0 corresponde a las muestras tomadas inmediatamente luego del inóculo de la cepa NH2 en el barro del microcosmos 3. Junto con el ADN extraído de la cepa NR2 pura, el ADNc se utilizó como templado para amplificar la región V3 del ADNr 16S, y los productos amplificados se separaron por DGGE.

En esta figura se puede observar que los cambios relacionados con la aparición o desaparición de bandas que ocurren en los dos barros son prácticamente iguales. La banda correspondiente a la cepa NR2 en la calle del barro aumentado en el día 0 no se ve con claridad en esta imagen, pero se observó en la pantalla del equipo que se utilizó para obtener la fotografía.

Discusión

En este trabajo se aislaron bacterias que tenían la capacidad de degradar naftaleno y se monitoreó su aptitud para sobrevivir en comunidades complejas en presencia de naftaleno como única fuente de carbono y energía.

Evaluación de la técnica de aislamiento

De los métodos para el aislamiento indicados en la introducción del presente trabajo, se utilizó la técnica de las dos capas de agar (Bogardt & Hemmingsen 1992) debido a que con este método se logra una distribución homogénea de la fuente de carbono debido al mezclado de la solución de naftaleno en alcohol, que luego se evapora por la temperatura. Además, esta técnica permitió solucionar el problema de identificar las colonias que degradan naftaleno, debido a que en las placas esas colonias forman un halo de degradación. Una vez aisladas, para purificarlas se optó por incubarlas con naftaleno sólido externo al medio aprovechando su volatilidad, ya que era un método mucho más simple que el anterior y se evitaba el agregado del solvente. También se intentó generar una película de naftaleno según el método de Alley y Brown (Alley & Brown 2000), pero la distribución del naftaleno no era tan homogénea como en el método de las dos capas, y además no resultaba fácil trabajar en completa esterilidad.

Un punto importante a considerar al aislar bacterias por métodos clásicos de enriquecimiento utilizando un compuesto como única fuente de carbono, es que las condiciones del medio y la incubación son muy

diferentes a las del medio original, lo que puede favorecer el crecimiento de poblaciones que no representan un grupo funcionalmente importante en el medio original, o de poblaciones que tienen una tasa de crecimiento rápido y que luego, al ser reinoculadas en su medio original, pierden el protagonismo que les había otorgado la incubación en el medio sintético, y limitan la utilidad potencial de dicha cepa.

Caracterización genotípica

Se utilizó una combinación de métodos moleculares para la identificación de las bacterias aisladas: se realizó un análisis de restricción del ADN ribosomal (ARDRA) para poder establecer diferencias de secuencia en función de la secuencia casi completa, y se observó que todas presentaban el mismo patrón de restricción, lo que indicaba que existía un 95% de probabilidad de que la secuencia nucleotídica de la subunidad 16S de ARNr de todas las cepas aisladas fueran idénticas. A pesar de que todas compartían el mismo patrón de restricción de ADN ribosomal, y que según los resultados de la amplificación del gen NahAc todas poseían el gen de la dioxigenasa de naftaleno, el análisis de los patrones generados por amplificación de secuencias genómicas repetitivas (BOX PCR) permitió discriminar diferentes cepas dentro del grupo de colonias aisladas, lo que implicaba que las cepas podrían diferir en su composición genética debido a que su evolución se vio influenciada por sus micronichos particulares (Jaspers & Overmann 2004). La elección de la cepa a caracterizar de forma más completa y utilizar en los experimentos de bioaumentación se hizo teniendo en cuenta que la evolución de la cepa se seguiría por DGGE. Por lo tanto, dado que los patrones de restricción del ARDRA eran iguales, y teniendo en cuenta que el grado de resolución del DGGE utilizando un gradiente entre 35% y 75%, adecuado para estudiar comunidades complejas, no resolvería las posibles diferencias de la región V3, se eligió la cepa NR2 para estudiarla con mayor profundidad.

El análisis fenotípico, y la secuenciación del gen 16S casi completo y su comparación con secuencias en la base de datos del NCBI, permitió ubicar la colonia aislada dentro del género *Pseudomonas* sp. Las características de ser metabólicamente versátiles, participando de numerosas actividades importantes como el ciclado de elementos, degradación de compuestos biogénicos o xenobióticos orgánicos, entre otros, y en especial las *Pseudomonas putida*, que posee requerimientos nutricionales simples y puede crecer rápidamente en los medios comúnmente empleados en el laboratorio (Timmis 2002), explican la predominancia de la *Pseudomonas* en el cultivo. De hecho, el 90% de todas las bacterias cultivadas y caracterizadas por secuenciación del 16S ARNr pertenecen a las divisiones de Proteobacteria, Cytobagales, Actinobacteria y bacterias Gram positivas con bajo porcentaje de G+C (Vandamme et al. 1996).

Experimento de Bioaumentación

Se utilizó la técnica de DGGE (Muyzer & Smalla 1998) para monitorear la evolución en el tiempo de la cepa en el contexto de dos comunidades complejas. La molécula elegida para monitorear la presencia de la cepa aislada en una comunidad fue el ARNr. Se prefirió el uso de ARNr al de ADN porque proveía un mejor reflejo de la actividad metabólica de las bacterias (Boon et al. 2003).

Pasados los 8 días, en el microcosmos que contenía el barro activado proveniente de la refinería de petróleo, dejó de verse la banda correspondiente a la cepa NR2 entre los grupos predominantes. En paralelo a la desaparición de la banda perteneciente a la cepa inoculada, se vio la aparición de distintas bandas a lo largo del tiempo que no se detectaban al inicio (bandas 2, 3 y 4). Por otro lado, la cantidad de UFC que se contaron al día 35 del experimento también demostraron la diferencia entre los tratamientos: en el barro aumentado que provino de la refinería ($1,7 \times 10^7$ UFC/ml), el número de UFC fue superior al observado en la placa con el inóculo del mismo barro sin aumentar, y de los otros dos microcosmos (menos de 5.000 UFC/ml). Estos resultados indicaron que la cepa inoculada produjo un cambio en la comunidad del barro de la refinería, aumentando el número de bacterias capaces de degradar naftaleno. Se sabe que los genes responsables del metabolismo de hidrocarburos frecuentemente se codifican en plásmidos transmisibles, y que son fácilmente intercambiables entre *Pseudomonas* sp. y transmitidos a otras bacterias (Timmis 2002). La secuenciación completa de los plásmidos de degradación de naftaleno pDTG (Dennis & Zylstra 2004) y pND6 (Li et al. 2004), que presentan un 99-100% de similitud entre sí y con el plásmido G7, ha permitido identificar secuencias codificantes para transposasas, resolvasas e integrasas, además de los operones del metabolismo de naftaleno, que presentan alta homología con los genes encontrados en otras cepas estudiadas. Los plásmidos pueden incrementar la tasa de degradación, porque debido a la transducción y conjugación, el número de organismos capaces de utilizar naftaleno aumenta a una tasa mayor que la multiplicación celular (Herrick et al. 1997). El cambio en la estructura de la comunidad bacteriana del barro de la refinería de petróleo pudo haber ocurrido por la utilización del naftaleno como resultado de la conjugación del plásmido hacia otras bacterias, aunque también pudo haberse debido a la utilización de productos de degradación formados en los primeros días de residencia de la cepa NR2.

Para evaluar la actividad de la biomasa en los distintos sistemas en forma directa, se intentó hacer una curva de degradación de naftaleno pasados los 35 días del agregado de la cepa NR2. El ensayo se realizó sobre los cuatro tratamientos, la cepa pura, y un control abiótico que consistía en los barros autoclavados. Se midió la absorbancia a 275 y 280 nm pero en ambos casos una disminución abrupta en los controles abióticos no permitió que obtuviéramos resultados concluyentes. En las publicaciones relacionadas con la degradación de PAHs se utiliza la cromatografía líquida o gaseosa para determinar compuestos de degradación, pero para este trabajo esa opción no estaba dentro de nuestro alcance.

En el barro proveniente de la planta de tratamiento del laboratorio farmacéutico, la cepa NR2 dejó de observarse al segundo día luego de ser introducida en el microcosmos. En este último caso, además de no haberse observado supervivencia de la cepa introducida, tampoco se observaron diferencias en las estructuras de las comunidades bacterianas bioaumentadas y no bioaumentadas. Algunos estudios atribuyen una disminución de la capacidad de supervivencia de los microorganismos en relación al aumento de la distancia entre su lugar de origen y su destino final (Belotte et al. 2003), lo que podría ser una posible explicación de lo observado, ya que la cepa aislada provino de la planta de tratamiento de la refinería de petróleo. El *stress* provocado al ocupar un lugar en una comunidad bacteriana ya establecida y la ruptura del equilibrio ecológico pudieron haber contribuido al resultado observado (Thompson et al. 2005).

La desaparición de bacterias introducidas en experimentos de bioaumentación no es poco común: en numerosos estudios están descriptos los fallidos intentos de bioaumentación, en donde las cepas introducidas no sobreviven en comunidades que perduran a lo largo del experimento (Bouchez *et al.* 2000a). Esto implica que la elección de la cepa utilizada en la bioaumentación es un factor clave para su éxito (Thompson et al. 2005). Es probable que la pérdida de actividad haya sido provocada por un factor biótico, porque si estuviera relacionado con fenómenos abióticos no se hubieran visto diferencias en los DGGEs de los experimentos 1 y 2 o 3 y 4. Para descartar esta posibilidad, se podrían haber llevado a cabo experimentos paralelos, utilizando los barros correspondientes autoclavados.

Uno de los factores bióticos más importantes es la depredación por protozoos y otros invertebrados microscópicos (Bouchez *et al.* 2000b). Este mecanismo también puede explicar el hecho de que haya sido eliminada más rápidamente la cepa introducida en el barro de la farmacéutica que en el de la refinería, ya que en el primer caso la abundancia de protozoos y rotíferos era mayor. Para minimizar este problema en experiencias de bioaumentación, se han desarrollado técnicas con el objetivo de proteger físicamente a las bacterias como, por ejemplo, incorporar al inóculo exógeno en esferas pequeñas de alginato (Gentry et al. 2004).

El método de aislamiento pudo haber contribuido a la elección de una cepa poco resistente a las condiciones a las que se la sometió. El requisito para el aislamiento en placas es el de utilizar naftaleno como única fuente de carbono, y no se pudieron contemplar otros aspectos igualmente necesarios como por ejemplo, el de competencia o *fitness*, o la capacidad de colonización de un nicho. En otras palabras, las bacterias que más rápido crecieron o que fueron favorecidas por el medio de cultivo y las condiciones de incubación fueron elegidas para ser aisladas, pero eso no asegura su buen desempeño dentro de la comunidad y del medio en el que ésta comunidad existe, debido a que puede haber factores que inhiban la biodegradación como el pH, tóxicos, o la ausencia de cosustratos necesarios, entre otros (Thompson et al. 2005).

Para lograr este objetivo, una estrategia alternativa sería estudiar previamente la comunidad para determinar cuáles son los grupos bacterianos funcionalmente más abundantes y desarrollar, a continuación, una estrategia destinada a aislar y cultivar dichas especies para poder reintroducirlas en mayor número y de esta manera aumentar la probabilidad de su supervivencia.

Para que un tratamiento de bioaumentación sea exitoso, la cepa debe sobrevivir por un tiempo lo suficientemente prolongado como para que cumpla su función en el proceso de biodegradación, o que la comunidad sea apta para recibir los genes cedidos por la cepa introducida, y adquieran la capacidad de degradación deseada.

En este trabajo se observó que si bien la cepa NR2 no se integró en ninguna de las comunidades, produjo un cambio en el barro que provenía de la refinería de petróleo tanto en su estructura, observado en el DGGE, como en su actividad, determinado por la diferencia en el número de UFC capaces de degradar naftaleno como única fuente de carbono, observadas en las placas de cultivo entre el barro aumentado y sin aumentar. Por otro lado, los barros provenientes de la planta de tratamiento de la planta elaboradora de productos farmacéuticos no resultaron modificados por la introducción de la cepa, y evolucionaron prácticamente de la misma manera, lo que también se vio reflejado en el DGGE y en el número de UFC en el medio sólido.

Por lo tanto, estos resultados demuestran la relevancia de la elección de la comunidad huésped previo a la elección de la cepa que se utilizará en los procesos de bioaumentación y de la elección de una técnica de aislamiento adecuada al propósito.

Bibliografía

- Molecular Microbial Ecology Manual* Kluwer academics.
- Abdulmawjood A. & Lammler C. (1999) Amplification of 16S ribosomal RNA gene sequences for the identification of streptococci of Lancefield group B. *Res Vet Sci* 67: 159-162.
- Alley J. F. & Brown L. R. (2000) Use of sublimation to prepare solid microbial media with water-insoluble substrates. *Appl Environ Microbiol* 66: 439-442.
- Atlas R. M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev* 45: 180-209.
- Atlas R. M. & Richard B. (1998) *Microbial ecology, fundamentals and applications*. Benjamin/Cummings Science Publishing.
- Bakermans C. & Madsen E. L. (2002) Diversity of 16S rDNA and Naphthalene Dioxygenase Genes from Coal-Tar-Waste-Contaminated Aquifer Waters. *Microb Ecol* 44: 95-106.
- Bastiaens L., Springael D., Wattiau P., Harms H., deWachter R., Verachtert H. & Diels L. (2000) Isolation of Adherent Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Degrading Bacteria Using PAH-Sorbing Carriers. *Appl Environ Microbiol* 66: 1834-1843.
- Belotte D., Curien J. B., Maclean R. C. & Bell G. (2003) An experimental test of local adaptation in soil bacteria. *Evolution Int J Org Evolution* 57: 27-36.
- Bogardt A. H. & Hemmingsen B. B. (1992) Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an over-layer technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites. *Appl Environ Microbiol* 58: 2579-2582.
- Boon N., Top E. M., Verstraete W. & Siciliano S. D. (2003) Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load. *Appl Environ Microbiol* 69: 1511-1520.
- Bouchez T., Patureau D., Dabert P., Juretschko S., Dore J., Delgenes P., Moletta R. & Wagner M. (2000a) Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environ Microbiol* 2: 179-190.
- Bouchez T., Patureau D., Dabert P., Wagner M., Delegenes J. & Moletta R. (2000b) Successful and unsuccessful bioaugmentation experiments monitored by fluorescent in situ hybridization. *Water science & technology* 41: 61-68.
- Cho J. C. & Giovannoni S. J. (2004) Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria. *Appl Environ Microbiol* 70: 432-440.
- Daane L. L., Harjono I., Zylstra G. J. & Haggblom M. M. (2001) Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Appl Environ Microbiol* 67: 2683-2691.
- Dennis J. J. & Zylstra G. J. (2004) Complete sequence and genetic organization of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4. *J Mol Biol* 341: 753-768.
- Diaz E. (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol* 7: 173-180.
- Edlund S. (2001) PAH as a POP Possibilities, implications and appropriateness of regulating global emissions of Polycyclic Aromatic hydrocarbons through the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants pp. 128. The International Institute for Industrial Environmental Economics.
- Gentry T., Rensing C. & Pepper I. (2004) New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 34: 447-494.
- Godon J. J. (1997) Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 63: 2802-2813.
- Head I. M., Saunders J. R. & Pickup R. W. (1998) Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microb Ecol* 35: 1-21.
- Hecker K. H. & Roux K. H. (1996) High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques* 20: 478-485.
- Herrick J. B., Stuart-Keil K. G., Ghiorse W. C. & Madsen E. L. (1997) Natural horizontal transfer of a naphthalene dioxygenase gene between bacteria native to a coal tar-contaminated field site. *Appl Environ Microbiol* 63: 2330-2337.
- Irwin R. ed. (1997) *Environmental contaminants encyclopedia, Naphthalene entry*.
- Jaspers E. & Overmann J. (2004) Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysologies. *Appl Environ Microbiol* 70: 4831-4839.
- Kaeberlein T., Lewis K. & Epstein S. S. (2002) Isolating «uncultivable» microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296: 1127-1129.

- Li W., Shi J., Wang X., Han Y., Tong W., Ma L., Liu B. & Cai B. (2004) Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. strain ND6. *Gene* 336: 231-240.
- Macrae A. (2000) The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian Journal of Microbiology* 31: 77-82.
- Moyer C. L., Tiedje J. M., Dobbs F. C. & Karl D. M. (1996) A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl Environ Microbiol* 62: 2501-2507.
- Muyzer G., de Waal E. C. & Uitterlinden A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
- Muyzer G. & Smalla K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Rockne K. J., Chee-Sanford J. C., Sanford R. A., Hedlund B. P., Staley J. T. & Strand S. E. (2000) Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Appl Environ Microbiol* 66: 1595-1601.
- Stackebrandt E. & Goebel B. (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44: 846-849.
- Stevenson B. S., Eichorst S. A., Wertz J. T., Schmidt T. M. & Breznak J. A. (2004) New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl Environ Microbiol* 70: 4748-4755.
- Thompson I. P., van der Gast C. J., Ciric L. & Singer A. C. (2005) Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ Microbiol* 7: 909-915.
- Timmis K. N. (2002) *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ Microbiol* 4: 779-781.
- Van Hamme J. D., Singh A. & Ward O. P. (2003) Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 503-549.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K. & Swings J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60: 407-438.
- Versalovic J., Koeuth T. & Lupski J. R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19: 6823-6831.
- Wagner M. (2004) Deciphering Functions of Uncultured Microorganisms. *ASM news* 70: 63-70.
- Wilson M. S., Bakermans C. & Madsen E. L. (1999) In situ, real-time catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. *Appl Environ Microbiol* 65: 80-87.
- Woese C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-271.
- Zengler K., Toledo G., Rappe M., Elkins J., Mathur E. J., Short J. M. & Keller M. (2002) Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15681-15686.

