



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA**

**CRECIMIENTO DE CUATRO CEPAS DEL  
GÉNERO *Rhizobium* EN PRESENCIA DE  
HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS  
AROMÁTICOS (HPA)**

**YESSICA GONZÁLEZ PAREDES**

**T E S I S**

**PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2012**

La presente tesis titulada: **CRECIMIENTO DE CUATRO CEPAS DEL GÉNERO *Rhizobium* EN PRESENCIA DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA)**, fue realizada por la alumna: **Yessica González Paredes**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



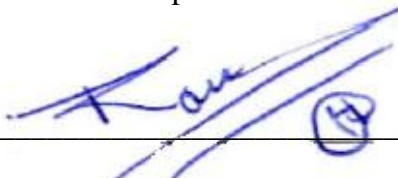
Dr. Alejandro Alarcón

DIRECTORA



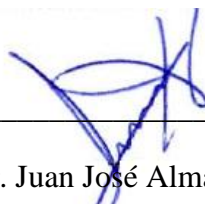
Dra. Esperanza Martínez-Romero

ASESOR



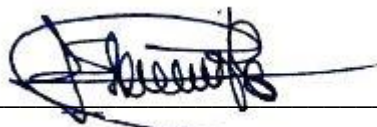
Dr. Ronald Ferrera-Cerrato

ASESOR



Dr. Juan José Almaraz-Suarez

ASESOR



Dr. Jesús Samuel Cruz-Sánchez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto del 2012

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por permitirme vivir muchas experiencias en esta etapa de mi vida, por poner en mi camino a mucha gente bonita que me regalo de su luz para crecer personal y profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante este estudio.

Al Colegio de Postgraduados campus Montecillo por mi formación en esta etapa profesional.

Al Servicios de Apoyo en Resolución Analítica de la Universidad Veracruzana y al Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM por prestarme sus instalaciones y equipos para realizar parte de esta investigación.

A la Dra. Esperanza Martínez Romero por su asesoramiento para la realización de esta tesis, por permitirme participar con su exitoso equipo de trabajo y principalmente porque es emocionante ver la pasión que tiene por la ciencia.

A mi querido Dr. Ronald Ferrera Cerrato por estar siempre pendiente de mi persona y de esta investigación.

Al Dr. Alejandro Alarcón por confiar en mí, por dirigir esta investigación y porque gracias a usted he crecido profesionalmente.

Al Dr. Jesús Samuel Cruz Sánchez por ser parte de mi comité y por brindarme su apoyo durante mi estancia en Xalapa.

Al Dr. Juan José Almaraz Suarez por sus observaciones y comentarios dados en la tesis, por su cordialidad hacia mi persona y porque en estos últimos meses es muy agradable verlo sonreír.

Al Dr. Julián Delgadillo Martínez por aceptar ser mi sinodal y por dedicar parte de su tiempo para leer esta tesis.

A la Dra. María Remedios Mendoza López por su disposición y su amabilidad durante las evaluaciones en el GC-MS. Pero principalmente por brindarme su amistad, por decirme “No te

preocupes Yessica va a salir” y tenia mucha razón porque después de muchos contratiempos se obtuvieron buenos resultados.

Al Dr. Oscar García Barradas por su gentileza y consejos dados a pesar de no ser parte de mi comité.

Al Dr. Ernesto Ormeño Orrillo por dedicarme parte de su tiempo para realizar parte de este estudio y por sus enseñanzas.

Al M. en C. Marco Antonio Rogel por su ayuda y asesoramiento técnico durante mi estancia en el CCG.

A la Dra. Gabriela Sánchez Viveros por su alojamiento durante mi estancia en Xalapa

A las M. en C. Cristina Heredia Acuña y Elvia Pérez Rosales por su amistad, porque las tres aprendimos y crecimos durante este tiempo. Gracias por esos días de risa, tristeza y sobre todo de estrés, jejeje...

A las chicas de Microbiología: Rosalba Argumedo, Esmeralda Cruz, Alejandra Hernández, Claudia Ordóñez, Vivian Quiroz, Mariela Benitez y la pequeña Brigsania Galindez, por brindarme su amistad y por sus consejos.

Al chico que siempre me hace reír Francisco Javier Yépez Hernández.

A mis compañeros de Microbiología: A las Maestras en Ciencia Ma. Encarnación Lara, Alicia Franco, Susana Martínez, Katina Stamatiu, Yadira Cornejo, a la Lic. Alejandra Romero, a los M. en C. Miguel Ángel, Mario Jiménez, al Biol. Eliseo Quit y a Marcos.

A Manuel Solano, Mundito Martínez, Lorenzo Viana y Fernando López por su apoyo técnico en el C.P., a la Sra. Araceli y a Don. Martín por su ayuda durante mi estancia en el CCG.

A Rosario Galicia y a Lucí por su amabilidad y por su servicio secretarial prestado.

A mis compañeros que conocí durante mi estancia en el colegio: Araceli Gastelum, Paulina Brena, Felipe San Juan, Humberto Ramírez, Manolo, Carlos Torres, Edwin Puc y Oswaldo Osuna.

A Marco Antonio Rogel y Aline López por ayudarme, por su amistad y sobre todo por las risas de Marco cada vez que no sale algo.

A mis amigos del CCG: Wendy Ivette Aragón, Eunice López, Julia Althabegoiti, Martha Guerrero, Francisco Flores, Emilio Durán, Rogelio Hernández y Arturo Vera. Gracias chicos por los momentos compartidos.

A Lorenzo Sánchez y Oscar por compartir más que una casa, por ser una pequeña familia el tiempo que convivimos.

A la familia Sánchez Alvarado por abrirme las puertas de su casa y ser parte de su familia durante mi estancia en Xalapa.

Por último pero no menos importante a mí querida familia Limantour, porque aun a distancia estamos pendientes de cada uno de nosotros y porque la tristeza o alegría de uno es de todos.

*"La vida es una unión simbiótica y cooperativa que permite triunfar a los que se asocian."*

**Lynn Margulis**

## DEDICATORIA

*Con mucho cariño y respeto a la M. C. María de Jesús Sánchez Colín<sup>†</sup> porque gracias a usted me encamine en un área tan hermosa como es la Microbiología.*

*A mis padres Cruz González Uribe y Ma. Teresa Paredes Gómez, porque la maestría es un logro más gracias a ustedes, por ser los mejores padres, por su amor dado y por apoyarme en todo momento.*

*A la familia González Villa y Vidal González*

*A mi hermana Sofí por apapacharme y quererme*

*A mi Argelita porque ahora todos los días dibuja en su rostro una sonrisa*

*A los monstruos Israel y José Ángel López porque llegaron a darnos alegría*

*A mi nenita Kenia aunque no estés con nosotros eres parte de todo lo que se vive en la familia*

*A Leticia Bustamante Jiménez y José Ernesto Zúñiga por ser los mejores amigos*

*A Susana Sánchez y a Wendy Ivette Aragón por regalarme de su luz*

*Al Dr. Alejandro Alarcón por ser un amigo y por la gratitud que le tengo a su persona*

Esta tesis titulada “Crecimiento de cuatro cepas del género *Rhizobium* en presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA)”, forma parte del proyecto “**Simbiosis tripartita *Rhizobium*-Leguminosa-Micorriza Arbuscular y su respuesta a los Hidrocarburos del Petróleo Proyecto SEP-CONACYT 79456**”



# CRECIMIENTO DE CUATRO CEPAS DEL GÉNERO *Rhizobium* EN PRESENCIA DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA)

González-Paredes Yessica, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2012

## RESUMEN

Este estudio evaluó el crecimiento de cuatro cepas de *Rhizobium* en medio contaminado con fenantreno (PHE) o benzo[a]pireno (BaP) en concentraciones de 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En la primera fase experimental, *R. tropici* CIAT899, *R. tropici* PRF81, *R. leucaena* CFN299 y *R. etli* CFN42 crecieron en condiciones *in vitro* o en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* L. en presencia de PHE y BaP. El crecimiento *in vitro* de las cuatro cepas a las 24 h, disminuyó al aumentar las concentraciones de ambos HPA; sin embargo, el BaP fue más tóxico para su crecimiento. Las cuatro cepas ante 80 y 100  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$  presentaron una fase de adaptación; para CIAT899 y PRF81 esta fase fue de 48 h, y para CFN299 y CFN42 esta fase fue de 72 y 96 h, respectivamente. La simbiosis de las cuatro cepas con *Phaseolus* se evaluó a los 21 días; el PHE y el BaP disminuyeron el número de nódulos, y la biomasa aérea y radical. Las cepas CIAT899 y PRF81 fueron más tolerantes a los dos HPA al formar mayor número de nódulos en comparación con las cepas CFN299 y CFN42. En la segunda fase experimental se evaluó el crecimiento de *Rhizobium tropici* CIAT899 cuantificando las unidades formadoras de colonias, en PHE y BaP. El crecimiento y la biomasa bacteriana en presencia de PHE fueron menores que los obtenidos ante BaP. Mediante análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), *R. tropici* CIAT899 degradó 50% de PHE y 45% de BaP, a las 120 h.

**Palabras claves:** *rizobios, tolerancia, adaptación, simbiosis, degradación, fenantreno, benzo[a]pireno*



# GROWTH OF FOUR *Rhizobium* STRAINS IN PRESENCE OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAH)

González-Paredes Yessica, M.Sc.

Colegio de Postgraduados, 2012

## ABSTRACT

This study evaluated the growth of four *Rhizobium* strains in contaminated medium with phenanthrene (PHE) or benzo[*a*]pyrene (BaP) at concentrations of 0, 10, 20, 40, 60, 80 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . In the first experimental stage, *R. tropici* CIAT899, *R. tropici* PRF81, *R. leucaena* CFN299 and *R. etli* CFN42 were free-living grown or in symbiosis with *Phaseolus vulgaris* L. at PHE or BaP contamination. At 24 h, growth of the four bacterial strains decreased as concentrations of both PAH increased, although BaP had more toxic effects. Four strains exposed to 80 and 100  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$  showed an adaptation phase; for CIAT899 and PRF81 this phase was of 48 h, whereas for CFN299 and CFN42 was of 72 and 96 h, respectively. The symbiosis of the four bacterial strains with *Phaseolus* was evaluated at 21 days. Number of nodules, and shoot and root biomass diminished at PHE or BaP contamination. Strains CIAT899 and PRF81 had more tolerance to both PAH by showing high number of nodules when compared to CFN299 and CFN42. For the second experimental stage, the growth of *R. tropici* CIAT899 was evaluated by counting the colony forming units when exposed to PHE and BaP. The bacterial growth and biomass in presence of PHE were lower than that obtained for BaP. By analyzing with gas chromatography coupled/mass spectrometry (GC-MS), it was demonstrated that *R. tropici* CIAT899 degraded 50% of PHE, and 45% of BaP, at 120 h.

**Key words:** *rhizobia, tolerance, adaptation, symbiosis, degradation, phenanthrene, benzo[*a*]pyrene*

## CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA. LOS HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS Y SU INTERACCIÓN CON BACTERIAS SIMBIÓTICAS	3
2.1. Características generales y fuentes de obtención de los hidrocarburos policíclicos	3
2.2. Propiedades físicas y químicas de los HPA	4
2.3. Contaminación, toxicidad y legislación de los HPA	5
2.4. Aspectos generales de la degradación de HPA por microorganismos	9
2.5. Características de las bacterias degradadoras de HPA	11
2.6. Degradación de HPA por la enzima dioxigenasa	12
2.7. Degradación de HPA por co-metabolismo	12
2.8. El género <i>Rhizobium</i> y su importancia ambiental	14
2.9. Interacción de <i>Rhizobium</i> con HPA: Estudios <i>in vitro</i> o en simbiosis con leguminosas	14
2.10. Discusión general de la revisión de la literatura y justificación	15
2.11. Literatura citada	16

<b>CAPÍTULO III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Objetivo general</b>	25
3.1.1. Objetivos particulares	25
<b>3.2. Hipótesis general</b>	25
3.2.1. Hipótesis particulares	25
<b>CAPÍTULO IV. TOLERANCIA Y CRECIMIENTO DE CUATRO CEPAS DE</b> <b><i>Rhizobium IN VITRO</i> Y EN SIMBIOSIS CON <i>Phaseolus vulgaris</i> L. EN</b> <b>PRESENCIA DE FENANTRENO Y BENZO[A]PIRENO</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Resumen</b>	26
<b>4.2. Abstract</b>	27
<b>4.3. Introducción</b>	28
<b>4.4. Materiales y métodos</b>	30
4.4.1. Material biológico	30
4.4.2. Hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA)	30
4.4.3. Crecimiento <i>in vitro</i> de las cepas de <i>Rhizobium</i> y <i>Burkholderia phenoliruptrix</i> en medio líquido contaminado con fenantreno y/o benzo[a]pireno.	30
4.4.4. Capacidad de nodulación de cuatro cepas de <i>Rhizobium</i> en <i>Phaseolus vulgaris</i> L. expuestas a HPAs	31
<b>4.5. Resultados y discusión</b>	33
4.5.1. Crecimiento <i>in vitro</i> de las cepas de <i>Rhizobium</i> en medio líquido contaminado con fenantreno y/o benzo[a]pireno	33
4.5.2. Capacidad de nodulación de cuatro cepas de <i>Rhizobium</i> en <i>Phaseolus vulgaris</i> L. expuestas a HPAs	40

<b>4.6. Conclusiones</b>	48
<b>4.7. Literatura citada</b>	48
<b>CAPÍTULO V. CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE FENANTRENO Y BENZO[A]PIRENO POR <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 EN VIDA LIBRE EN SISTEMA <i>IN VITRO</i></b>	<b>56</b>
<b>5.1. Resumen</b>	56
<b>5.2. Abstract</b>	57
<b>5.3. Introducción</b>	58
<b>5.4. Materiales y métodos</b>	60
5.4.1. Determinación de la dinámica de crecimiento de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899	61
5.4.2. Crecimiento de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 en medio líquido contaminado con diferentes concentraciones de fenantreno y/o benzo[a]pireno	61
5.4.3. Crecimiento de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 en medio líquido contaminado con fenantreno (40 µg mL <sup>-1</sup> ) o con benzo[a]pireno (60 µg mL <sup>-1</sup> )	62
<b>5.5. Resultados y discusión</b>	65
5.5.1. Dinámica de crecimiento de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899	65
5.5.2. Crecimiento de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 en medio líquido con diferentes concentraciones de fenantreno y/o benzo[a]pireno	65
5.5.3. Crecimiento de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 ante fenantreno y/o benzo[a]pireno en medio de cultivo líquido	67
5.5.4. Biomasa bacteriana de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 al crecer en medio líquido contaminado con fenantreno (40 µg mL <sup>-1</sup> ) y/o benzo[a]pireno (60 µg mL <sup>-1</sup> )	69

5.5.5. Degradación de fenantreno y/o benzo[a]pireno por <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 evaluado mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)	71
<b>5.6. Conclusiones</b>	79
<b>5.7. Literatura citada</b>	79
<b>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>85</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 2.1. Características fisicoquímicas y carcinogénicas de 17 hidrocarburos policíclicos aromáticos considerados como principales contaminantes según la USEPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América) y la IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer). .....	7
Cuadro 2.2. Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en el suelo, de acuerdo con la norma NOM-138-SEMARNAT/2003. ....	8
Cuadro 2.3. Límites permisibles para fracciones de hidrocarburos en el suelo de acuerdo con la NOM-138-SEMARNAT/2003. ....	9

## ÍNDICE DE FIGURAS

Páginas

Figura 2.1. A) Regiones A, B, Bay y L de los hidrocarburos policíclicos aromáticos, involucradas en la formación de epóxidos metabólicamente activos, los cuales confieren la propiedad de ser cancerígenos y genotóxicos. B) Bioactivación del benzo[a]pireno cuando es transformado a 7,8 dihidrodiol, 9,10 epóxido en células de mamíferos y en bacterias, por la enzima monoxigenasa, siendo este último compuesto más tóxico que el compuesto parental.....	6
Figura 4.1. Tolerancia y adaptación de cuatro cepas de <i>Rhizobium</i> al exponerlas ante diferentes concentraciones de fenantreno.....	35
Figura 4.2. Tolerancia y adaptación de cuatro cepas de <i>Rhizobium</i> al exponerlas ante diferentes concentraciones de benzo[a]pireno.....	36
Figura 4.3. Tolerancia y adaptación de <i>Burkholderia phenoliruptrix</i> al exponerla ante diferentes concentraciones de fenantreno (A) y benzo[a]pireno (B).....	39
Figura 4.4. Número de nódulos desarrollados por cuatro cepas del género <i>Rhizobium</i> a los 21 días en plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. contaminadas con diferentes concentraciones de fenantreno (A) y benzo[a]pireno (B)..	42
Figura 4.5. Producción de biomasa aérea a los 21 días de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L contaminadas con diferentes concentraciones de fenantreno (A) y benzo[a]pireno (B)..	46
Figura 4.6. Producción de biomasa radical a los 21 días en plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L contaminadas con diferentes concentraciones de fenantreno (A) y benzo[a]pireno (B)..	47

Figura 5.1. Cinética de crecimiento de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 en medio de cultivo ELM sin contaminante. (A) fase de latencia, (B) fase logarítmica, y (C) fase estacionaria.....	65
Figura 5.2. Crecimiento de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899, en medio líquido contaminado con diferentes concentraciones de fenantreno (PHE) y benzo[a]pireno (BaP), a las 24 h.....	67
Figura 5.3. Tolerancia y crecimiento (Unidades logarítmicas, UFC <sub>log</sub> ) de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 (R) en medio líquido contaminado con fenantreno [40 µg PHE mL <sup>-1</sup> ] y/o benzo[a]pireno [60µg BaP mL <sup>-1</sup> ].....	69
Figura 5.4. Biomasa seca de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 (R) determinada en medio líquido contaminado con fenantreno [40 µg PHE mL <sup>-1</sup> ] y/o benzo[a]pireno [60 µg BaP mL <sup>-1</sup> ].....	71
Figura 5.5. Abundancia de dos hidrocarburos policíclicos aromáticos en medios sin y con la inoculación de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899. A) Abundancia de PHE, y B) abundancia de BaP.....	73
Figura 5.6. Picos cromatográficos obtenidos por GC-MS, que muestran la abundancia de fenantreno (PHE) en los medios inoculados con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899, en diferentes tiempos de crecimiento bacteriano. ....	76
Figura 5.7. Picos cromatográficos obtenidos por GC-MS, que muestran la abundancia de benzo[a]pireno (BaP) en los medios inoculados con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899, en diferentes tiempos de crecimiento bacteriano. ....	77
Figura 5.8. Porcentaje de degradación de A) fenantreno y B) benzo[a]pireno en medios inoculados con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899, en diferentes tiempos de crecimiento bacteriano. ....	78

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se han sobreexplotado los recursos naturales para satisfacer las necesidades del hombre, lo que además de un desequilibrio ecológico también ha provocado la contaminación del ambiente. La contaminación que se lleva a cabo durante la explotación y extracción del petróleo ha llamado la atención en los últimos años debido a que muchos de sus derivados y/o componentes son recalcitrantes y persistentes en el ecosistema. Tal es el caso de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) que son considerados como principales contaminantes según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (USEPA), ya que algunos de los hidrocarburos enlistados se caracterizan por ser genotóxicos y cancerígenos (Kanaly y Harayama, 2000). Una alternativa para limpiar sitios contaminados con este tipo de compuestos es vía microbiana, en donde los microorganismos que se desarrollan en medios contaminados, utilizan a los hidrocarburos como fuente de carbono y energía para su crecimiento y reproducción (Siciliano *et al.*, 2003). Por lo anterior, se han realizado investigaciones sobre aquellos microorganismos que pueden degradar este tipo de contaminantes, en las que se describen bacterias, cianobacterias, actinomicetos y hongos (Bracho *et al.*, 2005; Kanaly y Harayama, 2000; Satheesh *et al.*, 2009).

La mayoría de las bacterias que degradan hidrocarburos son aerobias y de vida libre como es el caso de aquellas pertenecientes al género *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, cuyo metabolismo expresa enzimas como dioxigenasas, peroxidasas, catalasas, entre otras, con las que oxidan a los



hidrocarburos, y así iniciar su degradación y/o transformación a compuesto menos tóxicos que el compuesto original (Harvey *et al.*, 2002; Seo *et al.*, 2009).

En contraste con las bacterias de vida libre, poco se conoce sobre aquellas bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas cuando se desarrollan en medios contaminados con hidrocarburos. Tal es el caso del género *Rhizobium*, el cual ha sido estudiado con fines agronómicos para cubrir la deficiencia de nitrógeno (Jackson *et al.*, 2008) Este género bacteriano se caracteriza por formar simbiosis con raíces de leguminosas, en donde forma órganos especializados llamados nódulos, y dentro de ellos estas bacterias fijan nitrógeno atmosférico (Oldroyd y Downie, 2008). Algunas bacterias del género *Rhizobium* pueden tolerar y degradar sustancia tóxicas como el dibenzotiofeno (Frassinetti *et al.*, 1998), 2,4 dinitrotolueno (Dutta *et al.*, 2003) y algunos HPA (fenantreno y acenaftileno) (Poonthrigpun *et al.*, 2006; Keum *et al.*, 2006). Sin embargo aún son pocos los estudios donde se observa el papel de este género bacteriano aplicado en sistemas de biorremediación.

Este trabajo analizó el potencial de cepas del género *Rhizobium* para tolerar y degradar HPA de bajo y alto peso molecular como es el fenantreno y el benzo[a]pireno, tanto en vida libre como en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* L.

## CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

### LOS HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS Y SU INTERACCIÓN CON BACTERIAS SIMBIÓTICAS

#### 2.1. Características generales y fuentes de obtención de los hidrocarburos policíclicos

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos son moléculas orgánicas que contienen uno o más anillos aromáticos en su estructura, su presencia en el ambiente tiene tres principales fuentes: biogénica, pirogénica y petrogénica (Seo *et al.*, 2009). Los compuestos biogénicos se caracterizan por tener alguna función o biotransformación en organismos biológicos; un ejemplo de ello son los aminoácidos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y compuestos como la lignina, la cual se encuentra naturalmente como componente principal de la madera (Seo *et al.*, 2009).

Los siguientes dos tipos de compuestos aromáticos (pirogénicos y petrogénicos) son primordialmente generados por las actividades del hombre. La fuente de los compuestos aromáticos pirogénicos es principalmente vía pirolisis de la materia orgánica. Estos compuestos tienen amplia distribución en los ecosistemas y los podemos encontrar en emisiones de automóviles, aviones y barcos, en plantas de generación eléctrica y en las incineradoras de residuos, así como en el humo del tabaco, alimentos ahumados o a la parrilla, en incendios forestales y emisiones volcánicas (Johnsen *et al.*, 2005a). Por otra parte, la presencia en el ambiente de compuestos aromáticos petrogénicos se debe a la explotación, extracción y derrames del petróleo y sus derivados (Chaineau *et al.*, 2003; Rivera-Espinoza y Dendooven, 2004).

Los compuestos aromáticos de origen petrogénico o pirogénico, también llamados hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), sobresalen debido a que son considerados como principales contaminantes del ambiente, y porque están ampliamente distribuidos en

la mayoría de los ecosistemas, además de ser muy persistentes, recalcitrantes, y tener propiedades genotóxicas y cancerígenas (Kanaly y Harayama, 2000; Van Hamme *et al.*, 2003).

## **2.2. Propiedades físicas y químicas de los HPA**

Los HPA se caracterizan por contener dos o más moléculas de benceno fusionados o pentacíclicos, con arreglos lineales, angulares o en racimo (Cerniglia, 1992). En general, los HPA tienen alta hidrofobicidad y estabilidad química por lo cual son más perdurables y menos disponibles en el ambiente. La hidrofobicidad y estabilidad química aumentan sí el peso molecular y el número de anillos de benceno se incrementan en los HPA (Wilson y Jones, 1993). Su coeficiente de partición octanol/agua ( $K_{ow}$ ) es alto lo que hace que los HPA se adsorban en tejidos grasos, suelo y sedimentos, además de conferirles menos labilidad a procesos de degradación y biodisponibilidad (Cofield *et al.*, 2008). Dependiendo del número de anillos, los HPA se han clasificado en dos categorías: i) los de bajo peso molecular (LMW, por sus siglas en inglés) que contienen tres o menos anillos, y ii) los de alto peso molecular (HMW, por sus siglas en inglés) que contienen cuatro o más anillos (Cerniglia, 1992; Chauhan *et al.*, 2008). Los hidrocarburos LMW son solubles en agua en concentraciones de  $\text{mg L}^{-1}$ , mientras que los hidrocarburos HMW sólo son solubles en concentraciones de  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Sin embargo, a pesar de tener baja solubilidad en agua, los HPA son solubles en disolventes orgánicos como acetona, benceno, cloroformo, diclorometano, y hexano, entre otros (Wild *et al.*, 1990). Desde el punto de vista químico, la mayoría de los HPA son sujetos a la fotooxidación, reacción por la cual se facilita su eliminación en la atmósfera; además, también sufren procesos de volatilización y de manera particular, los HPA son susceptibles a la degradación vía microbiana (Xu-Xiang *et al.*, 2006)

### 2.3. Contaminación, toxicidad y legislación de los HPA

Los HPA son muy persistentes y recalcitrantes, y se pueden encontrar en la mayoría de los ecosistemas (agua, aire, suelo, sedimentos y tejidos biológicos); 17 de éstos, tienen potencial genotóxico, es decir se unen al ADN causando mutaciones en él organismo (White, 2002). Por ello, Los HPA están ubicados como principales contaminantes según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (USEPA) (Cuadro 2.1). Por otro lado, 15 de los 17 HPA enlistados por la USEPA, pueden ser carcinogénicos, con base en lo indicado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (ATDSR, 2005; Chauhan *et al.*, 2008; USEPA, 2004).

La toxicidad se puede definir como la capacidad intrínseca que posee un agente químico de producir efectos adversos sobre un organismo. La toxicidad en humanos por HPA se lleva a cabo de dos maneras; i) directa: cuando hay contacto epitelial, ingestión o inhalación de partículas de HPA, e ii) indirecta: ocurre durante la ingesta de alimento contaminado. La toxicidad de los HPA se incrementa con la cadena trófica, lo cual conlleva a que el receptor final de dicha cadena, tenga mayor acumulación de HPA en su organismo y con ello, mayor riesgo de toxicidad. A su vez, el consumo de alimentos a la parrilla y el humo de cigarro directo o indirecto, representa una exposición más a los HPA (Goldman, 2001; Ping *et al.*, 2007).

Estudios sobre mutagénesis indican que dentro de los HPA no mutagénicos están el naftaleno, fluoreno y antraceno (Juhász y Naidu, 2000). Sin embargo, se conoce que algunos HPA con propiedades carcinogénicas como el fenantreno (PHE), tienen en su molécula regiones conocidas como A, B, Bay y L, y que al ser metabolizados forman epóxidos altamente activos (Figura 2.1A). Dichos epóxidos confieren al PHE la característica de ser cancerígeno y genotóxico (Goldman, 2001). Un ejemplo más, es el

benzo[a]pireno (BaP), considerado por la USEPA como uno de los 15 HPA más tóxicos, cancerígenos y mutagénicos ya que puede ser bioactivado o transformado a metabolitos como el benzo[a]pireno 7,8 dihidrodiol, 9,10 epóxido en células de mamíferos y en bacterias, siendo este intermediario más cancerígeno que el compuesto parental (Figura 2.1B) (Pothuluri y Cerniglia, 1994).

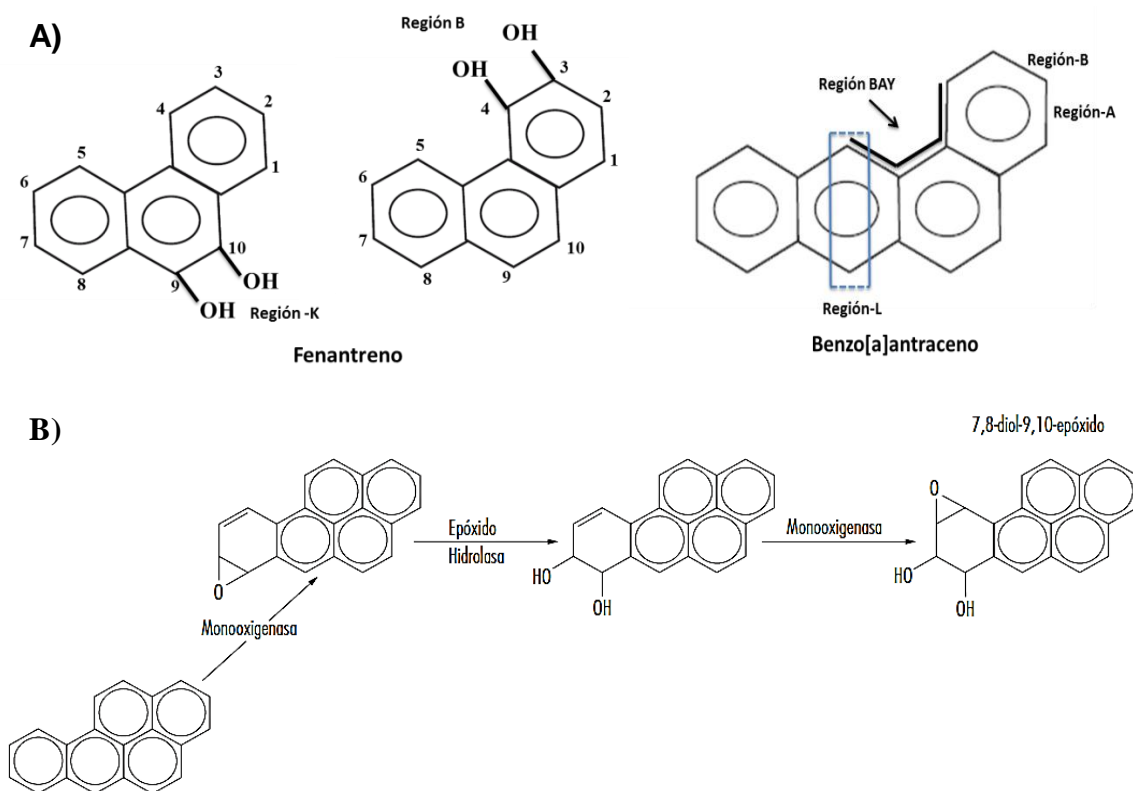


Figura 2.1. A) Regiones A, B, Bay y L de los hidrocarburos policíclicos aromáticos, involucradas en la formación de epóxidos metabólicamente activos, los cuales confieren la propiedad de ser cancerígenos y genotóxicos. B) Bioactivación del benzo[a]pireno cuando es transformado a 7,8 dihidrodiol, 9,10 epóxido en células de mamíferos y en bacterias, por la enzima monooxigenasa, siendo este último compuesto más tóxico que el compuesto parental (Goldman, 2001).

Cuadro 2.1. Características fisicoquímicas y carcinogénicas de 17 hidrocarburos policíclicos aromáticos considerados como principales contaminantes según la USEPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América) y la IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) (ATDSR, 2005; Chauhan *et al.*, 2008; USEPA, 2004).

Hidrocarburos policíclicos	Número de anillos	Solubilidad en agua a 25°C mg L <sup>-1</sup>	Coefficiente de partición Octanol/agua (K <sub>ow</sub> )	Grupo de Carcinogenicidad *
<b>Aromáticos</b>				
Naftaleno	2	3.2	2.3 x10 <sup>3</sup>	2B
Naftilamina	2	4.6	1.4 x10 <sup>3</sup>	1
Acenaftaleno	3	3.4	2.1 x10 <sup>4</sup>	NR
Acenaftileno	3	3.93	1.2 x10 <sup>4</sup>	NR
Fluoreno	3	1.9	1.5 x10 <sup>4</sup>	3
Antraceno	3	0.05-0.07	2.8 x10 <sup>4</sup>	3
Fenantreno	3	1.0-1.3	2.9 x10 <sup>4</sup>	3
Fluoranteno	4	0.26	3.4 x10 <sup>5</sup>	3
Criseno	4	0.002	4.0 x10 <sup>5</sup>	3
Pireno	4	0.14	2.0 x10 <sup>5</sup>	3
Benzo[a]antraceno	4	0.01	4.0 x10 <sup>5</sup>	2A
Benzo[b]fluoranteno	5	NR	4.0 x10 <sup>6</sup>	2B
Benzo[k]fluoranteno	5	NR	7.0 x10 <sup>6</sup>	2B
Benzo[a]pireno	5	0.0038	1.0 x10 <sup>6</sup>	2A
Dibenzo[a,h]antraceno	5	0.0005	1.0 x10 <sup>6</sup>	2A
Benzo[g, h, j]perileno	6	0.003	1.0 x10 <sup>7</sup>	3
Indeno[1, 2, 3-c, d]pireno	6	0.062	1.0 x10 <sup>7</sup>	2B

\*Grupo 1. El agente es carcinogénico para los humanos

Grupo 2A probable carcinogénico (Se utiliza esta categoría cuando hay evidencia limitada de carcinogenicidad en los humanos y evidencia suficiente en animales de experimentación).

Grupo 2B, posiblemente carcinogénico (Se utiliza esta categoría cuando hay evidencia limitada de carcinogenicidad en los humanos y poca evidencia en animales de experimentación).

Grupo 3. No se ha clasificado en cuanto a su carcinogenicidad para los humanos.

NR= no reportado

El suelo es el reservorio de muchos contaminantes generados por las actividades humanas, y los HPA no son la excepción. El ecosistema suelo ha sido el más susceptible a este tipo de contaminantes, por lo cual se han realizado diferentes estudios de ecotoxicidad con el objetivo de conocer, por ejemplo, el efecto de estos contaminantes en plantas, así como en la macro, meso y microfauna. Los HPA afectan la germinación y el crecimiento de plantas, así como la supervivencia y reproducción de algunos invertebrados, y causan mutagénesis en organismos procariotes (Cofield *et al.*, 2008). La biodisponibilidad de los HPA es marcadamente afectada por las propiedades físicas, químicas y biológicas, y por la edad del suelo, mientras que el efecto agudo (respuesta tóxica inmediata al contaminante), crónico (respuesta toxica después de cierto tiempo de exposición al contaminante) y mutagenicidad dependerán del tipo y concentración del hidrocarburo (Eom *et al.*, 2007).

Por lo anterior, se han decretado normas para legislar las características de los sitios contaminados con este tipo de sustancias. La USEPA, es la encargada de regular este tipo de hidrocarburos en los Estados Unidos. Aquí en México, la SEMARNAT (2003), describe en la NORMA-138-SEMARNAT/2003, los límites máximos permisibles de hidrocarburos dependiendo del tipo y del uso de suelo ya sea agrícola, residencial e industrial (Cuadros 2.2 y 2.3).

Cuadro 2.2. Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en el suelo, de acuerdo con la norma NOM-138-SEMARNAT/2003 (SEMARNAT, 2003).

Fracción de hidrocarburos	Uso de suelo predominante (mg kg <sup>-1</sup> base seca)		
	Agrícola	Residencial	Industrial
<b>Ligera</b>	200	200	500
<b>Media</b>	1,200	1,200	5,000
<b>Pesada</b>	3,000	3,000	6,000

Cuadro 2.3. Límites permisibles para fracciones de hidrocarburos en el suelo de acuerdo con la NOM-138-SEMARNAT/2003 (SEMARNAT, 2003).

Fracción de Hidrocarburos	Uso de suelo predominante (mg kg <sup>-1</sup> )		
	Agrícola <sup>2</sup>	Residencial <sup>3</sup>	Industrial
Benceno	6	6	15
Tolueno	40	40	100
Etilbenceno	10	10	25
Xilenos	40	40	100
Benzo[a]pireno <sup>4</sup>	2	2	10
Dibenzo[a,h]antraceno <sup>4</sup>	2	2	10
Benzo[a]antraceno <sup>4</sup>	2	2	10
Benzo[b]fluoranteno <sup>4</sup>	2	2	10
Benzo[k]fluoranteno <sup>4</sup>	8	8	80
Indeno (1,2,3-cd)pireno <sup>4</sup>	2	2	10

Para usos de suelo mixto, deberá aplicarse la especificación al menor de los usos de suelo involucrados; 2.-Agrícola: incluye forestales, recreativo, y de conservación; 3.-Industrial; incluye comercial; 4.-La determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos deberá realizarse únicamente en los casos que se pretende demostrar que se está cumpliendo con los límites máximos permisibles.

#### 2.4. Aspectos generales de la degradación de HPA por microorganismos

La contaminación por HPA se ha incrementado en las últimas décadas y se estima que para los próximos 25 años se tendrán 249,000 sitios contaminados con componentes del petróleo que requerirán remediación (USEPA, 2004). Como parte de los sistemas de remediación, existen técnicas físicas y químicas como la incineración o el lavado de suelo. Sin embargo, también existe la técnica biológica mejor conocida como biorremediación, la cual se basa en la habilidad



de los microorganismos para degradar este tipo de compuestos, hasta convertirlos a bióxido de carbono y agua. Así, la biorremediación, es una técnica muy prometedora ya que es muy efectiva, de bajo costo y amigable con el ambiente (Chauhan *et al.*, 2008; Ivancev-Tumbas *et al.*, 2004; Mueller *et al.*, 1996; Rivas., 2006).

La degradación vía actividad microbiana se da principalmente porque los microorganismos toman a los HPA como fuente de carbono y energía para su crecimiento y reproducción (Siciliano *et al.*, 2003). Además, también pueden disminuir la toxicidad de estos compuestos al hacerlos biodisponibles para otros microorganismos, o bien, llevar a cabo un co-metabolismo donde toman a los HPA de bajo peso molecular como co-sustrato (Johnsen *et al.*, 2005b). Los HPA no sólo proveen carbono a los microorganismos, sino que también aportan electrones para obtener energía. Sin embargo, lo anterior dependerá de la convergencia de factores bióticos y abióticos como: i) las propiedades del HPA (peso molecular, efecto de concentración, solubilidad en agua, hidrofobicidad y estructura del anillo), ii) propiedades del suelo (contenido nutrimental y materia orgánica, presencia de fuentes alternas de carbono, temperatura, porosidad y pH), y iii) la ecología microbiana (diversidad, abundancia de especies, rutas metabólicas, producción de surfactantes y afinidad de sustrato) (Alexander, 1999; Huang *et al.*, 2004).

Existen microorganismos como bacterias, cianobacterias, actinomicetos y hongos, cuyo metabolismo tiene enzimas que degradan HPA (Bracho *et al.*, 2005; Kanaly y Harayama, 2000). Cabe señalar que las vías de degradación de los HPA dependerán del metabolismo de cada microorganismo, por lo tanto estas vías son diferentes entre eucariontes y procariontes. En los organismos eucariontes como es el caso de los hongos, la oxidación de los anillos aromáticos de los HPA se da principalmente por la vía citocromo P450 que es dependiente de una enzima llamada monooxigenasa, la cual hidroliza varios metabolitos primarios y secundarios, incluyendo epóxidos, fenoles, quinonas, *trans*-dihidrodiol, sulfato glutationes y glucorinados conjugados

(Cerniglia, 1992). Para el caso de las bacterias, la degradación ocurre principalmente por la vía catecol, que es subsecuentemente hidrolizado a intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, y en la cual interviene la enzima dioxigenasa (Johnsen *et al.*, 2005a)

## **2.5. Características de las bacterias degradadoras de HPA**

Las bacterias son microorganismos que se encuentran en todos los ecosistemas, ya que se adaptan fácilmente a cambios bruscos que ocurren en el medio donde se desarrollan. Por lo anterior, no es una sorpresa que este tipo de microorganismos se encuentre en sitios contaminados con HPA (Zhang y Bennett, 2005). Las bacterias tienen la capacidad de oxidar hidrocarburos alifáticos, alicíclicos y aromáticos, dando lugar a la remoción de estos compuestos del ambiente contaminado (Atlas y Bartha, 2002).

Para que las bacterias tomen a los hidrocarburos como única fuente de carbono y energía, se necesita de una serie de condiciones fisicoquímicas y nutricionales óptimas (nitrógeno, fósforo, azufre, vitaminas, entre otros) (Atlas y Bartha, 2002). No obstante, las condiciones ideales para que se lleve a cabo la degradación de HPA dependerá de las características genotípicas de cada especie bacteriana, ya que se ha reportado una extensa diversidad ecológica de bacterias degradadoras (aerobias o anaerobias; gram positivas o gram negativas; de vida libre o simbióticas; mesófilas, termófilas y psicrófilas); lo que conlleva a que cada una de ellas expresen diferentes enzimas y rutas metabólicas (Fuchedzhieva *et al.*, 2008; Márquez-Rocha *et al.*, 2005; Mohamed *et al.*, 2006; Si-Zhong *et al.*, 2009; Wolicka *et al.*, 2009).

La degradación de HPA principalmente en aquellos de bajo peso molecular como naftaleno, fluoreno, antraceno y fenantreno, ha sido muy estudiada en géneros bacterianos como *Aeromonas*, *Artrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, entre otros. Sin embargo, a pesar que son pocas las bacterias con la capacidad de utilizar HPA de cuatro o más anillos de benceno (criseno, pireno, benzo[a]pireno,

benzo[a]antraceno, o dibenzo[a,h]antraceno) como única fuente de carbono y energía (Kanaly y Harayama, 2000), se ha reportado que los géneros *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, o *Xanthomonas*, pueden también metabolizarlos (Santos *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2009; Xu-Xiang *et al.*, 2006).

## **2.6. Degradación de HPA por la enzima dioxigenasa**

La degradación de HPA se da generalmente en procesos aerobios, aunque en procesos anaerobios también ha sido reportada (Bianchin *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2000). En el caso de la degradación de HPA por bacterias aerobias, el oxígeno juega un papel muy importante, ya que se necesita en concentraciones adecuadas para que se lleve a cabo la oxidación de estos compuestos por medio de enzimas como mono y dioxigenasas. A pesar de que la actividad de la enzima monooxigenasa se encuentra en hongos para degradar HPA, esta enzima en algunas bacterias se activa durante el inicio de la degradación de HPA (Kelley *et al.*, 1990).

Las dioxigenasas hidroxilantes corresponden a sistemas enzimáticos que involucran componentes proteicos que se dividen, desde el punto de vista funcional, en dos clases: oxigenasa terminal o hidroxilasa, y componentes transportadores de electrones. Generalmente, los genes que codifican para las dioxigenasas hidroxilantes están agrupados con un gen que codifica para un dihidrodiol deshidrogenasa que pertenece a la familia de las alcohol deshidrogenasas (Manson y Cammack, 1992). La dioxigenasa origina la pérdida de aromaticidad del compuesto y hace posible la utilización del carbono contenido en su estructura cíclica saturada mediante la intervención de otras enzimas, generando productos que son metabolizados hasta compuestos intermediarios del ciclo de Krebs (Samanta *et al.*, 2002).

## **2.7. Degradación de HPA por co-metabolismo**

La degradación vía microbiana de HPA es más reportada en aquellos hidrocarburos LMW; sin embargo, son pocos los microorganismos (bacterias, hongos y cianobacterias) que

degradan a los hidrocarburos de alto peso molecular al utilizarlos como única fuente de carbono y energía). La degradación de los hidrocarburos HMW es más recalcitrante para los microorganismos debido a su estructura, peso molecular y disponibilidad (Zhong *et al.*, 2007). Una forma de degradar a los HPA de alto peso molecular es por medio del co-metabolismo, el cual se refiere a la transformación biológica de un cosustrato (compuesto que se cometaboliza por la adición de sustrato en el medio) mientras que el sustrato (compuesto que se adiciona al medio que permite la inducción de enzimas necesarias para la degradación) sirve como energía primaria como fuente de carbono (Juhaz y Naidu, 2000). Algunos estudios mencionan que el extracto de levadura, la glucosa, el succinato, el salicilato, la peptona, el medio dextrosa, y los HPA de bajo peso molecular (fenantreno, naftaleno, etc.) entre otros, pueden ser utilizados como sustrato en el co-metabolismo de HPA de alto peso molecular (Zhong *et al.*, 2010).

La tasa de consumo del cosustrato está directamente relacionada con la tasa de consumo del sustrato, la cual está regulada por i) la pérdida de la actividad microbiana por el agotamiento del sustrato utilizado para el crecimiento bacteriano, ii) la disminución de la actividad microbiana por la acumulación de productos tóxicos, iii) inhibición del consumo del sustrato por el cosustrato y viceversa, y iv) decaimiento celular en ausencia del sustrato (García-Rivero y Peralta-Pérez, 2008).

Algunos trabajos donde se llevan cabo la biorremediación *in situ* mencionan que se deben determinar algunas variables antes de utilizar el co-metabolismo para la degradación de algunos contaminantes como los HPA: i) identificar y explicar los factores limitantes de manera que sea posible mantener el co-metabolismo durante el tiempo requerido para el tratamiento, ii) buscar un sustrato que proporcione la mayor tasa de co-metabolismo, iii) definir la forma adecuada de dosificación del sustrato con respecto al tiempo y concentración del cosustrato, iv) determinar las

concentraciones de sustrato que pueden ser tratadas, y v) evitar la estimulación de una flora microbiana indeseable al aplicar el sustrato (García-Rivero y Peralta-Pérez, 2008).

El mecanismo de acoplamiento entre el co-metabolismo del cosustrato y consumo del sustrato puede diferir dependiendo de las características químicas del sustrato y de las especies bacterianas involucradas. En general, el co-metabolismo ocurre cuando la enzima de un microorganismo que crece a partir de un sustrato A reconoce al compuesto B como sustrato, y lo transforma en un producto. Así la transformación está generalmente limitada porque las siguientes enzimas de la ruta metabólica suelen tener una especificidad mayor y no reconocen al producto B como sustrato (Atlas y Bartha, 2002). Las enzimas monooxigenasas y las dioxigenasas, comúnmente están asociadas al co-metabolismo (Juhász y Naidu, 2000).

## **2.8. El género *Rhizobium* y su importancia ambiental**

El género *Rhizobium*, comprende un grupo de bacterias Gram negativas, en forma de bacilos, y se caracterizan por formar simbiosis con leguminosas. En esta simbiosis se desarrollan unos órganos especializados llamados nódulos en cuyo interior las bacterias fijan el nitrógeno atmosférico, propiedad que las hace de gran importancia para la agricultura, ya que pueden aportar de 145-450 kg de N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> a los suelos agrícolas (Giles y Downie., 2008; Lloret y Martínez-Romero, 2005; Raymond *et al.*, 2004).

## **2.9. Interacción de *Rhizobium* con HPA: Estudios *in vitro* o en simbiosis con leguminosas**

En muchos estudios mencionan que la actividad microbiana incrementa la atenuación de plaguicidas, translocación de metales pesados, y degradación de xenobióticos y HPA (Johnson *et al.*, 2004). El género *Rhizobium* ha sido poco estudiado con fines de biorremediación de suelos contaminados. Algunas especies (*Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Shinorhizobium* sp.) en vida libre y en simbiosis, toleran y se desarrollan en presencia de arsénico, de metales pesados, de compuestos explosivos como el 2,4-

dinitrotolueno (Broos *et al.*, 2004; Dutta *et al.*, 2003; Reichman, 2007) y de HPA de bajo peso molecular (González-Paredes *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2004).

Son pocas las cepas de *Rhizobium* que han sido evaluadas en vida libre por su capacidad de degradar HPA. Keum *et al.* (2006) mencionaron que *Sinorhizobium* sp. C4 tiene la capacidad tomar al fenantreno como única fuente de carbono y energía, además de degradarlo mediante enzimas dioxigenasas. De igual manera, *Rhizobium* sp. cepa CU-A1 puede degradar acetatileno y tomarlo como única fuente de energía (Poonthrigpun *et al.*, 2006).

La importancia de utilizar a bacterias del género *Rhizobium* en suelos contaminados, se debe a que se asocian con leguminosas en las cuales pueden fijar nitrógeno atmosférico, favoreciendo con ello un mejor desarrollo de la planta (Oldroyd y Downie, 2008).

La degradación de HPA por bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) de vida libre o en simbiosis ha sido poco estudiada. Sin embargo, los estudios del género *Rhizobium* con leguminosas, indican que esta simbiosis es inhibida al exponerse a hidrocarburos, ya que se reduce el desarrollo de los rizobios, el intercambio químico de las moléculas mensajeras entre los dos organismos, y la nodulación, y en consecuencia la fijación de nitrógeno atmosférico es limitada (Adam y Duncan, 2003; Lindstrom *et al.*, 2003; Méndez *et al.*, 2005; Rivera-Cruz *et al.*, 2005)

## **2.10. Discusión general de la revisión de la literatura y justificación**

Como se mencionó, los hidrocarburos policíclicos aromáticos son contaminantes tóxicos que se encuentran en la mayoría de los ecosistemas, cuya recalcitrancia y persistencia en el ambiente dependerá de su estructura química: los HPA de bajo peso molecular son más lábiles que los HPA de alto peso molecular. Por otro lado, la contaminación en el sistema suelo por HPA

ha aumentado en las últimas décadas, por tal motivo se han buscado alternativas biológicas como la biorremediación para limpiar los sitios contaminados con este tipo de hidrocarburos.

Estudios enfocados a la degradación de HPA vía microbiana, han demostrado que algunas bacterias tienen enzimas que pueden metabolizarlos y tomarlos como fuente de carbono y energía para su crecimiento y reproducción. Sin embargo, la mayoría de los estudios mencionan que la degradación de HPA está mediada por bacterias de vida libre. Por lo anterior, poco se conoce del potencial que tienen las bacterias simbióticas para crecer en medio contaminado con estos hidrocarburos.

Las bacterias del género *Rhizobium* además de crecer en vida libre, se caracterizan por establecer simbiosis con las raíces de leguminosas, formando nódulos donde fijan el nitrógeno atmosférico. No obstante, poco se conoce del comportamiento de estas bacterias al exponerlas ante HPA. Por tal razón, resulta interesante evaluar el potencial que tienen algunas cepas de *Rhizobium* para desarrollarse y/o degradar en vida libre o en simbiosis con leguminosas a este tipo de hidrocarburos.

## **2.11. Literatura citada**

Adam, G. and Duncan, H. 2003. The effect of diesel fuel on common vetch (*Vicia faba* L.) plants. *Environmental Geochemistry and Health*. 25: 123-130.

Alexander, M. 1999. Biodegradation and bioremediation. Academic Press, San Diego, CA, pp. 302-305.

Atlas, R. and Bartha, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. España. 677p.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2005. CERCLA Priority list of hazardous substances US Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, USA.  
<http://www.asdr.cdc.gov/cercla/05list.html>. Consultada en Enero, 2010.

- Bianchin, M., Smith, L., Barker, J.F., and Beckie, R. 2006. Anaerobic degradation of naphthalene in a fluvial aquifer: A radiotracer study. *Journal of Contaminant Hydrology*. 84: 178-196.
- Bracho M., Díaz, L. y M.L. Soto. 2005. Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado de Zulia, Venezuela. *Biológico*. 38 :1-9.
- Broos, K., Uyttebroek, M., Mertens, J., and Smolders, E. 2004. A survey of symbiotic nitrogen fixation by white clover grow on metal contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 36: 633-640.
- Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*. 3:351-368.
- Cofield, N., Banks, M.K., and Schwab, A.P. 2008. Lability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *Chemosphere*. 70: 1664-1652.
- Chaineau, H.C., Yepremian C., Vidalie J.F., Ducreux J., and Ballerini, D. 2003. Biorremediation of crude oil-polluted soil: Biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water Air Soil Pollution*. 144: 419-440.
- Chauhan, A., Oakeshott, J.G., and Rakesh, K.J. 2008. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal Microbiology*. 48:95-113.
- Chang, W., Um, Y., Hoffman, B., and Pulliam, H.T.R. 2005. Molecular characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading methanogenic communitites. *Biotechnology Progress*. 21: 682-688.
- Dutta, S.K., Hollowell, G.P., Hashem, F.M., and Kuykendall, L.D. 2003. Enhanced bioremediation of soil containing 2,4-dinitrotoluene by a genetically modified *Sinorhizobium meliloti*. *Soil Biology and Biochemistry*. 35: 667-675.



- Eom, I.C., Rast, C., Veber, A.M., and Vasseur, P. 2007. Ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67: 190-205.
- Frassinetti, S., Setti, L., Corti, A., Farrinelli, P., Montevecchi, P., and Vallini, G. 1998. Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal of Microbiology*. 44: 289-297.
- Fuchedzhieva, N., Karakashev, D., and Angelidaki, I. 2008. Anaerobic biodegradation of fluoranthene under methanogenic conditions in presence of surface-active compounds. *Journal Hazardous Materials*. 153:123-127.
- García-Rivero, M. y Peralta-Pérez, M.R. 2008. Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 7:1-12.
- Giles, E.D.O., and Downie, J.A. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legume. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 519-546.
- Goldman, R. 2001. Smoking increases carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human lung tissue. *Cancer Research*. 61:63-67.
- González-Paredes, Y., Ferrera-Cerrato, R., and Alarcón A. 2008. Effect of three polycyclic aromatic hydrocarbons on nodulation of *Rhizobium tropici* CIAT899 on *Phaseolus vulgaris*. Pp. 294. In. The third International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering (3IMBE). Sastre-Conde, I., Macaire, H., Lopez-Lopez, G., Ibañez-Burgos, A.M., Garau, C., Luna, J.M., March, J., Martorel, A., Colombas, M, Vadell, J., Vera, J., and Sanz, J.L. (Eds.). 21-25 September, 2008. Palma de Mallorca, Spain.
- Harvey, C., Castro, P., Harmas, H., Lichtfouse, E., Schäffner, A., Smrcek, S., and Werck, D. 2002. Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environmental Science and Pollution*. 9: 29-47.

- Huang, X.D., El-Alawi, Y., Penrose, D.M., Glick, B.R., and Greenberg, B.M. 2004. A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. *Environmental Pollution*. 130: 465-476.
- Ivancev-Tumbas, I., Trickovic, J., Karlovic, E., Tamas, Zagorka., Roncevic, S., Dalmacija, B., Petrovic, O., and Klasnja, M. 2004. GC/MS-SCAN to follow the fate of crude oil components in bioreactors set to remediate contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 54: 311-318.
- Jackson, L.E., Burger, M. and Cavagnaro, T.R. 2008. Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services. *Annual Review of Plant Biology*. 59:341-63.
- Johnsen, A.R., Wick, L.Y and Harms, H. 2005a. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*. K 133: 71-84.
- Johnsen, A.R., and Karlson, U. 2005b. PAH degradation capacity of soil microbial communities- does it depend on PAH exposure? *Microbial Ecology*. 50:488-495.
- Johnson, D.L., Maguire, K.L., Anderson, D.R. and McGrath, S.P. 2004. Enhanced dissipation of crysene in planted soil: the impact of a rhizobial inoculum: *Soil Biology and Biochemistry*. 36: 33-38.
- Juhasz, A.L and Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 45:57-88.
- Kanaly, R.A and Harayama, S. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*. 182:2059-2067.
- Kelley, I., Freeman, J.P., and Cerniglia, C.E. 1990. Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a *Mycobacterium* sp. *Biodegradation*. 1: 283-290.

- Keum, Y.S., Seo, J.S., Mu, Y., and Li, Q.X. 2006. Degradation pathways of phenantrene by *Sinorhizobium* sp. C4. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 935-941.
- Lindström, K., Hitntsa, H., Kaksonen, A., Mokolke, L., Mäkeläinen, K., Pitkäljärvi, J., and Suominen, L. 2003. Potential of the *Galega-Rhizobium galegae* system for bioremediation of-contaminated soil. *Technology and Biotechnonology*. 41: 11-16.
- Lloret, L y Martínez-Romero, E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47: 43-60.
- Manson, J.R. and Cammack, R. 1992. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annual Review Microbiology*. 46, 277-305.
- Márquez-Rocha, F.J., Olmos-Soto, J., Rosano-Hernández, M.C., and Muriel-García, M. 2005. Determination of the hydrocarbon-degrading metabolic capabilities of tropical bacterial isolates. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 55: 17-23.
- Méndez, N.J., Mujia, B.C. y Pino, M.F. 2005. Efecto de la contaminación con petróleo sobre los caracteres de la nodulación en el cultivo de frijol *Vigna unguiculata* (L.) Wal.) en dos suelos del estado de Monagas. *Revista UDO Agrícola* 5: 81-87.
- Mohamed, M.E., Al-Dousary, M., Hamzah, R.Y and Fuchs, G. 2006. Isolation and characterization of indigenous thermophilic bacterial active in natural attenuation of bio-hazardous petrochemical pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 58: 213-223.
- Mueller, J.G., Cerniglia C.E. and Pintchard P.H. 1996. Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. pp 125-198. *In*. Bioremediation principles and applications. R.L. Crawford and D.L. Crawford (Eds), Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Oldroyd, G.E.D. and Downie, J.A. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*. 59:519-46.
- Ping, L.F., Luo, Y.M., Zhang, H.B., Li, Q.B and Wu, L.H. 2007. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in thirty typical soil profiles in the Yangtze River Delta region, east China. *Environmental Pollution*. 147: 358-365.
- Pothuluri, J.V. and Cerniglia, R.M.1994. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons pp 92-124. *In*. Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals. Chaundhry, G.R (Eds). Dioscorides Press. Portland, OR. USA.
- Poonthrigpun, S., Pattaragulwanit, K., Paengthai, S., Kriangkripipat, T., Juntongjin, K., Thaniyavarn, S., Petsom, A., and Pinphanichakarn, P. 2006. Novel intermediates of acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. strain CU-A1: Evidence for naphthalene-1,8-dicarboxylic acid metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:6034-6039.
- Raymond, J., Siefert, J., Staples, C and Blankenship, R. 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology Evolution*. 21: 541-554.
- Reichman, S.M. 2007. The potential use the legume-*Rhizobium* symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. *Soil Biology and Biochemistry*. 39: 2587-2593.
- Rivas, F.J. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soil: A short review of chemical oxidation based treatments. *Journal Hazardous Materials*. 138: 243-251.
- Rivera-Cruz, M., Trujillo, A., Miranda, A. y Maldonado, E. 2005. Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleo nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia*. 30: 326-331.
- Rivera-Espinoza and Dendooven, L. 2004. Dynamics of carbon, nitrogen and hydrocarbons in diesel-contaminated soil amended with biosolids and maize. *Chemosphere*. 54: 379-386.

- Samanta, S.K., Singh, O.V. and Jain, R.K. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*. 20: 243-248.
- Satheesh, K.M., Muralitharan, G. and Thajuddin, N. 2009. Screening of a hypersaline cyanobacterium, *Phormidiumtenue* for the degradation of aromatic hydrocarbons: naphthalene and anthracene. *Biotechnology Letter*. 31:1863-1866.
- Santos, E.C., Jacques, R.J.S., Bento, F.M., Peralba, R., Selbach, P.A., Sá, E.L.S. and Camargo, F.A.O. 2008. Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology*. 99: 2644-2649.
- SEMARNAT. 2003. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT-2003. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en el suelo y las especificaciones para su caracterización y remoción. [www.ordenjuridico.gob.mx/./SEMARNAT/Normas oficiales](http://www.ordenjuridico.gob.mx/./SEMARNAT/Normas_oficiales). Consultada en Enero, 2010.
- Seo, J.S., Keum, Y.S., and Li, Q.X. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 6: 278-309.
- Siciliano, S.D., Germida, J.J., Banks, K., and Greer, C.W. 2003. Changes in microbial community composition and function during a polycyclic aromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Applied Environmental Microbiology*. 69:483-489.
- Si-Zhong, Y., Hui-Jun, J., Zhi, W., Rui-Xia, H., Yan-Jun, J., Xiu-Mei, L. and Shao-Peng, Y. 2009. Bioremediation of oil spills in cold environments: A Review. *Pedosphere* 19: 371-381.
- USEPA 2004. Cleaning up the nation's wastes sites: Markets and technology trends office of soil waste and emergency response. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. <http://www.epa.gov/download/market/20004market.pdf>. Consultada en Enero, 2010.

- Van Hamme, J., Singh, A. and Ward, O. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67: 503-549.
- Wolicka, D., Suszek A., Borkowski A. and Bielecka A. 2009. Application of aerobic microorganisms in bioremediation *in situ* of soil contaminated by petroleum products. *Bioresorce Technology*. 100: 3221-3227.
- White, P.A. 2002. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 515: 85-98.
- Wild, S.R., Waterhouse, K.S., McGrath, S.P. and Jones, K.C. 1990. Organic contaminants in an agricultural soil with a known history of sewage sludge amendments: polynuclear aromatic hydrocarbons. *Environmental Science Technology*. 24: 1706-1711.
- Wilson, S.C. and Jones, K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A Review. *Environmental Pollution*. 81: 229-249.
- Xu-Xiang, Z., Shu-Pei, C., Cheng-Jun, Z., and Shi-Lei, S. 2006. Microbial PAH-degradation in soil: Degradation pathways and contributing factors. *Pedosphere*. 16: 555-565.
- Zhang, C. and Bennett, G.N. 2005. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Applied Mibrobiology of Biotechnology*. 67: 600-618.
- Zhang, X., Suvillan, E. R., and Young, L.Y. 2005. Evidence for aromatic ring reduction in the biodegradation pathway of carboxylated naphthalene by a sulfate reducing consortium. *Biodegradation*. 11: 117-124
- Zhong, Y., Luan, T.G., Wang, X.W., Lan, C. Y., and Tam, N.F.Y. 2007. Influence of growth medium on cometabolic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. STRAIN PheB4. *Applied Biotechnology*. 75: 175-186.

Zhong, Y., Zou, S., Lin, L., Luan, T.G., Qiu, R., and Tam, N.F.Y. 2010. Effects of pyrene and fluoranthene on the degradation characteristics of phenanthrene in the cometabolism process by *Sphingomonas* sp. strain PheB4 isolated from mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*. 60: 2043-2049.

## CAPÍTULO III

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 3.1. Objetivo general

- Evaluar el crecimiento de cuatro cepas de *Rhizobium* en vida libre y su capacidad de nodular en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* L. a la contaminación con hidrocarburos policíclicos aromáticos y determinar el potencial de degradación de fenantreno y benzo[a]pireno por *Rhizobium tropici* CIAT899.

##### 3.1.1. Objetivos particulares

- Evaluar la tolerancia de *Rhizobium tropici* CIAT899, *R. tropici* PRF81, *R. leucaenae* CFN299 y *R. etli* CFN42 en vida libre y en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* L., a la contaminación con fenantreno y/o benzo[a]pireno.
- Determinar la tolerancia y crecimiento de *Rhizobium tropici* CIAT899 en medio líquido contaminado con fenantreno y/o benzo[a]pireno, y evaluar mediante GC-MS su capacidad de degradación de fenantreno y benzo[a]pireno.

#### 3.2. Hipótesis general

- Algunas cepas de *Rhizobium* serán capaces de crecer en vida libre y en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* L. en presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos, y *Rhizobium tropici* CIAT899 en condiciones *in vitro* será capaz de degradar fenantreno y benzo[a]pireno.

##### 3.2.1. Hipótesis particulares

- Las cepas de *Rhizobium* crecen en vida libre y establecen simbiosis con *Phaseolus vulgaris* L. en medios contaminados con fenantreno y benzo[a]pireno.
- *Rhizobium tropici* CIAT899 tolera y degrada fenantreno y benzo[a]pireno al desarrollarse en medio contaminado con estos dos HPA.



## CAPÍTULO IV

### TOLERANCIA Y CRECIMIENTO DE CUATRO CEPAS DE *Rhizobium* IN VITRO Y EN SIMBIOSIS CON *Phaseolus vulgaris* L. EN PRESENCIA DE FENANTRENO Y BENZO[A]PIRENO

#### 4.1. Resumen

Este trabajo evaluó el crecimiento de *Rhizobium tropici* CIAT899, *R. tropici* PRF81, *R. leucaena* CFN299 y *R. etli* CFN42 en presencia de 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de fenantreno (PHE) o de benzo[a]pireno (BaP) en condiciones *in vitro* o en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* L. En condiciones *in vitro*, el crecimiento bacteriano disminuyó en presencia de PHE y/o BaP, siendo más evidente al aumentar las concentraciones de ambos contaminantes. El crecimiento de las cuatro cepas de *Rhizobium* a las 24 h fue inhibido por el BaP en concentraciones de 80 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Sin embargo, a las 96 h en presencia de 100  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$ , se observó un crecimiento significativo de 86, 20, 20 y 16 % en las cepas CIAT899, PRF81, CFN299, y CFN42, respectivamente, en comparación con su crecimiento a las 24 h. Después de 21 días de la inoculación, se evaluó la simbiosis de las cuatro cepas de *Rhizobium* con *Phaseolus vulgaris* L. y se observó que la presencia de PHE o de BaP, disminuyó significativamente el número de nódulos. El PHE fue más tóxico para el establecimiento de la simbiosis en comparación con el BaP. Además de la nodulación, la biomasa aérea y radical disminuyeron significativamente en presencia de estos dos HPA.

**Palabras claves:** rizobios, crecimiento en vida libre, simbiosis, hidrocarburos policíclicos aromáticos.

**TOLERANCE AND GROWTH OF FOUR *Rhizobium* STRAINS IN FREE LIVING AND  
IN SYMBIOSIS WITH *Phaseolus vulgaris* L. IN PRESENCE OF PHENANTHRENE AND  
BENZO[A]PYRENE**

**4.2. Abstract**

The present work evaluated the growth of *Rhizobium tropici* CIAT899, *R. tropici* PRF81, *R. leucaena* CFN299 and *R. etli* CFN42 in presence of phenanthrene (PHE) or benzo[*a*]pyrene (BaP) (0, 10, 20, 40, 60, 80 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) in free living conditions or in symbiosis with *Phaseolus vulgaris* L. In free living conditions, bacterial growth decreased as the concentrations of PHE or BaP increased. At 24 h, the growth of the four *Rhizobium* strains was inhibited by BaP at concentrations of 80 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nevertheless, at 96 h in presence of 100  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$ , bacterial growth had a significant increase of 86, 20, 20 and 16% for strains CIAT899, PRF81, CFN299, and CFN42, respectively, in comparison to the growth observed at 24 h. After 21 days of inoculation, the symbiosis of the four bacterial strains with *Phaseolus vulgaris* L. was evaluated. In presence of PHE or BaP, the number of nodules significantly decreased. Moreover, PHE exerted more toxic effects to the symbiosis establishment when compared to BaP. Besides nodulation, shoot and root biomass significantly diminished in presence of either PHE or BaP.

**Key words:** *rhizobia, free living growth, symbiosis, polycyclic aromatic hydrocarbons.*

### 4.3. Introducción

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) son contaminantes tóxicos que pueden ser genotóxicos y carcinogénicos, cuya estructura química y baja bioaccesibilidad hacen que sean más persistentes en la mayoría de los ecosistemas (aire, suelo, agua, sedimentos y tejidos biológicos) (Chauchan *et al.*, 2008; Habe y Omori, 2003). La presencia de HPA en los últimos años se ha incrementado principalmente por las actividades humanas como: i) la explotación, extracción y combustión del petróleo y sus derivados, y ii) la pirolisis de la materia orgánica (Johnsen y Karlson, 2007; Seo *et al.*, 2009). El sistema suelo ha sido el más susceptible a la contaminación por HPA, ya que estos hidrocarburos pueden reducir la cobertura vegetal, inhibir la germinación y el crecimiento de las plantas, y afectar la supervivencia y la reproducción de algunos organismos de la microfauna y macrofauna, además de provocar cambios en la dinámica de población de la biota microbiana (Cofield *et al.*, 2008).

Pese a lo anterior, se conoce que hay bacterias que pueden tolerar y crecer en presencia de HPA y tomarlos como fuente de carbono y energía (Atlas y Bartha, 2002; Han y Moon, 2004). Al igual que las bacterias, hay plantas (gramíneas y leguminosas) que pueden detoxificar, extraer, y secuestrar metales pesados (plomo, níquel, cadmio), y transformar o mineralizar bifenilos policlorados, compuestos nitroaromáticos, hidrocarburos halogenados, e HPA (Trapp y Karlson, 2001; Wenzel, 2009). También, en la rizósfera de las plantas se ha observado la degradación de contaminantes orgánicos como los HPA, proceso conocido como rizoremediación. En general, este proceso se basa en la interacción sinérgica que ocurre entre las raíces de las plantas y los microorganismos de la rizósfera para transformar o degradar compuestos tóxicos a compuestos intermediarios menos tóxicos (Chaudhry *et al.*, 2005; Gerhardt *et al.*, 2009). Sin embargo, la eficiencia de este proceso dependerá de factores abióticos como la disponibilidad, la recalcitrancia, la concentración, y la fitotoxicidad del HPA, y de factores bióticos como los

exudados radicales, el metabolismo, la supervivencia, el crecimiento y las interacciones ecológicas de los organismos (Pilon-Smits, 2005; Kiuper *et al.*, 2001; Kuiper *et al.*, 2004).

Por otro lado, la información respecto a la ecología de las bacterias del género *Rhizobium* en vida libre y en simbiosis con leguminosas en presencia de sustancias tóxicas es limitada. En la década de 1990, se reportó que *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, *Rhizobium trifolii* ANV543, *R. meliloti* Zb57, *R. leguminosarum* RBL560 y *R. meliloti* degradaron bifenilos biclorados y dibenzotiofeno (Damaj y Ahmad, 1996; Frassinetti *et al.*, 1998). Posteriormente, se conoció que otros rizobios pueden transformar o tolerar 2, 4, 6-trinitrotolueno, m-toluato, fenol (Labidi *et al.*, 2001; Kaksonen *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2008). También, los rizobios pueden crecer en presencia de metales pesados como cadmio, cobre, y metaloides como el arsénico (Carrasco *et al.*, 2005; Ike *et al.*, 2007; Lian-Mei *et al.*, 2011).

Poco se conoce acerca de la capacidad de rizobios para desarrollarse en presencia de HPA. Keum *et al.* (2006) mencionan que *Sinorhizobium* sp C4 en vida libre puede degradar fenantreno. Aunque, también existen cepas de rizobios que pueden formar simbiosis en suelos contaminados con hidrocarburos (Méndez *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2004). La importancia del género *Rhizobium* radica en su habilidad de establecer simbiosis con leguminosas y así, fijar nitrógeno atmosférico, característica que es muy importante en suelos contaminados con HPA, ya que este tipo de compuestos hace que aumente en el suelo la cantidad de carbono disponible, lo cual alterara la relación C/N. Por lo anterior, este estudio evaluó la tolerancia de cuatro cepas de *Rhizobium* en vida libre y en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* L., al crecer en medio contaminado con fenantreno y benzo[a]pireno.

## 4.4. Materiales y métodos

### 4.4.1. Material biológico

Las cepas de *Rhizobium* utilizadas fueron 1) *R. tropici* CIAT899; 2) *R. tropici* PRF81; 3) *R. leucaena* CFN299, y 4) *R. etli* CFN42, y *Burkholderia phenoliruptrix* proporcionadas por el Centro de Ciencias Genómicas (UNAM). Las bacterias fueron cultivadas en cajas de Petri con el medio peptona, extracto de levadura y  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (PY), e incubadas a 28 °C por tres días (Vincent, 1970).

### 4.4.2. Hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA)

Los HPA utilizados fueron fenantreno (PHE; 77470-100G-SIGMA-ALDRICH®) y benzo[a]pireno (BaP; B1760-1G-SIGMA-ALDRICH®). Estos dos HPA se prepararon en soluciones por separado, utilizando como disolvente acetona para obtener las siguientes concentraciones: 10, 20 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Inmediatamente, las soluciones fueron colocadas en frascos ámbar para evitar la fotooxidación de los HPA, y conservadas a 4 °C para evitar la volatilización del disolvente.

### 4.4.3. Crecimiento *in vitro* de las cepas de *Rhizobium* y *Burkholderia phenoliruptrix* en medio líquido contaminado con fenantreno y/o benzo[a]pireno.

El medio de cultivo líquido utilizado fue el extracto de levadura manitol (ELM) modificado para aplicar 50% de su fuente de carbono original. La composición del medio fue la siguiente ( $\text{g L}^{-1}$ ): 0.5  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0.2  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1 NaCl, 5 manitol, 0.75 extracto de levadura, el medio de cultivo se ajustó a pH neutro.

Las cuatro cepas de *Rhizobium* y *B. phenoliruptrix* fueron expuestas al medio de cultivo contaminado con sus diferentes concentraciones (0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de PHE o de BaP, en agitación (180 rpm) a 28 °C. El crecimiento bacteriano fue estimado mediante lecturas de densidad óptica (DO) a  $A_{600\text{nm}}$ , en cuatro fechas de muestreo: 24, 48, 72 y 96 h.

El experimento factorial 4x2x7 incluyó cuatro niveles de cepas de *Rhizobium* (CIAT899, PRF81, CFN299 y CFN42), dos niveles por tipo de HPA (PHE y/o BaP), y siete niveles por concentración (0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los 56 tratamientos y sus tres repeticiones, se establecieron en un diseño experimental completamente al azar. Para *Burkholderia phenoliruptrix* se realizó un experimento factorial 2x7. Los datos obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico SAS (SAS, 2002) V 8.0, mediante un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

4.4.4. Capacidad de nodulación de cuatro cepas de *Rhizobium* en *Phaseolus vulgaris* L. expuestas a HPAs.

La capacidad de nodulación de las cuatro cepas de *Rhizobium* en medio sólido contaminado con dos HPA, se realizó en dos experimentos, en los que se evaluó el PHE y el BaP por separado. Las concentraciones utilizadas en esta fase experimental se eligieron debido a que en ensayos previos se observó que la simbiosis no se establece en concentraciones mayores a 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ambos HPA (datos no presentados).

Para evaluar la toxicidad de PHE, cada cepa tuvo los siguientes tratamientos: a) planta inoculada con *Rhizobium*; b) planta inoculada con *Rhizobium* + 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , c) planta inoculada con *Rhizobium* + 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; e) planta inoculada con *Rhizobium* + 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , además, se incluyeron los tratamientos sin la inoculación de las bacterias con su correspondiente aplicación del contaminante. En total se tuvieron veinte tratamientos para cada cepa de *Rhizobium*.

Para evaluar la toxicidad del BaP, cada cepa tuvo los siguientes tratamientos: a) planta inoculada con *Rhizobium*; b) planta inoculada con *Rhizobium* + 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; c) planta inoculada con *Rhizobium* + 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; d) planta inoculada con *Rhizobium* + 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; e) planta inoculada con *Rhizobium* + 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; además, se incluyeron los tratamientos sin la inoculación

de las bacterias con su correspondiente aplicación del contaminante. En total se tuvieron veinte cinco tratamientos para cada cepa de *Rhizobium*.

Para ambos experimentos las semillas de *Phaseolus vulgaris* L. se desinfectaron superficialmente y se pusieron a germinar en cajas de Petri que contenían agar agua al 1% a 28 °C durante 72 h. Paralelamente, se esterilizaron matraces Erlenmeyer que contenían agar al 1.5 %, con 200 mL de solución nutritiva Fahareus libre de nitrógeno cuya composición fue la siguiente ( $\text{g L}^{-1}$ ): 10  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 5 Fe-citrato; 15  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , y el medio de cultivo se ajustó a pH neutro. Posteriormente, los matraces se contaminaron con fenantreno (0, 5, 10, y 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) o con benzo[a]pireno (0, 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), de acuerdo a su correspondiente tratamiento y por triplicado.

Una vez germinadas las semillas, se colocaron en los matraces con su respectivo tratamiento de contaminación; en aquellos tratamientos en los que se consideró la inoculación de *Rhizobium*, se aplicaron 400  $\mu\text{L}$  de una suspensión bacteriana de cada cepa, con una D.O de 0.3 nm ( $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). Los tratamientos se colocaron en un cuarto oscuro durante dos días para inducir la etiolación de las plántulas, y posteriormente, a los matraces se les colocó un tapón de hule espuma. La parte del fondo del matraz se cubrió para evitar el paso de la luz hacia la raíz. Enseguida, las plantas se colocaron en cámara de crecimiento con 12 h de fotoperiodo a 23 °C, durante 21 días. Al final, se contó el número de nódulos, y se cosechó la parte aérea y radical de la planta para secarlas a 68 °C durante 72 h, y con ello determinar la biomasa seca.

El experimento para evaluar la toxicidad de PHE fue un factorial 5x4, el cual tuvo cinco niveles por tipo de inoculación (sin inocular o con la inoculación de cada una de las cuatro cepas de *Rhizobium*) y cuatro niveles de contaminación (0, 5, 10 y 20  $\mu\text{g PHE mL}^{-1}$ ). Para evaluar la toxicidad del BaP, el experimento fue un factorial 5x5, el cual tuvo cinco niveles por tipo de inoculación (sin inocular o con la inoculación de cada una de las cuatro cepas de *Rhizobium*) y

cinco niveles de contaminación (0, 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$ ). Los dos experimentos se realizaron por duplicado, considerando tres repeticiones por tratamiento. Los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico SAS (SAS, 2002) V 8.0, mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

## **4.5. Resultados y discusión**

### 4.5.1. Crecimiento *in vitro* de las cepas de *Rhizobium* en medio líquido contaminado con fenantreno y/o benzo[a]pireno

La toxicidad de los HPA sobre el crecimiento bacteriano depende de la recalcitrancia, estructura química y tipo de HPA, por lo cual el efecto de cada HPA será diferente sobre el organismo; sin embargo, la adaptabilidad, la tolerancia y la degradación de los hidrocarburos también depende de la bacteria, su abundancia y sus rutas metabólicas (Alexander, 1999). Lo anterior se reflejó en el presente estudio, ya que se observó que el comportamiento de cada cepa de *Rhizobium* dependió del HPA y de las concentraciones utilizadas. En las figuras 4.1 y 4.2 se muestra el crecimiento celular de *R. tropici* CIAT899, *R. tropici* PRF81, *R. leucaena* CFN299 y *R. etli* CFN42, en las que se observa que en presencia de PHE y BaP, el crecimiento bacteriano disminuyó. El crecimiento de las bacterias fue más afectado al exponerse en medio contaminado con BaP en comparación con el observado con PHE. Estos resultados son concordantes con la literatura, ya que se conoce que el BaP es más tóxico y recalcitrante para el crecimiento de los microorganismos por ser un hidrocarburo de alto peso molecular (Eom *et al.*, 2007; Juhasz y Naidu, 2000).

El crecimiento de las cuatro cepas de *Rhizobium* a las 24 h disminuyó significativamente al incrementar las concentraciones de los dos HPA; sin embargo, su crecimiento se incrementó con el tiempo de incubación (Figuras 4.1 y 4.2). Este comportamiento concuerda con el crecimiento de cepas de rizobios reportado en medios contaminados con hidrocarburos. Por



ejemplo, Chaudri *et al.* (1996), observaron una disminución en el crecimiento de *R. leguminosarum* al exponerse a diferentes concentraciones (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 180 y 200 mg kg<sup>-1</sup>) de pentaclorofenol; después de cinco semanas, el crecimiento bacteriano disminuyó 98% ante 200 mg kg<sup>-1</sup> del contaminante.

Por su parte, Damaj y Ahmad (1996), mencionan que *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, *R. trifolii* ANU543, *R. meliloti* ZB57, y *R. leguminosarum* RBL5560 fueron capaces de crecer en presencia de bifenilos biclorados, pero para su crecimiento todas las cepas requirieron de la adición de extracto de levadura (0.02-0.05%) como fuente de carbono alterna. En la presente investigación se adicionó al medio de cultivo 5 y 0.7 (g L<sup>-1</sup>) de manitol y extracto de levadura para el crecimiento de las cepas de *Rhizobium*, ya que no crecieron al adicionar al medio de cultivo PHE y/o BaP como única fuente de carbono (datos no presentados). Estudios relacionados destacan que algunas bacterias necesitan una fuente de carbono alterna para tener mejor adaptabilidad a medios contaminados con HPA (Han y Moon *et al.*, 2004; Juhasz y Naidu, 2000). Keum *et al.* (2008), mencionan que *Sinorhizobium* sp. C4 creció en medio contaminado con PHE enriquecido con diferentes fuentes de carbono alterna (caldo nutritivo, glucosa y piruvato), observando que el crecimiento bacteriano no presentó una fase de latencia con respecto aquellos tratamientos donde sólo se adicionó el PHE como única fuente de carbono.

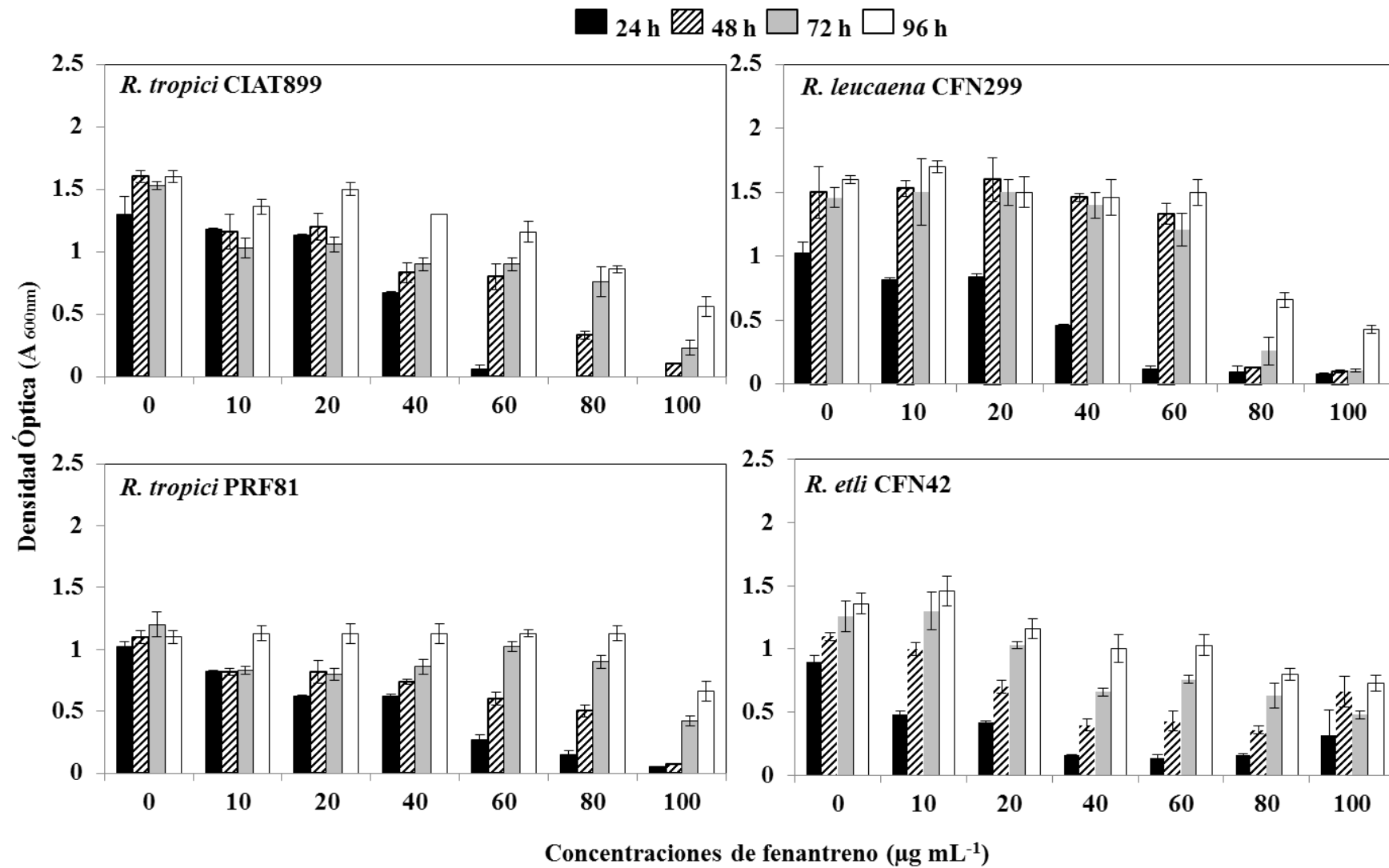


Figura 4.1. Tolerancia y adaptación de cuatro cepas de *Rhizobium* al exponerlas ante diferentes concentraciones de fenanthreno. n=3. Medias ± error estándar.

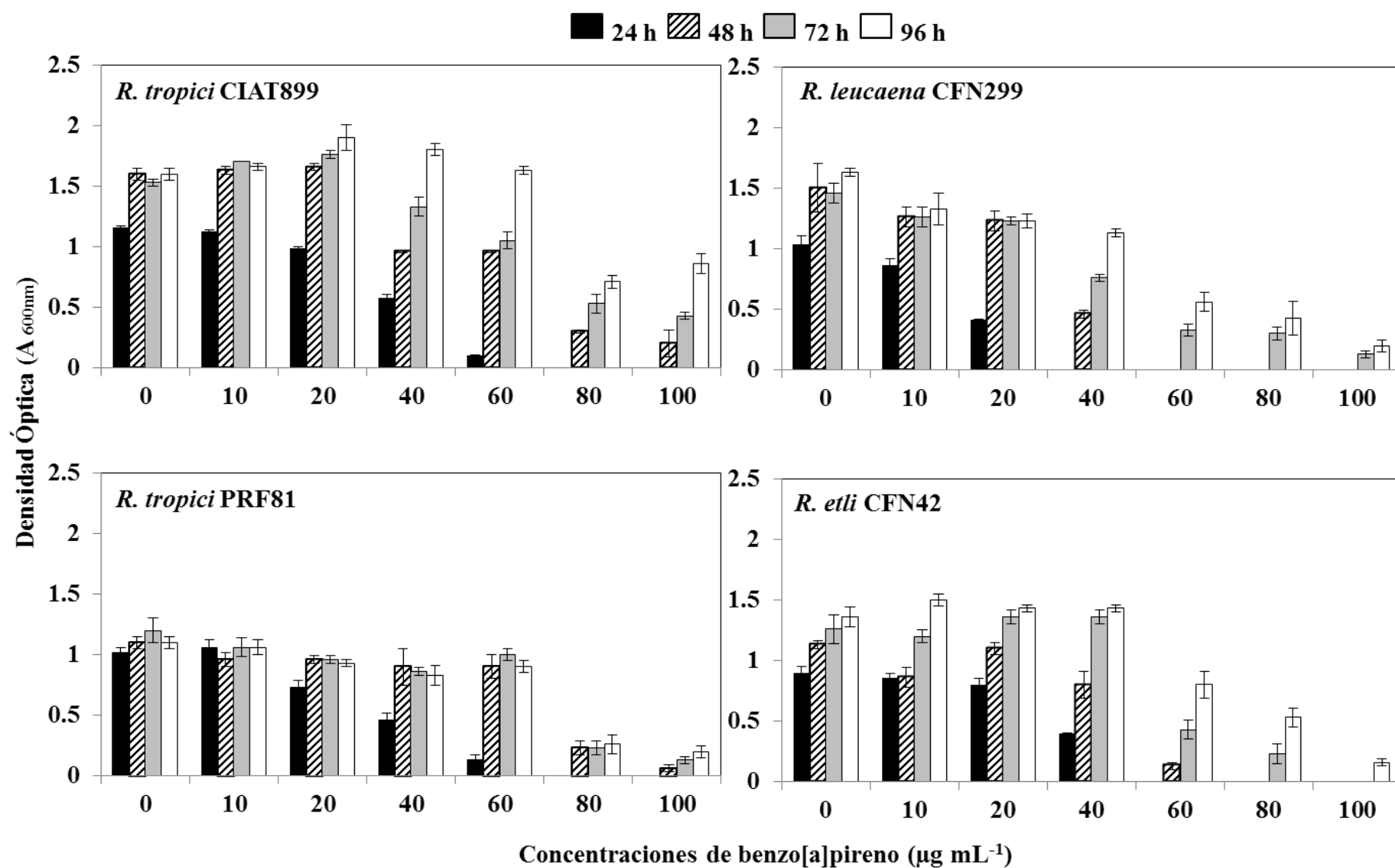


Figura 4.2. Tolerancia y adaptación de cuatro cepas de *Rhizobium* al exponerlas ante diferentes concentraciones de benzo[a]pireno. n=3. Medias  $\pm$  error estándar.

En la figura 4.1 se muestra la tolerancia de PHE en las cuatro cepas de *Rhizobium*, y se observa en general que a las 24 h el crecimiento celular de las cepas no fue afectado significativamente al exponerlas con 10 y 20  $\mu\text{g PHE mL}^{-1}$ ; sin embargo, hubo una disminución significativa del 50% ante 40  $\mu\text{g PHE mL}^{-1}$ , y del 90% en promedio, en presencia de 100  $\mu\text{g PHE mL}^{-1}$ . Además, esta figura muestra que las cuatro cepas tienen la tendencia de disminuir su crecimiento al incrementarse las concentraciones de PHE; sin embargo, después de 96 h el crecimiento bacteriano con 100  $\mu\text{g PHE mL}^{-1}$  se incrementó significativamente en 56, 81, 92, y 55%, para CIAT899, CFN299, PRF81 y CFN42, respectivamente, en comparación con el crecimiento observado a las 24 h.

La figura 4.2 muestra el comportamiento del crecimiento de las cuatro cepas ante BaP. A las 24 h se observa que el crecimiento celular de las cepas no fue afectado significativamente ante 10 y 20  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$ , comportándose de manera similar a lo observado con PHE (Figura 4.1). Sin embargo, el crecimiento de las cepas CIAT899, PRF81 y CFN42 disminuyó significativamente en 40% en promedio, ante 40  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$ . A las 24 h, la aplicación de 40 y 60  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$  inhibió el crecimiento de CFN299 y CFN42 respectivamente, mientras que ante 80 y 100  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$ , el crecimiento de las cuatro cepas fue completamente inhibido (Figura 4.2).

Cuando las bacterias crecen en medios contaminados pasan por una etapa de adaptación la cual se refleja al presentarse una fase de latencia (Chauhan *et al.*, 2008; Kaushin *et al.*, 2009). En la figura 4.2 se observa, que el crecimiento de las cuatro cepas de *Rhizobium* en presencia de 80 y 100  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$ , presentaron esta fase de latencia, aunque fue diferente para cada cepa; para las cepas CIAT899 y PRF81 fue de 48 h, mientras que para las cepas CFN299 y CFN42 fue de 72 y 96 h, respectivamente. No obstante, después de este periodo de adaptación, a las 96 h se observó

un crecimiento bacteriano significativo de 86, 20, 20 y 16% para las cepas CIAT899, CFN299, PRF81 y CFN42, respectivamente, ante 100  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$  con respecto al crecimiento observado a las 24 h. Johnson *et al.* (2004) observaron una disminución significativa de *R. leguminosarum* bv *trifolii* después de 56 días de estar expuesta a 50 y 500  $\text{mg kg}^{-1}$  de criseno; sin embargo, después de 122 días su crecimiento fue similar al tratamiento sin criseno.

El crecimiento bacteriano observado en las cepas de *Rhizobium* se ha reportado en medios contaminados con arsénico (As). Carrasco *et al.* (2005) mencionan que el crecimiento de *Sinorhizobium meliloti* Alf12 no fue alterado en presencia de 100 ó 200  $\text{mg As mL}^{-1}$ ; sin embargo, ante 200  $\text{mg As mL}^{-1}$  la bacteria tuvo un periodo de latencia de 8 h y a pesar de esto, la densidad final del cultivo (48 h) no mostró diferencias significativas con el control crecido en ausencia de As.

Por otro lado, se conoce que algunas cepas del género *Burkholderia* están presentes en medios contaminados con HPA y que tienen el potencial de degradar este tipo de compuestos (Jung *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2007). Por esta razón, se decidió comparar el crecimiento de las cuatro cepas de *Rhizobium* con *Burkholderia phenoliruptrix* en medio contaminado con PHE y BaP, y basándose en que *B. phenoliruptrix* tiene la capacidad de degradar 2, 4, 5-ácido triclorofenoxiacético y halofenol (Coenye *et al.*, 2004). En este experimento, se observó que a las 24 h, las cuatro cepas de *Rhizobium* al igual que *B. phenoliruptrix*, disminuyeron en presencia de PHE y BaP, a medida que se incrementaron las concentraciones de los dos HPA (Figura 4.3 A-B); particularmente, el BaP en este mismo tiempo fue más tóxico para las cepas de *Rhizobium* y para *B. phenoliruptrix* al inhibir totalmente su crecimiento ante 80 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 4.3B).

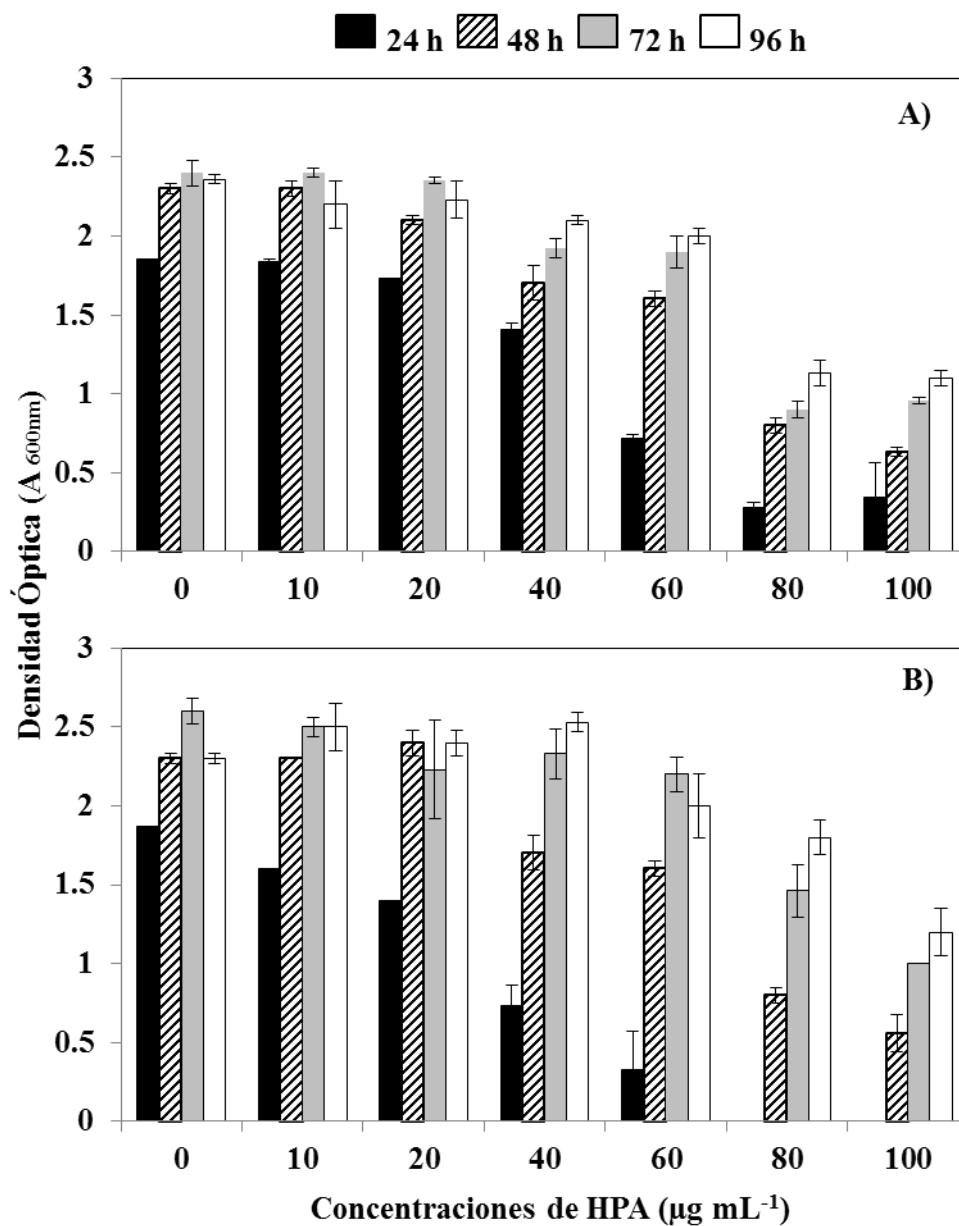


Figura 4.3. Tolerancia y adaptación de *Burkholderia phenoliruptrix* al exponerla ante diferentes concentraciones de fenantreno (A) y benzo[a]pireno (B).  $n=3$ . Medias  $\pm$  error estándar. Simbología HPA= hidrocarburos policíclicos aromáticos.

En las figuras 4.2 y 4.3 se observa que *R. tropici* CIAT 899 y *R. tropici* PRF81 tienen la misma tendencia que *B. phenoliruptrix* en presencia de BaP, ya que las tres cepas tienen una fase de adaptación de 48 h al crecerlas en 80 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de este HPA, sin embargo, después de esta fase el crecimiento bacteriano incrementa con el tiempo de incubación. Por lo anterior, es posible inferir que estas bacterias pueden tener en su metabolismo enzimas para degradar este tipo de compuestos como lo hace *B. phenoliruptrix*, además, posiblemente *R. tropici* CIAT899, *R. tropici* PRF81 y *B. phenoliruptrix* tengan la capacidad de degradar HPA como ha sido descrito bacterias del género *Rhizobium* y *Burkholderia* (Juhász y Naidu, 2000; Keum *et al.*, 2008).

#### 4.5.2 Capacidad de nodulación de cuatro cepas de *Rhizobium* en *Phaseolus vulgaris* L. expuestas a HPAs

La simbiosis entre *Rhizobium* y las leguminosas se caracteriza por formar nódulos en las raíces, en cuyo interior las bacterias fijan nitrógeno atmosférico por medio de la enzima nitrógenasa (Jackson *et al.*, 2008; Shrimant, 2012). La ventaja del establecimiento de esta simbiosis en suelos contaminados con hidrocarburos, se relaciona con que estos organismos no competirán por el nitrógeno disponible, ya que los suelos con hidrocarburos se caracterizan por tener una alta relación C/N (Moreto *et al.*, 2005) A pesar de que se conoce que hay leguminosas y bacterias del género *Rhizobium* que pueden crecer ante diversos componentes del petróleo (Atlas y Bartha, 2002; Han y Moon, 2004; Trapp y Karlson, 2001; Wenzel, 2009), son pocos los estudios que muestran el comportamiento de la interacción entre estos dos organismos en medios contaminados con HPA.

En la figura 4.4 se observa que la simbiosis medida por el número nódulos de las cuatro cepas de *Rhizobium* en *Phaseolus vulgaris* disminuyó significativamente al desarrollarse en medio contaminado con PHE o con BaP. Este mismo comportamiento se ha observado en

estudios relacionados, ya que mencionan que los hidrocarburos y los componentes del petróleo pueden disminuir o inhibir el número de nódulos (Adam y Duncan, 2003; Lindstrom *et al.*, 2003; Méndez *et al.*, 2005; Rivera-Cruz *et al.*, 2005). En esta misma figura se observa que el PHE fue más tóxico para la simbiosis en comparación con el BaP, a pesar de que este último compuesto es más tóxico y recalcitrante (Juhász y Naidu, 2000). Estos resultados no son concordantes con la tolerancia de las cepas de *Rhizobium* al crecerlas en presencia de PHE y BaP en vida libre, donde se observa de manera consistente que el BaP fue más tóxico para el crecimiento de los rizobios (Figura 4.1). Lo anterior permite sugerir que los HPA principalmente el PHE, tienen efectos fitotóxicos que afectan la interacción de *Rhizobium* y *Phaseolus*, y el establecimiento de la simbiosis. Chaîneau *et al.* (1996) observaron que los hidrocarburos de bajo peso molecular (como el fenantreno) pueden ser solubles en estructuras vegetales hidrófobas lo cual les permite penetrar las membranas celulares provocándoles toxicidad. Lo anterior puede explicar por qué el PHE a pesar de ser un hidrocarburo menos recalcitrante en comparación con el BaP, es más tóxico para la planta. Por su parte, Chaudhry *et al.* (2005) mencionan que la tolerancia de una planta en medios contaminados dependerá de su genotipo; sin embargo, ésta será más afectada por el tipo de contaminante y por su concentración en el suelo. También señalan que las plantas y las comunidades microbianas deben tener una relación sinérgica para tolerar o degradar compuestos orgánicos recalcitrantes. El establecimiento de la simbiosis en medios contaminados con PHE y BaP mostró un retraso de 5 y 3 días respectivamente, en comparación con los tratamientos sin HPA. En la figura 4.4A se aprecia que la simbiosis de las cuatro cepas de *Rhizobium* es afectada con 5 µg PHE mL<sup>-1</sup>, al presentar una disminución significativa del 76, 38, 98 y 95% en el número de nódulos formados por CIAT899, PRF81, CFN299 y CFN42, respectivamente, en comparación



con sus correspondientes tratamientos sin PHE. Sin embargo, ninguna de las cuatro cepas de *Rhizobium* establecieron simbiosis con su macrosimbionte al exponerse a 20  $\mu\text{g PHE mL}^{-1}$ .

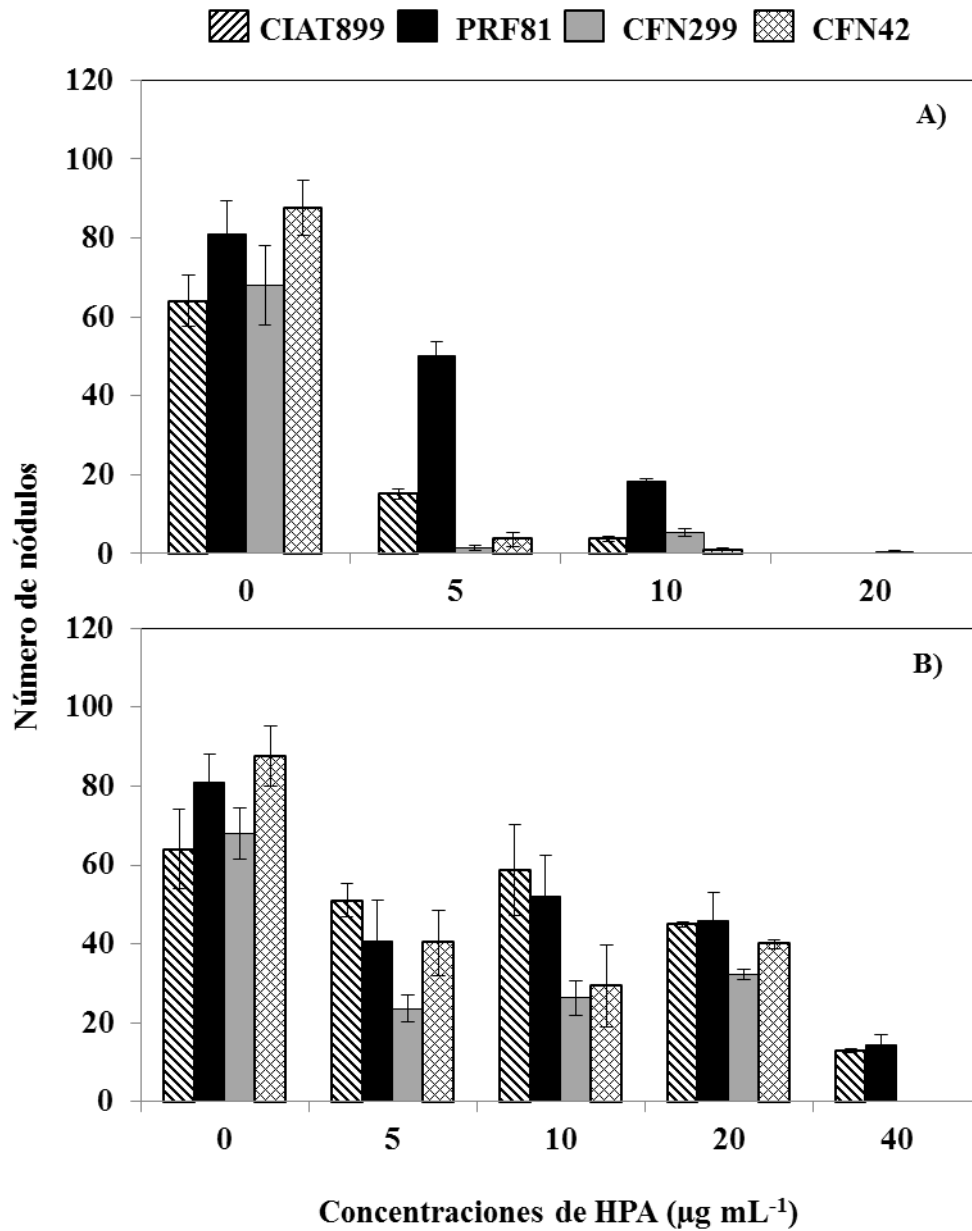


Figura 4.4. Número de nódulos desarrollados por cuatro cepas del género *Rhizobium* a los 21 días en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. contaminadas con diferentes concentraciones de fenantreno (A) y benzo[a]pireno (B). n=3. Medias  $\pm$  error estándar. Simbología: *R. tropici* CIAT899= CIAT899; *R. tropici* PRF81= PRF81; *R. leucaena* CFN299= CFN299; *R. etli* CFN42= CFN42; HPA= hidrocarburos policíclicos aromáticos.

En la figura 4.4B se aprecia una disminución en la nodulación aproximadamente del 50% ante 5, 10 y 20  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$  comparando con aquellos tratamientos sin BaP. Sin embargo, con 40  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$  la nodulación se redujo en 80% para las cepas CIAT899 y PRF81, mientras que esta misma concentración inhibió totalmente la nodulación por las cepas CFN299 y CFN42. Es importante mencionar que CFN299 y CFN42 fueron las cepas menos tolerantes al crecer en vida libre en presencia de BaP.

Merkl *et al.* (2005) mencionan que los microorganismos que habitan en la rizósfera son diferencialmente estimulados o inhibidos en función de la actividad fisiológica y capacidad de crecimiento de la planta en presencia de petróleo crudo. Los exudados radicales son importantes para el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa en la que la exudación de flavonoides inician la quimiotaxis entre las raíces de las plantas y los rizobios (Giles y Downie, 2008). Por lo anterior, es probable que la exudación de este tipo de compuestos podría cambiar por la presencia de los HPA, y como consecuencia el establecimiento de la simbiosis es alterado. Por su parte, Kuiper *et al.* (2004) mencionan que los exudados de las plantas desarrolladas en medios sin contaminar, están caracterizados por carbohidratos (fructuosa, glucosa, maltosa y galactosa), ácidos orgánicos, aminoácidos, entre otros. Sin embargo, Muratova *et al.* (2009) mencionan que cuando las plantas se encuentran en suelos contaminados con HPA, los exudados se inhiben o cambian a ácidos carboxílicos como oxalatos, lactato, citrato y fumarato como respuesta al estrés por el contaminante, y éstos aumentan al incrementar la concentración del contaminante. Cabe resaltar que este tipo de exudados por su condición, genera un ambiente ácido, lo que podría explicar también por qué hay menor número de nódulos en aquellos tratamientos contaminados con PHE o con BaP, ya que se sabe que la mayoría de los rizobios se desarrollan en pH neutro. Martínez-Romero *et al.* (1991) mencionan que *R. tropici* CIAT899 se

caracteriza por crecer en un rango de pH de 5-7, por lo que es posible inferir que esta cepa tiene mayor capacidad de adaptación en medio contaminado con estos dos HPA.

En la figura 4.4 también se observa que *R. tropici* CIAT899 y *R. tropici* PRF81 fueron las cepas con mayor potencial para establecer simbiosis con *P. vulgaris* en presencia de PHE o de BaP. Las cepas *R. leucaena* CFN299 y *R. etli* CFN42 formaron mayor número de nódulos en medios contaminados con BaP, en comparación con sus correspondientes tratamientos contaminados con PHE. La simbiosis de las cepas CIAT899 y PRF81 con su macrosimbionte, favorece la tolerancia de *P. vulgaris* ante los dos HPA. También es importante resaltar que tanto CIAT899 y PRF81 fueron las dos cepas más tolerantes que crecieron en vida libre en presencia de PHE y BaP (Figuras 4.1 y 4.2).

En las figuras 4.5 y 4.6 se observa la producción de biomasa aérea y radical de las plantas inoculadas con las cepas de rizobios, en las que se observa que la biomasa disminuye significativamente de manera general en presencia de ambos HPA, excepto con *R. tropici* CIAT899 ante 5 y 10  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$  (Figura 4.5B). También se observa que el PHE afectó en mayor proporción el desarrollo de la planta, en comparación con el BaP. Estudios relacionados mencionan que los hidrocarburos del petróleo son tóxicos para el desarrollo de la planta; sin embargo, su efecto tóxico dependerá de la concentración y del tipo de hidrocarburos presentes en el suelo (Chaîneau *et al.*, 1996). Merkl *et al.* (2004) observaron que en suelos contaminados con 3% ó 5% de petróleo crudo, la biomasa aérea y radical de *Calopogonium mucunoides* Desv. y de *Stylosanthes capita* Vogel disminuyen significativamente. Por su parte, Hans-Holger y Prutz (2006) mencionan que la germinación de las semillas, la supervivencia de la planta y el rendimiento de los brotes de *Medicago sativa* L. y *Lupinus luteus* L se reducen por la contaminación con petróleo ( $>23,000 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

Redondo-Gómez *et al.* (2011) mencionan que *Spartina densiflora* (Familia Poaceae) puede crecer en suelo contaminado con concentraciones hasta 1000 mg PHE kg<sup>-1</sup>; sin embargo, su crecimiento disminuyó al aumentar su concentración, y las plantas mostraron clorosis y un alto porcentaje de tallos muertos. Por su parte, Reynoso-Cuevas *et al.* (2008) observaron que la biomasa aérea y radical de las gramíneas *Festuca arundinacea* Schreb., *Cenchrus ciliaris* Michx., *Bouteloua curtipendula* L. y *Rhynchelytrum repens* Willd, disminuyó al incrementarse las concentraciones de una mezcla de fenantreno, pireno y benzo[a]pireno (500, 1000, 2000, 3000, 4000, y 5000 mg kg<sup>-1</sup>).

La presencia de PHE redujo la materia seca de la raíz; en contraste, la aplicación de 5 µg BaP mL<sup>-1</sup> estimuló significativamente el desarrollo radical de las plantas inoculadas con CIAT899 y PRF81 (Figura 4.5B). La concentración más tóxica para el desarrollo radical fue 40 µg BaP mL<sup>-1</sup> ya que disminuyó la biomasa radical en 40, 48 y 45% en las plantas inoculadas con CIAT899, PRF81, y CFN299 respectivamente, en comparación con sus correspondientes tratamientos sin BaP (Figura 4.5B). Estos resultados son similares a los reportados por Chaîneau *et al.* (1996) al observar que la germinación y el desarrollo de *Trifolium repens* L., *Zea mays* L. y *P. vulgaris* variaron con la concentración y el tipo de los hidrocarburos presentes en suelo. Por su parte, Sang-Hwan *et al.* (2008) observaron que tanto gramíneas (*Panicum bisulcatum* Thunb. y *Echinogalus crus-galli* L.) como leguminosas (*Astragalus membranaceus* Fisch. y *Aeschynomene indica* L.) mostraron en general, menor producción de biomasa en presencia de PHE y de pireno, aunque *A. indica* presentó mayor biomasa ante ambos HPA.

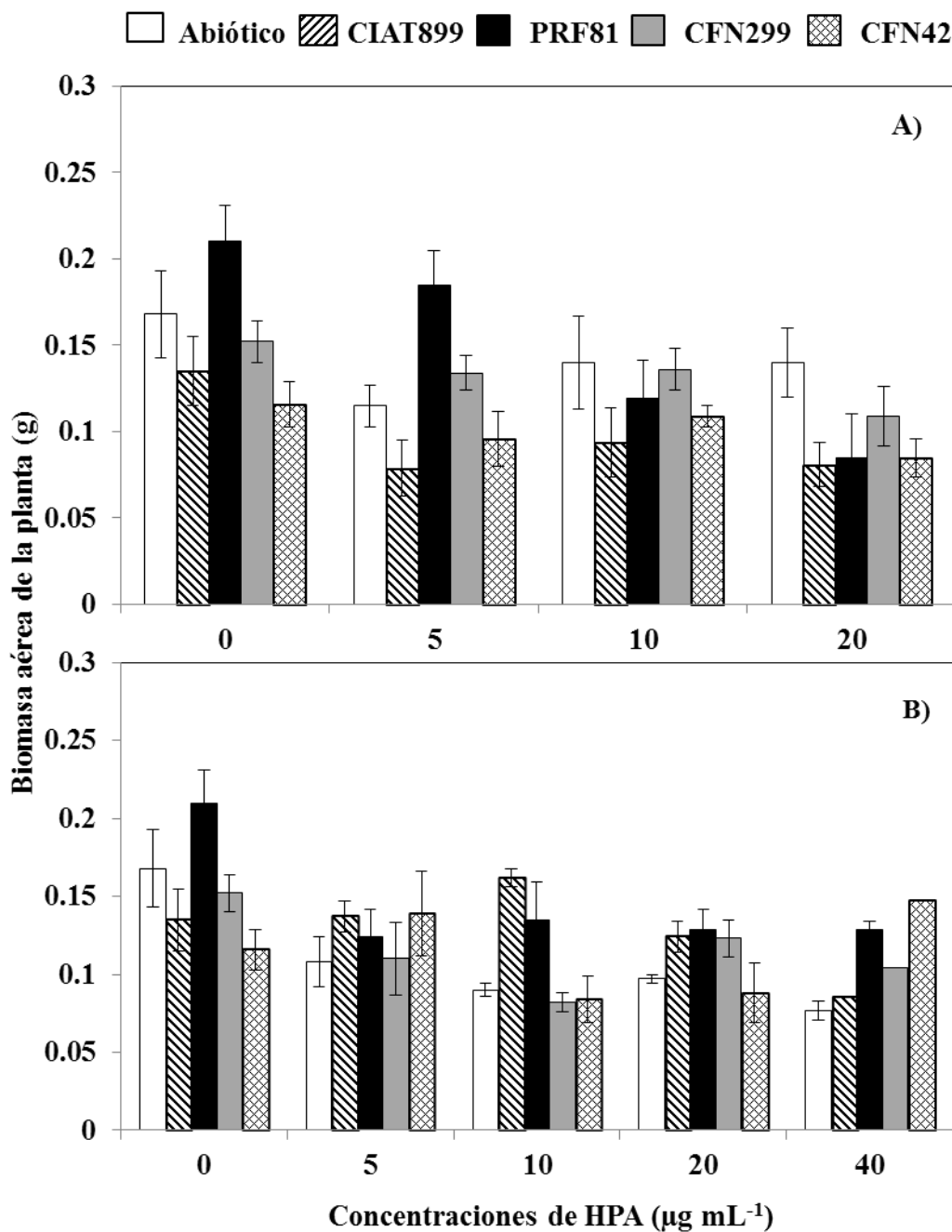


Figura 4.5. Producción de biomasa aérea a los 21 días de plantas de *Phaseolus vulgaris* L contaminadas con diferentes concentraciones de fenantreno (A) y benzo[a]pireno (B). n=3. Medias  $\pm$  error estándar. Simbología: *R. tropici* CIAT899= CIAT899; *R. tropici* PRF81= PRF81; *R. leucaena* CFN299= CFN299; *R. etli* CFN42= CFN42; HPA= hidrocarburos policíclicos aromáticos; Abiótico= planta sin inocular.

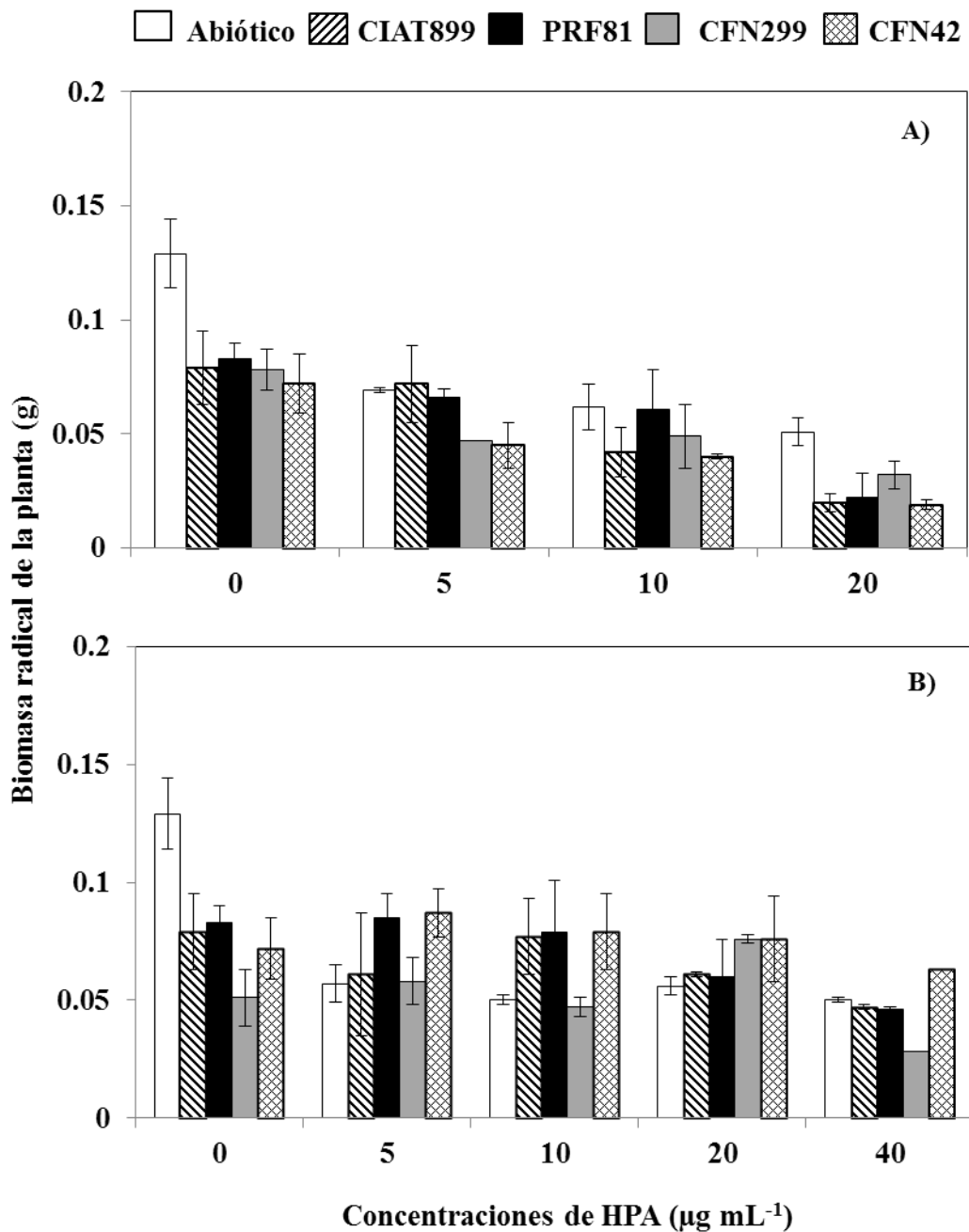


Figura 4.6. Producción de biomasa radical a los 21 días en plantas de *Phaseolus vulgaris* L contaminadas con diferentes concentraciones de fenantreno (A) y benzo[a]pireno (B). n=3. Medias  $\pm$  error estándar. Simbología: *R. tropici* CIAT899= CIAT899; *R. tropici* PRF81= PRF81; *R. leucaena* CFN299= CFN299; *R. etli* CFN42= CFN42; HPA= hidrocarburos policíclicos aromáticos; Abiótico = planta sin inocular

#### 4.6. Conclusiones

- El crecimiento en vida libre y el establecimiento de la simbiosis entre *Rhizobium tropici* CIAT899, *R. tropici* PRF81, *R. leucaena* CFN299 o *R. etli* CFN42 con *Phaseolus vulgaris* L. fueron afectados negativamente al exponerse a PHE y BaP.
- El BaP fue más tóxico para el crecimiento en vida libre de las cuatro cepas de *Rhizobium*, mientras que el PHE fue más tóxico para el establecimiento de la simbiosis con *Phaseolus vulgaris*.
- *Rhizobium tropici* CIAT899 y *R. tropici* PRF81 fueron más tolerantes para crecer en vida libre y en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* L. en presencia de PHE y BaP.
- *Rhizobium etli* CFN42 fue la cepa menos tolerante para crecer y establecer simbiosis con frijol en presencia de PHE y BaP.
- El crecimiento a las 24 h de las cuatro cepas de *Rhizobium* y *B. phenoliruptrix* disminuyó en presencia de PHE y BaP; sin embargo, *R. tropici* CIAT899, *R. tropici* PRF81 y *B. phenoliruptrix* tienen una fase de adaptación de 48 h en presencia de las concentraciones más altas de BaP (80 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

#### 4.7. Literatura citada

- Adam, G. and Duncan, H. 2003. The effect of diesel fuel on common vetch (*Vicia faba* L.) plants. *Environmental Geochemistry and Health*. 25: 123-130.
- Alexander, M. 1999. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, San Diego, CA, pp. 302-305.
- Atlas, R. and Bartha, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. España. 677p.

- Carrasco, J.A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M.A., López, R., Chamber, M.A., and Palomares, A. J. 2005. Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. *Soil Biology and Biochemistry*. 37: 1131-1140.
- Coenye, T., Henry, D., Speert, D., and Vandamme, P. 2004. *Burkholderia phenoliruptrix* sp. nov., to accommodate the 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and halophenol-degrading strain AC1100. *Systematic and Applied Microbiology*. 27: 623-627.
- Cofield, N., Banks, M.K., and Schwab, A.P. 2008. Lability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *Chemosphere* 70: 1664-1652.
- Chaîneau, C.H., Morel, J.L., and Oudot, J. 1996. Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *Journal of Environmental Quality*. 26: 1478-1483.
- Chauhan, A., Oakeshott, J.G., and Rakesh, K.J. 2008. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal Microbiology*. 48: 95-113.
- Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S., and Joner, E.J. 2005. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Plant-Microbial Interactions*. 12: 34-48.
- Chaudri, A.M., McGrath, S. P., Knight, B.P., Johnson, D.L. and Kevin, C.J. 1996. Toxicity of organic compounds to the indigenous population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolli* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 28: 1483-1487.
- Damaj, M. and Ahmad, D. 1996. Biodegradation of polychlorinated biphenyls by rhizobia: A novel finding. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 218: 908-915.



- Eom, I.C., Rast, C., Veber, A.M. and Vasseur, P. 2007. Ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67: 190-205.
- Frassinetti, S., Setti, L., Corti, A., Farrinelli, P., Montevecchi, P., and Vallini, G. 1998. Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal of Microbiology*. 44: 289-297.
- Gerhardt, K.E., Xiao-Dong, H., Glick, B.R., and Greenberg, B.M. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*. 176: 20-30.
- Giles, E.D.O and Downie, J.A. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legume. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 519-546.
- Habe, H. and Omori, T. 2003. Review. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbons metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. 67: 225-243.
- Han, W.S. and Moon, J. P. 2004. Microbial degradation and enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1:16-23.
- Hans-Holger, L. and Prutz, I. 2006. Plant performance, dioxygenase-expressing rhizosphere bacteria, and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil. *Chemosphere*. 62: 1411-1420.
- Ike, A., Sriprang, R., Ono, H., Murroka, Y., and Yamashita, M. 2007. Bioremediation of cadmium contaminated soil using symbiosis between leguminous plant and recombinant rhizobia with the *MTL4* and the *PCS* genes. *Chemosphere*. 66: 1670-1676.

- Jackson, L.E., Burger, M., and Cavagnaron, T.R. 2008. Roots, nitrogen, transformations, and ecosystem services. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 341-363.
- Johnson, D.L., Maguire, K.L., Anderson, D.R. and McGrath, S.P. 2004. Enhanced dissipation of chrysene in planted soil: the impact of a rhizobial inoculum. *Soil Biology and Biochemistry*. 36: 33-38.
- Johnsen, A.R. and Karlson, U. 2007. Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation. *Applied Microbiology of Biotechnology*. 76: 533-543.
- Juhasz, A.L. and Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 45: 57-88.
- Jung, K.T., Young, L.E., Jung, K.Y., Kyung-Suk, C. and Wook, R.H. 2003. Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19: 411-417.
- Kaksonen, A.H., Jussila, M.M., Lindström, K. and Suominen, L. 2006. Rhizosphere effect of *Galega orientalis* in soil-contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 38: 817-827.
- Kaushish, L.M., Bahuguna, A., Dangwal, K. and Garg, V. 2009. Degradation of benzo[a]pyrene by novel strain *Bacillus subtilis* BMT41 (MTCC9447). *Brazilian Journal of Microbiology*. 40: 884-892.
- Keum, Y.S., Seo, J.S., Hu, Y., and Li, Q.X. 2006. Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C4. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 935-941.

- Keum, Y.S., Seo, J.S., Li, Q.X., and Kim, J.H. 2008. Comparative metabolomics analysis of *Sinorhizobium* sp. C4 during the degradation of phenanthrene. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80: 863-872.
- Kiuper, I., Bloemberg, G.V., and Lugtenber, B. J.J. 2001. Selection of a plant-bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14: 1197-1205.
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L. Bloember, G.V., and Lugtenberg, B.J.J. 2004. Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17: 6-15.
- Labidi, M., Ahmad, D., Halasz, A., and Hawari, J. 2001. Biotransformation and partial mineralization of the explosive 2, 4, 6-trinitrotolueno (TNT) by rhizobia. *Canadian Journal of Microbiology*. 47: 559-566.
- Lian-Mei, F., Zhan-Qiang, M., Jian-Qiang, L., Hui-Fen, L., En-Tao, W., and Ge-Hong, W. 2011. Characterization of copper-resistant symbiotic bacterium isolated from *Medicago lipulina* growing in mine tailings. *Bioresource Technology*. 102: 703-709.
- Lindström, K., Hitntsa, H., Kaksonen, A., Mokolke, L., Mäkeläinen, K., Pitkäljärvi, J., and Suominen. L. 2003. Potential of the *Galega-Rhizobium galegae* system for bioremediation of contaminated soil. *Technology and Biotechnology*. 41: 11-16.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Martins, M.F., Franco, A.A., Graham, P., and Pardo, M.A. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41: 417-426.
- Merkl, N., Schultze-Kraft, R., and Infante, C. 2004. Phytoremediation in the tropics the effect of crude oil on the growth of tropical plants. *Bioremediation Journal*. 8: 177-184.

- Merkl, N., Schulte-Kraft, R., and Infante, C. 2005. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Water, Air and Soil Pollution*. 165: 195-209.
- Méndez, N.J.R., Mujica, C.F.B. y Pino, F.B.M. 2005. Efecto de la contaminación con petróleo sobre los caracteres de nodulación en el cultivo de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) en dos suelos del estado Monagas. *Revista UDO Agrícola*. 5: 81-87.
- Mikkonen, A., Kondo, E., Lappi, K., Wallenius, K., Lindström, K., Hartikainen, H., and Suominen, L. 2011. Contaminant and plant-derived changes in soil chemical and microbiological indicators during fuel oil rhizoremediation with *Galega orientalis*. *Geoderma*. 160: 336-346.
- Moreto, M., Silvestri, S., Ugo, P., Zorzi, G., Abbodanzi, F., Baiocchi, C., and Iacondini, A. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by composting in a soot-contaminated alkaline soil. *Journal of Hazardous Materials*. 26: 141-148.
- Muratova, A.Y., Golubev, S.N., Merbach, W., and Turkovskaya, O.V. 2009. Biochemical and physiological peculiarities of the interactions between *Sinorhizobium meliloti* and *Sorghum bicolor* in the presence of phenanthrene. *Microbiology*. 78: 308-314.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Reviews Plant Biology*. 56: 15-39.
- Redondo-Gómez, S., Andrades-Moreno, L., Parra, R., Valera-Burgos, J., Real, M., Mateos-Naranjo, E., Cox, L., and Cornejo, J. 2011. *Spartina densiflora* demonstrates high tolerance to phenanthrene in soil and reduces its concentration. *Marine Pollution Bulletin*. 62: 1800-1808.
- Reynoso-Cuevas, L., Gallegos-Martínez, M.E., Cruz-Sosa, F., and Gutiérrez-Rojas, M. 2008. *In vitro* evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented

- with hydrocarbons associated with contaminated soils. *Bioresource Technology*. 99: 6379-6385.
- Rivera-Cruz, M., Trujillo, A., Miranda, A., y Maldonado, E. 2005. Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleo nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia*. 30: 326-331.
- SAS (Statistical Analysis System, Institute). 2002. User's Guide: Statistics, version 8.0. SAS. Institute. Inc. Cary. N.Y.
- Sang-Hwan, L., Won-Seok, L., Chang-Ho, L., and Jeong-Gyu, K. 2008. Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes. *Journal of Hazardous Materials*. 153: 892-898.
- Seo, J.S., Keum, Y.S., Hu, Y., Lee, S.E., and Li, Q.X. 2007. Degradation of phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: initial 1,2- and 3,4-dioxygenation and *meta*- and *ortho*- cleavage of naphthalene-1,2-diol. *Biodegradation*. 18: 123-131.
- Seo, J.S., Keum, Y.S., and Li, Q.X. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 6: 278-309.
- Shrimant, S.B. 2012. Review, nitrogen fixing microorganisms. *International Journal of Microbiological Research*. 3:46-52.
- Trapp, S. and Karlson, U. 2001. Aspects of phytoremediation of organic pollutants. *Journal of Soil and Sediments*. 1: 37-43.
- Vincent, J.M. 1970. Manual for the practical study of root-nodule bacterial. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p 164.

- Wei, G., Yu, J., Zhu, Y., Chen, W., and Wang, Li. 2008. Characterization of phenol degradation by *Rhizobium* sp. CCNWTB 701 isolated from *Astragalus chysopteru* in mining tailing region. *Journal of Hazardous Materials*. 151: 111-117.
- Wenzel, W.W. 2009. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil*. 321:385-408.

## CAPÍTULO V

### CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE FENANTRENO Y BENZO[A]PIRENO POR

#### *Rhizobium tropici* CIAT899 EN VIDA LIBRE EN SISTEMA *IN VITRO*

##### 5.1. Resumen

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) son contaminantes ubicuos que son tóxicos y recalcitrantes a la degradación por bacterias. La presente investigación evaluó la toxicidad de diferentes concentraciones [10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] de PHE y/o BaP en el crecimiento de *Rhizobium tropici* CIAT899, y su capacidad de degradación de fenantreno (PHE) y benzo[a]pireno (BaP) en vida libre. A las 24 h, se observó una disminución del 40% en el crecimiento de *Rhizobium* al exponerse a una concentración de 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de PHE y/o BaP, y una inhibición total ante PHE o BaP aplicados en niveles de 80 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Después de 96 h de exponer a *R. tropici* con 40  $\mu\text{g PHE mL}^{-1}$  y/o 60  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$  su crecimiento fue similar con aquellos tratamientos sin HPA. Para conocer el potencial de degradación de *R. tropici*, los tratamientos abióticos (sin cepa) con 40  $\mu\text{g PHE mL}^{-1}$  y/o 60  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$  y los bióticos (con la cepa) contaminados con estos dos HPA, se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), y se observó una degradación del 50 % de PHE, y 45 % de BaP en aquellos tratamientos inoculados con la cepa bacteriana a las 120 h.

**Palabras claves.** *Hidrocarburos policíclicos aromáticos, degradación, crecimiento celular, Rhizobium*

## CAPABILITY OF DEGRADING PHENANTHRENE AND BENZO[A]PYRENE BY FREE LIVING *Rhizobium tropici* CIAT899 UNDER *IN VITRO* SYSTEMS

### 5.2. Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are ubiquitous contaminants that are toxic and recalcitrant to bacterial degradation. The present research evaluated the toxicity of several concentrations (10, 20, 40, 60, 80 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of phenanthrene (PHE) or benzo[a]pyrene (BaP) on growth of *Rhizobium tropici* CIAT899, and the ability of this bacterium for degrading both PAH in free living conditions. At 24 h, growth of *Rhizobium* decreased in 40% at 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of either PHE or BaP, but a total inhibition was observed at both PAH applied at 80 or 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . After 96 h, *R. tropici* grown at 40  $\mu\text{g PHE mL}^{-1}$  or 60  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$  had a similar growth when compared to treatments without PAH. In order to know the capability of *R. tropici* for degrading both PAH, the bacteria were exposed to 40  $\mu\text{g PHE mL}^{-1}$  or 60  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$  (concentrations selected from previous results). Treatments including those contaminated with each PAH but without bacterial inoculation were analyzed by means of gas chromatography / mass spectrometry (GC-MS). *Rhizobium tropici* CIAT99 started the degradation of both contaminants at 24 h. At 120 h, the extent of PAH degradation bacteria was of 50 % for PHE, and 45 % for BaP.

**Key words:** *Polycyclic aromatic hydrocarbons, degradation, bacterial growth, bacterial protein, rhizobia*



### 5.3. Introducción

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) están constituidos por uno o más anillos de benceno en forma lineal, angular o en forma de racimo cuya fuente principal es de origen petrogénico y pirogénico (Cerniglia, 1992; Seo *et al.*, 2009). Los HPA tienen amplia distribución en la mayoría de los ecosistemas; además son recalcitrantes a la degradación y son muy persistentes en el ambiente. Por ser ecotóxicos, genotóxicos y carcinogénicos la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (USEPA, por sus siglas en inglés), los ha colocado como principales contaminantes en el ambiente (Kanaly y Harayama, 2000; USEPA, 2004; ATDSR, 2005).

La contaminación con HPA provoca la inhibición de microorganismos del suelo (Eom *et al.*, 2007); sin embargo, algunos grupos microbianos pueden adaptarse a este tipo de compuestos (Peixoto *et al.*, 2011). Dentro de los microorganismos tolerantes a los HPA están las bacterias (Bracho *et al.*, 2005; Kanaly y Harayama, 2000), las cuales son un grupo muy común en sitios contaminados con HPA, y con otros compuestos tóxicos como plaguicidas, metales pesados, entre otros. Las bacterias pueden utilizar a los HPA como fuente de carbono y energía para su crecimiento y reproducción, debido a que su metabolismo posee enzimas como dioxigenasas, peroxidasas y catalasas, las cuales oxidan a los HPA y con ello, iniciar su degradación y/o transformación a compuestos menos tóxicos (Harvey *et al.*, 2002; Siciliano *et al.*, 2003).

La degradación de HPA vía microbiana se conoce más en organismos de vida libre, y es más reportada en aquellos hidrocarburos de bajo peso molecular que se caracterizan por tener uno o tres anillos aromáticos y ser menos tóxicos, por ejemplo, el fenantreno (PHE) (Chauhan *et al.*, 2008). Entre las bacterias que degradan este tipo de compuestos están *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, y *Xanthomonas*. (Kanaly y Harayama, 2000).

En contraste, las bacterias (e.g *Burkholderia*, *Mycobacterium*, y *Rhodococcus*) que pueden degradar HPA de alto peso molecular y tomarlos como única fuente de carbono y energía son escasas (Seo *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2008; Xu-Xiang *et al.*, 2006). Lo anterior se debe a que estos HPA son más recalcitrantes ya que están constituidos por cuatro o más anillos de benceno fusionados, haciéndolos menos biodisponibles para su degradación (Atlas y Bartha, 2002). Un ejemplo de este tipo de compuestos es el benzo[a]pireno (BaP), el cual está constituido por cinco anillos de benceno fusionados, además de ser genotóxico, carcinogénico, y resistente al ataque microbiano (Pothuluri y Cerniglia, 1994). Estos HPA de alto peso molecular pueden ser también degradados por co-metabolismo, donde la transformación del HPA depende de la presencia de una fuente de carbono alterna que sirve de sustrato (glucosa, peptona, entre otros (Johnsen *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2010).

Como se mencionó, la biodegradación de HPA ha sido estudiada principalmente en bacterias de vía libre; sin embargo, poco se conoce del potencial de bacterias simbióticas para degradar HPA. Ejemplo de este tipo de bacterias está representado por el género *Rhizobium*, el cual es conocido por establecer simbiosis con leguminosas y por su contribución en la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (Oldroyd y Downie, 2008).

La importancia de las bacterias del género *Rhizobium* en la biorremediación de HPA, radica en que éstas al asociarse con su hospedero no compiten por nitrógeno, lo cual es importante durante la biorremediación, puesto que la acumulación de hidrocarburos del petróleo en el suelo incrementa la cantidad de carbono disponible generando así, una relación de C/N muy alta (Moreto *et al.*, 2005). Lo anterior es desfavorable para la actividad y el crecimiento bacteriano debido principalmente por la baja disponibilidad de nitrógeno (López-Martínez *et al.*, 2005).

Por otro lado, se conoce que *Rhizobium tropici* CIAT899 es resistente a metales pesados y antibióticos como cloranfenicol, espectinomina, carbenicilina y estreptomicina (Martínez-Romero *et al.*, 1991). Por lo anterior, este estudio tuvo como objetivo evaluar la capacidad de degradación de PHE y BaP por *Rhizobium tropici* CIAT899 en vida libre. Como antecedente se ha reportado que algunas bacterias del género *Rhizobium* pueden tolerar y degradar sustancias tóxicas como el dibenzotiofeno (Frassinetti *et al.*, 1998), 2,4 dinitrotolueno (Dutta *et al.*, 2003) y algunos HPA (acenaftileno y fenantreno) (Poonthrigpun *et al.*, 2006; Keum *et al.*, 2006). Sin embargo, aún son pocos los estudios donde se ha valorado el papel de este género bacteriano para tolerar o degradar HPA y su potencial para utilizarse en sistemas de biorremediación y fitorremediación.

#### **5.4. Materiales y métodos**

La cepa *Rhizobium tropici* CIAT899 fue proporcionada por el Centro de Ciencias Genómicas (UNAM). Para su reactivación, la bacteria fue sembrada en cajas de Petri que contenían el medio de cultivo extracto de levadura manitol agar rojo congo (ELMARC), incubadas a 28° C por tres días, haciendo el seguimiento del crecimiento bacteriano cada 24 h (Vincent, 1970). Una vez reactivada la bacteria se realizó una prueba de confirmación de pureza, basándose en la prueba de leche tornasolada (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993). Posteriormente, la bacteria fue transferida a tubos inclinados que contenían extracto de levadura manitol agar (ELMA), para su conservación y posterior uso. Paralelamente se preparó una solución madre para cada uno de los HPA (fenantreno, 77470-100G-SIGMA-ALDRICH®) y benzo[a]pireno, B1760-1G-SIGMA-ALDRICH®), utilizando acetona como disolvente, para posteriormente obtener las siguientes concentraciones 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg mL<sup>-1</sup>. Inmediatamente después, las

soluciones fueron colocadas en frascos color ámbar para evitar fotooxidación de los hidrocarburos, y conservadas a 4 °C para evitar la volatilidad del disolvente.

#### 5.4.1. Determinación de la dinámica de crecimiento de *Rhizobium tropici* CIAT899

Con el objetivo de utilizar el inóculo de *R. tropici* CIAT899 con crecimiento en fase logarítmica, se determinó su dinámica de crecimiento. El medio líquido que se utilizó para el crecimiento de la bacteria fue extracto de levadura manitol (ELM), colocando en matraces (20 mL), que fueron inoculados con *R. tropici* CIAT899. Enseguida estos matraces fueron colocados en una incubadora con agitación a 180 rpm a 28 °C. El crecimiento bacteriano se evaluó cada tres horas mediante la estimación de las unidades formadoras de colonias (UFC) durante 36 h. Para cuantificar las UFC bacterianas, fue necesario tomar una alícuota de 100 µL de cada uno de los tratamientos por separado, la cual fue colocada en tubos eppendorf con 900 µL del cual se realizaron diluciones seriales hasta obtener la dilución  $10^{-9}$ . De las diluciones  $10^{-4}$  a la  $10^{-9}$ , se sembraron 100 µL en cajas de Petri que contenían ELMARC, por triplicado. La alícuota fue distribuida sobre la superficie del agar con ayuda de una varilla de vidrio en forma de L. Al finalizar la siembra, las cajas fueron incubadas a 28° C, al tercer día las UFC se cuantificaron y posteriormente se transformaron a unidades logarítmicas en base 10 (Log UFC) (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993).

#### 5.4.2. Crecimiento de *Rhizobium tropici* CIAT899 en medio líquido contaminado con diferentes concentraciones de fenantreno y/o benzo[a]pireno

El medio de cultivo que se utilizó en ésta y en las siguientes etapas experimentales fue extracto de levadura manitol (ELM) modificado al aplicar 50% de su fuente de carbono original, el cual fue seleccionado previamente (datos no presentados). La composición del medio fue la

siguiente ( $\text{g L}^{-1}$ ): 0.5  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0.2  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1 NaCl, 5 manitol, 0.75 extracto de levadura, el medio de cultivo se ajustó a pH neutro.

Para evaluar el efecto tóxico que tienen los HPA sobre el crecimiento de *Rhizobium tropici* CIAT899, dicha bacteria se expuso a medio (ELM modificado) contaminado con diferentes concentraciones (0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por separado de PHE o de BaP. El crecimiento de la bacteria se observó por densidad óptica (D.O) A  $_{600\text{nm}}$ , durante 24 h.

El experimento fue un diseño factorial 2x7, el cual tuvo dos niveles de tipo de HPA (fenantreno y benzo[a]pireno) y siete niveles por tipo de concentración. Los 14 tratamientos resultantes tuvieron tres repeticiones, y el experimento se realizó por duplicado. Los datos obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico SAS (SAS, 2002) V 8.0, mediante un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

5.4.3. Crecimiento de *Rhizobium tropici* CIAT899 en medio líquido contaminado con fenantreno ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) o con benzo[a]pireno ( $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ )

A partir de los datos obtenidos de la fase experimental anterior, se evaluó el comportamiento de *R. tropici* en medio ELM contaminado con fenantreno ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) o con BaP ( $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) durante 96 h. El experimento consistió de los siguientes tratamientos: a) testigo absoluto (To); b) medio inoculado con *Rhizobium*; c) medio contaminado con PHE ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) + *Rhizobium*, d) medio contaminado con BaP ( $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) + *Rhizobium*, e) medio (abiótico) con PHE ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), y f) medio (abiótico) con BaP ( $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los tratamientos (b, c y d) fueron inoculados con 500  $\mu\text{L}$  de una solución bacteriana de *R. tropici* con crecimiento en fase logarítmica ( $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) Posteriormente, todos los tratamientos se colocaron en una incubadora con agitación a 180 rpm a 28 °C. El crecimiento bacteriano se evaluó por medio de la

estimación de las unidades formadoras de colonias (UFC) a las 24, 48, 72 y 96 h (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993).

Además, la biomasa bacteriana de *Rhizobium tropici* CIAT899 fue determinada mediante la separación de las bacterias al centrifugar el medio líquido a 8000 rpm durante 20 min; posteriormente, el pellet bacteriano se secó a 60 °C durante 72 h, y finalmente la biomasa seca fue pesada en una balanza analítica.

La extracción y análisis de abundancia de fenantreno y de benzo[a]pireno en el medio líquido fue realizado mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), con base en el siguiente procedimiento. Se realizó una extracción líquido-líquido, donde el medio de cultivo fue vertido en tubos de vidrio de 50 mL a los que se agregaron 10 mL de hexano grado HPLC (J.T. Baker®). Los tubos se agitaron manualmente durante 10 min para el caso de fenantreno, y 20 min para el benzo[a]pireno, con el objetivo de extraer el hidrocarburo. Al término de esto, los tubos fueron colocados en reposo hasta observar dos fases en el medio; a partir de la primera fase o sobrenadante (disolvente con el hidrocarburo) se tomó un mililitro que fue transferido a un vial, para posteriormente ser analizado por GC-MS.

Para el análisis de las muestras extraídas, se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies, modelo 6890N, con una columna DB-5 (5%-fenil-metilpolisiloxano) de 60 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película. La temperatura de inicio fue 70 °C, la cual se mantuvo durante 5 min, posteriormente la temperatura se elevó hasta 280 °C durante 10 min usando una rampa de calentamiento de 40°C min<sup>-1</sup>, gas acarreador helio con un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, temperatura del inyector 250 °C, inyección splitless. Una vez obtenido el cromatograma, la identificación de cada uno de los picos cromatográficos se llevó a cabo mediante espectrometría de masas empleando un espectrómetro de masas marca

Agilent Technologies (modelo 5975 inert XL). Los espectros de masas se obtuvieron mediante ionización por impacto electrónico a 70 eV, y la adquisición de los datos se realizó en modo SIM (Selective Ion Monitoring). Los iones utilizados para la identificación y cuantificación de fenantreno fueron 178.15 (como ion cuantificador) y 176.15, 179.15 y 76.1 (como iones calificadores), y para benzo[a]pireno los iones fueron 252.15 (como ion cuantificador) y 126.10, 250.20 y 253.15 (como iones calificadores). Para la identificación se comparó el espectro de masas obtenido con una base de datos (HP Chemstation-NIST 05 Mass Spectral search program, versión 2.0d). Además se hizo la comparación con fenantreno (98% de pureza; C<sub>14</sub> H<sub>10</sub>; FW 178.23; bp 340°C / 760 mm Hg; mp 98° C/ d1.063 SIGMA-ALDRICH®) y de benzo[a]pireno (≥ 96% de pureza; C<sub>20</sub> H<sub>12</sub>; FW 252.31; bp 495 °C / 760 mm Hg; mp177-180° C/ d1.063 SIGMA-ALDRICH®), analizados bajo las mismas condiciones, el cual fue utilizado como estándares externos para la cuantificación.

El experimento fue un diseño factorial 2x2x2, que incluyó dos niveles de inoculación de *R. tropici* (con y sin), dos niveles de contaminación (sin y con HPA) y dos niveles de tipo de HPA (fenantreno y benzo[a]pireno). Los HPA se analizaron por separado. Los ocho tratamientos resultantes tuvieron cuatro repeticiones, distribuidos completamente al azar. Se evaluó el crecimiento a las 24, 48, 72 y 96 h para observar el crecimiento de la bacteria, sin embargo, para el experimento de extracción y análisis de abundancia de fenantreno y benzo[a]pireno se evaluó a las 24, 48, 72, 96 y 120 h. El experimento se hizo por duplicado. Los datos obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico SAS (SAS, 2002) V 8.0, mediante un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

## 5.5. Resultados y discusión

### 5.5.1. Dinámica de crecimiento de *Rhizobium tropici* CIAT899

La figura 5.1 muestra la cinética de crecimiento de *Rhizobium tropici* CIAT899 en medio de cultivo ELM sin contaminar. En dicha figura se observa que la bacteria tiene una fase de latencia de tres horas, y su mayor división celular o fase logarítmica inició a partir de la tercera hasta las 18 h, ya que al finalizar esta última, inició la fase estacionaria.

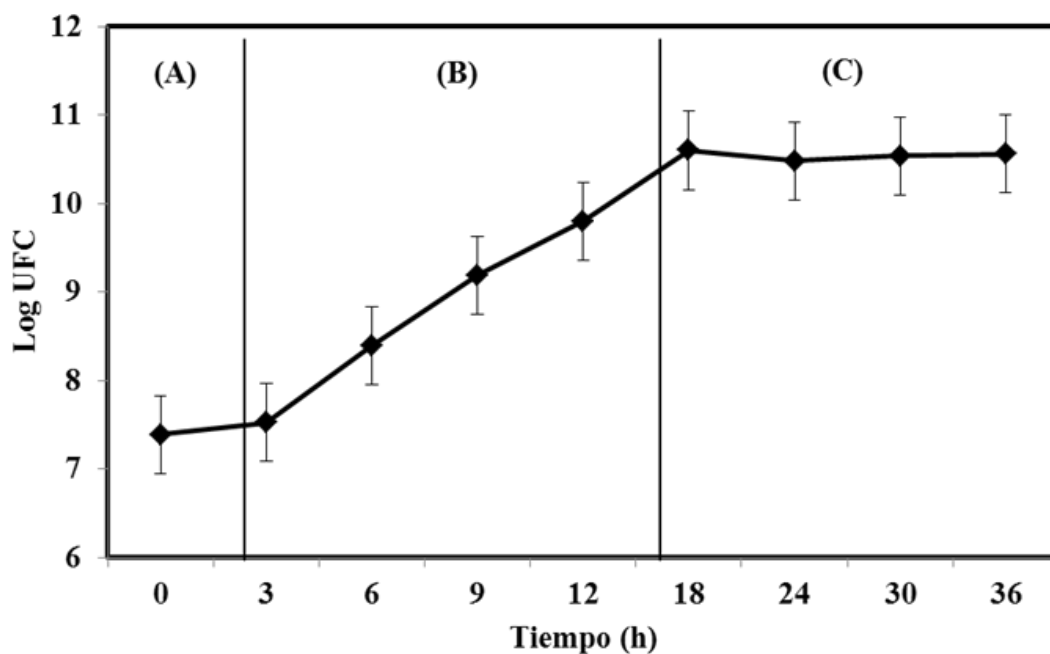


Figura 5.1. Cinética de crecimiento de *Rhizobium tropici* CIAT899 en medio de cultivo ELM sin contaminante. (A) fase de latencia, (B) fase logarítmica, y (C) fase estacionaria. n= 3. Medias.  $\pm$  error estándar.

### 5.5.2. Crecimiento de *Rhizobium tropici* CIAT899 en medio líquido con diferentes concentraciones de fenantreno y/o benzo[a]pireno

La toxicidad de las diferentes concentraciones (10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de PHE o de BaP en el crecimiento de *Rhizobium tropici* CIAT899, fue evaluada por DO A<sub>600 nm</sub> a las 24



h, ya que después de este tiempo, la bacteria sin la presencia del contaminante, pasa a su fase estacionaria (Figura 5.1), además de que esta bacteria ha sido caracterizada por ser de crecimiento rápido. En la figura 5.2 se observa una disminución significativa del 40% en el crecimiento de *R. tropici* ante  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  tanto de PHE como de BaP en el medio de cultivo, mientras que ante 80 y  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ambos HPA, el crecimiento celular fue inhibido. Al comparar la toxicidad de estos dos hidrocarburos a la concentración de  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ , se observó que el PHE es ligeramente más tóxico para esta bacteria (Figura 5.2). Por lo anterior, las concentraciones de  $40 \mu\text{g PHE mL}^{-1}$  y  $60 \mu\text{g BaP mL}^{-1}$ , fueron seleccionadas para la siguiente fase del experimento.

A pesar de la diferencia existente en la estructura química de ambos HPA, esta característica no fue significativa para el crecimiento *R. tropici*, ya que se esperaba que el BaP fuera el HPA con mayor toxicidad hacia la bacteria por ser un hidrocarburo de alto peso molecular, además de ser de los hidrocarburos más tóxicos ya que es genotóxico, teratogénico y carcinogénico (Van Hamme *et al.*, 2003); por lo que, son pocos los microorganismos que crecen en medio contaminado con este HPA (Juhasz y Naidu, 2000).

Eom *et al.* (2007) mencionan la ecotoxicidad que tienen los 16 HPA enlistados por la USEPA, indicando que éstos disminuyen el crecimiento celular de *Vibrio fischeri* (bacteria gram negativa, que se encuentra en ambientes marinos), en medio líquido contaminado con estos hidrocarburos. Así, el crecimiento de *V. fischeri* disminuyó al incrementar las concentraciones y el número de anillos de los HPA. En contraste, el crecimiento de *R. tropici* disminuyó al aumentar las concentraciones de los HPA, sin embargo, la complejidad de la estructura química del PHE y del BaP no presentó diferencias.

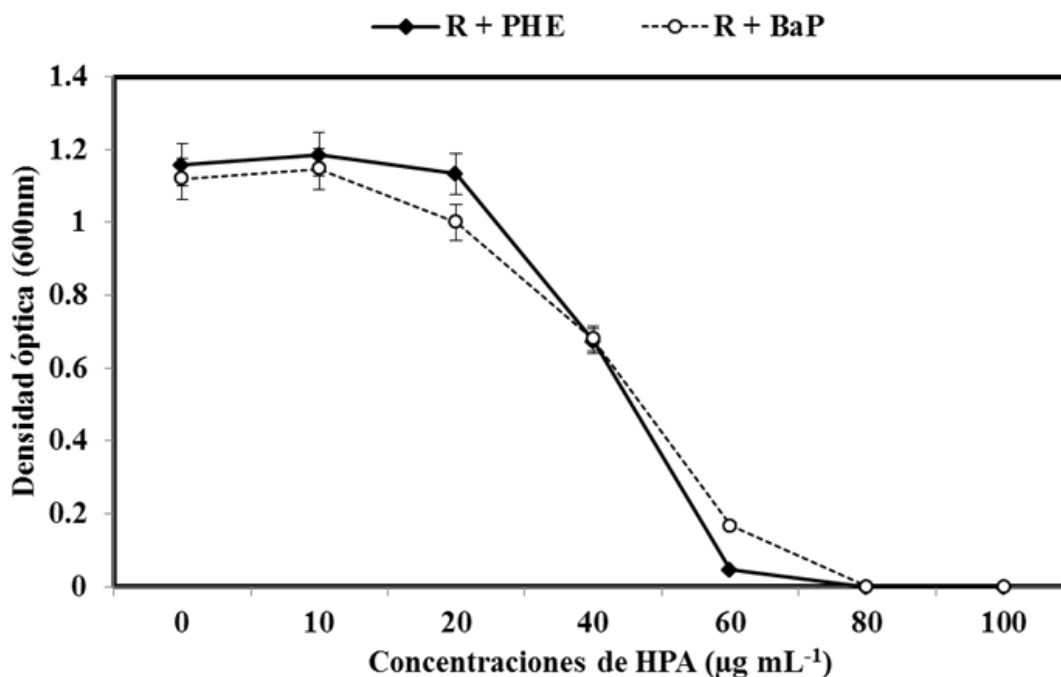


Figura 5.2. Crecimiento de *Rhizobium tropici* CIAT899, en medio líquido contaminado con diferentes concentraciones de fenantreno (PHE) y benzo[a]pireno (BaP), a las 24 h. n=3. Medias.  $\pm$  error estándar.

### 5.5.3. Crecimiento de *Rhizobium tropici* CIAT899 ante fenantreno y/o benzo[a]pireno en medio de cultivo líquido

*Rhizobium tropici* CIAT899 es una bacteria de crecimiento rápido, porque a los tres días se observa crecimiento celular en medio sólido (Martínez-Romero *et al.*, 1991). Por lo anterior se evaluó el crecimiento de *R. tropici* en medio líquido contaminado con PHE ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y BaP ( $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a las 24, 48, 72 y 96 h después de la inoculación.

En la figura 5.3 se observa que *R. tropici* mostró tolerancia a las dos dosis de ambos HPA, ya que hubo crecimiento celular, mismo que aumentó con el tiempo de incubación. A las 24 y 48 h, hubo significativamente menor crecimiento bacteriano en aquellos tratamientos con

HPA (20 y 27% menos, respectivamente), con respecto a los tratamientos sin contaminar, lo que indica que las bacterias están adaptándose al medio contaminado, de tal forma que a las 96 h después de la inoculación con *R. tropici*, no hubo diferencia significativa en el crecimiento bacteriano entre los tratamientos con HPA y sin HPA (Figura 5.3). Kaushin *et al.* (2009) observaron que el crecimiento de *Bacillus subtilis* BMT4 (MTCC9447) tuvo una latencia de 12 h al exponerlo a 50 µg BaP mL<sup>-1</sup>, después de este tiempo el crecimiento fue exponencial. Por otro lado, Zhong *et al.* (2010) no observaron diferencia en el crecimiento de *Sphingomonas* sp. PheB4 al exponerla en medio contaminado con fenantreno, fenantreno + pireno, y fenantreno + fluoranteno, aunque, la mezcla de estos tres HPA (fenantreno+pireno+fluoreno) fue más tóxica para el crecimiento de esta bacteria.

La tolerancia de *R. tropici* observada hacia PHE y BaP, se atribuye a que la bacteria utilizó estos compuestos como fuente de carbono y energía. Seo *et al.* (2009), mencionan que el crecimiento celular de *Burkholderia* está relacionado con la disponibilidad del PHE en el medio de cultivo; estos investigadores observaron que el crecimiento celular disminuyó a los cinco días debido a que el HPA había sido totalmente utilizado como fuente de carbono y energía. Atlas y Bartha (2002) mencionan que las bacterias crecidas en medios contaminados con hidrocarburos, experimentan una tolerancia hacia los compuestos, la cual les permite sobrevivir por largo tiempo por su metabolismo basal, o por las reservas de carbono de su propia estructura, por el carbono procedente de células muertas; pero después de este periodo se lleva a cabo la liberación de enzimas dioxigenasas, las cuales son responsables de degradar a este tipo de HPA (Chauchan *et al.*, 2008). En el caso de *R. tropici*, su tolerancia puede también estar relacionada con la presencia de enzimas como la dioxigenasa, ya que Keum *et al.* (2006) observaron que por medio de esta enzima dioxigenasa, *Shinorhizobium* sp C4 puede degradar PHE (500 mg L<sup>-1</sup>).

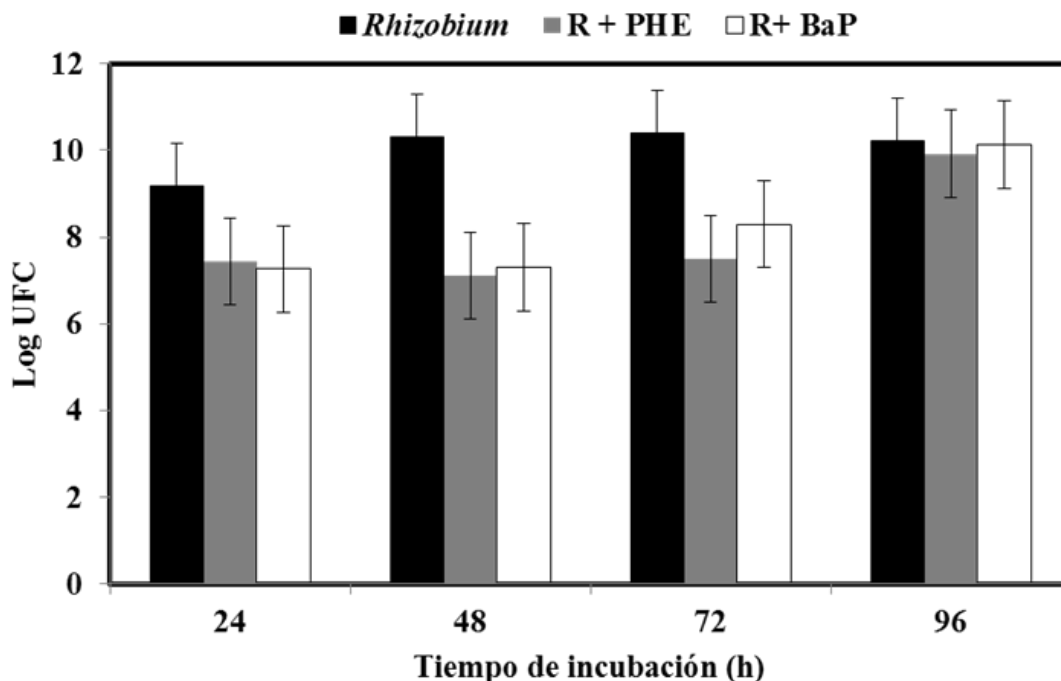


Figura 5.3. Tolerancia y crecimiento (Unidades logarítmicas, UFC<sub>Log</sub>) de *Rhizobium tropici* CIAT899 (R) en medio líquido contaminado con fenantreno [40 µg PHE mL<sup>-1</sup>] y/o benzo[a]pireno [60µg BaP mL<sup>-1</sup>]. n=4. Media ± error estándar.

#### 5.5.4. Biomasa bacteriana de *Rhizobium tropici* CIAT899 al crecer en medio líquido contaminado con fenantreno (40 µg mL<sup>-1</sup>) y/o benzo[a]pireno (60 µg mL<sup>-1</sup>)

En la figura 5.4, se observa el comportamiento de la biomasa de *Rhizobium tropici* CIAT899 por efecto del PHE y del BaP en comparación con el tratamiento sin HPA. A las 24 h, la biomasa bacteriana (BB) fue significativamente menor (36%) en los tratamientos contaminados con los hidrocarburos, aunque no se presentaron diferencias significativas entre los dos contaminantes (Figura 5.4). A partir de las 48 h se observó un repunte de la BB en todos los tratamientos especialmente con BaP, el cual tuvo un incremento del 80 % hasta las 96 h (Figura

5.4). En contraste, la BB en ausencia de los contaminantes se mostró estable desde las 48 h hasta las 96 h, pero significativamente mayor a la BB obtenida en presencia de PHE (Figura 5.4).

Dhote *et al.* (2010) mencionaron que el crecimiento de un consorcio bacteriano en presencia de criseno, fue directamente proporcional con la biomasa bacteriana, y señalaron que estas dos variables sirven como indicadores del uso del criseno como fuente de carbono para las bacterias. La diferencia de la BB entre el PHE y el BaP que se aprecia a partir de las 48 h, hace más evidente que el PHE fue más tóxico para *R. tropici*, a pesar de que es un HPA menos recalcitrante (vida media en el suelo entre 16 y 126 días, y el benzo[a]pireno puede perdurar en el suelo hasta 4 años; Wickle, 2000). Traczewska (2000) menciona que algunos metabolitos generados por la degradación incompleta de antraceno y fenantreno tienen fuertes propiedades tóxicas y mutagénicas. Lo anterior permite pensar que *R. tropici* si es capaz de degradar PHE, posiblemente esté liberando al medio de cultivo metabolitos más tóxicos que el compuesto original provocando con ello, la inhibición o incluso la muerte de las células bacterianas. Kazunga y Aitken (2000) mencionan que durante la degradación de pireno existen metabolitos que pueden ser mineralizados por la misma bacteria o por otros microorganismos; sin embargo, hubo metabolitos (cis-4,5-dihidro-4,5-dihidroxipireno y pireno-4,5-diona) que inhibieron la degradación de PHE.

La disminución de la BB observada en los tratamientos sin HPA con respecto al tiempo, se puede atribuir a que *R. tropici* consumió toda la fuente de carbono del medio de cultivo a partir de las 48 h, lo cual limitó su continuo crecimiento (Figura 5.4).

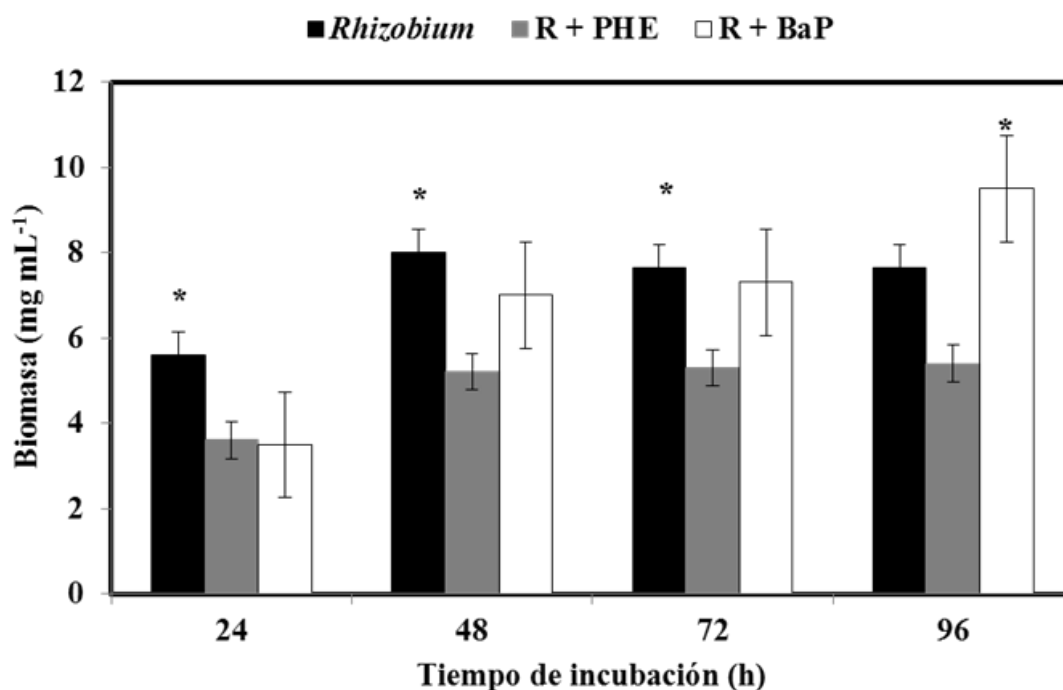


Figura 5.4. Biomasa seca de *Rhizobium tropici* CIAT899 (R) determinada en medio líquido contaminado con fenantreno [40 µg PHE mL<sup>-1</sup>] y/o benzo[a]pireno [60 µg BaP mL<sup>-1</sup>]. n=4 Medias ± error estándar. El asterisco (\*) indica diferencias significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre los tratamientos para cada fecha de muestreo.

#### 5.5.5. Degradación de fenantreno y/o benzo[a]pireno por *Rhizobium tropici* CIAT899 evaluado mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)

En la figura 5.5 se observa una disminución significativa de la abundancia (expresada en porcentaje) de PHE y/o BaP en los tratamientos inoculados con *Rhizobium tropici* con respecto al tiempo de evaluación. La disminución de ambos HPA fue concordante con el crecimiento bacteriano (Figuras 5.3 y 5.4). El porcentaje de abundancia de PHE y de BaP a las 120 h disminuyó significativamente en 50% y 45%, respectivamente, en comparación con los tratamientos en los que solo se aplicó cada uno de los HPA, cuya abundancia fue constante en cada muestreo (Figuras 5.5 y 5.8). Estos resultados indican que *R. tropici* contribuye en la

degradación de estos HPA como ha sido demostrado por *Sinorhizobium* sp C4 (cepa aislada de un sitio contaminado con HPA en Hilo, HI, USA), la cual puede degradar PHE y tomarlo como única fuente de carbono y energía, durante siete días de incubación (Keum *et al.*, 2006). Por su parte, Poonthrigpun *et al.* (2006) mencionan que *Rhizobium* sp CU-A1 (cepa aislada de suelo de Tailandia contaminado con petróleo), puede crecer en acenaftileno ( $600 \text{ mg L}^{-1}$ ) y tomarlo como única fuente de carbono, y degradarlo completamente en tres días.

Existen otros estudios en los que se describe la capacidad de las cepas del género *Rhizobium* para degradar otro tipo de sustancias tóxicas. Frassinetti *et al.* (1998) encontraron que *R. meliloti* Orange 1, puede degradar dibenzotiofeno (hidrocarburo aromático azufrado) y tomarlo como única fuente de carbono y energía, después de un periodo de preadaptación de la cepa. También Dutta *et al.* (2003) observaron que *Sinorhizobium meliloti* USA1936 puede degradar 94% de 2,4 dinitrotolueno a una concentración de 0.55 mM a los 10 días; esta degradación se logró a través de la modificación genética de la bacteria al insertarle genes de *Burkholderia* sp DNT que degradan a 2,4 dinitrotolueno.

La degradación de PHE y BaP por *R. tropici* CIAT899 posiblemente se llevó a cabo directamente o por co-metabolismo, ya que el medio de cultivo contenía ambos HPA, así como manitol y extracto de levadura ( $5$  y  $0.75 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente) los cuales pudieron servir de sustrato y con ello favorecer su degradación. Yuan *et al.* (2000) reportaron que la degradación de PHE ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) por un consorcio de bacterias gram negativas, aumentó al adicionar al medio de cultivo extracto de levadura, acetato, glucosa y piruvato. Por su parte, Ye *et al.* (1996) demostraron una degradación del 5% en la concentración inicial de BaP ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) por *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 a las 168 h, utilizando fluoranteno como sustrato; sin

embargo, al utilizar extracto de levadura (100 mg L<sup>-1</sup>) la degradación del BaP se incrementó significativamente en 40%.

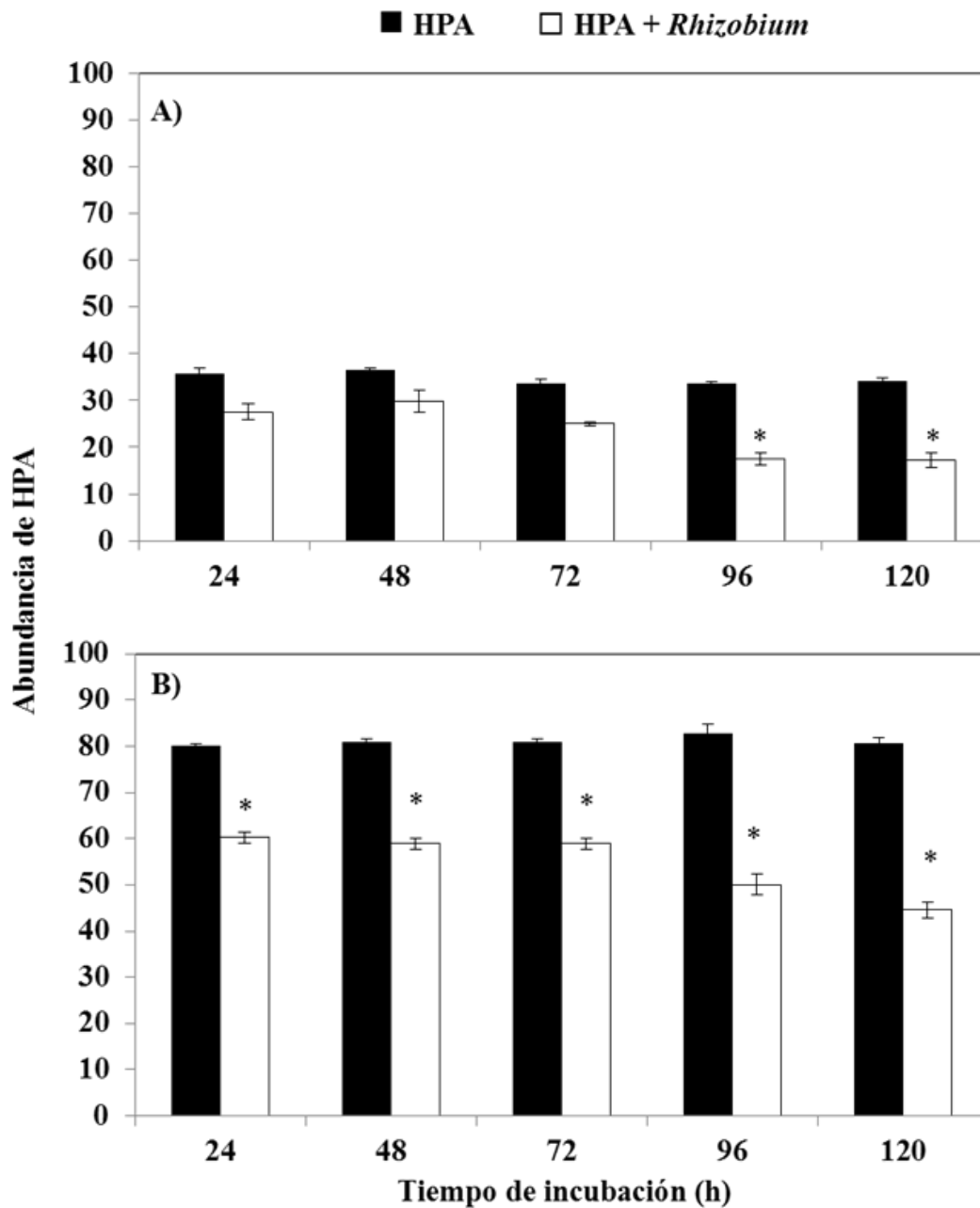


Figura 5.5. Abundancia de dos hidrocarburos policíclicos aromáticos en medios sin y con la inoculación de *Rhizobium tropici* CIAT899. A) Abundancia de PHE, y B) Abundancia de BaP. n=4. Medias ± error estándar. El asterisco (\*) indica diferencias significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre los tratamientos para cada fecha de muestreo.



Otros reportes indican que la degradación de compuestos aromáticos, principalmente el BaP, requiere de una fuente de carbono como inductor para mantener o expresar enzimas que degraden HPA (Rentz *et al.*, 2005). Como consecuencia de esto son pocos los trabajos que describen bacterias que toman al BaP como única fuente de carbono y energía. Juhasz y Naidu (2000) reportan que *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium* y *Gardona* pueden tomar a este HPA como única fuente de energía. Por lo anterior, es posible pensar que una fuente de carbono alterna aplicada en los medios de cultivo puede aumentar la degradación de HPA de bajo peso molecular, mientras que para aquellos de alto peso molecular, esta fuente de carbono puede servir como sustrato para que se lleve a cabo la degradación. Teng *et al.* (2010) mencionan que la adición de almidón, succinato de sodio y glucosa en el suelo contribuyó en la estimulación de la biomasa bacteriana y fúngica, además de la disipación de fenantreno y de benzo[a]pireno, después de 90 días. Hunter *et al.* (2005) encontraron que *Bacillus subtilis* tgr3 fue capaz de degradar 55% de BaP a las 48 h, y 65% a las 72 h, en un medio de cultivo mínimo suplementado con citrato de sodio como fuente de carbono.

Por lo anterior, es posible concluir que *Rhizobium tropici* CIAT899 puede degradar PHE y BaP en las concentraciones y condiciones de cultivo evaluadas, a pesar de no haber sido aislada de suelos contaminados con petróleo, ni que haya sido previamente adaptada en laboratorio, ni genéticamente modificada, como ha sido el caso de algunas bacterias que pueden tomar a los HPA como única fuente de carbono y energía (Leneva *et al.*, 2009).

Con base en la búsqueda de literatura, este trabajo es uno de los primeros estudios que muestra la capacidad de *Rhizobium tropici* CIAT899 para degradar HPA de bajo y de alto peso molecular, lo cual le confiere ventajas para ser utilizada en ensayos de degradación *in situ*.

En las figuras 5.6 y 5.7 se aprecian los cromatogramas en los cuales se observa con mayor claridad la degradación de PHE y de BaP por *Rhizobium tropici* CIAT899 en diferentes tiempos de crecimiento. La degradación de PHE por otras bacterias diferentes a *Rhizobium*, se ha reportado en varios artículos. Yuan *et al.* (2000) observaron la degradación de 5 mg L<sup>-1</sup> de PHE por un consorcio bacteriano a las 28 h; sin embargo, el crecimiento celular mostró un estado de latencia de 3 a 5 h después de la inoculación. Por su parte, Seo *et al.* (2007) mencionan que *Burkholderia* sp. degradó 100% de PHE aplicado a una concentración de 40 mg L<sup>-1</sup>. Es importante resaltar que la degradación de HPA puede ser favorecida por la inoculación de consorcios bacterianos. Por ejemplo, Jing *et al.* (2007) estudiaron el potencial de un consorcio bacteriano constituido por *Sphingomonas cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylooxidans* y *Rhizobium* sp. y observaron que este consorcio degradó 99% de PHE, no obstante, al evaluar individualmente el potencial de degradación de cada bacteria, encontraron que *Rhizobium* sp no degradó PHE.

En las figuras 5.5B y 5.8 se observa que el BaP disminuyó en 28% después de 24 h en los tratamientos inoculados con *R. tropici* CIAT899, y esta disminución fue más grande y significativa al incrementarse los tiempos de incubación, 45% a las 120 h. Este comportamiento fue similar al reportado por Kaushish *et al.* (2009) quienes mencionan que la degradación de BaP (5.2%) por *Bacillus subtilis* BMT4 (MTCC9447) inició después de 24 h de la inoculación; no obstante la degradación se incrementó en un 48.3% y 84.6% a los 7 y 28 días, respectivamente. Sin embargo, la degradación de este HPA no aumentó en los tiempos de incubación correspondientes a 35 y 42 días.

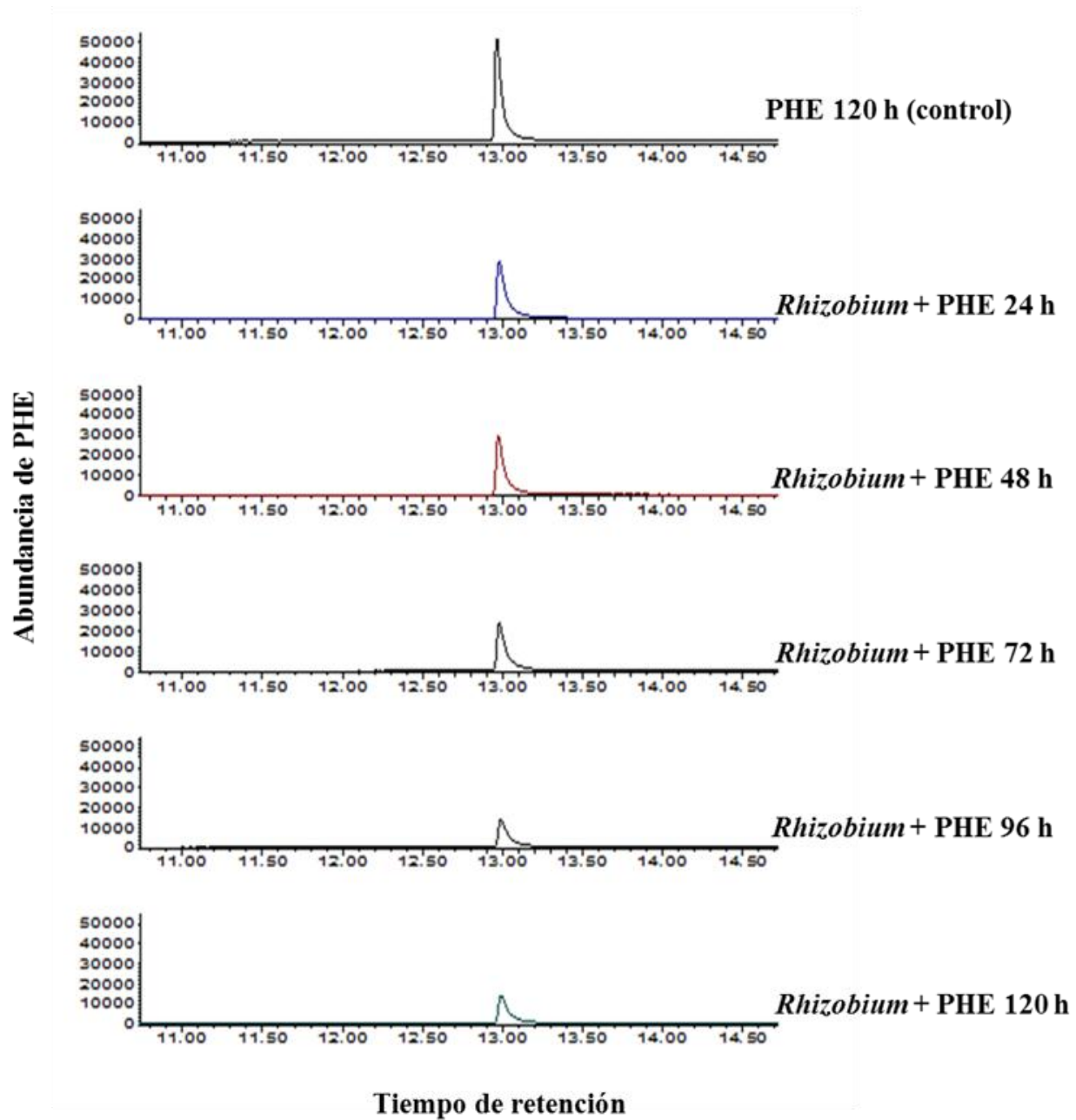


Figura 5.6. Picos cromatográficos obtenidos por GC-MS, que muestran la abundancia de fenantreno (PHE) en los medios inoculados con *Rhizobium tropici* CIAT899, en diferentes tiempos de crecimiento bacteriano.

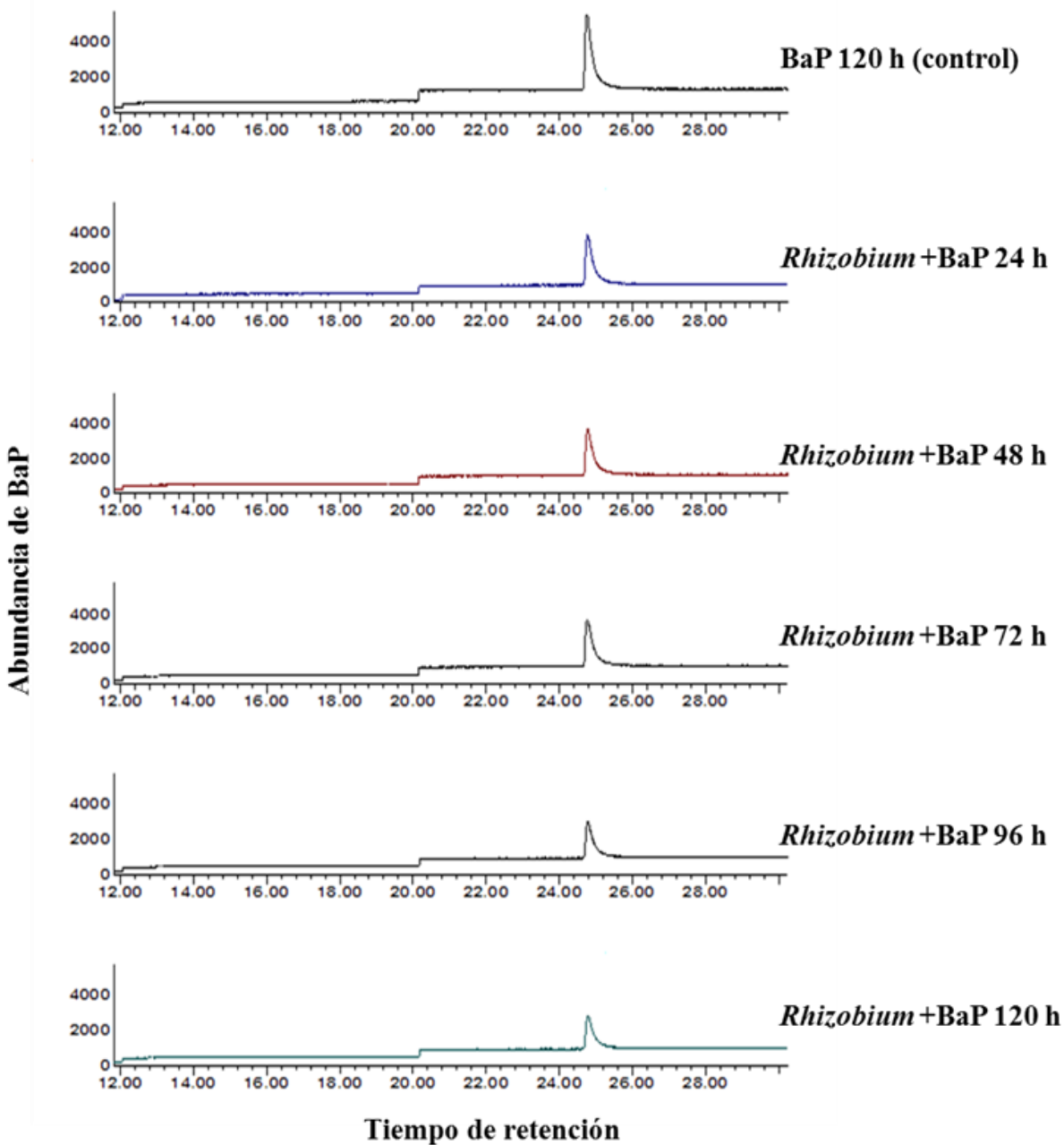


Figura 5.7. Picos cromatográficos obtenidos por GC-MS, que muestran la abundancia de benzo[a]pireno (BaP) en los medios inoculados con *Rhizobium tropici* CIAT899, en diferentes tiempos de crecimiento bacteriano.

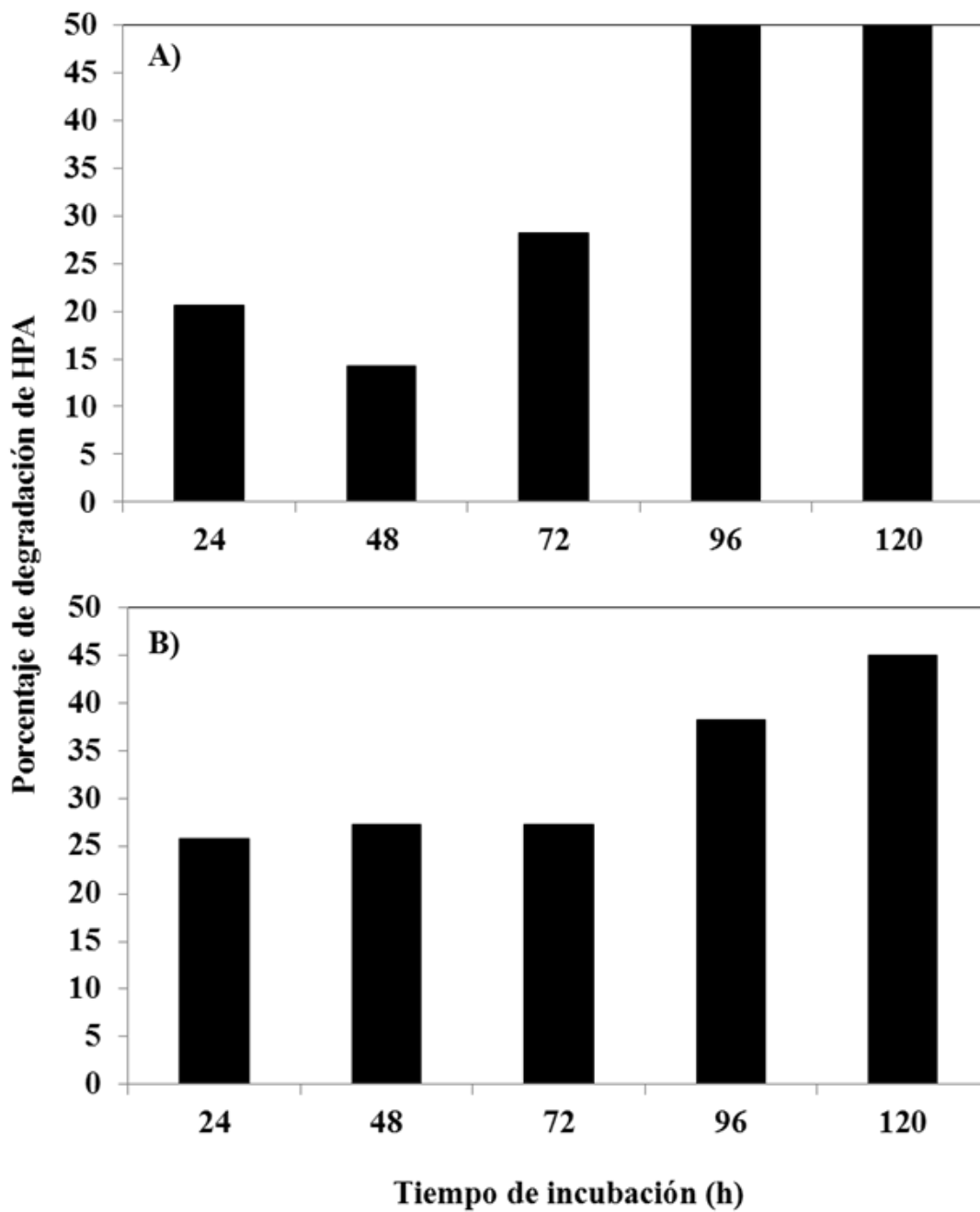


Figura 5.8. Porcentaje de degradación de A) fenantreno y B) benzo[a]pireno en medios inoculados con *Rhizobium tropici* CIAT899, en diferentes tiempos de crecimiento bacteriano.

## 5.6. Conclusiones

- PHE y BaP en concentraciones de 80 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  son muy tóxicos, ya que a las 24 h produjeron la inhibición total del crecimiento celular de *Rhizobium tropici* CIAT899.
- *Rhizobium tropici* CIAT899 tolera y crece ante 40  $\mu\text{g PHE mL}^{-1}$  y/o 60  $\mu\text{g BaP mL}^{-1}$ , observándose que a las 96 h, el crecimiento bacteriano no presentó diferencias significativas con respecto a los tratamientos sin contaminar.
- El PHE fue el hidrocarburo más tóxico para el crecimiento de *Rhizobium tropici* CIAT899, a pesar de ser menos recalcitrante que el BaP.
- La degradación de PHE y BaP por *Rhizobium tropici* CIAT899 fue estadísticamente significativa, siendo concordante con el crecimiento bacteriano en presencia de ambos contaminantes.
- *Rhizobium tropici* CIAT899 puede degradar 50% de PHE y 45% de BaP a las 120 h de inoculación, demostrándose su capacidad de degradación de HPA de bajo y alto peso molecular.
- Esta investigación es uno de los primeros estudios que reportan la degradación de BaP por una cepa del género *Rhizobium*.

## 5.7. Literatura citada

Atlas, R., and Bartha, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. (4ed). Editorial Prentice Hall España. 677.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2005. CERCLA Priority list of hazardous substances US Department of Health and Human Service, Atlanta, GA, USA.

<http://www.asdr.cdc.gov/cercla/05list.html>. Consultada en Enero, 2010.

- Bracho, M., Díaz, L., and Soto, M.L. 2005. Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado de Zulia, Venezuela. *Boletín del centro de Investigaciones Biológicas* 38:1-9.
- Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*. 3:351-368.
- Chauhan, A., Oakeshott, J.G., and Rakesh, K.J. 2008. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal Microbiology*. 48:95-113.
- Dutta, S.K., Hollowell, G.P., Hashem, F.M., and Kuykendall, L.D. 2003. Enhanced bioremediation of soil containing 2,4-dinitrotoluene by a genetically modified *Sinorhizobium meliloti*. *Soil Biology and Biochemistry*. 35: 667-675.
- Dhote, M., Juwarkar, A., Kumar, A., Kanade, G.S., and Chakrabarti, T. 2010. Biodegradation of chrysene by the bacterial strains isolated from oily sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26:329-335.
- Eom, I.C., Rast, C., Veber, A.M., and Vasseur, P. 2007. Ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67: 190-205.
- Ferrera-Cerrato, R., González-Chávez, C., y Rodríguez-Mendoza, M.N. 1993. Manual de Microbiología de Suelos. Pag. 127.
- Frassinetti, S., Setti, L., Corti, A., Farrinelli, P., Montevecchi, P and Vallini, G. 1998. Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal of Microbiology*. 44: 289-297.

- Harvey, C., Castro, P., Harmas, H., Lichtfouse, E., Schäffner, A., Smrcek, S. and Werck, D. 2002. Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environmental Science and Pollution*. 9: 29-47.
- Hunter, R.D., Ekunwe, S.I. Dodor, D.E., Hwang, H.M., and Ekunwe, L. 2005. *Bacillus subtilis* is a potential degrader of pyrene and benzo[a]pyrene. *International Journal of Environmental Health Research*. 2 : 267-71.
- Jing, W., Hongke, X., and Shaohui, G. 2007. Isolation and characteristics of a microbial consortium for effectively degrading phenanthrene. *Petroleum Science*. 4: 68-75.
- Johnsen, A.R., and Karlson, U. 2005. PAH degradation capacity of soil microbial communities. Does it depend on PAH exposure? *Microbial Ecology*. 50:488-495.
- Juhasz, A.L., and Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 45:57-88.
- Kaushish, L.M., Bahuguna, A., Dangwal, K., and Garg, V. 2009. Degradation of benzo[a]pyrene by novel strain *Bacillus subtilis* BMT41 (MTCC9447). *Brazilian Journal of Microbiology*. 40: 884-892.
- Kanaly, R.A., and Harayama, S. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*. 182:2059-2067.
- Kazunga, C., and Aitken, M.D. 2000. Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1917-1922.
- Keum, Y.S., Seo, J.S., Hu, Y., and Li, Q.X. 2006. Degradation pathways of phenantrene by *Sinorhizobium* sp. C4. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 935-941.



- Leneva, N.A., Kolomytseva, M.P., Baskunov, B.P., and Golovleva, L.A. 2009. Phenanthrene and anthracene degradation by microorganisms of genus *Rhodococcus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 45: 188-194.
- López-Martínez, S., Gallegos-Martínez, M., Pérez, F., y Gutiérrez, M. 2005. Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 21: 91-100.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Martins, M.F., Franco, A. A., Graham, P., and Pardo, M. 1991. *Rhizobium tropici* a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41: 417-426.
- Moreto, M., Silvestri, S., Ugo, P., Zorzi, G., Abbodanzi, F., Baiocchi, C., and Iacondini, A. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by composting in a soot-contaminated alkaline soil. *Journal of Hazardous Materials*. 26: 141-148.
- Oldroyd, G.E.D., and Downie, J.A. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*. 59:519-46.
- Peixoto, R.S., Vermelho, A.B., and Rosado, A.S. 2011. Petroleum-degrading enzymes: Bioremediation and new prospects. *Enzyme Research*. 2011: 1-7.
- Poonthrigpun, S., Pattaragulwanit, K., Paengthai, S., Kriangkripipat, T., Juntongjin, K., Thaniyavarn, S., Petsom, A., and Pinphanichakarn, P. 2006. Novel intermediates of acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. strain CU-A1: Evidence for naphthalene-1,8-dicarboxylic acid metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:6034-6039.

- Pothuluri, J.V., and Cerniglia, R.M. 1994. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. pp. 92-124. *In*. Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals. Chaundhry, G.R (Eds). Dioscorides Pres. Portland, OR. USA.
- Rentz, J.A., Alvarez, P.J.J., and Schnoor, J.L. 2005. Benzo[a]pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudates: Implications for phytoremediation. *Environmental Pollution*. 136: 477-484.
- Santos, E.C., Jacques, R.J.S., Bento, F.M., Peralba, R., Selbach, P.A., Sá, E.L.S., and Camargo, F.A.O. 2008. Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology*. 99: 2644-2649.
- SAS (Statistical Analysis System, Institute). 2002. User's Guide: Statistics, version 8.0. SAS. Institute. Inc. Cary. N.C.,USA.
- Seo, J.S., Keum, Y.S., Hu, Y., Lee, S.E., and Li, Q.X. 2007. Degradation of phenantrene by *Burkholderia* sp. C3: initial 1,2-and 3,4-dioxygenation and meta-and ortho-cleavage of naphthalene-1,2-diol. *Biodegradation*. 18: 123-131.
- Seo, J.S., Keum, Y.S., and Li, Q.X. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 6: 278-309.
- Siciliano, S.D., Germida, J.J., Banks, K., and Greer, C.W. 2003. Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Applied Environmental Microbiology*. 69:483-489.
- Teng, Y., Luo, Y., Ping, L., Zou, D., Li, Z., and Cristie, P. 2010. Effects of soil amendment with different carbon sources and other factors on the bioremediation of an aged PAH-contaminated soil. *Biodegradation*. 21: 167-178.

- Traczewska, T.M. 2000. Changes of toxicological properties of biodegradation products of anthracene and phenanthrene. *Water Science and Technology*. 41: 31-38.
- USEPA. 2004. Cleaning up the nation's wastes sites: Markets and technology trends office of soil waste and Emergency response. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. <http://www.epa.gov/download/market/2004market.pdf>. Consultada en Enero, 2010.
- Van Hamme, J., Singh A., and Ward, O. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67: 503-549.
- Vincent, J.M. 1970. Manual for the practical study of root-nodule bacterial. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 164.
- Wickle, W. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil- A review. *Journal of Plant Nutrition Soil Science*. 163:229-248.
- Xu-Xiang, Z., Shu-Pei, C., Cheng-Jun, Z., and Shi-Lei, S. 2006. Microbial PAH-degradation in soil: Degradation pathways and contributing factors. *Pedosphere*. 16: 555-565.
- Ye, B., Siddiqi, M.A., Maccubbin, A.E., Kumar, S., and Sikka, H.C. 1996. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environmental Science and Technology*. 30: 136-142.
- Yuan, S.Y., Wei, S.H., and Chang, B.V. 2000. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons a mixed culture. *Chemosphere*. 41:1463-1468.
- Zhong, Y., Zou, S., Lin, L., Luan, T. G., Qiu, R., and Tam, N.F.Y. 2010. Effects of pyrene and fluoranthene on the degradation characteristics of phenanthrene in the cometabolism process by *Sphingomonas* sp. strain PheB4 isolated from mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*. 60: 2043-2049.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES GENERALES

#### Fase I

- Las cepas de *Rhizobium tropici* CIAT899, *R. tropici* PRF81, *R. leucaena* CFN299 y *R. etli* CFN42 crecieron en vida libre y en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* L. en presencia de fenantreno y benzo[a]pireno, por lo que la hipótesis planteada para esta fase se acepta.
- El crecimiento en vida libre de las cuatro cepas de *Rhizobium* presentaron una fase de latencia como respuesta a su adaptación; sin embargo, después de 96 h presentaron crecimiento exponencial, indicando que estas cepas fueron tolerantes a ambos HPA en concentraciones de hasta 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- La simbiosis de las cuatro cepas de *Rhizobium* con *Phaseolus vulgaris* L. es inhibida ante PHE y BaP, al observarse que la formación de nódulos sólo se establece en concentraciones menores a 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de PHE o de BaP.

#### Fase II

- *Rhizobium tropici* CIAT899 tolera, crece y degrada PHE y BaP, por lo que se acepta la hipótesis planteada para esta fase experimental.
- *Rhizobium tropici* CIAT899 degrada 50% de PHE y 45% de BaP en un tiempo de incubación de 120 h; sin embargo, significativamente hablando, la degradación del BaP se observó a partir de las 24 h, y la degradación de PHE se observó hasta las 72 h.