

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS CAUSADOS POR  
LA INTRODUCCIÓN DE SISTEMAS DE  
RIZORREMEDIACIÓN EN LAS POBLACIONES  
BACTERIANAS NATIVAS DE UN SUELO  
CONTAMINADO POR PCBs**

**DANIEL AGUIRRE DE CÁRCER GARCÍA**  
**Gwangju, Corea del Sur, 2007**



**Memoria presentada para optar al Grado de  
Doctor en Ciencias**

Fdo. Daniel Aguirre de Cárcer García  
Licenciado en Ciencias Biológicas

El Director

Fdo. Rafael Rivilla Palma Profesor Titular Dpto. Biología Universidad Autónoma de Madrid
---



*A mis padres*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo agradecerle al Dr. Rafael Rivilla la confianza que depositó en mí al ofrecerme la posibilidad de realizar la tesis doctoral en su grupo de investigación. Asimismo, deseo expresarles mi más sincera gratitud a los Drs. Rafael Rivilla y Marta Martín por todas sus enseñanzas y el magnífico trato que en todo momento me han dispensado.

Querría agradecerle especialmente a Roke Iñaki Oruezabal el tiempo y esfuerzo que dedicó, durante mis primeros meses en el laboratorio, tanto a formarme como a favorecer mi integración en el que acabaría convirtiéndose en mi segundo hogar.

Mil gracias también al Dr. Redondo, ya que, en lo que al silicio se refiere, “*una hora de su ayuda valen por cien*”, y a la Dra. Capdevila, por ser un modelo de trabajo y eficiencia. Asimismo, desearía agradecer a Uli, Tom y Martina la enorme ayuda prestada en el desarrollo experimental.

Finalmente, gracias al resto de personas con las que he coincidido en la unidad, por los buenos momentos que he pasado y todo lo que he aprendido.

*"Querida Sra. Chown, ignore los intentos de su hijo de enseñarle física. La Física no es la cosa más importante. La cosa más importante es el amor"*. (Richard P. Feynman, 1918-1988).

Gracias Virginia.



*“¡¡¡Está desnudo; El Emperador está desnudo!!!”*

*(Eventyr Fortalte for Børn, Hans C. Andersen (1805-1875))*

*“Sólo sé que no sé nada”*

*(Atribuido a Sócrates (470adc-399adc))*

*“Hay que simplificar las cosas tanto como sea posible, pero no más”*

*(Albert Einstein (1879-1955))*



# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 BREVE INTRODUCCIÓN A LA ECOLOGÍA MICROBIANA MOLECULAR .....	1
1.2 EL SUELO Y LA RIZOSFERA COMO HÁBITAT MICROBIANO ...	6
1.3 BIORREMEDIACIÓN .....	8
1.3.1 Tipos de estrategias en biorremediación .....	8
1.3.2 Rizorremediación .....	10
1.3.3 ¿Por qué emplear microorganismos modificados genéticamente (MMGs) en biorremediación?.....	12
1.4 LIBERACIÓN AL MEDIO DE MICROORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (MMGs) .....	14
1.4.1 Requerimientos para la liberación al medio de MMGs en la Unión Europea .....	14
1.4.2 Persistencia en el medio de los MMGs .....	16
1.4.3 Diseminación de los MMGs desde su sitio de liberación .....	16
1.4.3.1 Dispersión horizontal.....	16
1.4.3.2 Dispersión vertical.....	17
1.4.4 Interacciones entre las bacterias liberadas y la microflora nativa ...	18
1.4.4.1 Efecto sobre la microflora nativa.....	19
1.4.4.2 Potencial de transferencia genética.....	19
1.5 LOS BIFENILOS POLICLORADOS .....	20
1.5.1 Introducción.....	20

1.5.2 Contaminación por PCBs.....	21
1.5.3 Efecto de los PCBs sobre la salud.....	21
1.6 METABOLISMO DE LOS BIFENILOS POLICLORADOS .....	23
1.6.1 Degradación aerobia de los PCBs.....	23
1.6.2 Subunidad ISP $\alpha$ del enzima bifenilo 2,3 dioxigenasa.....	25
1.7 <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> F113 Y SUS DERIVADOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE F113pcb Y F113L::1180.....	27
2. OBJETIVOS .....	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
3.1 MATERIALES.....	35
3.1.1 Bacterias .....	35
3.1.2 Material vegetal .....	35
3.1.3 Reactivos, Enzimas y Antibióticos .....	35
3.1.4. Hibridación y revelado.....	36
3.1.5. Suelo empleado .....	37
3.2 MÉTODOS .....	38
3.2.1 Cultivo de Microorganismos.....	38
3.2.2 Inoculación de cepas de <i>Pseudomonas</i> en las raíces de Sauce.....	38
3.2.3 Preparación de microcosmos y posterior incubación .....	38
3.2.4 Detección de PCBs en las muestras .....	39
3.2.5 Aislamiento de ADN total de las muestras .....	40
3.2.6 Amplificación de ADN por PCR .....	40
3.2.7 Re-amplificación de los genes 16S ARNr e ISP $\alpha$ para su análisis por TGGE (PCR anidada).....	42
3.2.8 Electroforesis en Geles de Agarosa.....	43

3.2.9 Purificación de Fragmentos de ADN de agarosa .....	43
3.2.10 Clonaje en plásmido.....	43
3.2.11 Transformación de células competentes.....	44
3.2.12 Extracción de ADN plasmídico.....	44
3.2.13 Electroforesis en gradiente térmico (TGGE) .....	44
3.2.14 Secuenciación.....	45
3.2.15 Generación de Perfiles fisiológicos .....	45
3.3 TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS .....	47
3.3.1 Análisis de los perfiles fisiológicos .....	47
3.3.2 Análisis de las genotecas derivadas de Suelo y Rizosfera .....	48
3.3.3 Análisis de los geles de TGGE .....	50
4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	53
4.1. Análisis de los cambios producidos por la introducción de plantas de <i>Salix vimminalis</i> en las poblaciones bacterianas y en la diversidad de tolueno/bifenilo dioxigenasas de un suelo contaminado por bifenilos policlorados .....	55
4.2. Análisis del impacto causado por la introducción de sistemas integrados planta-microorganismo modificado genéticamente en la poblaciones microbianas nativas .....	57
5. RESULTADOS y DISCUSIÓN .....	59
5.1 Análisis de los cambios producidos por la introducción de plantas de <i>salix vimminalis</i> en las poblaciones bacterianas y en la diversidad de tolueno/bifenilo dioxigenasas de un suelo contaminado por PCBs .....	61
5.1.1. Composición de las poblaciones de <i>Bacteria</i> en suelo y rizosfera.	61
5.1.2. Análisis de las genotecas de 16S ARNr específicas de grupo .....	62

5.1.2.1. <i>α-Proteobacteria</i> .....	64
5.1.2.2. <i>β-Proteobacteria</i> .....	64
5.1.2.3. <i>Acidobacteria</i> .....	65
5.1.2.4. <i>Actinobacteria</i> .....	65
5.1.2. Comparación estadística entre las genotecas derivadas de suelo y rizosfera .....	78
5.1.3. Análisis de los perfiles fisiológicos de las comunidades de suelo y rizosfera .....	78
5.1.4. Estudio de la diversidad de los genes ISP $\alpha$ de la familia tolueno/bifenilo dioxigenasas.....	79
5.1.5. Comparación de las genotecas de ISP $\alpha$ derivadas de suelo y rizosfera .....	84
5.1.6. Discusión .....	85
5.2 Análisis del impacto causado por la introducción de sistemas integrados planta-microorganismo modificado genéticamente (MMG) en la poblaciones microbianas nativas.....	92
5.2.1. Degradación de PCBs.....	92
5.2.2. Análisis de los cambios estructurales en la comunidad de <i>Bacteria</i> .....	92
5.2.3. Análisis de los cambios estructurales en poblaciones bacterianas específicas.....	99
5.2.4. Análisis de la función de la comunidad microbiana.....	101
5.2.5. Discusión .....	102
6. CONCLUSIONES .....	107
7. REFERENCIAS.....	111

# **1. INTRODUCCIÓN**



## **1.1 BREVE INTRODUCCIÓN A LA ECOLOGÍA MICROBIANA MOLECULAR**

Las especies bacterianas han evolucionado durante más de 3800 millones de años y ocupan virtualmente todos los nichos de la tierra. Las aproximadamente 5000 especies procariotas descritas no reflejan la diversidad de dicho dominio presente en el ambiente, ya que, empleando experimentos de reapareamiento de ADN (Torsvik *et al.*, 1990), se ha observado que puede haber hasta  $10^4$  genomas distintos en diferentes muestras de suelo. Por lo tanto, cualquier estimación sobre el número de especies procariotas existentes es mera suposición.

La comparación entre el porcentaje de bacterias cultivables en laboratorio y el recuento de células totales en diferentes hábitats naturales muestra enormes discrepancias (Amann *et al.*, 1995), fenómeno denominado “*La gran anomalía de conteo en placa*” (Staley & Konopka, 1985). Inicialmente se pensó que dicha discrepancia era debida principalmente a la presencia de gran cantidad de células pequeñas y probablemente inactivas que no podían ser cultivadas en el laboratorio (Bakken & Olsen, 1987). Sin embargo, los análisis de respiración de células individuales extraídas de suelo (Torsvik *et al.*, 1996), indican que virtualmente todas las bacterias presentes en el suelo son metabólicamente activas. En la actualidad, se asume que la incapacidad de cultivar la inmensa mayoría de los tipos bacterianos observados en la naturaleza es debida a un profundo desconocimiento de las condiciones reales bajo las cuales las bacterias crecen en su ambiente natural.

El conocimiento actual sobre la diversidad microbiana y su papel en la naturaleza es, pues, pobre. Esto es debido, principalmente, a que los métodos tradicionales de estudio, como la microscopía, el cultivo en medios específicos, o la caracterización bioquímica, sólo tienen un uso limitado en clasificación e

identificación; la clasificación basada en los caracteres morfológicos es dificultosa ya que los microorganismos suelen carecer de características externas representativas que permitan un agrupamiento fiable. Por otro lado, el hecho de que alrededor del 99% de todas las células bacterianas presentes en el suelo no sean actualmente cultivables en el laboratorio, da lugar a que la clasificación de los microorganismos en función de su fisiología o caracteres bioquímicos sea casi imposible. Además, las comunidades microbianas difieren tanto cualitativa como cuantitativamente en su composición; la proporción relativa de cada uno de los miembros de la comunidad está sujeta a variaciones debidas a causas externas (factores ambientales) o internas (competición interespecífica etc.), por lo que organismos que son abundantes y cultivables bajo ciertas condiciones ambientales pueden convertirse en formas aletargadas y posiblemente no cultivables bajo otras condiciones ambientales.

Con el fin de tener un mejor conocimiento de la diversidad microbiana y su papel en el funcionamiento de los ecosistemas, se hizo necesario el desarrollo de nuevas técnicas de análisis. Estas técnicas, basadas en los enormes avances realizados en la biología molecular (PCR, clonación, secuenciación etc.), e inicialmente ideadas con el propósito de servir de complemento, han llegado a relegar a las técnicas tradicionales a un segundo plano.

El progreso realizado en el uso de las tecnologías anteriormente citadas, junto con la utilización del ARNr y sus genes como marcadores filogenéticos fiables en el estudio de las relaciones evolutiva entre organismos, ha permitido estudiar la diversidad microbiana a nivel genético y agrupar a los organismos en función de la similitud entre sus genes, que también refleja su relación evolutiva (Woese, 1987). La aplicación de técnicas de biología molecular para detectar e identificar microorganismos o funciones mediante ciertos marcadores moleculares ha creado una nueva disciplina: la ecología microbiana molecular.

Inicialmente, se estudió el ARNr procedente de muestras ambientales mediante su análisis por hibridación en filtro (Stahl *et al.*, 1988) y mediante secuenciación directa (Pace *et al.*, 1986). Más tarde se llevaron a cabo experimentos de retrotranscripción específica del ARNr que posteriormente fue clonado y secuenciado, detectando así, en teoría, las especies más activas. En la actualidad, la técnica más empleada en los estudios de diversidad microbiana es la amplificación directa de los genes que codifican los ARNr de muestras ambientales, posterior clonaje y subsiguiente secuenciación de insertos elegidos al azar (Ward *et al.*, 1990).

Los nuevos métodos de análisis, muestran una asombrosa diversidad de especies no cultivables en casi todos los ambientes (Barns *et al.*, 1999). Debido a la capacidad de la técnica de PCR para amplificar pequeñas cantidades de ADN, microorganismos que aparecen en números bajos en el ambiente son ahora detectables. Además, el reducido volumen de muestra necesario para realizar este tipo de análisis permite el estudio de gran cantidad de microhabitats, como la rizosfera, imposibles de investigar adecuadamente mediante los métodos tradicionales.

A la hora de estudiar la diversidad microbiana contenida en una muestra, el proceder de muchos estudios realizados hasta la fecha ha sido elegir un marcador filogenético, comúnmente el gen 16S del ARNr, y analizar su diversidad. La presencia de un determinado gen 16S en una muestra puede, en algunos casos, ser relacionada directamente con una función realizada en el ecosistema. Sin embargo, la falta de conocimiento existente sobre la función real que desempeñan la mayoría de especies no cultivadas en sus habitats, ha hecho que este acercamiento tenga una aplicación limitada. Por otro lado, muchas funciones pueden ser adquiridas por las bacterias mediante transmisión horizontal de genes, por lo que las conclusiones sobre las relaciones taxón-función de estos estudios pueden no ser válidas en muchos casos.

Para estudiar las interacciones entre los microorganismos y su ambiente (objetivo de la ecología microbiana), el clonaje directo era demasiado costoso y lento, y los métodos de hibridación sólo permitían, en muchos casos, el estudio de grupos de microorganismos taxonómicamente amplios o bien demasiado específicos. Por tanto, para estudiar la dinámica de las comunidades microbianas complejas se hizo necesario el desarrollo de otros métodos. Entre estos nuevos métodos cabe destacar las técnicas de *fingerprinting* genético. Dichas técnicas proporcionan un patrón o perfil de la estructura genética de la comunidad y están basadas en la separación física de especies únicas de ácidos nucleicos obtenidos mediante amplificación directa de los ácidos nucleicos del ambiente. Entre las técnicas de *fingerprinting* genético más comúnmente utilizadas se encuentran las siguientes:

-SSCP (single strand chain polymorphism) (Orita et al., 1989).

-ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis) y RFLP (Restriction Fragment length polymorphism) (Weidner et al., 1996).

-TGGE y DGGE (Temperature o Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer, 1999).

Estas técnicas se pueden emplear tanto en la comparación entre comunidades microbianas como en su monitorización temporal (Borneman & Triplett, 1997).

Recientemente, los ecólogos microbianos han tomado conciencia de que los profesionales de la biología evolutiva y la ecología han ido desarrollando toda una gama de teorías y herramientas matemáticas, para analizar y caracterizar poblaciones o ecosistemas, que pueden ser aplicadas a los datos producidos por las técnicas de ecología microbiana molecular. Esta sinergia ha permitido otro gran salto cualitativo en la ecología microbiana.

Otra estrategia en franca expansión, denominada metagenómica, se basa en el aislamiento del ADN total de una muestra y su posterior archivo (mediante clonaje) en forma de fago, cosmido, fosmido, cromosoma bacteriano artificial, etc. Este acercamiento permite el análisis genético directo del ecosistema estudiado, y posee diversas ventajas respecto a los métodos anteriormente citados. La más importante de estas ventajas es que permite, en teoría, el estudio de las relaciones estructura-función del ecosistema. Sin embargo, no es posible en todos los casos predecir una función en base a una secuencia, dado que entre el 30% y 40% de los ORFs conocidos no están adscritos a ninguna función (DeLong, 2004). No obstante, estas librerías metagenómicas mantienen la ventaja de permitir el análisis de un gen (enzima) desconocido mediante estudios de expresión.

El análisis de los ARNr ambientales facilitó la identificación de los microorganismos presentes en una muestra y la detección de ARNm proporcionó el análisis de la expresión de genes funcionales clave en el medio, dando lugar al nacimiento de la ecología microbiana molecular. Los avances técnicos más recientes como la metagenómica, utilización de *microarrays* (empleados en la detección y cuantificación simultánea de grandes cantidades de fragmentos de ARNr y ARNm), empleo de sustratos marcados con isótopos estables (*Stable Isotopic Probing* o SIP) e incluso la secuenciación directa de metagenomas (*Shotgun Sequencing*, (Venter *et al.*, 2004)), han comenzado a proporcionar una visión más clara del funcionamiento de los ecosistemas microbianos. El enorme potencial de estos avances augura una explosión del empleo de la ecología microbiana molecular en una infinidad de ámbitos tanto científicos como industriales.

## **1.2 EL SUELO Y LA RIZOSFERA COMO HÁBITAT MICROBIANO**

El suelo está compuesto de partículas minerales (de diferentes tamaños, formas y características químicas), junto con la microflora y material orgánico en varias fases de descomposición. La matriz del suelo, a su vez, se caracteriza estructuralmente por la formación de complejos arcillas-materia orgánica y la estabilización de arcillas, arenas y limos mediante la formación de agregados. Dichas partículas varían en tamaño desde los grandes agregados (2 mm approx.) a las partículas coloidales (Daniel, 2005).

La microflora edáfica se encuentra frecuentemente adherida o absorbida a las partículas de suelo y está constituida principalmente por bacterias, hongos, oomicetos y algas. Esta microflora suele estar formada por, aproximadamente,  $10^4$ - $10^6$  hongos y  $10^7$ - $10^9$  bacterias (de  $10^3$ - $10^4$  especies) por gramo de suelo. Además, su estructura y actividad dependen de las propiedades fisicoquímicas del suelo así como del ambiente local, características que varían en el tiempo y el espacio (Amarger, 2002).

Esta microflora representa entre 5-50 toneladas de materia viva por hectárea (Amarger, 2002) y juega un papel fundamental en la evolución de los numerosos compuestos orgánicos o minerales presentes en el suelo (sean endógenos o exógenos), de los cuales depende no solo la nutrición y la salud de las plantas, sino también la calidad de las aguas subterráneas y la composición de la atmósfera.

El suelo es probablemente el medio que más exigencias técnicas presenta a los microbiólogos. Esto es debido no solo al tamaño de su comunidad microbiana y a la enorme diversidad de especies presente, sino también a la naturaleza multifásica del medio (que incluye gases, agua y materiales sólidos) y a las

cambiantes características químicas y biológicas del medio. Todos estos factores provocan una extrema heterogeneidad espacial y temporal en la microbiología del suelo.

El término “rizosfera” define el compartimiento edáfico directamente bajo la influencia de las raíces (Kent & Triplett, 2002). En este nicho, existen complejas comunidades microbianas que son mantenidas por los nutrientes exudados por la raíz (principalmente azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos), mucílagos y células radiculares en descomposición (Curl & Truelove, 1986). De esta forma, la rizosfera induce un cambio característico en la distribución y actividad de los microorganismos asociados a las raíces en comparación con los de suelo, denominado efecto rizosférico.

La composición de las poblaciones rizosféricas depende de la composición del exudado radicular, así como de la especie vegetal, tipo de raíz, edad de la planta, tipo de suelo e historial del suelo (Anderson *et al.*, 1993). Sin embargo, por regla general se suele observar una dominancia de bacilos gram negativos (como por ejemplo cepas del género *Pseudomonas*).

El “efecto rizosférico” fue descrito por primera vez por Lorenz Hiltner (Hiltner, 1908), que observó un efecto “estimulante” de las raíces sobre las poblaciones microbianas del suelo. A su vez, los microorganismos rizosféricos tienen un enorme impacto sobre las plantas, habiéndose aislado una enorme variedad de microorganismos que poseen efectos estimulantes o inhibitorios sobre la salud de las mismas (Campbell, 1990). De hecho, la utilización de inóculos bacterianos promotores del crecimiento vegetal o su empleo en el biocontrol de enfermedades vegetales se ha convertido, no solo en un enorme campo de estudio, sino, en muchos casos, en una realidad en franca expansión.

### **1.3 BIORREMEDIACIÓN**

La existencia de suelos altamente contaminados es un grave riesgo medioambiental y sanitario para la gran mayoría de países industrializados. Los costes estimados para su descontaminación mediante técnicas convencionales, tales como la incineración o el enterramiento en vertederos especiales, son enormes (Rosenberg, 1993). Además, las técnicas convencionales no siempre bastan para obtener una descontaminación suficiente (Dixon, 1996). Por otro lado, la incineración puede dar lugar a la contaminación del aire, los escapes de los vertederos (líquidos o gaseosos) pueden alcanzar las aguas subterráneas y los pozos de agua potable, mientras que la excavación de los sitios contaminados puede dar lugar a la generación de emisiones tóxicas (Kuiper *et al.*, 2004). Por tanto, se ha hecho necesaria la búsqueda de métodos alternativos para restaurar los sitios contaminados de una forma menos cara, más segura y que no dañe el medio ambiente.

Una de las alternativas propuestas es la biorremediación, definida como la acción de microorganismos u otros sistemas biológicos para degradar contaminantes ambientales (Dua *et al.*, 2002). La biorremediación puede ser llevada a cabo *in situ* sin perturbar gravemente el medio. Además, la degradación bacteriana puede resultar en la completa mineralización del contaminante (Heitzer & Sayler, 1993).

#### **1.3.1 Tipos de estrategias en biorremediación**

Generalmente, cuando un lugar es contaminado, la composición de las poblaciones microbianas nativas se adapta a la nueva situación; las bacterias capaces de utilizar los sustratos contaminantes como nutrientes serán capaces de proliferar, lo que se traducirá en la eventual degradación del contaminante. Este

proceso natural de degradación de contaminantes por parte de la microflora nativa se llama **atenuación natural** o **biorremediación intrínseca**, y es, en realidad, una combinación de degradación microbiana, dispersión, dilución, sorción, volatilización y estabilización de los contaminantes.

Otra estrategia se basa en mejorar la tasa de degradación de contaminantes *in situ* mediante la introducción de microbios específicos capaces de degradar el compuesto de interés. A éste método se lo denomina **Bioaumentación**. Esta estrategia, a pesar de parecer efectiva *a priori*, suele toparse con varios factores que amenazan su eficacia (Kuiper *et al.*, 2004):

**A)** La concentración (o la biodisponibilidad) del contaminante puede ser demasiado baja para mantener el crecimiento del inóculo.

**B)** La presencia de ciertos compuestos en el ambiente puede inhibir el crecimiento o la actividad del inóculo.

**C)** La tasa de predación por parte de protozoos presentes en el medio puede ser mayor que la de crecimiento del inóculo, lo que resultaría en un rápido declive de su población.

**D)** El inóculo puede emplear preferentemente otras fuentes de carbono presentes en el medio, por lo que el contaminante no sería degradado.

**E)** El inóculo puede no ser capaz de esparcirse y alcanzar el contaminante.

Por otro lado, la introducción de bacterias capaces de remediar *in situ* en un ambiente competitivo (no estéril) requiere que el microorganismo sea capaz de sobrevivir en grandes cantidades y que exprese el fenotipo catabólico deseado. Sin embargo, se suele observar un declive general de estas bacterias en dichos ambientes (Barriault & Sylvestre, 1993; Kuiper *et al.*, 2004), por lo que para efectuar una degradación real del contaminante, las cepas empleadas deben ser a menudo reintroducidas para poder competir con la microflora indígena o, de forma alternativa, se puede ejercer una selección positiva para mantener la cepa introducida (Barriault & Sylvestre, 1993; Lajoie *et al.*, 1993).

Existen, además, otros factores ambientales que tienen una importancia capital en el éxito de las estrategias biorremediativas en general; por ejemplo, la tensión de oxígeno, el pH, la temperatura, la humedad, la presencia de aceptores de electrones adecuados en el medio, etc. (Leahy & Colwell, 1990). Algunas de estas trabas ambientales pueden ser parcialmente paliadas mediante la adición de nutrientes (**Bioestimulación**), regulación del pH, aireación mecánica, etc. Sin embargo, en muchos casos, la necesidad de atenuar algunos de las trabas ambientales anteriormente citadas puede llegar a hacer del uso del Bioaumentación una estrategia económicamente poco factible que, además, puede alterar fuertemente el ecosistema (Kuiper *et al.*, 2004).

Otro acercamiento frecuentemente estudiado, denominado **Fitorremediación**, se basa en la utilización de plantas para extraer, secuestrar o detoxificar enzimáticamente contaminantes presentes en suelos. La Fitorremediación, a pesar de ser una estrategia atractiva (sobre todo en la descontaminación de suelos contaminados por metales pesados), suele presentar una serie de limitaciones (Khan *et al.*, 2000). Entre ellas cabe destacar el largo periodo de tiempo necesario en ocasiones para obtener efectos aceptables y el problema de concentrar compuestos nocivos en un eslabón importante de la cadena alimenticia.

### 1.3.2 Rizorremediación

Durante los últimos años se ha venido observando que una parte muy importante de la degradación de contaminantes en suelos es resultado de la acción de bacterias presentes en la rizosfera de las plantas que surgen como vegetación natural en los sitios contaminados o que han sido introducidas para Fitorremediación (Kuiper *et al.*, 2004). Además, el empleo de plantas en la biorremediación intrínseca tiene la ventaja de causar un incremento en las

poblaciones microbianas y en la actividad metabólica microbiana en la rizosfera, debido al anteriormente citado efecto rizosférico. Asimismo, el empleo de plantas frecuentemente mejora las propiedades fisicoquímicas del suelo contaminado, así como la aireación, y produce un incremento en el contacto entre bacterias y contaminantes. Estos hechos han producido que se haya propuesto una nueva estrategia en la remediación de suelos contaminados, denominada **Rizorremediación** (Yee *et al.*, 1998), en la cual la planta proporciona nutrientes, aireación, soporte y una mayor biodisponibilidad del sustrato y la bacteria proporciona la remediación enzimática.

La Rizorremediación presenta, *a priori*, diversas ventajas:

**A)** Las raíces proporcionan una gran superficie capaz de mantener una población significativa de bacterias.

**B)** Las raíces sirven de vehículo para la inoculación y dispersión vertical de las bacterias.

**C)** El agua fluye a través de la comunidad rizosférica hacia las raíces incrementando enormemente la biodisponibilidad de los contaminantes.

**D)** Las raíces proporcionan nutrientes por lo que no es necesario añadir fuentes de carbono exógenas.

**E)** El metabolismo básico de las bacterias capaces de colonizar la rizosfera no depende de la degradación del compuesto objetivo, sino del consumo de exudados radiculares. Esto hace que el balance termodinámico entre la degradación del contaminante y la carga fisiológica (impuesta por el mantenimiento de una ruta enzimática prescindible) sea menos desfavorable, ya que la producción de biomasa esta desacoplada de la eliminación del contaminante (Brazil *et al.*, 1995).

**F)** Una vez un área ha sido eficazmente remediada, la recolección de las plantas debería eliminar el nicho para las bacterias introducidas.

Debido a estas ventajas, la rizorremediación parece ser un método de descontaminación *in situ* efectivo, estéticamente agradable, de bajo precio y que requiere un mantenimiento mínimo.

Uno de los problemas relacionados frecuentemente con esta estrategia es que las cepas biodegradadoras más comunes no suelen ser buenos colonizadores de la rizosfera, condición fundamental en las aplicaciones biotecnológicas de sistemas planta/bacteria (Chin-A-Woeng *et al.*, 2000; Lugtenberg *et al.*, 2001). El hecho de que sean necesarios múltiples y parcialmente desconocidos caracteres bacterianos para una eficiente colonización de la rizosfera (Lugtenberg *et al.*, 2001) hace impráctico mejorar la habilidad colonizadora de cepas con buena capacidad biodegradadora, por lo que resulta más sencillo introducir genes de biodegradación en bacterias capaces de colonizar eficientemente la rizosfera. Dado que una aplicación exitosa de los sistemas planta-microorganismo para biorremediación depende de un alto grado de establecimiento en la rizosfera de la bacteria introducida, se suelen emplear especies de los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas* que cuentan con excelentes colonizadores de rizosfera entre sus filas (Lugtenberg *et al.*, 2001). Esta estrategia ha sido ya empleada en la biorremediación de metales pesados (Wu *et al.*, 2006), de tolueno (Barac *et al.*, 2004), entre otros.

### **1.3.3 ¿Por qué emplear microorganismos modificados genéticamente (MMGs) en biorremediación?**

Como se ha mencionado al inicio de este capítulo, en principio cualquier contaminación química ambiental es eventualmente remediada mediante biorremediación intrínseca (si bien el lapso de tiempo requerido puede ser largo). Sin embargo, dicho proceso suele verse limitado en la práctica por una serie de bloqueos. Entre dichos bloqueos cabe destacar (Cases & de Lorenzo, 2005):

**A)** La falta de inducción de los operones catabólicos correctos debida a la baja concentración de los sustratos o a un fallo en su identificación como efectores reguladores.

**B)** La falta de reconocimiento de los contaminantes como sustratos para los enzimas catabólicos presentes en las bacterias.

**C)** El estrés causado a las bacterias por los mismos contaminantes o por las condiciones ambientales.

**D)** El caos metabólico causado por la generación de compuestos tóxicos o recalcitrantes producidos por la posible coexistencia de múltiples contaminantes y por la presencia de bacterias con distintas rutas metabólicas.

**E)** El posible balance termodinámico negativo de los procesos degradativos enmarcado en las condiciones fisicoquímicas ambientales, como el potencial redox y la disponibilidad de un aceptor de electrones adecuado.

Por otro lado, la degradación de los contaminantes mediante una única reacción enzimática es muy inusual, ya que normalmente se requiere una secuencia de transformaciones biológicas para eliminar un contaminante en particular, tarea que puede ser llevada a cabo por varias estirpes bacterianas conjuntamente. Si la tasa de generación de uno de los compuestos intermedios es mayor que su tasa de degradación, dicho compuesto se acumulará. Además, en el caso de que el compuesto acumulado sea más peligroso que el contaminante original, el riesgo medioambiental puede aumentar (Drobnik, 1999)

A la hora de solventar los problemas anteriormente citados, la ingeniería genética ofrece la posibilidad de construir cepas modificadas que posean enzimas con nuevas características, sistemas de expresión génica más adecuados o nuevas rutas degradativas, por lo que es generalmente aceptado que la biodegradación de los contaminantes recalcitrantes se consigue mejor mediante el empleo de organismos modificados genéticamente (Timmis & Pieper, 1999; de Lorenzo, 2001).

## **1.4 LIBERACIÓN AL MEDIO DE MICROORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (MMGs)**

Como se ha mencionado anteriormente, el empleo de MMGs en el tratamiento de suelos contaminados puede tener una importancia capital en el éxito de de las estrategias biorremediativas. Sin embargo, la liberación al medio de MMGs plantea una serie de interrogantes acerca de su ecología y el posible impacto sobre el medio que dicha actuación pueda ocasionar. A continuación, se presenta una breve descripción de la regulación actual en la Unión Europea (UE) respecto a la liberación al medio de MMGs.

### **1.4.1 Requerimientos para la liberación al medio de MMGs en la Unión Europea**

Dentro de la UE, la liberación al medio de cualquier MMG (tanto con fines científicos como comerciales) está regulada por la directiva 2001/18/EC. Dicha directiva resalta la importancia de realizar ensayos de campo durante las fases de investigación y desarrollo anteriores a su explotación comercial.

Bajo esta directiva, la aceptación para la liberación de un inoculante modificado genéticamente (MG) requiere de la presentación de un dossier científico respecto al MMG y una evaluación del riesgo ambiental, que detalle las características del MMG que puedan suponer una amenaza para la salud humana o el medio ambiente (la Tabla I presenta un sumario de dichos requerimientos). Posteriormente, se pide una evaluación de la probabilidad de que la amenaza se materialice; ésta es una tarea muy complicada y debería estar basada en la experiencia con situaciones similares, datos de la literatura, experimentos con modelos o formulada como una opinión cualificada (Drobnik, 1999).

El énfasis de esta directiva está en el potencial de persistencia y diseminación del MMG, el impacto del MMG en organismos no objetivo (incluyendo el impacto en la diversidad) y el potencial de transferencia del material genético insertado a organismos nativos. Además, la aprobación para la liberación en campo dependerá de los resultados de estudios previos conducidos en ambientes naturales simulados (denominados microcosmos) (Morrissey *et al.*, 2002).

**Tabla I.** Sumario de los requerimientos para la liberación de inoculantes MG con fines científicos bajo la directiva EU 2001/18/EC

<b>Información requerida en la notificación</b>	<b>Información requerida como parte de la evaluación de riesgo ambiental</b>
Información relacionada con el MMG: características del donante y del receptor, organismo parental, vector y organismo modificado.	Identificación de las características del MMG que puedan causar efectos adversos.
Información relacionada con las condiciones de la liberación y del medio receptor.	Evaluación de la probabilidad de la ocurrencia de cada uno de los efectos adversos potenciales identificados.
Información respecto a las interacciones entre el MMG y el medio; supervivencia, diseminación, potencial de transferencia genética y efecto en organismos no objetivo.	Evaluación de la magnitud de las consecuencias potenciales y del riesgo supuesto por cada efecto adverso.
Información sobre la monitorización y planes de respuesta de emergencia.	Aplicación de estrategias de gestión de riesgos.

Sólo existe un número limitado de estudios de liberación en campo de inoculantes modificados genéticamente, y la mayoría de ellos fue llevado a cabo con cepas que poseían sólo genes marcadores, por lo que, en general, hay una carestía de datos sobre el comportamiento en el medio de cepas MG funcionales.

Seguidamente, se presenta un resumen de los resultados de dichos estudios respecto a la ecología y posible impacto en el medio de los MMGs liberados al medio.

### **1.4.2 Persistencia en el medio de los MMGs**

La monitorización de bacterias inoculadas en ambientes no estériles requiere de su diferenciación respecto a las bacterias indígenas que puedan ser genética o fenotípicamente muy similares. Dicha diferenciación suele llevarse a cabo mediante la introducción en las bacterias inoculadas de genes marcadores, que normalmente son poco comunes en las poblaciones de suelo. Ésta estrategia ha facilitado la monitorización de las bacterias liberadas, especialmente si los genes marcadores son introducidos en derivados que, además, son resistentes a algún antibiótico.

Los resultados obtenidos con rizobios y *Pseudomonas*, sugieren que los niveles de persistencia de los inoculantes en distintos suelos varían enormemente (al igual que para las poblaciones nativas) en función de las condiciones ambientales locales. El nivel superior que han alcanzado a largo plazo (mínimo un año) las bacterias introducidas es de  $10^5$ - $10^6$  UFC/g (UFC, Unidad Formadora de Colonia) de suelo para los rizobios y  $10^2$  UFC/g para *Pseudomonas*. Por tanto, la persistencia de cepas de *Pseudomonas* en el suelo parece estar muy limitada, por lo menos en su forma cultivable, ya que hay que tener en cuenta que los conteos celulares directos, basados en inmunofluorescencia, habitualmente exceden los conteos de placa entre uno y tres ordenes de magnitud (Amarger, 2002).

### **1.4.3 Diseminación de los MMGs desde su sitio de liberación**

#### **1.4.3.1 Dispersión horizontal**

El movimiento horizontal de los inóculos en el campo parece muy limitado. En varios experimentos realizados con cepas de *Pseudomonas* marcadas y liberadas en el momento de sembrar trigo, éstas bacterias se detectaron hasta a 30 cm de su sitio de inoculación, aunque solo de forma irregular y en números bajos, a lo largo del periodo de crecimiento del trigo (Cook *et al.*, 1990; Drahos *et al.*, 1992).

En otros estudios, la dispersión horizontal de rizobios marcados desde su sitio de aplicación (en este caso guisantes), fue similar a la de *Pseudomonas* (Amarger & Delgutte, 1990; Hirsch & Spokes, 1994). Sin embargo, después de la cosecha, la dispersión lateral de los rizobios fuera de las áreas inoculadas se hizo cada vez más difícil de evaluar, aunque pareció ir en paralelo a los movimientos del suelo resultantes del arado y otras prácticas agrícolas.

#### **1.4.3.2 Dispersión vertical**

Los datos sobre el movimiento vertical de las bacterias después de su introducción en el medio han sido adquiridos tanto de liberaciones en campo controladas, como de liberaciones en lisímetros de gran tamaño situados al aire libre (ambientes naturales simulados que permiten tanto la monitorización del contenido de los efluentes como el empleo de distintos tratamientos).

En los ensayos de campo, la migración vertical pareció estar restringida a la zona que contenía las raíces de las plantas inoculadas. Esto correspondió a un máximo de 80 cm bajo la superficie para cepas de *Rhizobium* liberadas con guisante (Amarger & Delgutte, 1990; Hirsch & Spokes, 1994) o de 40 cm en los casos de cepas de *Rhizobium* inoculadas con soja o alfalfa, y cepas de *Pseudomonas* y *Rhizobium* inoculadas con trigo (Amarger & Delgutte, 1990; Deleij *et al.*, 1995).

En otro experimento, se observó como una cepa de *P. fluorescens* pudo ser transportada rápidamente y en grandes cantidades a profundidades de 150 cm

cuando se simularon fuertes lluvias inmediatamente después de su liberación, lo que sugiere que las bacterias se transportaron a capas de suelo profundas a través de macroporos del suelo (Natsch *et al.*, 1996). Troxler y colaboradores (Troxler *et al.*, 1998) confirmaron posteriormente que fuertes precipitaciones podían producir un transporte bacteriano profundo a través de canales de flujo preferenciales en el suelo. Por otro lado, Ripp y colaboradores (Ripp *et al.*, 2001) demostraron, mediante experimentos que empleaban lisímetros de 4 m de profundidad, que las fluctuaciones en el nivel freático también pueden inducir el transporte vertical de las bacterias.

Basándose en los citados estudios, parece que la diseminación de las bacterias liberadas en el suelo está limitada bajo condiciones normales. Sin embargo, los flujos de agua causados por fuertes lluvias o cambios en el nivel freático pueden resultar en un transporte vertical significativo de las bacterias liberadas a capas de suelo más profundas, mientras que el transporte horizontal de las bacterias inoculadas resultaría principalmente debido a prácticas agrícolas.

### **1.4.4 Interacciones entre las bacterias liberadas y la microflora nativa**

Aunque la práctica, cada vez más habitual en agricultura, de introducir bacterias no modificadas en el ambiente no ha suscitado nunca ninguna controversia, sigue existiendo preocupación sobre el efecto que la liberación de grandes cantidades de MMGs pueda tener sobre la microflora nativa y su función ecológica. En respuesta a esta preocupación, se llevaron a cabo varias liberaciones de MMGs en campo con el fin de poder obtener datos con los que aproximarse a las siguientes cuestiones: ¿Que efecto tienen estas liberaciones sobre la composición y actividad de la microflora nativa? y, en el caso de que exista tal efecto, ¿Es acaso diferente del provocado por la introducción de las mismas especies sin modificar genéticamente?. Por otro lado, ¿Existe un intercambio de material genético entre los

MMGs inoculados y las especies nativas? (Deleij *et al.*, 1995; Natsch *et al.*, 1997; Glandorf *et al.*, 2001; Leeftang *et al.*, 2002).

#### **1.4.4.1 Efecto sobre la microflora nativa**

De los citados estudios se desprende que la introducción de grandes cantidades de bacterias modificadas genéticamente en el campo, sean mejoradas en alguna función o no, causó esencialmente los mismos efectos en la microflora nativa que la inoculación con las cepas silvestres. Dichos efectos fueron observados como posibles cambios transitorios en las poblaciones rizosféricas. Sin embargo, estos cambios en la composición de las comunidades microbianas de la rizosfera fueron aparentemente mucho menos importantes que las diferencias inducidas por el crecimiento de la planta o las diferencias observadas en las rizosferas de plantas diferentes.

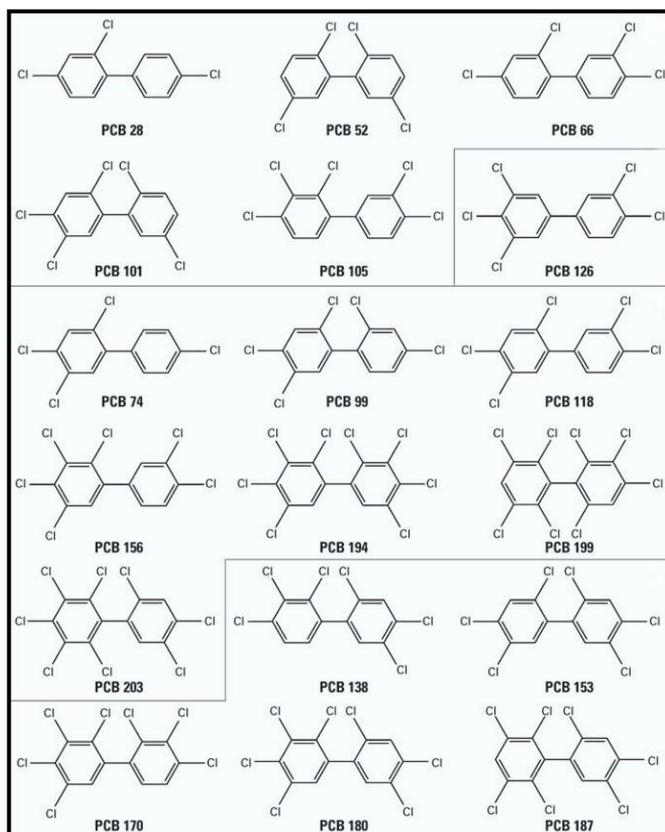
#### **1.4.4.2 Potencial de transferencia genética**

Existen evidencias bien fundadas de transferencias genéticas entre bacterias de suelo, obtenidas tanto indirectamente, de estudios poblacionales, como directamente, de experimentos con microcosmos o en estudios de campo bajo presión selectiva (Droge *et al.*, 1999). Se piensa que la transferencia de plásmidos es el principal medio de transmisión de información genética entre las bacterias de suelo. Liberaciones en campo de cepas especialmente diseñadas para evaluar la transferencia de plásmidos bajo condiciones naturales (Drahos *et al.*, 1986; Hirsch & Spokes, 1994; Lilley & Bailey, 1997), han proporcionado evidencias que indican que bajo ciertas circunstancias y entre determinadas bacterias se da dicha transferencia. Sin embargo, teniendo en cuenta los datos obtenidos, los cambios inducidos en las poblaciones fueron transitorios, por lo menos en ausencia de una presión selectiva para la característica (o rasgo) transferida.

## 1.5 LOS BIFENILOS POLICLORADOS

### 1.5.1 Introducción

Los bifenilos policlorados (PCBs) están formados por un esqueleto de bifenilo que porta entre uno y diez átomos de cloro (ver Figura 1). A partir de esta estructura se pueden formar hasta 209 combinaciones (congéneres) distintas. Sin embargo, las mezclas comerciales comúnmente producidas, tales como Aroclor, Kaneclor, Clophen o Delor, normalmente contenían entre 20 y 60 congéneres, principalmente tri a hexaclorados.



**Figura 1.** Estructura química de varios PCBs.

Debido a su altísima estabilidad térmica y química, resistencia al fuego y a la oxidación, baja presión de vapor, superhidrofobicidad y excelentes propiedades dieléctricas, los PCBs han sido ampliamente utilizados en multitud de aplicaciones; como retardadores de fuego, fluidos dieléctricos, intercambiadores de calor, fluidos hidráulicos, etc.

### **1.5.2 Contaminación por PCBs**

Los PCBs empezaron a producirse en la década de 1930 en cantidades que rondaban las 1000 toneladas anuales, pero a medida que se les fueron encontrando más usos, su producción se elevó exponencialmente hasta unas 200000 toneladas anuales en 1975 (Abraham *et al.*, 2002). Sin embargo, al observarse que las mismas propiedades que los hacían valiosos los convertían en contaminantes persistentes y tóxicos que se bioacumulan en la cadena alimenticia, se produjo la prohibición de su producción a mediados de la década de 1980.

En total se produjeron aproximadamente 1,5 millones de toneladas de PCBs a escala mundial y una fracción substancial de dicha cantidad ha entrado o finalmente entrará en el medio ambiente. Los PCBs se encuentran actualmente distribuidos globalmente, pudiéndose encontrar en todos los componentes de la biosfera. Incluso en áreas remotas como la Antártida o el Ártico canadiense, no se ha observado evidencia de que la carga de PCBs haya disminuido, por lo que se estima que su vida media (al menos en el Ártico) sea por lo menos de décadas (MacDonald *et al.*, 2000).

### **1.5.3 Efecto de los PCBs sobre la salud**

Unos pocos congéneres estéricamente similares a 2,3,7,8 tetraclorobenzo-p-dioxina son directamente tóxicos (cancerígenos). Otros congéneres, al igual que los que son directamente tóxicos, son indirectamente tóxicos por estimular, al

menos en el ser humano, la producción de sistemas enzimáticos bioactivadores, siendo el que más consecuencias nocivas tiene la inducción de las oxidasas metabolizantes de hidrocarburos arilados de función mixta dependientes de Citocromo P-450. Dicha inducción tiene como resultado la bioactivación de compuestos exógenos que de otra forma no serían tóxicos (como los hidrocarburos aromáticos policíclicos) transformándolos en compuestos carcinógenos, mutagénicos o teratogénicos. Además, la inducción por parte de los PCBs de ciertos sistemas enzimáticos, influye en la capacidad del organismo de eliminar compuestos orgánicos exógenos o desechos endógenos (McFarland & Clarke, 1989). Por otro lado, ciertos PCBs pueden actuar como estrógenos ambientales (disruptores endocrinos), que se sospecha son una de las causas de la baja fertilidad patente en las naciones industrializadas.

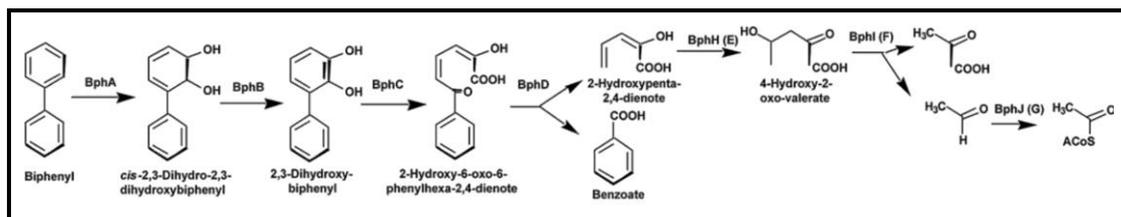
## **1.6 METABOLISMO DE LOS BIFENILOS POLICLORADOS**

Los PCBs pueden ser degradados aeróbica y anaeróbicamente. En general, se puede decir que los congéneres altamente clorados (altamente estables y altamente hidrofóbicos) son buenos sustratos para la degradación anaerobia, probablemente vía clororespiración (el uso inicial de los PCBs como aceptores de electrones) (Abraham *et al.*, 2002), pero son pobres sustratos para la degradación aerobia. La dechloración es un proceso progresivo que convierte congéneres altamente clorados en formas menos cloradas (o congéneres muy hidrofóbicos en formas menos hidrofóbicas). Al contrario, los congéneres de baja cloración son pobres sustratos para la degradación anaerobia pero buenos sustratos para la degradación aerobia, en donde actúan como donadores de electrones.

### **1.6.1 Degradación aerobia de los PCBs**

La degradación aerobia de los PCBs es iniciada por una oxigenación (enzima: bifenilo 2,3 dioxigenasa, BphA) que da lugar, siguiendo el caso del bifenilo (ver Figura 2), a *cis* 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibifenilo. Éste es posteriormente deshidrogenado (enzima: *cis*-dihidrodiol deshidrogenasa, BphB) para dar 2,3-dihidroxibifenilo que sufre una rotura del anillo en posición *meta* (enzima: extradiol dioxigenasa, BphC). El 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato formado es hidrolizado (enzima: HOPDA hidrolasa, BphD) dando lugar a 2-hidroxipenta-2,4-dienoato (o HOPDA) y benzoato como productos. A esta secuencia de reacciones se la suele denominar ruta periférica de la degradación de bifenilo, y resulta en la degradación de PCBs a clorobenzoato y un ácido alifático de cinco carbonos (HOPDA), que es posteriormente degradado a intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos (ruta central) (Pieper, 2005).

Como intermediarios en varias rutas de degradación, los clorobenzoatos y clorocatecoles pueden ser posteriormente degradados en el medio, si bien el número de rutas distintas que pueden llevar a su degradación es tan extenso que queda fuera del alcance de esta breve descripción.



**Figura 2.** Ruta periférica de la degradación del bifenilo por parte de *Burkholderia sp.* LB400.

El origen de los genes para la degradación de PCBs no está muy claro. Los PCBs llevan en el ambiente unos 70 años por lo que es muy improbable que dichos genes se hayan desarrollado *de novo*. Existen varias teorías respecto a su origen que postulan una relación evolutiva con los genes de degradación de ligninas o terpenos (Abraham *et al.*, 2002).

Los genes que codifican para los enzimas de la ruta periférica de degradación del bifenilo suelen estar organizados en un único clúster (operón), con pequeñas variaciones en el orden de los genes, y comúnmente se encuentran bajo el control de un regulador de respuesta ambiental (Pieper, 2005). Por otro lado, aunque suele asumirse que sólo existe un grupo de estos genes por organismo, diversas cepas contienen rutas metabólicas múltiples o isoenzimas involucradas en el metabolismo de PCBs. (Abraham *et al.*, 2002)

La mayoría de las bacterias que poseen los genes que codifican los enzimas de esta ruta degradan PCBs. Sin embargo, dichas bacterias sólo cometabolizan los congéneres clorados, dando lugar tanto a clorobenzoatos, que a pesar de no ser

tóxicos pueden inhibir los enzimas responsables de la ruptura del anillo durante la degradación de PCBs (Stratford *et al.*, 1996), y otros metabolitos recalcitrantes como HOPDAs clorados, dihidrodioles o dihidroxibifenilos, muchos de ellos muy tóxicos para las bacterias (Camara *et al.*, 2004).

### **1.6.2 Subunidad ISP $\alpha$ del enzima bifenilo 2,3 dioxigenasa**

El espectro de congéneres de PCBs que pueden ser transformados por un organismo está determinado, de forma muy significativa, por la especificidad del enzima bifenilo 2,3 dioxigenasa (responsable de la catálisis del primer paso de la ruta). Dicho enzima pertenece a la gran familia de dioxigenasas Rieske de hierro no hemo (Gibson & Parales, 2000). Estos enzimas están compuestos por una oxigenasa terminal (proteína hierro-azufre; ISP), una ferredoxina y una ferredoxina reductasa. Estas últimas actúan como sistema de transporte electrónico para transferir electrones del NADH a la oxigenasa terminal (Butler & Mason, 1997). Las ISP catalíticas son heteromultímeros formados por una subunidad grande ( $\alpha$ ) y una pequeña ( $\beta$ ). La subunidad  $\alpha$  posee un clúster de tipo Rieske [2Fe-2S], un centro activo oxígeno-hierro mononuclear no hemo, y un centro de unión al sustrato (Butler & Mason, 1997; Furusawa *et al.*, 2004), responsable de la especificidad de sustrato (Furukawa *et al.*, 1993; Kimura *et al.*, 1997).

La comparación de las secuencias aminoacídicas de las ISP $\alpha$  conocidas revela que forman una familia de secuencias diversas pero evolutivamente relacionadas, dentro de la cual se pueden distinguir cuatro linajes principales (Gibson & Parales, 2000). Aunque ninguno de los enzimas es completamente específico, se puede encontrar una amplia correlación entre el agrupamiento en las subfamilias tolueno/bifenilo, naftaleno, benzoato y ftalato dioxigenasas, y sus sustratos originales. Cabe destacar, sin embargo, que varios estudios demuestran que pequeñas diferencias en las secuencias aminoacídicas de las ISP $\alpha$  pueden ir

asociados a enormes cambios en la especificidad de sustrato (Erickson & Mondello, 1993; Beil *et al.*, 1998; Zielinski *et al.*, 2002).

Los miembros de la subfamilia de dioxigenasas tolueno/bifenilo están relacionados con la degradación de clorobenceno, tolueno, etilbenceno, isopropilbenceno, bifenilo y PCBs. El análisis filogenético de sus secuencias peptídicas (Nam *et al.*, 2001) indica la presencia de varios grupos distinguibles, como los de las benceno/tolueno, isopropilbenceno, bifenilio dioxigenasas de bacterias Gram positivas y bifenilio dioxigenasas de bacterias Gram negativas.

A pesar de que el resto de los enzimas del curso alto de la ruta de degradación de bifenilo no tengan tanta implicación en la especificidad de sustrato, cabe destacar que la tercera enzima de esta ruta, BphC, puede sufrir varios tipos de inhibición (incluida inhibición irreversible) por parte de diversos posibles intermediarios. Además, BphD es inhibida competitivamente por HOPDAs clorados en su mitad dienoato, ralentizando la mineralización de todos los congéneres presentes en el medio, siendo en muchos casos este enzima determinante en la falta de degradación aerobia de PCBs en el medio (Pieper, 2005).

## **1.7 PSEUDOMONAS FLUORESCENS F113 Y SUS DERIVADOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE F113pcb Y F113L::1180**

La cepa *Pseudomonas fluorescens* F113 fue aislada de la rizosfera de remolacha azucarera (Shanahan *et al.*, 1992) y ha demostrado ser un excelente colonizador de varias rizosferas tales como la de la propia remolacha, tomate (Simons *et al.*, 1996), guisante (Naseby & Lynch, 1999) y alfalfa (Villacieros *et al.*, 2003). Por lo tanto, parece un candidato excelente para su aplicación en sistemas rizosfera-microorganismo, como la rizorremediación, y para la introducción de genes heterólogos degradadores de PCBs en la rizosfera.

Los genes empleados en la construcción de cepas de *Pseudomonas fluorescens* F113 modificadas genéticamente para su uso en rizorremediación fueron los de *Burkholderia sp.* LB400, una cepa originalmente aislada de un suelo contaminado (Bopp, 1986), que tiene la capacidad de degradar algunos congéneres de PCBs que posean hasta 6 cloros en su molécula (Bopp, 1986). El operón *bph* de esta cepa codifica la ruta metabólica completa que permite la degradación de bifenilo, su uso como única fuente de carbono y el cometabolismo completo de PCBs (Furukawa & Matsumura, 1976; Guilbeault *et al.*, 1994).

El operón *bph* de LB400 fue insertado bajo su propio promotor en el genoma de *Pseudomonas* F113, dando lugar a la cepa F113pcb. Esta cepa retuvo la competencia rizosférica y el comportamiento de la cepa parental *in vitro* e *in vivo* y, además, puede crecer en bifenilo como única fuente de carbono y cometabolizar PCBs (Brazil *et al.*, 1995). Sin embargo el nivel de expresión de los genes *bph* en esta cepa es menor que en la cepa parental, lo que limita su aptitud como cepa rizorremediadora. Por otro lado, el elemento insertado es estable y la transferencia lateral del elemento a un recipiente homólogo en la rizosfera ocurre a frecuencias

no detectables (Brazil *et al.*, 1995). Además, la cepa mostró una elevada tasa de degradación de clorobenzoatos en la rizosfera (Crowley *et al.*, 1996).

Una forma potencial de aumentar la actividad degradadora de esta cepa fue incrementar la tasa de transcripción de los genes *bph*, cambiando el promotor. Para ello se construyó la cepa F113::1180L (Villacieros *et al.*, 2005), que presenta los genes *bph* bajo el control de un casete formado por promotores nod (promotores de nodulación de *Sinorhizobium meliloti*). Esta estrategia permitió obtener una cepa mejorada en cuanto a su capacidad rizadorremediadora, ya que era superior a F113pcb en cuanto a su actividad dioxigenasa y crecimiento en bifenilo (Villacieros *et al.*, 2005). Los genes integrados en el cromosoma bajo el control del casete nod son también estables gracias al sistema de minitransposón empleado en su construcción (de Lorenzo *et al.*, 1990). Además, esta cepa no posee genes de resistencia antibiótica del vector, por lo que es apta para aplicaciones *in situ*.

Por otro lado, el uso de promotores heterólogos reduce la posibilidad de variación de cepa mediante recombinación homóloga y permite el desacoplamiento de la expresión de los genes y del metabolismo del carbono, superando la represión catabólica del promotor (Villacieros *et al.*, 2005).

## **2. OBJETIVOS**



La remediación de suelos contaminados por bifenilos policlorados (PCBs) se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante incineración o enterramiento en vertederos específicos. Estas prácticas han demostrado ser, en la mayoría de los casos, costosas, ineficaces e incluso peligrosas. En los últimos años, se ha postulado una estrategia remediadora alternativa; la rizorremediación, basada en el empleo de sistemas integrados planta-microorganismo modificado genéticamente.

Para poder explotar todo el potencial de esta tecnología emergente, es necesario una mayor comprensión de las diversas poblaciones bacterianas, y polimorfismos catabólicos, que se desarrollan en la rizosfera de la planta introducida (con fines de remediación) en el suelo contaminado.

Por otro lado, antes de poder emplear dicha estrategia en el tratamiento de suelos contaminados, existe un requisito legal relativo al estudio, en ambientes naturales simulados, del posible impacto que la introducción de los microorganismos modificados genéticamente pueda tener sobre las poblaciones nativas del suelo.

Es por ello que consideramos oportuno fijar los siguientes como objetivos principales de este trabajo:

-Estudio del efecto causado por la introducción de plantas destinadas a rizorremediación (*Salix viminialis*) sobre las poblaciones bacterianas de un suelo con un historial de contaminación por PCBs; implicaciones y aplicaciones en rizorremediación.

-Análisis del impacto causado por la introducción de sistemas planta-microorganismo modificado genéticamente, diseñados para rizorremediación, sobre las poblaciones bacterianas nativas de un suelo con un historial de contaminación por PCBs.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



## **3.1 MATERIALES**

### **3.1.1 Bacterias**

Las estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo se recogen en la Tabla II.

### **3.1.2 Material vegetal**

Los ensayos con plantas fueron realizados con Sauce (*Salix viminalis x schwerinii*, variedad Björn). Esta especie presenta diversas ventajas en la rizadorremediación de suelos contaminados por PCBs; son plantas fáciles de cultivar, perennes y con raíces profundas. Además, producen ácido salicílico y otros compuestos relacionados que inducen la degradación de muchos compuestos xenobióticos (como los hidrocarburos aromáticos policíclicos) (Singer *et al.*, 2003). Las cepas bacterianas empleadas en este estudio colonizan de forma eficaz su rizosfera.

### **3.1.3 Reactivos, Enzimas y Antibióticos**

Los reactivos utilizados procedieron de Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, E.E.U.U.), Aldrich (Milwaukee, E.E.U.U.), Fluka (Buchs, Suiza) y Panreac (Montplet & Esteban SA, Barcelona, España). La Triptona, el extracto de levadura, las agarosas y el Agar bacteriológico se obtuvieron de Pronadisa (Madrid, España). Los reactivos para electroforesis, se obtuvieron de Sigma, Bio-Rad (Hercules, E.E.U.U.) y Biometra (Goettingen, Alemania). Las columnas y resinas para purificación de ADN se obtuvieron de Qiagen (Diagen, Alemania) y de Millipore (Beverly, E.E.U.U.). Los antibióticos utilizados se obtuvieron de Sigma y SmithKline Beecham (Philadelphia, E.E.U.U.) y fueron preparados y almacenados

según Sambrook y col. (Sambrook *et al.*, 1989). El equipo así como el material específico de TGGE se obtuvo de Biometra. Los oligonucleótidos empleados fueron sintetizados por Roche. Los reactivos para PCR se obtuvieron de Biotools (Madrid, España).

**Tabla II.** Estirpes bacterianas utilizadas.

Estirpe	Características relevantes	Origen o referencia
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	$\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169.	Gibco B.R.L. (Burlington, Canadá)
<i>P. fluorescens</i> F113rif	Cepa salvaje con Rif <sup>R</sup> espontánea.	(Fedi <i>et al.</i> , 1996)
<i>P. fluorescens</i> F113rifpcb	Inserción cromosómica única del operón <i>bph</i> . Rif <sup>R</sup> .	(Brazil <i>et al.</i> , 1995)
<i>P. fluorescens</i> F113::1180L	Inserción cromosómica única del operón <i>bph</i> con tasa de crecimiento en bifenilo incrementada, <i>lacZY</i> . Rif <sup>R</sup> .	(Villacieros <i>et al.</i> , 2005)
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ</i> $\Delta$ M15 Tet <sup>R</sup> ]	Stratagene (La Jolla, E.E.U.U.)
<i>E. coli</i> XL0LR	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ</i> $\Delta$ M15 Tet <sup>R</sup> ] Su- $\lambda$ <sup>R</sup>	Stratagene (La Jolla, E.E.U.U.)

### 3.1.4 Hibridación y revelado

La membrana de hibridación (Hybond N) y el papel fotográfico empleados fueron de Amersham (Little Chalfont, Reino Unido) y las soluciones de revelado provinieron de Agfa (Leverkusen, Alemania).

### **3.1.5 Suelo empleado**

El suelo empleado, obtenido de Lhenice (República Checa), estaba contaminado con aproximadamente 200 mg/kg de la mezcla comercial Delor103 (similar a Aroclor 1242), compuesta por PCBs de baja cloración, principalmente triclorados. Dicha mezcla era fabricada como fluido dieléctrico para condensadores y se encuentra presente en dicho suelo debido a fugas existentes en contenedores de almacenaje cercanos a una industria.

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Cultivo de Microorganismos.**

Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron a 37°C con agitación en medio LB (Sambrook *et al.*, 1989). Las cepas de *Pseudomonas* se cultivaron a 28°C con agitación en medio SA (Sacarosa-Asparragina) (Scher & Baker, 1982). Al medio se le añadieron antibióticos cuando fue necesario. Todos los medios de cultivo fueron preparados con agua desionizada. El LB se esterilizó a 121°C durante 20 min. El SA se esterilizó a 110°C durante 15 min. Se añadió agar bacteriológico (1,5%) para cultivo sólido.

### **3.2.2 Inoculación de cepas de *Pseudomonas* en las raíces de Sauce**

La cepa deseada se cultivó en medio líquido y posteriormente se lavó con tampón fosfato. Posteriormente, el sistema radicular de los sauces se introdujo en tampón fosfato que contenía  $10^6$  bacterias/ml durante una hora.

### **3.2.3 Preparación de microcosmos y posterior incubación**

Se dispusieron tres plantas de sauce, de tres semanas de edad cada una, en cada maceta de hierro galvanizado (ver Figura 3). A continuación, se vertió cuidadosamente alrededor de las raíces 1900 g de suelo contaminado, pre-homogeneizado y filtrado a través de una malla de 2 mm. Las macetas se incubaron de forma controlada; 16 h de luz a 22°C y 8 h de oscuridad a 18°C. Las plantas fueron regadas desde abajo para evitar el lavado de las poblaciones rizosféricas. Cada replica de muestreo fue obtenida de una sola maceta.



**Figura 3.** Secuencia demostrativa de la preparación de los microcosmos.

De cada maceta se tomaron dos tipos de muestras:

**Rizosfera;** extrayendo la planta cuidadosamente y posteriormente agitándola para quitar el grueso del suelo. El suelo que se mantuvo adherido a las raíces fue definido como perteneciente a la rizosfera.

**Suelo;** fue tomado utilizando tubos cilíndricos de PVC (28 mm de diámetro interno).

### 3.2.4 Detección de PCBs en las muestras

Las muestras fueron aireadas a temperatura ambiente durante 24 h, después homogeneizadas con mortero y filtradas a través de una malla de 1 mm. Posteriormente se procedió a la extracción en hexano de alícuotas de 1 g durante 4 h empleando una modificación del método EPA para extracción Soxhlet (método EPA 3540C) (Ryslava *et al.*, 2003). Los extractos fueron posteriormente concentrados bajo nitrógeno y limpiados con florisil (método EPA 3620B) antes del

análisis. Cada muestra se analizó por duplicado utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 con un detector de captura iónica y una columna capilar de sílice fusionada (30 m de longitud y 0,2 mm de diámetro interior), recubierta de 0,25 mm de fase estacionaria SE054, empleando nitrógeno como gas transportador (flujo de 1 ml/min). La concentración total de PCBs fue estimada basándose en los congéneres indicadores, utilizando los métodos US EPA 8089/8081 para expresar el contenido total de PCBs como la suma de congéneres indicadores recomendados (PCBs número 28: 2,4,4'-triclorobifenilo; 52: 2,2',5,5'-tetraclorobifenilo; 101: 2,2',4,5,5'-pentaclorobifenilo; 138: 2,2',3,4,4',5-hexaclorobifenilo; 153: 2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenilo y 180: 2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenilo).

### **3.2.5 Aislamiento de ADN total de las muestras**

El aislamiento de ADN total se llevo a cabo según el método desarrollado por Porteus y colaboradores (Porteous *et al.*, 1994). Posteriormente, se utilizo una columna Microcon-100 de Amicon (Beverly, E.E.U.U.), con el fin concentrar la muestra y eliminar los acidos húmicos que suelen co-extraerse junto al ADN.

### **3.2.6 Amplificación de ADN por PCR**

La mezcla de reacción de PCR fue en todos los casos de 2,5 µl de tampón de reacción (10x), 5 pmol de cada cebador, 3,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 5 µg de albúmina de suero bovino (BSA) y 1U de ADN polimerasa, en un volumen final de 25 µl. Los programas de PCR constaron siempre de 5 min de desnaturalización a 94°C seguido por ciclos de 1 min a 94°C (desnaturalización), 1 min a la temperatura de *annealing*, 2 min a 72°C (elongación), y un ciclo final de 10 min a 72°C. Los cebadores, temperaturas de *annealing* y número de ciclos empleados están incluidos en las Tablas III y IV.

**Tabla III.** Oligonucleótidos empleados como cebadores

bre	Nom d	Específida	Secuencia 5'-3'	Origen
	$\alpha$ 203	$\alpha$ Proteobact eria	CCGCATACGCC TACGGGGGAAAGATT TAT	(Gomes <i>et al.</i> , 2001)
2	L149	Bacteria	CTACGGRTACCT TGTTACGAC	(Weisburg <i>et al.</i> , 1991)
	27f	Bacteria	AGAGTTTGATCM TGGCTCAG	(Weisburg <i>et al.</i> , 1991)
GC	F984	Bacteria	CGCCCGGGGCGC GCCCCGGGGCGGGGC GGGGGCACGGGGGG ACGCGAAGAACCTTA C	(Heuer <i>et al.</i> , 1997)
8	R137	Bacteria	CGGTGTGTACAA GGCCCGGGAACG	(Heuer <i>et al.</i> , 1997)
$\beta$	F948	$\beta$ Proteobact eria	CGCACAAGCGGT GGATGA	(Gomes <i>et al.</i> , 2001)
	31F	Acidobacteri a	GATCCTGGCTCA GAATC	(Barns <i>et al.</i> , 1999)
hgc	F243	Actinobacter ia	GGATGAGCCCGC GGCCTA	(Heuer <i>et al.</i> , 1997)
$f_{668}$	bphA	ISP $\alpha$	GTTCCGTGTAAC TGGAARTWYGC	(Witzig <i>et al.</i> , 2006)
$r_{1153}$	bphA	ISP $\alpha$	CCAGTTCTCGCC RTCRTCYTGHTC	(Witzig <i>et al.</i> , 2006)
$f_{668}$ GC	bphA GC	ISP $\alpha$	CGCCCGGGGCGC GCCCCGGGC GGGGCGGGGGCACG GGGGGGTTCCGTGTA ACTGGAARTWYGC	Éste estudio

**Tabla IV.** Parejas de cebadores y condiciones de amplificación empleados para los distintos grupos estudiados.

Par cebador	Especificidad	T <sup>a</sup> de <i>annelaing</i>	Nº Ciclos
$\alpha$ 203 + L1492	$\alpha$ Proteobacteria	56°C	27
F948 $\beta$ + L1492	$\beta$ Proteobacteria	61°C	25
31F + L1492	Acidobacteria	42°C	27
F243hgc + R1378	Actinobacteria	63°C	25
27f + L1492	Bacteria	55°C	25
F984GC + R1378	Bacteria/TGGE	53°C	25+5
bphAf <sub>668</sub> + bphAr <sub>1153</sub>	ISP $\alpha$	58°C	25
bphAf <sub>668</sub> G C+ bphAr <sub>1153</sub>	ISP $\alpha$ /TGGE	58°C	20

### 3.2.7 Re-amplificación de los genes 16S ARNr e ISP $\alpha$ para su análisis por TGGE (PCR anidada)

Con el objeto de obtener un fragmento de menor tamaño que pueda ser separado por TGGE, se utilizó 1  $\mu$ l de una dilución 1:10 de los productos de amplificación de los genes 16S ARNr específicos de grupo, para llevar a cabo una segunda amplificación de una región interna empleando los cebadores F984GC y L1492. El fragmento obtenido consta de 475 pb aprox. (correspondientes a las posiciones 968 a 1401 de la numeración de *Escherichia coli*), y contiene las regiones hipervariables V6-8. En el caso de la re-amplificación de los genes ISP $\alpha$ , se modificó el oligonucleótido bphAf668 añadiéndole una cola de GCs en su extremo 5', con el fin de permitir la separación de estos fragmentos mediante TGGE.

Para llevar a cabo las reamplificaciones no se utilizó BSA, en su lugar, se añadió 4% DMSO o Acetamida para favorecer la apertura de las dobles hélices e impedir la formación de estructuras secundarias. Después de los 25 ciclos de amplificación, se añadieron otros 5 ciclos sin la fase de desnaturalización a 94°C, con el objetivo de finalizar la elongación de aquellos fragmentos incompletos que posteriormente podrían enmascarar los resultados.

### **3.2.8 Electroforesis en Geles de Agarosa**

Los fragmentos de ADN se separaron en función de su tamaño por electroforesis en geles horizontales de agarosa, utilizando tampón TAE (Sambrook *et al.*, 1989). La concentración de agarosa varió del 0.7% al 1.5% según el tamaño del fragmento de ADN que se quería resolver. Las muestras se mezclaron con 1/6 de tampón de carga (15% ficoll en TAE con o sin 0.25% de azul de bromofenol). El tamaño de los fragmentos se estimó por su movilidad electroforética, usando como referencia marcadores estándar de peso molecular (*1kb ladder*, Biotools).

### **3.2.9 Purificación de Fragmentos de ADN de agarosa**

El ADN seleccionado fue escindido del gel mediante un escalpelo y se purificó mediante el “Gel Extraction Kit” de Qiagen.

### **3.2.10 Clonaje en plásmido**

Los fragmentos de ADN seleccionados fueron clonados en el plásmido pGEMT easy vector de Promega (Madison, E.E.U.U.) según especificaciones del fabricante.

### **3.2.11 Transformación de células competentes**

Los plásmidos deseados fueron introducidos en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes, preparadas según la modificación descrita por Kushner (Kushner, 1978) del método del cloruro cálcico, mediante un choque térmico; 20 min en hielo, 2 min a 42°C y 10 min en hielo.

### **3.2.12 Extracción de ADN plasmídico**

El ADN plasmídico fue extraído utilizando el “RapidPURE kit” de QBIogene (Solon, E.E.U.U.)

### **3.2.13 Electroforesis en gradiente térmico (TGGE)**

Para obtener una separación dependiente de secuencia de los fragmentos obtenidos por PCR, se empleó un sistema de electroforesis en gradiente térmico (TGGE Maxi, BIOMETRA), que fue utilizado según las especificaciones del fabricante. Se utilizaron geles con 6% Poliacrilamida, 1% TAE, 8 M Urea, 20% Formamida desionizada y 2% Glicerol. La polimerización fue iniciada con 100  $\mu$ l de TEMED y 200  $\mu$ l de Persulfato Amónico al 10%. Posteriormente, se cargaron entre 2-8  $\mu$ l de producto de PCR al cual se añadió 1/5 de tampón de carga (5x TAE, 0.1% Tritón x-100 y 0.01% de azul de bromofenol). Se incluyeron patrones de referencia obtenidos de varias secuencias específicas de cada grupo para facilitar el posterior análisis. La electroforesis se realizó durante 16 h a 130 V, bajo un gradiente térmico de 44.5°C a 56°C para los fragmentos de 16S ARNr y 41°C a 56°C para los fragmentos de ISP $\alpha$ .

**Tabla V.** Composición de las soluciones empleadas en la tinción con plata.

<b>Solución</b>	<b>Composición</b>
Fijación	10% Etanol, 0,5% Ácido Acético.
Tinción	0,2% Nitrato de plata.
Revelado	1,5% NaOH, 0,01% Borohidruro Sódico, 0,15% Formaldehído.
Paro	0,75% p/v Carbonato sódico.
Conservación	25% w/w etanol, 10% v/v glicerol.

La presencia de las diferentes bandas del gel fue evidenciada mediante tinción con nitrato de plata (Heuer *et al.*, 1997). Todas las soluciones empleadas (Tabla V) fueron preparadas frescas y todos los pasos se realizaron en agitación; dos lavados de 3 min en solución de fijación, incubación durante 25 min en solución de tinción, dos lavados (aproximadamente 4 segundos cada vez) con agua destilada, inmersión en solución de revelado hasta que se observen todas las bandas, lavado con agua destilada e inmersión en la solución de paro durante 10 min. Finalmente, se dejó reposar en solución de conservación durante 7 min.

### 3.2.14 Secuenciación

La secuenciación de los fragmentos de ADN clonados fue realizada por la unidad de genómica del Parque Científico de Madrid (Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos *GenBank* bajo los códigos de acceso DQ648899 - DQ649002 y EF565826 - EF565853.

### 3.2.15 Generación de Perfiles fisiológicos

Para la caracterización fisiológica de las comunidades microbianas presentes en las muestras, se utilizaron microplacas ECOplates de Biolog (Hayward, E.E.U.U.). Cada una de estas placas contiene 31 pocillos con diferentes

fuentes de carbono y un pocillo control sin fuente de carbono. Con cada fuente de carbono va incluido un tinte redox de Tetrazolio que se torna púrpura cuando es reducido por la respiración bacteriana.

Para obtener un extracto bacteriano de las muestras, se introdujeron alícuotas de suelo de 5 g en matraces de 250 ml, que contenían 45 ml de solución salina estéril (0,9% NaCl) y se dispusieron en un agitador orbital a 250 rpm durante 30 min a 28°C. Para las muestras de rizosfera, se dispusieron 0,5 g de muestra en tubos de ensayo con 4,5 ml de solución salina estéril y fueron agitados mediante vortex durante 2 min. Los detritus de suelo y raíz fueron eliminados mediante una centrifugación a baja velocidad (2 min, 500 g, 20°C). La fracción bacteriana se recogió mediante centrifugación a 1000 g durante 20 min. El sedimento bacteriano resultante fue lavado con 10 ml de solución salina estéril, para evitar el transporte de fuentes de carbono del suelo que podrían enmascarar los resultados.

Cada suspensión bacteriana fue diluida 1:10 y utilizada para inocular las microplacas (135 µl por pocillo) que posteriormente se incubaron a 28°C en oscuridad. La densidad optica (DO) fue medida a 595 nm con un lector de microplacas Spectra Fluor de Tecan (Zurich, Suiza), después de 22 h, 44 h, 66 h y 88 h.

### **3.3 TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS**

#### **3.3.1 Análisis de los perfiles fisiológicos**

Los valores de DO fueron corregidos restando el valor del pocillo control (sin fuente de carbono). Con el fin de tener en cuenta densidades microbianas iniciales ligeramente diferentes, las DO ya corregidas fueron divididas por la DO media de la placa, obteniendo DOs estandarizadas, comparando por tanto patrones estandarizados en vez de valores absolutos (Garland & Mills, 1991).

Para subsiguientes análisis, se utilizaron los valores de actividad obtenidos cuando un máximo de pocillos mostró actividad (Glimm *et al.*, 1997), que resultó ser la medida tomada a 66 h. Teniendo en cuenta que las actividades menores de 0,006 solo contribuyen a aumentar el ruido, éstas fueron tratadas como 0. Las 31 variables resultantes (un valor de actividad corregido y estandarizado para cada fuente de carbono) fueron reducidas por extracción de componentes principales (SPSS 12.0), a un grupo de variables nuevas que explicasen al menos el 75% de la varianza total (suma de *eigenvalues* total), utilizando la covarianza de las variables.

Con el fin de probar eventuales diferencias entre comunidades, se realizó un análisis multivariante (*General Linear Modelling*, SPSS 12.0) utilizando los nuevos componentes principales como variables (Glimm *et al.*, 1997). En todos los casos donde se empleó estadística paramétrica, los datos fueron previamente analizados mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov (distribución normal) y Levene (igualdad de las varianzas).

La diversidad de los patrones catabólicos fue analizada utilizando el índice de Shannon (Shannon & Weaver, 1963) de acuerdo con la fórmula:

$$H = - \sum_{i=0}^n P_i (\log P_i)$$

donde  $P_i$  representa la proporción de una actividad particular y  $n$  es el número total de pocillos en la placa.

### **3.3.2 Análisis de las genotecas derivadas de Suelo y Rizosfera**

Los fragmentos de 16S ADN<sub>r</sub> específicos de grupo y de ISP $\alpha$  analizados fueron agrupados en unidades taxonómicas operativas (OTU) en función de su movilidad electroforética corregida.

Las frecuencias de cada OTU fueron utilizadas como indicadores de abundancia. Un fragmento representativo de cada OTU fue secuenciado y las secuencias obtenidas fueron enviadas al programa *SEQUENCE MATCH* del *RIBOSOMAL DATABASE PROJECT* (RDP II) (Cole *et al.*, 2005) en el caso de los fragmentos de 16S ARN<sub>r</sub>, y al programa BLAST en el caso de los de ISP $\alpha$ , con el fin de obtener las secuencias descritas más similares a las enviadas. La similitud entre ambas secuencias se calculó utilizando el programa BIOEDIT (Hall, 1999). Las secuencias en bruto obtenidas, fueron editadas y alineadas utilizando el programa *CLUSTALW* (Thompson *et al.*, 1994). Con el fin de identificar posibles quimeras (una secuencia quimérica es una secuencia compuesta por dos o más secuencias filogenéticamente distintas que aparecen generalmente como artefactos de PCR; se forman cuando un amplicón terminado prematuramente se apareja con una secuencia distinta de la secuencia parental y es copiada hasta su finalización durante los siguientes pasos de la PCR), las secuencias fueron analizadas mediante los programas *CHECK\_CHIMERA* (Cole *et al.*, 2005) y *BELLEROPHON* (Huber *et al.*, 2004).

La diversidad de las genotecas fue calculada utilizando el índice de Shannon (Shannon & Weaver, 1963) de acuerdo con la fórmula anteriormente citada, donde  $P_i$  representa la proporción de un filotipo particular en la genoteca y  $n$  es el número total de filotipos. El análisis de diversidad y riqueza se realizó utilizando el programa *DOTUR* (Schloss & Handelsman, 2005).

Para cada grupo estudiado se obtuvieron un grupo de secuencias de 16S ARNr de los organismos cultivados más próximos del RDPII, así como secuencias similares o bien descritas para los fragmentos de ISP $\alpha$ , con el fin de conseguir enmarcar su posición dentro de la diversidad conocida de dichos grupos. Posteriormente se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud para las secuencias de 16S ARNr empleando un algoritmo de *quartet puzzling* incluido en el programa *TREE-PUZZLE* (Schmidt *et al.*, 2002), utilizando un modelo de sustitución HKY (incluido corrección gamma), imponiendo el supuesto de reloj molecular, y fueron visualizados utilizando el programa *TREEVIEW* (Page, 1996). La matriz de distancia y el valor de  $\alpha$  (de la corrección gamma) obtenidos fueron utilizados en subsiguientes análisis. En el caso de las secuencias de ISP $\alpha$ , se utilizó el programa *MEGA* ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) para la reconstrucción filogenética, mediante el método de *Neighbour-Joining*, con un modelo de distancias JTT y delección por pares de huecos y valores perdidos. Finalmente, se infirió un árbol consenso de 1000 *bootstrap*.

Con el fin de comparar la diversidad genética en cada comunidad con la diversidad genética de ambas comunidades combinadas, se utilizó el test estadístico  $F_{ST}$  (Martin, 2002), que utiliza la ecuación  $F_{ST} = (\theta_t - \theta_w) / \theta_t$ , donde  $\theta_t$  es la diversidad genética total y  $\theta_w$  es la diversidad genética en cada comunidad. La diferenciación de poblaciones utilizando  $F_{ST}$  fue calculada usando el programa *ARLEQUIN* (Schneider *et al.*, 2000). La significación estadística fue evaluada mediante la asignación al azar de secuencias a poblaciones y calculando  $F_{ST}$  para 3.034

permutaciones. Además se obtuvieron estimadores adicionales como la diversidad nucleotídica y  $\theta(\pi)$  (una estimación de la variación genética en una muestra).

Cada par de genotecas (derivadas de suelo y rizosfera) fue comparada utilizando el programa *f-LIBSHUFF* (Schloss *et al.*, 2004), que calcula la integral del estadístico Cramér-von Mises de la fórmula de cobertura de Good (Good, 1953) y lo compara mediante un test de Monte Carlo.

También se empleó la función del RDPII de comparación de genotecas, la cual utiliza el clasificador ingenuo bayesiano del RDPII (con un intervalo de confianza del 95%), para proporcionar una clasificación a las secuencias de las genotecas y estima la probabilidad de que una diferencia observada en un taxón sea producto del azar.

### **3.3.3 Análisis de los geles de TGGE**

Los geles fueron fotografiados digitalmente y analizados mediante el programa *QUANTITY ONE* de Bio-Rad. Después de la eliminación del ruido de fondo utilizando el método del disco rodante, las bandas fueron detectadas y estandarizadas con el patrón de referencia incluido. Cada banda fue descrita en función de su posición estandarizada y su intensidad relativa, medida como la superficie relativa del pico de la banda dividida entre la suma de las superficies de todos los picos en el perfil.

Los datos obtenidos; abundancias y posiciones relativas, fueron utilizados para realizar análisis de correspondencias (CA) mediante el paquete estadístico *XLSTAT*, con el fin de poder representar las relaciones entre los perfiles en dos dimensiones. El CA está bien adaptado a los datos de abundancias, dado que se basa en un modelo que asume una distribución unimodal de las especies a lo largo de los gradientes ambientales (ter Braak, 1985) tal y como estima la teoría de

Nichos (Hutchinson 1957; Legendre y Legendre, 1998). Además, dado que se basa en distancias chi-cuadrado, evita el problema generado por la presencia de dobles ceros en los datos (Legendre & Legendre, 1998).

Posteriormente, con el fin de estimar el efecto global de los distintos tratamientos, los datos fueron también utilizados para realizar agrupamientos jerárquicos aglomerativos (HAC), empleando el método de agrupamiento pareado no ponderado utilizando media aritmética (UPGMA), basado en las media de las disimilitudes chi-cuadrado entre los tratamientos, los agrupamientos significativos en los dendogramas se determinaron automáticamente mediante el programa *XLSTAT*.

El efecto de los tratamientos con los distintos MMGs sobre las poblaciones de suelo, fue investigado también comparando los valores de sus disimilitudes chi-cuadrado respecto al tratamiento control contra las disimilitudes entre el tratamiento sin sauce con respecto al control, mediante análisis de varianza (*SPSS 12.0*).

La diversidad de los perfiles genéticos fue calculada utilizando el índice de Diversidad de Shannon (como arriba), siendo  $P_i$  la proporción de una banda en particular y  $n$  el número total de bandas en el perfil.



## **4. DISEÑO EXPERIMENTAL**



**4.1. ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS PRODUCIDOS POR LA INTRODUCCIÓN DE PLANTAS DE *SALIX VIMMINALIS* EN LAS POBLACIONES BACTERIANAS Y EN LA DIVERSIDAD DE TOLUENO/BIFENILO DIOXIGENASAS DE UN SUELO CONTAMINADO POR BIFENILOS POLICLORADOS (PCBs)**

Se dispusieron 3 microcosmos con sauces y 3 sin sauces, que fueron incubados de forma controlada durante un período seis meses. Posteriormente, se tomaron muestras, obteniéndose suelo rizosférico de los microcosmos con sauces y suelo control de los microcosmos sin sauces. Esta tarea fue llevada a cabo por el Dr. Ulrich Karlson en el departamento de Química Ambiental y Microbiología del “National Environmental Research Institute” (Roskilde, Dinamarca).

Una alícuota de cada una de las seis muestras fue empleada para la generación de perfiles fisiológicos que fueron posteriormente analizados. Otra alícuota se utilizó para extraer ADN total, cuyo tamaño y calidad fueron comprobados mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, las muestras de ADN obtenidas de suelo fueron unificadas al igual que las de suelo rizosférico.

El ADN obtenido fue empleado como molde para amplificar tanto fragmentos de los genes 16S ARNr de  $\alpha$  y  $\beta$  *Proteobacteria*, *Acidobacteria* y *Actinobacteria*, como parte de los genes ISP $\alpha$  de la familia tolueno/benceno dioxigenasas. Los productos de 2 amplificaciones repetidas fueron juntados y purificados mediante extracción de geles de agarosa, antes de su posterior clonaje. Los plásmidos resultantes fueron utilizados para transformar células competentes, y la presencia de insertos del tamaño correcto en estos plásmidos fue analizada mediante amplificación por PCR, empleando los mismos cebadores específicos de grupo. De esta forma se obtuvieron dos juegos de genotecas (uno proveniente de las

muestras de suelo normal y otro del suelo rizosférico) que contenían los fragmentos de genes anteriormente citados (diez genotecas diferentes de cinco genes distintos).

Un cierto número de clones (ver resultados) elegidos al azar de cada genoteca fue re-amplificados (PCR anidada) y analizados por TGGE. Los clones analizados fueron agrupados en función de su movilidad electroforética corregida y un representante de cada grupo fue secuenciado. Los datos obtenidos (secuencias y frecuencias) fueron utilizados para estudiar posibles diferencias, a nivel de los diversos grupos estudiados, entre las comunidades de suelo y rizosfera, y para analizar la diversidad de los genes 16S ARNr e ISP $\alpha$  (diversidad estructural y funcional respectivamente), presente en ambas localizaciones.

Con el fin de inferir el porcentaje de las bacterias totales incluido en este estudio, se amplificaron los genes 16S ARNr de *Bacteria* con cebadores universales, empleando como molde el ADN de suelo y suelo rizosférico, que posteriormente fueron clonados e introducidos en *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante transformación. Los plásmidos con inserto del tamaño correcto fueron empleados como molde para amplificaciones específicas de grupo, obteniendo el número de clones amplificables con cada par de cebadores específicos respecto del total de clones de *Bacteria*.

## **4.2. ANÁLISIS DEL IMPACTO CAUSADO POR LA INTRODUCCIÓN DE SISTEMAS INTEGRADOS PLANTA-MICROORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (MMG) EN LA POBLACIONES MICROBIANAS NATIVAS**

Se dispusieron microcosmos sin sauce y con sauce. Éstos últimos fueron inoculados con alguna de las cepas siguientes: *P. fluorescens* F113rif (tipo salvaje; **TS**), F113rifpcb (microorganismo modificado genéticamente de clase 1; **MMG1**) o F113::1180L (microorganismo modificado genéticamente de clase 2; **MMG2**). Los microcosmos fueron incubados y se tomaron muestras (destruictivamente) de suelo y suelo rizosférico, a tiempo 0 (en este caso solo se tomaron muestras de suelo) y cada 4 semanas durante un periodo de 24 semanas. Para cada muestreo, se tomaron 3 muestras (una por microcosmo) para cada uno de los 4 tratamientos (suelo sin sauce y suelo con sauce inoculado con TS, MMG1 o MMG2). Esta tarea fue llevada a cabo por el Dr. Ulrich Karlson en el departamento de Química Ambiental y Microbiología del “National Environmental Research Institute” (Roskilde, Dinamarca).

Una alícuota de cada una de las muestras fue empleada para la generación de perfiles fisiológicos que fueron posteriormente analizados. Otra alícuota fue empleada para medir la concentración de PCBs (tarea llevada a cabo por los Drs. Martina Macková y Thomas Macek en el Instituto de Química Orgánica y Bioquímica-CAS de (Praga, República Checa). Y una tercera alícuota fue empleada para generar perfiles genéticos específicos de grupo de la siguiente manera:

De cada muestra se extrajo el ADN total, cuya calidad fue analizada en geles de agarosa. Posteriormente, los extractos de ADN provenientes de un mismo muestreo, tratamiento y tipo de suelo fueron unificados: Por tanto, cada perfil genético obtenido (uno por muestreo, tratamiento y tipo de suelo) fue derivado del ADN proveniente de tres microcosmos combinado. Se procedió entonces a la

amplificación por triplicado de los genes 16S ARNr específicos de grupo presentes en cada muestra de ADN unificada. La correcta amplificación de cada réplica fue analizada en gel de agarosa, después de lo cual el producto de las tres réplicas fue unificado. Después se procedió a la re-amplificación (PCR anidada) de los genes 16S ARNr específicos de grupo para su análisis por TGGE, y los perfiles genéticos obtenidos fueron analizados.

Con el fin de observar la persistencia del inóculo, se analizaron las muestras de suelo rizosférico (de cada muestreo, tratamiento y microcosmo) mediante su extracción en tampón fosfato y posterior incubación en placas de SA con rifampicina. Además, las colonias aparecidas fueron verificadas en función de su correcta apariencia morfológica.

## **5. RESULTADOS y DISCUSIÓN**



**5.1 ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS PRODUCIDOS POR LA  
INTRODUCCIÓN DE PLANTAS DE *SALIX VIMMINALIS* EN LAS  
POBLACIONES BACTERIANAS Y EN LA DIVERSIDAD DE  
TOLUENO/BIFENILO DIOXIGENASAS DE UN SUELO  
CONTAMINADO POR PCBs**

**5.1.1. Composición de las poblaciones de *Bacteria* en suelo y rizosfera**

Se construyeron genotecas de los genes 16S ARNr de *Bacteria* derivadas de muestras de suelo y rizosfera, que posteriormente fueron analizadas en busca de clones pertenecientes a  $\alpha$  y  $\beta$  *Proteobacteria*, *Acidobacteria* y *Actinobacteria*, mediante amplificación de clones al azar con los cebadores específicos de estos grupos. De esta forma se analizaron 48 clones de la genoteca de suelo y 43 de la genoteca de rizosfera.

La Tabla VI muestra el número de amplificaciones positivas obtenidas con los diferentes cebadores específicos de cada genoteca.

**Tabla VI.** Porcentaje de los clones de *Bacteria* analizados amplificados positivamente con los diferentes cebadores específicos empleados

Par cebador	Suelo	Rizosfer a
$\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	25%	32,55%
$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	18,75%	25,58%
<i>Acidobacteria</i>	14,58%	6,97%
<i>Actinobacteri</i>	8,33%	4,65%
a Total	66,66%	69,76%

Como se puede observar, ningún clon fue amplificado por más de una reacción específica de grupo, lo que indica que los cebadores específicos de grupo empleados amplificaron grupos filogenéticos no superpuestos. Los resultados muestran también que los grupos estudiados representaron el 67% de la población de *bacteria* de la muestra de suelo y el 70% de la de rizosfera. Ambas comunidades estaban dominadas por secuencias de *Proteobacteria*, las cuales representaban el 44% y el 52% de los clones estudiados de suelo y rizosfera.

### **5.1.2. Análisis de las genotecas de 16S ARNr específicas de grupo**

Se construyeron genotecas de 16S ARNr específicas de grupo, derivadas de suelo y rizosfera. Varios clones al azar de cada genoteca fueron reamplificados (PCR anidada) y analizados por TGGE. Los clones analizados fueron agrupados en OTUs en función de su movilidad electroforética. El número de veces que una OTU apareció fue tomado como una medida de abundancia, y un representante de cada OTU fue secuenciado.

De esta forma fueron analizados 320 clones, que fueron agrupados en 105 OTUs distintas, secuenciándose aproximadamente 115000 pb. La Tabla VII muestra los datos y la diversidad observada de cada genoteca basada en las abundancias de las OTUs. El índice de diversidad de Shannon fue más alto en la rizosfera para  $\alpha$  y  $\beta$  *Proteobacteria* y más alto en el suelo para *Actinobacteria*, aunque estas diferencias no fueron significativas. Sin embargo, se pudo observar una diferencia significativa en el caso de *Acidobacteria*, que tenía mayor diversidad en la rizosfera. La Tabla VII también muestra la diversidad genética, inferida por los valores de diversidad nucleotídica y de  $\theta(\pi)$ , la cual fue muy similar entre suelo y rizosfera en el caso de *Acidobacteria* y *Actinobacteria*, y ligeramente mayor en la rizosfera para  $\alpha$  y  $\beta$  *Proteobacteria*.

Los parientes más cercanos (secuencias más similares) encontradas en las bases de datos para cada OTU, y el número de veces que dicha OTU apareció en cada genoteca se muestran en la Tabla VIII.

**Tabla VII.** Números e índices de diversidad de las genotecas derivadas de suelo (S) y rizosfera (R).  $\theta(\pi)$  es una medida de la diversidad genética.

Genoteca	Zonas Estudiadas	Clones	OTUs	Índice de Shannon	Diversidad nucleotídica	$\theta$ ( $\pi$ )
<i><math>\alpha</math>Proteobact.</i>	S	42	21	3,2 $\pm 0,2$	0,18 $\pm 0,09$	<sup>2</sup> 20 $\pm 110$
	R	41	18	3,3 $\pm 0,2$	0,20 $\pm 0,10$	<sup>2</sup> 60 $\pm 130$
<i><math>\beta</math>Proteobact.</i>	S	37	13	2,4 $\pm 0,2$	0,09 $\pm 0,04$	<sup>4</sup> 3 $\pm 21$
	R	45	21	2,8 $\pm 0,3$	0,11 $\pm 0,05$	<sup>5</sup> 0 $\pm 25$
<i>Acidobact.</i>	S	30	13	2,3 $\pm 0,3$	0,22 $\pm 0,11$	<sup>1</sup> 80 $\pm 90$
	R	41	23	2,9 $\pm 0,2$	0,21 $\pm 0,10$	<sup>1</sup> 90 $\pm 90$
<i>Actinobact.</i>	S	46	19	2,7 $\pm 0,2$	0,31 $\pm 0,15$	<sup>3</sup> 70 $\pm 180$
	R	38	17	2,6 $\pm 0,2$	0,32 $\pm 0,15$	<sup>3</sup> 80 $\pm 180$
ISP $\alpha$	S	48	20	2,7 $\pm 0,2$	0,48 $\pm 0,23$	<sup>2</sup> 50 $\pm 120$
	R	47	14	2,0 $\pm 0,3$	0,35 $\pm 0,17$	<sup>1</sup> 90 $\pm 90$

### 5.1.2.1. $\alpha$ -Proteobacteria

En el caso de las secuencias de  $\alpha$ -Proteobacteria, sus parientes más cercanos (que presentaron una similitud de entre 83,6% y 99,4%), son normalmente de bacterias no cultivadas, aunque se encontraron altas similitudes con varias especies cultivadas del orden *Rhizobiales*. Para este grupo de secuencias se observa una amplia distribución filogenética (ver Figura 4); muchas secuencias se agrupan con secuencias del orden *Rhizobiales*, pero también se encuentran representados otros órdenes como *Rhodobacterales*, *Caulobacterales* y *Rhodospirales*. Varias OTUs muestran una profunda derivación en el árbol filogenético. Por ejemplo el grupo formado por las OTUs Lhap1 y Lhap2, muestra una relación estrecha con bacterias que forman un nuevo y aún no nombrado orden de  $\alpha$ -Proteobacteria recientemente descrito (Sait *et al.*, 2002) y probablemente pertenecen a dicho orden. El grupo formado por Lhap25 y Lhap8, así como el grupo formado por Lhap15 y Lhap16 no muestran una relación cercana a ningún taxón descrito y pueden representar nuevos linajes dentro de las  $\alpha$ -Proteobacteria. Solo se obtuvieron secuencias de la familia *Rhizobiaceae* en la genoteca de rizosfera y se detectó un ligero aumento en la población de secuencias de la familia *Rhodobacteraceae* en la rizosfera ( $p < 0,058$ ) empleando la función de comparación de genotecas del *RDPII*.

### 5.1.2.2. $\beta$ -Proteobacteria

La mayoría de secuencias de  $\beta$ -Proteobacteria obtenidas resultó ser muy similar (entre 94,8% y 100%) a secuencias obtenidas de organismos no cultivados ya presentes en las bases de datos. La distribución filogenética de estas secuencias está claramente dominadas por el orden *Burkholderiales* (ver Figura 5), incluyendo

miembros de las familias *Oxalobacteraceae*, *Alcaligenaceae* y *Comamonadaceae*, tanto en la genoteca de suelo como en la de rizosfera. Sin embargo, se observó un incremento significativo de secuencias de la familia *Comamonadaceae* ( $p < 0,032$ ) en la rizosfera empleando la función de comparación de genotecas del *RDPII*. Este resultado es también fácilmente observable en el árbol filogenético (Figura 5).

### 5.1.2.3. *Acidobacteria*

Las secuencias casi completas de *Acidobacteria* obtenidas son todas similares a especies no cultivadas (similitud entre 93% y 98,8%). La mayoría de ellas, de acuerdo con la agrupación propuesta por Barns y colaboradores (Barns *et al.*, 1999), son representantes de los grupos III y IV (ver Figura 6), las secuencias del grupo II solo se encontraron en la rizosfera, y no se obtuvieron secuencias de los restantes grupos. Una de las OTUs (Lhad13), que fue encontrada tanto en la genoteca de suelo como en la de rizosfera, no pertenece a ninguno de estos grupos a juzgar por su profunda dicotomía. Esta OTU, junto con otra secuencia perteneciente a un simbiote de esponja (AY703463), podría representar un grupo nuevo dentro de las *Acidobacteria*.

No pudo obtenerse una clasificación o comparación entre genotecas empleando el test de comparación de genotecas para las secuencias de *Acidobacteria* obtenidas dado que aún no hay una filogenia robusta para este grupo.

### 5.1.2.4. *Actinobacteria*

Las secuencias de *Actinobacteria* encontradas son muy similares a su pariente más cercano (entre 95,4% y 99,6%), que es a menudo una especie cultivada. Sorprendentemente, se obtuvieron dos agrupaciones principales de

acuerdo con la distribución filogenética de las secuencias (ver Figura 7); los grupos de *Verrucomicrobiales* y de *Actinobacteria*, lo que indica una falta de verdadera especificidad de los cebadores específicos para *Actinobacteria*, al menos bajo las condiciones de amplificación empleadas en este estudio. La mayoría de las secuencias son del orden *Actinomycetales*, incluyendo representantes de varias familias como *Sporichthyaceae*, *Microbacteriaceae*, *Mycobacteriaceae* y *Microsphaeraceae*, muchas secuencias del género *Streptomyces* y un grupo de secuencias no clasificadas de *Actinobacteria*. No se observaron diferencias entre las genotecas en la distribución filogenética de las secuencias y tampoco se encontraron diferencias significativas de acuerdo con la comparación del *RDPII*.

**Tabla VIII.** Secuencias obtenidas del *RDPII* con mayor similitud para cada OTU (pariente más cercano) y distribución de las OTUs en las genotecas de suelo (S) y rizosfera (R).

Clo n	Tamaño	S -R	Pariente más cercano	Simi litud (%)	Genotec a
Lh ap1	1292	3 -0	Bacterium Ellin332; AF498714	98,8	<i>αProteo bact.</i>
Lh ap2	1265	4 -0	Bacterium Ellin335; AF498717	89,6	”
Lh ap3	1295	1 -0	<i>Pedomicrobium manganicum</i> ; X97691	91,4	”
Lh ap4	1296	1 -0	Uncultured <i>α- Proteobacterium</i> ; AJ582034	98,8	”
Lh ap5	1259	2 -0	<i>Afipia massiliensis</i> ; AY029562	87,9	”
Lh ap6	1294	2 -1	<i>Afipia massiliensis</i> ; AY029562	99,2	”
Lh ap7	1297	2 -1	<i>α Proteobacterium</i> ; AY145553	98,4	”
Lh ap8	1294	3 -2	<i>Magnetospirilla m sp. CF20</i> ; AJ863153	87,7	”

**Tabla VIII.** Secuencias obtenidas del *RDPH* con mayor similitud para cada OTU (pariente más cercano) y distribución de las OTUs en las genotecas de suelo (S) y rizosfera (R).

Lh ap9	1292	4 -4	Uncultured $\alpha$ - <i>Proteobacterium</i> ; AJ318111	97,0	”
Lh ap10	1295	6 -3	Uncultured bacterium; AY625147	98,6	”
Lh ap11	1296	1 -0	Uncultured bacterium; AY625147	97,0	”
Lh ap12	1285	1 -1	Uncultured bacterium; AY662029	83,6	”
Lh ap13	1298	3 -1	Uncultured forest soil bacterium; AY913244	94,9	”
Lh ap14	1292	2 -0	Uncultured sludge bacterium; AF234730	98,5	”
Lh ap15	1280	0 -1	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Shinshu-th2; AB121773	83,9	”
Lh ap16	1285	0 -3	Uncultured sponge symbiont; AF186410	92,2	”
Lh ap17	1299	0 -2	Uncultured sludge bacterium; AF234730	97,6	”
Lh ap18	1275	0 -4	Uncultured bacterium; AY212706	99,4	”
Lh ap19	1330	0 -3	<i>Rhizobium etli</i> ; AY460185	93,6	”
Lh ap20	1291	0 -2	<i>Rhizobium etli</i> ; AY460185	98,8	”
Lh ap21	1295	0 -1	Uncultured bacterium; AY212717	95,8	”
Lh ap22	1296	0 -2	Uncultured bacterium; AF358012	96,7	”
Lh ap23	1292	0 -3	<i>Pedomicrobium</i> <i>australicum</i> ; X97693	98,8	”
Lh ap24	1296	1 -6	Uncultured bacterium; AY221056	94,9	”

**Tabla VIII.** Secuencias obtenidas del *RDPII* con mayor similitud para cada OTU (pariente más cercano) y distribución de las OTUs en las genotecas de suelo (S) y rizosfera (R).

Lh ap25	1294	1 -0	Uncultured soil bacterium; AY326604	93,0	”
Lh ap26	1290	1 -0	Uncultured bacterium; AY625147	96,9	”
Lh ap27	1294	1 -0	Uncultured bacterium; AY625147	98,2	”
Lh ap28	1269	1 -0	<i>Brevundimonas bullata</i> ; AB023428	99,1	”
Lh ap29	1298	1 -1	<i>Afipia massiliensis</i> ; AY029562	96,5	”
Lh ap30	1294	1 -0	Uncultured $\alpha$ - <i>Proteobacterium</i> ; AJ582029	98,1	”
Lh be1	469	3 -0	Uncultured soil bacterium; AF423284	99,1	$\beta$ <i>Proteob act.</i>
Lh be2	465	1 -2	Uncultured bacterium; AY752109	99,3	”
Lh be3	470	0 -3	Uncultured $\beta$ - <i>Proteobacterium</i> ; AJ534662	99,7	”
Lh be4	470	0 -1	<i>Acidovorax delafieldii</i> ; AF078764	98,0	”
Lh be5	470	0 -4	Uncultured bacterium; AY050592	99,3	”
Lh be6	466	0 -1	Uncultured <i>Comamonadaceae</i> ; AF523023	99,3	”
Lh be7	465	0 -3	Uncultured <i>Hydrogenophaga</i> sp; AF523011	99,7	”
Lh be8	466	0 -1	Uncultured <i>Hydrogenophaga</i> sp.; AF52301	99,1	”
Lh be9	470	0 -1	Uncultured bacterium; AY706434	98,9	”

**Tabla VIII.** Secuencias obtenidas del *RDPH* con mayor similitud para cada OTU (pariente más cercano) y distribución de las OTUs en las genotecas de suelo (S) y rizosfera (R).

Lh be10	393	4 -0	Uncultured <i>Variovorax</i> sp.; AY599725	99,8	”
Lh be11	470	0 -3	<i>Variovorax</i> sp. WDL1; AF538929	98,5	”
Lh be12	470	0 -1	Uncultured bacterium; AY250108	99,3	”
Lh be13	464	0 -3	Uncultured $\beta$ - <i>Proteobacterium</i> ; AJ58317	96,1	”
Lh be14	465	5 -3	Uncultured $\beta$ - <i>Proteobacterium</i> ; AY622242	99,5	”
Lh be15	465	2 -0	Uncultured bacterium; AB166773	97,4	”
Lh be16	465	2 -2	Uncultured bacterium; AY160866	96,5	”
Lh be17	465	4 -8	Uncultured soil bacterium; AY326597	98,4	”
Lh be18	465	2 -1	$\beta$ - <i>Proteobacterium</i> ; AJ224618	100	”
Lh be19	471	0 -1	Uncultured bacterium; AY212629	97,2	”
Lh be20	470	4 -1	Uncultured bacterium; AY212629	97,0	”
Lh be21	470	2 -1	Uncultured $\beta$ - <i>Proteobacterium</i> ; AF204242	94,8	”
Lh be22	470	1 -2	Uncultured beta- proteobacterium; AF204242	97,2	”
Lh be23	470	0 -1	Uncultured $\beta$ - <i>Proteobacterium</i> ; AJ581593	95,3	”

**Tabla VIII.** Secuencias obtenidas del *RDPII* con mayor similitud para cada OTU (pariente más cercano) y distribución de las OTUs en las genotecas de suelo (S) y rizosfera (R).

Lh be24	470	4 -2	Uncultured bacterium; AY212629	97,2	”
Lh be25	469	3 -0	Uncultured bacterium; AY212629	96,8	”
Lh ad1	1516	3 -0	Uncultured <i>Acidobacteria</i> ; AY922062	97,0	<i>Acidobac t.</i>
Lh ad2	1505	1 -1	Uncultured <i>Acidobacteria</i> ; AY281352	97,5	”
Lh ad3	1510	0 -1	Uncultured <i>Acidobacteria</i> ; AY922096	98,7	”
Lh ad4	1051	0 -2	Uncultured <i>Acidobacteria</i> ; AY281352	94,5	”
Lh ad5	1516	0 -2	Uncultured <i>Holophaga</i> sp.; AJ519375	98,3	<i>Acidobac t.</i>
Lh ad6	1519	1 -3	Uncultured <i>Acidobacteria</i> ; AY921697	96,6	”
Lh ad7	1504	0 -3	Uncultured <i>Acidobacteria</i> ; AY921697	96,9	”
Lh ad8	1505	0 -2	Uncultured soil bacterium; AF423235	98,5	”
Lh ad9	1504	0 -3	Uncultured <i>Acidobacteria</i> ; AY921697	98,8	”
Lh ad10	1502	0 -1	Uncultured sludge bacterium; AF234731	97,3	”
Lh ad11	1511	5 -0	Uncultured soil bacterium; AY493932	96,4	”
Lh ad12	1505	0 -3	Uncultured <i>Acidobacteria</i> ; AY922121	98,7	”
Lh ad13	1479	3 -1	Uncultured sponge symbiont; AF186413	94,7	”

**Tabla VIII.** Secuencias obtenidas del *RDPH* con mayor similitud para cada OTU (pariente más cercano) y distribución de las OTUs en las genotecas de suelo (S) y rizosfera (R).

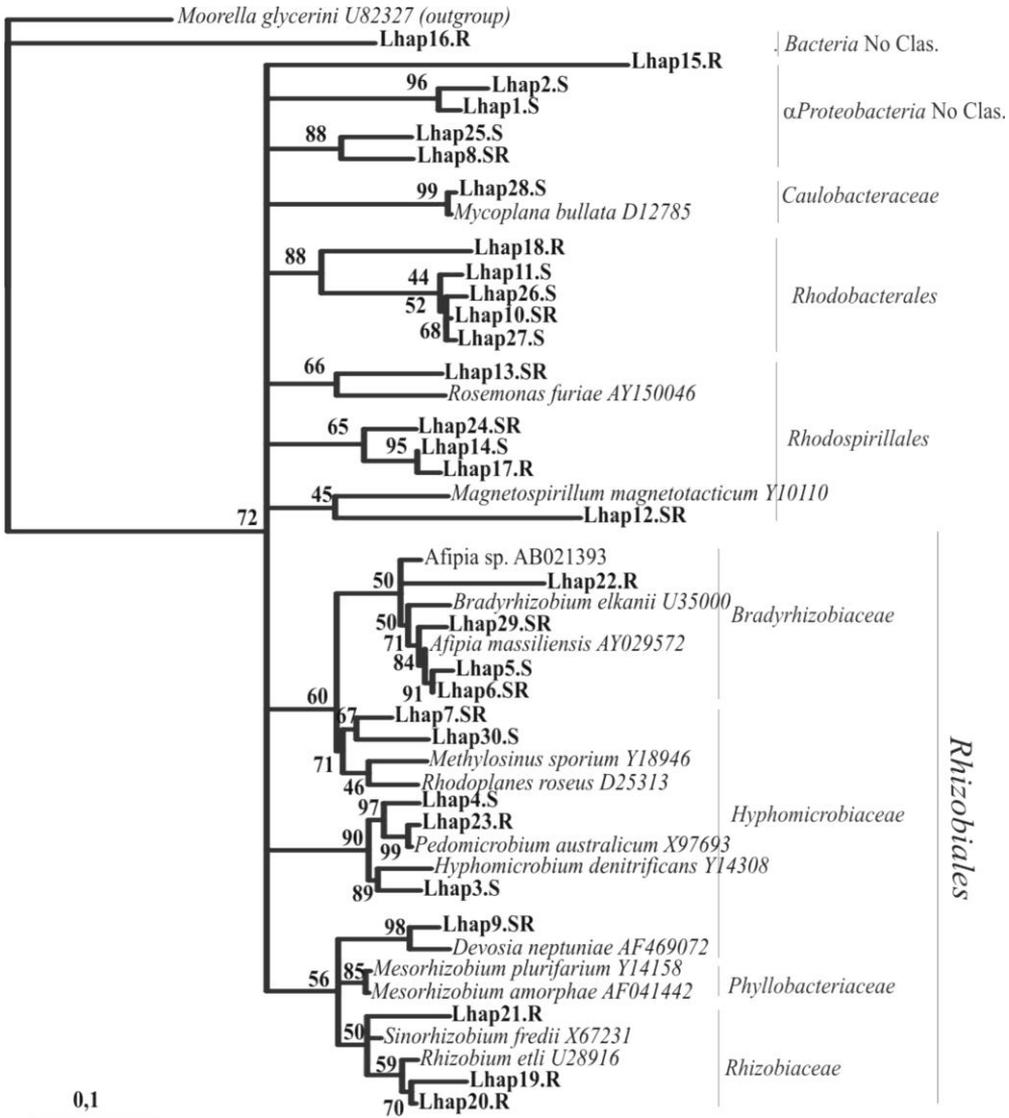
Lh ad14	1455	0 -1	Uncultured <i>Acidobacteria</i> ; AY395390	96,1	''
Lh ad15	1449	0 -2	Uncultured <i>Eubacterium</i> ; AJ292582	92,9	''
Lh ad16	1482	3 -1	Uncultured <i>Acidobacteria</i> ; AY921970	97,9	''
Lh ad17	1481	1 -0	Uncultured <i>Acidobacteria</i> ; AY921970	98,7	''
Lh ad18	1481	1 -2	Uncultured <i>Acidobacteria</i> ; AY921727	98,1	''
Lh ad19	1476	0 -2	Uncultured Antarctic bacterium; AF173824	95,9	''
Lh ad20	1474	0 -2	Uncultured Antarctic bacterium; AF173824	96,7	''
Lh ad21	1519	1 -2	Uncultured bacterium; AY456757	97,3	''
Lh ad22	1520	2 -1	<i>Bacteria</i> ; Z95711	98,3	''
Lh ad23	1521	2 -0	Uncultured soil bacterium; AY326536	97,9	''
Lh ad24	1521	1 -2	Uncultured <i>Acidobacteria</i> ; AY281358	93,2	''
Lh ad25	1514	0 -1	<i>Bacteria</i> ; Z95722	96,9	''
Lh ad26	1534	6 -0	<i>Bacteria</i> ; Z95730	87,3	''
Lh ad27	982	0 -1	Uncultured bacterium; AF371525	95,0	''
Lh ad28	1505	0 -2	Uncultured soil bacterium; AF423235	98,5	''
Lh ac1	1154	7 -0	Uncultured <i>Actinobacterium</i> ; AJ581630	96,3	<i>Actinoba ct.</i>

**Tabla VIII.** Secuencias obtenidas del *RDPII* con mayor similitud para cada OTU (pariente más cercano) y distribución de las OTUs en las genotecas de suelo (S) y rizosfera (R).

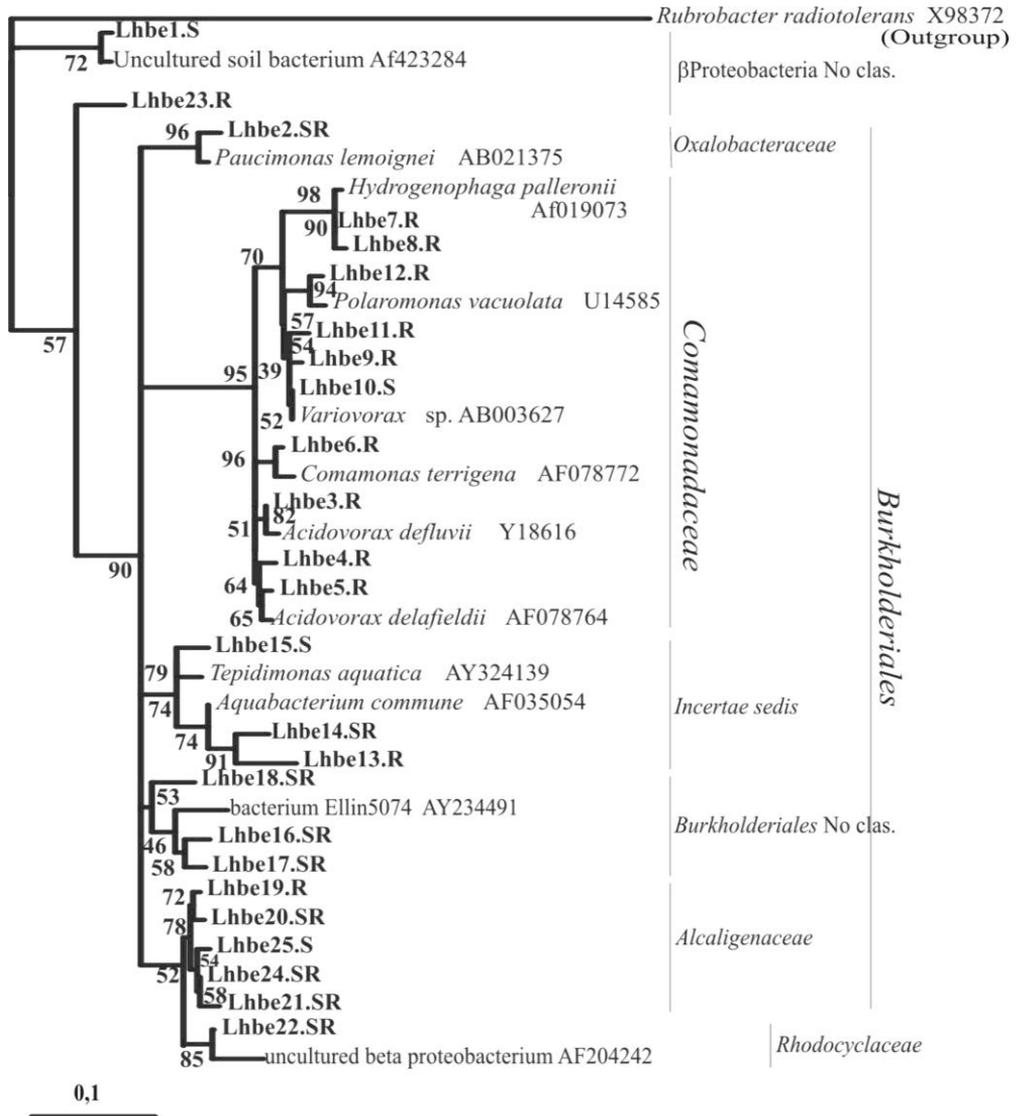
Lh ac2	1154	1 -1	Uncultured <i>Actinobacterium</i> ; AJ581630	96,6	”
Lh ac3	1154	2 -1	Uncultured <i>Actinobacterium</i> ; AJ581630	96,4	”
Lh ac4	1153	1 -3	Uncultured <i>Actinobacterium</i> ; AJ581606	95,8	“
Lh ac5	1156	3 -1	Uncultured bacterium; AJ576407	97,2	”
Lh ac6	1158	3 -1	<i>Mycobacterium</i> sp. Ellin151; AF408993	97,8	”
Lh ac7	1159	4 -6	<i>Microbacterium</i> sp. V4.BE.51; AJ244679	98,9	”
Lh ac8	1159	2 -4	<i>Curtobacterium</i> sp. VKM; AB042093	97,2	”
Lh ac9	1165	1 -4	<i>Streptomyces</i> sp. R46S; AY572485	99,5	”
Lh ac10	1165	1 -2	<i>Streptomyces</i> <i>ciscaucasicus</i> ; AY508512	99,6	”
Lh ac11	1165	4 -0	<i>Streptomyces</i> sp.; Y10842	99,6	”
Lh ac12	1157	0 -1	Uncultured <i>Actinobacterium</i> ; AY250884	98,4	”
Lh ac13	1164	2 -0	Uncultured bacterium; AB179534	96,7	”
Lh ac14	1164	6 -4	Uncultured sludge bacterium A21; AF234742	96,0	”
Lh ac15	1186	1 -1	Unidentified eubacterium EA25; U51864	97,9	”
Lh ac16	1186	0 -1	Uncultured <i>Xiphinematobacteria</i> <i>ceae</i> ; AY395325	98,4	”
Lh ac17	1183	0 -1	Bacterium Ellin507; AY960770	96,7	”

**Tabla VIII.** Secuencias obtenidas del *RDPII* con mayor similitud para cada OTU (pariente más cercano) y distribución de las OTUs en las genotecas de suelo (S) y rizosfera (R).

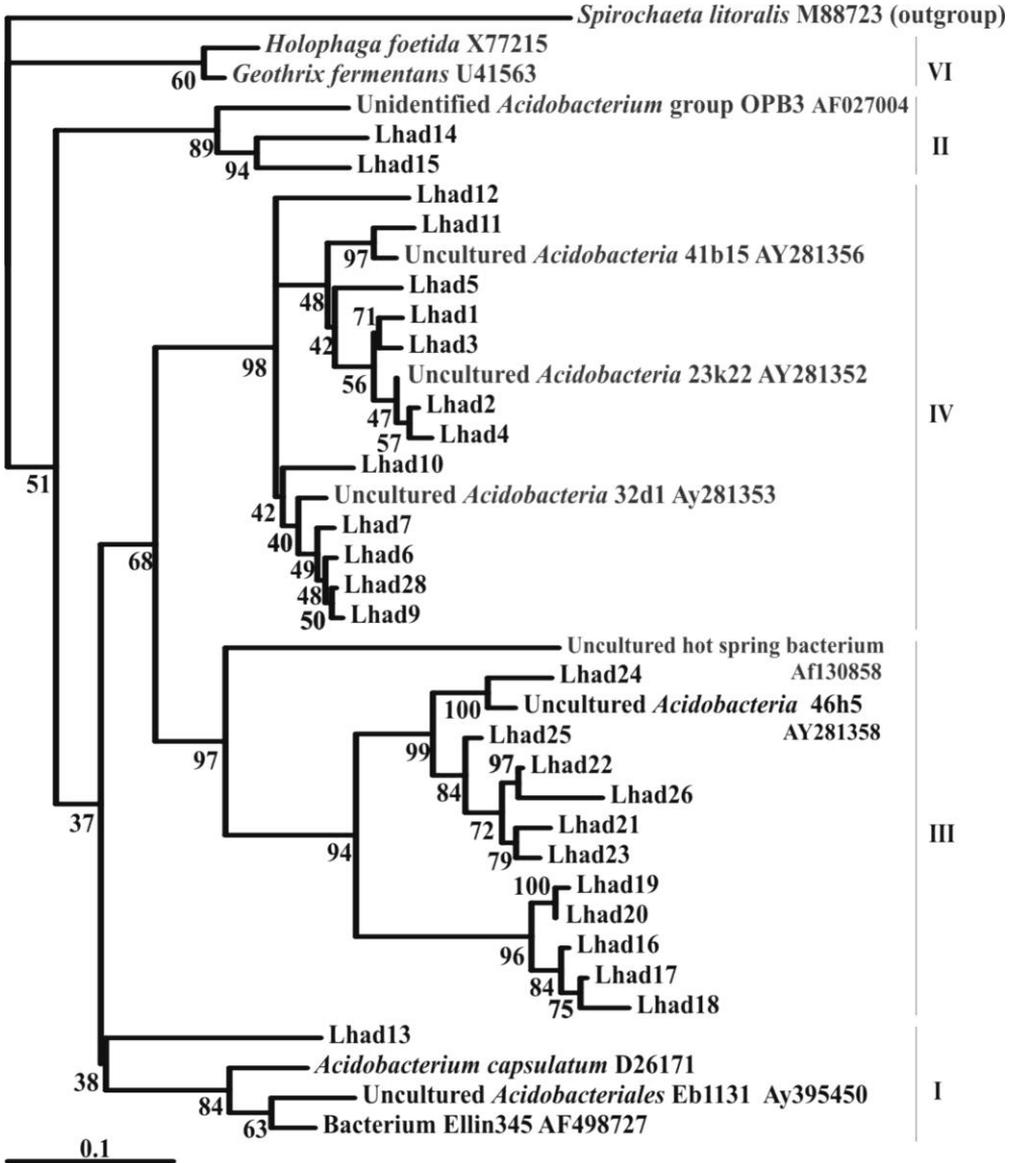
Lh ac18	1182	1 -2	Uncultured bacterium; 139ds10; AY212589	98,4	”
Lh ac19	1176	1 -3	Uncultured <i>Verrucomicrobia</i> ; AJ575731	86,2	”
Lh ac20	1182	2 -0	Uncultured bacterium; KD4-60; AY218640	98,9	”
Lh ac21	1186	3 -2	Uncultured <i>Verrucomicrobia</i> ; AY921923	95,4	”
Lh ac22	871	1 -0	<i>Streptomyces</i> <i>phaeochromogenes</i> ; AF500071	99,5	”



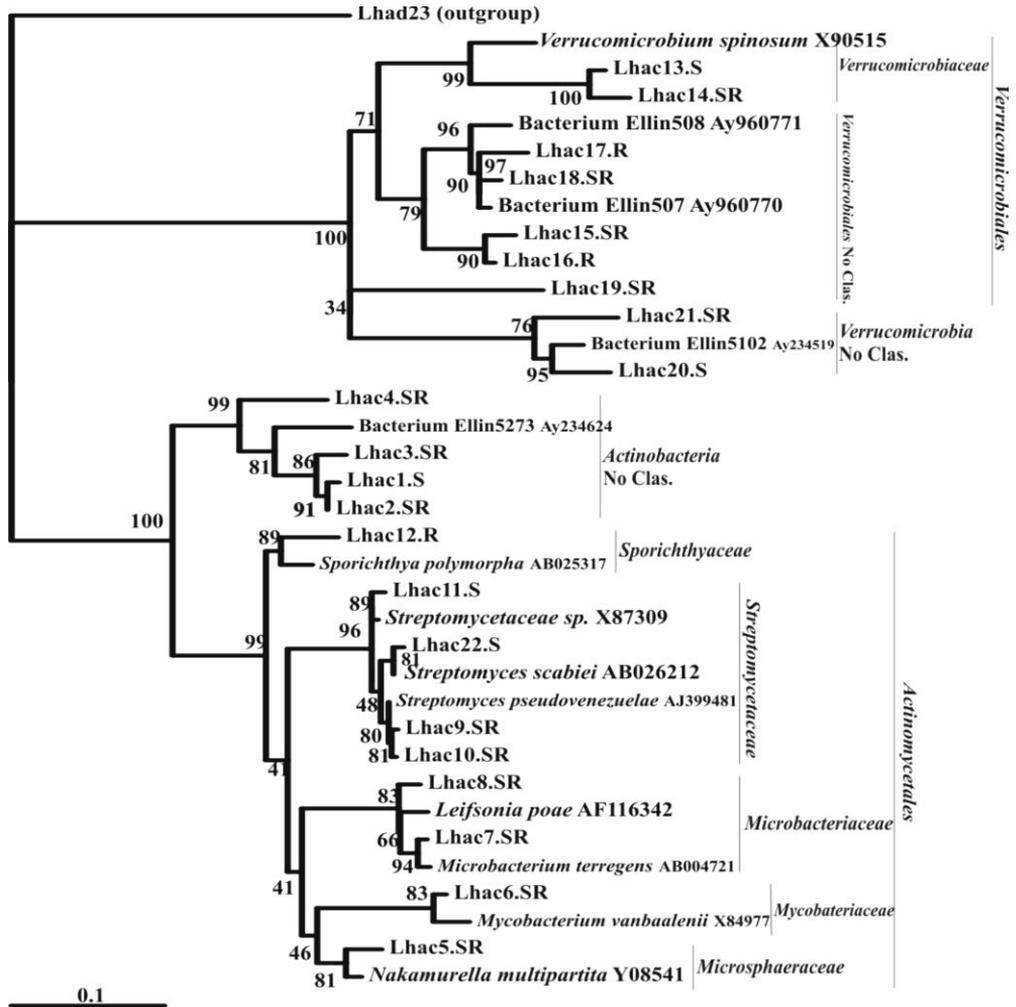
**Figura 4.** Árbol filogenético representando las relaciones filogenéticas entre las secuencias de  $\alpha$ -Proteobacteria encontradas en suelo (S) y rizosfera (R), o en ambos (SR) y secuencias de las bacterias cultivadas más similares obtenidas de RDPII. Los números en los nodos son valores de verosimilitud (1000 repeticiones) las particiones por debajo del 50% se han incluido siempre que no contradijesen particiones que ocurriesen igual o mas veces. Las afiliaciones taxonómicas se obtuvieron empleando el clasificador de RDPII. La barra de 0,1 es una medida de distancia evolutiva.



**Figura 5.** Árbol filogenético representando las relaciones filogenéticas entre las secuencias de  $\beta$ Proteobacteria encontradas en suelo (S) y rizosfera (R), o en ambos (SR) y secuencias de las bacterias cultivadas más similares obtenidas de RDPII. Los números en los nodos son valores de verosimilitud (1000 repeticiones) las particiones por debajo del 5 0% se han incluido siempre que no contradijesen particiones que ocurriesen igual o mas veces. Las afiliaciones taxonómicas se obtuvieron empleando el clasificador de RDPII. La barra de 0,1 es una medida de distancia evolutiva.



**Figura 6.** Árbol filogenético representando las relaciones filogenéticas entre las secuencias *Acidobacteria* encontradas en suelo (S) y rizosfera (R), o en ambos (SR) y secuencias más similares obtenidas de RDPII. Los números en los nodos son valores de verosimilitud (1000 repeticiones) las particiones por debajo del 50% se han incluido siempre que no contradijesen particiones que ocurriesen igual o más veces. La agrupación taxonómica se ha realizado de acuerdo con Barns y col. (Barns et al., 1999). La barra de 0,1 es una medida de distancia evolutiva.



**Figura 7.** Árbol filogenético o representando las relaciones filogenéticas entre las secuencias de *Actinobacteria* (y *Verrucomicrobia*) encontradas en suelo (S) y rizosfera (R), o en ambos (SR) y secuencias de las bacterias cultivadas más similares obtenidas de RDPII. Los números en los nodos son valores de verosimilitud (1000 repeticiones) las particiones por debajo del 50% se han incluido siempre que no contradijesen particiones que ocurriesen igual o mas veces. Las afiliaciones taxonómicas se obtuvieron empleando el clasificador de RDP II. La barra de 0,1 es una medida de distancia evolutiva.

### 5.1.2. Comparación estadística entre las genotecas derivadas de suelo y rizosfera

Se realizó un análisis estadístico de las diferencias entre las genotecas derivadas de suelo y rizosfera (ver Tabla IX) comparando la diversidad genética dentro de cada genoteca respecto a la diversidad genética total combinada (comparación mediante  $F_{ST}$ ). Los resultados obtenidos indican diferencias significativas entre ambas genotecas para todos los grupos excepto el de *Actinobacteria*. Los mismos resultados se obtuvieron al analizar las diferencias entre curvas de cobertura homólogas y heterólogas mediante un estadístico de tipo Cramér-von Mises y comparados por un procedimiento de Monte Carlo (comparación mediante  $\int$ -LIBSHUFF).

**Tabla IX.** Análisis estadístico de las diferencias entre genotecas derivadas de suelo y rizosfera.

Genoteca	Fst (p-valor)	$\int$ -LIBSHUFF p-valor (XY/YX)
$\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	0,034 (0,00±0,00)*	0,046 / 0,000*
$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	0,06 (0,00±0,00)*	0,057 / 0,002*
<i>Acidobacteria</i>	0,09 (0,00±0,00)*	0,006 / 0,004*
<i>Actinobacteri</i>	0,01 (0,64±0,01)	0,420 / 0,448
<i>a</i> ISP $\alpha$	0,10 (0,00±0,00)*	0,002 / 0,001*

\*Estadísticamente significativo ( $\alpha$  0,05)

### 5.1.3. Análisis de los perfiles fisiológicos de las comunidades de suelo y rizosfera

No se observaron diferencias significativas comparando los índices de diversidad de Shannon de ambas comunidades, basados en el uso de 31 fuentes de carbono ecológicamente relevantes (Choi & Dobbs, 1999) ( $3,00 \pm 0,05$  para el suelo contra  $2,92 \pm 0,07$  para la rizosfera). No obstante, se observó una diferencia significativa entre ambas comunidades atendiendo a los perfiles fisiológicos ( $p < 0,02$ ).

#### **5.1.4. Estudio de la diversidad de los genes ISP $\alpha$ de la familia tolueno/bifenilo dioxigenasas**

Se empleó una estrategia basada en la amplificación por PCR, clonaje y posterior análisis por TGGE, para la detección y discriminación de los genes ISP $\alpha$  de la familia tolueno/bifenilo dioxigenasas presentes en las muestras de suelo y rizosfera. De esta forma se analizaron 48/47 (suelo/rizosfera) clones, que dieron lugar a 28 OTUs diferentes.

La metodología empleada fue capaz de discriminar entre fragmentos casi idénticos (como LhISP8 y LhISP4) con tan solo 2 pb de diferencia en secuencias de 454 pb. Como era esperable, todas las secuencias obtenidas fueron designadas como “dioxigenasas Rieske de hierro no hemo” al ser analizadas mediante el programa *BLAST*. La secuencia peptídica deducida de las secuencias obtenidas osciló entre el 37% (LhISP1) y el 100% (LhISP24) de similitud respecto a secuencias de ISP $\alpha$  previamente descritas (ver Tabla X). La gran mayoría de las secuencias encontradas contiene los residuos considerados característicos de estas enzimas (numeración de *P. fluorescens* IP01 *cumene dioxygenase* [IP01-CumDO]): His234 e His240; que se encuentran envueltos en la coordinación del hierro mononuclear en el centro activo, Asp231; relacionado con el puente de transferencia electrónica (Furusawa *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2005), y los residuos Glu226, Gln227 y Tyr233 (o los equivalentes Glu/Asp, Gln/Asn y Tyr/His); los cuales probablemente estén

envueltos en la transferencia electrónica mediante la conexión del centro catalítico al centro Rieske de la subunidad vecina (Yeates *et al.*, 2000).

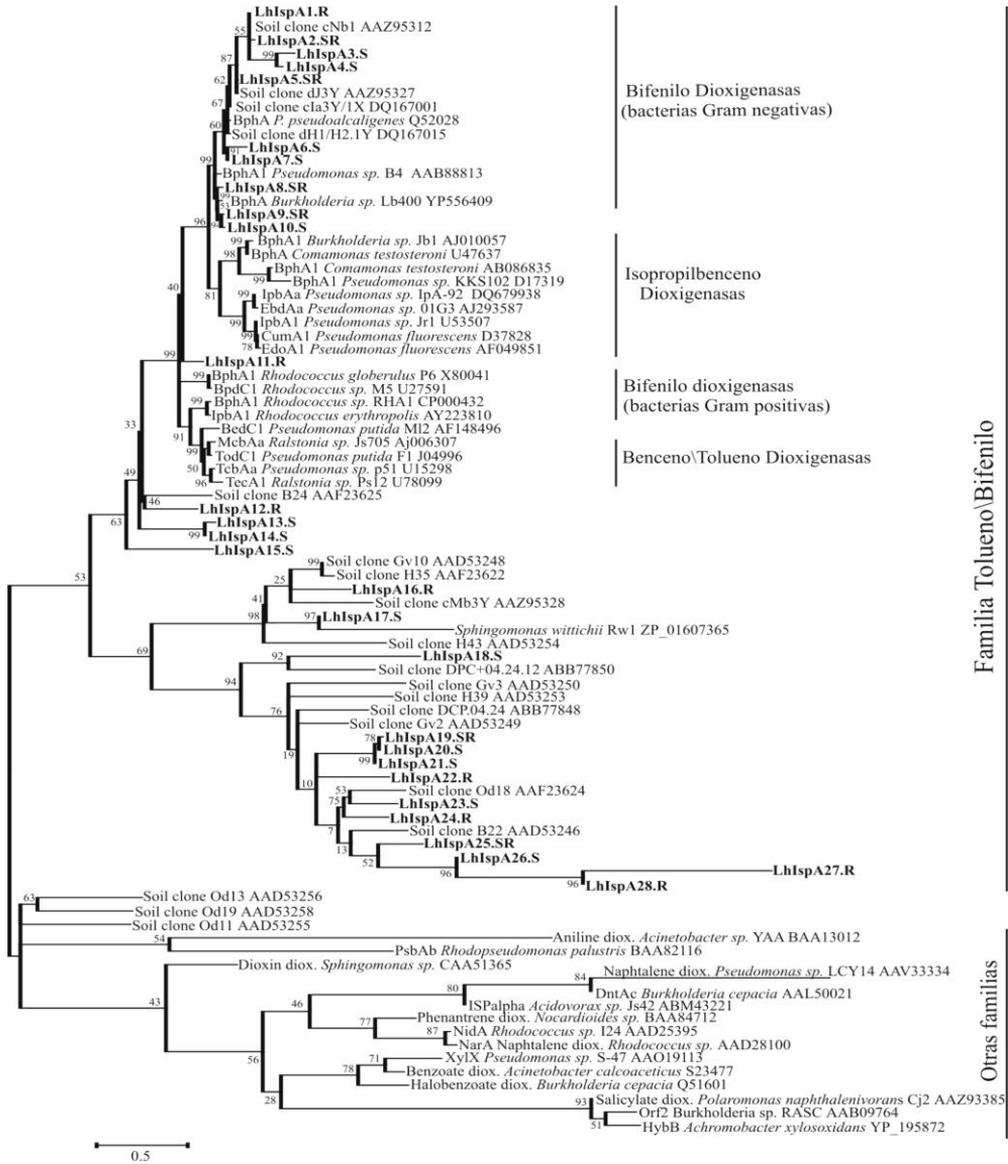
**Tabla X.** Secuencias obtenidas de las bases de datos con mayor similitud a las OTUs de ISP $\alpha$  (pariente más cercano), y su distribución en las genotecas de suelo y rizosfera (S y R).

n	Clo	Ta maño	S -R	Pariente más cercano	Similitud (%)*
SP1	LhI	4	1	Uncultured bacterium; ABB77850.1	27,4/59,0
SP2	LhI	4	2	<i>Ralstonia eutropha</i> H850; CAD67505.1	95,6/98,1
SP3	LhI	4	1	Australian soil clone OD18; AAF23624.1	55,0/63,0
SP4	LhI	4	2	Australian soil clone GV2; AAD53249.1	56,5/68,0
SP5	LhI	4	8	Australian soil clone GV2; AAD53249.1	55,2/67,1
SP6	LhI	4	0	Australian soil clone GV10; AAD53248.1	63,5/64,1
SP7	LhI	4	1	<i>Pseudomonas</i> sp. IC; AAZ95273.1	94,4/97,5
SP8	LhI	5	3	Australian soil clone GV2; AAD53249.1	55,9/67,5
SP9	LhI	4	4	Australian soil clone B24 ; AAF23625.1	50,8/65,6
SP10	LhI	4	0	<i>Pseudomonas putida</i> ; AAX45786.1	75,5/70,9
SP11	LhI	4	1	Uncultured bacterium; AAZ95312.1	83,7/95,8
SP12	LhI	4	2	Uncultured bacterium; AAZ95327.1	99,3/99,7
SP13	LhI	5	2	Australian soil clone H39; AAD53253.1	39,1/61,3
SP14	LhI	4	2	Uncultured bacterium; AAZ95307.1	92,5/94,1
SP15	LhI	4	1	<i>Sphingomonas wittichii</i> RW; ZP01607365.1	54,8/54,8
SP16	LhI	4	4	Uncultured bacterium; ABB77848.1	40,5/63,3
SP17	LhI	5	0	Australian soil clone H39; AAD53253.1	37,0/60,1
SP18	LhI	4	0	Australian soil clone GV2; AAD53249.1	49,6/61,1

LhI	4	2	Australian soil clone B24;	43,4/61,3
SP19	78	-0	AAF23625.1	
LhI	4	1	Uncultured bacterium;	96,3/96,9
SP20	93	-1	AAZ95312.1	
LhI	4	0	Australian soil clone B24;	55,0/65,8
SP21	69	-2	AAF23625.1	
LhI	4	0	Australian soil clone OD18;	59,2/69,1
SP22	78	-1	AAF23624.1	
LhI	4	0	Australian soil clone H39;	38,8/60,8
SP23	96	-2	AAD53253.1	
LhI	4	0	Uncultured bacterium;	100/100
SP24	81	-4	AAZ95312.1	
LhI	4	1	Uncultured bacterium;	86,8/93,1
SP25	84	-0	AAZ95307.1	
LhI	3	3	Australian soil clone B24	46,0/62,7
SP26	94	-0	AAF23625.1	
LhI	4	6	<i>Ralstonia eutropha</i> H850;	95,0/97,5
SP27	84	-1	CAD67505.1	
LhI	4	1	Uncultured bacterium,	86,8/92,5
SP28	84	-0	AAZ95312.1	

\* peptídica/nucleotídica

El análisis filogenético de las secuencias peptídicas deducidas (ver Figura 8) muestra que todas ellas son miembros de la subfamilia de las tolueno/bifenilo dioxigenasas; muchas secuencias se agruparon con secuencias del grupo de las bifenilo dioxigenasas de bacterias Gram negativas, mientras que ninguna se agrupó con los grupos de las isoprobilbenceno, tolueno/benceno y bifenilo dioxigenasas de bacterias Gram positivas (agrupación de acuerdo con Witzig y colaboradores (Witzig *et al.*, 2006)). Otras secuencias (LhISP10, LhISP26, LhISP9, LhISP10 y LhISP19) no pudieron ser asignadas sin ambigüedad a ninguno de los grupos previamente descritos. Sorprendentemente, muchas secuencias se agruparon en un clúster solo representado previamente por secuencias deducidas de algunos clones ambientales y una dioxigenasa putativa de *Sphingomonas wittichii* RW1. Como era esperado, ninguna de las secuencias encontrada se agrupó con miembros de las otras subfamilias incluidas en el análisis.



**Figura 8.** Árbol filogenético representando las relaciones filogenéticas entre las secuencias peptídicas deducidas de las ISP $\alpha$  encontradas en suelo (S), rizosfera (R), o en ambos (SR), y secuencias muy similares obtenidas de BLAST, y otras secuencias específicas de grupo. Los números en los nodos son valores de *bootstrap* (1000 repeticiones), las particiones por debajo del 50% se han incluido siempre que no contradijesen particiones que ocurriesen igual o más veces. Las afiliaciones taxonómicas se han realizado de acuerdo con lo propuesto por Witzig y colaboradores (Witzig et al., 2006). La barra de 0,1 representa porcentaje de divergencia.

A)	227	228	232	235	240	278	284	288	321	323	333	336	378	384
<b>CumA1</b>	Q	F	M	A	H	F	L	I	A	H	L	I	F	Y
LhIspA1	Q	F	M	A	H	F	M	V	G	H	L	I	F	F
LhIspA2	Q	F	M	F	H	F	M	V	G	H	L	I	F	F
LhIspA3	X	V	V	X	H	F	M	V	G	H	L	I	F	F
LhIspA4	I	L	C	P	T	F	M	V	G	H	L	I	F	F
LhIspA5	Q	F	M	A	H	F	M	V	G	H	L	I	F	F
LhIspA6	Q	F	D	I	H	Y	T	V	G	H	L	I	F	F
LhIspA7	Q	F	M	V	H	Y	T	V	G	H	L	I	F	F
<b>BphA1</b>	Q	F	M	A	H	Y	T	V	G	H	L	I	F	F
LhIspA8	Q	F	M	A	H	Y	N	L	G	H	L	I	F	F
LhIspA9	Q	F	M	A	H	Y	S	L	G	H	L	M	F	F
LhIspA10	Q	F	M	A	H	Y	S	L	G	H	L	M	F	F
<b>BphA</b>	Q	F	M	A	H	F	I	V	G	H	L	I	F	F
LhIspA11	Q	F	M	A	H	Y	M	I	V	H	L	I	F	F
<b>BpdC1</b>	Q	F	M	V	H	Y	T	V	G	H	L	I	F	F
<b>TodC1</b>	Q	F	M	A	H	Y	L	I	V	G	H	L	I	F
LhIspA12	Q	F	M	A	H	F	-	L	G	H	L	I	F	L
LhIspA13	-	-	-	-	-	H	L	I	G	H	L	I	F	F
LhIspA14	Q	F	M	A	H	H	L	I	G	H	L	I	F	F
LhIspA15	Q	F	M	V	H	Y	I	I	S	H	L	V	F	F

B)	227	228	232	235	240	278	284	288	321	323	333	336	378	384
<b>S. w. RW1</b>	N	S	P	N	H	I	-	V	S	L	H	P	S	T
LhIspA16	N	F	L	N	H	L	-	K	V	G	H	P	S	T
LhIspA17	N	F	M	T	H	F	-	V	I	P	H	P	S	T
LhIspA18	D	N	F	S	H	A	-	E	V	N	F	W	L	M
LhIspA19	N	V	F	-	H	E	-	N	L	H	T	Y	F	L
LhIspA20	N	V	F	-	H	E	-	N	L	H	T	Y	F	L
LhIspA21	N	V	F	-	H	E	-	N	L	H	T	Y	F	L
LhIspA22	N	V	Y	-	H	Q	-	N	S	H	T	N	F	L
LhIspA23	N	V	F	P	H	E	-	R	S	H	T	A	F	L
LhIspA24	N	V	F	P	H	E	-	R	S	H	T	F	F	L
LhIspA25	N	L	F	G	H	R	-	K	Q	H	T	-	F	W
LhIspA26	N	L	F	A	H	T	-	G	A	H	T	-	F	L
LhIspA27	N	L	F	P	H	S	-	-	S	H	X	-	X	X
LhIspA28	N	L	F	P	H	S	-	-	S	H	A	-	F	L

**Figura 9.** Residuos que contribuyen a la superficie interna del bolsillo de unión al sustrato del enzima CumDO de la cepa IP01 (CumA1, en gris) y sus contrapartidas en las secuencias peptídicas deducidas encontradas en este estudio. (A; clúster principal. B; secuencias del clúster de *S. wittichii* RW1). Los números superiores corresponden a la secuencia CumA1 de IP01. Los residuos conservados se muestran en gris y los altamente conservados en negrita. Se muestran también secuencias representativas de cada grupo (en negrita).

Al estudiar los aminoácidos equivalentes a los 14 residuos responsables de la superficie interna del centro activo en el bolsillo de unión al sustrato de la bien conocida ISP $\alpha$  de IP01-CumDO (Witzig *et al.*, 2006), se observó que las secuencias peptídicas deducidas de las secuencias obtenidas en este estudio contienen una gran diversidad (Figura 9). Los miembros del grupo principal (que comprende las secuencias agrupadas con las bifenilo dioxigenasas de Gram negativas más LhISP21, LhISP26, LhISP9, LhISP10 y LhISP19) poseen una media de 5 residuos diferentes con respecto a los 14 responsables del bolsillo de unión a sustrato en IP01. Estos residuos se encuentran concentrados en 5 posiciones (posiciones 235, 278, 284 y 336). Además, cabe destacar que todas las secuencias de este grupo poseen Gly321 y Phe384 fijos (en vez de Ala y Tyr en dichas posiciones). Sorprendentemente, algunas secuencias de este grupo carecen de residuos supuestamente importantes: LhISP28 carece aparentemente de centro activo, LhISP25 carece del residuo His234 y LhISP27 carece del residuo Asp231. LhISP15 y LhISP6 (presentes en el mismo subgrupo) tienen el residuo His240 en la posición 238 y Asn227 en vez de Gln.

Los miembros del grupo de *S. wittichii* RW1 poseen una media de 11 residuos diferentes en el bolsillo de unión al sustrato con respecto a IP01. Además, todos poseen Asp-Asn en vez de Glu226-Gln227, y LhISP17 y LhISP23 carecen de Asp231 en el centro activo.

### **5.1.5. Comparación de las genotecas de ISP $\alpha$ derivadas de suelo y rizosfera**

La comparación entre las genotecas de ISP $\alpha$  derivadas de suelo y rizosfera revela diferencias entre sus estructuras de genes catabólicos. Estas genotecas fueron estadísticamente diferentes de acuerdo con los tests estadísticos empleados (ver Tabla IX). Además, los índices de Shannon, diversidad nucleotídica y  $\theta(\pi)$  fueron

más elevados en la genoteca de suelo (ver Tabla VII). Por otro lado, hubo un fuerte descenso en la abundancia de secuencias del grupo de *S. wittichii* RW1 en la genoteca de rizosfera (pasó del 45,76% en la genoteca de suelo al 21,2% en la de rizosfera), especialmente en el grupo formado por las secuencias LhISP5, LhISP8 y LhISP4, que descendió del 27% al 4,2%. Sin embargo, en la genoteca de rizosfera hubo un gran aumento de las secuencias del grupo principal (del 54% al 68,6%), debido principalmente al aumento en la abundancia de las secuencias LhISP24 (0%-8,5%), LhISP10 (0%-19,1%) y especialmente LhISP7 (2%-40,4%). Aunque cabe destacar que también hubo un descenso en la abundancia de otros grupos dentro del clúster principal, como los formados por LhISP9-LhISP26 (14%-0%) y LhISP27-LhISP2 (16,6%-2,1%).

#### **5.1.6. Discusión**

El objetivo de este estudio fue evaluar los cambios funcionales y estructurales producidos en las comunidades bacterianas de un suelo contaminado por PCBs después de la introducción de una planta adecuada para la biorremediación (*Salix viminalis*). Esto fue llevado a cabo mediante la exploración por TGGE de genotecas (de los genes 16S ARNr e ISP $\alpha$ ) derivadas de suelo y rizosfera, agrupación de los clones en OTUs, secuenciación y análisis de los datos.

Debido al hecho de que los organismos que han podido ser cultivados hasta la fecha representan solo una pequeña fracción de la diversidad microbiana (Ward *et al.*, 1990), la extracción de ADN ambiental, amplificación por PCR de genes marcadores o relacionados con alguna función y subsiguiente análisis de los productos, es actualmente una estrategia ampliamente empleada en estudios de ecología microbiana, a pesar de los posibles sesgos introducidos por estos procedimientos (Wintzingerode *et al.*, 1997). En el presente estudio hemos intentado minimizar dicho sesgo empleando un método de extracción de ADN

específico para muestras de suelo, posterior purificación del extracto de los ácidos húmicos (que suelen co-extraerse con el ADN y son capaces de inhibir la reacción de PCR), y análisis de los productos resultantes en búsqueda de artefactos. No obstante, la amplificación diferencial de ciertas secuencias conduce inevitablemente a un cierto grado de sesgo en los resultados.

Con el fin de disminuir el esfuerzo de secuenciación reteniendo el máximo de poder de discriminación, elegimos explorar las genotecas empleando la técnica de TGGE. Dado que empleando esta técnica, amplicones con idéntica longitud migran en función de su estructura primaria y composición nucleotídica específica (Heuer *et al.*, 1997), los clones con idéntica movilidad electroforética fueron definidos como pertenecientes a la misma OTU. Felske y colaboradores (Felske *et al.*, 1998), y Bano y colaboradores (Bano & Hollibaugh, 2000), han demostrado que la exploración de clones por DGGE o TGGE es una fórmula eficiente y conveniente para detectar y recuperar las secuencias predominantes en una muestra. No obstante, se tomaron réplicas de cinco OTUs al azar (una de cada par de genotecas), que fueron secuenciadas, con el fin de confirmar que el agrupamiento basado en la movilidad electroforética en geles de TGGE era fiable. No se observaron diferencias entre las secuencias, lo que sugiere que el acercamiento empleado fue eficaz para este estudio.

La selección de los grupos bacterianos a analizar fue realizada dependiendo de los oligonucleótidos cebadores específicos de grupo presentes en la literatura y de la información publicada sobre los grupos más comúnmente presentes en suelos. La selección empleada permitió el estudio de entre 67%-70% de la diversidad bacteriana presente en las muestras de suelo y rizosfera. Además, las largas secuencias obtenidas con estos cebadores dieron gran cantidad de información filogenética, permitiendo el agrupamiento filogenético fino de las secuencias. Todos los pares de oligonucleótidos cebadores empleados fueron verdaderamente específicos de grupo, con la excepción de los cebadores específicos de

*Actinobacteria*, que también amplificaron secuencias pertenecientes a *Verrucomicrobia*.

En este estudio, se ha empleado una combinación de aproximaciones diferentes en el análisis de la información obtenida, con el fin de obtener conclusiones más robustas. En primer lugar, se obtuvieron una serie de descriptores para cada genoteca; el índice de diversidad de Shannon, la diversidad nucleotídica y la distribución filogenética de las secuencias (árboles filogenéticos). En segundo lugar se emplearon tres herramientas estadísticas distintas para analizar si existían diferencias entre genotecas derivadas de suelo o rizosfera; los tests  $F_{ST}$ ,  $\beta$ -LIBSHUFF y RDPII de comparación de genotecas. Además, también se analizaron los perfiles fisiológicos de ambas comunidades. Estos análisis ofrecen información diferente de las comunidades microbianas muestreadas y cada uno posee ventajas y limitaciones particulares (Martin, 2002).

En el presente estudio se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las comunidades de suelo y rizosfera para todos los grupos estudiados menos *Actinobacteria*, empleando análisis basados en la cobertura ( $\beta$ -LIBSHUFF) y en la diversidad genética ( $F_{ST}$ ) de las genotecas. Además, los perfiles catabólicos de ambas comunidades también fueron significativamente diferentes.

El alto grado de similitud encontrado entre las secuencias obtenidas en este estudio y sus parientes más cercanos encontrados en las bases de datos es remarcable, y probablemente se deba al gran esfuerzo llevado a cabo por los ecólogos microbianos durante los pasados años. Esto es especialmente cierto en el caso de *Acidobacteria*, cuyos miembros eran relativamente desconocidos hasta hace unos años (Barns *et al.*, 1999).

**Tabla XI.** Abundancia relativa de los distintos grupos filogenéticos analizados en este estudio (Suelo) y previamente descritos en suelos (General)\*

Par cebador	Suelo	General
$\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	25%	18,8%
$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	18,75%	10,0%
<i>Acidobacteria</i>	14,58%	19,7%
<i>Actinobacteri</i>	8,33%	12,7%
<i>a</i>		
Total	66,66%	61,2%

\*Adaptado del análisis de 32 genotecas del gen 16S ARNr de *Bacteria* preparadas de suelos diferentes (3398 clones) realizado por P.H. Janssen (Janssen, 2006).

Los valores de abundancia relativa de los distintos grupos filogenéticos estudiados caen dentro de los rangos previamente descritos en suelo (Tabla XI) y rizosfera (Smalla *et al.*, 2001). Es interesante la gran abundancia de secuencias de  $\beta$ -*Proteobacteria* presente en las genotecas de *Bacteria*, ya que también fue observada en otro sitio contaminado por PCBs en Wittenberg, Alemania (Nogales *et al.*, 1999; Nogales *et al.*, 2001), mientras que en la mayoría de estudios de suelo este grupo se encuentran en números relativamente bajos (Janssen, 2006). Más aún, una característica inusual del suelo de Wittenberg fue la abundancia de secuencias dentro de las  $\beta$ -*Proteobacteria* relacionadas con especies de *Variovorax* y *Burkholderia*, las cuales también están altamente representadas en nuestras genotecas de  $\beta$ -*Proteobacteria*. Nogales y colaboradores (Nogales *et al.*, 2001) especularon que dicha alta abundancia podía estar debida a la habilidad de estas bacterias para prosperar en suelo ácidos. Sin embargo, en nuestro caso el pH del suelo (7,2) no puede ser tomado como causa. El enriquecimiento de estas especies en suelos contaminados por PCBs con diferentes orígenes es digno de mención, ya que podría representar una selección debida a la presencia de PCBs. Nogales y colaboradores, (Nogales *et al.*, 1999) postularon también que si la concentración de

PCBs fuese suficientemente alta como para formar parte importante de la reserva de carbono y energía del suelo (como es en nuestro caso), algunas de las secuencias detectadas deberían indicar los organismos probablemente involucrados, directa o indirectamente, en la utilización de PCBs como fuente de carbono y/o energía. Siguiendo este razonamiento, podría ser que algunas especies de *Burkholderiales* tuviesen un rol funcional importante en la degradación bacteriana de PCBs en el suelo.

En un reciente estudio, basado en el análisis de las bacterias degradadoras de PCBs cultivables asociadas con la rizosfera de diferentes especies de árboles establecidos en un sitio contaminado por PCBs (Leigh *et al.*, 2006), se observó que los árboles del género *Salix* afectaban positivamente el tamaño de las poblaciones degradadoras de PCBs, en comparación con otras tres especies de árboles y con suelo sin raíces. Por tanto, si asumimos que esto también debería de ser cierto para las bacterias degradadoras de PCBs aún no cultivadas, las cuales deberían de ser la mayoría de las degradadoras de PCBs, algunos de los tipos enriquecidos en la rizosfera (principalmente especies de *Proteobacteria*) podrían representar degradadoras de PCBs.

Todas las secuencias de ISP $\alpha$  (putativas) obtenidas en este estudio parecen ser miembros de la subfamilia Tolueno/Bifenilo de las dioxigenasas Rieske no hemo, como queda demostrado por su identificación como tales empleando el programa BLAST y los análisis filogenéticos realizados. Las secuencias obtenidas muestran una gran diversidad con respecto a los enzimas de este grupo previamente descritos, tanto provenientes de especies cultivadas bien estudiadas como de clones ambientales. La mayoría de ellas contienen todos los aminoácidos que se piensa están relacionados con el funcionamiento del centro activo y aquellos que tienen un rol en la transferencia electrónica, por lo que probablemente codifican para enzimas funcionales (aunque algunas secuencias obtenidas parecen carecer de algunos de estos importantes residuos aminoacídicos). Dado que las muestras provienen de un

ambiente altamente contaminado por PCBs, no es sorprendente encontrar que muchas secuencias se agrupasen con la rama de las bifenilo dioxigenasas de bacterias Gram negativas, en vez de con los grupos de las isopropilbenceno y tolueno/benceno dioxigenasas. Sin embargo, la falta de secuencias relacionadas con las bifenilo dioxigenasas de bacterias Gram positivas es notable, ya que el 8% de los clones de *Bacteria* analizados en este estudio eran secuencias de *Actinobacteria*. Por otro lado, es sorprendente la existencia de un clúster de secuencias compuesto por muchas secuencias encontradas en este estudio pero solo algunas secuencias previamente descritas pertenecientes a clones ambientales y una ISP $\alpha$  putativa de *Sphingomonas wittichii* RW1. Dicho agrupamiento está claramente separado del resto de grupos y sin embargo contiene mucha más diversidad genética que el grupo principal de la subfamilia tolueno/bifenilo, tanto a nivel global como respecto a los residuos que definen la unión al sustrato en el centro activo.

Las muestras estudiadas contenían un alto grado de diversidad de genotipos catabólicos, como muestra el bajo grado de homología de muchas de las secuencias obtenidas (en comparación con secuencias de ISP $\alpha$  previamente descritas), la variabilidad encontrada en los residuos responsables para el funcionamiento del centro activo, y la gran variación observada en los residuos amioacídicos homólogos a aquellos que definen el bolsillo de unión al sustrato en IP01 y otras dioxigenasas. Esto sugiere que las dioxigenasas previamente descritas pueden no jugar un papel importante en el catabolismo de PCBs en el suelo estudiado.

La comparación entre las genotecas de ISP $\alpha$  derivadas de suelo y rizosfera reveló diferencias entre sus estructuras de genes catabólicos; se encontró que eran estadísticamente diferentes, y muchas secuencias estaban claramente distribuidas de forma diferenciada entre ambos ambientes. Dos secuencias de ISP $\alpha$  dominaban la rizosfera; LhISP8 y LhISP11, representando entre las dos casi el 60% de la genoteca. Estas secuencias muestran una máxima similitud con ISP $\alpha$  putativas de

*Pseudomonas* sp. IC (identidad del 94,4%) y *Pseudomonas putida* (identidad del 75,5%) respectivamente. No sería sorprendente descubrir que estos genes pertenecen a especies de *Pseudomonas*, ya que se sabe que son excelentes colonizadores de rizosfera (Lugtenberg *et al.*, 2001). Por tanto sería interesante identificar tanto las cepas que posean estos genes como el rango de sustratos que dichos enzimas putativos pudiesen emplear, con el fin de estudiar su posible utilidad en la biorremediación mediada por *Salix viminalis*.

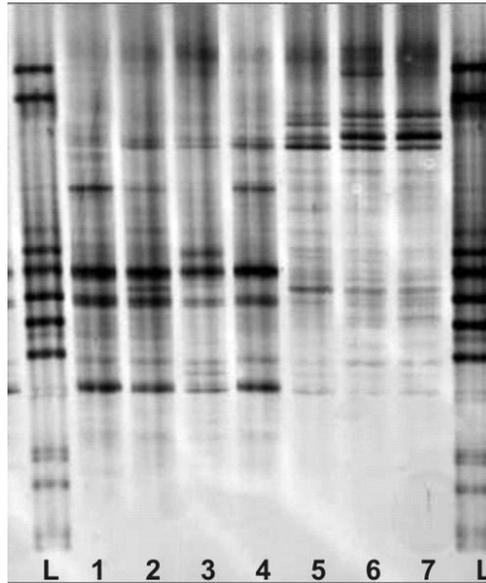
## **5.2 ANÁLISIS DEL IMPACTO CAUSADO POR LA INTRODUCCIÓN DE SISTEMAS INTEGRADOS PLANTA-MICROORGANISMO MODIFICADO GENETICAMENTE (MMG) EN LA POBLACIONES MICROBIANAS NATIVAS**

### **5.2.1. Degradación de PCBs**

Con el fin de determinar la eficiencia de las cepas de MMGs en la degradación de PCBs bajo las condiciones de suelo en microcosmos, se midió la concentración de PCBs presente inicialmente y durante cada muestreo. La concentración inicial, medida como la suma de seis congéneres indicadores recomendados (ver Métodos) fue de  $182 \pm 22$  mg de PCBs/Kg de suelo seco. Después de 168 días, las concentraciones de PCBs de los distintos tratamientos fueron:  $186 \pm 31$  mg/Kg para el tratamiento con la cepa salvaje F113rif (TS),  $164 \pm 78$  mg/kg para F113pcb (MMG1) y  $158 \pm 16$  mg/Kg para F113::1180L (MMG2). El análisis estadístico de los datos de los muestreos demuestra diferencias significativas entre el tratamiento con TS y los tratamientos con MMG1 ( $p < 0,013$ ) y MMG2 ( $p < 0,009$ ), pero no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con MMG1 y MMG2.

### **5.2.2. Análisis de los cambios estructurales en la comunidad de *Bacteria***

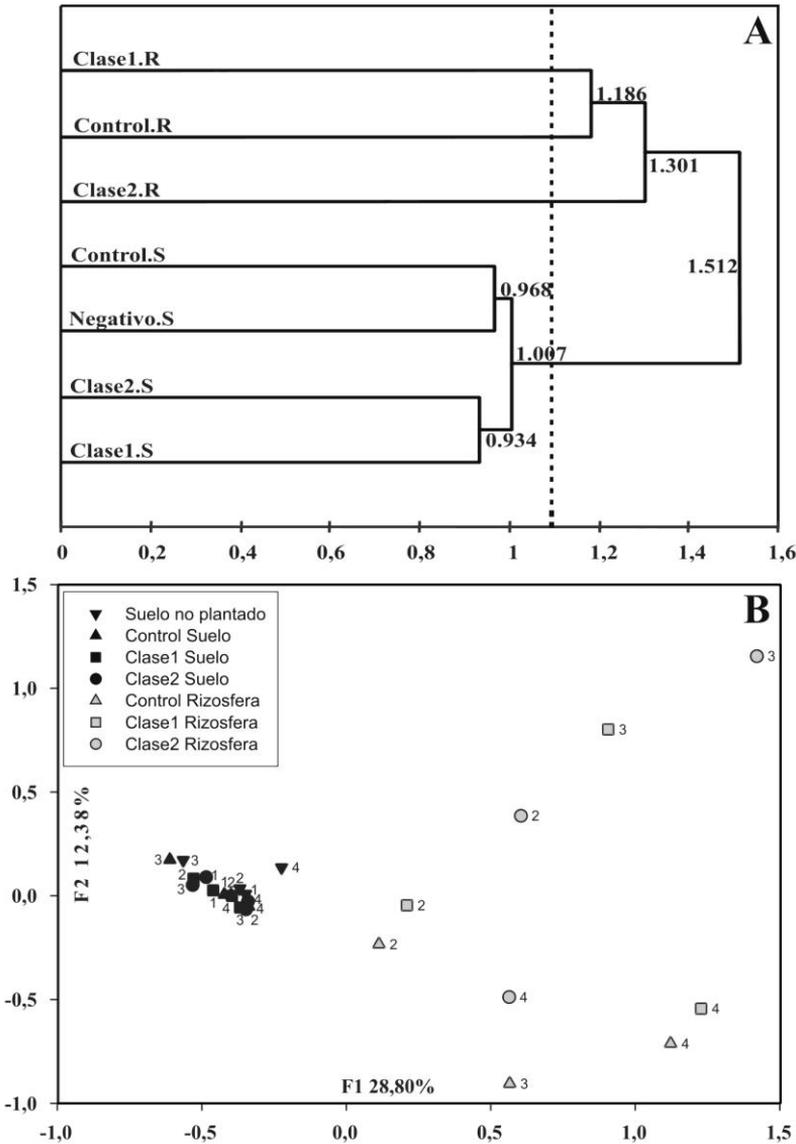
Con el fin de observar las diferencias en las estructuras de las comunidades microbianas estudiadas, se generaron perfiles genéticos mediante la amplificación por PCR de los genes 16S ARNr presentes en el ADN obtenido de las muestras, seguido de la separación específica de secuencia por medio de TGGE (ver Figura 10).



**Figura 10.** Ejemplo de patrones de TGGE correspondientes al segundo muestreo (28 días) de  $\alpha$ -*Proteobacteria*. L, marcador específico de grupo. 1-7, tratamientos: suelo no plantado, suelo TS, suelo MMG1, Suelo MMG2, rizosfera TS, rizosfera MMG1 y rizosfera MMG2.

Las disimilitudes medias entre los perfiles genéticos derivados de los diferentes tratamientos fue representada en dendrogramas (ver Figuras 11-15, **A**), con el fin de poder evaluar el efecto global de los tratamientos en la estructura de la comunidad. Además, para observar los cambios temporales producidos ocurridos en la estructura de las comunidades, los perfiles genéticos fueron sometidos a Análisis de Correspondencia (CA) (ver Figuras 11-15, **B**).

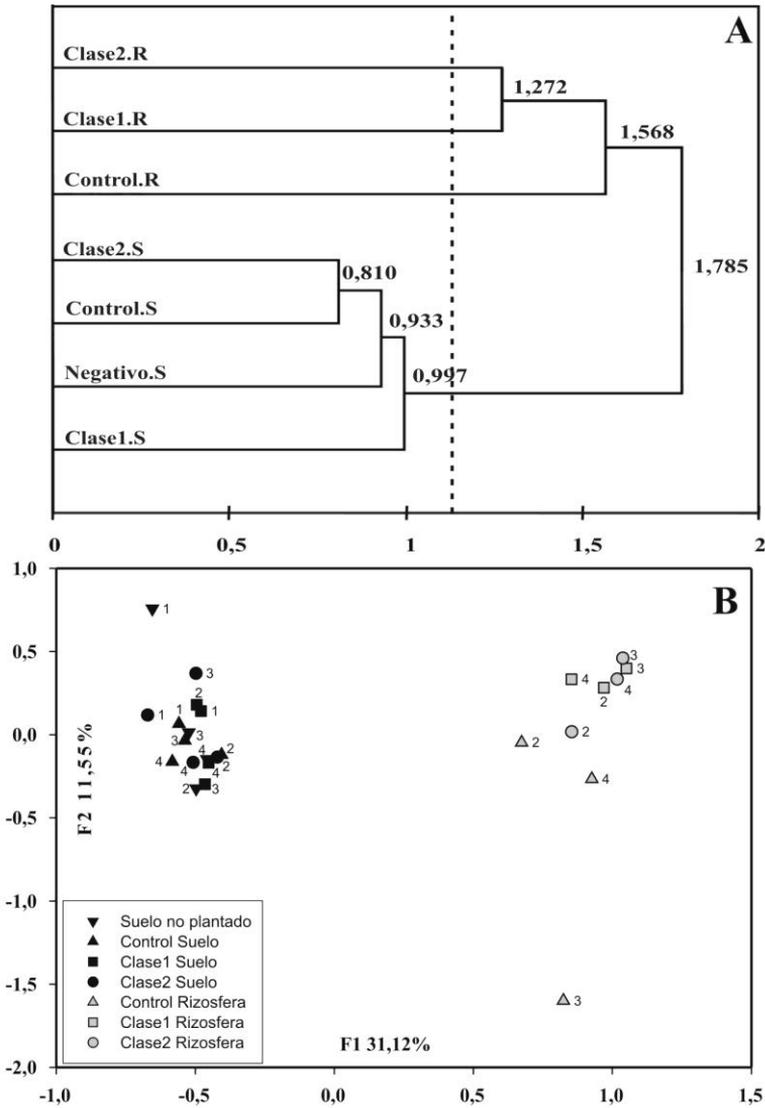
En el dendrograma derivado de los perfiles genéticos de *Bacteria* (Figura 11, **A**), los tratamientos fueron agrupados en cuatro clústeres significativos (línea discontinua), que estaban formados por los cuatro tratamientos de suelo en un clúster y los tres tratamientos de rizosfera en grupos separados. En el CA de esta comunidad pueden observarse resultados similares (Figura 11, **B**); existe una clara separación entre los perfiles de suelo y rizosfera, la cual creció con el tiempo.



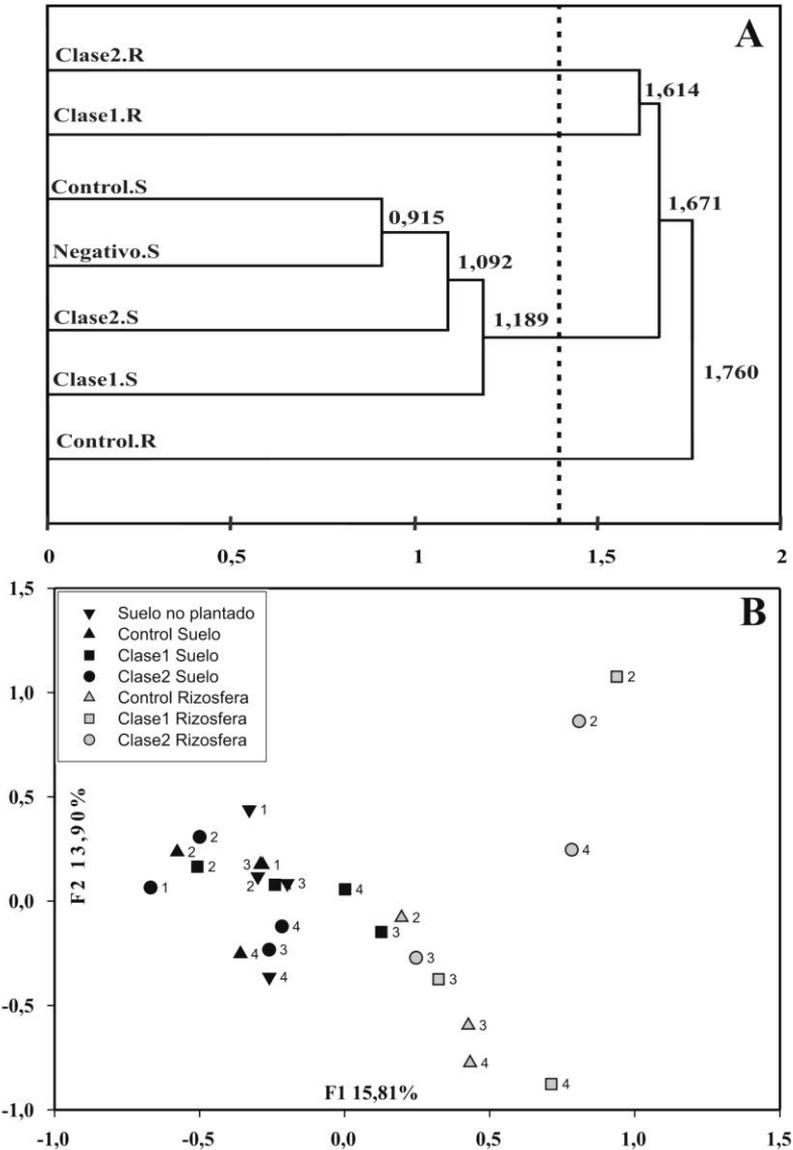
**Figura 11 .**

**A;** Dendrograma basado en las disimilitudes medias globales entre las comunidades de *Bacteria* de suelo (S) y rizosfera (R) derivadas de los perfiles genéticos de los diferentes tratamientos: Control ; F113rif. Clase1; F113pcb. Clase2; F113L::1180. Negativo; no plantado. Los valores en los nodos y abscisas representan disimilitudes  $\chi^2$ . La línea discontinua representa el valor de corte para grupos significativos.

**B;** Análisis de correspondencia (CA) basado en los perfiles genéticos de las comunidades de *Bacteria* de los distintos tratamientos y muestreos. Control; F113rif. Clase1; F1 13pcb. Clase2; F113L::1180 y suelo no plantado. Los números cercanos a los objetos representan los muestreos (1; 0 días. 2; 28 días. 3; 56 días. 4; 84 días). Los valores de los ejes representan el porcentaje de la varianza total explicada por cada dimensión.



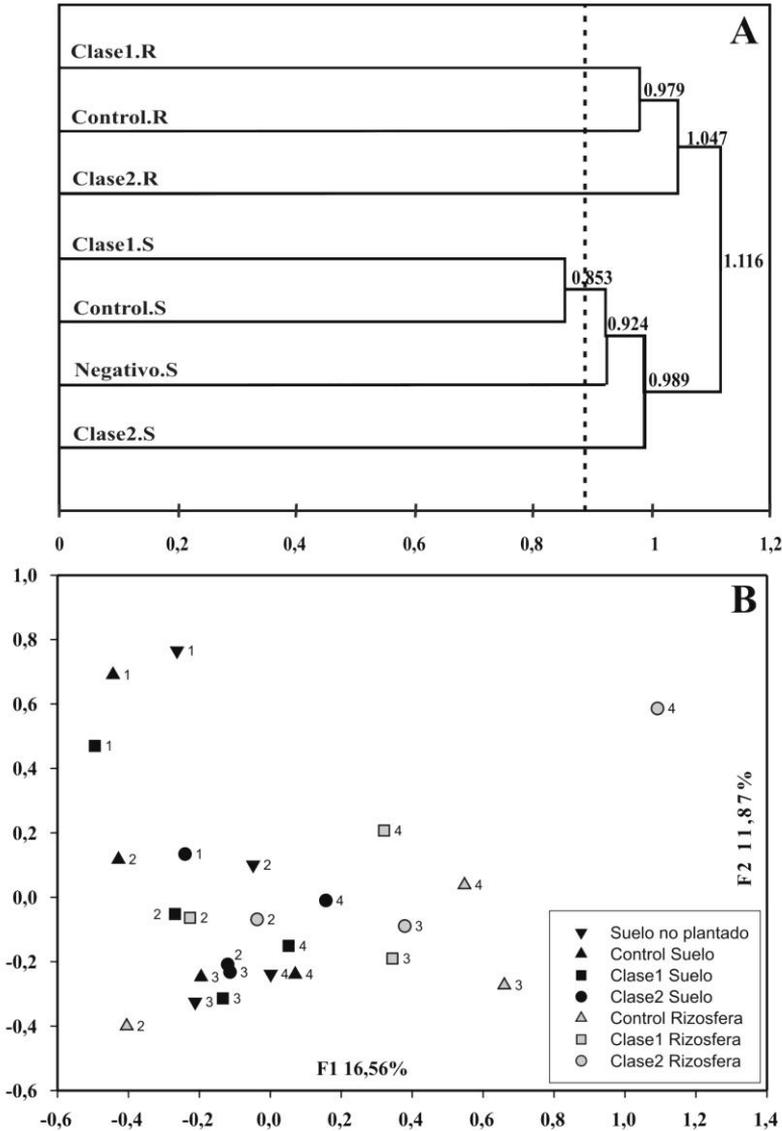
**Figura 12.**  
**A;** Dendrograma basado en las disimilitudes medias globales entre las comunidades de  $\alpha$  Proteobacteria de suelo (S) y rizosfera (R) derivadas de los perfiles genéticos de los diferentes tratamientos: Control ; F113rif. Clase1; F113pcb. Clase2; F113L::1180. Negativo; no plantado. Los valores en los nodos y abscisas representan disimilitudes  $\chi^2$ . La línea discontinua representa el valor de corte para grupos significativos.  
**B;** Análisis de correspondencia (CA) basado en los perfiles genéticos de las comunidades de  $\alpha$  Proteobacteria de los distintos tratamientos y muestreos. Control; F113rif. Clase 1; F113pcb. Clase2; F113L::1180 y suelo no plantado. Los números cercanos a los objetos representan los muestreos (1; 0 días. 2; 28 días. 3; 56 días. 4; 84 días). Los valores de los ejes representan el porcentaje de la varianza total explicada por cada dimensión.



**Figura 13.**

A; Dendrograma basado en las disimilitudes medias globales entre las comunidades de  $\beta$  *Proteobacteria* de suelo (S) y rizosfera (R) derivadas de los perfiles genéticos de los diferentes tratamientos: Control; F113rif. Clase1; F113pcb. Clase2; F113L::1180. Negativo; no plantado. Los valores en los nodos y abscisas representan disimilitudes  $\chi^2$ . La línea discontinua representa el valor de corte para grupos significativos.

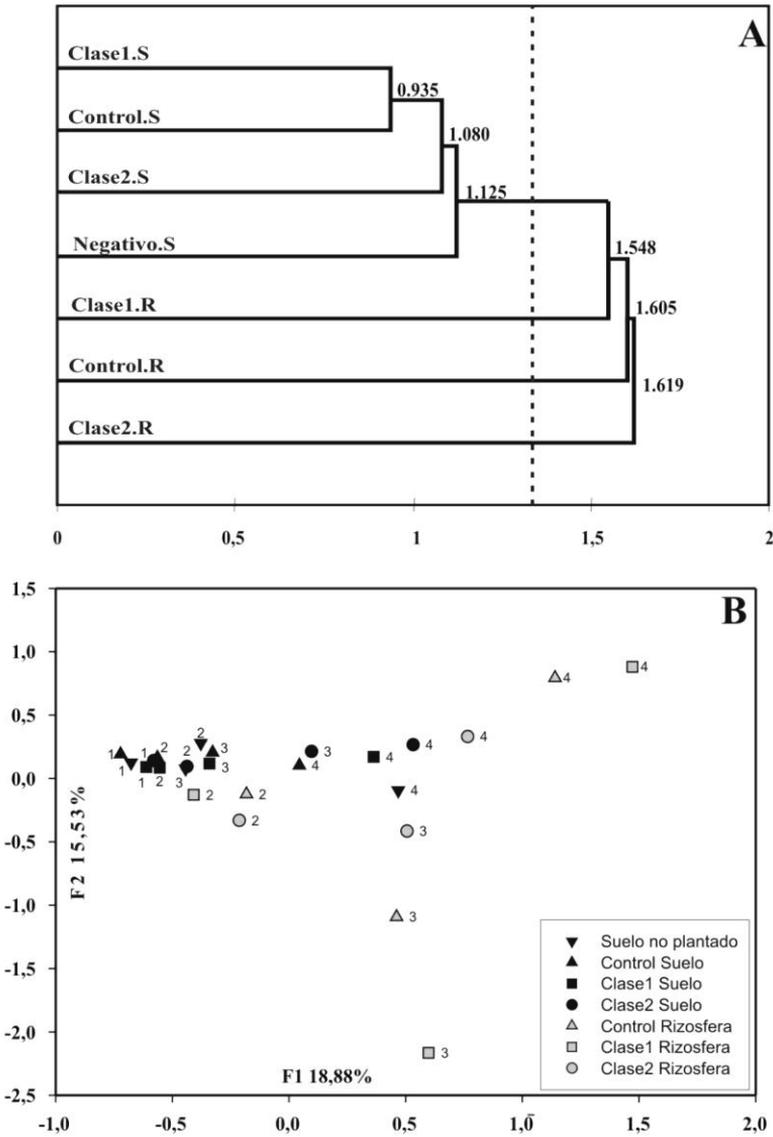
B; Análisis de correspondencia (CA) basado en los perfiles genéticos de las comunidades de  $\beta$  *Proteobacteria* de los distintos tratamientos y muestreos. Control; F113rif. Clase 1; F113pcb. Clase2; F113L::1180 y suelo no plantado. Los números cercanos a los objetos representan los muestreos (1; 0 días. 2; 28 días. 3; 56 días. 4; 84 días). Los valores de los ejes representan el porcentaje de la varianza total explicada por cada dimensión.



**Figura 14.**

**A;** Dendrograma basado en las disimilitudes medias globales entre las comunidades de *Acidobacteria* de suelo (S) y rizosfera (R) derivadas de los perfiles genéticos de los diferentes tratamientos: Control ; F113rif. Clase1; F113pcb. Clase2; F113L::1180. Negativo; suelo no plantado. Los valores en los nodos y abscisas representan disimilitudes  $\chi^2$ . La línea discontinua representa el valor de corte para grupos significativos.

**B;** Análisis de correspondencia (CA) basado en los perfiles genéticos de las comunidades de *Acidobacteria* de los distintos tratamientos y muestreos: Control; F113rif. Clase1; F113pcb. Clase2; F113L::1180 y suelo no plantado. Los números cercanos a los objetos representan los muestreos (1; 0 días. 2; 28 días. 3; 56 días. 4; 84 días). Los valores de los ejes representan el porcentaje de la varianza total explicada por cada dimensión.



**Figura 15.**

**A;** Dendrograma basado en las disimilitudes medias globales entre las comunidades de *Actinobacteria* de suelo (S) y rizosfera (R) derivadas de los perfiles genéticos de los diferentes tratamientos: Control; F113rif. Clase1; F113pcb. Clase2; F113L::1180. Negativo; no plantado. Los valores en los nodos y abscisas representan disimilitudes  $\chi^2$ . La línea discontinua representa el valor de corte para grupos significativos.

**B;** Análisis de correspondencia (CA) basado en los perfiles genéticos de las comunidades de *Actinobacteria* de los distintos tratamientos y muestreos. Control; F113rif. Clase1; F113pcb. Clase2; F113L::1180 y suelo no plantado. Los números cercanos a los objetos representan los muestreos (1; 0 días. 2; 28 días. 3; 56 días. 4; 84 días). Los valores de los ejes representan el porcentaje de la varianza total explicada por cada dimensión.

Los perfiles de suelo muestran una baja dispersión por tratamiento o muestreo, mientras que los perfiles de rizosfera muestran una mayor dispersión, con cambios temporales marcados. Los perfiles de rizosfera del tratamiento con MMG2 fueron muy diferentes de los del tratamiento con TS, mientras que los perfiles del tratamiento con MMG1 fueron intermedios, oscilando entre ser similares a los de TS o a los de MMG2 en muestreos diferentes. Por tanto, no se observa un efecto evidente debido a los tratamientos en la estructura de *Bacteria* del suelo. Sin embargo, los tratamientos tuvieron evidentes efectos diferentes sobre el desarrollo de la comunidad bacteriana rizosférica.

### **5.2.3. Análisis de los cambios estructurales en poblaciones bacterianas específicas**

Cuando se empleó el mismo procedimiento para analizar los cambios estructurales de poblaciones específicas de bacterias ( $\alpha$  y  $\beta$  *Proteobacteria*, *Acidobacteria* y *Actinobacteria*) se obtuvieron resultados similares a los obtenidos para *Bacteria* (Figuras 12-15, **A**); los distintos tratamientos se agruparon en cuatro clústeres para todas las poblaciones analizadas con la excepción de *Acidobacteria*. Estos cuatro clústeres estuvieron formados por las muestras de suelo en un grupo y las muestras de rizosfera en clústeres diferentes. Los valores de disimilitud entre los perfiles de suelo fueron bajos, mientras que los perfiles genéticos de los diferentes tratamientos en rizosfera fueron normalmente muy disimilares. Los gráficos de CAs (Figuras 12-15, **B**) también muestran una clara separación entre los perfiles de rizosfera y suelo para todos los grupos estudiados, fenómeno que normalmente aumentó con el tiempo. En la mayoría de los casos existe una baja dispersión entre los perfiles de suelo de los diferentes tratamientos. Por el contrario los perfiles de rizosfera presentan una mayor dispersión, con una marcada evolución temporal (excepto en el caso de  $\alpha$ -*Proteobacteria*).

Sin embargo, hubo diferencias interesantes entre los diferentes grupos estudiados: en el caso de las  $\alpha$ -*Proteobacteria* (Figura 12), las diferencias entre los perfiles de suelo y rizosfera fue muy alta desde el principio y no se evidenciaron cambios temporales. Para esta población, los dos tratamientos con MMG produjeron perfiles rizosféricos que fueron muy similares a lo largo del tiempo, mientras que se puede observar una diferencia constante entre éstos y el tratamiento con TS.

En el gráfico de  $\beta$ -*Proteobacteria* (Figura 13), los perfiles de rizosfera del tratamiento MMG2 fueron muy diferentes de los perfiles producidos por el tratamiento con TS, en dos de los tres muestreos, mientras que los perfiles producidos por el tratamiento con MMG1 oscilaron entre ser similares al control (tratamiento con TS) o al tratamiento con MMG2 en los diferentes muestreos.

En el caso de *Acidobacteria* (Figura 14, **A**), la disimilitud entre tratamientos fue baja, indicando la ausencia de efecto debido a tratamiento, aunque se observó una evidente diferencia entre los perfiles de suelo y rizosfera. La diferenciación entre los perfiles de suelo y rizosfera se desarrolló lentamente (Figura 14, **B**), y se observó una baja deriva temporal para las muestras de suelo. Por otro lado, la dispersión de los perfiles de suelo de *Acidobacteria* en los dos primeros muestreos fue sorprendentemente elevada, aunque se transformó con el tiempo en una disposición mucho más cerrada en los muestreos tercero y cuarto, similar a la observada en las otras poblaciones.

En el análisis de correspondencias de los perfiles de *Actinobacteria* (Figura 15, **B**), al igual que en el caso de *Acidobacteria*, la diferenciación entre los perfiles de suelo y rizosfera se desarrolló más lentamente, y también se observó una baja deriva temporal en las muestras de suelo.

Cuando se analizaron, mediante análisis de varianza, las disimilitudes de los tratamientos de suelo con MMGs y no plantado con respecto al suelo tratado con

TS, no se obtuvieron diferencias significativas, para todos los grupos estudiados, lo que indica que el posible efecto de los tratamientos con MMGs en las comunidades de suelo no fue mayor que el efecto de dejar el suelo sin plantar. Los índices de diversidad de Shannon basados en las abundancias relativas de los geles de TGGE fueron analizados mediante análisis de varianza, sin embargo no se obtuvieron diferencias significativas debidas al tratamiento o a la evolución temporal tanto en suelo como en rizosfera.

#### **5.2.4. Análisis de la función de la comunidad microbiana**

Se generaron perfiles fisiológicos de las muestras obtenidas con el fin de evaluar las posibles diferencias entre las funciones de las comunidades microbianas derivadas de los diferentes tratamientos y muestreos. Una vez analizados, se encontraron diferencias significativas entre los perfiles de muestreos diferentes para todos los tratamientos ( $p < 0,000$ ), lo que indica que la función de las comunidades experimentó una evolución temporal. Los perfiles de las comunidades de suelo fueron diferentes a los de su contrapartida rizosférica ( $P < 0,002$ ), lo cual no es sorprendente teniendo en cuenta el bien documentado efecto rizosférico (ver Introducción). Además, se observó que las plantas ejercieron un efecto en la función microbiana más allá de la rizosfera, ya que se observaron diferencias significativas comparando las comunidades de suelo derivadas de microcosmos con y sin plantas ( $p < 0,000$ ). No se detectaron diferencias significativas entre los perfiles fisiológicos de las comunidades de suelo con tratamientos diferentes, lo que indica que la función de las comunidades microbianas del suelo no se alteró debido a los tratamientos. Sin embargo, en el caso de la función de las comunidades rizosféricas sí se encontraron diferencias significativas para ambos tratamientos MMG1 ( $p < 0,035$ ) y MMG2 ( $p < 0,012$ ) al compararlos con el tratamiento TS, aunque no se observaron diferencias entre los tratamientos con MMGs. Estos resultados indican que ambos tratamientos con MMGs tuvieron un efecto sobre las poblaciones

microbianas de la rizosfera que fue diferente del causado por el tratamiento con el TS.

Los perfiles fisiológicos también fueron empleados para obtener una medida de la diversidad funcional de las comunidades basados en el índice de diversidad de Shannon, que fueron posteriormente comparados. Los resultados indican que las comunidades de suelo de los microcosmos con plantas fueron más diversas que aquellas provenientes de los microcosmos sin plantar (no plantado  $2,91 \pm 0,18$ ; plantado  $3,03 \pm 0,11$ ,  $p < 0,000$ ) y las comunidades rizosféricas fueron ligeramente más diversas que su contrapartida de suelo (suelo  $3,03 \pm 0,11$ ; rizosfera  $3,08 \pm 0,11$ ,  $p < 0,020$ ). Estos resultados, junto con los anteriores, demuestran que la presencia de plantas de Sauce alteró la función microbiana más allá de la rizosfera y la hizo más diversa.

No se observaron diferencias entre la diversidad catabólica de las comunidades de suelo con tratamientos diferentes, pero en las comunidades rizosféricas se observó un incremento significativo en la diversidad catabólica de los tratamientos MMG1 ( $3,16 \pm 0,05$ ,  $p < 0,001$ ) y MMG2 ( $3,14 \pm 0,1$ ,  $p < 0,017$ ) con respecto al tratamiento con TS ( $3,08 \pm 0,11$ ), aunque no se observaron diferencias entre ambos tratamientos con MMGs.

### **5.2.5. Discusión**

La introducción de dos cepas bacterianas modificadas genéticamente (con rasgos diseñados para la degradación de PCBs) en la rizosfera de plantas de sauce no tuvo efecto en las poblaciones bacterianas nativas de un suelo contaminado por PCBs comparado con la introducción de la cepa salvaje. Esto fue evidenciado tanto por los resultados obtenidos de la función microbiana como de la estructura genética bacteriana de las muestras:

a) No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los perfiles fisiológicos de las muestras provenientes de los distintos tratamientos (así como entre los índices de diversidad derivados de ellos), a pesar de que dicho acercamiento detectó cambios temporales, diferencias globales entre las poblaciones de microcosmos plantados y sin plantar, y diferencias entre las poblaciones de suelo y rizosfera.

Cuando se analizó la estructura genética de las comunidades bacterianas se obtuvieron resultados similares; los perfiles genéticos de las comunidades de muestras de suelo fueron homogéneos, como demuestra la baja dispersión que muestran en los análisis de correspondencias la mayoría de los grupos estudiados. Además, el hecho de que el método de agrupamiento empleado reuniese las poblaciones de suelo en un mismo clúster, y la evidencia de que el efecto de los tratamientos con MMGs no fuese significativamente mayor que el causado por la ausencia de raíces de sauce en los alrededores, sostienen la conclusión de que las comunidades de suelo no fueron perceptiblemente afectadas por la diferencia en el tratamiento recibido.

b) Por el contrario, la introducción de estos MMGs influyó el desarrollo de comunidades rizosféricas diferentes, ya que los perfiles fisiológicos de los tratamientos con MMGs difirieron de los de la cepa salvaje, y los perfiles genéticos también fueron diferentes, lo cual puede observarse no solo en los característicos HACs sino también en la dispersión observada en los análisis de correspondencias.

En los análisis específicos de grupo se observa un cuadro similar, aunque existen algunas diferencias debidas, por ejemplo, a efectos temporales o a la fuerza del efecto rizosférico, lo cual puede fácilmente explicarse aceptando que los diferentes grupos bacterianos estudiados puedan tener respuestas diferenciadas a la presencia de raíces en el ambiente o puedan responder más lentamente a los

cambios en los factores ambientales aplicados en el experimento, como los regímenes de riego, temperatura o iluminación aplicados.

Sin embargo, otras diferencias encontradas entre los distintos grupos estudiados merecen una mayor atención; en el caso de las  $\alpha$ -*Proteobacteria* parece claro, observando los niveles de disimilitud del dendrograma (Figura 12, **A**), que hubo mayores diferencias entre los tratamientos de rizosfera de lo que se puede deducir en el análisis de correspondencia (Figura 12, **B**). Esto puede explicarse por el hecho de que el análisis de correspondencia, que aspira a retener el máximo del total de la varianza de las muestras en dos dimensiones (Legendre & Legendre, 1998), fue probablemente sesgado por la presencia de alguna banda poco común en el tratamiento control de rizosfera del tercer muestreo (primera dimensión) y en el tratamiento de suelo sin plantar en el primer muestreo (segunda dimensión), condicionando de esta manera la posición de los perfiles respecto a estos factores, pudiendo enmascarar otras posibles diferencias presentes.

Los perfiles de  $\beta$ -*Proteobacteria* derivados de suelo de los tratamientos con MMG exhibieron una gran dispersión comparados con los patrones de *Bacteria*. Varios estudios (Nogales *et al.*, 1999; Nogales *et al.*, 2001) describen una abundancia de  $\beta$ -*Proteobacteria* superior a la esperada en suelos contaminados por PCBs con diferentes orígenes y postulan una posible implicación de especies de  $\beta$ -*Proteobacteria* en la degradación de PCBs *in situ*. Por tanto, es plausible que estas bacterias se vean influenciadas por los MMG introducidos, ya sea debido a la competición por recursos o a la formación de nuevos intermediarios degradables.

No encontramos una explicación fácil para la alta dispersión de los perfiles genéticos de *Acidobacteria* en los muestreos 1 y 2 (Figura 14, **B**). Cabe suponer que se deba a un artefacto experimental ya que los perfiles de suelo son mucho más homogéneos en los muestreos 3 y 4. Además, en el primer muestreo los perfiles

deberían ser mucho más homogéneos, ya que apenas habrían tenido tiempo para diferenciarse. Cabe también destacar que, aunque parezca haber un efecto debido a los distintos tratamientos en la rizosfera durante los muestreos 3 y 4, las disimilitudes globales entre estos fueron más bien bajas (Figura 14, A).

Como se ha expuesto anteriormente, el efecto causado por la introducción de las cepas MG (comparados con la inoculación de la cepa salvaje) en las poblaciones bacterianas nativas estuvo limitado a la rizosfera y fue variable dependiendo del grupo bacteriano estudiado. Dado que la aptitud colonizadora y el metabolismo de ambas cepas MG (excepto el catabolismo de PCBs), son indistinguibles de aquellos de la cepa salvaje (Villacieros *et al.*, 2003; Villacieros *et al.*, 2005) y persistieron en el ambiente a niveles similares, deducimos que los diferentes efectos provocados pueden ser el resultado de la actividad de los transgenes introducidos; reducción local de las concentraciones de PCBs y/o formación de nuevos intermediarios, y su posible impacto en poblaciones sensibles, ya sea por toxicidad o cambio en la disponibilidad de sustrato.

No se conocen otros trabajos que estudien el impacto a medio plazo de MMG diseñados para rizerremediación en las bacterias nativas con los que comparar estos resultados. Sin embargo, en un estudio reciente basado en la utilización de sistemas integrados de alfalfa-*Commamonas sp.* para remediar suelo artificialmente contaminado con 4-cloronitrobenceno (Liu *et al.*, 2006), la estructura de la comunidad de *Bacteria* fue analizada durante un periodo de 15 días. En este caso, las diferencias que se observaron entre los distintos tratamientos fueron consideradas como el resultado de la variabilidad natural del suelo y no debidas a la introducción de la cepa MG (si bien no aportan discusión alguna al respecto). No obstante, existen evidencias de una gran variedad de experimentos de introducción de MMGs orientados al biocontrol de patógenos en plantas (Amarger, 2002; Viebahn *et al.*, 2003; Johansen & Olsson, 2005) que sugieren que la introducción de MMG en el suelo causa esencialmente los mismos efectos en las

poblaciones bacterianas nativas que la inoculación con las cepas salvajes; pueden inducir, en las poblaciones rizosféricas, cambios transitorios en su estructura y función, pero mucho menos importantes que las diferencias inducidas por el crecimiento de la planta, especie vegetal empleada u otros medios de variabilidad natural

Según los resultados de un estudio de liberación en campo de F113rif (Karlson, comunicación personal), ésta cepa podía aún detectarse y recuperarse 4 años después en la rizosfera de sauces a pesar de haber descendido al 9,2% de su presencia original. Un comportamiento similar es esperado de la cepa F113::1180L. Esta cepa no posee genes de resistencia a antibióticos del vector y por tanto es apropiada para aplicaciones *in situ*. El elemento bph en F113::1180L es estable y su transferencia horizontal a un recipiente homólogo debería ocurrir a frecuencias no detectables en la rizosfera (Ramos *et al.*, 1994). Los transgenes introducidos provienen de un microorganismo de suelo por lo que no se añaden genes nuevos a la comunidad microbiana. Además, los productos de dichos transgenes no están relacionados con ningún factor tóxico o patogénico. Por tanto, el riesgo potencial para el medio ambiente o para los seres humanos del uso de este sistema *Salix sp.*-*P. fluorescens* F113::1180L para la biorremediación de suelos contaminados por PCBs parece muy bajo. Sin embargo, sería de gran valor un estudio de campo completo para analizar la idoneidad a largo plazo de esta cepa así como su utilidad real en la descontaminación de suelos contaminados por PCBs.

## **6. CONCLUSIONES**



1) Los diferentes análisis llevados a cabo en este estudio sostienen que la comunidad bacteriana de la rizosfera, que evolucionó de la población nativa de un suelo con un historial de contaminación por bifenilos policlorados, durante el desarrollo de las raíces de *Salix viminalis*, fue diferente de la comunidad parental tanto a niveles funcionales como estructurales. La rizosfera estuvo enriquecida en especies de *Proteobacteria*, y en genes de ISP $\alpha$  altamente relacionados con el grupo de las bacterias Gram negativas. La rizosfera seleccionó y sustentó ciertas bacterias poseedoras de genes ISP $\alpha$  (posibles degradadoras de PCBs), posiblemente por su competencia en la colonización de la rizosfera, hecho que podría ser empleado en futuras estrategias rizorremediadoras. Además, el descubrimiento de un clúster nuevo de secuencias ISP $\alpha$  que contiene un alto grado de variación de secuencia, abre el camino para la detección de enzimas novedosos y de gran utilidad, al haber sido seleccionados bajo las condiciones ambientales existentes en el suelo contaminado estudiado.

2) El impacto causado por la introducción de dos sistemas integrados sauce-microorganismo modificado genéticamente (diseñados para rizorremediación) en la estructura y función de las poblaciones bacterianas nativas de un suelo con un historial de contaminación por bifenilos policlorados, resultó imperceptible en comparación con la utilización de la cepa salvaje. Por el contrario, dicho impacto fue perceptible en las poblaciones rizosféricas desarrolladas, siendo, además, variable en función del grupo bacteriano estudiado.



## **7. REFERENCIAS**



**Abraham, W.R., Nogales, B., Golyshin, P.N., Pieper, D.H., & Timmis, K.N. (2002)** Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr Opin Microbiol* **5**: 246-253.

**Aguirre de Cárcer, D., Martín, M., Mackova, M., Macek, T., Karlson, U., & Rivilla, R. (2007)** The introduction of genetically modified microorganisms designed for rhizoremediation induces changes on native bacteria in the rhizosphere but not in the surrounding soil. *The ISME journal* **0**: 1-9.

**Amann, R.L., Ludwig, W., & Schleifer, K.H. (1995)** Phylogenetic Identification and *in-Situ* Detection of Individual Microbial-Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews* **59**: 143-169.

**Amarger, N. (2002)** Genetically modified bacteria in agriculture. *Biochimie* **84**: 1061-1072.

**Amarger, N., & Delgutte, D. (1990)** Monitoring genetically manipulated *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* released in the field. *in: D.R. MacKenzie, S.C. Henry (Eds.), Biological Monitoring of Genetically Engineered Plants and Microbes, Agricultural Research Institute, Bethesda, MD* 221–228.

**Anderson, T.A., Guthrie, E.A., & Walton, B.T. (1993)** Bioremediation in the Rhizosphere. *Environmental Science & Technology* **27**: 2630-2636.

**Bakken, L.R., & Olsen, R.A. (1987)** The Relationship between Cell-Size and Viability of Soil Bacteria. *Microbial Ecology* **13**: 103-114.

**Bano, N., & Hollibaugh, J.T. (2000)** Diversity and distribution of DNA sequences with affinity to ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in the Arctic Ocean. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1960-1969.

**Barac, T., Taghavi, S., Borremans, B., Provoost, A., Oeyen, L., Colpaert, J.V. et al. (2004)** Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnology* **22**: 583-588.

**Barns, S.M., Takala, S.L., & Kuske, C.R. (1999)** Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1731-1737.

**Barriault, D., & Sylvestre, M. (1993)** Factors Affecting Pcb Degradation by an Implanted Bacterial Strain in Soil Microcosms. *Canadian Journal of Microbiology* **39**: 594-602.

**Beil, S., Mason, J.R., Timmis, K.N., & Pieper, D.H. (1998)** Identification of chlorobenzene dioxygenase sequence elements involved in dechlorination of 1,2,4,5-tetrachlorobenzene. *Journal of Bacteriology* **180**: 5520-5528.

**Bopp, L.H. (1986)** Degradation of Highly Chlorinated PCBs by *Pseudomonas* Strain LB400. *Journal of Industrial Microbiology* **1**: 23-29.

**Borneman, J., & Triplett, E.W. (1997)** Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2647-2653.

**Brazil, G.M., Kenefick, L., Callanan, M., Haro, A., de Lorenzo, V., Dowling, D.N., & O'Gara, F. (1995)** Construction of a rhizosphere pseudomonad with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of bph gene expression in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1946-1952.

**Butler, C.S., & Mason, J.R. (1997)** Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. *In Advances in Microbial Physiology* **38**: 47-84.

**Camara, B., Herrera, C., Gonzalez, M., Couve, E., Hofer, B., & Seeger, M. (2004)** From PCBs to highly toxic metabolites by the biphenyl pathway. *Environmental Microbiology* **6**: 842-850.

**Campbell, R., & Greaves, M.P (1990)** *Anatomy and community structure of the rhizosphere.*

**Cases, I., & de Lorenzo, V. (2005)** Genetically modified organisms for the environment: stories of success and failure and what we have learned from them. *Int Microbiol* **8**: 213-222.

**Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., McGarrell, D.M. et al. (2005)** The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* **33**: D294-296.

**Cook, R., Weller, D., Kovacevich, P., Drahos, D., Hemming, B., Barnes, G., & Pierson, E. (1990)** Establishment, monitoring, and termination of field tests with genetically altered bacteria applied to wheat for biological control of take-all *in: D.R. MacKenzie, S.C. Henry (Eds.), Biological Monitoring of Genetically Engineered Plants and Microbes, Agricultural Research Institute, Bethesda, MD* 177-187.

**Crowley, D.E., Brennerova, M.V., Irwin, C., Brenner, V., & Focht, D.D. (1996)** Rhizosphere effects on biodegradation of 2,5-dichlorobenzoate by a bioluminescent strain of root-colonizing *Pseudomonas fluorescens*. *Fems Microbiology Ecology* **20**: 79-89.

**Curl, E., & Truelove, B. (1986)** The Rhizosphere. *Springer-Verlag, Berlin, Germany*: 288.

**Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., Mulders, I.H.M., Dekkers, L.C., & Lugtenberg, B.J.J. (2000)** Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1340-1345.

**Choi, K.H., & Dobbs, F.C. (1999)** Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *J Microbiol Methods* **36**: 203-213.

**Daniel, R. (2005)** The metagenomics of soil. *Nat Rev Microbiol* **3**: 470-478.

**de Lorenzo, V. (2001)** Cleaning up behind us - The potential of genetically modified bacteria to break down toxic pollutants in the environment. *Embo Reports* **2**: 357-359.

**de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., & Timmis, K.N. (1990)** Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative Bacteria. *J Bacteriol* **172**: 6568-6572.

**Deleij, F., Sutton, E.J., Whipps, J.M., Fenlon, J.S., & Lynch, J.M. (1995)** Field Release of a Genetically-Modified *Pseudomonas-fluorescens* on Wheat - Establishment, Survival and Dissemination. *Bio-Technology* **13**: 1488-1492.

**DeLong, E.F. (2004)** Microbial population genomics and ecology: the road ahead. *Environ Microbiol* **6**: 875-878.

**Dixon, B. (1996)** Bioremediation is here to stay. *Asm News* **62**: 527-528.

**Dong, X., Fushinobu, S., Fukuda, E., Terada, T., Nakamura, S., Shimizu, K. et al. (2005)** Crystal structure of the terminal oxygenase component of cumene dioxygenase from *Pseudomonas fluorescens* IP01. *J Bacteriol* **187**: 2483-2490.

**Drahos, D., Barry, G., Hemming, B., Brandt, E., Kline, E., Skipper, H. et al. (1992)** Spread and survival of genetically marked bacteria. in: *M.J. Day, J.C. Fry (Eds.), Environmental Release of Genetically Engineered and Other Microorganisms, Cambridge University Press, Cambridge* 147–159.

**Drahos, D.J., Hemming, B.C., & McPherson, S. (1986)** Tracking Recombinant Organisms in the Environment - Beta-Galactosidase as a Selectable Non-Antibiotic Marker for Fluorescent Pseudomonads. *Bio-Technology* **4**: 439-444.

**Drobnik, J. (1999)** Genetically modified organisms (GMO) in bioremediation and legislation. *International Biodeterioration & Biodegradation* **44**: 3-6.

**Droge, M., Puhler, A., & Selbitschka, W. (1999)** Horizontal gene transfer among bacteria in terrestrial and aquatic habitats as assessed by microcosm and field studies. *Biology and Fertility of Soils* **29**: 221-245.

**Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., & Johri, A.K. (2002)** Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**: 143-152.

**Erickson, B.D., & Mondello, F.J. (1993)** Enhanced Biodegradation of Polychlorinated-Biphenyls after Site-Directed Mutagenesis of a Biphenyl Dioxygenase Gene. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3858-3862.

**Fedi, S., Brazil, D., Dowling, D.N., & O'Gara, F. (1996)** Construction of a modified mini-Tn5 lacZY non-antibiotic marker cassette: ecological evaluation of a lacZY marked *Pseudomonas* strain in the sugarbeet rhizosphere. *FEMS Microbiol Lett* **135**: 251-257.

**Felske, A., Wolterink, A., Van Lis, R., & Akkermans, A.D. (1998)** Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse A grassland soils (The Netherlands). *Appl Environ Microbiol* **64**: 871-879.

**Furukawa, K., & Matsumura, F. (1976)** Microbial Metabolism of Polychlorinated Biphenyls - Studies on Relative Degradability of Polychlorinated Biphenyl Components by *Alkaligenes-Sp.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **24**: 251-256.

**Furukawa, K., Hirose, J., Suyama, A., Zaiki, T., & Hayashida, S. (1993)** Gene Components Responsible for Discrete Substrate-Specificity in the Metabolism of Biphenyl (Bph Operon) and Toluene (Tod Operon). *Journal of Bacteriology* **175**: 5224-5232.

**Furusawa, Y., Nagarajan, V., Tanokura, M., Masai, E., Fukuda, M., & Senda, T. (2004)** Crystal structure of the terminal oxygenase component of biphenyl dioxygenase derived from *Rhodococcus* sp strain RHA1. *Journal of Molecular Biology* **342**: 1041-1052.

**Garland, J.L., & Mills, A.L. (1991)** Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Appl Environ Microbiol* **57**: 2351-2359.

**Gibson, D.T., & Parales, R.E. (2000)** Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* **11**: 236-243.

**Glandorf, D.C.M., Verheggen, P., Jansen, T., Jorritsma, J.W., Smit, E., Leeftang, P. et al. (2001)** Effect of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r on the fungal rhizosphere microflora of field-grown wheat. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3371-3378.

**Glimm, E., Heuer, H., Engelen, E., Smalla, K., & Backhaus, H. (1997)** Statistical comparisons of community catabolic profiles. *J Microbiol Methods* **30**: 71-80.

**Gomes, N.C.M., Heuer, H., Schonfeld, J., Costa, R., Mendonca-Hagler, L., & Smalla, K. (2001)** Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis *Plant Soil* **232** 167-180.

**Good, I.J. (1953)** The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* **40**: 237-264.

**Guilbeault, B., Sondossi, M., Ahmad, D., & Sylvestre, M. (1994)** Factors Affecting the Enhancement of PCB Degradative Ability of Soil Microbial-Populations. *International Biodeterioration & Biodegradation* **33**: 73-91.

**Hall, T.A. (1999)** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**.

**Heitzer, A., & Sayler, G.S. (1993)** Monitoring the Efficacy of Bioremediation. *Trends in Biotechnology* **11**: 334-343.

**Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., & Wellington, E.M. (1997)** Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3233-3241.

**Hiltner, L. (1904)** Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und der Brache. *Arb. DLG* **98**: 59–78.

**Hirsch, P.R., & Spokes, J.D. (1994)** Survival and Dispersion of Genetically-Modified Rhizobia in the Field and Genetic Interactions with Native Strains. *Fems Microbiology Ecology* **15**: 147-159.

**Huber, T., Faulkner, G., & Hugenholtz, P. (2004)** Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20**: 2317-2319.

**Janssen, P.H. (2006)** Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1719-1728.

**Johansen, A., & Olsson, S. (2005)** Using phospholipid fatty acid technique to study short-term effects of the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* DR54 on the microbial microbiota in barley rhizosphere. *Microbial Ecology* **49**: 272-281.

**Kent, A.D., & Triplett, E.W. (2002)** Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Review of Microbiology* **56**: 211-236.

**Khan, A.G., Kuek, C., Chaudhry, T.M., Khoo, C.S., & Hayes, W.J. (2000)** Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* **41**: 197-207.

**Kimura, N., Nishi, A., Goto, M., & Furukawa, K. (1997)** Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but different functionally. *Journal of Bacteriology* **179**: 3936-3943.

**Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V., & Lugtenberg, B.J. (2004)** Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 6-15.

**Kushner, S.R. (1978)** An improved method for transformation of *E. coli* with ColE1-derived plasmids. In: *Boyer, H.W., Nicosia, S. (Eds.), Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering, Milan, March 1978, Elsevier, Amsterdam: 17.*

**Lajoie, C.A., Zylstra, G.J., Deflaun, M.F., & Strom, P.F. (1993)**

Development of Field Application Vectors for Bioremediation of Soils Contaminated with Polychlorinated-Biphenyls. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1735-1741.

**Leahy, J.G., & Colwell, R.R. (1990)** Microbial-Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews* **54**: 305-315.

**Leeflang, P., Smit, E., Glandorf, D.C.M., van Hannen, E.J., & Wernars, K. (2002)** Effects of *Pseudomonas putida* WCS358r and its genetically modified phenazine producing derivative on the *Fusarium* population in a field experiment, as determined by 18S rDNA analysis. *Soil Biology & Biochemistry* **34**: 1021-1025.

**Legendre, P., & Legendre, L. (1998)** Numerical Ecology. *Elsevier Science B.V.: Amsterdam, The Netherlands*.

**Leigh, M.B., Prouzova, P., Mackova, M., Macek, T., Nagle, D.P., & Fletcher, J.S. (2006)** Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Degrading Bacteria Associated with Trees in a PCB-Contaminated Site. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2331-2342.

**Lilley, A.K., & Bailey, M.J. (1997)** The acquisition of indigenous plasmids by a genetically marked pseudomonad population colonizing the sugar beet phytosphere is related to local environmental conditions. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1577-1583.

**Liu, L., Jiang, C.-Y., Liu, X.-Y., Wu, J.-F., Han, J.-G., & Liu, S.-J. (2006)** Plant-microbe association for rhizoremediation of chloronitroaromatic pollutants with *Comamonas* sp. strain CNB-1. *Environmental Microbiology* **0**

**Lugtenberg, B.J.J., Dekkers, L., & Bloemberg, G.V. (2001)** Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 461-+.

**MacDonald, R.W., Barrie, L.A., Bidleman, T.F., Diamond, M.L., Gregor, D.J., Semkin, R.G. et al. (2000)** Contaminants in the Canadian Arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence & pathways. *Science of the Total Environment* **254**: 93-234.

**McFarland, V.A., & Clarke, J.U. (1989)** Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener-specific analysis. *Environ Health Perspect* **81**: 225-239.

**Morrissey, J.P., Walsh, U.F., O'Donnell, A., Moenne-Loccoz, Y., & O'Gara, F. (2002)** Exploitation of genetically modified inoculants for industrial

ecology applications. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 599-606.

**Muyzer, G. (1999)** DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* **2**: 317-322.

**Nam, J.W., Nojiri, H., Yoshida, T., Habe, H., Yamane, H., & Omori, T. (2001)** New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **65**: 254-263.

**Naseby, D.C., & Lynch, J.M. (1999)** Effects of *Pseudomonas fluorescens* F113 on ecological functions in the pea rhizosphere are dependent on pH. *Microbial Ecology* **37**: 248-256.

**Natsch, A., Keel, C., Hebecker, N., Laasik, E., & Defago, G. (1997)** Influence of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and its antibiotic overproducing derivative on the diversity of resident root colonizing pseudomonads. *Fems Microbiology Ecology* **23**: 341-352.

**Natsch, A., Keel, C., Troxler, J., Zala, M., VonAlbertini, N., & Defago, G. (1996)** Importance of preferential flow and soil management in vertical transport of a biocontrol strain of *Pseudomonas fluorescens* in structured field soil. *Appl Environ Microbiol* **62**: 33-40.

**Nogales, B., Moore, E.R., Abraham, W.R., & Timmis, K.N. (1999)** Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl-polluted moorland soil. *Environ Microbiol* **1**: 199-212.

**Nogales, B., Moore, E.R., Llobet-Brossa, E., Rossello-Mora, R., Amann, R., & Timmis, K.N. (2001)** Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1874-1884.

**Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., & Hayashi, K. (1989)** Rapid and Sensitive Detection of Point Mutations and DNA Polymorphisms Using the Polymerase Chain-Reaction. *Genomics* **5**: 874-879.

**Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J., & Olsen, G.J. (1986)** The Analysis of Natural Microbial-Populations by Ribosomal-Rna Sequences. *Advances in Microbial Ecology* **9**: 1-55.

**Page, R.D.M. (1996)** TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**(4): 357-358.

**Pieper, D.H. (2005)** Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**: 170-191.

**Porteous, L.A., Armstrong, J.L., Seidler, R.J., & Watrud, L.S. (1994)** An effective method to extract DNA from environmental samples for polymerase chain reaction amplification and DNA fingerprint analysis. *Curr Microbiol* **29**: 301-307.

**Ramos, J.L., Diaz, E., Dowling, D., de Lorenzo, V., Molin, S., O’Gara, F., et al. (1994)** *The behavior of bacteria designed for biodegradation Biotechnology (NY)* **12**: 1349-1356.

**Ripp, S., Nivens, D.E., Werner, C., & Sayler, G.S. (2001)** Vertical transport of a field-released genetically engineered microorganism through soil. *Soil Biology & Biochemistry* **33**: 1873-1877.

**Rosenberg, E. (1993)** Exploiting Microbial-Growth on Hydrocarbons - New Markets. *Trends in Biotechnology* **11**: 419-424.

**Ryslava, E., Krejcek, Z., Macek, T., Novakova, H., & Mackova, M. (2003)** Study of PCB biodegradation in real contaminated soil. . *Fres Environ Bull* **12**: 296-301.

**Sait, M., Hugenholtz, P., & Janssen, P.H. (2002)** Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ Microbiol* **4**: 654-666.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

**Scher, F.M., & Baker, R. (1982)** Effects of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology* **72**: 1567-1573.

**Schloss, P.D., & Handelsman, J. (2005)** Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1501-1506.

**Schloss, P.D., Larget, B.R., & Handelsman, J. (2004)** Integration of Microbial Ecology and Statistics: a Test To Compare Gene Libraries. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5485-5492.

**Schmidt, H.A., Strimmer, K., Vingron, M., & Haeseler, A. (2002)** TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* **18**: 502-504.

**Schneider, S., Roessli, D., & Excoffier, L. (2000)** Arlequin: A Software for Population Genetics Data Analysis. *Genetics and Biometry Lab. Department of Anthropology, Geneve University.*

**Shanahan, P., Osullivan, D.J., Simpson, P., Glennon, J.D., & Ogara, F. (1992)** Isolation of 2,4-Diacetylphloroglucinol from a Fluorescent Pseudomonad and Investigation of Physiological-Parameters Influencing Its Production. *Appl Environ Microbiol* **58**: 353-358.

**Shannon, C.E., & Weaver, W. (1963)** The Mathematical Theory of Communication. *University of Illinois Press: Urbana, IL, USA.*

**Simons, M., vanderBij, A.J., Brand, I., deWeger, L.A., Wijffelman, C.A., & Lugtenberg, B.J.J. (1996)** Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting Pseudomonas bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**: 600-607.

**Singer, A.C., Crowley, D.E., & Thompson, I.P. (2003)** Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends Biotechnol* **21**: 123-130.

**Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S. et al. (2001)** Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant-Dependent Enrichment and Seasonal Shifts Revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4742-4751

**Stahl, D.A., Flesher, B., Mansfield, H.R., & Montgomery, L. (1988)** Use of Phylogenetically Based Hybridization Probes for Studies of Ruminant Microbial Ecology. *Appl Environ Microbiol* **54**: 1079-1084.

**Staley, J.T., & Konopka, A. (1985)** Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**: 321-346.

**Stratford, J., Wright, M.A., Reineke, W., Mokross, H., Havel, J., Knowles, C.J., & Robinson, G.K. (1996)** Influence of chlorobenzoates on the utilisation of chlorobiphenyls and chlorobenzoate mixtures by chlorobiphenyl/chlorobenzoate-mineralising hybrid bacterial strains. *Archives of Microbiology* **165**: 213-218.

**ter Braak, C.J.F. (1985)** Correspondence Analysis of Incidence and Abundance Data: Properties in Terms of a Unimodal Response Model *Biometrics* **41**(4): 859-873.

**Thompson, J.D., Higgins, D.G., & Gibson, T.J. (1994)** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.

**Timmis, K.N., & Pieper, D.H. (1999)** Bacteria designed for bioremediation. *Trends in Biotechnology* **17**: 201-204.

**Torsvik, V., Goksoyr, J., & Daae, F.L. (1990)** High Diversity in DNA of Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 782-787.

**Torsvik, V., Sorheim, R., & Goksoyr, J. (1996)** Total bacterial diversity in soil and sediment communities - A review. *Journal of Industrial Microbiology* **17**: 170-178.

**Troxler, J., Zala, M., Natsch, A., Nievergelt, J., Keel, C., & Defago, G. (1998)** Transport of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* through 2.5-m deep outdoor lysimeters and survival in the effluent water. *Soil Biology & Biochemistry* **30**: 621-631.

**Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A. et al. (2004)** Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66-74.

**Viebahn, M., Glandorf, D.C., Ouwens, T.W., Smit, E., Leeftang, P., Wernars, K. et al. (2003)** Repeated introduction of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r without intensified effects on the indigenous microflora of field-grown wheat. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3110-3118.

**Villacieros, M., Power, B., Sanchez-Contreras, M., Lloret, J., Oruezabal, R.I., Martin, M. et al. (2003)** Colonization behaviour of *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*) rhizosphere. *Plant and Soil* **251**: 47-54.

**Villacieros, M., Whelan, C., Mackova, M., Molgaard, J., Sanchez-Contreras, M., Lloret, J. et al. (2005)** Polychlorinated Biphenyl Rhizoremediation by *Pseudomonas fluorescens* F113 Derivatives, Using a *Sinorhizobium meliloti* nod System To Drive *bph* Gene Expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2687-2694.

**Villadas, P.J., Martinez-Abarca, F., & Toro, N. (2002)** Polymerase chain reaction-temperature gradient gel electrophoresis requires the use of high-performance liquid chromatography-purified oligonucleotides. *Anal Biochem* **300**: 101-103.

- Ward, D.M., Weller, R., & Bateson, M.M. (1990)** 16S Ribosomal-RNA Sequences Reveal Numerous Uncultured Microorganisms in a Natural Community. *Nature* **345**: 63-65.
- Weidner, S., Arnold, W., & Puhler, A. (1996)** Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 766-771.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., & Lane, D.J. (1991)** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**: 697-703.
- Wintzingerode, F., Göbel, U.B., & Stackebrandt, E. (1997)** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis *FEMS Microbiology Reviews* **21**: 213
- Witzig, R., Junca, H., Hecht, H.J., & Pieper, D.H. (2006)** Assessment of toluene/biphenyl dioxygenase gene diversity in benzene-polluted soils: links between benzene biodegradation and genes similar to those encoding isopropylbenzene dioxygenases. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3504-3514.
- Woese, C.R. (1987)** Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews* **51**: 221-271.
- Wu, C.H., Wood, T.K., Mulchandani, A., & Chen, W. (2006)** Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1129-1134.
- Yeates, C., Holmes, A.J., & Gillings, M.R. (2000)** Novel forms of ringhydroxylating dioxygenases are widespread in pristine and contaminated soils. *Environ. Microbiol.* **2**: 644-653.
- Yee, D.C., Maynard, J.A., & Wood, T.K. (1998)** Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene ortho-monooxygenase constitutively. *Appl Environ Microbiol* **64**: 112-118.
- Zielinski, M., Backhaus, S., & Hofer, B. (2002)** The principal determinants for the structure of the substrate-binding pocket are located within a central core of a biphenyl dioxygenase alpha subunit. *Microbiology-Sgm* **148**: 2439-2448.



## ABREVIATURAS

- ADN**; Ácido desoxiribonucleico.
- ARDRA**; *Amplified ribosomal DNA restriction analysis*.
- ARNm**; Ácido ribonucleico mensajero.
- ARNr**; Ácido ribonucleico ribosómico.
- CA**; *Correspondence analysis* .
- DGGE**; *Denaturing gradient gel electrophoresis*.
- DMSO**; Dimetilsulfóxido.
- DO**; Densidad óptica.
- EPA**; Environmental Protection Agency (E.E.U.U.).
- HAC**; *Hierarchical agglomerative clustering*.
- HOPDA**; 2-hidroxipenta-2,4-dienoato.
- ISP $\alpha$** ; *Iron sulphur protein* subunidad alfa.
- MG**; Modificado genéticamente.
- MMG**; Microorganismo modificado genéticamente.
- ORF**; *Open reading frames*.
- OTU**; Operational taxonomic unit.
- pb**; pares de bases.
- PCBs**; Bifenilos policlorados.
- PCR**; *Polymerase chain reaction*.
- RFLP**; *Restriction fragment length polymorphism*.
- SSCP**; *Single strand conformation polymorphism*.
- TAE**; tampón Tris-Acético-EDTA.
- TEMED**; N,N,N,N'-tetrametilnediamina.
- TGGE**; *Temperature gradient gel electrophoresis*.
- TS**; Tipo salvaje.
- UPGMA**; *Unweighted pair-group method with arithmetic mean*.
- UE**; Unión Europea.
- UFC**; Unidad Formadora de Colonia.