

Caracterización de tres cepas bacterianas capaces de fijar nitrógeno y biodegradar hidrocarburos aisladas de un suelo de la Patagonia

A.J. Acuña¹, G.N. Pucci¹, O.H. Pucci¹

(1) Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Ciudad Universitaria. Comodoro Rivadavia. Chubut. Argentina.

➤ Recibido el 23 de abril de 2010, aceptado el 14 de mayo de 2010.

Acuña, A., Pucci, G.N., Pucci, O.H. (2010). Caracterización de tres cepas bacterianas capaces de fijar nitrógeno y biodegradar hidrocarburos aisladas de un suelo de la Patagonia. *Ecosistemas* 19(2):000-000.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar tres microorganismos capaces de biodegradar hidrocarburos en ausencia de nitrógeno aislados a partir de un suelo de la Patagonia con una larga historia de contaminación por petróleo y sus derivados. Para ello se aislaron tres cepas bacterianas de un suelo patagónico con baja concentración de nitrógeno y contaminado con hidrocarburos. Estos fueron identificados por ARNr 16S y ácidos grasos de membrana. También se estudiaron sus perfiles de biodegradación de hidrocarburos en presencia y en ausencia de nitrógeno con hidrocarburos alifáticos, cíclicos, aromáticos y poliaromáticos. La capacidad de realizar fijación biológica de nitrógeno se estudió por reducción de acetileno y detección del gen *nifD*. Por otro lado, se realizó un estudio por desarrollo en cultivo líquido para conocer la adaptación a diferentes pH, entre 5 y 9, temperatura, de 15 a 65 °C, y concentraciones crecientes de NaCl entre 0 y 3M. Los microorganismos aislados correspondieron a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Gordonia*, todos con capacidad de fijar nitrógeno. Las cepas biodegradaron casi la totalidad de los hidrocarburos ensayados en presencia y ausencia de nitrógeno y tuvieron una buena adaptación a los cambios de pH, temperatura y concentración de NaCl, demostrando una buena adaptación a los principales factores de estrés en los suelos patagónicos.

Palabras claves: fijación de nitrógeno, biodegradación, hidrocarburos, Patagonia.

Acuña, A., Pucci, G.N., Pucci, O.H. (2010). Characterization of three nitrogen fixing and hydrocarbon degrading strains isolated from Patagonian soil. *Ecosistemas* 19(2):000-000.

The aim of this study is to characterize three hydrocarbon-degrading bacteria in absence of nitrogen. Three microorganisms were isolated from Patagonian soil with low nitrogen concentration and contaminated with hydrocarbons. These were identified by 16S rDNA and fatty acids. The hydrocarbon degradation profiles were studied in the presence and the absence of nitrogen with aliphatic, cyclic, aromatic and polyaromatic hydrocarbons. The ability to perform biological nitrogen fixation was studied by acetylene reduction and detection of the *nifD* gene. Furthermore, a study was conducted to determine the strains adaptation to different pH between 5 to 9, temperature of 15°C, 28°C, 37°C and 65 °C, and increasing concentrations of NaCl between 0 and 3M. The three isolated strains belong to the genera *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Gordonia*, all with the ability to fix nitrogen. The strains degraded almost all hydrocarbons tested in the presence and absence of nitrogen. All microorganisms showed a good adaptation to changes in pH, temperature and NaCl concentration, having a good adaptation to major stress factors in Patagonian soil.

Keywords: nitrogen fixation, biodegradation, hydrocarbons, Patagonia.

Introducción

Un vertido de hidrocarburos en un suelo origina un desequilibrio en la relación carbono:nitrógeno (C:N), induciendo una deficiencia de nitrógeno tan grande, que implica cambios en la población bacteriana, aumentando el número de

microorganismos capaces de degradar hidrocarburos (Walworth et al., 2007). Para que los hidrocarburos contaminantes de un suelo sean biodegradados de forma aceptable, se han propuesto varias relaciones entre C:N que oscilan entre 100:10 y 100:1 (Van Hamme et al., 2003).

Los suelos de Patagonia se caracterizan por ser deficientes de nitrógeno biodisponible (Mazzarino et al., 1998), lo que dificulta la biorremediación de los hidrocarburos derramados sin una adecuada bioestimulación. Sin embargo, hay autores que proponen que en deficiencia de nitrógeno es posible realizar este proceso con un rendimiento menor (Acuña et al., 2008). Si bien, en suelos contaminados con hidrocarburos, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) raramente fue observada a pesar de la frecuente limitación de nitrógeno, en los casos en que si fue evidenciada (Piehler et al., 1999; Eckford et al., 2002), el proceso no pudo ser directamente relacionado con las bacterias degradadoras de hidrocarburos. Existen pocas referencias de microorganismos capaces de fijar nitrógeno y que al mismo tiempo se desarrollen en presencia de hidrocarburos (Prantera et al., 2002; Chen et al., 2003). En otros microorganismos, la capacidad de fijar nitrógeno no se expresa durante el crecimiento con hidrocarburos, sino solo en presencia de sustratos polares (Eckford et al., 2002).

Los efectos de los cambios de temperatura y de la concentración salina que se observan en los suelos de Patagonia son responsables de cambios que ocurren a nivel molecular en los microorganismos de la zona. Así, se demostró que uno de los principales mecanismos de adaptación que poseen los microorganismos, para adecuarse a estas situaciones de estrés, es la modificación de los ácidos grasos de membrana, situación que fue demostrada en *Pseudomonas fluorescens* GNP-OHP-3 (Pucci et al., 2004) y *Mycobacterium esteraromaticum* GNP-5 (Pucci y Pucci, 2006), ambos aislados a partir de suelos patagónicos contaminados con hidrocarburos.

El ciclo del nitrógeno en suelos es llevado a cabo únicamente por microorganismos, siendo los procesos más importantes: la FBN, la nitrificación y la desnitrificación (Ye y Thomas, 2001).

El proceso de FBN esta catalizado por el complejo enzimático nitrogenasa que consta de dos proteínas distintas llamadas dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa. Ambos componentes contienen hierro en su estructura, la dinitrogenasa, además, contiene molibdeno. Algunas bacterias fijadoras de nitrógeno sintetizan complejos nitrogenasas sin molibdeno, estas nitrogenasas son comúnmente denominadas alternativas (Merrick, 2005).

Acuña et al. (2008) demostraron que en un suelo de la Patagonia con una relación C:N de 100:0,003 contaminado con hidrocarburos es posible realizar la biodegradación del contaminante presente con una velocidad de eliminación menor, evidenciando que existe un importante número de microorganismo que realizan FBN en presencia de hidrocarburos. Este grupo de microorganismos sería responsable de producir nitrógeno biodisponible, en forma de amonio, para la producción de biomasa bacteriana. Unas de las incógnitas que este panorama genera es que tipo de microorganismos son capaces de biodegradar los hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en los suelos de la Patagonia.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar tres microorganismos capaces de biodegradar hidrocarburos en ausencia de nitrógeno aislados a partir de un suelo de la Patagonia con una larga historia de contaminación por petróleo y sus derivados. También conocer si estos microorganismos son capaces de adaptarse a los cambios de pH, temperatura y salinidad, representado por diferentes concentraciones de NaCl.

Materiales y Métodos

Suelo utilizado en el estudio

Se tomó una muestra de suelo Patagónico en la ciudad de Comodoro Rivadavia (S 45°36'38.76"-W 67°40'41.78"), provincia de Chubut, Argentina, contaminada con residuos de la industria del petróleo proveniente de un sistema de biorremediación por el método de *landfarming* a una profundidad comprendida entre los 10 y 30 cm. El suelo estudiado fue caracterizado en un estudio anterior (Acuña et al., 2008) demostrando un pH de 7,1 y una humedad de 7,3%, las concentraciones de nutrientes biodisponibles fueron de 2,2 mg.kg⁻¹ para nitrato, 0,9 mg.kg⁻¹ para nitrito, 0,4 mg.kg⁻¹ para amonio y 0,6 mg.kg⁻¹ para urea. Los valores de fósforo fueron de 5,4 mg.kg⁻¹ con una concentración de hidrocarburos totales de 58715 mg.kg⁻¹. La relación C:N del suelo fue de 100:0,003 con una tasa de mineralización de hidrocarburos intrínseca de 30,1 mgCO₂.kg⁻¹ de suelo y un número de microorganismos diazotrofos degradadores de hidrocarburos de 3,7x10⁵ UFC.g⁻¹.

Aislamiento de microorganismos

Se añadió en un erlenmeyer de 250 mL 10 g de suelo en 90 mL de un medio base mineral sin fuente de nitrógeno denominado MM2 (NaCl 5 g, K₂PO₄.H₂O 0,5 g, NaPO₄.H₂O 0,5 g, NaSO₄ 1 g, MgSO₄ 0,2 g, FeSO₄ 0,05 g, SL 10 B 10 mL, agua destilada 1000 mL, pH 7,2) al que se le añadió 1% de gasoil. Este sistema fue incubado a 28°C durante 20 días en agitador orbital a

180 r.p.m. Transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota de la suspensión bacteriana de 1 mL y se colocó en 20 mL de MM2 nuevo con 1% de gasoil y se incubó en iguales condiciones a lo mencionado anteriormente. Este procedimiento se repitió dos veces más para finalmente realizar un aislamiento a partir de la suspensión bacteriana obtenida en un agar especial para microorganismos diazotrofos denominado DM (Solución A: KH_2PO_4 0,1 g, K_2HPO_4 0,9 g, $\text{NaCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g, $\text{NaVO}_3\cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,005 g, $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,005 g, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, solución de elementos traza: SL6 ($\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g, H_3BO_3 0,3 g, $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g, agua destilada 1000mL) 3 mL, agar 15 g, agua destilada 900 mL. Solución B: extracto de levadura 0,05 g, succinato de sodio 1 g, malato 2 g, agua destilada 50 mL. Solución C: piruvato de sodio 1 g, D-manitol 2 g, D-glucosa 2 g, agua destilada 50 mL. Luego de esterilizado, fue fundida la solución A y cuando llegó a una temperatura de 45°C fue mezclada con las soluciones B y C, cada 90 mL de solución A, fueron colocados 5 mL de solución B y 5 mL de solución C).

Identificación de las cepas aisladas

Secuenciación parcial de ARNr 16S. Se realizó la extracción del DNA total de los cultivos bacterianos puros con el kit FastDNA SPIN (QBIogene, Alemania) de acuerdo a las prácticas propuestas por el fabricante. La amplificación del gen ARNr 16S se realizó en un termociclador PTC-200 sobre una mezcla de reacción de 100 μL compuesta por 50 μL de Taq PCR Master Mix (QIAGEN, Alemania), 3 mM MgCl_2 , 10 pmol de cada uno de los primers utilizados (UniBac27f: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG> y UniBac519r: 5'-G(AT)A TTA CCG CGG C(GT)G CTG>) y 1 μL de DNA diluido 1:10 completando a volumen con agua destilada. El programa utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa se inició con 3 min a 94°C seguido de 30 ciclos de 20 s a 94°C, 30 s a 54°C y 1 min a 72°C, para finalizar con 10 min a 72°C. Los productos de PCR obtenidos fueron purificados con el kit E.Z.N.A. Cycle-Pure (peqLab Biotechnologia GmbH, Alemania) eluyendo con 30 μL de agua bidestilada con una digestión con 6 unidades de exonucleasa Lambda (New England Biolabs, Alemania). La secuenciación fue realizada en un analizador genético ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Alemania). Los datos se analizaron con el programa de análisis de secuencias ABI PRISM DNA y las secuencias complementarias fueron ensambladas con el programa de autoensamblaje ABI PRISM. El programa BLASTn fue utilizado para buscar secuencias similares en la base de datos GenBank y el programa Sequence Match tool para la búsqueda en Ribosomal Database Project II (RDP II) (Kleinstueber et al., 2006).

Para una buena identificación a nivel de género bacteriano el índice de similitud (IS) debe ser mayor a 95% o 0,95, mientras que para especie debe ser mayor a 99% o 0,99 para GenBank o RDP, respectivamente.

Perfil de ácidos grasos de membrana. La extracción de ácidos grasos se realizó por tratamiento de aproximadamente 40 mg de masa de un cultivo en medio TSBA (tripteína 15 g, peptona de soya 5 g, NaCl 5 g, K_2HPO_4 2,5 g, glucosa 5 g, agar 15 g, agua destilada 1000 mL, pH 7,2) de 24 horas (Pucci et al., 2004) efectuando una saponificación con alcohol metílico-hidróxido de sodio-agua (150 mL:45 g:150 mL) seguida de una metilación con ácido clorhídrico 6N y alcohol metílico (325 mL:275 mL) y a continuación una extracción con n-hexano-metil térbutil éter (1:1) y lavado con hidróxido de sodio-agua (10,8 g-900 mL). Las muestras fueron procesadas por triplicado y se almacenaron a -20°C hasta realizar la cromatografía correspondiente. Los ácidos grasos obtenidos se determinaron como metil ésteres (FAME: Fatty Acid Methyl Ester) por cromatografía gaseosa, utilizando una columna capilar Ultra2 de 25 m de longitud, 0,2 mm de diámetro. El análisis se llevó a cabo con un cromatógrafo HP 6890 serie II GC (inyección splitless; presión inicial 10 psi; programa de temperatura: 170-250°C a 5°C.min⁻¹, 260-310°C a 40°C.min⁻¹, 1,5 min. de permanencia a 310°C, detector por ionización de llama) controlado por Chemstation 10,0x (Hewlett Packard) (Pucci y Pucci, 2006), la integración se realizó según el sistema MIDI Sherlock versión 6.0.

Como criterios de identificación fueron tomados los especificados por el manual del sistema utilizado donde que indica que una buena identificación, es aquella que logra un IS mayor a 0,5 con una diferencia mayor de 0,1 con respecto a la segunda opción de identificación que brinda el sistema.

Cinética de crecimiento de las cepas bacterianas en presencia de los hidrocarburos que constituyen el gasoil

Las cepas bacterianas aisladas se cultivaron 24 a 48 horas en agar DM. A partir de estos cultivos se realizó una suspensión bacteriana en solución fisiológica con una densidad óptica de 0,5 a 600 nm. 100 μL de la suspensión anterior se inoculó en 10 mL de caldo MM2 para estudiar la cinética de crecimiento en ausencia de nitrógeno, y en 10 mL de caldo mineral denominado MM (NaCl 5 g, K_2PO_4 0,5 g, $\text{NH}_4\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, MgSO_4 0,2 g, KNO_3 3 g, FeSO_4 0,05 g, SL 10 B 10 mL, agua destilada 1000 mL, pH 7,2) para estudiar la cinética en presencia de nitrógeno. Se añadió gasoil al 1% como única fuente de carbono, y se incubó a 28°C en agitador orbital a 120 r.p.m, el experimento se realizó por triplicado. El seguimiento se realizó durante 120 días midiendo la densidad óptica a 600 nm. Se utilizaron tubos preparados en iguales condiciones a los mencionados anteriormente como blanco de la experiencia sin el agregado del inóculo bacteriano.

Perfil de utilización de hidrocarburos

Se colocó 10 mL de MM2 o MM en un vial de 20 mL de capacidad y se suplementó con el hidrocarburo ensayado. Los hidrocarburos individuales utilizados fueron pentano, hexano, heptano, pentadecano, hexadecano y heptadecano, en una concentración de 1% y pristano, ciclohexano, ciclohexanona, benceno, tolueno, xileno, naftaleno, antraceno y fenantreno al 0,5%. Todos los viales se inocularon con 100 µL de una suspensión del microorganismo en estudio con una densidad óptica de 0,5 a 600 nm de un cultivo en fase exponencial. Como blanco se utilizó un vial preparado en las mismas condiciones sin inóculo bacteriano. Todos los viales se realizaron por triplicado y se incubaron 30 días a 28°C en agitador orbital a 120 r.p.m. La presencia de turbidez visible se tomó como resultado positivo.

Ensayo de fijación de nitrógeno

Reducción de acetileno. Los microorganismos estudiados fueron cultivados, por triplicado, en caldo MM2 libre de nitrógeno y con glucosa, manitol y sacarosa al 0,1% como fuente de carbono a 28°C y en agitador orbital a 120 r.p.m. hasta lograr una densidad óptica de 0,5 a 600 nm. El cultivo fue inoculado en su atmósfera con un 10% de acetileno (Hardy et al., 1968) y se incubó nuevamente a 28°C en agitador orbital a 120 r.p.m. durante 2 horas. Como blanco se utilizó un vial preparado igual a lo anteriormente mencionado sin inóculo bacteriano. Transcurridas las dos horas de incubación, se tomaron 0,1 mL de la atmósfera y se inyectaron en un cromatógrafo HP 5890 equipado con una columna empacada Cromosorb 107 de acero inoxidable con una longitud de 6ft y 1/8" de diámetro, como gas carrier fue utilizado He (14 mL por minuto) con una presión de ingreso de 20 psi, un detector FID a 100°C, inyector a 60°C y un horno isotérmico a 60°C. Los cálculos fueron realizados por integración de área de los picos obtenidos, utilizando un testigo Scotty® II Analyzed Gases con 1,0004% de monóxido de carbono, 1,0002% de dióxido de carbono, 1,0009% de metano, 0,9988% de etano, 0,9933% de etileno y 1,0004% de acetileno. Los resultados fueron obtenidos como nmoles de etileno producidos por mg de proteínas por hora. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Folin-Ciocalteu (Daniels et al., 1994).

Detección de genes nifD. Se realizó la extracción del DNA total de los cultivos bacterianos puros con el kit FastDNA SPIN (QBIogene, Alemania) de acuerdo a las prácticas propuestas por el fabricante. La amplificación del gen *nifD* se realizó en un termociclador PTC-200 sobre una mezcla de reacción de 25 µL compuesta por 1 U de Taq PCR Master Mix (QIAGEN, Alemania), 2,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 200 µM de cada uno de los dNTP, 30 pmol de cada uno de los primers utilizados (FdB261: 5'-TGGGGICCIRTIAARGAYATG-3' y FdB260: 5'-TCRTTIGCIATRTGRTGNCC-3') y 1 µL de DNA diluido 1:10 completando a volumen con agua destilada. El programa utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa se inició con 5 min a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 52°C y 30 s a 72°C, para finalizar con 5 min a 52°C y 10 min a 72°C. La amplificación del gen *nifD* fue comprobada en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Aguilar et al., 1998).

Resistencia a factores ambientales

Se realizó en 10 mL de caldo TSB (tripteína 15 g, peptona de soya 5 g, NaCl 5 g, agua destilada 1000 mL, pH 7,2) que se inoculó con 100 µL de una suspensión de bacterias con una densidad óptica de 0,5 a 600 nm realizada a partir de un cultivo en fase exponencial. Para estudiar la capacidad de los microorganismos de desarrollarse a diferentes pH, la incubación se realizó a 28°C con un pH del medio de cultivo de 5, 6, 7, 8 y 9. Para conocer la capacidad de desarrollo a diferentes temperaturas, los cultivos se incubaron a 15, 28, 37 y 65°C. Por último, para estudiar la resistencia a concentraciones salinas crecientes, se adicionó el caldo TSB con 0 - 0,25 - 0,5 - 0,75 - 1 - 1,25 - 1,5 - 1,75 - 2 - 2,25 - 2,5 - 2,75 y 3 M de NaCl y se incubó a 28°C. La experiencia se realizó durante 20 días en un agitador orbital a 120 r.p.m. y el seguimiento de producción de biomasa se realizó midiendo el aumento de densidad óptica de los cultivos a 600 nm.

Análisis de datos

Los valores obtenidos fueron analizados utilizando análisis de la varianza (ANOVA) con 3 réplicas por nivel, mediante el programa BIOM (Applied Biostatistics Inc., 3 Heritage, Setauket, NY 11711 USA) con un nivel de significancia de 5 %. Los resultados mostrados en gráficos y tablas fueron corregidos por gramo de suelo seco, y se expresa el valor medio de los triplicados.

Resultados

Aislamiento e identificación de los microorganismos

A partir del desarrollo en el medio DM se aislaron hasta cultivo puro tres cepas bacterianas a las que se denominó 38, 40 y 59A. La cepa 38 fue identificada como *Pseudomonas stutzeri* en las dos bases de datos utilizadas en función a ARNr 16S

con un IS de 99% y 0,99 para GenBank y RDP, respectivamente. Los ácidos grasos de membrana la identificaron como *Pseudomonas balearica* y *Pseudomonas stutzeri* con un IS de 0,643 y 0,596, respectivamente. Si bien el IS fue mayor a 0,5, no existió una diferencia mayor a 0,1 con respecto a la segunda opción de identificación otorgada por el sistema, con lo que no se puede diferenciar entre ambas. De todas maneras, *P. stutzeri* y *P. balearica* son dos microorganismos estrechamente relacionados que poseen diferencias en la composición de sus ácidos grasos de membrana. *P. stutzeri* posee entre 0,28 y 1,72% del ácido graso 17:0 ciclo y entre 0,32 y 1,45% del 19:0 ciclo, *P. balearica* posee 4,71% de 17:0 ciclo y 3,8% de 19:0 ciclo (Bennasar et al., 1996). La cepa 38 posee 2,06% del ácido graso 17:0 ciclo y 1,60% de 19:0 ciclo (datos no mostrados), lo que la coloca más cerca de *P. stutzeri*. Por estos datos podemos identificarla como *Pseudomonas stutzeri*, o como una adaptación de ésta al hábitat del que proviene.

La cepa 40 fue identificada como *Bacillus pumilus* por la secuenciación parcial de ARNr 16S con un IS de 99% y 0,99 en GenBank y RDP, respectivamente, lo que sólo nos explica el género bacteriano. Con ácidos grasos de membrana, se identificó como *Bacillus megaterium* y *Brevibacillus parabrevis* con un IS de 0,524 y 0,441, respectivamente. Si bien existe una diferencia mayor a 0,1 entre las dos posibilidades brindadas por el sistema, el valor de IS de 0,524 obtenido para *B. megaterium* se encuentra muy cercano al valor de corte para IS de 0,5, con lo que la cepa 40 fue identificada como *Bacillus* sp.

La cepa 59A, en función a ARNr 16S, fue identificada en la base de datos GenBank como *Gordonia* sp. (IS 99%) y en RDP como *Gordonia amicalis* (IS 0,965) lo que permitió una buena identificación a nivel de género bacteriano. Con FAME se obtuvo un IS de 0,774 para *Gordonia rubripertincta*. Estos datos nos permitieron identificar a la cepa 59A como *Gordonia rubripertincta*.

Cinética de crecimiento en gasoil y perfil de utilización de hidrocarburos

Los tres microorganismos estudiados fueron capaces de desarrollar en las condiciones de estudio, es decir, con gasoil como única fuente de carbono y energía (**Fig. 1**). En ausencia de nitrógeno, tanto la cepa 38 ($F_{(1,4)}: 65, P: 0,001$), 40 ($F_{(1,4)}: 72, P: 0,001$) como la 59A ($F_{(1,4)}: 40, P: 0,003$), mostraron un crecimiento significativamente menor, siendo la cepa 59A la que mostró una cinética de crecimiento más eficiente logrando un mayor desarrollo. Contrariamente, la cepa 40 fue la que necesitó mayor tiempo de incubación para entrar en fase exponencial en el caldo sin nitrógeno.

Todos los hidrocarburos utilizados como fuente de carbono y con nitrógeno biodisponible produjeron crecimiento con los tres microorganismos, solo ciclohexanona y naftaleno inhibieron el desarrollo de la cepa 40, y el xileno de la cepa 59A (**Tabla 1**).

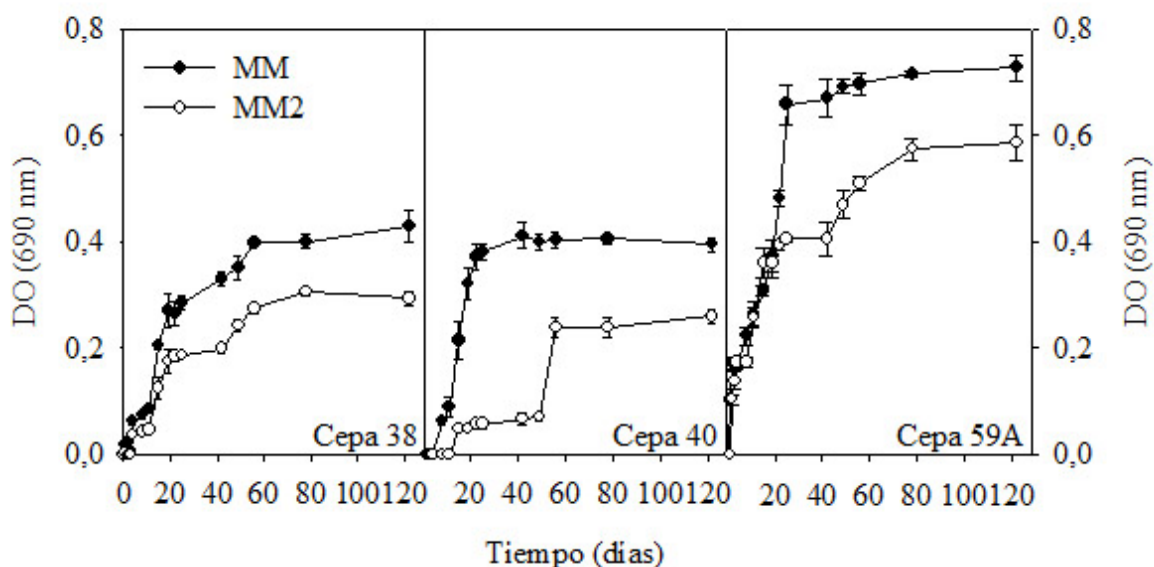


Figura 1. Cinética de crecimiento de los tres microorganismos estudiados en presencia (MM) y ausencia (MM2) de nitrógeno y con gasoil como única fuente de carbono y energía.

	Desarrollo con fuente de nitrógeno														Desarrollo sin fuente de nitrógeno															
Cepa	pentadecano	hexadecano	heptadecano	pentano	hexano	heptano	pristano	ciclohexano	ciclohexanona	benceno	tolueno	xileno	naftaleno	antraceno	fenantreno	pentadecano	hexadecano	heptadecano	pentano	hexano	heptano	pristano	ciclohexano	ciclohexanona	benceno	tolueno	xileno	naftaleno	antraceno	fenantreno
38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
40	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
59A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Tabla 1. Perfil de biodegradación de hidrocarburos de los tres microorganismos estudiados en presencia y ausencia de nitrógeno.

Los hidrocarburos n-alcenos ensayados en el caldo sin nitrógeno fueron biodegradados por los tres microorganismos estudiados, a excepción del hexano y el heptano con la cepa 38. Los hidrocarburos cíclicos y mono aromáticos también fueron utilizados como fuente de carbono por las cepas estudiadas. La cepa 40 no desarrolló con ciclohexano y ciclohexanona, mientras que la cepa 59A no desarrolló en presencia de xileno. Los hidrocarburos poliaromáticos (PAH) presentaron el mayor problema para el desarrollo de los tres microorganismos estudiados en ausencia de nitrógeno, siendo la cepa 38 la única capaz de desarrollar en presencia de naftaleno.

Fijación de nitrógeno

En la determinación indirecta por reducción de acetileno se observó que los tres microorganismos estudiados poseen capacidad de fijación de nitrógeno. La cepa 38, 40 y 59A mostraron una tasa de reducción de acetileno de $23,36 \pm 4,21$, $122,80 \pm 18,15$ y $141,32 \pm 21,34$ $\text{nmol}_{\text{etileno}} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ respectivamente. Se observó que las cepas 40 ($F_{(1,4)}: 85$, $P: 0,0008$) y 59A ($F_{(1,4)}: 88$, $P: 0,0007$) poseen una capacidad significativamente mayor de fijar nitrógeno con respecto a la cepa 38, sin encontrarse una diferencia significativa entre los resultados observados entre las cepas 40 y 59A ($F_{(1,4)}: 1,31$, $P: 0,316$). En la determinación directa de esta capacidad por detección del gen *nifD*, solo se observó un resultado positivo en la cepa 38 con un producto de amplificación de 390 bp.

Resistencia a factores ambientales

El rango de temperatura óptima de crecimiento para los tres microorganismos fue entre 28 y 37°C debido a que se encontró una $P < 0,05$ para las tres cepas respecto de las temperaturas de 15 y 65°C (**Fig. 2**). Las cepas 38 y 59A crecieron en presencia de un pH comprendido entre 6 y 9, mientras que la cepa 40, también creció a pH 5, observándose que esta última presentó un desarrollo significativamente mayor respecto de las cepas 38 y 59A a pH 5 ($F_{(1,4)}: 2821$, $P: 0,000001$) y 6 ($F_{(1,4)}: 95$ y 296 respecto la cepa 38 y 59A, respectivamente, $P: 0,0006$ y $0,0001$ respecto la cepa 38 y 59A, respectivamente). El desarrollo en presencia de NaCl fue disminuyendo a media que aumentó la concentración del mismo en el medio de cultivo. Las cepas 38 y 59A se desarrollaron de forma significativa ($P < 0,05$) hasta una concentración de 1M, mientras que la cepa 40 lo hizo hasta una concentración de 2,5M ($P < 0,05$).

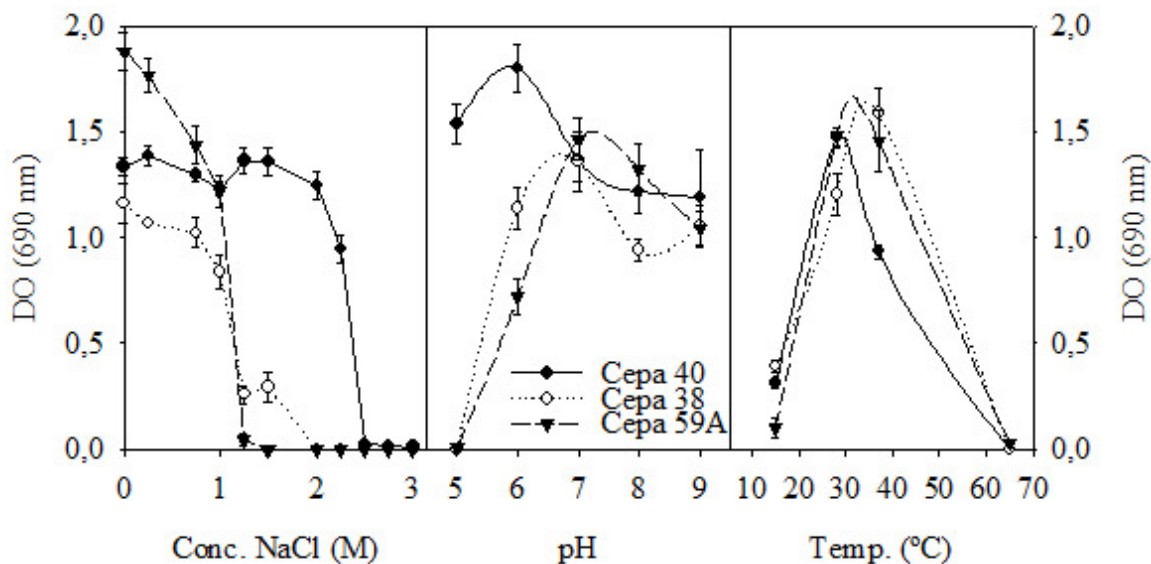


Figura 2. Capacidad de resistir a diferentes factores ambientales de los tres microorganismos estudiados. Los factores experimentados fueron concentraciones crecientes de NaCl, pH y temperatura.

Discusión

Las tres cepas estudiadas mostraron buenas aptitudes para soportar los diferentes tipos de estrés a los que fueron sometidos. El género bacteriano *Pseudomonas*, es conocido por su capacidad de biodegradar hidrocarburos alifáticos y aromáticos en suelos (Ghalazi et al., 2004), encontrándose que los compuestos derivados del petróleo, como nafta y gasoil, también pueden ser biodegradados por este género (Jacques et al., 2005). En el presente trabajo, la cepa 38 pudo utilizar el gasoil, tanto en presencia como en ausencia de nitrógeno. En los últimos años ha aumentado el interés por estudiar la degradación de los PAH por parte de *Pseudomonas*, encontrándose que está altamente involucrado en la biodegradación de estos compuestos por medio de la producción de biosurfactantes (García-Junco et al., 2003). Nosotros observamos que la cepa de *Pseudomonas* aislada, pudo utilizar los PAH probados en presencia de nitrógeno, no ocurriendo lo mismo sin nitrógeno en el medio de cultivo. Breedveld y Sparrevik (2000) estudiaron la influencia del nitrógeno y el fósforo en la degradación de los PAH en suelos contaminados con hidrocarburos en una experiencia de seis meses de duración, observando que la falta de nutrientes inhibe la degradación de los hidrocarburos poliaromáticos, en especial los constituidos por 4 anillos, siendo menor para los de 2 y 3 anillos. El género *Pseudomonas* posee un rango de pH de crecimiento de 5 a 9, con un óptimo de 7, con una temperatura óptima de 30°C (Jacques et al., 2005), lo que fue corroborado en este trabajo. En la literatura científica se encuentra que el género *Pseudomonas* puede utilizar como fuente de carbono los hidrocarburos tolueno y xileno (Ghalazi et al., 2004), como así también fenantreno, antraceno, naftaleno y pireno (Marcon et al., 2007).

En suelos no contaminados con hidrocarburos, el número de microorganismos fijadores de nitrógeno se encuentra en el orden de 10^6 a 10^8 UFC.g⁻¹, estando esto relacionado con la presencia de materia orgánica. Mientras más materia orgánica, más bacterias fijadoras de nitrógeno (Achouak et al., 1999; Xie et al., 2003). El género *Bacillus* está citado en la bibliografía como un microorganismo fijador de nitrógeno (Beneduzi et al., 2008), observándose que las especies de *B. pumilus* (Hernández et al., 2009) y *B. megaterium* (Xie et al., 2003) poseen esta capacidad. Este género bacteriano se encuentra involucrado frecuentemente en procesos de biodegradación de hidrocarburos en suelos (Doddamani y Ninnekar, 2000; Stapleton et al., 2000) encontrándose en diferentes estudios que degrada hidrocarburos alifáticos, aromáticos como benceno, tolueno y xileno (Ghalazi et al., 2004), cepas de *B. cereus* y *B. megaterium* capaces de biodegradar pireno (Lin y Cai, 2008), como así también, cepas de *B. pumilus* que utilizan como fuente de carbono el naftaleno, pireno y fenantreno (Brill, 1980) y que pueden soportar altas concentraciones de petróleo en el medio de crecimiento. Ghazali et al. (2004) encontraron que el género *Bacillus* posee una gran importancia en los procesos de biodegradación de hidrocarburos en suelo, estando esto relacionado con la capacidad del género de formar esporas y resistir en situaciones extremas (Annweiler et al., 2000). Por este motivo, en los suelos contaminados, este género es uno de los más abundantes (Ijah y Antai, 2003). De las tres cepas estudiadas, la 40 fue la que mostró mejores aptitudes para desarrollar en presencia de altas concentraciones de NaCl, de 0 a 2,5M, lo que indica que posee una buena capacidad de adaptarse a ambientes secos, como lo son los suelos de la Patagonia donde la baja cantidad de agua incrementa la concentración salina en el agua intersticial del suelo.

Los microorganismos del género *Gordonia* son frecuentemente encontrados en los suelos contaminados con petróleo (Shen

et al., 2008), siendo este uno de los más abundantes en este tipo de ambientes con capacidad de metabolizar los hidrocarburos poliaromáticos (Kästner et al., 1994), situación que se reflejó en nuestro estudio con la cepa 59A en los medios con nitrógeno. Díaz-Ramírez et al. (2008) aislaron una *Gordonia* con capacidad de utilizar diversos hidrocarburos alifáticos y aromáticos como fuente de carbono, demostrando que este género posee una gran importancia en los momentos finales del proceso de degradación ya que posee una gran habilidad de utilizar los metabolitos producidos por otros microorganismos a partir de los hidrocarburos (Díaz-Ramírez et al., 2008). Este género posee la capacidad de biodegradar diferentes PAH, como ser antraceno, fenantreno, pireno y fluorantreno (Jacques et al., 2008).

Las tres cepas estudiadas presentaron capacidad de reducción de acetileno. Esto demuestra, indirectamente, que los tres microorganismos poseen la capacidad de FBN de forma asimbiótica. No ocurrió lo mismo con respecto a los análisis genéticos realizados. Solo a partir de la cepa de *Pseudomonas* se pudo obtener un resultado positivo al realizar la amplificación del gen *nifD*. *Azotobacter vinelandii* fue uno de los primeros microorganismos habitantes del suelo capaz de fijar nitrógeno en forma asimbiótica que se estudió. Este fue tomado como modelo para el estudio de la FBN en forma asimbiótica. La enzima que lleva adelante el proceso de la FBN se denomina comúnmente nitrogenasa, y se sabe que *A. vinelandii* posee tres tipos de nitrogenasas capaces de realizar FBN en diferentes condiciones (Kennedy y Bishop, 1994). Estas tres nitrogenasas han sido estudiadas en este microorganismo modelo y se ha podido establecer que la denominada nitrogenasa 1 o Mo-dependiente, es un sistema de dos componentes y que su estructura proteica se encuentra codificada en los genes *nifHDK*. El Componente 1 o dinitrogenasa, una MoFe proteína codificada por el gen *nifDK* (Brill, 1980), y el Componente 2 o dinitrogenasa reductasa, una Fe proteína que se encuentra codificada en el gen *nifH* (Kennedy y Bishop, 1994). Las dos nitrogenasas restantes (nitrogenasa 2 y 3) estudiadas en *A. vinelandii*, son las denominadas Mo-independientes. Ambas son sistemas de dos componentes que están codificadas por genes diferentes a los descriptos para la nitrogenasa 1 (Kennedy y Bishop, 1994). La nitrogenasa 2 o Vanadio (V)-dependiente, posee su dinitrogenasa2, una VFe-proteína, codificada por los genes *vnfDK* (Joerger et al., 1990). Su Componente 2, dinitrogenasa reductasa2 o Fe-proteína2, se encuentra codificada por el gen *vnfH* (Rina et al., 1988). La nitrogenasa 3, enzima que solo posee Fe en su estructura, se encuentra codificada por los genes *anfDK* para el Componente 1, nitrogenasa3 o FeFe-proteína (Joerger et al., 1989). Su Componente 2, dinitrogenasa reductasa3 o Fe-proteína3, se encuentra codificada por el gen *anfH* (Mylona et al., 1996).

En nuestro trabajo, sólo buscamos la presencia de la nitrogenasa 1, que fue encontrada en la cepa identificada como *Pseudomonas stutzeri*. Es de suponer que los otros dos microorganismos posean algunas de las otras nitrogenasas para realizar la FBN. En la actualidad se conocen un gran número de microorganismos con nitrogenasas Mo-independientes. Parte de estos microorganismos son *Clostridium pasteurianum* (Zinoni et al., 1993), *Rhodobacter capsulatus* (Schneider et al., 1997), *Anabaena variabilis* (Thiel, 1993), *Rhodospirillum rubrum* (Lehman y Roberts, 1991), *Heliobacterium gestii* (Kimbel y Madigan, 1992), *Azospirillum brasilense* (Chakraborty y Samadar, 1995), *Azotobacter salinestrís* (Lovelless y Bishop, 1999), *Azotobacter paspali* (Lovelless y Bishop, 1999), *Azomonas macrocytogenes* (Lovelless et al., 1999), *Rhodopseudomonas palustris* (Oda et al., 2005). Este tipo de microorganismos, con nitrogenasas alternativas, han sido encontrados en diferentes ambientes a lo largo de los años. Se ha podido observar la presencia de cepas del género *Pseudomonas* en muestras de agua dulce y agua de mar con nitrogenasas alternativas (Lovelless et al., 1999). También se han aislado cepas de los géneros *Azomonas*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Paenibacillus* de diferentes tipos de suelo (Betancourt et al., 2008).

Si bien lo más común es encontrar las nitrogenasas alternativas en compañía de la nitrogenasa clásica en un microorganismo, se han comunicado casos en que sólo se ha podido detectar en el genoma de una bacteria la presencia de únicamente la nitrogenasa 2 (Lovelless et al., 1999).

El hecho que un microorganismo posea diferentes nitrogenasas, le da una mayor capacidad de realizar FBN en diferentes condiciones. Así, cuando un suelo posee Mo, la nitrogenasa 1 puede ser sintetizada y llevarse a cabo la FBN. Si en el suelo hay deficiencia de Mo y cantidades adecuadas de V, puede ser sintetizada la nitrogenasa 2. Si no hay Mo ni V, la nitrogenasa 3 puede ser sintetizada y permitirle al microorganismo realizar FBN. En nuestro suelo encontramos mayor cantidad de V que de Mo, en concentraciones de 99 y 7mg.kg⁻¹ para V y Mo, respectivamente (datos no mostrados).

La concentración de molibdeno en los suelos del mundo se ha determinado que está entre 1 y 5 mg.kg⁻¹ (He et al., 2005), llegando hasta concentraciones de 7 mg.kg⁻¹ (Das et al., 2007). El vanadio en el suelo es escaso y se encuentra principalmente en los combustibles fósiles y en el petróleo (Chen y Owens, 2008). La concentración promedio que encontramos de este micronutriente en petróleo es de 0,1 a 1500 mg.L⁻¹ (Amorim et al., 2007), con valores para el petróleo de Venezuela y Brasil de 500 y 30mg.L⁻¹, respectivamente (Navarro et al., 2007; Vale et al., 2008). Los microorganismos como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Actinomicetes*, son contaminantes que comúnmente se encuentran en el petróleo crudo, como en los tanques de almacenamiento de los derivados que se obtienen del mismo (Yemashova et al., 2007).

Al poseer un suelo que contiene Mo, es probable que encontremos microorganismos fijadores de nitrógeno que posean la nitrogenasa 1, que quizás esté acompañada de una o ambas nitrogenasas alternativas. Con lo que la cepa de *Pseudomonas* puede aparecer en el suelo muestreado del *landfarming* porque ya formaba parte del suelo antes de ser contaminado con

hidrocarburos. Por otra parte, las cepas de *Bacillus* y *Gordonia* encontradas en este trabajo, pueden ser incorporadas en el sistema de biorremediación junto con el hidrocarburo incorporado al mismo como una contaminación biológica del residuo a tratar. También puede ocurrir, que el hecho de encontrar bacterias con la presencia de nitrogenasas alternativas y sin la nitrogenasa clásica, sea una adaptación de estos microorganismos a las bajas temperaturas que soportan en el invierno de la Patagonia, ya que se ha observado que las bajas temperaturas favorecen la actividad de la nitrogenasa 2, es decir, la vanadio V-dependiente (Miller y Eady, 1988; Walmstey y Kennedy, 1991), elemento que se encuentra en mayores concentraciones que el molibdeno en nuestro suelo.

Conclusiones

A partir de la muestra de suelo patagónico estudiado, se aislaron e identificaron tres cepas correspondientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Gordonia*. Los tres mostraron capacidad de biodegradar hidrocarburos en ausencia de nitrógeno y de realizar la fijación biológica de este nutriente. Todos mostraron buena capacidad de adaptarse a los diferentes tipos de estrés de la región, cambios de pH, temperatura y salinidad. Este tipo de microorganismos son de suma importancia en la Patagonia ya que serían los responsables de generar nitrógeno biodisponible en los suelos con baja concentración del mismo y así incrementar su biomasa y la de otros microorganismos degradadores, bioestimulando la degradación de los hidrocarburos presentes.

Agradecimientos

Al Dr. Mario Aguilar y al Ing. Enrique Rost por su colaboración en la detección del gen *nifD* y en la determinación de reducción de acetileno realizada, respectivamente.

Referencias

- Achouak, W., Normand, P., Heulin, T. 1999. Comparative phylogeny of *rrs* and *nifH* genes in the *Bacillaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:961-967.
- Acuña, A., Pucci, O., Pucci, G. 2008. Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de la Patagonia Argentina. *Ecosistemas* 17:85-93.
- Aguilar, O., López, M., Riccillo, P., González, R., Pagano, M., Grasso, D., Pühler, A., Favelukes, G. 1998. Prevalence of the *Rhizobium etli*-Like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3520-3524.
- Amorim, A., Welz, B., Costa, A., Lepri, F., Vale, M., Ferreira, F. 2007. Determination of vanadium in petroleum and petroleum products using atomic spectrometric techniques. *Talanta* 72:349-359.
- Annweiler, E., Richnow, H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Francke, W., Michaelis, W. 2000. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:518-523.
- Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L., Bodanese-Zanettini, M., Passaglia, P. 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology* 39:311-320.
- Bennasar, A., Rosselló-Mora, R., Lalucat, J., Moore, E. 1996. 16S rRNA Gene sequence analysis relative to genomovars of *Pseudomonas stutzeri* of *Pseudomonas balearica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:200-205.
- Betancourt, D., Loveless, T., Brown, J., Bishop, P. 2008. Characterization of diazotrophs containing Mo-independent nitrogenases isolated from diverse natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* 74:3471-3480.
- Breedveld, G., Sparrevik, M. 2000. Nutrient-limited biodegradation of PHA in various soil strata at a creosote contaminated site. *Biodegradation* 11:391-399.
- Brill, W. 1980. Biochemical genetics of nitrogen fixation. *Microbiological Reviews* 44:449-467.
- Chakraborty, B., Samadar, K. 1995. Evidence for the occurrence of an alternative nitrogenase system in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters* 127:127-131.

- Chen, G., Zhu, H., Zhang, Y. 2003. Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. *Research in Microbiology* 154:393-398.
- Chen, Z., Owens, G. 2008. Trends in speciation analysis of vanadium in environmental samples and biological fluids - A Review. *Analytica Chimica Acta* 607:1-14.
- Daniels, L., Hanson, R., Phillips, J. 1994. Chemical analysis. En: Gerhardt, P., Murray, R., Wood, W., Krieg, N. (eds.). *Methods for general and molecular bacteriology*, pp. 542-543, Washington, D.C, USA.
- Das, A., Chakraborty, R., Cervera, M., Guardia, M. 2007. A review on molybdenum determination in solid geological samples. *Talanta* 71:987-1000.
- Díaz-Ramírez, I., Escalante-Espinosa, E., Favela-Torres, E., Gutiérrez-Rojas, M., Ramírez-Saad, H. 2008. Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE. *International Biodeterioration and Biodegradation* 62:21-30.
- Doddamani, H., Ninnekar, H. 2000. Biodegradation of phenanthrene by a Bacillus species. *Current Microbiology* 44:11-14.
- Eckford, R., Cook, F., Saul, D., Aislabie, J., Foght, J. 2002. Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel-contaminated antarctic soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68:5181-5185.
- García-Junco, M., Gomez-Lahoz, C., Niqui-Arroyo, J., Ortega-Calco, J. 2003. Biosurfactant- and biodegradation-enhanced partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from nonaqueous-phase liquids. *Environmental Science and Technology* 37:2988-2996.
- Ghazali, F., Rahman, R., Salleh, A., Basri, M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54:61-67.
- Hardy, R., Holsten, R., Jackson, E., Burns, R. 1968. The acetylene - ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43:1185-1207.
- He, Z., Yang, X., Stoffella, P. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19:125-140.
- Hernández, J., Bashan, L., Rodríguez, D., Rodríguez, Y., Bashan, Y. 2009. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *European Journal of Soil Biology* 45:88-93.
- Ijah, U., Antai, S. 2003. Removal of nigerian light crude oil in soil over a 12-month period. *International Biodeterioration and Biodegradation* 51:93-99.
- Jacques, R., Okeke, B., Bento, F., Teixeira, A., Peralba, M., Camargo, F. 2008. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresource Technology* 99:2637-2643.
- Jacques, R., Santos, E., Bento, F., Peralba, M., Selbach, P., Sá, E., Camargo, F. 2005. Anthracene biodegradation by Pseudomonas sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *International Biodeterioration and Biodegradation* 56:143-150.
- Joerger, R., Jacobson, M., Premakumar, R., Wolfinger, E., Bishop, P. 1989. Nucleotide sequence and mutational analysis of the structural genes (anfHDKG) for the second alternative nitrogenase from Azotobacter vinelandii. *Journal of Bacteriology* 171:1075-1086.
- Joerger, R., Loveless, T., Pau, R., Mitchenall, L., Simon, B., Bishop, P. 1990. Nucleotide sequence and mutational of de structural genes for nitrogenase 2 of Azotobacter vinelandii. *Journal of Bacteriology* 172:3400-3408.
- Kästner, M., Breuer-Jammali, M., Mahro, B. 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 41:267-273.

- Kennedy, C., Bishop, P. 1994. Genetics of nitrogen fixation and related aspects of metabolism in species of *Azotobacter*: History and current status. En: Klipp, W., Masepohl, B., Gallon, J., Newton, W. (eds.). *Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria*, pp. 27-52, Washington, D.C, USA.
- Kimbel, L., Madigan, M. 1992. Evidence for an alternative nitrogenase in *Heliobacterium gestii*. *FEMS Microbiology Letters* 100:255-260.
- Kleinstüber, S., Riis, V., Fetzer, I., Harms, H., Müller, S. 2006. Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3531-3542.
- Lehman, L., Roberts, G. 1991. Identification of an alternative nitrogenase system in *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Bacteriology* 173:5705-5711.
- Lin, Y., Cai, L. 2008. PHA-degrading microbial consortium and its pyrene-degrading plasmids from mangrove sediment samples in Huian, China. *Marine Pollution Bulletin* 57:703-706.
- Loveless, T., Bishop, P. 1999. Identification of genes unique to Mo-independent nitrogenase systems in diverse diazotrophs. *Canadian Journal of Microbiology* 45:312-317.
- Loveless, T., Saah, R., Bishop, P. 1999. Isolation of nitrogen-fixing bacteria containing molybdenum-independent nitrogenases from natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4223-4226.
- Marcon, R., Bestetti, G., Frati, F., Pepi, M., Baldi, F. 2007. Naphthalene and biphenyl oxidation by Two *Pseudomonas* strains isolated from Venice lagoon sediment. *International Biodeterioration and Biodegradation* 59:25-31.
- Mazzarino, M., Bertiller, M., Sain, C., Satti, P., Coronato, F. 1998. Soil nitrogen dynamics in northeastern Patagonia steppe under different precipitation regimes. *Plant and Soil* 202:125-131.
- Merrick, M. 2005. Regulation of nitrogen fixation in free-living diazotrophs. En: Klipp, W., Masepohl, B., Gallon, J., Newton, W., (eds.). *Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria*, pp. 197-223, Washington, D.C, USA.
- Miller, R., Eady, R. 1988. Molybdenum and vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. Low temperature favours N₂ reduction by vanadium nitrogenase. *Biochemical Journal* 256:429-432.
- Mylona, P., Premakumar, R., Pau, R., Bishop, P. 1996. Characteristics of *orf1 orf2* in the *anfHDGK* genomic region encoding nitrogenase 3 of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 178:204-208.
- Navarro, R., Guzman, J., Saucedo, I., Revilla, J., Guibal, E. 2007. Vanadium recovery from oil fly ash by leaching, precipitation and solvent extraction processes. *Waste Management* 27:425-438.
- Oda, Y., Samanta, S., Rey, F., Wu, L., Liu, X., Yan, T., Zhou, J., Harwood, C. 2005. Functional genomic analysis of three nitrogenases isozymes in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Journal of Bacteriology* 187:7784-7794.
- Piehler, M., Swistak, J., Pinckney, J., Paerl, H. 1999. Stimulation of diesel fuel biodegradation by indigenous nitrogen fixing bacterial consortia. *FEMS Microbiology Ecology* 38:69-78.
- Prantera, M., Drozdowicz, A., Leite, S., Rosado, A. 2002. Degradation of gasoline aromatic hydrocarbons by two N₂-fixing soil bacteria. *Biotechnology Letters* 24:85-89.
- Pucci, G., Härtig, C., Pucci, O. 2004. Influencia de la concentración salina y la temperatura en la composición de ácidos grasos de membrana de *Pseudomonas fluorescens* GNP-OHP-3. *Revista Argentina de Microbiología* 36:6-15.
- Pucci, G., Pucci, O. 2006. Cambios en los ácidos grasos de membrana de *Microbacterium esteraromaticum* GNP-5 con diferentes temperaturas y osmolaridades. *Acta Biológica Colombiana* 11:61-73.
- Rina, R., Reddy, M., Ghosal, D., Das, H. 1988. Characterization of the gen for the Fe-protein of the vanadium dependent alternative nitrogenase of *Azotobacter vinelandii*. *Molecular and General Genetics* 214:121-127.

- Schneider, K., Gollan, U., Drottboom, M., Selsemeier-Voigt, S., Müller, A. 1997. Comparative biochemical characterization of the iron-only nitrogenase and the molybdenum nitrogenase from Rhodobacter capsulatus. *European Journal of Biochemistry* 15:789-800.
- Shen, F., Ho, M., Huang, H., Arun, A., Rekha, P., Young, C. 2008. Molecular detection and phylogenetic characterization of Gordonia species in heavily oil-contaminated soils. *Research in Microbiology* 159:522-529.
- Stapleton, R., Bright, N., Saylor, G. 2000. Catabolic and genetic diversity of degradative bacteria from fuel hydrocarbon contaminated aquifers. *FEMS Microbiology Ecology* 39:211-221.
- Thiel, T. 1993. Characterization of genes for an alternative nitrogenase in the cyanobacterium Anabaena variabilis. *Journal of Bacteriology* 175:6276-6286.
- Vale, M., Silva, M., Damin, I., Filho, P., Welz, B. 2008. Determination of volatile and non-volatile nickel and vanadium compounds in crude oil using electrothermal atomic absorption spectrometry after oil fractionation into saturates, aromatics, resins and asphaltenes. *Talanta* 74:1385-1391.
- Van Hamme, J., Singh, A., Ward, O. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67:503-549.
- Walmsley, J., Kennedy, C. 1991. Temperature-dependent regulation by molybdenum and vanadium of expression of the structural genes encoding three nitrogenases in Azotobacter vinelandii. *Applied and Environmental Microbiology* 57:622-624.
- Walworth, J., Pond, A., Snape, I., Rayner, J., Ferguson, S., Harvey, P. 2007. Nitrogen requirements for maximizing petroleum bioremediation in a sub-antarctic soil. *Cold Regions Science and Technology* 48:84-91.
- Xie, G., Cai, M., Tao, G., Steinberger, Y. 2003. Cultivable heterotrophic N₂-fixing bacterial diversity in rice fields in the Yangtze River Plain. *Biology and Fertility of Soils* 37:29-38.
- Ye, R., Thomas, S. 2001. Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications. *Current Opinion in Microbiology* 4:307-312.
- Yemashova, N., Murygina, V., Zhukov, D., Zakharyantz, A., Gladchenko, M., Appanna, V., Kalyuzhnyi, S. 2007. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 6:315-337.
- Zinoni, F., Robson, R., Robson, R. 1993. Organization of potential alternative nitrogenase genes from Clostridium paspasteurianum. *Biochimica et Biophysica Acta* 1174:83-86.