

**DEGRADACIÓN DE *p*-NITROFENOL POR BACTERIAS EN LOS RÍOS AÑASCO Y
GUANAJIBO Y LA QUEBRADA DE ORO (PUERTO RICO)**

Por

Dina Paola Bracho Rincon

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En

Biología

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO

RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ

2007

Aprobado por:

Rafael Montalvo, Ph.D
Miembro Comité Graduado

Fecha

Mónica Alfaro, Ph.D
Miembro Comité Graduado

Fecha

Baqar R. Zaidi, Ph.D
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Ernesto Otero Morales, Ph.D
Representante de Escuela Graduada

Fecha

Lucy Bunkley-Williams, Ph.D
Directora del Departamento

Fecha

ABSTRACT

Biodegradation of *p*-nitrophenol and changes in bacterial communities during degradation process in water samples from the Añasco and Guanajibo rivers and Quebrada de Oro were determined. The degradation rate of *p*-nitrophenol was monitored spectrophotometrically. The numbers of *p*-nitrophenol degrading and heterotrophic bacteria were estimated by most probable number (MPN). Analysis of the changes of the bacterial communities during degradation of *p*-nitrophenol was done by using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms (T-RFLP) of gene 16S rDNA from Añasco River and Quebrada de Oro samples. In all sampling sites, *p*-nitrophenol degradation was over 90%; however degradation was generally higher in Añasco and Guanajibo River but varied with each sampling month. For example, in Añasco in November the degradation was in 34.3 h, in February 48.3 h and in April 85.0 h. The variability could be due to the changes in environmental conditions as well as changes in PNP-degrading bacterial populations. The numbers of *p*-nitrophenol degrading bacteria were also higher in samples from Añasco and Guanajibo River, resulting in faster degradation. This could be due higher anthropogenic input of toxic chemicals at these sites; this may result in increased number of degrading bacteria. The T-RFLP analysis showed that the variations in the Añasco River and Quebrada Oro microbial community structures are greater in the communities exposed to *p*-nitrophenol. It also showed that the change was more noticeable when the degradation reaches the 50%. This may be associated with an increase in the degrading bacterial populations. Sequence analysis of 16s rDNA from the isolated degrading bacteria showed close relationship with the genus *Pseudomonas*. This genus is characterized by organisms with wide metabolic diversity, and has been widely isolated from environment exposed to variety of toxic chemicals.

RESUMEN

La degradación de *p*-nitrofenol fue estudiada en los ríos Añasco, Guanajibo y la Quebrada de Oro, así mismo se evaluó cambios en la estructura de la comunidad microbiana durante la degradación. La degradación de *p*-nitrofenol fue estimada utilizando espectrofometría. El número de bacterias heterótrofas y degradadoras de *p*-nitrofenol fue estimado utilizando la técnica de número más probable (NMP). Muestras del río Añasco y la Quebrada de Oro se utilizaron para estudiar los cambios en la estructura de la comunidad microbiana durante la degradación de *p*-nitrofenol mediante el empleo de la técnica polimorfismo de la longitud del fragmento terminal por restricción (T-RFLP) del gen 16S rADN. En todos los sitios de muestreo, la degradación de *p*-nitrofenol fue superior al 90%, sin embargo fue generalmente más rápida en los ríos Añasco y Guanajibo, pero vario entre épocas de muestreo. Por ejemplo en el Río Añasco en noviembre para la degradación se empleo 34.3 h, en febrero 48.3 h y en abril 85.0 h. Las variaciones pueden estar relacionados a cambios en condiciones ambientales así como cambios en las poblaciones de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol. El número de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol fue más alto en muestras de los ríos Añasco y Guanajibo lo cual se relacionó con una rápida degradación. Esto puede ser debido a una mayor actividad antropogénica y entrada de tóxicos en estos lugares, cuyo resultado es un incremento en el número de bacterias degradadoras. El análisis de T-RFLP mostró que las variaciones en la estructura de las comunidades del río Añasco y la Quebrada de Oro son mayores en las comunidades expuestas a *p*-nitrofenol y el cambio fue notorio cuando la degradación llega al 50% y se puede asociar con un incremento en las poblaciones degradadoras. El análisis de las secuencias del 16s del ADNr de las bacterias degradadoras aisladas mostraron estrecha similitud con el género *Pseudomonas*. Este género es caracterizado por ser metabólicamente diverso y ha sido ampliamente aislado de ambientes expuestos a una variedad de químicos tóxicos.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Biología de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez, por brindarme la oportunidad de realizar mi maestría y por apoyarme como ayudante de cátedra.

A mi consejero Dr. Baqar Zaidi, por su guía y apoyo en la realización de mi trabajo y por la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación.

Al Dr. Rafael Montalvo y la Dra. Mónica Alfaro por sus sugerencias y la revisión del manuscrito.

Al Dr. Arturo Massol, por sus sugerencias y por brindarme las facilidades del laboratorio de Ecología Microbiana para realizar las técnicas empleadas en biología molecular.

A la MSc. Gladys Toro y Enid Rodríguez por su ayuda y consejos en la realización de los diferentes métodos de biología molecular que hacen parte de este trabajo. A la MSc. Magali Zapata y el Dr. Syed Imam, por los materiales proveídos para algunas pruebas realizadas en este trabajo.

A los estudiantes: Alejandro Caro, Gina Rodríguez (Biología), Nidia Rodríguez y Yaritza Maldonado (Ciencias Marinas) quienes me brindaron su apoyo en algunas etapas de mi trabajo. A Eric, Imilce, Jessica, Donato y Fernando por su ayuda en la toma de muestras.

A Rogelinda, Francisco, Eduar, Diana e Yvette, mi familia en Puerto Rico. A Julio Cesar por su ayuda en el trabajo de laboratorio y su apoyo. A mis compañeros del laboratorio de Ecología Microbiana y todos mis compañeros del Departamento de Biología, por hacer agradable mi estancia en el colegio.

A Dios, quien me ha permitido llegar aquí

A ser más dulce y maravilloso, mi madre

A mis sobrinos, Sebastián, Daniel y Eduardo

A mi padre, hermanos y mi abuela

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS.....	ix
OBJETIVOS	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos.....	5
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Área de estudio	13
<i>Río Guanajibo</i>	13
<i>Río Grande de Añasco</i>	14
<i>Quebrada de oro</i>	14
Plan de Muestreo.....	17
Enumeración de bacterias degradadoras de p-nitrofenol	18
Enumeración de bacterias heterótrofas	18
Cinética de degradación de p-nitrofenol	19
<i>Medición de degradación</i>	20
<i>Análisis estadístico</i>	21
Aislamiento y caracterización de bacterias degradadoras de p-nitrofenol	21
<i>Caracterización fisiológica y genotípica de cepas bacterianas</i>	22
<i>Extracción de ADN de cepas bacterianas</i>	22
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	23
<i>Secuenciación del 16S ADNr y análisis filogenético</i>	24
Análisis de la estructura de la comunidad microbiana durante el proceso de degradación.....	25
<i>Muestreo de los sistemas y extracción del ADN de la comunidad</i>	26
<i>Análisis T-RFLP del ADNr 16S</i>	26
<i>Análisis de datos y estadística</i>	27
RESULTADOS	29
Parámetros fisicoquímicos.....	29
Biodegradación de p-nitrofenol.....	31
Enumeración de bacterias heterótrofas y degradadoras de p-nitrofenol	35

Cambios en la comunidad microbiana durante la degradación de p-nitrofenol mediante el análisis de T-RFLP.....	37
Identificación de bacterias degradadoras de p-nitrofenol	41
DISCUSIÓN	44
Cambios en la comunidad microbiana durante la degradación de p-nitrofenol por medio de la técnica de T-RFLP	49
LITERATURA CITADA.....	54
APÉNDICES	60
Apéndice 1. Análisis de la Varianza de dos vías.....	61
Apéndice 2. Curva calibración de p-nitrofenol.....	62
Apéndice 3. Datos de precipitación	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 . Localización de las estaciones de muestreo (Mapa del área oeste de Puerto Rico).....	15
Figura 2. Lugar de muestreo en el Río Guanajibo	15
Figura 3. Lugar de muestreo en el Río Añasco	16
Figura 4. Lugar de muestreo en la Quebrada de Oro	16
Figura 5. Degradación de p-nitrofenol. Añasco (A), Guanajibo (G) Quebrada de Oro (QO). Experimental (E), Control (C). Abril 2006	33
Figura 6. Degradación de p-nitrofenol. Añasco (A), Guanajibo (G) Quebrada de Oro (QO). Experimental (E), Control (C). Febrero 2006.....	33
Figura 7. Degradación de p-nitrofenol. Añasco (A), Guanajibo (G), Quebrada de Oro (QO). Experimental (E), Control (C). Noviembre 2005.....	34
Figura 8. Degradación de p-nitrofenol. Añasco (A), Guanajibo (G) Quebrada de Oro (QO). Experimental (E), Control (C). Julio 2005.....	34
Figura 9. Bacterias degradadoras de p-nitrofenol (NMP/100ml)	36
Figura 10. Bacterias Heterótrofas (NMP/100ml)	36
Figura 11. Análisis de correspondencia de los perfiles de T-RFLP. Comunidades de Quebrada de Oro con PNP(■) Quebrada de Oro sin PNP (□) Río Añasco con PNP (▲) y Río Añasco sin PNP (Δ). Las flechas indican el orden de los cambios en la comunidad.....	39
Figura 12. Árbol filogenético basado en secuencias parciales del gen 16S del ADNr de bacterias degradadoras de p-nitrofenol. El árbol fue generado por el método del vecino más cercano (neighbourjoining). El número mostrado en la rama son los valores de bootstrap basados en 1000 replicas. Se muestran valores de más de 50%.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los tratamientos realizados para estudiar la degradación de <i>p</i> -nitrofenol	19
Tabla 2. Características fisicoquímicas de los ríos Añasco, Guanajibo y la Quebrada de Oro	30
Tabla 3. Caracterización de bacterias aisladas	42

INTRODUCCIÓN

El aumento de la actividad industrial ha generado grandes cantidades de compuestos tóxicos. Estos compuestos han sido liberados al ambiente causando una extensa contaminación de suelos y cuerpos de aguas (Chauhan et al., 2000). Durante las décadas pasadas grandes cantidades de pesticidas e insecticidas que fueron usados en la agricultura, se han acumulado en el ambiente creando innumerables sitios contaminados. Entre los principales contaminantes están los aromáticos policíclicos, compuestos halogenados orgánicos y compuestos nitroaromáticos (NACs) (Jain et al., 2005). De estos NACs, el *p*-nitrofenol puede acumularse en el suelo como resultado de la hidrólisis de varios insecticidas órganofosforados y herbicidas nitrofénolicos, además puede entrar al ambiente durante la elaboración de tintes, pesticidas y medicamentos (Cho et al., 2000).

Los nitrofenoles son tóxicos para plantas y animales y son considerados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) como contaminantes prioritarios. La exposición a *p*-nitrofenol presenta un alto riesgo para la salud, genera daños en el hígado y riñón, anemia, irritación en los ojos y en la piel (Bhatti et al., 2002). Es carcinogénico, mutagénico y cito-embriotóxico para mamíferos (Mulchandani et al., 2002). La USEPA ha establecido concentraciones menores a 10 ng/ml como el nivel de *p*-nitrofenol aceptable en aguas naturales (Kulkarani y Chaudrani, 2006).

Los ríos Añasco y Guanajibo y la Quebrada de Oro están ubicados en el área oeste de Puerto Rico; sus aguas se utilizan para riego, abastecimiento de plantas

filtradoras y suministro de agua para animales. Los ríos Añasco y Guanajibo han sido impactados con actividad agrícola a lo largo de su cauce siendo menor ésta en Guanajibo (Gilbes et al., 1996); mientras la Quebrada de Oro es un área sin actividad agrícola. El amplio uso de pesticidas, insecticidas y fertilizantes en la agricultura ha afectado adversamente la calidad del agua de estos ríos y ha incrementado la presencia de compuestos tóxicos. Unos de estos compuestos tóxicos puede ser el *p*-nitrofenol, cuya concentración incrementa como consecuencia directa del uso de herbicidas en la agricultura. Debido a la alta toxicidad de este compuesto es importante buscar una alternativa para convertirlo en compuestos inocuos como CO₂ y agua.

Una alternativa atractiva para disminuir la concentración de *p*-nitrofenol es la biodegradación. Esta estrategia explota la habilidad de los microorganismos del medio para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en sustancias de carácter menos tóxico o convirtiéndolas en inocuas para el medio ambiente y la salud humana. Es un método eficiente, económico, versátil y amigable con el ambiente (Jain et al., 2005) y ha sido utilizada ampliamente. Uno de los principales ejemplos es el derrame de petróleo del Exxon Valdez, en Prince William Sound. Donde las poblaciones microbianas autóctonas fueron estimuladas con un fertilizante para incrementar la degradación del petróleo (Daubaras y Chakrabarty, 1992).

La biodegradación de compuesto tóxicos, es un proceso complejo y es afectado por la estructura molecular y concentración del compuesto, por las condiciones ambientales como el oxígeno (si es un proceso aerobio), pH, presencia de nutrientes,

temperatura y por la composición de la comunidad microbiana autóctona (Atlas y Bartha, 2002). Este último factor es muy importante porque a pesar que el contaminante sea fácilmente biodegradable, la ausencia de una población microbiana adecuada puede ser un factor limitante e impedir la remoción del tóxico (Ritman y Mc Carty, 2001).

Actualmente se utilizan técnicas moleculares para estudiar las comunidades microbianas, la razón de esto es que aproximadamente solo del 1-10% de las especies que juegan un rol importante en la biodegradación de contaminantes pueden ser cultivadas (Macnaughton et al., 1999). Algunas metodologías independientes de cultivo y comúnmente utilizadas para estudiar la comunidad microbiana emplean el análisis de la subunidad pequeña del gen ADNr. Esta subunidad es valiosa porque esta presente en todos los organismos, además tiene una tasa de evolución baja, con regiones conservadas y regiones variables (Engebretson y Moyer, 2003). Entre las técnicas que utilizan la subunidad pequeña ADNr (16s) se incluyen análisis de: restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA), electroforesis en gradiente de gel desnaturizante (DGGE) y del polimorfismo de la longitud del fragmento terminal por restricción (T-RFLP).

De estas técnicas, el T-RFLP provee grandes ventajas sobre los otros métodos, porque es altamente reproducible y tiene una alta sensibilidad, ya que detecta poblaciones que se encuentran en concentraciones tan bajas como el 0.1-1% del total de la comunidad (Dunbar et al., 2000). Además es un método rápido y efectivo para

discriminar comunidades en una amplia variedad de muestras ambientales (Saikaly et al., 2005).

El propósito principal de esta investigación fue evaluar la biodegradación de *p*-nitrofenol en la Quebrada de Oro y los ríos Añasco y Guanajibo. También se investigaran las siguientes interrogantes:

- ¿La comunidad microbiana nativa de los ríos tiene capacidad de degradar *p*-nitrofenol?
- ¿Las bacterias encargadas de la degradación de *p*-nitrofenol son las mismas en cada lugar?
- ¿Hay cambios en la estructura de la comunidad microbiana durante la degradación de *p*-nitrofenol?
- ¿El tiempo requerido para la degradación es igual en los tres ríos?

OBJETIVOS

Objetivo general

- Estudiar la biodegradabilidad de *p*-nitrofenol en los ríos Añasco y Guanajibo y la Quebrada de Oro.

Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de las poblaciones bacterianas de los ríos Añasco y Guanajibo y la Quebrada de Oro para degradar *p*-nitrofenol.
- Aislar e identificar por técnicas bioquímicas y moleculares bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol.
- Estudiar cambios en la estructura de la comunidad microbiana del río Añasco y la Quebrada de Oro durante la degradación de *p*-nitrofenol mediante la técnica T-RFLP del gen 16S del ADN ribosomal.

REVISIÓN DE LITERATURA

Durante los últimos años la explotación masiva de los recursos naturales y la síntesis de químicos industriales han generado numerosos problemas ambientales como consecuencia de la poca incorporación de estos compuestos, en los ciclos biológicos. Esta situación es mas precaria aún con compuestos xenobióticos los cuales exhiben elementos estructurales o sustituyentes que son raramente encontrados en la naturaleza (Esteve-Núñez et al., 2001). Entre los compuestos responsables de contaminar el ambiente encontramos los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), halogenados orgánicos y los nitroaromáticos (NACs) (Atlas et al., 2002).

Los compuestos nitroaromáticos (NACs) son contaminantes ubicuos en ecosistemas acuáticos y terrestres y son liberados al ambiente casi exclusivamente por fuentes antropogenicas. Pocos compuestos nitroaromáticos son producidos en forma natural y son principalmente antibióticos como el cloranfenicol y pirrolnitrina (Esteve-Núñez et al., 2001 y Schackmann et al., 1991). Entre los nitroaromáticos se incluyen los nitrobenzoatos, nitrobencenos nitrotoluenos y nitrofenoles. Estos compuestos son ampliamente utilizados en la síntesis de pesticidas (paratión, metilparation, dinoseb, dinitrocresol y nitrofen), medicamentos, plásticos, tintes y explosivos {2,4,6-trinitrotolueno (TNT), 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX) y 1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,6-tetrazina (HMX)} (Spain, 1995). También son utilizados como intermediarios en la producción de algunos compuestos halogenados y derivados sulfonados (Bruhn, 1987).

Un compuesto importante del grupo de los nitrofenoles es el 4-nitrofenol, también llamado *p*-nitrofenol, este compuesto puede ser producido en la atmósfera por una reacción fotoquímica entre el benceno y monóxido de nitrógeno. El *p*-nitrofenol se usa en la manufactura de acetaminofen, tintes y pesticidas. Es el principal metabolito urinario del paratión y ha sido aceptado como biomarcador para monitorear humanos expuestos a metilparatión y paratión. (Hryhorczuk et al., 2002 y Bhatti et al., 2002)

La producción anual de *p*-nitrofenol es de 20 millones de kilogramos (Karim y Gupta, 2001), el 97.92% se utiliza como intermediario en la elaboración de metil y etil paratión, 1.04% en la elaboración de N-acetil-*p*-aminofenol (APAP) y el 1.04% restante en tintes para cuero, tintes de oxidianilina y otras aplicaciones. (Spectrum, 2005).

Para la Agencia de Protección Ambiental (EPA), el *p*-nitrofenol es un contaminante ambiental prioritario por su toxicidad (LD₅₀ oral 247 mg/L y por piel 920mg/Kg). La Comisión Europea (EC), ha establecido un límite de 100 ng/L en agua potable (Mulchandani et al., 2002). La EPA recomienda su concentración en aguas naturales por debajo de 10 ng/L (Karim y Gupta, 2001).

El *p*-nitrofenol se ha detectado en efluentes de agua tratadas de las industrias de componentes eléctricos (<22 µg/L), manufactura de plásticos (190 µg/L), refinamiento de petróleo (<1µg/L) y fabricación de textil (<10 µg/L). También se ha detectado en aguas no tratadas de las industrias de aluminio (18 µg/L), lavaderos de autos (14 µg/L) y suplidoras de equipos fotográficos (57 µg/L.). Se ha reportado en escorrentías de

varias ciudades de Estados Unidos de América (Long Island, N.Y. Washington, DC; Litte Rock, AK y Eugene, OR) con un rango de 1-19 µg/L y su frecuencia de detección fue de 9% (Spectrum, 2005)

El *p*-nitrofenol puede sufrir cambios fisicoquímicos como volatilización y fotodegradación en aguas superficiales claras (vida media 2-14 días), siendo más rápido cuando el agua es ácida o contiene iones de NO_3^- y NO_2^- (Spectrum, 2005). Sin embargo, la biodegradación es el principal mecanismo de remoción del *p*-nitrofenol (Karim et al., 2001). La velocidad de degradación de *p*-nitrofenol es menor en sistemas marinos donde se ha reportado con una vida media de 1-3 años, mientras en aguas continentales la vida media es de 1-8 días aproximadamente. La vida media del *p*-nitrofenol disminuye cuando las poblaciones microbianas son aclimatadas y el *p*-nitrofenol puede ser degradado completamente en un día (Munnecke et al., 1976, Herman et al., 1993)

La presencia del grupo nitro en el *p*-nitrofenol incrementa su resistencia a la degradación, sin embargo se han reportado muchos géneros bacterianos que tienen habilidad para degradarlo, entre ellos se incluyen: *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Arthrobacter* y *Bacillus*. La degradación aeróbica del *p*-nitrofenol a menudo suministra carbono, nitrógeno y energía (Spain, 1995). El metabolito inicial de la degradación de *p*-nitrofenol varía dependiendo del organismo (Hanne et al., 1993; Kadiyala et al., 1998), *Arthrobacter* sp degrada *p*-nitrofenol por la vía 1,2,4-Bencenotriol (Jain et al., 1994); y *Moraxella* puede degradar por la vía benzoquinona

(Spain et al., 1991), la diferencia del metabolito inicial producido depende de la estrategia utilizada para remover o transformar el grupo nitro

Para emprender programas de biodegradación además de conocer las vías catabólicas mencionadas anteriormente, también se deben conocer los factores ambientales que pueden influenciar la degradación. Entre estos factores se incluyen: (a) **concentración del compuesto**; en estudios de suelos de Everglades, cuando se ensayaron bajas concentraciones de *p*-nitrofenol (0.01-0.1 mg/g suelo), ocurrió mineralización en una semana; sin embargo, al aumentar la concentración *p*-nitrofenol a 10mg/g no hubo mineralización en un periodo de cuatro meses, debido posiblemente a que las concentraciones elevadas producen un efecto inhibitorio (Laha y Petrova, 1998). (b) **escasez de nutrientes**, es conocido que el fosfato (PO_4^{-3}) es un factor limitante en el crecimiento y producción primaria del fitoplancton y de esta forma puede limitar a las bacterias en la degradación de compuestos sintéticos orgánicos. Se ha reportado que la adición de fosfato al agua de un lago incremento la descomposición bacteriana de *p*-nitrofenol (Robertson et al, 1992); (c) **pH**; se han reportado algunas cepas de *Pseudomonas* incapaces de degradar *p*-nitrofenol en agua de lago a pH 8.0, sin embargo cuando se ajusta a 7.0 el *p*-nitrofenol es mineralizado. (Zaidi et al., 1988),

La composición de la comunidad microbiana autóctona es uno de los factores más importantes durante la degradación de un químico, la ausencia de una población microbiana adecuada puede ser un factor limitante e impedir la remoción del contaminante (Ritman y Mc Carty, 2001). Para estudiar la composición de la comunidad

microbiana se utilizan técnicas dependientes e independientes de cultivos; sin embargo debido a la dificultad de cultivar en el laboratorio bacterias provenientes de muestras ambientales (aproximadamente un 0.1-10% del total de la comunidad puede ser cultivado) (Head et al., 1998) actualmente se están empleando para el análisis de comunidades microbianas métodos moleculares. Estos métodos proveen técnicas para identificar los organismos que se presentan en las comunidades microbianas sin necesidad de ser cultivados. (Hugenholtz et al., 1998)

Los métodos moleculares pueden estudiar genes de interés funcional como los genes *nirK* y *nirS* que codifican para las enzimas utilizadas en el proceso de desnitrificación y sirven para estudiar la estructura de una comunidad desnitrificadora (Braker et al., 2000), o genes de interés filogenético en los cuales a menudo se utiliza el gen 16S ADNr como marcador filogenético procariótico (Osborne et al., 2006). El gen 16S ADNr está distribuido universalmente en todos los organismos, es funcionalmente constante y relativamente bien conservado, tiene una tasa de evolución baja, con regiones conservadas y regiones variables. Debido a estas razones el análisis comparativo de las secuencias del gen 16S ADNr puede ser universalmente aplicada para inferir relaciones filogenéticas entre organismos (Engebretson y Moyer, 2003)

Entre las técnicas que utilizan el gen 16S ADNr se incluyen: análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA), electroforesis en gradiente de gel desnaturante (DGGE), análisis automatizado del espacio entre genes en el ADN ribosomal y polimorfismo de la longitud del fragmento terminal por restricción (T-RFLP) (Nagashima et al., 2003)

El T-RFLP es una herramienta importante en ecología microbiana, fue desarrollada por Lui et al (1997). Se utiliza para estimar la composición y la diversidad filogenética en diversos ambientes. Esta técnica produce un patrón distintivo de las comunidades que pueden ser utilizados para evaluar la similitud de diferentes comunidades, además evalúa los cambios que ocurren a escala temporal o espacial en la estructura de una comunidad en respuesta a perturbaciones ambientales (Lui et al., 1997). Esta técnica permite un análisis rápido de datos y ofrece grandes ventajas frente a otros métodos porque es reproducible y tiene una alta sensibilidad (Saikaly et al., 2005)

El T-RFLP ha sido utilizado para: estudiar cambios en las comunidades bacterianas fijadoras de nitrógeno y oxidadoras de amonio en suelos de bosques de coníferas después de incendios forestales (Yeager et al., 2005); comparar la estructura y función de las comunidades de reactores utilizados para remover fenol y fenol más tricloroetano (Ayala-del-Río et al., 2004); evaluar el efecto de la presencia de 2,4,6-triclorofenol en las comunidades microbianas de un suelo de un bosque (Sánchez et al., 2004); caracterizar y comparar las comunidades bacterianas del colon de los intestinos de cerdos alimentados con diferentes dietas y después de una infección con *Brachyspira hyodysenteriae* (Leser et al., 2000) y para caracterizar comunidades microbianas encontradas en la vagina humana (Coolen et al., 2005)

En la técnica de T-RFLP, El ADN de la comunidad es extraído directamente del ambiente y se amplifica el gen 16S del ADN ribosomal de la comunidad. Uno de los iniciadores utilizados; usualmente el iniciador forward es marcado fluorescentemente

(por ser una región mas heterogénea). Los productos amplificados son digeridos con enzimas de restricción y los productos proximales al primer marcado (de ahí el uso del nombre "terminal") son separados por tamaño en una gel de poliacrilamida o por electroforesis capilar donde solo el fragmento terminal marcado fluorescentemente (T-RFs) es detectado y cuantificado. Cada T-RFs detectado es definido como una unidad taxonómica operacional (OTU, por su sigla en inglés) y puede ser inferido como una sola población dentro de una comunidad. (Engebretson y Moyer 2003, Blackwood et al., 2003, Osborne et al., 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Las muestras se colectaron en el área oeste de Puerto Rico en los ríos Añasco y Guanajibo y la Quebrada de Oro (Figura 1). Los ríos Grande de Añasco y Guanajibo son clasificados como categoría cinco por su longitud, mientras la Quebrada de Oro es clasificado como categoría tres. Los ríos Grande de Añasco y Guanajibo se encuentran en la lista de los más contaminados de Puerto Rico del área oeste (Junta de Calidad Ambiental, 2004). Las actividades desarrolladas en las cuencas de los ríos pueden ser observadas en el mapa de uso de terreno (Figura 1).

Río Guanajibo

Nace en la cordillera central a 883m sobre el nivel del mar, al noroeste del pueblo de Sabana Grande, tiene una longitud aproximada de 47 km y su cuenca hidrográfica es de 127 millas cuadradas (PUTPR, 2006). El río fluye en dirección suroeste hacia el pueblo de Sabana Grande y luego al Pasaje de Mona al oeste de Puerto Rico. Atraviesa los municipios de Sabana Grande, San Germán, Hormigueros, Cabo Rojo y Mayagüez (Suárez, 2005). Este río se ve afectado por aguas residuales de comunidades, escorrentías urbanas, por extracción de material de la corteza terrestre, vertederos y por actividad agrícola (Environmental Quality Board, 2004). El sitio de muestreo está ubicado cerca a la desembocadura del río en las coordenadas 18° 06' 22.53" N; 67° 06' 01.13" O (Figura 2).

Río Grande de Añasco

Se origina en el límite del Barrio Espino y Pesuela del municipio de Lares. Se forma al unirse el río Blanco y río Prieto, atraviesa los municipios de Adjuntas, Lares, Las Marías, San Sebastián, Añasco y Mayagüez y desemboca en el Pasaje de Mona al oeste de Puerto Rico. Tiene una longitud 93.2 km, siendo el segundo en extensión en Puerto Rico y su cuenca hidrográfica abarca un área de 181 millas cuadradas (PUTPR, 2006)

Este río se ve afectado por efluentes de aguas sin tratar provenientes de comunidades, vertederos, y por escorrentías de agricultura (Environmental Quality Board, 2004), también ha sido afectado por el uso de plaguicidas para el control de maleza acuática (Rodeo-77). El río Grande de Añasco sule de agua a las plantas filtradoras del Monte del Estado, las Perchas, las Marías, Indiera alta, Castañar y de Añasco (Junta de calidad Ambiental, 1996). Las muestras se colectaron cerca de la desembocadura del río en las coordenadas 18° 16' 21.47"N; 67° 09' 42.90"O (Figura 3).

Quebrada de oro

Se origina en el barrio miradero y atraviesa el zoológico y la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. La mayor parte de la cuenca de la Quebrada de Oro es bordeada por área de bosque y área urbanizada. En su trayecto se ve afectada por escorrentías urbanas. El sitio de muestreo se encuentra en la zona media de la Quebrada, en las coordenadas 18° 15.59' 11.5"N; 67°07'9.1"O (Figura 4)

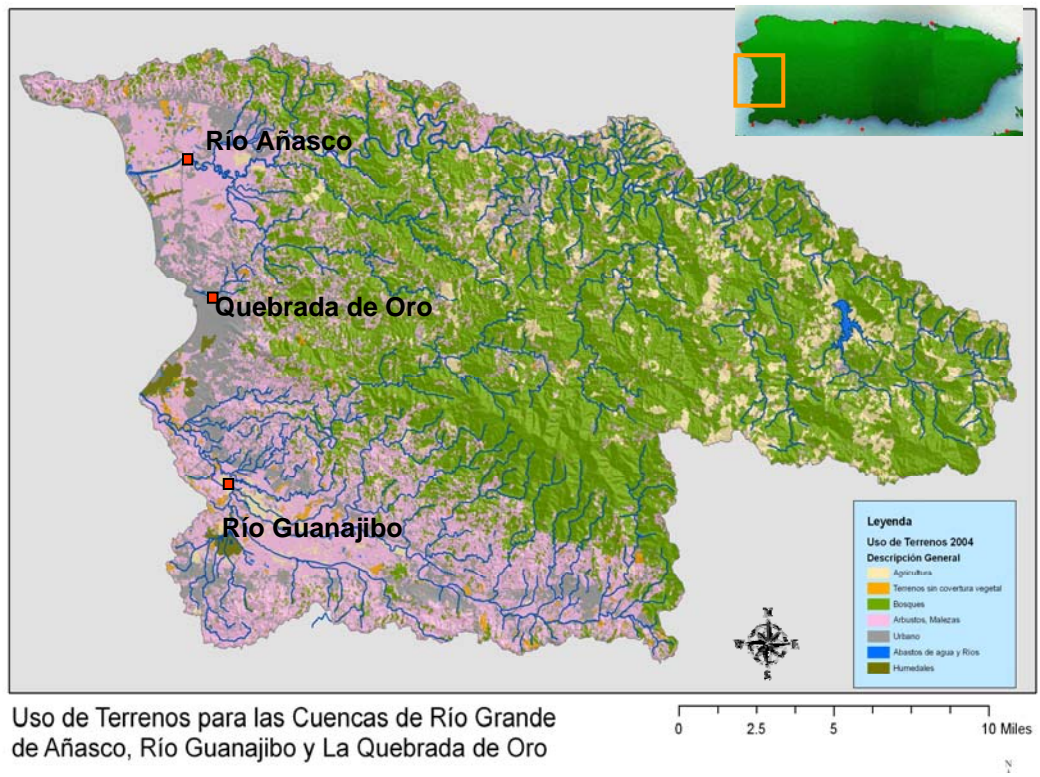


Figura 1 . Localización de las estaciones de muestreo (Mapa del área oeste de Puerto Rico)



Figura 2. Lugar de muestreo en el Río Guanajibo



Figura 3. Lugar de muestreo en el Río Añasco



Figura 4. Lugar de muestreo en la Quebrada de Oro

Plan de Muestreo

Las muestras fueron colectadas en los ríos de Añasco y Guanajibo y la Quebrada de Oro durante 4 meses. Teniendo en cuenta los reportes de precipitación de la USGS se escogieron dos muestras en época seca (febrero y abril de 2006) y las dos restantes correspondieron a época de lluvia (julio y noviembre de 2005). Los muestreos fueron realizados en la mañana. Se utilizaron botellas plásticas de 3.89L previamente lavadas con jabón y agua destilada. Las botellas fueron enjuagadas con agua del lugar de muestreo antes de tomar la muestra final. Las muestras se tomaron en contra de la corriente y fueron transportadas a temperatura ambiente y procesada en el laboratorio de Microbiología Marina y el laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Adicionalmente se tomaron medidas de pH, temperatura, oxígeno disuelto (Dissolved Oxygen Kit LaMotte), nitratos (Kit CHEMets[®] nitrate K-6902 de CHEMetrics), y fosfatos (Kit CHEMets[®] Phosphate K-8510 de CHEMetrics).

Las muestras de agua se utilizaron para cinética de degradación de *p*-nitrofenol, y para realizar conteo de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol y de heterótrofas. Las muestras de agua de abril del río Añasco y la Quebrada de Oro se utilizaron para determinar cambios en la comunidad bacteriana durante la degradación.

Enumeración de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol

Para determinar el número de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol se utilizó la técnica de número más probable (NMP) en medio líquido. Una muestra de agua de 10ml se mezcló con 90ml de una solución amortiguadora de fosfato a pH neutro, se agitó por 1min y posteriormente se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-3} . El medio que se utilizó para la enumeración fue Busnell Hass suplementado con *p*-nitrofenol (10mg/L). Para cada dilución se inoculó un grupo de 3 tubos. Todos los tubos con excepción de los controles se inocularon con 1ml de las diluciones seriadas apropiadas. Se incubó a temperatura ambiente por 15 días o hasta que el número de tubos positivos no cambió por dos días consecutivos. Los tubos se contaron como positivos, si el color amarillo inducido por el *p*-nitrofenol desapareció. Un grupo de 5 tubos sin inocular se incubaron en presencia de luz y otro grupo en oscuridad, como grupo control.

Enumeración de bacterias heterótrofas

Se utilizó la técnica de NMP en medio líquido, para determinar la densidad poblacional de la muestra. El medio utilizado fue caldo tripticasa soja, y se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-3} hasta 10^{-7} . Por cada dilución se sembró un grupo de 5 tubos. Los tubos se inocularon con 1ml de la respectiva dilución, luego se incubó a temperatura ambiente por 5 días, se interpretó como positivo los tubos que presentaron turbidez.

Los valores obtenidos fueron reemplazados en la formula de Thomas (Standard Methods, 1995) para determinar el NMP de bacterias.

$$\text{NMP/100ml} = \frac{(\text{no. tubos positivos} \times 100)}{\sqrt{(\text{ml de muestra en tubos negativos} \times \text{ml muestra en todos los tubos})}}$$

Cinética de degradación de *p*-nitrofenol

Los ensayos para evaluar la degradación de *p*-nitrofenol en las muestras de agua los ríos Añasco y Guanajibo y la Quebrada de Oro se realizaron por duplicado, en erlenmeyer de 250ml. Se utilizaron 150 ml de agua provenientes de los diferentes cuerpos de agua y se aplicaron los tratamientos descritos en la Tabla 1. Los erlenmeyer conteniendo las muestras fueron sellados con papel aluminio y se incubaron a temperatura ambiente en agitadores rotatorios por 15 días. El seguimiento de la degradación de *p*-nitrofenol se realizó cada 12 horas durante los primeros dos días y las lecturas posteriores se realizaron aproximadamente cada 6 horas (Se estableció en ensayos preliminares, se observó que no hay degradación de *p*-nitrofenol antes de ese periodo).

Tabla 1. Descripción de los tratamientos realizados para estudiar la degradación de *p*-nitrofenol

Tratamiento	Descripción
Agua de río + <i>p</i> -nitrofenol (Experimental)	150ml de agua de río suplementado con <i>p</i> -nitrofenol [10 mg/L]. Para evaluar la degradación de <i>p</i> -nitrofenol por bacterias autóctonas de la muestra de agua
Agua de río estéril + <i>p</i> -nitrofenol (Control)	150ml de agua de río esterilizada a 121°C 15 psi por 15 min. y suplementadas con 10mg/L de <i>p</i> -nitrofenol.

Medición de degradación

La concentración de *p*-nitrofenol fue estimada por espectrofotometría. Se tomó una alícuota de 3ml de cada uno de los experimentos se le ajustó el pH a 9 con hidróxido de sodio y se centrifugó a 3600 rpm por 15 minutos para eliminar sedimentos de la muestra que puedan interferir en la lectura. La absorbancia se determinó en el espectrofotómetro Beckman DU 640. La longitud de onda de lectura fue 380 nm. Para calcular la concentración de *p*-nitrofenol en mg/L se utilizó la siguiente fórmula:

Abs.= KCL donde abs.: absorbancia

K: Coeficiente de extinción molar

C: concentración

L: distancia que viaja la luz a través de la muestra

El coeficiente de extinción molar se calculó utilizando soluciones de *p*-nitrofenol en concentraciones de: (0.5, 1, 4, 7, 10 y 12 mg/L). Se midió la absorbancia de cada solución; los valores obtenidos fueron graficados en función de la concentración. La pendiente de la línea ($\Delta y/\Delta x$) es el coeficiente de extinción molar K (Apéndice 2). La cubeta promedio en la cual se adiciona la muestra, tiene dimensiones internas de 1cm (L). Como L es constante (1cm) y se conoce el valor de K, la concentración en mg/L de *p*-nitrofenol se calculó con base en la absorbancia.

Periodo de aclimatación (Adaptación): es el tiempo empleado desde que se adiciona el *p*-nitrofenol en la muestra de agua hasta que es detectable la degradación del compuesto.

Tiempo de degradación: Es el lapso de tiempo comprendido entre el final del periodo de aclimatación hasta la desaparición del 90% del *p*-nitrofenol.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, para comparar si hubo diferencias en el tiempo empleado para la degradación entre los ríos y a través del tiempo (meses). El análisis se realizó utilizando el paquete estadístico Infostat (versión 2006e-1).

Aislamiento y caracterización de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol

Para aislar las bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol, se tomó del experimento de cinética de degradación del mes de abril una alícuota de 10ml y se inoculó en 90ml del medio mineral Busnell-Hass (Sulfato de magnesio 0.2gr, Cloruro de calcio 0.02gr, Fosfato monopotásico 1gr, Fosfato dibásico de amonio 1gr, nitrato de potasio 1gr y cloruro férrico 0.05gr) suplementado con *p*-nitrofenol [10mg/L] (BH-PNP). Cuando el color amarillo del medio asociado a *p*-nitrofenol desapareció, el cultivo enriquecido se transfirió a un medio fresco. Después de dos transferencias posteriores, se tomó 0.1ml de cultivo y se sembró en medio sólido (agar R2A suplementado con *p*-nitrofenol [10mg/L]) utilizando la técnica de esparcido en plato. Se incubó a temperatura ambiente por 48 horas.

Por cada sitio de muestreo se seleccionaron al azar colonias que presentaron halo transparente indicativo que degradan *p*-nitrofenol y se inocularon en tubos con 10ml del medio BH-PNP para confirmar su habilidad degradadora, las colonias positivas a este ensayo fueron transferidas a agar tripticasa soja para obtener colonias aisladas y posteriormente ser identificados.

Caracterización fisiológica y genotípica de cepas bacterianas

Para identificar las bacterias aisladas degradadoras de *p*-nitrofenol se realizó tinción de Gram, prueba de oxidasa, catalasa, crecimiento en agar Mac Conkey, prueba de nitrato, motilidad, indol, producción de H₂S, producción de ureasa y la prueba de arginina hidrolasa. De las bacterias aisladas se escogieron 4 cepas para caracterizarlas genotípicamente. Para esto se realizó extracción de ADN, seguido por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen del ADNr 16S y finalmente se hizo secuenciación.

Extracción de ADN de cepas bacterianas

El ADN de las bacterias fue extraído utilizando el protocolo descrito por Sambrook y Russell (1989) con ciertas modificaciones. Las bacterias se inocularon en 7 ml de caldo Luria y se incubaron a 37°C por 18-24 h. Se centrifugó 1.5 ml de cultivo a 14,000 rpm. por 2 min.; el sobrenadante se descartó y se repitió nuevamente el proceso hasta obtener un precipitado de células considerable.

Las células precipitadas se resuspendieron con 100 µl de TES (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8, Sacarosa 25%), por vortex. A la suspensión de células se adicionó 40 µl de lisozima (5mg/ml) y 40 µl de EDTA, y seguidamente se mezcló con vortex durante 1 min. y se incubó a 37°C por 10 min. Luego se añadió 175 µl de agua destilada, 50 µl de SDS (dodecilsulfato de sodio) y 5 µl de la enzima RNAsa (10mg/ml), se mezcló bien y se incubó a 37°C por 20 min. Después se añadió 10µl de Pronasa E (10mg/ml) y se incubó a 37°C por 30min. A esto se le adicionó 85 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8), 120 µl de NaCl se mezcló en vortex y se incubó a 65°C por 20min. Posteriormente se adicionó 75µl de acetato de potasio (8M), se mezcló invirtiendo el microtubo, se refrigeró por 15min. y se centrifugó a 14,000rpm por 5min. para precipitar restos celulares y las proteínas. Después se añadió 1.3ml de etanol al 95% y se dejó precipitando el ADN toda la noche a 4°C. Luego se centrifugó a 14,000rpm por 30min y se descartó el sobrenadante. El ADN precipitado fue lavado con 1.3ml de etanol al 70% y se centrifugó a 14,000rpm por 30min. El ADN fue secado al vacío y se resuspendió en 50 µl de TE y guardado a -20°C.

El ADN obtenido fue visualizado y cuantificado en gel de agarosa al 1% teñida con 1% de bromuro de etidio (5mg/ml) utilizando como estándar de calibración el ADN del fago lambda cortado con la enzima *Hind* III.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para identificar las bacterias degradadoras se utilizo el gen 16s del ADNr. Este gen fue amplificado a partir de 100ng del ADN extraído de las bacterias usando los

iniciadores 8F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') y el 1392R (5'-ACGGGCGGTGTGTACA-3'). El volumen de reacción fue 50µl y contenía: 5µl de amortiguador sin MgCl₂ (Taq 10x), 6µl de MgCl₂ (25mM), 34µl de agua destilada, 1µl de una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatados (DNTP's por sus siglas en ingles) cuya concentración era de 2,5mM por cada DNTP, 1µl de cada iniciador (50pM/µl), 0.5µl de albúmina sérica bovina (10mg/µl) y 0.5µl de la enzima *Taq* polimerasa (5U/µl).

Para amplificar las muestras se utilizó un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 y los parámetros fueron los siguientes: un calentamiento inicial a 95°C/1min; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C/1min, anillamiento a 55°C/1min y extensión a 72°C/2min; y una extensión final a 72°C/7min. La amplificación se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% como se mencionó anteriormente.

Secuenciación del 16S ADNr y análisis filogenético

El producto amplificado en el PCR fue secuenciado en Nevada Genomics Center. Las secuencias del producto de PCR (1,500bp aproximadamente) obtenidas con los primer 8F y 1392R fueron parcialmente secuenciadas utilizando los iniciadores 1392R y 519F (5'CAGCMGCCGCGGTAATWC3'). El producto de PCR fue purificado con el sistema (Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System) para remover exceso de nucleótidos e iniciadores. Cada reacción de secuenciación contenía 5µl de ADN (300ng) y 1µl de iniciador (10pM).

Para identificar los organismos y establecer su posición filogenética las secuencias obtenidas del gen 16S ADNr fueron analizadas con la base datos disponibles en el programa Blast (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>). Posteriormente se seleccionaron en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide&cmd=search&term=>) secuencias de organismo referencia relacionadas con los organismos de interés. En el programa FastPCR (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>) se copiaron las secuencias de las bacterias degradadoras y de los parientes relacionados para corregir y eliminar errores en el formato de las secuencias. Luego fueron alineadas en el programa ClustalW de Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Finalmente el análisis de cluster y la generación del árbol filogenético de las secuencias parciales del 16S se realizó en el programa MEGA 3.1 por el método del vecino más cercano, utilizando el modelo de p-distance. (<http://www.megasoftware.net>)

Análisis de la estructura de la comunidad microbiana durante el proceso de degradación

La técnica utilizada para observar los cambios en la estructura de la comunidad microbiana durante la degradación de *p*-nitrofenol fue T-RFLP. Se utilizaron muestras de abril y los cuerpos de aguas evaluados fueron el Río Añasco y la Quebrada de Oro. Los ensayos se realizaron en frascos de 5L. Por cada lugar de muestreo se ensamblaron 8 sistemas conteniendo 1L de agua. A cuatro de los sistemas se les adicionó *p*-nitrofenol (10mg/l) y los cuatro restantes se utilizaron como control para estudiar los cambios que se dan en la comunidad por las condiciones de laboratorio.

Muestreo de los sistemas y extracción del ADN de la comunidad

En diferentes etapas de degradación de *p*-nitrofenol (al inicio del proceso, cuando se ha removido el 25% y el 50% del *p*-nitrofenol y al final degradación) se obtuvieron muestras de la comunidad. Para ello se tomó 1L de cada sistema y se filtraron utilizando una membrana de 0.2 μm de policarbonato (Millipore). La membrana fue picada en fragmentos de 0.5 cm^2 y colocada en un microtubo de 1.5 ml. Los pasos para la extracción del ADN se realizaron a la membrana y fueron similares al protocolo descrito anteriormente. Se modificó el volumen de reactivos utilizados, siendo duplicada la cantidad de cada uno de ellos. El ADN fue resuspendido en 30 μl de TE.

Análisis T-RFLP del ADNr 16S

La amplificación del ADNr 16S de la comunidad fue realizado con los iniciadores 27F-IRDye[®] 700 de LI-COR (5' AGAGTTTGATCMTGGCTC 3') marcado en el extremo 5' y el iniciador 1392R. El volumen total de reacción fue 50 μl , las cantidades y reactivos utilizados, así como los parámetros de amplificación fueron similares a los descritos anteriormente. La amplificación se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (TAE 1X) con 1 μg del marcador Lambda *Hind*III utilizado para estimar la cantidad de ADN.

El producto amplificado (gen 16S ADNr) fue digerido con tres enzimas en reacciones separadas. Las enzimas utilizadas fueron *Hae* III, *Rsa* I, y *Msp* I (Promega[®]). La digestión se realizó a 37°C/4 h, en volúmenes de 20 μl , conteniendo 10 μl de ADN (200 ng), 7.5 μl de agua destilada desionizada estéril, 2 μl del amortiguador específico

para cada enzima (10X) y 0.5µl de enzima de restricción (10U/µl). Después que la reacción finalizó la enzima fue inactivada por calentamiento de la mezcla a 65°C/10 min e inmediatamente refrigerada a 4°C.

Los perfiles de T-RFLP de la digestión del gen 16S rDNA de la comunidad se visualizaron utilizando el analizador LI-COR Biosciences NEN[®]DNA Analyzer Model 4300 (LICOR Inc.). Para esto alícuotas de 1µl del producto de cada digestión fueron mezcladas con 1µl de IR² stop solution (LI-COR Biosciences) y se desnaturalizaron a 94°C/5min. Para separar los fragmentos se utilizó una gel de acrilamida al 6.5% (KB^{Plus} Gel Matrix LI-COR), la cual se preparó adicionando 20ml de KB^{PLUS}, 150µl persulfato de amonio y 20ml de una solución de TEMED (15%), y se dejó polimerizando por 2 horas.

Antes de usar el gel se realizó un pre-corrido por 20 min con el buffer de corrida KB^{plus} TAE 1X con los siguientes parámetros de electroforesis: voltaje de corrida 1500 V, corriente 40 mA, fuente de poder 40 W, temperatura 50 °C. Luego se sirvió 1µl de cada muestra y se corrieron por 4 h con los parámetros descritos antes. Después de la electroforesis, los patrones de T-RFLP fueron guardados en una imagen TIF. Se utilizó el marcador de peso molecular 50-700bp (KB^{Plus}-LICOR).

Análisis de datos y estadística

Los fragmentos de los perfiles de T-RFLP fueron analizados con el Software Gel Pro Analyzer 3.1 para determinar su tamaño y abundancia. Los fragmentos

terminales fluorescentes (T-RFs) se compararon con un marcador estándar de peso molecular de 50-700bp (KB^{Plus}-LICOR), para determinar el tamaño en pares de bases. La abundancia relativa de los TRFs, fue determinada calculando la proporción de la altura de cada pico entre la altura total de todos los picos de cada muestra. Para evitar la detección de iniciadores y determinación de tamaños inciertos, solo se consideraron los fragmentos terminales comprendidos entre 50bp y 700bp.

La similitud de la estructura de la comunidad entre los ríos se determinó utilizando el análisis de correspondencia (CA), con el software PAleontological STatistics, ver. 1.60 (PAST, <http://folk.uio.no/ohammer/past>). El análisis de correspondencia produce una representación grafica de las muestras a través de dos o mas ejes de referencia los cuales contienen una fracción del total de la variabilidad. Cada eje puede representar algunos de los posibles factores ambientales que afectan la distribución de las comunidades. Comunidades con estructura similar se encuentran agrupadas en la grafica multidimensional. Los datos dispersos en la grafica representan la variabilidad de la comunidad (Ayala et al., 2004). El CA se realizó con los dos cuerpos de agua para comparar la variabilidad de los lugares durante la degradación.

RESULTADOS

Parámetros fisicoquímicos

La distribución ecológica y el funcionamiento de las poblaciones microbianas están fuertemente influenciados por factores abióticos. Por estas razones se determinaron las propiedades físico-químicos en las áreas de estudio para observar el efecto que ejercieron sobre la degradación de p-nitrofenol. Los resultados de las características fisicoquímicas de los ríos Añasco, Guanajibo y la Quebrada de Oro aparecen en la tabla 2.

Temperatura: La temperatura en los ríos osciló entre 24 y 27°C. En julio 2005 y abril 2006 los ríos registraron un leve incremento en la temperatura. En Quebrada de Oro la temperatura presentó poca variación durante el periodo de estudio.

Oxígeno disuelto: El oxígeno disuelto fluctuó entre 4.8 y 6.1 mg/L durante los meses de muestreos. En abril fue bajo el nivel de oxígeno disuelto en los tres cuerpos de agua; el valor mínimo lo presentó el río Guanajibo (4.28mg/L). Por otro lado la Quebrada de Oro presentó los máximos valores de oxígeno disuelto (6.1mg/L) en febrero y noviembre.

PH: el pH osciló entre 7.4 – 8.0. En el río Guanajibo se registraron los valores más altos de pH y se presentó mucha oscilación en los valores a través de los muestreos.

Nutrientes: Los nutrientes se determinaron en los muestreos de febrero y abril, los datos de noviembre para los ríos Añasco y Guanajibo fueron suministrados por la United States Geological Survey (USGS-www.usgs.gov). La concentración de fósforo (PO_4^-) osciló entre 0.06-0.9 mg/L. El río Guanajibo registró los valores de PO_4^- más alto durante el estudio, presentando el máximo valor en febrero (0.9 mg/L). La concentración de NO_3^- osciló entre 0.15-2.2 mg/L. La Quebrada de Oro en noviembre registró el máximo valor (2.2 mg/L). El río Añasco presentó los valores más bajo de NO_3^- y PO_4^- .

Tabla 2. Características fisicoquímicas de los ríos Añasco, Guanajibo y la Quebrada de Oro

Área de Muestreo	Temperatura (°C)	Oxígeno Disuelto (mg/L)	pH	Fosfatos (PO_4^-)(mg/L)	Nitratos (NO_3^-)(mg/L)
Río Añasco					
Febrero	24.3	4.76	7.7	0.15	0.15
Abril	28	4.69	7.6	0.1	0.2
Julio	27.5	5.8	7.6	ND	ND
Noviembre	24	5.2	7.7	0.062 ^{*1}	0.941 ^{*1}
Río Guanajibo					
Febrero	26.9	5.22	8.0	0.9	0.7
Abril	27	4.28	7.6	0.4	0.4
Julio	27.5	5.8	7.8	ND	ND
Noviembre	24	5	7.4	0.224 ^{*1}	0.721 ^{*1}
Quebrada de Oro					
Febrero	24.9	6.1	7.7	0.2	0.9
Abril	26.2	4.78	7.7	0.2	0.8
Julio	26.5	6	7.6	ND	ND
Noviembre	25	6.1	7.6	0.23 [*]	2.2 [*]

* Sánchez, B. (Comunicación personal)

*¹Datos no publicados proporcionados por la USGS

ND: no determinado

Biodegradación de *p*-nitrofenol

En los tres ríos las bacterias autóctonas tuvieron capacidad de degradar el *p*-nitrofenol. El porcentaje de degradación en los ríos fue superior al 90%; sin embargo, se observó que hubo diferencias significativas entre ríos en el tiempo empleado para la degradación a través del tiempo ($p < 0.001$) apéndice 1.

Las muestras del río Añasco utilizaron menos tiempo para la degradación de *p*-nitrofenol en febrero (48.28h) y noviembre (34.3h) (Figura 6 y 7); mientras el río Guanajibo en abril (28.84h) y julio (49.56h) (Figura 5 y 8). En abril el periodo de aclimatación se prolongó, el río Añasco utilizó 75.39h, el río Guanajibo 65.39h y la Quebrada de Oro 137.73h (Figura 5).

La Quebrada de Oro durante el estudio tardó más en degradar el *p*-nitrofenol utilizando entre 69.86 y 124.33 horas (Figuras 5-8). Esto coincidió con el periodo de aclimatación, el cual fue más prolongado en comparación con los otros ríos, utilizando entre 74.83 y 137.73 horas. En noviembre la degradación fue rápida, empleó 69.86 horas para degradar el compuesto y su periodo de aclimatación fue el más corto, utilizando 74.83 horas (Figura 7).

En el río Añasco la degradación durante noviembre fue rápida, se llevó a cabo en 34.3 horas (Figura 7). El período de aclimatación fue similar en febrero (36.8h) y noviembre (36.7h); sin embargo, en febrero para la degradación empleo 48.28 horas. En abril la degradación tardó, siendo necesaria 85.02 horas, asimismo se duplicó la fase de aclimatación. En julio se registró el periodo de aclimatación más corto (23.6h).

En el río Guanajibo el tiempo de aclimatación fue similar en febrero (66.17 h), abril (65.39 h) y julio (60.88h). Sin embargo el tiempo para degradar el *p*-nitrofenol fue diferente en febrero empleó 53.31 horas, abril 28.84 horas y en julio 49.56 horas. En noviembre la degradación tardó más (70.99 h), no obstante, el periodo de aclimatación fue el más corto del periodo estudio, empleando 21 horas.

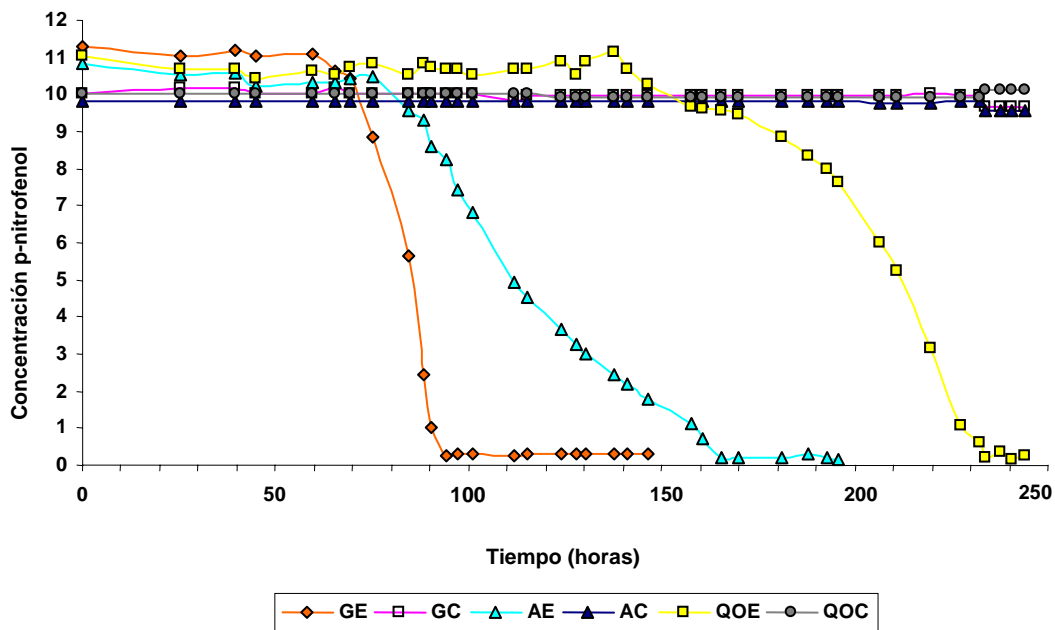


Figura 5. Degradación de p-nitrofenol. Añasco (A), Guanajibo (G) Quebrada de Oro (QO). Experimental (E), Control (C). Abril 2006

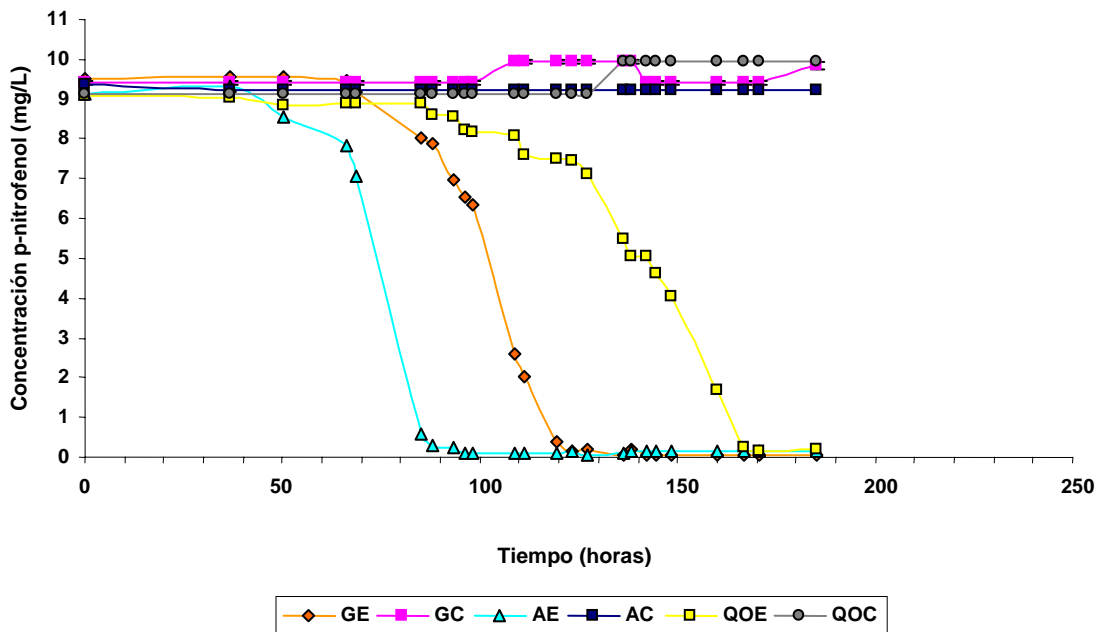


Figura 6. Degradación de p-nitrofenol. Añasco (A), Guanajibo (G) Quebrada de Oro (QO). Experimental (E), Control (C). Febrero 2006

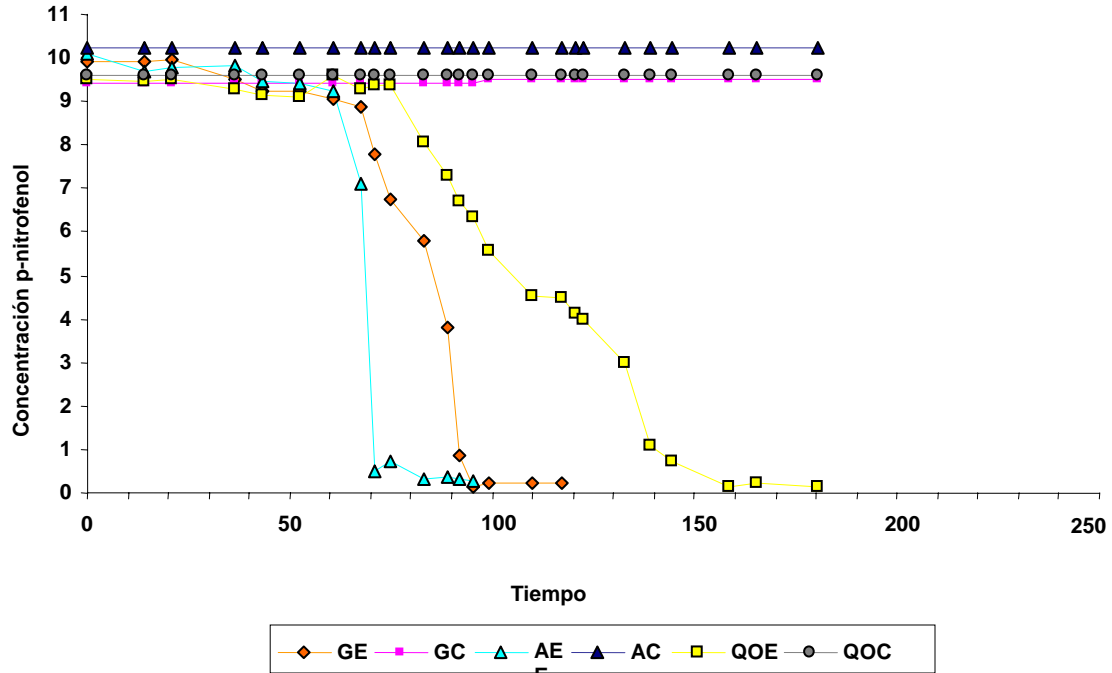


Figura 7. Degradación de p-nitrofenol. Añasco (A), Guanajibo (G), Quebrada de Oro (QO). Experimental (E), Control (C). Noviembre 2005

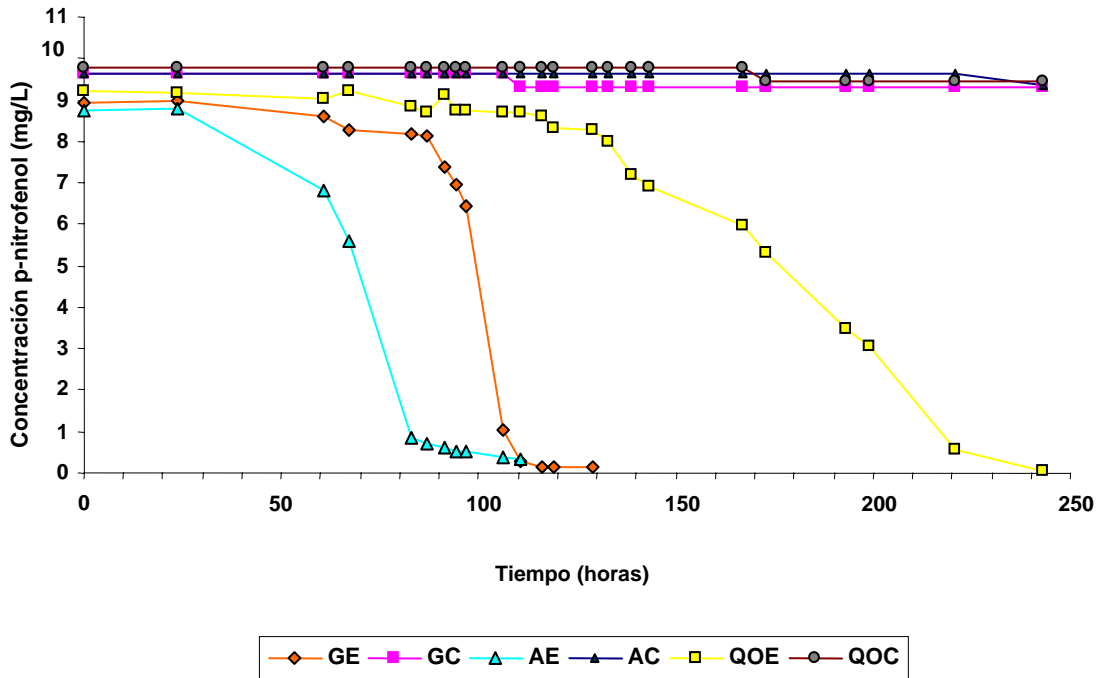


Figura 8. Degradación de p-nitrofenol. Añasco (A), Guanajibo (G) Quebrada de Oro (QO). Experimental (E), Control (C). Julio 2005

Enumeración de bacterias heterótrofas y degradadoras de *p*-nitrofenol

En general el conteo de bacterias degradadoras fue más bajo que el de bacterias heterótrofas (Figura 9 y 10). La densidad bacteriana degradadora de *p*-nitrofenol fue alta en julio en los ríos Añasco (1.1×10^4 NMP/100ml), Guanajibo (9.7×10^3 NMP/100ml) y la Quebrada de Oro (2×10^2 NMP/100ml) (Figura 9); sin embargo, fue aproximadamente 100 veces menor en proporción a los conteos obtenidos para bacterias heterótrofas los cuales fueron para el río Añasco 1.38×10^7 NMP/100ml, el río Guanajibo 2.14×10^7 NMP/100ml y la Quebrada de Oro 1.38×10^6 NMP/100ml (Figura 10).

El conteo de bacterias heterótrofas disminuyó en febrero; el río Añasco presentó 2.6×10^5 NMP/100ml, el río Guanajibo 1.9×10^5 NMP/100ml y la Quebrada de Oro 1.9×10^5 NMP/100ml. En abril el conteo de heterótrofas presentó un comportamiento similar al anterior, para el río Añasco 3.8×10^5 NMP/100ml y la Quebrada de Oro 1.3×10^5 NMP/100ml, mientras en el río Guanajibo se incremento el conteo a 5.29×10^6 NMP/100ml. Por otro lado en febrero y abril las bacterias degradadoras no fueron cuantificables en los cuerpos de agua, exceptuando al río Guanajibo en abril, donde la población degradadora fue 2×10^2 NMP/100ml, sin embargo, su proporción fue 20 veces menor a la registrada en noviembre. En general la Quebrada de Oro presentó las densidades más bajas de bacterias degradadoras y de heterótrofas durante el estudio.

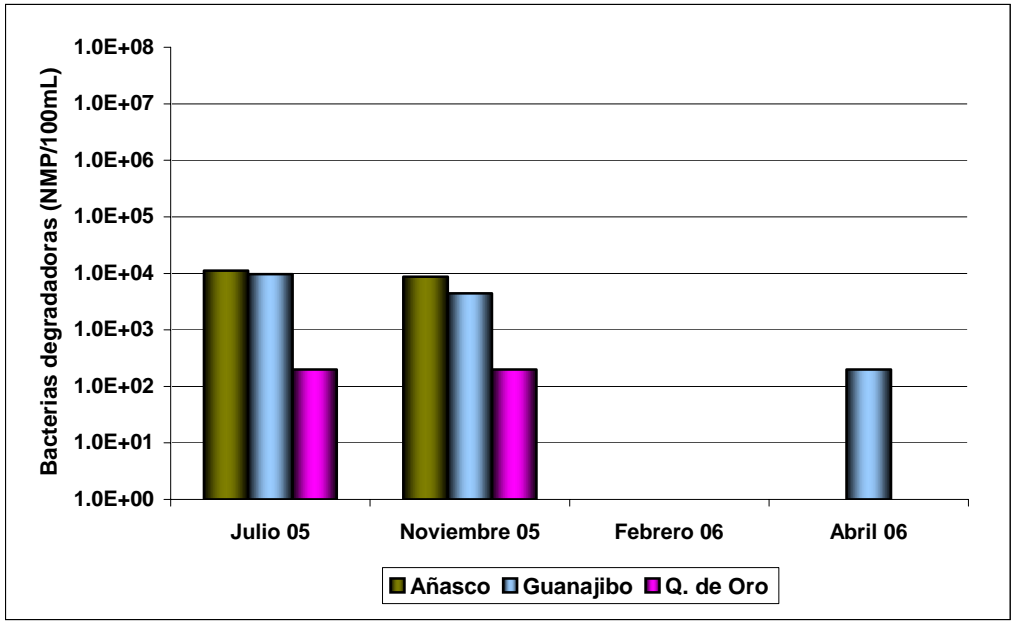


Figura 9. Bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol (NMP/100ml)

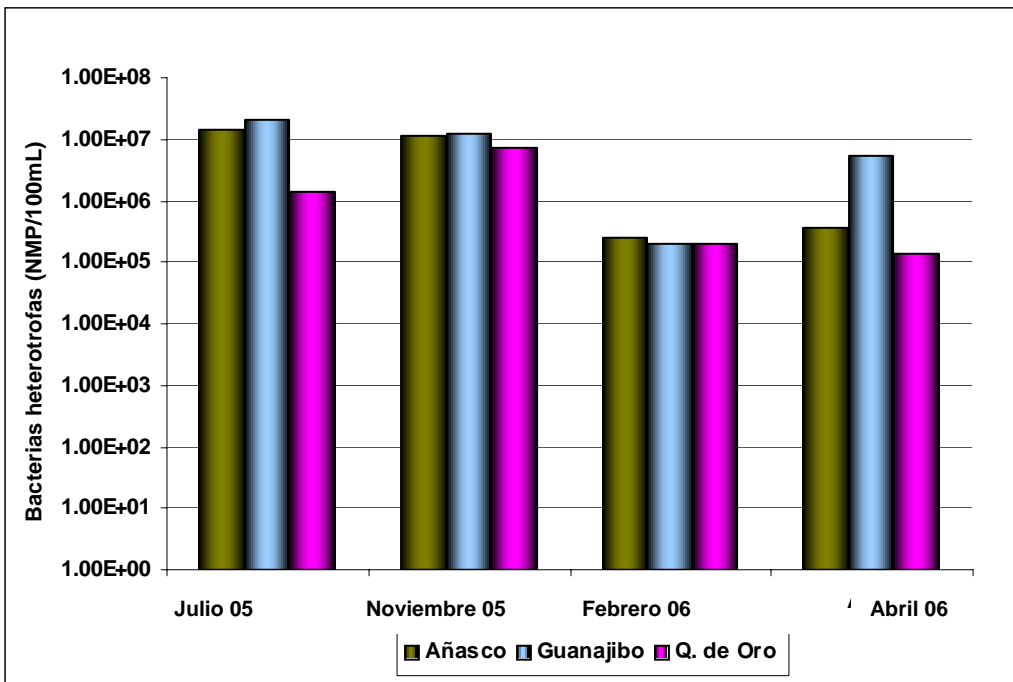


Figura 10. Bacterias Heterótrofas (NMP/100ml)

Cambios en la comunidad microbiana durante la degradación de *p*-nitrofenol mediante el análisis de T-RFLP

El análisis de correspondencia de los perfiles de T-RFLP de las comunidades microbianas de los ríos, mostró que las comunidades del río Añasco (Ac0%, Ae0%, Ac25% y Ae25%) y de la Quebrada de Oro (Qc0%, Qe0%, Qc25% y Qe25%) al inicio de proceso de degradación se agrupan cerca en el diagrama (Figura 11). EL patrón de T-RFLP mostró que las comunidades del río Añasco en esta etapa comparten 18 fragmentos terminales (T-RFs= 376, 318, 292, 278, **226**, 218, 192, y 173 con *Hae* III; T-RFs= 644, 429, 422, 117, 62 y 57 con *Rsa* y T-RFs= **490**, 460, 440, y 151 con *Msp* I). Mientras las comunidades en la Quebrada de Oro compartieron 29 fragmentos terminales (T-RFs= 376, 318, 292, 262, **226**, 192, 92, 87, 73, 67, 57, 55, 53 con *Hae* III; T-RFs= 644, 604, 472, 456, **429**, 371, 137, 117, 62 con *Rsa* y T-RFs= **490**, 440, 151, 93, 74, 68 y 52 con *Msp* I), esto podría explicar porque las comunidades de Quebrada de Oro estuvieron mas confinadas en la grafica (Figura 11). Los fragmentos terminales resaltados en negrita indican que esos fragmentos terminales presentaron una abundancia relativa alta.

Cuando se removió el 50% de *p*-nitrofenol se observó que la estructura de la comunidades expuestas a *p*-nitrofenol sufren un cambio dramático en los dos lugares estudiados, dispersando las comunidades de ambos cuerpos de agua (Figura 11). Al analizar los fragmentos terminales en esta etapa de degradación se observó en la Quebrada de Oro la aparición de nuevos fragmentos terminales, exclusivos de esta fase (T-RFs= 374, 242, 203, **153** y 144 con *Hae* III; T-RFs= 683, **591**, 400, 367, 361 y

357 con *Rsa* y T-RFs= 597, 438, 431, 426 y 422 con *Msp* I), desaparición de algunos fragmentos terminales (T-RFs= 262, con *Hae* III; T-RFs= 456 y 137 con *Rsa* y T-RFs= **604** con *Msp* I) e incremento en la abundancia relativa de fragmentos terminales (T-RFs= **226**, 87, 67, 57 con *Hae* III; T-RFs= 429 y **421** con *Rsa* y T-RFs= **151** y **407** con *Msp* I). Para el río Añasco la dinámica fue similar apareciendo nuevos fragmentos terminales (T-RFs= 178 y **116** con *Hae* III; T-RFs= 100 y 97 con *Rsa* y T-RFs= **73** con *Msp* I), desaparición de fragmentos terminales (T-RFs= **226**, 192 con *Hae* III; T-RFs= 117, 421 con *Rsa* y T-RFs= 440, 161 y 151 con *Msp* I) e incrementó en la abundancia relativa de fragmentos terminales (T-RFs= 376, 318, **60** con *Hae* III; T-RFs= 422, **62** y **57** y **52** con *Rsa* I y T-RFs= 490 y 460 con *Msp* I). La aparición, desaparición e incremento en la abundancia relativa de los fragmentos terminales indican que la comunidad expuesta a *p*-nitrofenol es dinámica y que los cambios pueden estar asociados a la presencia del *p*-nitrofenol. Al final de la degradación de *p*-nitrofenol se observó que la comunidad expuesta a *p*-nitrofenol converge al estado inicial (Figura 11).

Las secuencias obtenidas de las bacterias degradadoras aisladas podrían ser utilizadas para relacionarla con los fragmentos terminales obtenidos en el perfil de T-RFLP, sin embargo debido a que se utilizó el iniciador 519F para amplificar las bacterias aisladas no se pudo realizar este análisis.

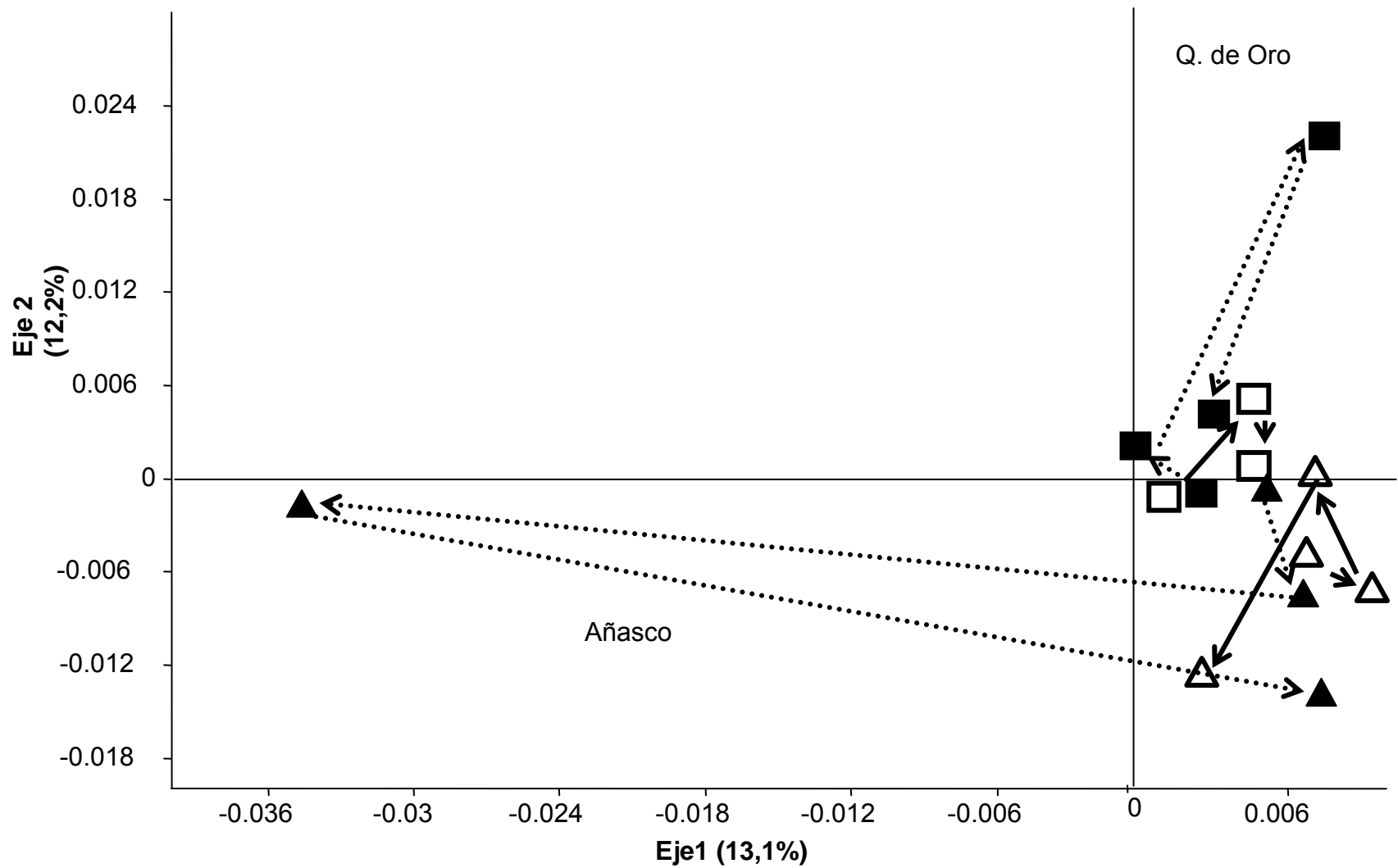


Figura 11. Análisis de correspondencia de los perfiles de T-RFLP. Comunidades de Quebrada de Oro con PNP (■) Quebrada de Oro sin PNP (□) Río Añasco con PNP (▲) y Río Añasco sin PNP (△). Las flechas indican el orden de los cambios en la comunidad.

Identificación de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol

Las bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol fueron aisladas de los ríos Añasco y Guanajibo. Las bacterias fueron clasificadas mediante tinción Gram, morfología celular y características fisiológicas (Tabla 3). Todos los aislados fueron bacterias Gram negativas, fueron similares bioquímicamente. La cepa AP 199 degradó bajas concentraciones de *p*-nitrofenol (3mg/L); las cepas AP213 y AP214 degradaron bajas y altas concentraciones de *p*-nitrofenol (3, 10 y 50mg/L), y las cepas AP194, GP2 y GP14 degradaron concentraciones de 3 y 10 mg/L de *p*-nitrofenol.

El análisis genético de las cepas degradadoras de *p*-nitrofenol (AP194, AP199, AP213, AP214) generó secuencias parciales entre 700 y 800 pares de bases que representan aproximadamente el 50% del gen 16s ADNr bacteriano. El análisis de las secuencias mostró que las cepas analizadas están asociadas al linaje de las proteobacterias (Figura 12). Las cepas AP213, AP194 y AP214 estuvieron estrechamente relacionadas con *Pseudomonas putida*, mientras la cepa AP199 se relacionó con el género *Acidovorax*.

Tabla 3. Caracterización de bacterias aisladas

Características	Cepa AP213	Cepa AP214	Cepa AP194	Cepa AP199	Cepa GP2	Cepa GP14
Tinción Gram	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)
Morfología	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Oxidasa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Catalasa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
P-nitrofenol 3mg/L	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
P-nitrofenol 10mg/L	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
P-nitrofenol 50mg/L	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Glucosa oxidada	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
Crecimiento Mac Conkey	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
H ₂ S	(-)	(-)	(-)	ND	(-)	(-)
Indol	(-)	(-)	(-)	ND	(-)	(-)
Nitratos	(-)	(-)	(-)	ND	(-)	(-)
Arginina hidrolasa	(+)	(+)	(+)	ND	(+)	(+)
Urea	(-)	(-)	(-)	ND	(-)	(-)
Motilidad	(+)	(+)	(+)	ND	(+)	(+)

ND: no determinado

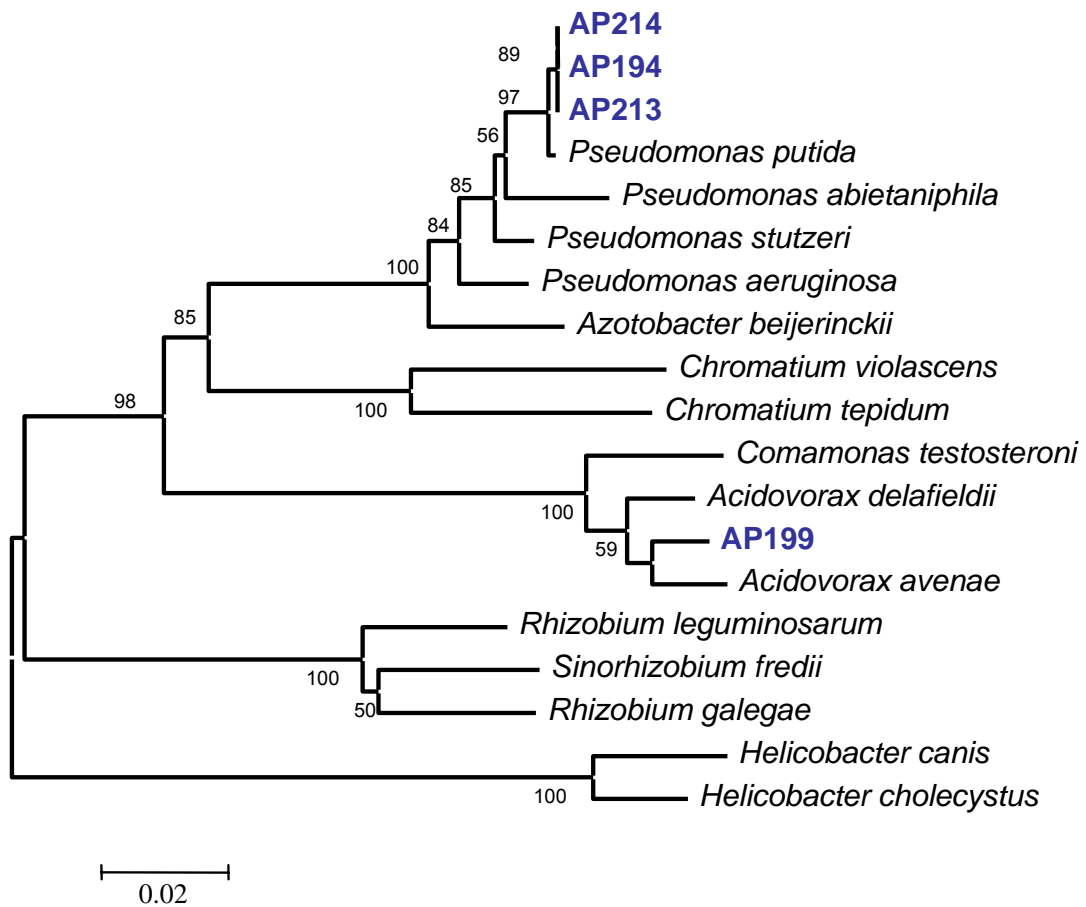


Figura 12. Árbol filogenético basado en secuencias parciales del gen 16S del ADNr de bacterias degradadoras de *p*-nitrofenol. El árbol fue generado por el método del vecino más cercano (neighbourjoining). El número mostrado en la rama son los valores de bootstrap basados en 1000 replicas. Se muestran valores de más de 50%.

DISCUSIÓN

Las poblaciones microbianas de los ríos pueden crecer con bajas concentraciones de nutrientes en comparación con las poblaciones de los suelos (Atlas y Bartha, 2002). Sin embargo, cuando se pretende degradar compuestos químicos la concentración de nutrientes inorgánicos es importante debido a que las poblaciones encargadas de mineralizar el compuesto pueden no tener habilidad para crecer bajo condiciones escasas de nutrientes (Zaidi et al., 1988a). Además de los nutrientes, factores ambientales como pH y temperatura pueden afectar la degradación (Swindoll et al., 1988). Sin embargo es necesario aclarar que los efectos que ejerce un factor sobre un ecosistema, pueden no ejercerlo en otros, e incluso en el mismo ecosistema en diferentes tiempos (Lewis et al., 1986).

Los resultados obtenidos en febrero mostraron una rápida desaparición de *p*-nitrofenol en los ríos Añasco, Guanajibo y la Quebrada de Oro. Sin embargo las bacterias degradadoras no fueron cuantificables. Se ha reportado que solo del 1-10% de los microorganismos que se presentan en la naturaleza son cultivables por las técnicas empleadas en los laboratorios (Lui et al., 1997, Head et al., 1998, Hugenholtz et al., 1998 y Macnaughton et al., 1999). Esto podría explicar el resultado encontrado, indicando que las bacterias encargadas de la degradación del *p*-nitrofenol en febrero posiblemente no fueron cultivables bajo condiciones de laboratorio. Por otra lado, la rápida degradación que se observó, pudo estar favorecida por la concentración de nutrientes inorgánicos como fósforo, el cual en este periodo estuvo en altas concentraciones en los ríos Añasco y Guanajibo. Robertson y Martin (1992),

encontraron que cuando se adicionó fósforo en un cultivo de *Pseudomonas* se incrementó la degradación de *p*-nitrofenol. Zaidi et al. (1988a), reportó que al suplementar con fósforo y nitrógeno la degradación fue mayor, que cuando suplementó con solo uno de los nutrientes en una muestra de agua de lago. A pesar que la degradación fue rápida en los tres ríos; se observó en Guanajibo un periodo de aclimatación prolongado 66.17 h y se esperaba tuviera un comportamiento similar al río Añasco (36.8h) e incluso más corto, debido a su concentración de fósforo la cual fue más alta. Esta conducta puede asociarse a un valor elevado del pH el cual fue 8. Es conocido que los organismos tienen un pH óptimo para su desarrollo y para la actividad de sus enzimas. De esta forma el pH pudo ejercer un efecto negativo sobre la población microbiana que realiza la degradación. Mulchandani et al. (2002), encontró que el pH óptimo para la máxima actividad de la enzima nitrofenol oxigenasa, la primera enzima involucrada en la degradación de *p*-nitrofenol de *Moxarella* osciló entre 7 y 7.5, y su actividad se redujo a pH 8. Zaidi et al. (1988b), reportó que algunas cepas de *Pseudomonas* no tuvieron capacidad de degradar *p*-nitrofenol en agua de lago con un pH 8 pero cuando se ajustó a pH 7, el compuesto fue degradado rápidamente.

En noviembre la rápida biodegradación coincidió con un alto conteo de bacterias degradadoras en el río Añasco y la Quebrada de Oro. Zaidi et al (1996), reportó que un incremento del inóculo de *Corynebacterium* de 3×10^5 a 3×10^6 cell/ml acortó el periodo de aclimatación y fue incrementada la degradación de *p*-nitrofenol. Spain et al. (1984), encontró que un incremento en la velocidad de degradación está relacionado con un aumento en la población degradadora. En el río Guanajibo la dinámica fue

diferente, a pesar que su población degradadora fue más alta a la de Quebrada de Oro, emplearon el mismo tiempo para realizar la degradación (70.99 h); al observar la curva de degradación para el río Guanajibo (Figura 7) se distingue que inicialmente la degradación transcurre lentamente y después es abrupta. Este comportamiento podría explicar la prolongación en el periodo de degradación y se puede relacionar a que inicialmente algunas de las poblaciones encargadas de degradar el *p*-nitrofenol utilizan otras fuentes de carbono mas fáciles de asimilar , y una vez se agotan utilizan el *p*-nitrofenol. Zaidi et al. (1995) encontró que la degradación de *p*-nitrofenol con una cepa de *Pseudomonas* sp GR, se incrementó cuando suplementó con glucosa, son obstante, con otra cepa de *Pseudomonas* MS se registró inhibición en presencia de glucosa. Wiggins y Alexander (1988), encontraron que la degradación de *p*-nitrofenol se retrasó como consecuencia del uso preferencial de 2,4-dinitrofenol (DNP), el *p*-nitrofenol solo puede ser mineralizado una vez el DNP fue eliminado.

En abril el periodo de aclimatación fue prolongado en los tres ríos y osciló entre 65.39 h y 137.73h, esto coincidió con una disminución marcada en el número de bacterias degradadoras, no siendo cuantificables en el río Añasco y en la Quebrada de Oro. En el río Guanajibo hubo bacterias degradadoras, sin embargo, su conteo fue menor a los obtenidos en noviembre. Entonces la extensión en el periodo de aclimatación, puede relacionarse con la baja población degradadora. Se ha reportado que el periodo de aclimatación en sistemas acuáticos es a menudo el reflejo del tiempo necesario para que una población pequeña de bacterias capaces de degradar el *p*-nitrofenol alcancen un alto número para que sea detectable la degradación (Wiggins et al., 1987). A pesar del periodo de aclimatación prolongado, se observó degradación en

los tres cuerpos de aguas, sin embargo, para el río Añasco, la degradación transcurre lentamente, lo cual puede ser reflejo de una población que crece gradualmente durante la degradación. En el río Guanajibo, se observó una rápida degradación de *p*-nitrofenol (28.8 h) en relación a los otros meses estudiados; esto nos podría indicar que las poblaciones encontradas en el río Guanajibo en abril son más eficientes para remover el *p*-nitrofenol.

Es conocido que las comunidades bacterianas en ecosistemas acuáticos son reguladas por protistos bacterívoros y por virus (Hahn et al., 1999, Jurgens et al., 1999, Wommack et al., 2000 y Fisher et al., 2000), estos posiblemente ejercieron mayor presión en las comunidades microbianas en febrero y abril siendo más notoria la mortalidad de las poblaciones y como consecuencia se observa una disminución en su abundancia relativa. Crump et al. (2003) encontró que poblaciones que desaparecen en el lago Toolik en Alaska, puede ser debido a que se tornan menos activas o debido a una nueva forma de mortalidad la cual disminuye su abundancia (Ej. pastoreo por protozoos y lisis viral). Por otro lado el incremento en la población heterótrofa y degradadora durante noviembre y julio posiblemente se relacionó con el aumento en la entrada de materia orgánica, nutrientes, así como la presencia esporádica de microorganismos alóctonos capaces de metabolizar el *p*-nitrofenol, que llegan a los ríos a través de las escorrentías ocasionadas por la elevada precipitación que se registró en estos meses (Apéndice 3), también puede ser consecuencia de la resuspensión de bacterias y de sedimentos en los cuerpos de agua. Se ha reportado que

aproximadamente el 29% de la población de bacterias del lago Ortrasket, Suiza son importadas por el río (Bregstrom y Jansson, 2001).

Es importante resaltar que la población degradadora fue más alta en lugares donde es mayor la actividad antropogénica como los ríos Añasco y Guanajibo, mientras en Quebrada de Oro, la población degradadora fue baja. Esto permite inferir que las poblaciones microbianas de la Quebrada de Oro no han estado previamente expuestas a este contaminante, siendo necesario más tiempo para aumentar el número de organismos capaces de metabolizar el *p*-nitrofenol. Esto explicaría porque el periodo de aclimatación y degradación son superiores a los de la comunidad de otros ríos. Spain y Veld (1983) encontraron que una rápida degradación y un periodo corto de aclimatación puede relacionarse a que las comunidades de los ríos pueden haber estado expuestas a el contaminante de interés o compuestos con estructura similar.

Las bacterias que crecieron en medios líquidos conteniendo como única fuente de carbono *p*-nitrofenol, fueron aisladas de los ríos Guanajibo y Añasco. Estas se relacionaron genéticamente principalmente con el género de *Pseudomonas*. Los organismos pertenecientes a este género se caracterizan por tener requerimientos nutricionales muy sencillos, son quimioorganotrófos y tienen capacidad de crecer rápidamente en ambientes ricos en nutrientes; por eso son clasificados como estrategas *r* (Margesin et al., 2003). Además, tienen amplia diversidad metabólica. Se ha encontrado que algunas especies pueden utilizar hasta 100 compuestos orgánicos como fuentes de carbono y muy pocas especies usan menos de 20 compuestos

comunidades (Figura 11). También se observa que la dinámica de la variación tiene una cronología de tiempo que indica la respuesta de la comunidad microbiana a la exposición al *p*-nitrofenol. El sistema control mostró las variaciones de la comunidad por las condiciones de incubación de laboratorio. Sin embargo la variación en las comunidades según se infiere del análisis de correspondencia es mayor en sistemas expuestos a *p*-nitrofenol. Este compuesto tiene un efecto reversible en la comunidad porque una vez desaparece la comunidad se reestablece.

Cuando la degradación alcanza el 50% de remoción de *p*-nitrofenol , el análisis de correspondencia de todos los fragmentos terminales obtenidos con las tres enzimas (*Hae* III, *Rsa* I y *Msp* I) mostró que la comunidad tiene una estructura particular. Se observó un incremento notable en la abundancia relativa de algunos fragmentos terminales para el río Añasco (*Hae* III= 116, 60; *Rsa* I= 62, 57, 52; *Msp* I =73) y en la Quebrada de Oro (*Rsa* I = 421 *Msp* I= 407, 151) y posiblemente puede ser asociado con un incremento en las poblaciones degradadoras las cuales se vieron favorecidas por la presencia del compuesto. Es importante observar que son diferentes los fragmentos que se incrementan para cada cuerpo de agua evaluado, indicando posiblemente que la degradación en cada lugar esta siendo llevada a cabo por poblaciones diferentes. Se observo desaparición en el río Añasco del fragmento terminal (*Hae* III= 226) mientras en los otros etapas de degradación tiene una abundancia relativa alta (38%) y para la Quebrada de Oro el fragmento terminal (*Msp* I= 490) disminuye drásticamente su abundancia relativa (15%), esta disminución se podría relacionar con el efecto negativo del *p*-nitrofenol sobre poblaciones sensibles.

Estos cambios que se dan en los fragmentos terminales pueden estar ocasionando la dispersión en la grafica de las comunidades de Quebrada de Oro y el río Añasco cuando la degradación alcanza el 50% y refleja los cambios que se dan en la comunidad debido a la presencia del *p*-nitrofenol.

Al finalizar el proceso de degradación de *p*-nitrofenol las comunidades se agrupan cerca de las del inicio del proceso; indicando que su estructura posiblemente es similar. Al observar los perfiles de T-RFLP hay reaparición de fragmentos que se encontraban al inicio del proceso de degradación; y que desaparecieron cuando la degradación estaba al 50%; además se observa que la abundancia relativa de los fragmentos terminales que se incrementaron en la etapa del 50% disminuyen nuevamente, explicando de esta forma el cambio que se da en la estructura de la comunidad. Es inusual que en el medio ambiente reaparezcan especies en la comunidad. Sin embargo se puede argumentar que las especies no fueron realmente desplazadas de la comunidad si no que su número descendió a niveles por debajo de los límites de detección de la técnica de T-RFLP (Ayala et al., 2004). esta reaparición puede estar relacionada con la desaparición del efecto negativo del *p*-nitrofenol.

CONCLUSIONES

- En los ríos evaluados las comunidades microbianas tienen potencial para degradar el *p*-nitrofenol.
- La degradación de *p*-nitrofenol fue más rápida en muestras provenientes de lugares que tienen un historial de actividad antropogénica mayor como los ríos Añasco y Guanajibo y puede estar relacionado con la exposición previa de las comunidades a el contaminante de interés o compuestos con una estructura similar.
- La comunidad degradadora de abril, en el río Guanajibo fue más eficiente para degradar el *p*-nitrofenol
- En Quebrada de Oro la degradación fue lenta y se asoció con el bajo recuento de bacterias degradadoras encontradas en las muestras.
- Las cepas aisladas de los ríos Guanajibo y Añasco que exhibieron capacidad para degradar *p*-nitrofenol están asociadas principalmente con el género *Pseudomonas*. Este género es común en lugares donde hay alto grado de contaminación y se ha aislado de lugares contaminados con nitroaromaticos.
- Las variaciones en la estructura de las comunidades microbianas del río Añasco y la Quebrada de Oro fueron mayores en los sistemas expuestos a *p*-nitrofenol.
- El cambio en la estructura de las comunidades del río Añasco y la Quebrada de Oro fue drástico cuando la degradación llega al 50% y puede ser asociado a un incremento en poblaciones degradadoras.

RECOMENDACIONES

Basado en los hallazgos de este estudio, se recomienda lo siguiente:

- Realizar genotecas para estudiar la diversidad de poblaciones presentes en los ríos Añasco y Guanajibo y la Quebrada de Oro y que no pueden ser cultivados bajo condiciones de laboratorio.
- Utilizar una técnica que permita cuantificar la cantidad de CO₂ producido durante la degradación del compuesto para verificar la mineralización de *p*-nitrofenol.

LITERATURA CITADA

- American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater
- Atlas, R. M. y R. Bartha. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Educación, S. A. Madrid
- Ayala del Río, H., S. Castiller, C. Criddle, y J. Tiedje. 2004. Correspondence between community structure and function during succession in phenol and phenol-plus-trichloethene-fed sequencing batch reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4950-4960
- Bhatti, Z.I., H. Toda, y K. Furukawa. 2002. *p*-Nitrophenol degradation by activated sludge attached on nonwovens. *Water Res.* 36: 1135-1142.
- Blackwood, C.B., T. Marsh, S.H. Kim, y E.A. Paul. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:926-932
- Braker, G., J. Zhou, L. Wu, A.H. Devol y J.M. Tiedje. 2000. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2096-2104.
- Bergstrom A.K. y M. Jansson. 2000. Bacterioplankton production in humic lake Ortrasket in relation to input of bacterial cells and input of allochthonous organic carbon. *Microb. Ecol.* 39: 101-105
- Bruhn, C., Lenke y H.J. Knackmuss. 1987. Nitrosubstituted aromatic compounds as nitrogen source for bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 208-210
- Chauhan, A., A.K. Chakraborti y R.K. Jain. 2000. Plasmid-encoded degradation of *p*-nitrophenol and 4-nitrocatechol by *Arthrobacter protophormiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 270: 733-740.
- Cho, Y.G., S.K. Rhee y S.T. Lee. 2000. Influence of phenol on biodegradation of *p*-nitrophenol by freely suspended and immobilized *Nocardioides* sp. NSP41. *Biodeg.* 11: 21-28.
- Coolen M.J.L., E. Post, C.C. Davis, Forney L.J. 2005. Characterization of microbial communities found in the human vagina by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8729-8737.

- Crump B.C., G.W. Kling, M. Bahr y J.E. Hobbie. 2003. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. 69: 2253-2268
- Daubaras, D. y A.M. Chakrabarty. 1992. The environment, microbes and bioremediation: microbial activities modulated by the environment. Biodeg. 3: 125-135
- Dunbar, J., L.O. Ticknor y C. Kuske. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16s rRNA gene terminal restriction fragment Analysis. Appl. Environ. Microbiol. 66:2943-2950
- Engebretson, J.J. y C.L. Moyer. 2003. Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. Appl. Environ. Microbiol. 69: 4823-4829
- Environmental Quality Board. 2004. Puerto Rico water quality inventory and list of impaired waters.
- Esteve-Núñez, A., A. Caballero y J. Ramos. 2001. Biological degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65(3):335-352
- Fisher, M.M., J.L. Klug, G. Lauster, M. Newton y E.W. Triplett. 2000. Effects of resources and trophic interactions on freshwater bacterioplankton diversity. Microb. Ecol. 40:125-138
- Gilbes, F., J.M. Lopez y P.M. Yoshioka. 1996. Spatial and temporal variations of phytoplankton chlorophyll *a* and suspended particulate matter in Mayaguez Bay, Puerto Rico. J. Plank. Res. 1:29-43
- Gilbert E.S., A.W. Walter y J.D. Keasling. 2003. A constructed microbial consortium for biodegradation of the organophosphorus insecticide parathion. Appl. Microbiol. Biotechnol 61:77-81
- Hanne, L.F., L.L. Kirk, S.M. Appel, A.D. Narayan y K.K. Bains. 1993. Degradation and induction specificity in actinomycetes that degrade p-nitrophenol. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3505-3508
- Hahn, M.V., E.R.B. Moore y Hofle M.G. 1999. Bacterial filament formation, a defense mechanism against flagellate grazing, is growth rate controlled in bacteria of different phyla. Appl. Environ. Microbiol. 65: 25-35
- Haigle B.E., W.H. Wallace, y J.C. Spain. 1994. Biodegradation of 2-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. Strain JS42. 60: 3466-3469

- Head, I.M., J.R. Saunders y R.W. Pickup. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* 35:2-21
- Herman, D.C. y W. Costerton. 1993. Starvation-survival of a *p*-nitrophenol-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:340-343.
- Hryhorczuk, D., M. Moomey, A. Burton, K. Runkle, E. Chen, T. Saxer, J. Slightom, J. Dimos, K. McCann y D. Barr. 2002. Urinary *p*-nitrophenol as a biomarker of household exposure to methyl parathion. *Environ. Health Perspect.* 110: 1041-1046
- Hugenholtz, P., B.M. Goebel y N. R. Pace. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180:4765-4774
- Jain R.K., J.H. Dreisbach y J.C. Spain. 1994. Biodegradation de *p*-nitrophenol via 1,2,4-Benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3030-3032
- Jain, R. K., M. Kapur, S. Labana, B. Lal, P.M. Sarma, D. Bhattacharya y I.S. Thakur. 2005. Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. Special section: Microbial Diversity. *Curr. Sci.* 89(1)
- Junta de Calidad Ambiental. 2004. Informe sobre el estado y condición del ambiente en P.R. 2004.
- Junta de Calidad Ambiental y Oficina del Gobernador. 1996. Área de calidad de agua y división de planes y programas. Río Grande de Añasco.
- Jurgens K., J. Pernthaler, S. Schalla y R. Amann. 1999. Morphological and compositional changes in planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1241-1250
- PUTPR. 2006. Plan de uso de terreno de Puerto Rico-Perfil regional, Región oeste.
- Kadiyala, V. y J.C. Spain. 1998. A Two-Component Monooxygenase Catalyzes Both the Hydroxylation of *p*-Nitrophenol and the Oxidative Release of Nitrite from 4-nitrocatechol in *Bacillus sphaericus* JS905. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2479-2484
- Karim K. y S.K. Gupta. 2001. Biotransformation of nitrophenols in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Bioresour. Technol* 80: 179-186
- Kulkarani, M. y A. Chaudhari. 2006. Biodegradation of *p*-nitrophenol by *P. Putida*. *Bioresour. Technol.* 97:982-988

- Laha, S. y K.P. Petrova. 1998. Biodegradation of 4-nitrophenol by indigenous microbial populations in Everglades soils. *Biodeg.* 8:349-356
- Leser, T.D., R.H. Lindecrone, T.K. Jensen, B.B. Jensen y K. Moller. 2000. Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3290-3296
- Lessner, D.J., R. E. Parales, S. Narayan y D. T. Gibson. 2003. Expression of the Nitroarene Dioxygenase Genes in *Comamonas* sp. Strain JS765 and *Acidovorax* sp. Strain JS42 Is Induced by Multiple Aromatic Compounds. *J. Bacteriol.* 185:3895-3904
- Lewis, D.L., H.P. Kollig y R.E. Hodson. 1986. Nutrient limitation and Adaptation of microbial populations to chemical transformations. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:598-603
- Lui, W.-T., T.L. Marsh, H. Cheng y L.J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4516-4522
- Macnaughton, S. J., J.R. Stephen, A.D. Venosa, G.A. Davis, Y.J. Chang y D.C. White. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3566-3574
- Madigan M.T., J.M. Martinko y J. Parker. 1999. *Brock biología de los microorganismos.* 8ª Ed. Prentice Hall, Madrid
- Margesin, R., D. Labbé, F. Schinner, C.W. Greer y L.G. White. 2003. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3085-3092
- McTavish, H., G. Pandey y P. Kotharu. 2006. University of Minnesota. 4-Nitrophenol Pathway Map. http://umbbd.msi.umn.edu/nphe/nphe_map.html
- Mulchandani, P., Y. Lei, W. Chen, J. Wang y A. Mulchandani. 2002. Microbial biosensor for p-nitrophenol using *Moraxella* sp. *Anal. Chim. Acta* 470: 79-86.
- Munnecke D.M. y D.P. Hsieh. 1974. Microbial decontamination of parathion and p-nitrophenol in Aqueous Media. *Appl. Microbiol.* 28: 212-217
- Nagashima K., T. Hisada, M. Sato y J. Mochizuki. 2003. Application of new primer-enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial populations in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1251-1262

- Osborne, C., G.N. Rees, Y. Bernstein y P.H. Janssen. 2006. New threshold and confidence estimates for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1270-1278
- Rittmann, B.E. y P.L. McCarty. 2001. Eliminación de toxicidad de productos químicos peligrosos en: *Biología del medio ambiente, principios y aplicaciones*. McGraw-Hill, Inc. España
- Robertson, B.K. y M. Alexander. 1992. Influence of calcium, iron and pH on phosphate availability for microbial mineralization of organic chemicals. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1): 38-41
- Saikaly, P.E., P.G. Stroot y D.B. Oerther. 2005. Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5814-5822
- Sambrook, J., E.F. Fritsh, y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. N.Y.
- Sánchez, M.A., M. Vásquez y B. González. 2004. A previously unexposed forest soil microbial community degrades high levels of the pollutant 2,4,6-trichlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7567-7570
- Sánchez, B. 2007. Comunicación personal
- Schackmann A. y R. Müller. 1991. Reduction of nitroaromatic compounds by different *Pseudomonas* species under aerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:809-813
- Spain, J.C. 1995. Biodegradation of nitroaromatics compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:523-555
- Spain, J. y D.T. Gibson. 1991. Pathway for biodegradation of p-nitrophenol in a *Moraxella* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (3): 812-819.
- Spain, J.C., P.A. Van Veld, C.A. Monti, P.H. Pritchard y C.R. Cripe. 1984. Comparison of p-nitrophenol biodegradation in field and laboratory test systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:944-950
- Spain, J.C. y P.A. Van Veld. 1983. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure, time, inoculum, and chemical structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:428-435
- Spectrum Laboratories. Chemical fact sheet 4-Nitrophenol. <http://www.speclab.com/compound/c100027.html>

- Suárez, V. M. Los ríos más importantes de Puerto Rico. Hoja informativa del Departamento de Recursos Naturales y Ambientales. <http://www.ceducapr.com/rios.htm>
- Swindoll C.M., C.M. Aelion y F.K. Pfaender. 1988. Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:212-217
- Yeager, C. M., D. E. Northup, C.C. Grow, S.M. Barns y C.R. Kuske. 2005. Changes in nitrogen-fixing and ammonia-oxidizing bacterial communities in soil of a mixed conifer forest after wildfire. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2713-2722
- Wiggins, B. A., S.H. Jones y M. Alexander. 1987. Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:791-796
- Wiggins, B. A. y M. Alexander. 1988. Role of chemical concentration and second carbon sources in acclimation of microbial communities for biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2803-2807
- Wommack, K.E. y Colwell R.R. 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 69-114
- Zaidi, B. y N. Metha. 1995. Effects of organic compounds on the degradation of *p*-nitrophenol in lake and industrial wastewater by inoculated bacteria. *Biodeg.* 6: 275-281
- Zaidi, B.R. y S.H. Imam. 1996. Inoculation of microorganisms to enhance biodegradation of phenolic compounds in industrial wastewater: Isolation and identification of three-indigenous bacterial strains. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 42: 249-256.
- Zaidi, B.R., Y. Murakami y M. Alexander. 1988a. Factors limiting success of inoculation to enhance biodegradation of low concentrations of organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 22:1419-1424
- Zaidi, B.R., G. Stucki y M. Alexander. 1988b. Low chemical concentration and pH as factors limiting the success of inoculation to enhance biodegradation. *Environ. Toxicol. Chem.* 7:143-151.
- Zaidi, B.R., S.H. Imam y R.V. Greene. 1996. Accelerated biodegradation of high and low concentrations of *p*-nitrophenol (PNP) by bacterial inoculation in industrial wastewater: the role of inoculum size on acclimation period. *Curr. Microbiol.* 33: 292-296

APÉNDICES

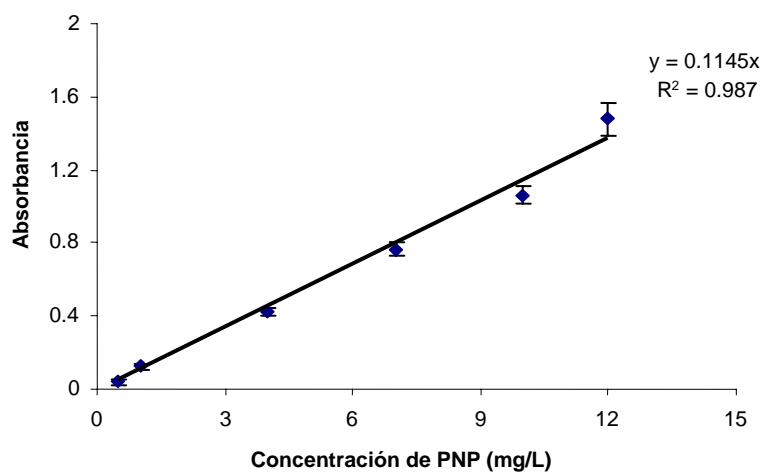
Apéndice 1. Análisis de la Varianza de dos vías

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Tiempodegradación	24	0.99	0.99	3.69

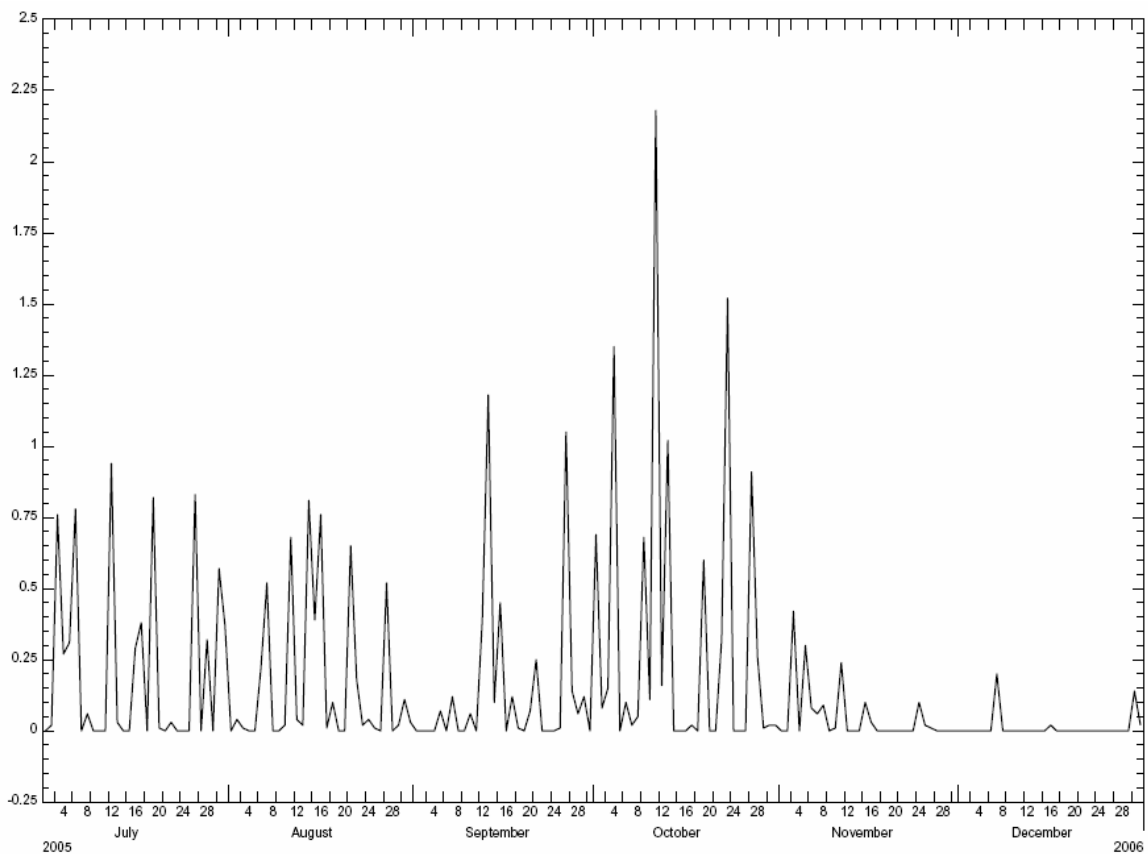
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	13982.79	11	1271.16	199.97	<0.0001
Ríos	5170.54	2	2585.27	406.69	<0.0001
Mes	2738.80	3	912.93	143.61	<0.0001
Ríos*Mes	6073.45	6	1012.24	159.23	<0.0001
Error	76.28	12	6.36		
Total	14059.07	23			

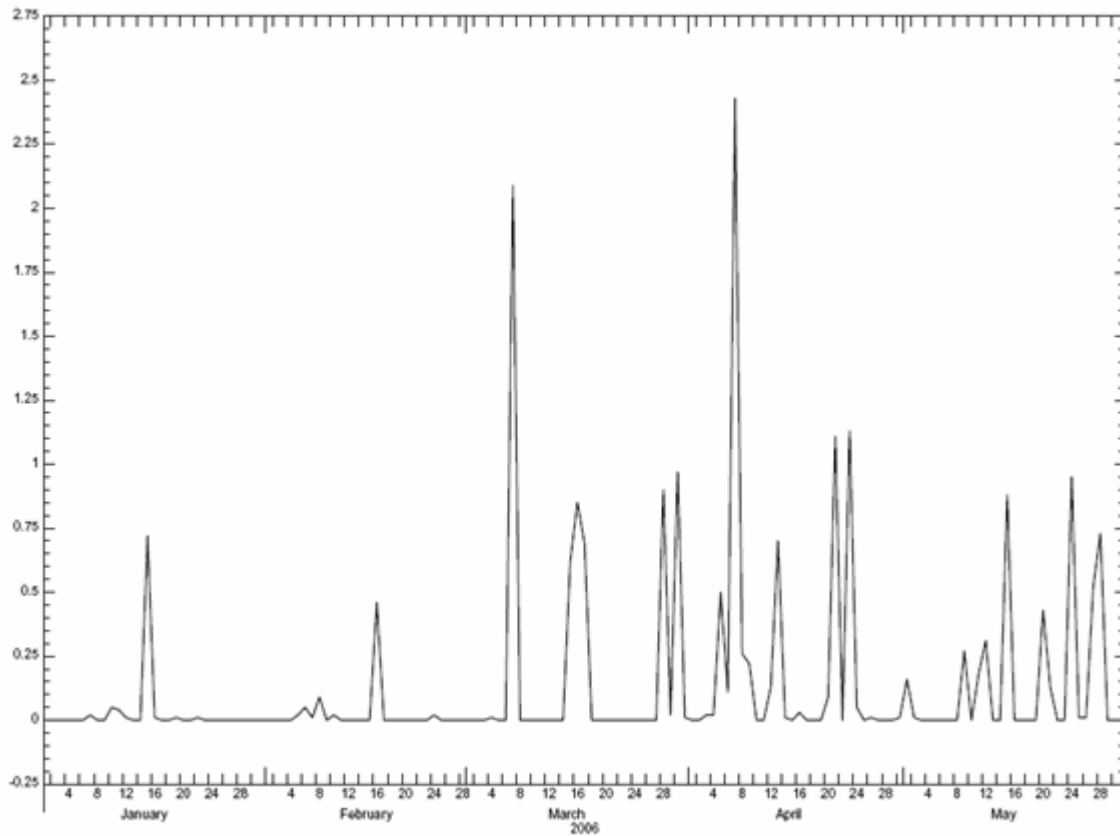
Apéndice 2. Curva calibración de *p*-nitrofenol



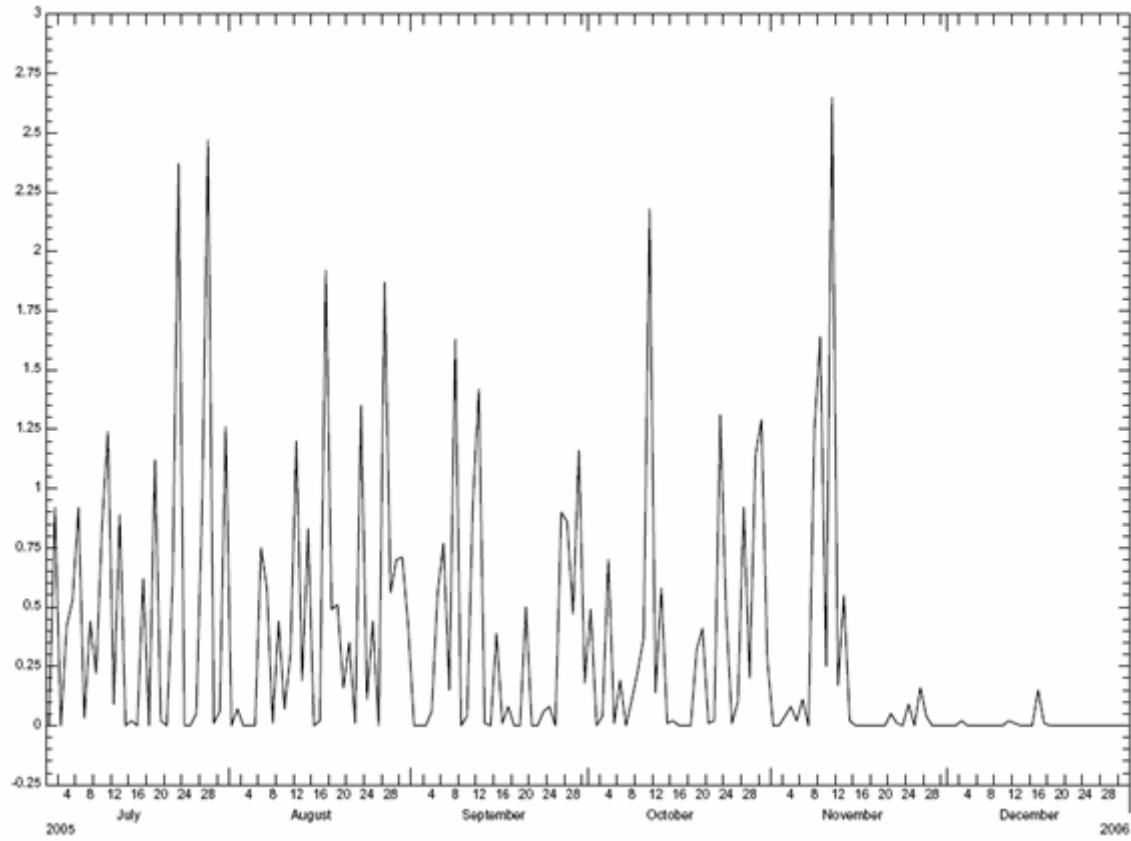
Apéndice 3. Datos de precipitación proporcionados por la USGS



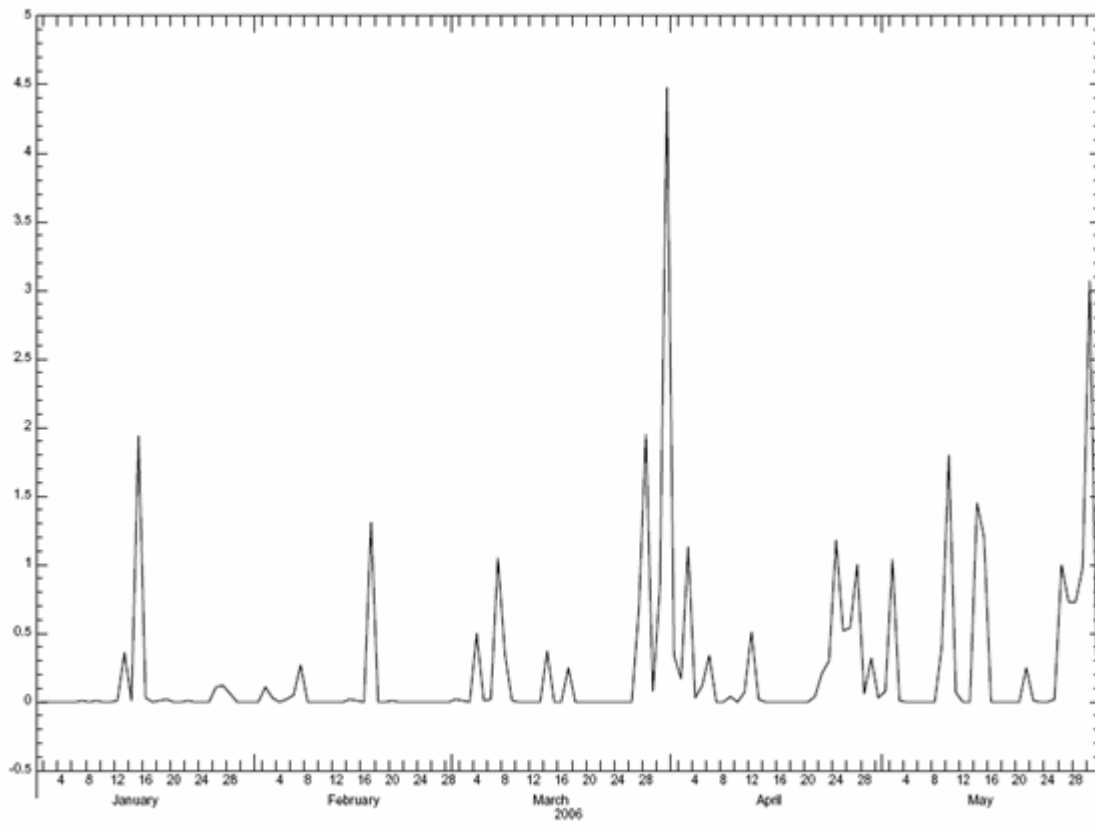
Precipitación en el río Guanajibo Julio-Diciembre 2005



Precipitación en el río Guajabo de enero-julio 2006



Precipitación en el río Grande de Añasco de julio-diciembre 2005



Precipitación en el río Añasco entre febrero- mayo 2006