

Obtaining microorganisms in cloud forest soils for the degradation of aromatic hydrocarbons

Obtención de microorganismos en suelos de un bosque de niebla, para la degradación de hidrocarburos aromáticos

Yair Cruz-Narváez^{1*}; Enrique Rico-Arzate¹; José J. Castro-Arellano¹; Gerardo Noriega-Altamirano²; Alberto Piña-Escobedo³; Selvasankar Murugesan³; Jaime García-Mena³

¹Instituto Politécnico Nacional-ESIQIE-UPALM, Laboratorio de Posgrado de Operaciones Unitarias. Edificio 7, 1.º Piso, Sección A, Av. Luis Enrique Erro s/n, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Zacatenco. C. P. 07738. Delegación Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México.

²Universidad Autónoma Chapingo, Academia de Meteorología, Área de Agronomía. km 38.5 Carretera México-Texcoco. C. P. 56230. Chapingo, Texcoco, Estado de México, México.

³Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav), Departamento de Genética y Biología Molecular. Av. IPN 2508, col. Zacatenco. C. P. 07360. Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México.

*Corresponding author: yair_8_88@hotmail.com; tel.: 55 57 29 6000 ext. 54228.

Abstract

Introduction: The impact of polluting substances, especially those of fossil fuels, on the environment is an important issue in the world. The ability of microorganisms to degrade these pollutants has been recently studied and characterized.

Objective: To analyze the ability of groups of microorganisms, obtained from a cloud forest ecosystem in Mexico, to degrade aromatic compounds (benzene, toluene, ethylbenzene and anthracene).

Materials and methods: Microbiome samples were collected in the Sierra Madre del Sur in the state of Oaxaca. The microorganisms were isolated and identified by molecular techniques. Subsequently, the ability of the microorganisms to degrade aromatic hydrocarbons in a packed-bed bioreactor was quantitatively evaluated by HPLC-PDA chromatography.

Results and discussion: Fifty groups of microorganisms were collected, cultured and genetically characterized. In genetic diversity, *Lactobacillus*, *Prevotella* and genera of the family Acetobacteraceae predominated. In the hydrocarbon biodegradation process, the pollutant concentration decreased 97 % and 91 % mineralization was achieved in less than 25 h.

Conclusions: The microorganisms showed significant degrading activity of the aromatic compounds. Biodiversity in the cloud forest in the Loxicha region is key to ensuring ecosystem services, so it is important to undertake explorations to evaluate the use of these bacterial microbiomes.

Resumen

Introducción: El impacto de sustancias contaminantes en el ambiente es un tema importante en el mundo, especialmente el de los combustibles fósiles. La capacidad de los microorganismos para degradar estos contaminantes se ha estudiado y caracterizado recientemente.

Objetivo: Analizar la capacidad de grupos de microorganismos, obtenidos del ecosistema de bosque de niebla en México, para la degradación de compuestos aromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y antraceno).

Materiales y métodos: Las muestras de microbiomas se recolectaron en la Sierra Madre del Sur en el estado de Oaxaca. Los microorganismos se aislaron e identificaron mediante técnicas moleculares. Posteriormente, la capacidad de los microorganismos para degradar hidrocarburos aromáticos, en un biorreactor de lecho empacado, se evaluó cuantitativamente mediante cromatografía HPLC-PDA.

Resultados y discusión: Cincuenta grupos de microorganismos se recolectaron, cultivaron y caracterizaron genéticamente. En la diversidad genética predominaron *Lactobacillus*, *Prevotella* y géneros de la familia Acetobacteraceae. En el proceso de biodegradación de hidrocarburos, la concentración de contaminantes disminuyó 97 % y se produjo mineralización de 91 % en un tiempo menor de 25 h.

Conclusión: Los microorganismos mostraron importante actividad degradadora de los compuestos aromáticos. La biodiversidad en el bosque de niebla en la región Loxicha es clave para garantizar los servicios ecosistémicos, por ello, es importante emprender exploraciones para evaluar el uso de estos microbiomas bacterianos.

Keywords: Genetic characterization; soil pollutants; *Lactobacillus*; *Prevotella*; mineralization.

Palabras clave: Caracterización genética; contaminantes del suelo; *Lactobacillus*; *Prevotella*; mineralización.

Introduction

The microbial diversity present in ecosystems is a very important component and a determining factor of biological equilibrium (Ofek-Lalzar et al., 2014). The alteration undergone in an ecosystem has an impact on different scales and on physicochemical and biological parameters (Lareen, Burton, & Schäfer, 2016; Ofek-Lalzar et al., 2014). The characterization of microorganisms and their relative abundance in different environments provides very important information on both the preservation of this ecosystem and the potential use of native microorganisms (Panke-Buisse, Poole, Goodrich, Ley, & Kao-Kniffin, 2015).

In Mexico, climatic, orographic and water factors result in a wealth of environments. There are reports of isolation of different types of microorganisms from soils of various ecosystems in the country (Rodríguez-Zaragoza et al., 2008; Vásquez-Murrieta, Govaerts, & Dendooven, 2007). The main limitations for carrying out these processes have been the difficult access to the places to obtain samples and the multiple requirements for the isolation and identification of the microorganisms. Only 1 % of the microorganisms in a soil sample are cultivable in laboratory media (Ofek-Lalzar et al., 2014; Panke-Buisse, Lee, & Kao-Kniffin, 2017; Vaz-Moreira, Nunes, & Manaia, 2014); therefore, the application of a technique that does not require isolation and culture would allow the characterization of a larger fraction of the soil microbiology.

Soil should be conceived as a living entity, in which each of the microorganism groups function as organs of a biological entity, with specialized functions, but at the same time interconnected (Lareen et al., 2016; Nurulita, Adetutu, Gunawan, Zul, & Ball, 2016; Poosakkannu, Nissinen, & Kytöviita, 2017). Being a living organism, the soil can become diseased, and diagnosing the condition requires a series of specific analyses (Nurulita et al., 2016; Rota et al., 2013). The traditional approach is to characterize the physicochemical parameters of the soil to detect its deficiencies; however, the new paradigm is to evaluate it microbiologically and establish the degree of alteration of the processes that must occur naturally (Lareen et al., 2016; Panke-Buisse et al., 2017).

The impact of polluting substances on the environment has been studied for a long time; the most significant is that which occurs from fossil fuels. Since the Exxon Valdez oil spill in 1989, studies have been carried out on the ability of microorganisms to degrade this type of pollutant. The results have been favorable, thanks to the ability of microorganisms to adapt to the most severe conditions possible (Atlas & Bragg, 2009; Bacosa, Suto, & Inoue, 2011; Feng et al., 2007;

Introducción

La diversidad microbiana presente en los ecosistemas es un componente muy importante y un factor determinante del equilibrio biológico (Ofek-Lalzar et al., 2014). La alteración sufrida en un ecosistema repercute en diferentes escalas y en los parámetros fisicoquímicos y biológicos (Lareen, Burton, & Schäfer, 2016; Ofek-Lalzar et al., 2014). La caracterización de los microorganismos y de su abundancia relativa en distintos ambientes proporciona información muy importante, tanto de la preservación de dicho ecosistema como del uso potencial de los microorganismos nativos (Panke-Buisse, Poole, Goodrich, Ley, & Kao-Kniffin, 2015).

En México, los factores climáticos, orográficos e hídricos dan como resultado una riqueza de ambientes. Existen reportes de aislamiento de tipos de microorganismos provenientes de suelos de varios ecosistemas del país (Rodríguez-Zaragoza et al., 2008; Vásquez-Murrieta, Govaerts, & Dendooven, 2007). Las limitaciones principales para realizar estos procesos han sido el acceso difícil a los lugares para la obtención de muestras y los múltiples requerimientos para el aislamiento e identificación de los microorganismos. Solo 1 % de los microorganismos existentes en una muestra de suelo es cultivable en medios de laboratorio (Ofek-Lalzar et al., 2014; Panke-Buisse, Lee, & Kao-Kniffin, 2017; Vaz-Moreira, Nunes, & Manaia, 2014); por tanto, la aplicación de una técnica que no requiera aislamiento y cultivo permitiría la caracterización de una fracción mayor de la microbiología del suelo.

El suelo debe concebirse como un ente vivo, en el cual cada uno de los grupos de microorganismos funcionan como órganos de una entidad biológica, con funciones especializadas, pero al mismo tiempo interconectadas (Lareen et al., 2016; Nurulita, Adetutu, Gunawan, Zul, & Ball, 2016; Poosakkannu, Nissinen, & Kytöviita, 2017). Al ser un organismo vivo, el suelo puede enfermar, y diagnosticar el padecimiento requiere una serie de análisis específicos para concluir su estado (Nurulita et al., 2016; Rota et al., 2013). El enfoque tradicional consiste en caracterizar los parámetros fisicoquímicos del suelo para detectar sus deficiencias; sin embargo, el nuevo paradigma es evaluarlo microbiológicamente y establecer el grado de alteración de los procesos que deben ocurrir naturalmente (Lareen et al., 2016; Panke-Buisse et al., 2017).

Durante mucho tiempo se ha estudiado el impacto de sustancias contaminantes en el medio ambiente; el más relevante es el que ocurre por combustibles fósiles. Desde el derrame de petróleo del buque Exxon Valdez en 1989, se han realizado estudios sobre la capacidad de los microorganismos para degradar este tipo de contaminantes. Los resultados han sido favorables,

Fukuyama, Shigenaka, & Coats, 2014; Rodriguez-R et al., 2015; Sharifi, Van Aken, & Boufadel, 2011). Because many fuel spills occur in soil and water, the option is to use microorganisms that adapt to these two conditions and that can pass from one medium to another while conserving their degrading ability, an intrinsic characteristic that only microorganisms are capable of developing (Boopathy, Shields, & Nunna, 2012; Bouchez-Naitali & Vandecasteele, 2008; Guo et al., 2012; Patel, Cheturvedula, & Madamwar, 2012; Stepanyan & Voskoboinikov, 2006).

This study analyzed the ability of groups of microorganisms with stable symbiotic associations, obtained from a cloud forest ecosystem in Mexico, to degrade aromatic compounds (benzene, toluene, ethylbenzene and anthracene), the main pollutants present in fossil fuels. This type of forest is characterized by a mixed composition of temperate climate species in the canopy, tropical and subtropical ones in the sub-canopy and understory, and an abundance of mosses, epiphytes and tree ferns that confer ample biodiversity to this ecosystem; in addition, it is geologically associated with the Paleozoic Era. For this reason, the territory has a rich soil biology, which can be promising for the degradation of aromatic hydrocarbons.

Materials and methods

Vegetation sampling was carried out in the Sierra Madre del Sur in the state of Oaxaca, Pochutla district, at an elevation of 1 300 m, where there are archipelagos of the mesophilic mountain forest (Gual-Díaz & Rendón-Correa, 2014). After recording the number of trees, species abundance was calculated considering 10 sites located in different plots. To corroborate the data obtained, Margalef's index was used for specific richness and Simpson's for abundance. Margalef's index is based on the relationship between the number of species (S) and the total number of individuals observed (N) and is defined as:

$$D_{Mg} = \frac{S - 1}{\ln N}$$

In turn, Simpson's index is given by:

$$\lambda = \sum p_i^2$$

where, p_i is the proportional abundance of species i ; that is, the number of individuals of species i divided by the total number of individuals in the sample.

Obtaining groups of microorganisms

In the cloud forest archipelagos, 50 soil microbiome samples were collected in different areas of the

gracias a la capacidad de los microorganismos para adaptarse a las condiciones más severas posibles (Atlas & Bragg, 2009; Bacosa, Suto, & Inoue, 2011; Feng et al., 2007; Fukuyama, Shigenaka, & Coats, 2014; Rodriguez-R et al., 2015; Sharifi, Van Aken, & Boufadel, 2011). Debido a que muchos derrames de combustibles ocurren en el suelo y en el agua, la opción es utilizar microorganismos que se adapten en estas dos condiciones y que puedan pasar de uno a otro medio conservando la capacidad degradadora; una característica intrínseca que solo los microorganismos son capaces de desarrollar (Boopathy, Shields, & Nunna, 2012; Bouchez-Naitali & Vandecasteele, 2008; Guo et al., 2012; Patel, Cheturvedula, & Madamwar, 2012; Stepanyan & Voskoboinikov, 2006).

En este trabajo se analizó la capacidad de grupos de microorganismos con asociaciones simbióticas estables, obtenidos del ecosistema de bosque de niebla en México, para degradar compuestos aromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y antraceno), principales contaminantes presentes en los combustibles fósiles. El bosque se caracteriza por la composición mixta de especies de clima templado en el dosel, tropical y subtropical en el subdosel y sotobosque, y abundancia de musgos, epífitas y helechos arborescentes que confieren amplia biodiversidad a este ecosistema; además, está asociado geológicamente con el Paleozoico. Por lo anterior, el territorio posee riqueza en la biología del suelo, la cual puede ser promisoría para la degradación de los hidrocarburos aromáticos.

Materiales y métodos

Se realizó un muestreo de vegetación en la Sierra Madre del Sur en el estado de Oaxaca, distrito de Pochutla, a una altitud de 1 300 m, donde se encuentran archipiélagos del bosque mesófilo de montaña (Gual-Díaz & Rendón-Correa, 2014). Con el registro del número de árboles se calculó la abundancia de las especies tomando en cuenta 10 sitios ubicados en distintas parcelas. Para corroborar los datos obtenidos se empleó el índice de Margalef para la riqueza específica y el de Simpson para la abundancia. El índice de Margalef se basa en la relación entre el número de especies (S) y el número total de individuos observados (N) y se define como:

$$D_{Mg} = \frac{S - 1}{\ln N}$$

A su vez, el índice de Simpson está dado por:

$$\lambda = \sum p_i^2$$

donde, p_i es la abundancia proporcional de la especie i ; es decir, el número de individuos de la especie i dividido entre el número total de individuos de la muestra.

ecosystem, as shown in Table 1. The methodology consisted of collecting soil, roots and leaves close to the trees, whose phenotypic characteristics are resistance and prosperity in inhospitable environments. Simple random sampling was carried out in sites with undisturbed vegetation, where the diversity of plants at the site and the amount of leaf litter on the ground were considered, starting from the hypothesis that the specimens of emerging trees should correspond to a biodiversity pattern in the soil.

The samples were cultured in a medium with a mixture of polysaccharides, in the facilities of the organic fertilizer and vermiculture production module at Autonomous Chapingo University's San Ignacio Field. After the development of the microbiota in the culture systems, samples were taken for genetic identification.

DNA Extraction and sequencing of amplicon libraries

Genetic material was extracted in accordance with the protocol indicated by the manufacturer of PowerSoil® (MO BIO Laboratories, Inc). The DNA was amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction), using 50 µL of 1xPCR buffer (5mM KCl, 1mM Tris-HCl, pH 8.0), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM of each primer 16S rDNA with 1356 bp product), 0.2 mM dNTP, 0.05 U of recombinant Taq polymerase (Thermo scientific EP0402) and 10 ng of total nucleic acids. The PCR program was 25 cycles (30 s, 95 °C; 30 s, annealing temperature for primers; 30 s, 72 °C) in a GeneAmp PCR System 2700 thermocycler (Applied Biosystems, USA).

The amplified material was characterized by massive ion semiconductor sequencing (Ion Torrent equipment, USA) and the results were processed through a bioinformatic analysis to obtain the sequences and make the corresponding identification (García-Mena et al., 2016).

Obtención de grupos de microorganismos

En los archipiélagos del bosque de niebla se recolectaron 50 muestras de microbiomas del suelo en diferentes zonas del ecosistema, mostradas en el Cuadro 1. La metodología consistió en la recolección de suelo, raíces y hojas cercanas a los árboles, cuyas características fenotípicas son la resistencia y prosperidad en ambientes inhóspitos. El muestreo aleatorio simple se realizó en sitios con vegetación no perturbada, donde se consideró la diversidad de plantas en el sitio y la cantidad de hojarasca sobre el suelo, partiendo de la hipótesis que los ejemplares de árboles emergentes deben corresponder a un patrón de biodiversidad en el suelo.

Las muestras se cultivaron en un medio con mezcla de polisacáridos, en las instalaciones del módulo de producción de abonos orgánicos y lombricultura del Campo San Ignacio de la Universidad Autónoma Chapingo. Posterior al desarrollo de la microbiota en los sistemas de cultivo, se tomaron muestras para su identificación genética.

Extracción y secuenciación del material genético

La extracción de material genético se realizó de acuerdo con el protocolo marcado por el fabricante de PowerSoil® (MO BIO Laboratories, Inc). El ADN se sometió a una amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), utilizando 50 µL de buffer 1xPCR (5mM KCl, 1mM Tris-HCl, pH 8.0), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada iniciador (16S rDNA con producto de 1356 bp), 0.2 mM dNTP, 0.05 U de Taq polimerasa recombinante (Thermo scientific EP0402) y 10 ng de ácidos nucleicos totales. El programa del PCR fue de 25 ciclos (30 s, 95 °C; 30 s, temperatura de alineamiento para iniciadores; 30 s, 72 °C) en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA).

Table 1. Location of soil microbiome samples in a cloud forest of the Sierra Madre del Sur in the state of Oaxaca, Mexico.

Cuadro 1. Localización de muestras de microbiomas del suelo en un bosque de niebla de la Sierra Madre del Sur en el estado de Oaxaca, México.

Extraction region/ Región de extracción	Microorganism groups/ Grupos de microorganismos	Latitude/ Latitud	Longitude/ Longitud
Region I	F1-F10	16° 03' 27.5" N	96° 37' 08.7" W
Region II	F11-F20	15° 59' 06.2" N	96° 13' 57.7" W
Region III	F21-F30	15° 59' 11.3" N	96° 42' 2.8" W
Region IV	F31-F40	16° 09' 56.8" N	97° 29' 45.1" W
Region V	F41-F50	16° 01' 00.2" N	96° 34' 49.5" W

Packed bioreactor test

A continuous-flow borosilicate bioreactor was built, measuring 10 cm in diameter and 70 cm in length, in an isothermal configuration. The fixed bed was made from sterile, additive-free, pharmaceutical-grade cotton fiber. The continuous flow was maintained with a diaphragm dosing pump (Seko brand, USA), from 0 to 100 % flow, with capacity to allow a volumetric flow of 500 mL·min⁻¹.

The bioreactor feed culture was prepared in a 20-L glass container, sterile and with continuous aeration by means of a pump (ELITE brand, USA) with a capacity of 60 L·h⁻¹ of air. The receptacle contained 20 L of minimum medium (1.2 mL·L⁻¹ FeCl₂ 0.1 %, KH₂PO₄ 0.5 g·L⁻¹, MgCl₂ 0.4 g·L⁻¹, NaCl 0.4 g·L⁻¹, NH₄Cl 0.4 g·L⁻¹, CaCl₂ 0.05 g·L⁻¹, 1mL·L⁻¹ trace element solution [ZnSO₄ 10 mg·L⁻¹, MnCl₂ 3.0 mg·L⁻¹, H₃BO₄ 30 mg·L⁻¹, CoCl₂ 20 mg·L⁻¹, CuCl₂ 1.0 mg·L⁻¹, NiCl₂ 2.0 mg·L⁻¹, Na₂MoO₄ 3.0 mg·L⁻¹]; all analytical-grade reagents were Fermont brand) enriched with glucose (2 g·L⁻¹). This medium was inoculated with 2 mL of each of the 50 groups of microorganisms and developed up to the exponential growth phase, for five days at 30 °C. The microorganism count during the test in the feeding system was made with 3M™ brand Petrifilm™ plates for aerobes, according to the methodology indicated by the manufacturer. The pumping system was connected to the bioreactor with a flow of 50 mL·min⁻¹, allowing the establishment and formation of a microbiological film at a temperature of 30 °C.

Once the biofilm was formed, the flow of the glucose-enriched medium was interrupted and the problem solution was fed, consisting of a mixture of the pollutants benzene, toluene, ethylbenzene and anthracene, with a concentration of 1 000 mg·L⁻¹ each. The solution was fed to the bioreactor, taking samples every 5 h, to analyze the concentration of the pollutants present by HPLC-PDA. At the end of the experiment, the bioreactor packing was extracted and divided into equal parts with a length of 10 cm in order to study the behavior of the microorganisms along the system by means of characterization by genetic sequencing.

The mineralization achieved during the process was measured through the analysis of total organic carbon (TOC), inorganic carbon (IC) and total carbon (TC) in General Electric brand equipment (Innova model, USA) with a self-sampling device. The measurement conditions were 5 % sodium persulphate as oxidant and 15 % phosphoric acid. The pollutant mixture used during the test was determined in a HPLC system (Perkin Elmer brand, Flexar model, USA) with a Phenyl column 25 cm long by 4.6 mm in diameter, with particle size of 5 µm, in reverse phase, coupled to a PDA (photodiode array) detector. The working conditions

El material amplificado se caracterizó mediante secuenciación masiva semiconductora de iones (equipo Ion Torrent, EUA) y los resultados se procesaron a través de un análisis bioinformático, para obtener las secuencias y realizar la identificación correspondiente (García-Mena et al., 2016).

Prueba en biorreactor empacado

Se construyó un biorreactor de flujo continuo de borosilicato de 10 cm de diámetro por 70 cm de longitud, en configuración isotérmica. El lecho fijo se elaboró con fibra de algodón estéril, libre de aditivos y de grado farmacéutico. El flujo continuo se mantuvo con una bomba dosificadora de diafragma (marca Seko, EUA) de 0 a 100 % de flujo, con capacidad para permitir un gasto volumétrico de 500 mL·min⁻¹.

El cultivo de alimentación al biorreactor se preparó en un recipiente de vidrio de 20 L, estéril y con aireación continua mediante una bomba (marca ELITE, EUA) con capacidad de 60 L·h⁻¹ de aire. El recipiente contenía 20 L de medio mínimo (1.2 mL·L⁻¹ FeCl₂ 0.1 %, KH₂PO₄ 0.5 g·L⁻¹, MgCl₂ 0.4 g·L⁻¹, NaCl 0.4 g·L⁻¹, NH₄Cl 0.4 g·L⁻¹, CaCl₂ 0.05 g·L⁻¹, 1mL·L⁻¹ solución elementos traza [ZnSO₄ 10 mg·L⁻¹, MnCl₂ 3.0 mg·L⁻¹, H₃BO₄ 30 mg·L⁻¹, CoCl₂ 20 mg·L⁻¹, CuCl₂ 1.0 mg·L⁻¹, NiCl₂ 2.0 mg·L⁻¹, Na₂MoO₄ 3.0 mg·L⁻¹]; todos los reactivos grado analítico fueron marca Fermont) enriquecido con glucosa (2 g·L⁻¹). Este medio se inoculó con 2 mL de cada uno de los 50 grupos de microorganismos y se desarrolló hasta la fase de crecimiento exponencial, durante cinco días a 30 °C. La cuenta de microorganismos durante la prueba en el sistema de alimentación se realizó con placas Petrifilm™ marca 3M™ para aerobios, de acuerdo con la metodología indicada por el fabricante. El sistema de bombeo se conectó al biorreactor con un flujo de 50 mL·min⁻¹, permitiendo el establecimiento y formación de una película microbológica a una temperatura de 30 °C.

Una vez formada la biopelícula, el flujo del medio mínimo enriquecido con glucosa se interrumpió y se alimentó la solución problema, formada por la mezcla de los contaminantes benceno, tolueno, etilbenceno y antraceno, con una concentración de 1 000 mg·L⁻¹ cada uno. La solución fue alimentada al biorreactor, tomando muestras cada 5 h, para analizar la concentración de los contaminantes presentes por HPLC-PDA. Al término del experimento, el empaque del biorreactor se extrajo y se dividió en partes iguales con longitud de 10 cm con la finalidad de estudiar el comportamiento de los microorganismos a lo largo del sistema mediante la caracterización por secuenciación genética.

La mineralización conseguida durante el proceso se midió a través del análisis de carbono orgánico total

were 95:5 acetonitrile:water and 1.0 mL·min⁻¹ flow in isocratic regime. The preparation of the sample for injection into the chromatograph required a SPE (solid phase extraction) system, using 2-mL C18 cartridges, with a speed of 23 to 26 drops per minute. The cartridge was conditioned with 5 mL of HPLC-grade methanol, followed by loading of the sample, whose required volume ranged from 1 to 100 mL; subsequently, the cartridge was washed with 5 mL of distilled water, and elution of the components was carried out with 5 mL of HPLC-grade acetonitrile.

Results and discussion

Ninety-nine tree species used as shade trees in coffee plantations were counted, many of which are endemic; a total of 1 140 individuals were recorded. Predominant species included pines (*Pinus* spp.), oaks (*Quercus* spp.), sweetgum (*Liquidambar* spp.), magnolias (*Magnolia* spp.), caudillo (*Oreomunnea mexicana* [Standl.] J.-F. Leroy), Mexican hand tree (*Chiranthodendron pentadactylon* Larreat.) and tree ferns (*Cyathea* spp.). Margalef's diversity index was 13.92 and Simpson's was 0.96. The former indicates that the archipelagos of the mountain cloud forest in the Loxicha region are composed of a wide diversity of variable composition in number of species, and the fact the Simpson's index is close to 1 ratifies that the site is diverse; the results reveal high biodiversity and abundance of each plant species. This was the criterion used in the selection of areas for microbial sampling and genetic sequencing of soil bacteria.

The sequencing results are shown in Figure 1. In all cases there are predominant genera, which vary in proportion. The different environmental conditions from which the microorganism groups were extracted allow the development of associations of this nature. Among the predominant genera in all samples are *Lactobacillus*, *Prevotella* and genera of the family Acetobacteraceae.

Figure 2 shows the disappearance rate of pollutants up to concentrations of the order of 10 mg·L⁻¹ in a period of 10 h, which was stable until the end of the experiment (120 h). The growth of the microorganisms was of the order of 1 x 10¹⁷, with the maximum being 1.2 x 10¹⁸. Initially, there is a direct dependence between the presence of pollutants and the increase in the number of microorganisms. It is possible that the maintenance in the number of microorganisms, subsequent to the drastic decrease in the concentration of pollutants, is due to the formation of the biofilm, which has a favorable environment to sustain the viability of the microorganisms present in the system.

Biofilm formation implies that several extracytoplasmic proteins interact with the abiotic surface and

(COT), carbono inorgánico (CI) y carbono total (CT) en un equipo marca General Electric (modelo Innova, EUA) con automuestreador. Las condiciones de medición fueron 5 % de persulfato de sodio como oxidante y 15 % de ácido fosfórico. La mezcla contaminante utilizada durante la prueba se determinó en un equipo de cromatografía HPLC (marca Perkin Elmer, modelo Flexar, EUA) con una columna Phenyl de 25 cm de largo por 4.6 mm de diámetro, con tamaño de partícula de 5 µm, en fase reversa, con acoplamiento a PDA (detector de arreglo de diodos). Las condiciones de trabajo fueron 95:5 acetonitrilo: agua, y flujo 1.0 mL·min⁻¹ en régimen isocrático. La preparación de la muestra para la inyección al cromatógrafo requirió un sistema de SPE (extracción en fase sólida), utilizando cartuchos de C18 de 2 mL de capacidad, con una velocidad de 23 a 26 gotas por minuto. El cartucho se acondicionó con 5 mL de metanol grado HPLC, seguido de la carga de la muestra, cuyo volumen requerido varió de 1 a 100 mL; posteriormente, el cartucho se lavó con 5 mL de agua destilada, y la elución de los componentes con 5 mL de acetonitrilo grado HPLC.

Resultados y discusión

Se contabilizaron 99 especies arbóreas empleadas como árboles de sombra en cafetales, muchas de las cuales son endémicas; el registro fue de 1 140 individuos en total. Entre las especies predominantes se encontraron pinos (*Pinus* spp.), encinos (*Quercus* spp.), liquidámbar (*Liquidambar* spp.), magnolias (*Magnolia* spp.), caudillo (*Oreomunnea mexicana* [Standl.] J.-F. Leroy), árbol de las manitas (*Chiranthodendron pentadactylon* Larreat.) y helechos arborescentes (*Cyathea* spp.). El índice de diversidad de Margalef fue de 13.92 y el de Simpson de 0.96. El primero indica que los archipiélagos del bosque mesófilo de montaña de la región Loxicha se integra por una amplia diversidad de composición variable en número de especies y el índice de Simpson entre más cercano sea a 1 ratifica que el sitio es diverso; los resultados revelan alta biodiversidad y abundancia de cada especie vegetal. Ese fue el criterio utilizado en la selección de zonas para la toma de muestras de microbiomas y secuenciación genética de las bacterias del suelo.

Los resultados de la secuenciación se muestran en la Figura 1. En todos los casos existen géneros predominantes, los cuales varían en su proporción. Las condiciones ambientales distintas, de las cuales fueron extraídos los grupos de microorganismos, permiten el desarrollo de asociaciones de esta naturaleza. Entre los géneros predominantes en todas las muestras se encuentran *Lactobacillus*, *Prevotella* y géneros de la familia Acetobacteraceae.

En la Figura 2 se observa la velocidad de desaparición de los contaminantes hasta concentraciones del

osmolarity of the medium (O'Toole & Kolter, 1998). The medium and conditions in which the development of the biofilm was promoted, and the change in the substrate from glucose to the pollutant mixture, may have activated the signal for the maintenance of bacterial viability. This signal, product of the change in environmental stimulus, translates into the expression of a mutant transposon as reported in the literature (Monteiro et al., 2007; O'Toole & Kolter, 1998; Wu, Yeh, Lu, Lin, & Chang, 2008).

orden de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en un periodo de 10 h, la cual fue estable hasta el final del experimento (120 h). El crecimiento de los microorganismos fue del orden de 1×10^{17} , encontrándose el máximo en 1.2×10^{18} . Inicialmente, existe una dependencia directa entre la presencia de los contaminantes y el incremento en el número de microorganismos. Es posible que el mantenimiento en el número de microorganismos, posterior a la disminución drástica en la concentración de los contaminantes, se deba a la formación de

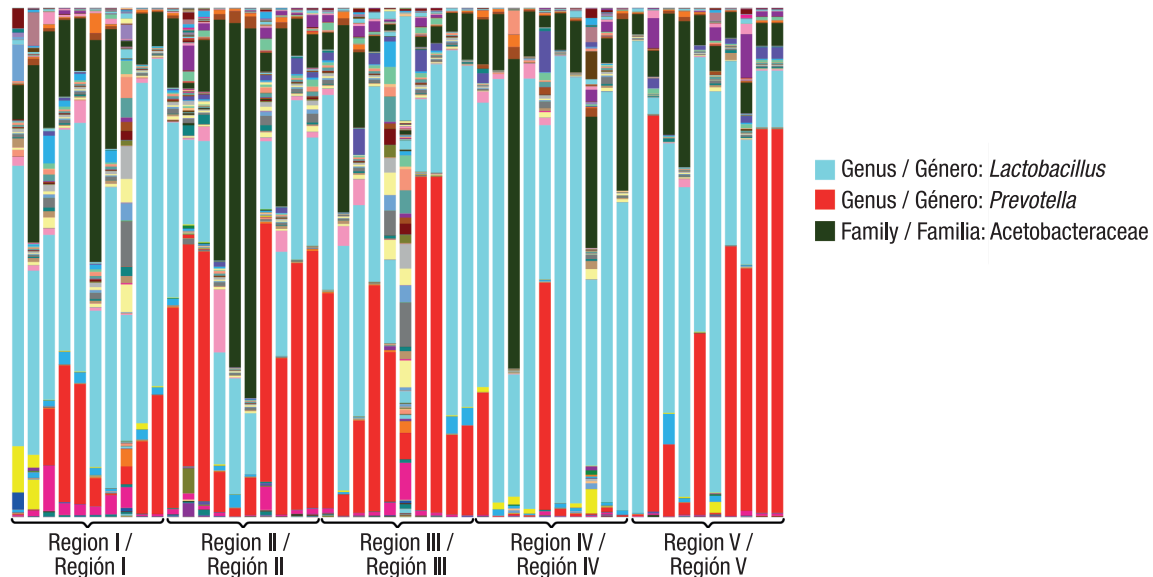


Figure 1. Variation of genera found in soil samples of the cloud forest ecosystem in the Sierra Madre del Sur in the state of Oaxaca.

Figura 1. Variación de géneros encontrados en muestras de suelo del ecosistema de bosque de niebla en la Sierra Madre del Sur en el estado de Oaxaca.

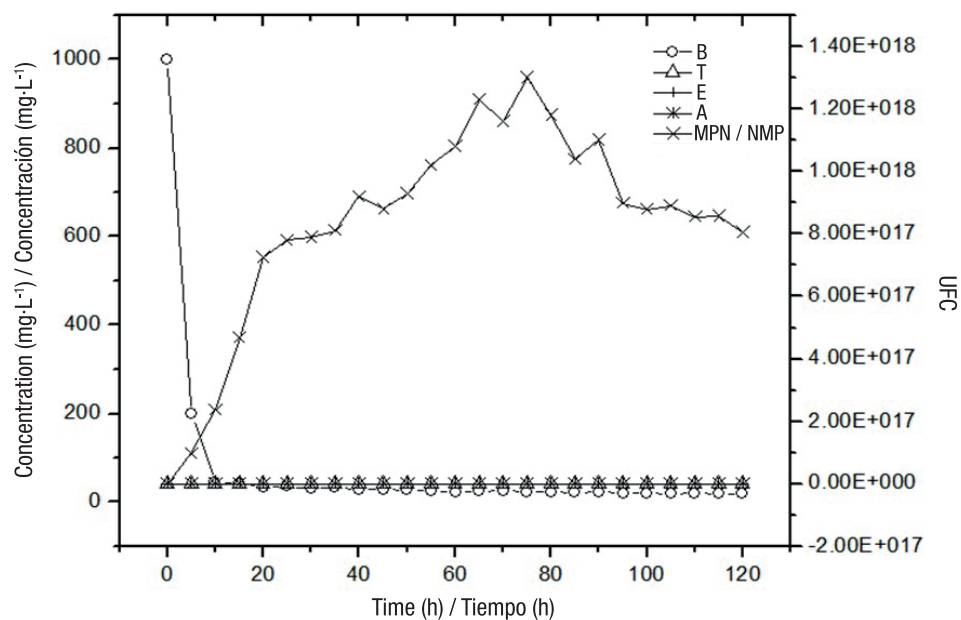


Figure 2. Disappearance rate of pollutants (B = benzene, T = toluene, E = ethylbenzene and A = anthracene) against microbial growth (MPN = Most Probable Number) in a packed-bed bioreactor.

Figura 2. Velocidad de desaparición de contaminantes (B = benceno, T = tolueno, E = etilbenceno y A = antraceno) contra el crecimiento microbiano (NMP = Número más probable) en un biorreactor de lecho empacado.

The bacterial physiology required for the degradation of pollutants follows multiple mechanisms, including the activation of the cytochrome P450 enzyme pathway, which catalyzes the biotransformation of xenobiotics, which is a crucial step in this metabolic process (Huang, Nemati, Hill, & Headley, 2012; Monteiro et al., 2007; Janikowski, Velicogna, Punt, & Daugulis, 2002).

The change undergone by microorganisms in the nutritional aspect is the first significant stimulus, where there is no glucose and predominant or total presence of polluting substrates. This change is evident in the production of extracellular polysaccharides to form the bacterial biofilm (Figure 3), which have a structural function and act as surfactant agents (Ławniczak, Kaczorek, & Olszanowski, 2011).

la biopelícula, la cual tiene un ambiente propicio para sostener la viabilidad de los microorganismos presentes en el sistema.

La formación de la biopelícula implica que varias proteínas extracitoplasmáticas interactúen con la superficie abiótica y la osmolaridad del medio (O'Toole & Kolter, 1998). El medio y las condiciones en las cuales se promovió el desarrollo de la biopelícula, y el cambio en el sustrato, de glucosa a la mezcla contaminante, pudieron haber activado la señal para el mantenimiento de la viabilidad bacteriana. Esta señal, producto del cambio en el estímulo ambiental, se traduce en la expresión de un transposón mutante como se reporta en la literatura (Monteiro et al., 2007; O'Toole & Kolter, 1998; Wu, Yeh, Lu, Lin, & Chang, 2008)

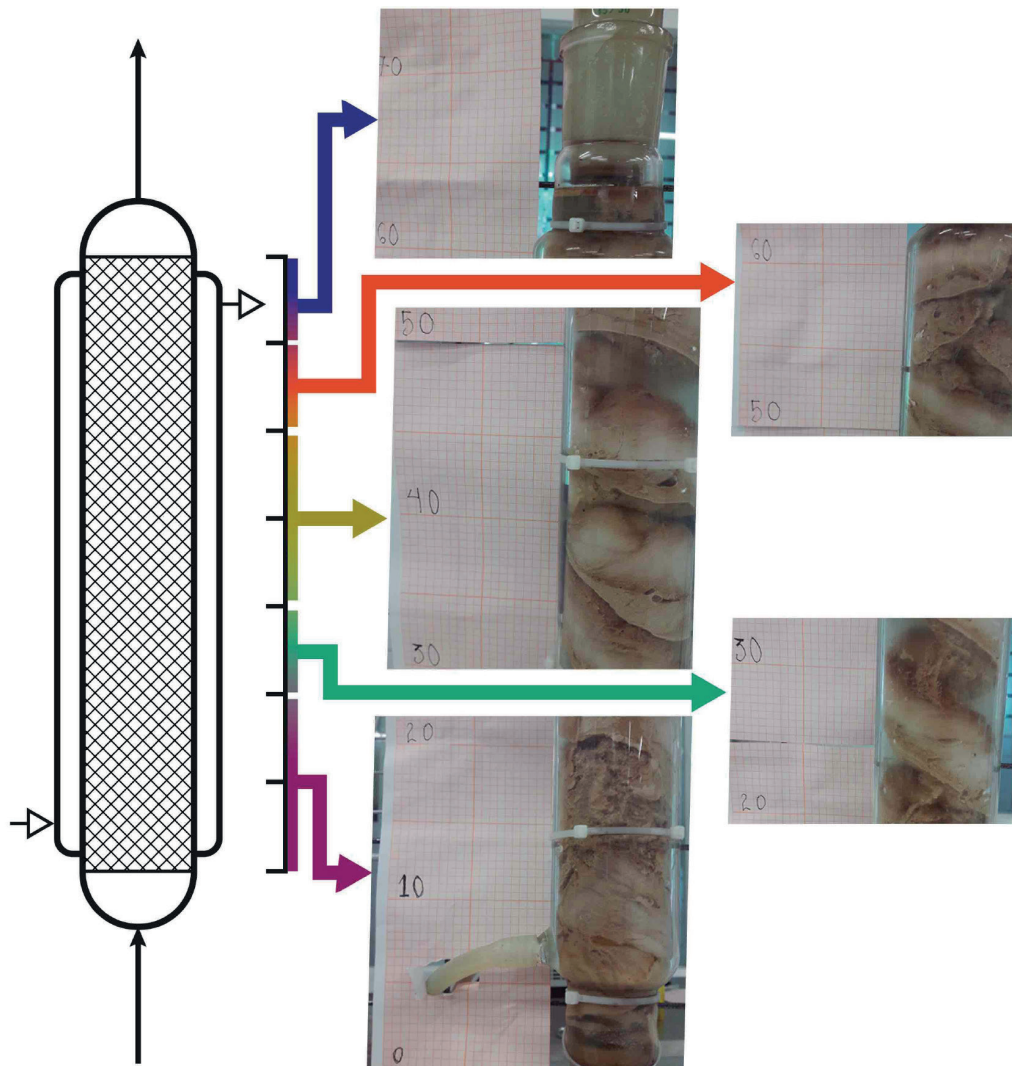


Figure 3. Development of the bacterial biofilm along the packed-bed bioreactor.

Figura 3. Desarrollo de la biopelícula bacteriana a lo largo del biorreactor de lecho empacado.

Characterization of the biofilm by next generation sequencing shows the final behavior and establishment of communities and interactions along the length of the bioreactor. Figure 4 shows that the microbiological distribution had an important variation, despite maintaining constant temperature and oxygen saturation during the experiment, which are key factors in microbial aerobic metabolism. The distribution by sections in the bioreactor allowed establishing that the genera *Bacteroides*, *Prevotella* and *Lactobacillus* increased their presence up to 50 %.

The degree of mineralization reached in the process is shown in Figure 5. The initial TOC corresponds to the amount of pollutants present in the solution. During the process, the IC increases due to the metabolic transformation that the microorganisms perform; however, at the end of the process, the sum of the TOC and the IC do not correspond to the initial TOC. The difference is the loss in the form of CO₂, the waste product of the aerobic metabolism of microorganisms. During this process, the mineralization reached is 91 %. An

La fisiología bacteriana requerida para la degradación de contaminantes sigue múltiples mecanismos, entre ellos, la activación de la vía de las enzimas citocromo P450, que cataliza la biotransformación de xenobióticos, el cual es un paso crucial en este proceso metabólico (Huang, Nemat, Hill, & Headley, 2012; Monteiro et al., 2007; Janikowski, Velicogna, Punt, & Daugulis, 2002).

El cambio sufrido por los microorganismos en el aspecto nutricional es el primer estímulo significativo, donde existe ausencia de glucosa y presencia predominante o total de los sustratos contaminantes. Este cambio se evidencia en la producción de polisacáridos extracelulares para formar la biopelícula bacteriana (Figura 3), los cuales tienen función estructural y como agentes surfactantes (Ławniczak, Kaczorek, & Olszanowski, 2011).

La caracterización de la biopelícula mediante secuenciación genética muestra el comportamiento final y el establecimiento de comunidades e interacciones en la longitud del biorreactor. La

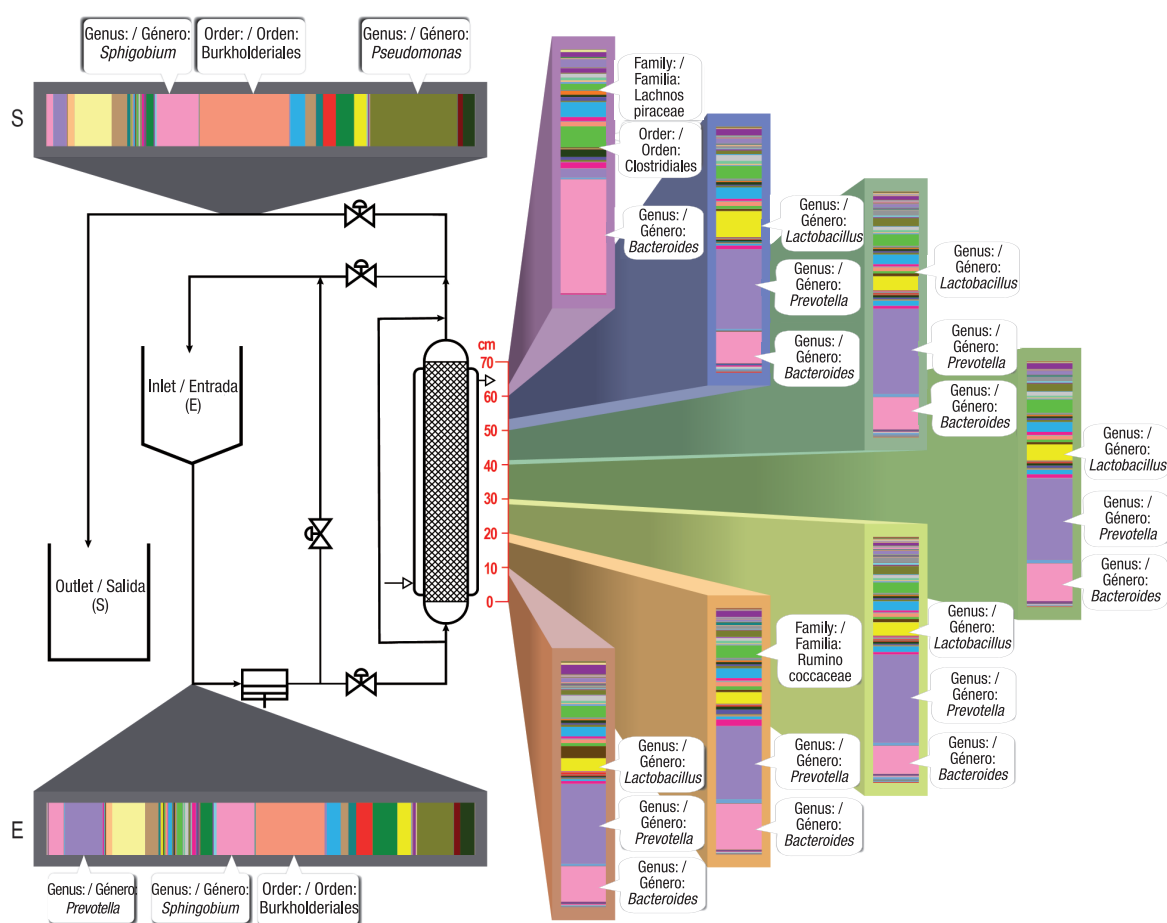


Figure 4. Variation of genera found along the bioreactor during the biodegradation process of aromatic hydrocarbons.

Figura 4. Variación de géneros encontrados a lo largo del biorreactor durante el proceso de biodegradación de hidrocarburos aromáticos

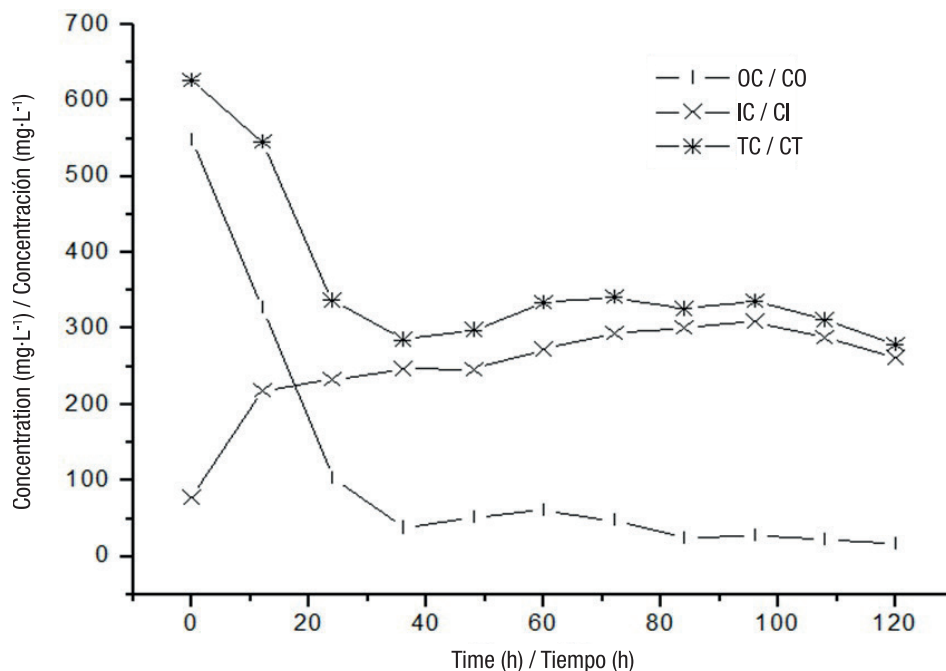


Figure 5. Mineralization during the biodegradation process of aromatic hydrocarbons. Behavior of total organic carbon (OC), inorganic carbon (IC) and total carbon (TC).

Figura 5. Mineralización durante el proceso de biodegradación de hidrocarburos aromáticos. Comportamiento del carbono orgánico total (CO), carbono inorgánico (CI) y carbono total (CT).

additional stimulus such as the addition of a surfactant to the medium or a substrate favoring co-metabolism could increase the degree of mineralization.

Conclusions

The biodiversity found in the cloud forest archipelagos in the Loxicha region is key to ensuring ecosystem services, so it is important to undertake explorations to evaluate the use of these bacterial microbiomes. The genetic diversity of the cloud forest ecosystem in the state of Oaxaca and the balance achieved are due to the proportion of microorganisms involved, with *Lactobacillus*, *Prevotella* and genera of the family Acetobacteraceae prevailing. These microorganisms showed degrading activity on aromatic compounds (benzene, toluene, ethylbenzene and anthracene) that constitute hydrocarbon fuels, until their mineralization.

Acknowledgments

The authors thank the following: Mexico's National Science and Technology Council for supporting this study through the CONACyT-163235 INFR-2011-01 project; the National Polytechnic Institute (IPN) Higher School of Chemical Engineering and Extractive Industries; Autonomous Chapingo University and IPN's Center for Research and Advanced Studies (Cinvestav) for allowing the work to be carried out in its facilities.

End of English version

Figura 4 muestra que la distribución microbiológica tuvo una variación importante, a pesar de mantener temperatura constante y saturación de oxígeno durante el experimento, los cuales son factores clave en el metabolismo aerobio microbiano. La distribución por secciones en el biorreactor permitió establecer que los géneros *Bacteroides*, *Prevotella* y *Lactobacillus* incrementaron su presencia hasta en 50 %.

El grado de mineralización alcanzado en el proceso se muestra en la Figura 5. El COT inicial corresponde a la cantidad de contaminantes presentes en la solución. Durante el proceso, el CI se incrementa, debido a la transformación metabólica que los microorganismos efectúan; sin embargo, al final del proceso, la suma del COT y el CI no corresponden al CT inicial. La diferencia es la pérdida en forma de CO₂, producto de desecho del metabolismo aerobio de los microorganismos. Durante este proceso, la mineralización alcanzada es de 91 %. Un estímulo adicional como la adición de un surfactante al medio o un sustrato que favorezca el cometabolismo podría incrementar el grado de mineralización.

Conclusiones

La biodiversidad encontrada en los archipiélagos del bosque de niebla en la región Loxicha es clave para garantizar los servicios ecosistémicos, por ello, es importante emprender exploraciones para evaluar el uso de estos microbiomas bacterianos. La diversidad genética que posee el ecosistema de bosque de niebla en

References / Referencias

- Atlas, R., & Bragg, J. (2009). Bioremediation of marine oil spills: when and when not - the Exxon Valdez experience. *Microbial Biotechnology*, 2(2), 213–221. doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00079.x
- Bacosa, H. P., Suto, K., & Inoue, C. (2011). Preferential utilization of petroleum oil hydrocarbon components by microbial consortia reflects degradation pattern in aliphatic–aromatic hydrocarbon binary mixtures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1109–1117. doi: 10.1007/s11274-010-0557-6
- Boopathy, R., Shields, S., & Nunna, S. (2012). Biodegradation of crude oil from the BP oil spill in the marsh sediments of Southeast Louisiana, USA. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(6), 1560–1568. doi: 10.1007/s12010-012-9603-1
- Bouchez-Naïtali, M., & Vandecasteele, J.-P. (2008). Biosurfactants, an help in the biodegradation of hexadecane? The case of *Rhodococcus* and *Pseudomonas* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1901–1907. doi: 10.1007/s11274-008-9691-9
- Feng, L., Wang, W., Cheng, J., Ren, Y., Zhao, G., Gao, C., ... Wang, L. (2007). Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(13), 5602–5607. doi: 10.1073/pnas.0609650104
- Fukuyama, A. K., Shigenaka, G., & Coats, D. A. (2014). Status of intertidal infaunal communities following the Exxon Valdez oil spill in Prince William Sound, Alaska. *Marine Pollution Bulletin*, 84(1-2), 56–69. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.05.043
- García-Mena, J., Murugesan, S., Pérez-Muñoz, A. A., García-Espitia, M., Maya, O., Jacinto-Montiel, M., ... Núñez-Cardona, M. T. (2016). Airborne bacterial diversity from the low atmosphere of Greater Mexico City. *Microbial Ecology*, 72(1), 70–84. doi: 10.1007/s00248-016-0747-3
- Gual-Díaz, M., & Rendón-Correa, A. (2014). *Bosques mesófilos de montaña en México: Diversidad, ecología y manejo*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Retrieved from http://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/pdf/BosquesMesofilos_montana_baja.pdf
- Guo, H., Yao, J., Cai, M., Qian, Y., Guo, Y., Richnow, H. H., ... Ceccanti, B. (2012). Effects of petroleum contamination on soil microbial numbers, metabolic activity and urease activity. *Chemosphere*, 87(11), 1273–1280. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.01.034
- Huang, J., Nemati, M., Hill, G., & Headley, J. (2012). Batch and continuous biodegradation of three model naphthenic acids in a circulating packed-bed bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 201-202, 132–140. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.11.052
- Lareen, A., Burton, F., & Schäfer, P. (2016). Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Molecular Biology*, 90(6), 575–587. doi: 10.1007/s11103-015-0417-8
- el estado de Oaxaca y el equilibrio alcanzado obedecen a la proporción de los microorganismos involucrados, prevaleciendo *Lactobacillus*, *Prevotella* y géneros de la familia Acetobacteraceae. Estos microorganismos mostraron actividad degradadora sobre compuestos aromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y antraceno) que constituyen los combustibles hidrocarbonados, hasta su mineralización.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindar el apoyo para la realización de este estudio por medio del proyecto CONACyT-163235 INFR-2011-01; a la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas del Instituto Politécnico Nacional (IPN); a la Universidad Autónoma Chapingo y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav) por permitir realizar el trabajo en sus instalaciones.

Fin de la versión en español

- Ławniczak, Ł., Kaczorek, E., & Olszanowski, A. (2011). The influence of cell immobilization by biofilm forming on the biodegradation capabilities of bacterial consortia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1183–1188. doi: 10.1007/s11274-010-0566-5
- Monteiro, S. A., Sassaki, G. L., de Souza, L. M., Meira, J. A., de Araújo, J. M., Mitchell, D. A., ... Krieger, N. (2007). Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. *Chemistry and Physics of Lipids*, 147(1), 1–13. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2007.02.001
- Nurulita, Y., Adetutu, E. M., Gunawan, H., Zul, D., & Ball, A. S. (2016). Restoration of tropical peat soils: The application of soil microbiology for monitoring the success of the restoration process. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 216, 293–303. doi: 10.1016/j.agee.2015.09.031
- Ofek-Lalzar, M., Sela, N., Goldman-Voronov, M., Green, S. J., Hadar, Y., & Minz, D. (2014). Niche and host-associated functional signatures of the root surface microbiome. *Nature Communications*, 5, 4950. doi: 10.1038/ncomms5950
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449–461. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x
- Panke-Buisse, K., Lee, S., & Kao-Kniffin, J. (2017). Cultivated sub-populations of soil microbiomes retain early flowering plant trait. *Microbial Ecology*, 73(2), 394–403. doi: 10.1007/s00248-016-0846-1
- Panke-Buisse, K., Poole, A. C., Goodrich, J. K., Ley, R. E., & Kao-Kniffin, J. (2015). Selection on soil microbiomes

- reveals reproducible impacts on plant function. *The ISME Journal*, 9(4), 980. doi: 10.1038/ismej.2014.196
- Patel, V., Cheturvedula, S., & Madamwar, D. (2012). Phenanthrene degradation by *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India. *Journal of Hazardous Materials*, 201-202, 43–51. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.11.002
- Poosakkannu, A., Nissinen, R., & Kytöviita, M.-M. (2017). Native arbuscular mycorrhizal symbiosis alters foliar bacterial community composition. *Mycorrhiza*, 27(8), 801–810. doi: 10.1007/s00572-017-0796-6
- Rodríguez-R, L. M., Overholt, W. A., Hagan, C., Huettel, M., Kostka, J. E., & Konstantinidis, K. T. (2015). Microbial community successional patterns in beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *The ISME Journal*, 9, 1928–1940. doi: 10.1038/ismej.2015.5
- Rodríguez-Zaragoza, S., González-Ruíz, T., González-Lozano, E., Lozada-Rojas, A., Mayzlish-Gati, E., & Steinberger, Y. (2008). Vertical distribution of microbial communities under the canopy of two legume bushes in the Tehuacán Desert, Mexico. *European Journal of Soil Biology*, 44(4), 373–380. doi: 10.1016/j.ejsobi.2008.05.003
- Rota, E., Caruso, T., Monaci, F., Baldantoni, D., De Nicola, F., Iovieno, P., & Bargagli, R. (2013). Effects of soil pollutants, biogeochemistry and microbiology on the distribution and composition of enchytraeid communities in urban and suburban holm oak stands. *Environmental Pollution*, 179, 268–276. doi: 10.1016/j.envpol.2013.04.026
- Sharifi, Y., Van Aken, B., & Boufadel, M. C. (2011). The effect of pore water chemistry on the biodegradation of the Exxon Valdez oil spill. *Water Quality, Exposure and Health*, 2(3-4), 157–168. doi: 10.1007/s12403-010-0033-4
- Stepanyan, O. V., & Voskoboinikov, G. M. (2006). Effect of oil and oil products on morphofunctional parameters of marine macrophytes. *Russian Journal of Marine Biology*, 32(S1), S32–S39. doi: 10.1134/S1063074006070042
- Janikowski, T., Velicogna, D., Punt, M., & Daugulis, A. (2002). Use of a two-phase partitioning bioreactor for degrading polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Sphingomonas* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3), 368–376. doi: 10.1007/s00253-002-1011-y
- Vásquez-Murrieta, M. S., Govaerts, B., & Dendooven, L. (2007). Microbial biomass C measurements in soil of the central highlands of Mexico. *Applied Soil Ecology*, 35(2), 432–440. doi: 10.1016/j.apsoil.2006.06.005
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2014). Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: Searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(4), 761–778. doi: 10.1111/1574-6976.12062
- Wu, J.-Y., Yeh, K.-L., Lu, W.-B., Lin, C.-L., & Chang, J.-S. (2008). Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresource Technology*, 99(5), 1157–1164. doi: 10.1016/j.biortech.2007.02.026