

PERFIL PLASMÍDICO DE BACTERIAS AISLADAS DE SEDIMENTO CONTAMINADO CON PETRÓLEO, ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Laugeny Díaz-Borrego*, José Dupontt y Lorena Atencio

Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Departamento de Biología,
Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526.
Maracaibo 4001-A, Venezuela. Correo electrónico: laugenydiazb@hotmail.com,
laugeny@yahoo.com.

Resumen. Se caracterizó el perfil plasmídico de bacterias hidrocarboclasticas aisladas de sedimento marino impactado por petróleo. Se determinaron parámetros fisicoquímicos en el agua y sedimento. La cuantificación del número UFC/g se realizó por la técnica de dilución en placas de agar con hidrocarburo al 0,05% p/v. La identificación bioquímica de las bacterias aisladas se hizo por protocolos convencionales. La extracción de plásmidos se realizó por los protocolos de lisis alcalina reportados en la literatura. *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp. y *Micrococcus* sp. LDA12, mostraron una única banda plasmídica, mientras que *Staphylococcus* sp. y *Micrococcus* sp. LDA16 presentaron tres bandas, siendo la de 22,59 kb común para todos los aislamientos. Las cepas de *Pseudomonas* sp. presentaron tres bandas plasmídicas de tamaños diferentes (19,59; 22,74-23,49 y 28,04 kb); mientras que *Enterobacter* sp. y *Bacillus* sp. presentaron un solo tipo de bandas (22, 74-23,49 kb) y (22,17-23,16 kb), respectivamente. Las dos cepas de *Staphylococcus* sp. y *Micrococcus* sp. LDA16 mostraron el mismo perfil plasmídico (22,59; 2,22 y 2,05 kb); es posible que la banda plasmídica de mayor tamaño (22-23 kb), presente en la mayoría de este tipo de bacterias, codifique la capacidad degradativa de los hidrocarburos. Las bacterias aisladas podrían usarse potencialmente para la remoción de hidrocarburos del ambiente impactado.

Palabras clave: Bacterias, hidrocarburos, perfil plasmídico, sedimento.

* Autor para la correspondencia.

Recibido: 02 Junio 2005 / Aceptado: 25 Mayo 2006
Received: 02 June 2005 / Accepted: 25 May 2006

PLASMIDIC PROFILE OF BACTERIA ISOLATED FROM SEDIMENT CONTAMINATED WITH PETROLEUM, IN ZULIA STATE, VENEZUELA

Abstract. The plasmid profile was characterized in hydrocarbonoclastic bacteria isolated from marine sediment impacted by petrochemical activity. Physico-chemical parameters were determined in water and sediment. Quantification of the UFC/g number was carried out by dilution technique in plaques of hydrocarbons (0.05% w/v). Biochemical identification of the isolated bacteria was done using standard methods, and plasmid extraction in bacteria was carried out according to protocols reported in the literature. *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp. and *Micrococcus* sp. LDA12 stains, transported only one plasmid, whereas *Staphylococcus* sp. and *Micrococcus* sp. LDA16 strains, presented three plasmids. However, the 22.59 kb plasmid was present in all isolations. *Pseudomonas* sp. strains present three plasmids of different sizes (19.59, 22.74-23.49 and 28.04 kb); while *Enterobacter* sp. (22.74-23.49 kb) and *Bacillus* sp. (22.17-23.16 kb) transported one type of plasmid. Two strains of *Staphylococcus* sp. and *Micrococcus* sp. LDA16, showed the same plasmid profile (22.59, 2.22 and 2.05 kb). It is possible that the larger plasmid (22-23 kb), present in the majority of these types of bacteria, codifies the capacity to degrade hydrocarbons. The isolated bacteria could be used potentially for the removal of hydrocarbons from impacted areas.

Key words: Bacteria, hydrocarbons, plasmid profile, sediment.

INTRODUCCIÓN

Varios estudios han examinado la degradación de compuestos aromáticos por la microbiota autóctona de suelos y sedimentos marinos. Dentro de las principales bacterias activas degradadoras de hidrocarburos en ambientes marinos se encuentran: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Neptunomonas*, *Micrococcus* y *Vibrio*, entre otras (Kanaly y Harayama 2000).

Las bacterias hidrocarbonoclasticas son capaces de oxidar todo tipo de hidrocarburos en forma líquida o sólida. Esta habilidad facilita que el compuesto sea dispersado y removido del ambiente (Atlas y Bartha 2002). La capacidad de las bacterias para utilizar una variedad de compuestos orgánicos sugiere que la microflora autóctona tiene potencial para la biodegradación *in situ* de contaminantes orgánicos (Fredrickson *et al.* 1991).

Existe mucha información sobre el metabolismo microbiano del naftaleno y antraceno, los cuales están ampliamente distribuidos en todos los sistemas terrestres y acuáticos. Estos compuestos se han utilizado como sustratos modelos en estudios sobre la degradación de hidrocarburos poliaromáticos, ya que sus estructuras se encuentran en poliaromáticos más complejos y carcinogénicos tales como: el benzo[*a*] pireno, el benzo[*a*] antraceno y el 3-metilcloroantreno.

El estudio de la genética de los microorganismos que utilizan hidrocarburos, ha alcanzado un gran auge desde la década pasada, permitiendo un mejor entendimiento del metabolismo microbiano de los hidrocarburos y su potencialidad para la descontaminación de ambientes impactados (Atlas y Bartha 2002).

La biodegradación de hidrocarburos aromáticos, desde el punto de vista genético, ocurre por dos vías: la cromosomal codificada por la ruta de la *orto*-fisión que ocurre cuando los sustratos son benzoatos o fenoles que involucran enzimas de alta especificidad y la ruta plasmídica de la *meta*-fisión cuando los sustratos incluyen benzoatos metilados, xilenos, toluenos y bencenos que involucran enzimas de baja especificidad (Carney y Leary 1989). Las bacterias emplean enzimas dioxigenasas para romper enlaces carbono-carbono del anillo aromático, convirtiéndolo en sustratos más sencillos que son asimilados por las bacterias (Atlas y Bartha 2002, Madigan *et al.* 2004).

El ADN plasmídico juega un papel importante en la adaptación genética, ya que puede transferirse vía conjugación o transformación, impartiendo nuevos fenotipos. En varios estudios se ha determinado la presencia de plásmidos en bacterias con capacidad degradativa de hidrocarburos, los cuales incluyen al antraceno y al naftale-

no (Hada y Sizemore 1981, Fredrickson *et al.* 1991, Sanseverino *et al.* 1993, Suárez *et al.* 1998, Querales *et al.* 2004).

En Venezuela, se han realizado pocos estudios sobre la caracterización de plásmidos en bacterias hidrocarbonoclásticas. El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de bandas plasmídicas en bacterias que crecen en hidrocarburos aromáticos aisladas de sedimento contaminado con petróleo, estado Zulia, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO Y RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Los estudios se realizaron en sedimento contaminado con petróleo de la playa “Caimare Chico” localizada a 71° 50’4” de Longitud Oeste y 11° 10’332” de Latitud Norte, en la parte suroccidental del Golfo de Venezuela, estado Zulia, municipio Páez.

Se realizaron dos muestreos, en los que se colectaron seis muestras de agua y seis de sedimento, de varios sectores de la playa donde de evidenciaron manchas de petróleo. Las muestras de sedimento se colectaron en bolsas estériles con cierre hermético, mientras que las de agua se colectaron manualmente, a un metro de la orilla, en envases de vidrio estériles de 500 mL; posteriormente, se colocaron en una cava con hielo ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) y se trasladaron al laboratorio para su procesamiento. Las muestras de sedimento se emplearon para los análisis bacteriológicos y el análisis fisicoquímico se realizó en ambos tipos de muestra.

ANÁLISIS FISICOQUÍMICO

Para determinar las condiciones ambientales donde se desarrollaron las bacterias, se midieron los valores de temperatura, pH y salinidad en todas las muestras, con un termómetro de mercurio marca Bannan de apreciación $0,1^{\circ}\text{C}$, un potenciómetro modelo 691 marca Methrom y un salinómetro-refractrómetro monocular modelo S-100, respectivamente.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se pesó 1 g de sedimento y se realizaron diluciones seriadas en solución salina fisiológica al 0,85%. De cada uno de los tubos se tomó 0,1 mL y se sembró en placas de medio mínimo mineral (MMM) con agar al 2% e hidrocarburo (antraceno o naftaleno) a una concentración final de 0,05% p/v (Jobson *et al.* 1972). Las placas se colocaron en una incubadora marca Memmert, a una temperatura de 30°C, durante dos semanas o hasta observar crecimiento. Se cuantificó el número total de bacterias heterotróficas aeróbicas que crecieron en los hidrocarburos, por el método de dilución en placas (Madigan *et al.* 2004) expresadas como UFC/g de sedimento. Posteriormente se escogió, al azar, el 10% colonias bacterianas crecidas en los hidrocarburos para hacer una caracterización macroscópica y microscópica, respectivamente (MacFaddin 2000).

Para adaptar las cepas bacterianas a los hidrocarburos, se sembraron en fiolas de 125 mL conteniendo 50 mL de MMM con 0,05% p/v del hidrocarburo y se incubaron durante dos semanas a 30°C con agitación constante (150 rpm) en un baño con agitación continua marca Lab-line. Las cepas se sembraron en placas de agar conteniendo los mismos compuestos con la finalidad de no perder los plásmidos que transportan.

La identificación bioquímica de las cepas bacterianas se realizó mediante protocolos convencionales reportados en la literatura (Holt 1984, Murray *et al.* 1999, MacFaddin 2000).

EXTRACCIÓN Y VISUALIZACIÓN DE BANDAS PLASMÍDICAS

Para las bacterias Gram negativas se utilizó el protocolo de Lisis Alcalina propuesto por Kado y Liu (1981) y para las Gram positivas, el protocolo de Macrina *et al.* (1980), con algunas modificaciones, para determinar el tamaño y el número de los plásmidos presentes en las cepas bacterianas. Para romper la pared celular de las cepas de *Bacillus* sp. y *Micrococcus* sp. se empleó lisozima y para *Staphylococcus* lisostafina (0,5 mg/L). Los bacilos Gram positivos fueron expuestos a la enzima durante toda la noche, a 37°C, para garantizar la completa ruptura de la pared celular.

La separación y observación de los plásmidos se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 0,7%, teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/mL), en una cámara horizontal Primo Midicell marca EC350, a 50 voltios, durante 4-5 horas. El ADN se visualizó en un transiluminador UVP, Chomato-Vue. El tamaño de los plásmidos se determinó mediante el programa computacional ORIGIN versión 6,0 para Windows año 2000, basado en la migración de las bandas de ADN de las muestras de estudio en comparación con las correspondientes al marcador de peso molecular (PM) Lambda *Hind*III, relacionando de esta manera el PM con la movilidad de cada banda en el gel de agarosa (Ausubel *et al.* 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

La temperatura promedio de las muestras de agua fue de 30°C y la de sedimento fue de 29,33°C, favoreciendo el crecimiento de bacterias mesófilas. El pH promedio de las muestras de agua fue de 8,15 y la salinidad fue de 30 ppm, permitiendo el crecimiento de bacterias alcalófilas y halotolerantes (o halófilas), respectivamente (Madigan *et al.* 2004).

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se obtuvo un promedio de $34,8 \times 10^4$ y de $7,70 \times 10^4$ UFC/g de sedimento, de cepas bacterianas que crecieron en naftaleno y antraceno, respectivamente. El mayor crecimiento en naftaleno podría relacionarse con su estructura química, cuya estructura es más sencilla que la del antraceno, siendo más accesible al ataque microbiano (Grimm y Harwood 1997, Van Hamme *et al.* 2003).

Se aislaron 25 cepas bacterianas, que degradaron tanto naftaleno como antraceno, identificadas como: *Pseudomonas* sp. (52%), *Bacillus* sp. (20%), *Enterobacter* sp. (12%) y *Staphylococcus* sp. y *Micrococcus* sp. (8%) respectivamente. Del género *Pseudomonas* se encontraron las siguientes especies: *P. putida* (24%), *P. aeruginosa* (12%), *P. fluorescens* (8%), *P. alcaligenes* y *P. oryzae* (4%),

respectivamente. Se aisló una especie de la Familia *Enterobacteriaceae*, *Enterobacter agglomerans* (12%) (Fig. 1).

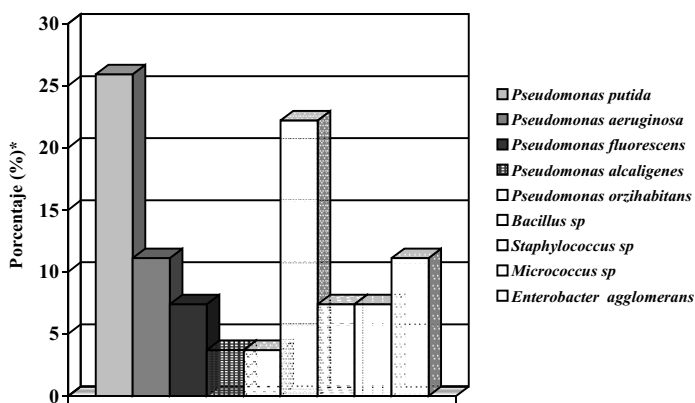
Se obtuvo un mayor número de aislamientos del género *Pseudomonas* en comparación con el resto de los géneros aislados. En numerosos trabajos se ha señalado a este género como el más versátil para la utilización de diversos hidrocarburos (Fuenmayor y Rodríguez 1992, Dupont *et al.* 2001, Bracho *et al.* 2004a, Bracho *et al.* 2004b).

Los géneros bacterianos Gram positivos obtenidos en este trabajo también han sido reportados por Cantini *et al.* (2001), Dupont *et al.* (2001) y Bracho *et al.* (2004a), en sitios contaminados por actividad petrolera de la región zuliana.

El porcentaje menor de bacterias Gram positivas aisladas, sugiere un desplazamiento competitivo por otros grupos bacterianos (Bracho *et al.* 2004a).

PERFIL PLASMÍDICO BACTERIANO

Del total de las 25 cepas aisladas, 22 (88%) presentaron plásmidos y tres (12%) (*P. putida* LDA4; *P. fluorescens* LDA3 y LDN3) no transportaron ningún plásmido y tuvieron crecimiento de escaso a moderado en los hidrocarburos (Tabla 1, Fig. 2B y C). Es posible que en estas bacterias la capacidad degradativa de hidrocarburos esté codi-



* con base al total de cepas aisladas

FIGURA 1. Porcentaje de cepas bacterianas aisladas.

TABLA 1. Crecimiento y perfil plasmídico bacteriano en hidrocarburos.

Cepa/Código	Crecimiento en naftaleno	Crecimiento en antraceno	Nº de plásmidos	Tamaño del plásmido en kb
<i>P. aeruginosa</i> LDA18	++	++	1	23,24
<i>P. aeruginosa</i> LDA9-1	++	++	1	23,16
<i>P. aeruginosa</i> LDN2	++	++	1	28,04
<i>P. alcaligenes</i> LDA19	+++	+++	1	22,74
<i>P. fluorescens</i> LDA3	+	+	0	-
<i>P. fluorescens</i> LDN3	+	+	0	-
<i>P. putida</i> LDA17	++	++	1	22,74
<i>P. putida</i> LDA20	++	++	1	23,49
<i>P. putida</i> LDA21	++	++	1	19,59
<i>P. putida</i> LDA4	+	++	0	-
<i>P. putida</i> LDA6	+	+++	1	22,74
<i>P. putida</i> LDN1	+	+	1	23,24
<i>P. oryzae</i> LDA8-1	++	++	1	23,16
<i>E. agglomerans</i> LDA1	+	+	1	22,74

Tabla 1. (Continuación)

Cepa/Código	Crecimiento en naftaleno	Crecimiento en antraceno	Nº de plásmidos	Tamaño del plásmido en kb
<i>E. agglomerans</i> LDA2	+	+	1	23,49
<i>E. agglomerans</i> LDA5	+	+	1	22,74
<i>Staphylococcus</i> sp. LDA13	+	+	3	22,59; 2,22; 2,054
<i>Staphylococcus</i> sp. LDA14	+	+	3	22,59; 2,22; 2,059
<i>Micrococcus</i> sp. LDA12	++	++	1	22,59
<i>Micrococcus</i> sp. LDA16	++	++	3	22,59; 2,37; 2,097
<i>Bacillus</i> sp. LDN5	+++	+++	1	22,172
<i>Bacillus</i> sp. LDA11	+++	+++	1	22,172
<i>Bacillus</i> sp. LDA10	++	+	1	22,172
<i>Bacillus</i> sp. LDA15	+	+	1	22,172
<i>Bacillus</i> sp. LDA22	++	++	1	23,16

+: poco crecimiento, ++: moderado crecimiento, +++: abundante crecimiento.

ficada en el cromosoma o en plásmidos de gran tamaño que no pudieron ser extraídos con la técnica aplicada en este trabajo (Tabla 1, Fig. 2A-D).

El resto de las cepas de *Pseudomonas* sp. presentaron tres bandas plasmídicas de diferentes tamaños (19,59; 22,74-23,49 y 28,04 kb). El análisis estadístico reveló que no se encontraron diferencias signifi-

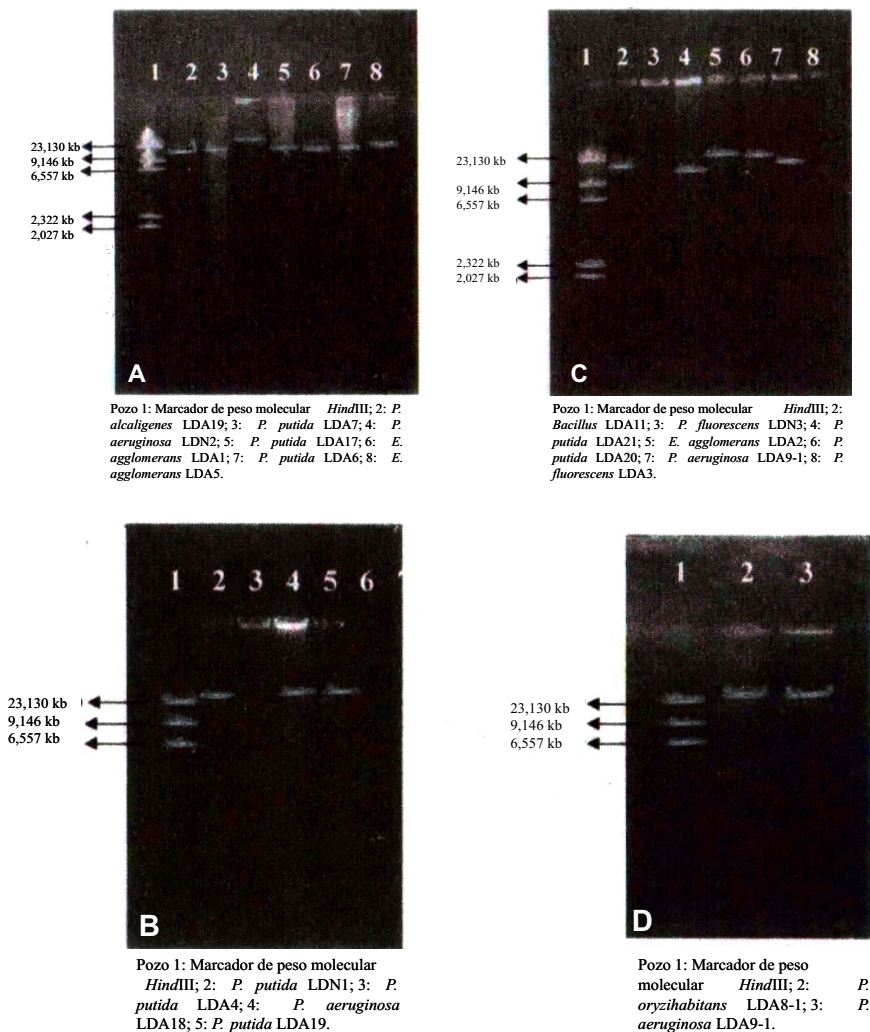


FIGURA 2. Geles de agarosa mostrando plásmidos de bacterias Gram negativas.

cativas ($p > 0,05$) en el tamaño de las bandas de 22,74; 23,16; 23,24 y 23,49 kb, lo cual sugiere que se trata de una misma banda plasmídica (Fig. 2).

Fredrickson *et al.* (1988) caracterizaron plásmidos crípticos de bacterias Gram negativas, a partir de ambientes contaminados por actividad industrial, que midieron 200 kb, mayores que los reportados en este trabajo. Similarmente, Sanseverino *et al.* (1993) extrajeron plásmidos de aproximadamente 100 kb, en *Pseudomonas* sp. que transportaban genes para la degradación de naftaleno. Carney y Leary (1989) indicaron la presencia de plásmidos de 95 y 115 kb en cepas de *P. putida* degradadoras de compuestos aromáticos.

Querales *et al.* (2004) detectaron tres clases de plásmidos en *Pseudomonas* sp. (> 35 kb, 35 kb y 7,5 kb) transportados por cepas degradadoras de hidrocarburos aromáticos de suelos contaminados con petróleo de la región zuliana. El plásmido de mayor tamaño (35 kb), transportado por todas las cepas, podría estar implicado en la degradación de hidrocarburos.

Las cepas de *Enterobacter* sp. presentaron una única banda plasmídica (Fig. 2A y C) con un tamaño similar al reportado por Suárez *et al.* (1998) para *Serratia liquefaciens* (23 kb) en el mismo sitio de estudio. El plásmido de 23,49 kb, probablemente se corresponde con el observado para *Pseudomonas* (Fig. 2A-D).

Las cepas de *Bacillus* sp. presentaron una única banda plasmídica (Tabla 1, Fig. 3) de menor tamaño que las reportadas por Fredrickson *et al.* (1991) para bacterias Gram positivas (aproximadamente 100 kb). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el tamaño de las bandas plasmídicas de las diferentes cepas de *Bacillus* sp. de lo cual se infiere que es el mismo plásmido.

Los dos aislamientos de *Staphylococcus* sp. (LDA13 y LDA14) mostraron el mismo perfil plasmídico, caracterizado por tres plásmidos (Tabla 1, Fig. 4); mientras que las dos cepas de *Micrococcus* sp. presentaron perfiles plasmídicos distintos. La cepa *Micrococcus* sp. LDA12 presentó una única banda en el gel de electroforesis durante

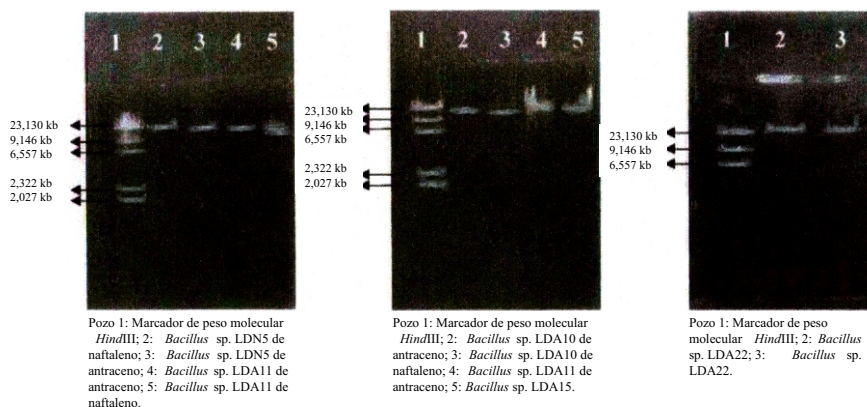


FIGURA 3. Geles de agarosa mostrando plásmidos de bacilos Gram positivos.

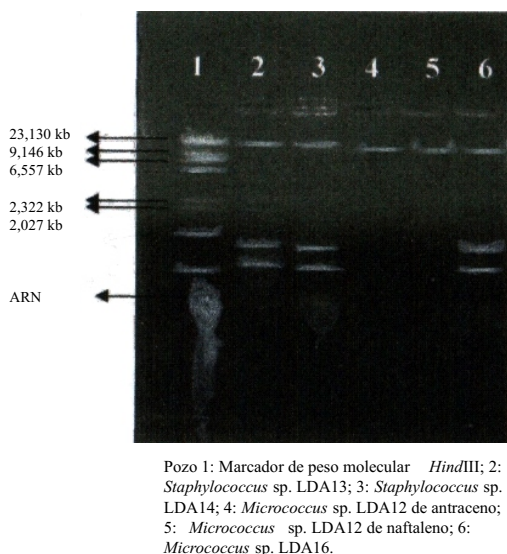


FIGURA 4. Geles de agarosa mostrando plásmidos de cocos Gram positivos.

la extracción de ADN plasmídico (22,59 kb); mientras que la cepa LDA16 presentó tres bandas de ADN (22,59; 2,37 y 2,097 kb). La única banda presente en LDA12 se corresponde con la primera banda correspondiente a LDA16, lo cual permite presumir que se trate del mismo plásmido (Fig. 4). Es posible que el plásmido de 22,59 kb, transportado por cepas de *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp. y *Ba-*

cillus sp., sea el mismo, y los plásmidos más pequeños de *Staphylococcus* sp. LDA13 y LDA14 y *Micrococcus* sp. LDA16, pudieran estar relacionados con otras actividades.

Al comparar el tamaño de las bandas más pequeñas de ADN plasmídico de las cepas de *Staphylococcus* sp. con las de *Micrococcus* sp. LDA16, se encontraron diferencias significativas ($t = 4,94$, $p < 0,05$) en el tamaño del segundo de los tres plásmidos extraídos, lo cual sugiere la presencia de plásmidos distintos.

Fuenmayor y Rodríguez (1992) demostraron la transferencia de genes plasmídicos, vía conjugación, entre bacterias que crecen en naftaleno, aisladas de suelos contaminados por petróleo en El Tigre, estado Anzoátegui.

CONCLUSIONES

Todas las bacterias aisladas fueron capaces de crecer en presencia de antraceno y naftaleno como únicas fuentes de carbono y la mayoría transportaron bandas plasmídicas. El plásmido de 22-23 kb, transportado por la mayoría de las cepas, podría estar involucrado en la codificación de la degradación de los hidrocarburos.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar otros estudios moleculares como mapeos con enzimas de restricción y experimentos de conjugación bacteriana (transferencia génica), para determinar el tamaño exacto de los plásmidos y su implicación en los fenotipos expresados por las bacterias; así mismo, usar electroforesis de campo pulsado para observar los plásmidos de tamaños mayores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONDES por el co-financiamiento otorgado para el proyecto N° 0884-04 y a Luz Marina Soto y Xiomara Montiel del Departamento de Biología de la Facultad Experimen-

tal de Ciencias de la Universidad del Zulia, por sus valiosos aportes en el desarrollo de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATLAS R. y R. BARTHA. 2002. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Cuarta Edición. Editorial Pearson Educación, SA. Madrid. 677 pp.
- AUSUBEL F., R. BRENT, R. KINGSTON, D. MOORE, J. G. SEIDMAN, J. A. SMITH y K. STRUHL. 1997. Short Protocols in Molecular Biology. Wiley Published by Jhon Wiley & Sons, Inc. United States of America. 1200 pp.
- BRACHO M., L. DÍAZ y L. SOTO. 2004a. Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo, estado Zulia, Venezuela. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas 38(3): 175-185.
- BRACHO M., L. DÍAZ y L. SOTO. 2004b. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas* spp. Ciencia 12 (4): 269-275.
- CANTINI L., L. DÍAZ, S. DÁVILA y L. SOTO. 2001. Crecimiento a diferentes concentraciones de fósforo y nitrógeno de un cultivo puro de bacterias degradadoras de fenantreno. Ciencia 9(2): 207-216.
- CARNEY B.F. y J. V. LEARY. 1989. Novel alterations in plasmid DNA associated with aromatic hydrocarbon utilization by *Pseudomonas putida* R5-3". Applied and Environmental Microbiology 55 (6): 1523-1530.
- DUPONTT J., L. DÍAZ, L. ATENCIO y A. PÉREZ. 2001. Susceptibilidad a Hg^{+2} y Cd^{+2} en cepas bacterianas biodegradadoras de antraceno aisladas de la playa "Caimare Chico" Estado Zulia. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas 35(3): 242-258.
- FREDRICKSON J. K., R. J. HICKS, S. W. LI y F. J. BROCKMAN. 1988. Plasmid incidence in bacteria from deep subsurface sediments. Applied and Environmental Microbiology 54(12): 2916-2923.
- FREDRICKSON J.K., F. J. BROCKMAN, D. J. WORKMAN, S. W. LI y T. O. SEVENS. 1991. Isolation and characterization of a subsurface bacterium

- capable of growth on toluene, naphthalene, and other aromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (3): 796-803.
- FUENMAYOR S. L. y V. RODRÍGUEZ-LEMOINE. 1992. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons degradative soil *Pseudomonas*. *Acta Científica Venezolana* 43: 349-354.
- GRIMM A. C. y C. S. HARWOOD. 1997. Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. *Applied and Environmental Microbiology* 63(10): 4111-4115.
- HADA, H. S. y R. K. SIZEMORE. 1981. Incidence of plasmid in marine *Vibrio* spp. isolated from an oil field in the Northwestern Gulf of Mexico". *Applied and Environmental Microbiology* 41 (1): 199-202.
- HOLT J. D. 1984. The Shorter Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Eighth Edition. The Williams & Wilkins Company. Baltimore. United States of America. 197 pp.
- JOBSON A., F. D. COOK y D. W. S. WESTLAKE. 1972. Microbial utilization of crude oil. *Applied Microbiology* 23(6): 1082-1089.
- KADO C. I. y S. T. LIU. 1981. Rapid Procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology* 145: 1365-1373.
- KANALY R. y S. HARAYAMA. 2000. Biodegradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology* 182: 2059-2067.
- MACRINA F., P. WOOD y K. JONES. 1980. Simple method for demonstrating small plasmid deoxyribonucleic acid molecules in oral streptococci. *Academic Science Hung* 24: 107-113.
- MADIGAN M. T., J. M. MARTINKO y J. PARKER. 2004. Brock Biología de los Microorganismos. 10ma Edición. Editorial Prentice Hall, Inc. 1011 pp.
- MAC FADDIN J. F. 2000. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. Third Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 912 pp.
- MURRAY P., E. BARON, M. PFALLER, F. TENOVER y R. YOLKEN. 1999. Manual of Clinical Microbiology. Sixth edition. ASM Press. Washington. D. C. 1773 pp.

- QUERALES L., M. BRACHO, L. CARABALLO y L. BOTERO. 2004. Perfil plasmídico de bacterias degradadoras de hidrocarburos y resistentes a metales. Libro de Resúmenes. X Jornadas de Investigación Científica 26 al 29 de octubre de 2004. Maracaibo-Venezuela. 112 pp.
- SANSEVERINO J., B. M. APPLGATE, J. M. KING y G. S. 1993. Plasmid-mediated mineralization of naphtalene, phenantrene, and anthracene. *Appl. Env. Microbiol.* 59: 1931-1937.
- SUAREZ J., L. ATENCIO, J. PAZ, J., A. PEREZ, C. PEREZ y G. TORO. 1998. Caracterización de una bacteria degradadora de antraceno aislada en el balneario "Caimare Chico". Libro de Resúmenes. VIII Jornadas Científicas Nacionales de la Facultad Experimental de Ciencias. 133 pp.
- VAN HAMME J., A. SING y O. WARD. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology* 67:503-549.