



## DETECCION DE *Nitrobacter* EN SUELOS SALINOS-ALCALINOS POR PCR

ROMAN JIMENEZ MORALES<sup>1</sup>, LUC DENDOOVEN<sup>2</sup> OLIVIA FRANCO HERNANDEZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología Av. Acueducto s/n. Col La Laguna Ticoman. C.P. 07340. México D.F. <sup>2</sup>Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV. Av: IPN 2508. C.P. 07360. México D.F. Tel/Fax (55)5729600 ext 56325. e-mail: [cervero16@yahoo.com.mx](mailto:cervero16@yahoo.com.mx)

*Palabras clave: Nitrobacter, Extremofilas, Salino-Alcalino*

**Introducción.** En años recientes, se ha incrementado el interés en estudios microbiológicos en ambientes extremos como fuentes potenciales de diversos microorganismos. Para entender la composición y diversidad de las bacterias en suelos, es necesario tener información acerca de la estructura de una comunidad microbiana y su diversidad, y explicar las relaciones entre los factores ambientales. La medición de la diversidad microbiana ha sido recomendada en los programas de monitoreo de salud de suelos. Objetivo: Detectar la presencia de poblaciones nitrificantes (*Nitrobacter*) en suelos salinos-alcálinos por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

**Metodología.** El suelo salino-alcálico usado, se recolectó en el ex-lago de Texcoco (México). El cual debido a sus condiciones naturales y de drenaje ha creado zonas con diferentes valores de pH y conductividad.

**Primers.** Se usaron los primers FGPS 1269 y FGPS 872 para detectar el género *Nitrobacter* 16S (1). 5' TTTTGTGAGATTTGCTAG 3' FGPS 1269 5' CTAAACTCAAAGGAATTGA 3' FGPS 872

**Extracción y purificación de DNA.** Se modificó el método de Guo et al. (2) el tamaño de la muestra inicial fue de 5 gr, la sustitución de CTAB por Triton X-100, concentración final 3 M de NH<sub>4</sub>OAc, la purificación se realizó a través del sistema mini Prep-Cell (Bio-Rad) con una matriz de agarosa 2 % (w/v) en amortiguador TBE (0.089 M Tris-borato, 0.089 ácido bórico, 0.002 M EDTA [pH 8]), con un voltaje constante de 90 V y un tiempo de elusión de 120 minutos.

**PCR.** Condiciones de amplificación con un volumen total de reacción de 50 µl conteniendo 5µl de amortiguador 10X, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP's, 0.5 µM de cada primer, 1 µl BSA y 2.5 U de *Taq* polimerasa (Difco Laboratories, USA). Un ciclo inicial a 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de denaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento de los primers a 50°C por 1 min, extensión del DNA a 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 3 min.

**Electroforesis.** Las muestras de DNA extraídas del suelo y amplificadas por PCR fueron verificadas por electroforesis horizontal en amortiguador TBE (0.089 M Tris-borato, 0.089 ácido bórico, 0.002 M EDTA [pH 8]) con 2.0 % agarosa (w/v). Los geles se revelan con una solución de bromuro de etidio (10 µg/ml) y fotografiada en una fuente de luz UV 312-nm.

**Resultados y discusión.** El suelo del ex-lago de Texcoco tiene valores de pH >10 y conductividad eléctrica >30 dSm<sup>-1</sup>, y altos contenidos de materia orgánica (cuadro 1).

Cuadro 1. Caracterización de las muestras de suelo del exlago de Texcoco

Suelo	Conductividad		Capacidad de retención de Agua		Nitrogeno		Arcilla	Limo	Arena
	(dS m <sup>-1</sup> )	pH <sub>H<sub>2</sub>O</sub>	Agua	Orgánico	Total	(g kg <sup>-1</sup> soil)			
A	32.7	9.8	89	28.7	1.52	185	188	627	
B	24.6	9.5	98	33.1	1.92	205	195	600	
C	3.2	8.2	81	47.1	1.26	157	65	778	
D	1.2	7.7	51	46.5	1.22	56	60	884	

Cuadro 1 Caracterización de los suelos.

Se probó un método para extraer DNA el cual se modificó para las condiciones específicas de estos suelos, también se comprobó la especificidad de los cebadores probados obteniéndose la amplificación de dicho marcador.

Figura 1. Extracción, purificación y amplificación de muestras de DNA a partir de las muestras de suelo.

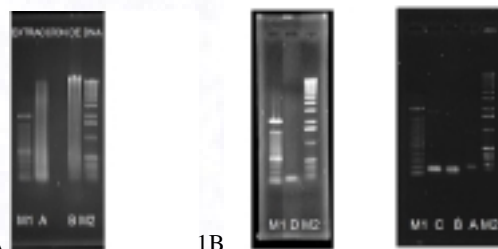


Figura 1A. Extracción y purificación de DNA. 1B. Amplificación del gen 16S rRNA de *Nitrobacter* con los primers FGPS 1269 Y 872. M1) LADDER 100 bp. A) CE 32.7 dS m<sup>-1</sup>. B) CE 24.6 dS m<sup>-1</sup>. C) CE 3.2 dS m<sup>-1</sup>. D) 1.2 dS m<sup>-1</sup>. M2) λ HIND III.

**Conclusiones.** Las modificaciones en el método de extracción y de purificación de DNA fueron adecuadas para obtener muestras susceptibles de amplificación. Se observó la presencia de amplificación de la secuencia de interés, mostrando en la electroforesis una banda en los cuatro extractos obtenidos a partir de las diferentes muestras de suelo. Es un avance importante ya que uno de los pasos limitantes para el uso de estas técnicas es la cantidad y calidad de DNA recuperado, así como la eliminación de inhibidores de la amplificación. Actualmente se están diseñando primers para detectar otras poblaciones presentes en suelos alcalinos hipersalinos del ex lago de Texcoco y su posible aislamiento.

**Bibliografía.** 1. Degrange V. and Bardin R. 1995. Detection and Counting of *Nitrobacter* Populations in Soil by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* (61):1093-2098.

2. Gou C., Sun W., Ogram A. 1997. Hybridization Analysis of Microbial DNA from Fuel Oil -Contaminated and Non-contaminated Soil. *Microb. Ecol.* (34):178-187.