

## ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA DE UNA MUESTRA DE SUELO DEL CORREDOR BIOLÓGICO CHICHINAUTZIN, MEDIANTE EL ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ADN<sub>r</sub> 16S.

Noemí Sirena Sánchez\*, Guillermo Gosset, Francisco Bolívar y Adelfo Escalante Lozada, Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62250, México, fax. 56227601, noemis@ibt.unam.mx\*

*Palabras clave: Metagenómico, diversidad, extracción directa.*

**Introducción.** En la actualidad diversas evidencias indican que el uso de las técnicas de aislamiento tradicional de microorganismos a partir del ambiente, tan solo permite obtener en laboratorio únicamente entre 0.1 y 10% de los microorganismos presentes en una muestra de suelo analizada. En cambio, la aplicación de herramientas moleculares al análisis de ADN bacteriano total aislado de una muestra ambiental (metagenoma) ha permitido la posibilidad de detectar productos naturales de interés para la industria farmacéutica y agrícola además que proporcionan riqueza y potencial para nuevas aplicaciones biotecnológicas para empresas que se especializan en biocatálisis, biorremediación. En este trabajo se presenta un estudio de diversidad bacteriana a partir de una muestra de suelo mediante el análisis de secuencias de ADN<sub>r</sub> 16S.

**Metodología.** Se colectó una muestra de suelo de la zona boscosa de la ciudad de Cuernavaca perteneciente al corredor biológico Chichinautzin. A partir de 5 g de suelo se obtuvo ADN metagenómico mediante una técnica de extracción directa <sup>(1)</sup> con cloroformo, posteriormente el ADN se utilizó como templado para amplificar por PCR los ADN<sub>r</sub> 16S, utilizando primers universales para eubacterias<sup>(2)</sup>. El producto obtenido se clonó en el sistema TOPO Blunt, se sometieron a análisis ARDRA 100 clonas positivas utilizando la enzima *Hae*III cuyos perfiles de restricción se compararon entre ellos para encontrar aquellos únicos, los cuales fueron secuenciados. Las secuencias obtenidas se compararon contra las secuencias registradas en la base de datos del NCBI y su filiación taxonómica se determinó al construir un árbol filogenético mediante el método NJ.

**Resultados y discusión.** Mediante la extracción directa se obtuvo un ADN de buena calidad (fig.1).

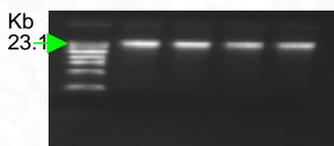


Fig. 1. ADN obtenido a partir de una muestra de suelo por técnicas independientes de cultivo

Se obtuvieron diferentes perfiles de restricción de ADN<sub>r</sub> 16S, los cuales se muestran en la fig. 2, lo cual refleja la alta diversidad bacteriana presente. El análisis de las secuencias de las clonas únicas obtenidas, en la base de datos de GenBank mostraron una diversidad más inclinada hacia microorganismos no cultivables de suelo con porcentajes altos de similitud entre ellas, que mayoritariamente se encuentran en el grupo de las Gram

negativas, esto puede deberse al tipo de actividad metabólica que se requiere en ese estrato del suelo. El 91% de las secuencias obtenidas pertenecen a microorganismos no cultivables, y el 9% restante pertenece a microorganismos descritos

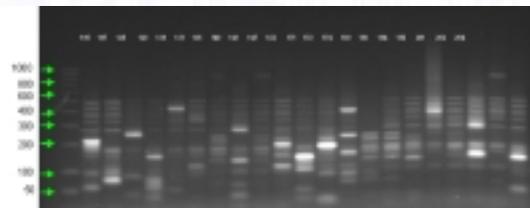


Fig.2 Electroforésis donde se muestran los diferentes perfiles de restricción obtenidos.

En la figura 3 se muestra el árbol filogenético obtenido mediante el método NJ

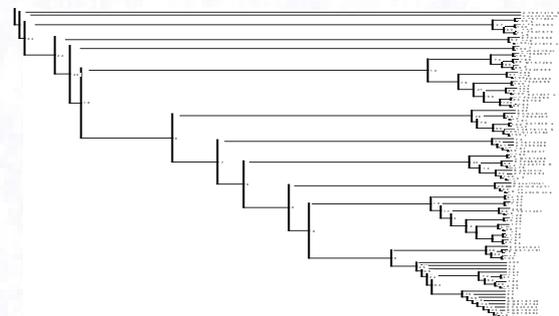


Fig.3 Árbol obtenido mediante NJ de las secuencias de ADN<sub>r</sub> 16S

**Conclusiones.** La técnica de extracción directa permitió obtener ADN de buena calidad y buena concentración. El estudio de diversidad utilizando ADN<sub>r</sub> 16S refleja que el 91% de los microorganismos caen dentro de los no cultivables, esto coincide con lo reportado por otros autores.

### Bibliografía.

1. Rondon, M, Augist, P, Bettermann, A, Brady, S, Grossman, T, Loiacono, K, Lynch, B, MacNeil, I, Minor, C, Lai Tiong, C, Gilman, M, Osburne, M., Clardy, J, Handelsman, J. y Goodman R.(2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and unclonal diversity of uncultured microorganisms. *Appl and Enviro Microbiol.* 66:2541-2547.
2. Borneman, J, Skroch, P, O'Sullivan, K, Palus, J, Rumjanek, N, Jansen, J.L, Nienhuis, J, y E. Triplett, W. (1996). Molecular Microbial Diversity of Agricultural Soil in Wisconsin. *Appl and Environ Microbiol.* 62(6) 1935-1943.