

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS PRESENTES EN UN CONSORCIO ANAERÓBICO AISLADO DE OLEODUCTOS

Isabel Neria¹, César Hernández-Rodríguez¹, Entao Wang¹, Florina Ramírez², Juan M. Romero³, Manuel G. Amaya³

¹ Depto. Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN. Prol. de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Casco de Sto. Tomás CP 11340, México DF. Fax 57 29 62 07. Correo electrónico: chdez38@hotmail.com ² Depto.

Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, ³ Programa de Investigación y Desarrollo en Ductos, Instituto Mexicano del Petróleo.

Palabras clave: bacterias sulfato reductoras, identificación, Desulfovibrio.

Introducción. Las bacterias sulfato reductoras (BSR) son ubicuas y participan en el ciclo del azufre en sedimentos de ríos y marinos, plantas de tratamiento de aguas residuales, yacimientos de petróleo, etc., son anaerobias obligadas, utilizan el SO_4^{2-} y otros compuestos sulfurados como aceptores finales de electrones⁽¹⁾. Las BSR poseen un alto poder destructivo, por ejemplo en la corrosión de tuberías que transportan agua, gas y petróleo, que afectan los procesos de producción generando serios problemas económicos a las industrias. Actualmente la identificación y el estudio de la filogenia de las BSR se basa en criterios fenotípicos y en las secuencias de los genes ribosomales⁽²⁾. Las principales BSR pertenecen a los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* (especies esporulantes), *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfonema* y *Desulfosarcina*.

En este trabajo se llevó a cabo el aislamiento e identificación de BSR presentes en un consorcio anaeróbico proveniente de la biopelícula formada en el interior de un oleoducto de PEMEX de la región marina del Sureste de México.

Metodología. Las BSR se aislaron del consorcio mediante cultivos sucesivos en medio específicos aplicando la técnica del tubo rodado. La identificación fenotípica se llevó a cabo mediante pruebas morfológicas y bioquímicas⁽³⁾. La extracción del DNA se realizó por el método de Cullen y Hirsch⁽⁴⁾. La identificación molecular BSR se llevó a cabo por el análisis del gen 16S rDNA, se realizó una PCR anidada, usando primeramente iniciadores universales para eubacterias y después iniciadores específicos para BSR^(2,5). Las secuencias del 16S rDNA de los aislados se analizaron para inferir la filogenia de cada aislado. El estudio de la diversidad bacteriana del consorcio se realizó con la construcción de una librería de genes 16S rDNA de la comunidad bacteriana. Las clonas se analizaron mediante Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen 16S rDNA utilizando las enzimas de restricción *HinPII*, *MspI* y *Sau3AI*.

Resultados y discusión. Los géneros que se lograron detectar en la muestra del consorcio por PCR fueron *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus* y *Desulfococcus*. Pero, los aislados de BSR que se obtuvieron correspondieron desde los puntos de vista morfológico, fisiológico y molecular al género *Desulfovibrio*. Los aislados fueron capaces de crecer en presencia de lactato, por otra parte, las especies reportadas para *Desulfovibrio* no crecen

con benzoato, propionato y acetato, sin embargo nuestros aislados presentaron crecimiento en tales compuestos y el SO_4^{2-} fue utilizado como aceptor de electrones produciendo H_2S . El análisis filogenético de las secuencias parciales del 16S rDNA de dos aislados de BSR determinó un 98% de similitud con *Desulfovibrio alaskensis*, *Desulfovibrio desulfuricans* G20 y menos del 98% con otras especies del mismo género. Los otros géneros detectados por PCR no se han logrado cultivar y aislar pese a que se han ensayado las condiciones recomendadas en la literatura. Es probable que estas BSR sean microorganismos no cultivables, al menos en las condiciones actuales. Finalmente, la construcción de una librería de 86 clonas para el gen 16S rDNA, ayudó por el análisis de la diversidad bacteriana del consorcio mediante RFLP. Los patrones de restricción con las enzimas *HinPII*, *MspI* y *Sau3AI* de las clonas analizadas fueron iguales, por lo que se intentará probar con otras enzimas.

Conclusiones. A partir de biopelículas que se forman en el interior de oleoductos, se ha logrado aislar e identificar BSR del género *Desulfovibrio* por métodos tradicionales de cultivo y mediante secuenciación del 16S rDNA. Asimismo, se han detectado, mediante PCR específicas, a BSR pertenecientes a los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus* y *Desulfococcus*. No se ha logrado hasta el momento poner en evidencia con otras técnicas, RFLP y PCR-DGGE la variabilidad genotípica de la comunidad bacteriana del consorcio.

Agradecimientos. CHR y EW son becarios de COFAA y EDD; IN es becaria de PIFI y CONACYT.

Bibliografía

1. Jorgensen, B. B. 1982. Mineralization of organic matter in the sea bed the role of sulfate reduction. *Nature* 296:643-645.
2. Daly, K. 2000. Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology* 146:1693-1705.
3. Noel, R. K. 1984. Dissimilatory Sulfate- or sulfur-reducing bacteria. En "*Bergey's Manual of systematic bacteriology*". Editorial BOARD, Baltimore, USA. Volumen I pp. 663-679.
4. Cullen, D. W. & Hirsch, P. R. 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil. Biol. Biochem.* 30: 983-993.
5. Redman, D.A. 1993. Universal bacterial 16S rDNA amplification and sequencing. En "Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications". Ed. By American Society Microbiology. pp 489-495.