

# SEGUIMIENTO DE LA COMUNIDAD BACTERIANA EN SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS DURANTE SU TRATAMIENTO EN BIORREACTORES DE FASE SEMISOLIDA.

Félix Aguirre<sup>1</sup>, Hugo Ramírez-Saad<sup>2</sup>, María Trejo<sup>3</sup>, Octavio Loera<sup>1</sup>. UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA. <sup>1</sup>Unidad Iztapalapa, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina C.P. 09340. <sup>2</sup>Unidad Xochimilco, Calz. del Hueso # 1100, Col. Villa Quietud. C.P. 04960. México, D.F. Fax. 54. 83. 72 37. <sup>3</sup>Centro de Biotecnología-UAEM, C.P. 62210<sup>3</sup>, Cuernavaca, Mor. México. Fax. 58046407. E-mail jackeasycure@yahoo.com

Palabras clave: PCR-REA, Bioestimulación, UFC.

**Introducción.** La bioestimulación es una de las estrategias en los procesos de biorremediación para acelerar la transformación de los contaminantes. Básicamente consiste en la adición de nutrientes y aceptores de electrones, para favorecer la actividad biológica de los microorganismos (1). Una de las formas de evaluar la comunidad bacteriana presente en los sistemas de tratamiento es mediante cuentas viables, normalmente se realizan para microorganismos totales y para hidrocarbonoclastas. En este proceso se obtienen aislados de interés que requieren ser tipificados rápidamente. Lo anterior se puede realizar por métodos moleculares, como el PCR-Análisis de Restricción (PCR-REA), para el cual se amplifica por PCR el gen 16SrRNA, presente en todas las bacterias. Después el uso de enzimas de restricción sobre dichos amplicones origina diferentes patrones de bandas, que se utilizan como huella molecular. Estos métodos complementan a la cuenta viable de una población (2). El objetivo de este trabajo fue comparar las poblaciones bacterianas de suelos contaminados con hidrocarburos, tratados en distintos biorreactores con y sin bioestimulación, así como tipificar los aislados hidrocarbonoclastas más abundantes en cada tratamiento.

**Metodología.** Conteo de microorganismos viables (UFC). Se hizo por triplicado en medio para microorganismos totales y medio para microorganismos hidrocarbonoclastas (3). Las unidades experimentales fueron 3 reactores de tambor rotatorio de fase semisólida; **E1** (sin bioestimulación) y **E2** (bioestimulado con solución mineral M9) ambos con 150 g de suelo; **E3** con 5000 g de carga y adicionado de M9. Las cepas aisladas con mayor frecuencia se cultivaron por separado y se les extrajo DNA usando el Wizard DNA Clean Up System (Promega). Para la amplificación por PCR del 16SrDNA se usaron los cebadores: p8for y p1492rev. Los amplicones obtenidos se cuantificaron densitométricamente y se digirieron con las siguientes enzimas; *HhaI*, *HaeIII* y *MspI*, que reconocen sitios de cuatro de bases.

**Resultados y discusión.** Se obtuvieron 47 aislados en medio para hidrocarbonoclastas para las diferentes muestras, luego de la extracción de DNA y su análisis por PCR-REA, se identificaron 11 grupos según los patrones de digestión con *HhaI*, y *MspI*. No se detectaron sitios de corte para *HaeIII* en ningún producto de PCR de las cepas analizadas.

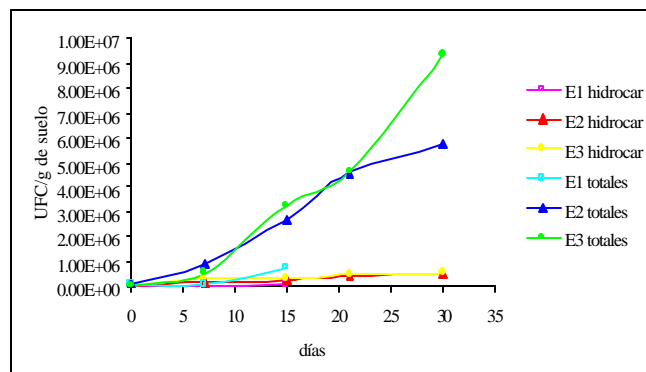


Fig. 1. UFC/g de muestra para los tres experimentos realizados en medio para microorganismos hidrocarbonoclastas y medio para microorganismos totales.

**Conclusiones.** La adición de la solución mineral M9 influyó significativamente en la cuenta de microorganismos hidrocarbonoclastas y totales, aumentando su número en un orden de magnitud (E2 y E3 > E1). De las 47 cepas aisladas se identificaron 11 grupos, pero el PCR-REA con dos enzimas diferentes corroboró que solo algunos grupos coincidieron para ambas enzimas (*HhaI*, y *MspI*). Este tipo de análisis puede discriminar entre cepas muy relacionadas que pudieran ser de la misma especie.

**Agradecimiento.** Proyecto CONACYT 33584-B y al IMP a través de un proyecto FIES.

## Bibliografía.

1. Pradhan, S. Liu, B. Srivastava, V. (1998). Slurry phase bioremediation of hazardous material: Bioslurry reactor application. Bioremediation. En: *Principles and Practice Bioremediation*. Ed Technomic Publishing corporation, Inc. USA. pp 463- 478
2. Lorch, H.J. Benckieser, G. Ottow, J.C. (1995). Basic methods for counting microorganisms in soil and water. En: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, Ltd. USA. pp 120-127.
3. Hernández, A.E., Tesis de Doctorado. La rizosfera de plantas gramíneas y leguminosas en la fitorremediación de suelos contaminados por petróleo. Colegio de Posgraduados. Instituto de Recursos Naturales. Programa de Edafología, 22