

TIPIFICACION MOLECULAR RAPIDA DE BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTAS AISLADAS DE SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS

Aída Hamdan Partida¹, Hugo Ramírez Saad¹, Octavio Loera². UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA.

¹Unidad Xochimilco. Depto. Sistemas Biologicos. Calz. del Hueso # 1100, Villa Quietud. C.P. 04960. ²Unidad Iztapalapa. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina C.P: 09340 .México, D.F. Fax. 54. 83. 72 37.

aidahamdan@yahoo.com

Palabras clave: ITS, REA, espacio intergénico.

Introducción. Los métodos de biología molecular ofrecen la posibilidad de tipificar aislados de una manera más rápida y sensible que los métodos de microbiología tradicionales que resultan ser muy laboriosos y en ocasiones poco sensibles. El Análisis de Restricción Enzimática (REA), se puede aplicar al denominado espacio intergénico (ITS) que separa los genes 16S y 23S rRNA. Dado que las regiones ITS tienen mayor variabilidad en su secuencia que los genes ribosomales, nos permiten realizar tipificaciones más específicas. En este caso, la región ITS es amplificada por PCR y los productos son restringidos para tener un patrón de bandas del espacio intergénico (2).

El objetivo de este trabajo fue identificar por métodos bioquímicos y tipificar mediante PCR-REA una colección de bacterias hidrocarbonoclastas aisladas de suelos en procesos de biorremediación, contaminados con hidrocarburos.

Metodología. Se colectaron muestras de suelo del Campo 10, Poza Rica, Ver. (1) y de una biopila de tratamiento. El aislamiento y selección de las cepas se realizó en agar medio mineral para bacterias hidrocarbonoclastas. Se utilizaron galerías API NE20 para identificación por perfil bioquímico. El ADN de las cepas se extrajo con el sistema Wizard DNA Clean Up (Promega). Para la amplificación por PCR del ITS se usaron los cebadores: pHr y p23SR01. REA: se utilizaron enzimas como *HhaI*, *HaeIII* y *Msp I* que reconocen diferentes secuencias de 4 bases.

17	1.5	M	I	K	13
18	1.3	N	J	L	14
19	1.5	O	K	M	15
20	1.3	O	L	L	16
21	1.3	P	M	J	17

Tabla 1. Tamaño del ITS y grupos identificados según la digestión con enzimas de las cepas hidrocarbonoclastas aisladas.

Resultados y discusión. Se aislaron en total 21 cepas de bacterias hidrocarbonoclastas, tanto del suelo control sin contaminación, como de los suelos contaminados en el sitio y la biopila. También se obtuvieron aislados del bagazo de caña utilizado como texturizante durante el tratamiento en biopila. Una caracterización preliminar con tinción de Gram, nos dio 16 cepas fue Gram (-) y 5 Gram (+). La identificación con galerías API permitió distinguir a especies de los géneros *Pseudomonas* (2 aislados), *Burkholderia* (1 aislado), *Chryseomonas* (2 aislados) *Sphingomonas* (5 aislados), *Stenotrophomonas* (1 aislado), y *Agrobacterium* (2 aislados). La tipificación molecular nos permitió crear 17 grupos distintos, demostrando que las cepas 5, 8, 9, 11 y 12 identificadas con mediante API como *Sphingomonas paucimobilis*, pertenecen a tres grupos distintos.

Conclusiones. La combinación técnicas como API y PCR-REA en la tipificación resulta práctica y sencilla con lo que se puede utilizar en trabajos similares. A pesar de que no hay diferencias substanciales en los tamaños de los ITS, las bacterias se pueden clasificar, con base en los patrones de bandas de restricción de dichos fragmentos, en 17 grupos distintos. El análisis de REA permitieron distinguir diferencias entre cepas de la misma especie de *Sphingomonas*, en 3 distintos grupos.

Agradecimiento. Proyecto CONACYT 33584-B y al IMP a través de un proyecto FIES. AHP contó con beca CONACYT para estudios de posgrado.

Bibliografía.

- 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.
- Normand, P. Ponsionnet, C, Nesme, X, Neyra, M, Simonet, P. (1996) ITS análisis de prokaryotes. *Molecular Ecology Manual* 3.4.5. Pp. 1-12.

Cepas	Tamaño del ITS (kb).	Análisis REA			Grupos
		<i>Hae III</i>	<i>Hha I</i>	<i>Msp I</i>	
1	1.6	A	A	A	1
2	1.6	A	A	A	1
3	1.5	B	B	B	2
4	1.2-1.4	C	C	C	3
5	1.2-1.4	D	C	D	4
6	1: >1.5 2: 1.4 3: 1.2	E	D	E	5
7	1: 1.3 2: 1.4	F	C	F	6
8	1.2	G	C	G	7
9	1.2	G	C	G	7
10	1.5	H	E	H	8
11	1.2	G	C	G	7
12	1.2	G	C	G	7
13	1.3	I	F	I	9
14	>1.6	J	G	I	10
15	1.3	K	H	J	11
16	1.8	L	H	K	1.2

