

ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS BACTERIAS DE LA RIZOSFERA DE *Cyperus* sp. QUE CRECE EN SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO

Francisco Javier Zavala Díaz de la Serna*, Juan Antonio Zermeño Eguia Lis+, Jesús Israel Morales Jiménez y César Hernández-Rodríguez*

*Departamento de Microbiología. E. N. C. B. - I. P. N. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n. Col Sto. Tomás. México DF. CP 11340 Fax (01) 57296207. E-mail: chdez38@hotmail.com

+Departamento de Biotecnología, Instituto Mexicano del Petróleo.

Palabras claves: Fitoremediación, 16S rDNA, rizosfera.

Introducción. La bioremediación *in situ* tiene el potencial para remover contaminantes de diversos ambientes con una buena relación costo/efectividad. Para valorarla se hace seguimiento de microorganismos participantes en los procesos degradativos, aunque existen evidencias de que la mayor parte de éstos no pueden ser cultivados (Muyzer *et al*, 1999). Un pantano del sur de Veracruz presenta una alta contaminación con hidrocarburos. En este sitio crecen casi exclusivamente plantas del género *Cyperus* y *Echinochloa*, y se sospecha que estas plantas facilitan la biodegradación de hidrocarburos principalmente del grupo BTEX (Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno) (Zermeño *et al*, 2000). Esto hace que estas plantas sean candidatas potenciales para ser utilizadas en procesos de fitoremediación.

El propósito de este trabajo es analizar la comunidad bacteriana asociada al suelo rizosférico de *Cyperus* sp. e identificar algunos microorganismos frecuentemente aislados de este ambiente.

Metodología. Se obtuvieron muestras de 7 suelos rizosféricos de *Cyperus* sp. y 2 de suelos no rizosféricos de diversos puntos del pantano. A estas muestras se les hicieron diversas pruebas fisicoquímicas. Los suelos se tamizaron, se extrajo y purificó el DNA metagenómico. Los genes 16S rDNA de la comunidad bacteriana se amplificaron por PCR y, los productos se separaron por electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE). Por otra parte se buscó la presencia del gen que codifica para la subunidad alfa de la benceno dioxigenasa que participa en la degradación de hidrocarburos BTEX. A partir del DNA de algunas bacterias aisladas de la rizosfera de *Cyperus* sp. se amplificó y secuenció el gen 16S rDNA para identificación y análisis filogenético de las cepas.

Resultados. En general el pH de los suelos no rizosféricos fue ácido (2.90) y el de los suelos rizosféricos fue cercano a la neutralidad. Después de probar diversas técnicas para la extracción y la purificación del DNA se seleccionó un protocolo basado en el rompimiento mecánico de las células seguido de precipitaciones y lavados con diferentes sales y alcoholes.

Se diseñó y estandarizó una PCR para amplificar un fragmento del gen de la subunidad α de la benceno dioxigenasa. Con este sistema, se obtuvo un fragmento del tamaño esperado a partir de DNA genómico de algunas bacterias aisladas de la rizosfera.

Por otra parte, se amplificó un fragmento de 250 pb del gen 16S rDNA a partir de DNA metagenómico de las muestras de suelo. Se observó una comunidad microbiana más compleja en los suelos rizosféricos que en los no rizosféricos.

El análisis de la secuencia del gen 16S rDNA permitió la identificación y construir la filogenia de bacterias pertenecientes a los grupos α y β de las proteobacterias dentro de los géneros *Enterobacter* y *Stenotrophomonas* respectivamente.

Conclusiones Se amplificó DNA bacteriano metagenómico a partir de suelos rizosféricos y no rizosféricos altamente contaminados con petróleo. La DGGE permitió observar una mayor complejidad de la diversidad bacteriana en los suelos rizosféricos, que tenían un pH neutro o ligeramente alcalino. Se pudieron detectar genes de la dioxigenasa de benceno y la presencia de bacterias no cultivables en los suelos.

Agradecimientos. CHR es becario COFAA y EDD. FIZDS y JIMJ son becarios PIFI.

Bibliografía

- 1.-Cullen, D. W. y Hirsch P. R. (1998). Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil to PCR. *Soil. Biol. Biochem.* 30:983-993.
- 2.- Knaebel, D. B. y Crawford R. L. (1995). Extraction and purification of microbial DNA from petroleum contaminated soils and detection of low number of toluene, octane and pesticide degraders by multiple polimerase chain reaction and southern analysis. *Mol. Ecol.* 4:579-591.
- 3.- Muyzer G. (1999). DGGE/TGGE A method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Op. Microbiol.* 2:317-322.
4. Zermeño, J., Uribe, H. R., Salazar, C.L., Camacho, R.A., Jaimes, L.C., Gutierrez, R.M., Escalante, E.E., Gallegos, M.M. y Gomez, S.A. (2000). Feasibility studies and toxicity tests for phytoremediation of soils contaminated with hydrocarbons. *First International Conference On Petroleum Biotechnology: State Of Art And Perspectives. Proceedings.* Instituto Mexicano Del Petróleo. México D. F 21-23 febrero. 235-239