

## PERFILES MOLECULARES OBTENIDOS POR DGGE DE UN CULTIVO MIXTO DEFINIDO EN LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS.

Idefonso Díaz Ramírez, Ernesto Favela-Torres, Mariano Gutiérrez-Rojas y Hugo Ramírez Saad\*.

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Av. San Rafael Atlixco No 186. Col. Vicentina, Iztapalapa, México, D.F. CP 09340, Fax 58-04-67-07

\*Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco

e-mail: ijdr@xanum.uam.mx

**Palabras clave:** DGGE, biodegradación de hidrocarburos, cultivo mixto definido.

**Introducción.** La detección e identificación de microorganismos a través de marcadores moleculares, tales como el 16S rRNA o sus genes codificadores, cada vez es más usada para explorar la diversidad y estructura de las comunidades microbianas involucradas en diversos procesos biotecnológicos. Técnicas como el DGGE o TGGE se han aplicado para el análisis de la composición de las comunidades microbianas, sin embargo, pueden ser empleadas también para el estudio de mezclas simplificadas de microorganismos (1). El estudio de la dinámica de poblaciones presentes en un cultivo mixto, en función de las diferentes fracciones de hidrocarburos, es parte importante en la comprensión del proceso de biodegradación. El objetivo de este trabajo fue determinar la dinámica de poblaciones presentes en un cultivo mixto definido (CMD), mediante la técnica de DGGE, en el proceso de biodegradación de diferentes fracciones de hidrocarburos.

### Metodología.

**Ensayos de biodegradación.** Se utilizaron hidrocarburos alifáticos (AL) y aromáticos/polares (AP) como fuente de C. Como inóculo se probaron 11 cepas bacterianas aisladas por enriquecimiento, a partir de la rizósfera de *Cyperus laxus*. Posteriormente, se probó un CMD, constituido por los aislados, en este caso además de las fracciones anteriores se utilizaron hidrocarburos totales (HT) como fuente de C (2).

**Obtención del ADN.** Para las cepas puras se utilizó el Sistema de extracción Wizard (Promega). Para el CMD, se empleó el método de Bead-Beating descrito por Ferris y col. (3).

**PCR.** Se amplificó el fragmento correspondiente a las regiones variables V6 a V8 del gen 16S DNA, las condiciones de PCR fueron similares a las propuestas por Muyzer y col. (4).

**DGGE.** Se llevó a cabo utilizando un gradiente de 44%/54% por 16h a 85 V (5).

**Resultados y Discusión.** Con la finalidad de determinar la presencia de las diferentes cepas bacterianas, al final de los ensayos de biodegradación, se obtuvieron previamente los perfiles genómicos de

indicando que posiblemente estos microorganismos poseen más de una copia del gen 16s rADN. En el caso de las cepas U4A y U5A (carriles 4 y 5), con el gradiente de desnaturalización probado, ambos microorganismos presentan una banda con movilidad similar en el gel. Al final de los ensayos de biodegradación con el CMD se determinó el perfil genómico y se comparó con el de cada aislado. En la Fig. 1b se presentan los perfiles al inicio y final de los ensayos de biodegradación. Con AL como fuente de carbono (carril B), las cepas U3A, U10AP, y U11A predominaron al final del cultivo. En cultivos individuales, éstas cepas presentaron tasas de consumo de AL de hasta 354 mg l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; siendo menor la tasa de consumo por el CMD (Tabla 1).

**Tabla 1.** Biodegradación de alifáticos (10,000 mg l<sup>-1</sup>), aromáticos/polares (5,000 mg l<sup>-1</sup>) e hidrocarburos totales (10,000 mg l<sup>-1</sup>) por el CMD.

Fuente de carbono	Tasa de biodegradación (mg l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Alifáticos	300 ? 26.5
Aromáticos/polares	7 ? 0.6
HT	234 ? 23.0

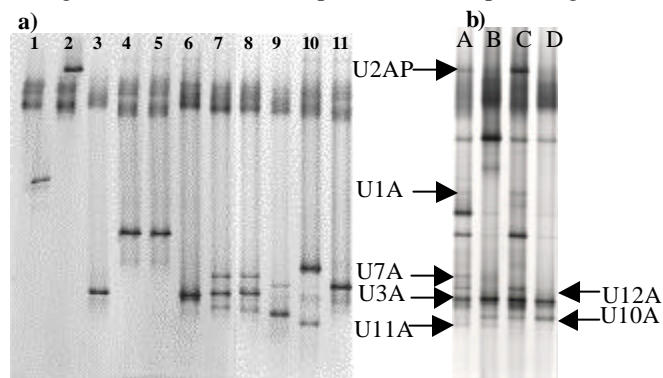
Para la mezcla de AP (carril C), los aislados U1A, U2AP, U3A, U10AP y U12A presentaron las bandas más intensas al final del cultivo. La tasa de consumo promedio de ésta fracción por las cepas U2AP y U10AP fue de 15 mg l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Las diferencias en las tasas de biodegradación de AL y AP, obtenidas con el CMD, respecto a los cultivos axénicos posiblemente se debe a interacciones de competencia entre los microorganismos durante la biodegradación de los hidrocarburos. Las cepas U2AP, U3A y U10AP predominaron al final del cultivo con HT, siendo el consumo de ésta fuente de carbono de 234 mg l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> con el CMD.

**Conclusiones.** De acuerdo a los perfiles de DGGE, con el CMD como inóculo, las cepas que presentaron las tasas de consumo de hidrocarburos más elevadas fueron predominantes al final de la biodegradación. Con nuestros resultados será posible diseñar cultivos mixtos definidos degradadores de fracciones específicas de petróleo.

**Agradecimientos.** Financiado por CONACyT (proyecto 33584-B) y PEMEX refinación. IDR recibió beca de estudios de posgrado.

### Bibliografía.

- Muyzer G. y Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73:127-141.
- Díaz-Ramírez I., Ramírez-Saad H., Gutiérrez-Rojas M. y Favela-Torres E. 2002. Biodegradation of Maya crude oil fractions by axenic and defined bacterial consortium. In Platform Abstracts, VI International Symposium on Environmental Biotechnology, Junio 9-12, Veracruz, México.
- Ferris M. J., Muyzer G. y Ward D. M. 1996. DGGE of 16SrRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(2):340-346
- Muyzer G., Brinkhoff T., Nübel U., Santegoeds C., Schäfer H., y Wawer C. 1998. DGGE in microbial ecology. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.4.: 1-27
- Muyzer G., Hottenträger S., Teske A., y Wawer C. 1996. DGGE of PCR-amplified 16S rDNA- A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.4.: 1-23.



**Fig. 1.** a) Perfil genómico obtenido para las cepas bacterianas aisladas. Carriles: 1, U1A; 2, U2AP; 3, U3A; 4, U4A; 5, U5A; 6, U6A; 7, U7A; 8, U9A; 9, U10AP; 10, U11A; 11, U12A. b) Perfil genómico para el CMD inicial (carril A) y final con AL (carril B), AP (carril C) y los HT (carril D).

cada una por la técnica de DGGE. (Fig.1a). Los perfiles son distintos para la mayoría de las cepas bacterianas, en el caso de las cepas U7A, U9A, U10AP y U11A se obtuvieron perfiles con más de una banda,