



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## ESTUDIO DE BIODIVERSIDAD BACTERIANA EN LAS BIOPELÍCULAS DEL SITIO EXTREMO “LOS AZUFRES”, MICHOACÁN, A TRAVÉS DE MÉTODOS MOLECULARES INDEPENDIENTES DE CULTIVO

Irene Amaranta Sotelo González, Norberto Villegas Negrete, Georgina E. Reyna López, Elcia M. Souza Brito, Hilda Amelia Piñón Castillo, Félix Gutiérrez Corona, Universidad de Guanajuato, División de Ingenierías, Departamento de Ingeniería Civil – Ambiental; División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Guanajuato, Gto. C.P. 36050. Correo electrónico: ami\_soph@live.com

*Palabras clave:* Extremófilos, rADN 16s, árbol filogenético.

**Introducción.** Los estudios de biodiversidad a través de métodos independientes del cultivo son especialmente útiles cuando se trabaja con organismos extremófilos debido a la dificultad que representa emular sus condiciones fisicoquímicas y nutricionales en el laboratorio. Este tipo de estudios son previos cuando se pretende realizar bioprospección para fines de biorremediación u otros (1). Para la presente investigación se utilizaron las técnicas de TRFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) y banco de genes para estudiar la biodiversidad de un sitio extremo localizado en Los Azufres, en Michoacán. Este es el segundo campo geotérmico de mayor importancia en México, además de ser un sitio recreativo.

**Objetivo:** Identificar, en base al fragmento 16S del ADN ribosomal, y a través técnicas moleculares independientes del cultivo, las especies microbianas extremófilas formadoras de biopelículas naturales, presentes en un punto del balneario “Los Azufres”.

**Metodología.** La toma de muestra se realizó en tubos Falcon estériles que se almacenaron en un termo durante su transporte al laboratorio donde la muestra se guardó a -20°C hasta ser procesada. Además se midieron variables fisicoquímicas de temperatura, oxígeno disuelto y pH, *in situ*. Parte de la muestra fue destinada al análisis elemental de metales y metaloides. En primer lugar se extrajo el ADN total utilizando el método, modificado, de Tsai y Griffit (2), este ADN fue amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) con oligonucleótidos (8F y 907R) marcados fluorescentemente para el análisis por TRFLP (3), y sin marcar para la creación del banco de genes. Para este último caso el producto fue purificado, y posteriormente clonado utilizando el sistema TOPO TA cloning (Invitrogen). Se verificó la presencia del vector con el fragmento inserto en las células a través de un PCR en colonia. Las clonas positivas fueron sometidas a un análisis ARDRA (*Amplified rDNA Restriction Analysis*) para discriminar entre grupos de clonas idénticas a través del patrón de bandeado obtenido por restricción enzimática. El ADN plasmídico fue extraído (sistema Fermentas) y enviado a secuenciar (CINVESTAV, Irapuato). Con las secuencias editadas se elaboró un árbol filogenético (4).

**Resultados.** El sitio de estudio es catalogado como extremo y los organismos que ahí habitan, como

extremófilos: microaerófilos (posiblemente anaerobios), extremófilos químicos, y acidófilos; mesófilos en cuanto a la temperatura a la viven. Los resultados arrojados por el análisis elemental de metales y metaloides indican que la muestra sobrepasa los límites permitidos por la NOM-001-ECOL. Los resultados obtenidos del análisis TRFLP hablan de la poca biodiversidad presente en el sitio de estudio, 15 comunidades con cada una de las enzimas *HinP* 1I y *Hae* III, esto se confirma con el banco de genes, el cual arrojó 13 clonas distintas, las cuales una vez secuenciadas pudieron agruparse en 7 grupos de acuerdo a sus similitudes con organismos ya catalogados (base de datos del NCBI).

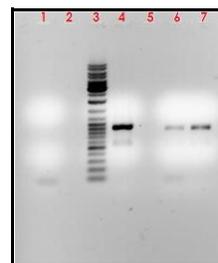


Fig. 1. ADN ribosomal 16 S amplificado por PCR, utilizado para elaborar el banco de genes.

**Conclusiones.** Las comunidades bacterianas formadoras de biopelículas halladas en el sitio de estudio, están compuestas por bacterias de la clase *Chlorobia* y proteobacterias de la clase *alfa*, *beta*, *delta* y *epsilon*.

**Agradecimiento.** Universidad de Guanajuato, SEP-Promep.

**Bibliografía.** (1). Brito E.M, Andrade L.H., Caretta C., Duran R., (2007). Microorganisms Bioprospection: a New Tendency in Microbial Ecology. En: *Leading-Edge Environmental Biodegradation*. Lyman E., Nova Science Publishers, Inc. EUA: ISBN 978-1-60021-903-9,199-222.  
(2). Tsai Y.L., Olson B.H., (1991). *Appl. Environ Microbiol.*57: 1070-1074.  
(3). Bordenave S., Jézéquel R., Fourcans A., Budzinsky H., Merlin F. X., Fourel T., Goñi Urriza M., Guyoneaud R., Grimaud R., Caumette P., Duran R., (2004). *Aquatic Living Resources*, 17: 261 – 267.  
(4). Tamura K., Peterson D., Stecher G., Nei M., Kumar S., (2011), *MEGA* versión 5.