



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



COMPARACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA DETERMINAR DIVERSIDAD Y DINAMICA POBLACIONAL MICROBIANA EN SUELOS TROPICALES CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS.

Jorge Ortiz Maya, Samantha Priego Rangel, Erika Escalante Espinosa, Hugo Ramírez-Saad, Ildefonso J. Díaz-Ramírez. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. División Académica de Ciencias Biológicas.

Lab. de Bioprocesos. Edif. H. Villahermosa, Tabasco, México. C.P. 86039. E-mail: maya368@gmail.com.

Palabras clave: Extracción de ADN, Biorremediación, Bioaumentación.

Introducción. En el análisis de comunidades microbianas nativas del suelo, herramientas moleculares tales como el aislamiento del ADN de muestras del área de estudio, la replicación in vitro de fragmentos específicos y la obtención de perfiles genómicos son esenciales para reducir la escala de trabajo, pudiéndose estudiar la presencia y dinámica poblacional microbiana a través del análisis del ADN metagenómico total del suelo. Sin embargo, tales métodos se ven afectados por diferentes factores (tipo de suelo, materia orgánica, concentración de hidrocarburos), por lo que la estandarización y comparación de diferentes métodos es necesaria para obtener un perfil más completo de los microorganismos del suelo.

El presente trabajo demuestra la aplicación y optimización de diferentes técnicas de extracción y purificación de ADN microbiano de un suelo tropical contaminado con HTP para la obtención de un perfil genómico por PCR y DGGE.

Metodología. Se realizó la extracción de ADN de muestras de suelo artificialmente contaminado con HTP bajo diferentes tratamientos e inoculación con un cultivo mixto definido de bacterias a diferentes concentraciones de hidrocarburos.

Extracción y purificación de ADN de cultivos en medio líquido y de suelo. Se compararon los siguientes métodos: a) *ruptura mecánica por Bead-Beater* (1), y b) *por afinidad ADN-Sílica en suelos y sedimentos* (2). Las muestras obtenidas fueron purificadas mediante kits comerciales: a) *columnas Wizard® DNA Clean-Up System* (PROMEGA), y b) *Quantum Prep Freeze'N Squeeze DNA Gel extraction spin columns* (BIO-RAD).

Amplificación por PCR. Se estandarizó el protocolo de PCR para la amplificación del gen 16S rDNA y su región variable V6-V8 para todas las muestras de suelo (3). Se realizó una curva de concentración de MgCl₂ para todas las muestras, y se visualizaron los productos mediante electroforesis en gel de agarosa (1%).

Resultados. Tanto la extracción de ADN por bead-beater como por sílica resultaron positivas, obteniéndose mayor rendimiento de ADN por bead-beater, mientras que por sílica se obtuvo ADN de alto peso molecular mejor conservado, aunque el rendimiento fue menor (Fig. 1a y 1b). La purificación del ADN se realizó sólo en muestras obtenidas por bead-beater, registrándose mayor recuperación con el kit Wizard® (Fig. 1c). Para confirmar la utilidad de las muestras de ADN obtenidas, se usaron los extractos por bead-beater purificados para la amplificación del gen 16S rDNA y la región variable V6-

V8, obteniéndose la mejor amplificación de todas las muestras. Los extractos obtenidos por sílica tuvieron que ser preparados en diluciones seriadas, obteniéndose un mejor rendimiento de amplificación a mayor dilución y en presencia de mayor concentración de MgCl₂. (Fig. 2).

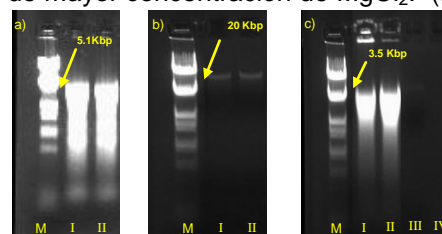


Fig. 1. a) extracción de ADN por Bead-Beater: I.-suelo inoculado, contaminado y bioestimulado (SI-C-B), II.-suelo no inoculado, contaminado y bioestimulado (SNI-C-B); b) extracción de ADN por sílica al 4%: I.-SI-C-B, II.-SNI-C-B; c) purificación de extractos de ADN: I.-SI-C-B y II.-SNI-C-B purificados por columnas; III.-SI-C-B y IV.-SNI-C-B purificados por electroforesis en gel de agarosa. M: marcador molecular Lambda DNA/EcoRI 0.125-21.226 Kbp.

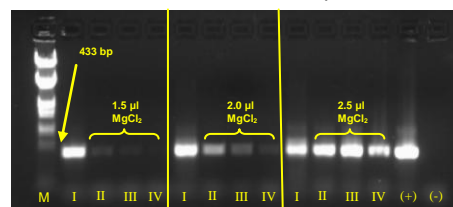


Fig. 2. Estandarización de PCR del gen 16S rDNA - región variable V6-V8 por curva de concentración de MgCl₂. I.- SI-C-B extraído por bead-beater y purificado por kit Wizard. II a IV: SI-C-B extraído por sílica sin purificar, con diluciones seriadas 1/150, 1/250, 1/500. (+): Control positivo (*Bacillus subtilis*); (-): control negativo (agua MQ); M: marcador molecular Lambda DNA/EcoRI 0.125-21.226 Kbp.

Conclusión. La extracción de ADN de suelo por bead-beater demostró ser útil para extraer una mayor cantidad de ADN en comparación con la extracción con sílica, aunque no todas las muestras de suelo presentaron resultados positivos. En contraste, la extracción por sílica fue exitosa en todas las muestras, siendo posible obtener los amplicones requeridos sin necesidad de purificar. Los protocolos establecidos forman parte del análisis de la dinámica de poblaciones en función de diferentes tratamientos de biorremediación.

Agradecimientos. Proyecto financiado por el Programa de Fomento a la Investigación (PFICA) de la UJAT (Proy. No. 20100819).

Bibliografía.

- (1) Aguirre-Garrido, J. F. 2005. Tesis (*Mtro. en Biotec.*). Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. 30 – 32.
- (2) Rojas-Herrera, R., Narváez-Zapata, J., Zamudio-Maya, M., Mena-Martínez, M. E. 2008. *Mol. Bio.* (40): 13 – 17.
- (3) Nakatsu, C. H., Torsvik, V., Ovreas, L. 2000. *Soil Sci. Soc. of A. J.* (64): 1382 - 1388.