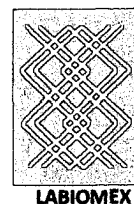


QR105
R58



**FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y DETECCIÓN
MOLECULAR DE BACTERIAS EN AGUAS DE
PRODUCCIÓN DE PETRÓLEO**

Carmen María Rivas Álvarez

Enero de 2014

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)



**FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y DETECCIÓN
MOLECULAR DE BACTERIAS EN AGUAS DE
PRODUCCIÓN DE PETRÓLEO**

**Trabajo Especial de Grado
para optar al título de
MAGISTER SCIENTIAE en BIOLOGÍA MOLECULAR**

Carmen María Rivas Álvarez

Enero de 2014

Tutor: MSc. Jhon Cruz

A Miguel y Víctor
Motivos y esperanzas de mi vida

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX) gracias al apoyo brindado por el Postgrado en Biología Molecular de la ilustre Universidad de Los Andes, ULA y en particular al Dr. Juan Puig Pons, Coordinador del Postgrado, por su receptividad y enseñanzas, así como a los profesores MSc. Jhon Cruz y MSc. Militza Quintero, por su orientación y apoyo incondicional.

Al personal y estudiantes de LABIOMEX, en especial a Marisé Solórzano y Natacha Blanco por su acompañamiento en la secuenciación de ADN, Reinaldo Guzmán y Balbino Perdomo por su valiosa ayuda en el laboratorio y a todos, gracias por el apoyo brindado.

Así mismo, la obtención de las muestras y la ejecución de las evaluaciones microbiológicas se realizaron con el apoyo de la Gerencia Funcional de Ambiente de PDVSA Intevep.

RESUMEN

Debido a la importancia estratégica que representan las operaciones en la Faja Petrolífera del Orinoco para el desarrollo de la nación, en la industria petrolera es fundamental orientar los esfuerzos en la investigación y el desarrollo de tecnologías para la explotación de crudos pesados y extrapesados, para la remediación de ambientes impactados por hidrocarburos y para la preservación de la infraestructura. Estas tecnologías incluyen los procesos biotecnológicos que involucran el uso de bacterias o sus metabolitos.

Uno de los productos de origen biológico mayormente utilizados en las operaciones de la industria petrolera son los biosurfactantes, principalmente del tipo ramnolípido producido a partir de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

A fin de establecer una estrategia para conocer los grupos mayoritarios de bacterias en ambientes relacionados con pozos petroleros y detectar bacterias de interés biotecnológico, se seleccionó un área de estudio modelo de acuerdo a su criticidad por el alto contenido de microorganismos.

Por técnicas basadas en cultivos, se estudiaron las características morfológicas y bioquímicas de las bacterias presentes en el área, su capacidad para formar biopelículas y para producir biosurfactantes. Para la identificación genética de las bacterias se realizó la amplificación por PCR del ADNr 23S, su secuenciación, alineamiento y comparación con las bases de datos disponibles y se diseñó un método basado en huellas moleculares por análisis de restricción de este gen, una metodología molecular que puede ser estandarizada y aplicada de manera rápida y confiable para

detectar los grupos bacterianos mayoritarios que habitan en ambientes de diferentes áreas operacionales de la industria petrolera, tanto para conocer si representan riesgos en la integridad de estructuras y procesos, como para obtener bacterias con uso potencial en procesos biotecnológicos.

La técnica de PCR-RFLP diseñada y usada en este estudio, resultó útil para identificar y diferenciar los grupos mayoritarios de bacterias presentes en ambientes relacionados con la producción de petróleo como son las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*.

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN	4
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
2.2 JUSTIFICACIÓN	5
2.3 ALCANCE	5
2.3 HIPÓTESIS	6
2.4 OBJETIVOS	6
III. MARCO TEÓRICO	8
3.1 ANTECEDENTES	8
3.2 BASES TEÓRICAS	14
3.2.1 La Faja Petrolífera del Orinoco	14
3.2.2 Los biosurfactantes	16
3.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
3.2.4 Las biopelículas	22
3.2.5 La PCR como herramienta para la detección de bacterias en muestras ambientales por técnicas moleculares	27
3.2.6 Identificación de bacterias mediante secuenciación de fragmentos de genes codificantes del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr)	31
3.2.7 Métodos basados en huellas moleculares para el análisis de comunidades bacterianas	37
IV. MARCO METOLÓGICO	42
4.1 Área de estudio	42
4.2 Obtención y procesamiento de las muestras de agua	42
4.3 Detección de bacterias por métodos de siembra	
4.3.1 Determinación de bacterias heterótrofas totales y bacterias productoras de ácido	43
4.3.2 Aislamiento y purificación de bacterias cultivables	43

	Página
4.3.3 Caracterización morfológica y bioquímica de las bacterias aisladas	43
4.3.4 Determinación de la dinámica de crecimiento de las bacterias aisladas, su capacidad para formar biopelículas y producir biosurfactantes	46
4.4 Detección de bacterias presentes en aguas de pozos productores de petróleo por técnicas moleculares	47
4.4.1 Extracción y purificación de ADN bacteriano	48
4.4.2 Diseño de iniciadores para la amplificación	48
4.4.3 Amplificación del gen ADNr 23S	50
4.4.4 Digestión por enzimas de restricción de productos de PCR (PCR-RFLP) de los fragmentos de ADNr 23S	51
4.4.5 Purificación de los amplificados	52
4.4.6 Secuenciación de los fragmentos de ADNr 23S del ADNr 23S	53
4.4.7. Análisis de las secuencias	54
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
5.1 Área de estudio	55
5.2 Parámetros físico químicos de las muestras de agua	56
5.3 Detección de bacterias por métodos de siembra	57
5.3.1 Determinación de bacterias heterótrofas totales y bacterias productoras de ácido	57
5.3.2 Aislamiento y purificación de las bacterias provenientes de las muestras de agua	59
5.3.3 Caracterización celular y bioquímica de las bacterias aisladas	63
5.3.4 Determinación de la dinámica de crecimiento de las bacterias aisladas, su capacidad para formar biopelículas y producir biosurfactantes	68

	Página
5.4 Detección de bacterias presentes en aguas de pozos productores de petróleo por técnicas moleculares	73
5.4.1 Extracción y purificación de ADN bacteriano	73
5.4.2 Diseño de iniciadores para la amplificación del ADNr 23S	74
5.4.3 Amplificación del gen ADNr 23S	77
5.4.4 Digestión por enzimas de restricción de productos de PCR (PCR-RFLP) de los fragmentos de ADNr 23S	79
5.4.5 Identificación de los aislados bacterianos por secuenciación y análisis de los ADNr 23S	82
VI CONCLUSIONES	87
VII RECOMENDACIONES	88
VIII. BIBLIOGRAFÍA	89
ANEXOS	96

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Faja Petrolífera del Orinoco	15
Figura 2. Estructura molecular de los biosurfactantes de tipo ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
Figura 3. Modelo representativo de los genes requeridos para la producción de ramnolípidos en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y su regulación	21
Figura 4. Resumen de los factores involucrados directa o indirectamente en la regulación génica de la producción del ramnolípidos	22
Figura 5. Etapas de la formación de biopelículas	26
Figura 6. Estructura esquemática de un operón <i>rrn</i> con los genes que codifican los ARNr 16S, 23S y 5S	32
Figura 7. Esquema de escisión de los ARNr a partir de su precursor 30S	33
Figura 8. Cambios de color de la galería de prueba API 20 E®.	44
Figura 9. La faja Petrolífera del Orinoco	55
Figura 10. Determinación de bacterias productoras de ácido en las muestras evaluadas	58
Figura 11. Aspecto del morfotipo 1	60
Figura 12. Aspecto del morfotipo 2	61
Figura 13. Aspecto del morfotipo 3	61
Figura 14. Aspecto del morfotipo 4	62
Figura 15. Aspecto del morfotipo 5	62
Figura 16. Aspecto del morfotipo 6	63
Figura 17. Aspecto de la galería antes de incubar	65
Figura 18. Aspecto de la galería con algunos resultados positivos	66

	Página
Figura 19. Aspecto de la emulsión formada en comparación con la muestra sin emulsificar	69
Figura 20. Crecimiento de las bacterias aisladas de la muestra de agua Carabobo	70
Figura 21. Crecimiento de las bacterias aisladas de la muestra de agua Ayacucho	70
Figura 22. Crecimiento de las bacterias aisladas de la muestra de agua Junín	71
Figura 23. Crecimiento de las bacterias aisladas de la muestra de agua Boyacá	71
Figura 24. Capacidad de las bacterias aisladas para formar biopelículas	72
Figura 25. Análisis virtual de la eficiencia de los iniciadores con diseño propio por la herramienta bioinformática SILVA	75
Figura 26. Resultado del análisis virtual de la eficiencia de los iniciadores diseñados por la herramienta bioinformática SILVA	75
Figura 27. Análisis virtual de la eficiencia de los iniciadores seleccionados (Kotilainen y col., 1998) por la herramienta bioinformática SILVA	76
Figura 28. Resultado del análisis virtual de la eficiencia de los iniciadores seleccionados (Kotilainen y col., 1998) por la herramienta bioinformática SILVA	76
Figura 29. Amplificados de ADNr 23 S de muestras de referencia en gel de poliacrilamida 19:1	77
Figura 30. Amplificados de ADNr 23 S de los aislados en gel de poliacrilamida 19:1	78
Figura 31. Huella molecular de las muestras de referencia digeridas con la enzima HpyCH4V en gel de poliacrilamida 29:1	81
Figura 32. Huella molecular de las muestras de referencia digeridas con la enzima HpyCH4V en gel de poliacrilamida 29:1	82

	Página
Figura 33. Geles preparativos en agarosa 1,5 % de las muestras de referencia	83
Figura34. Árbol filogenético basado en el alineamiento múltiple por el método Neighbor-Joining de secuencias parciales del ADNr 23S de las especies encontradas	85

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de Biosurfactantes	17
Tabla 2. Lectura de la galería de prueba API 20 E®	45
Tabla 3. Lista de iniciadores analizados virtualmente	50
Tabla 4. Sitio de corte en el ADN de la enzima de restricción seleccionada	52
Tabla 5. Pozos de la FPO en los cuales se tomaron las muestras de agua para la evaluación	55
Tabla 6. Parámetros físico químicos de las muestras de agua en estudio	56
Tabla 7. Contenido de bacterias en las muestras evaluadas	58
Tabla 8. Descripción de los morfotipos bacterianos	60
Tabla 9. Morfología celular de los aislados y tinción de Gram	64
Tabla 10. Resultados de la lectura de la galería API 20 E® correspondiente a cada uno de los aislados	65
Tabla 11. Identificación de las bacterias aisladas con el kit API 20E®	67
Tabla 12. Resultados de la prueba de emulsificación en mezclas de sobrenadante libre de células y querosén	68
Tabla 13. Índice de formación de biopelículas (IFB)	72
Tabla 14. Concentración y pureza de los ADN bacterianos	73
Tabla 15. Fragmentos obtenidos en la digestión virtual del ADNr 23S de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	79
Tabla 16. Fragmentos obtenidos en la digestión virtual del ADNr 23S de <i>Pseudomonas putida</i>	79
Tabla 17. Fragmentos obtenidos en la digestión virtual del ADNr 23S de <i>Pseudomonas huttiense</i>	80
Tabla 18. Fragmentos obtenidos en la digestión virtual del ADNr 23S de <i>Bacillus liqueniformis</i>	80

	Página
Tabla 19. Fragmentos obtenidos en la digestión virtual del ADNr 23S de <i>Bacillus subtilis</i>	80
Tabla 20. Identificación de los aislados bacterianos mediante el análisis de las secuencias de ADNr 23S	84

www.bdigital.ula.ve

ABREVIATURAS

FPO: Faja Petrolífera del Orinoco

MEOR: recuperación mejorada de crudos con el uso de microorganismos

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

Pol: ADN Polimerasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ADNr: ácido desoxirribonucleico ribosomal

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal

S: Svedbergs

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos

EMBL: Laboratorio Europeo de Biología Molecular

RDP: Base de datos de secuencias de ADNr

RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

ARDRA: Análisis de restricción de ARNr

RAPD: ADN polimórfico amplificado al azar

rpm: revoluciones por minuto

UFC: Unidades Formadoras de colonias

SPE: Sustancia polimérica extracelular

ml: mililitro

g: gramo

s: segundo

min: minuto

μM: micro molar

μg: micro gramo

ng: nano gramo

nm: nanometro

I. INTRODUCCIÓN

La Faja Petrolífera del Orinoco (FPO) posee una indiscutible importancia estratégica para la nación, ya que en ella se encuentra la mayor reserva de hidrocarburos del mundo y a través de la renta petrolera, el Gobierno Bolivariano impulsa importantes proyectos sociales, educativos, económicos y de salud que benefician al pueblo venezolano.

El uso de microorganismos es considerado como una de las opciones tecnológicas orientadas al incremento del recobro en estos reservorios, a su mejoramiento en función de facilitar los procesos de transporte en superficie o a la protección de la infraestructura por daños de origen biológico.

Los microorganismos presentes en los yacimientos, son responsables de transformar carbono y nitrógeno a partir de matrices complejas de hidrocarburos y se han adaptado a condiciones extremas de vida. El desarrollo de procesos tecnológicos con el uso de este tipo de microorganismos puede proporcionar soluciones a las necesidades de operación antes descritas.

Adicionalmente, el aumento de la conciencia pública sobre la contaminación ambiental influye en la búsqueda y el desarrollo de tecnologías que ayudan en la limpieza de contaminantes orgánicos e inorgánicos en áreas impactadas por hidrocarburos como consecuencia de los procesos de explotación de crudos. Un método alternativo y ecológico en tecnologías de remediación de ambientes contaminados con estos compuestos es el uso de biosurfactantes o de microorganismos que lo producen.

Los biosurfactantes son un grupo estructuralmente diverso de moléculas tenso activas sintetizadas biológicamente con una amplia variedad de aplicaciones industriales y biotecnológicas. Estas moléculas

reducen las tensiones superficial e interfacial tanto en soluciones acuosas como en mezclas de hidrocarburos, convirtiéndolas en candidatas potenciales para participar en distintos procesos aplicables en la industria petrolera, tales como, recuperación mejorada de crudos con el uso de microorganismos (MEOR por sus siglas en inglés), biorremediación de ambientes impactados con hidrocarburos o formulación de emulsiones.

Los biosurfactantes de tipo ramnolípido son los más utilizados en aplicaciones industriales. Se conocen los genes estructurales y los mecanismos regulatorios que controlan la producción de ramnolípidos a partir de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. La producción de biosurfactante de tipo ramnolípido ocurre bajo condiciones limitantes de nitrógeno y de hierro. La función está codificada por los genes *rhIA* y *rhIB*, organizados en un operón que está agrupado con los genes *rhIR* y *rhII*, los cuales regulan la transcripción de los genes *rhl* a través de una compleja red genética de señales de célula a célula denominada autoinducción o detección de quórum (*Quorum Sensing*) que es un mecanismo de control de expresiones genéticas dependiente de la densidad celular. Adicionalmente, la formación de biopelículas se encuentra estrechamente relacionada con la producción de biosurfactantes y por ende con el *Quorum Sensing*.

Para conocer los microorganismos presentes en un área determinada e involucrados en los procesos antes descritos, se emplean distintos métodos que comprenden técnicas microbiológicas de cultivo y técnicas basadas en biología molecular. Uno de los métodos moleculares usados para la identificación de especies bacterianas es la comparación de las secuencias de los ARNr 23S (o del gen que lo codifica, ADNr 23S) y a partir de las secuencias obtenidas se pueden establecer las relaciones filogenéticas entre los distintos organismos existentes en una comunidad.

En este estudio, las bacterias presentes en muestras de agua de producción provenientes de la FPO se caracterizaron siguiendo pruebas

bioquímicas, de acuerdo a su dinámica de crecimiento y por su capacidad para formar biopelículas y generar metabolitos de interés para la industria petrolera como son los biosurfactantes. La identificación bacteriana se realizó mediante la amplificación por PCR del ADNr 23S, su secuenciación, alineamiento y comparación con las bases de datos disponibles y se determinó la relación filogenética de las especies encontradas.

Se desarrolló una metodología de biología molecular basada huellas moleculares por análisis de restricción del ADNr 23S (ARDRA) para detectar los grupos mayoritarios de bacterias que habitan en ambientes relacionados con pozos de petróleo. La metodología desarrollada puede ser estandarizada para su aplicación en diferentes áreas operacionales de la industria petrolera a fin de conocer las poblaciones de bacterias existentes en esos ambientes o seleccionar bacterias para usos biotecnológicos.

www.bdigital.ula.ve

II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, en la caracterización de muestras provenientes de las áreas operativas de la industria petrolera venezolana, se utilizan técnicas de cultivo para detección de grupos bacterianos específicos en estudios de diagnóstico de problemáticas ambientales. Estos son métodos indirectos en los cuales se detecta el tipo de metabolismo celular involucrado pero no se llega a la detección del microorganismo o la identificación de su especie. Sin embargo, en muchos casos es necesario conocer las especies presentes en el proceso.

En este trabajo, con la finalidad de conocer la población bacteriana de ambientes relacionados con pozos petroleros, se seleccionó un área de estudio modelo, se estableció una estrategia basada en métodos clásicos de cultivo para conocer las bacterias involucradas, su dinámica de crecimiento, su capacidad para formar biopelículas y para producir biosurfactantes y métodos de biología molecular para la identificación de las especies bacterianas.

Se desarrolló una metodología molecular que incluye una técnica molecular ARDRA, el análisis de restricción del ADNr 23S, que puede ser aplicada de manera rápida y confiable para detectar los grupos mayoritarios que habitan en estos ambientes.

2.2 JUSTIFICACIÓN

En la industria petrolera venezolana, dentro los procedimientos estándar aplicados en evaluaciones ambientales, se dispone de metodologías para estimar el contenido de bacterias en muestras de distinta naturaleza como agua, suelo o combustibles. Estos métodos son útiles para detectar la presencia de bacterias en el sitio y para la toma inmediata de decisiones operacionales pero no es posible conocer las especies involucradas en los procesos ni sus interacciones.

Las técnicas basadas en la PCR junto con métodos post PCR como los análisis de restricción del ADNr 23S permiten conocer e identificar especies bacterianas en un ambiente determinado y, soportados con técnicas clásicas de cultivo, ayudan a comprender la dinámica de la comunidad en la cual se desarrollan. La ventaja de estos métodos es que permiten una visión directa de la composición comparativa y la diversidad de la microbiota dominante.

En este estudio, se obtiene información que ayuda a comprender como interaccionan las bacterias con su ambiente y cómo ambos cambian debido a estas interacciones. La metodología que se desarrolló puede ser estandarizada para su aplicación en diferentes áreas operacionales de la industria petrolera.

2.3 ALCANCE

El estudio se lleva a cabo con muestras de agua de producción de crudos pesados y extra pesados de la FPO. Las bacterias presentes en muestras de agua de producción de petróleo son cuantificadas, caracterizadas bioquímicamente y evaluadas por su capacidad para producir biosurfactantes y formar biopelículas. Posteriormente son identificadas por técnicas moleculares mediante la amplificación, secuenciación y análisis de

las secuencias obtenidas del ADNr 23S. Se desarrolla una metodología de biología molecular basada en la técnica de ARDRA para detectar los grupos mayoritarios de bacterias que habitan en ambientes relacionados con pozos de petróleo.

2.3 HIPÓTESIS

Si se desarrolla una metodología de biología molecular basada en técnicas de análisis de restricción de fragmentos amplificados por PCR del ADNr 23S, se facilitaría la identificación de los grupos mayoritarios de bacterias encontradas en un ambiente determinado y, esta metodología acompañada con técnicas dependientes de cultivo, nos permitiría detectar la presencia de bacterias productoras de biosurfactantes, involucradas en procesos relacionados con la industria petrolera como son la biodegradación de hidrocarburos, la recuperación mejorada de crudos, la biorremediación de ambientes contaminados o la formación e inhibición de biopelículas en tuberías.

2.4 OBJETIVOS

2.4.1 Objetivo general

Identificar los grupos mayoritarios de las bacterias presentes en muestras de agua de producción de petróleo mediante la amplificación, secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas del ADNr 23S, así como, por análisis de restricción del mismo gen y complementar los resultados con estudios microbiológicos por métodos dependientes de cultivo para la detección de bacterias productoras de biosurfactantes, metabolito fundamental en los procesos de biodegradación de hidrocarburos, la recuperación mejorada de crudos, la biorremediación de ambientes contaminados o la formación e inhibición de biopelículas en tuberías.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 ANTECEDENTES

Los antecedentes de este trabajo se basan en algunas investigaciones de interés sobre microorganismos productores de biosurfactantes, el uso de los mismos en procesos de degradación y recuperación mejorada de crudos, la correlación entre la producción de biosurfactantes, la formación de biopelículas y la degradación de hidrocarburos; estudios del sistema de regulación de la producción de biosurfactantes y, la detección molecular de las bacterias productoras de biosurfactantes.

Los microorganismos que actúan en comunidades complejas en los ciclos geoquímicos, son responsables de transformar carbono y nitrógeno a partir de matrices complejas de hidrocarburo y se han adaptado a condiciones extremas de vida. Las tecnologías aplicadas a los procesos de producción de petróleo con el uso de este tipo de microorganismos pueden proporcionar soluciones a las necesidades de mejoramiento de crudo, ya que no requieren el consumo de hidrógeno y producen mucho menos dióxido de carbono que los procesos termoquímicos (Kilbane, 2006).

Sin embargo, con frecuencia se presentan otros problemas en las instalaciones de producción de petróleo como la precipitación de las fracciones pesadas de los crudos, que puede ocasionar cambios en la composición de sus fracciones parafínicas y, como consecuencia, taponamientos en las tuberías durante su transporte. Por lo tanto, es necesario desarrollar tecnologías que permitan el manejo de los crudos en condiciones operacionales y que minimicen o eviten estos problemas. Convencionalmente se usan compuestos químicos con actividad emulsificante, pero el uso de productos de origen biológico es una alternativa a considerar. En este sentido, Etoumi, en el año 2007, publicó los resultados

de estudios sobre el uso de bacterias productoras de biosurfactantes con capacidad emulsificante de crudos. Las cepas productoras se aislaron de sedimentos marinos impactados por hidrocarburos. Los análisis por cromatografía de gases de los crudos tratados con estas bacterias mostraron una disminución de las fracciones pesadas de hidrocarburos e incremento de fracciones más livianas entre C₁₅ - C₂₀.

En cuanto a los procesos MEOR, las bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Clostridium* se han usado con frecuencia por su capacidad para soportar las condiciones del yacimiento, debido a que forman esporas que les permite permanecer latentes hasta encontrar las condiciones favorables para crecer y generar los metabolitos de interés en estos procesos. También son de interés las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* por su capacidad para producir agentes tensoactivos, gases, alcoholes, disolventes y, a veces polímeros. (Bonell, 2008).

Por su parte, las biopelículas se forman en las tuberías de los sistemas de distribución cuando las células microbianas se adhieren a las superficies y se multiplican para formar una capa de limo, que son microambientes dinámicos con procesos de metabolismo, crecimiento y formación de productos. La tasa de formación de las biopelículas depende de las propiedades fisicoquímicas de la interfase, de la rugosidad de la superficie y de los factores fisiológicos de los microorganismos fijados (De Sousa, 2008).

Por otro lado, Hasanshahian y Emtiazi, el el año 2008, realizaron un estudio de correlación entre la producción de biosurfactantes, formación de biopelículas y degradación de crudos por bacterias aisladas de un medio ambiente marino de seis lugares diferentes en el Golfo Pérsico. Seleccionaron 25 bacterias de las cuales el 83 % eran degradadoras de petróleo. Las cepas CS-2 (*Pseudomonas*) BC, PG-5 (*Rhodococcus*) y H (*Bacillus*) mostraron adherencias en un 30%, 46%, 10% y 1%

respectivamente. La cepa H presentó una baja producción de biosurfactante y formación de biopelículas, también mostró el menor crecimiento en crudos. El análisis por PCR de estas cuatro cepas mostró que todos los aislados poseen el gen para la enzima alcano hidroxilasa. Todos los aislados pudieron utilizar ciclohexano, octano, hexadecano, octadecano y aceite combustible diesel, sin embargo, el ensayo de microtitulación en placa mostró que la cepa BC mostró el mayor crecimiento en octadecano y mayor formación de biopelículas.

Posteriormente Arutchelvi y col. en el año 2011, estudiaron el efecto de biosurfactantes ramnolípidos durante la formación de biopelículas por la bacteria CPLC de *Pseudomonas aeruginosa* en superficies de polipropileno. Esta cepa produce una mezcla de biosurfactantes de tipo ramnolípidos. Los autores optimizaron las condiciones nutricionales y ambientales necesarias para la producción del ramnolípidos y su participación en la formación de la biopelícula sobre la superficie de polipropileno. Encontraron que se requiere pH ácido y temperaturas inferiores a los 35°C, así como, una velocidad de rotación del fluido superior a 200 rpm para la fijación de ramnolípidos en la superficie de polipropileno y la formación de biopelículas. El estudio se enfocó en el uso de las biopelículas en procesos de biorremediación.

Los estudios para la comprensión del sistema de regulación de la producción de biosurfactantes en *Pseudomonas aeruginosa* se iniciaron desde hace más de dos décadas, cuando en 1994, Ochsner y col. demostraron su relación con los sistemas *las* y *rhl* que regulan la expresión de factores de virulencia. Indicaron que los genes *lasR* y *rhlR* codifican para las proteínas regulatorias LasR y RhIR respectivamente. Los genes *lasI* y *rhlI* codifican para dos sintetisas que catalizan la síntesis de sus respectivos autoinductores: N-(3-oxododecanoil) homoserina lactona (3OC12HSL); y N-butil homoserina lactona (C4HSL). LasR interactúa con 3OC12HSL mientras que RhIR lo hace con C4HSL. El complejo formado por LasR/3OC12HSL promueve la expresión de genes para la producción de

elastasas y proteasas. El complejo RhIR/C4HSL activa la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de ramnolípidos, sin embargo en algunos casos RhIR puede reprimir la expresión cuando no se encuentra unido a su autoinductor. *Pseudomonas aeruginosa* sólo produce ramnolípidos en ciertos medios de cultivo, cuando hay una limitación de nutrientes

Por su parte En el año 2008 Cha y col. confirmaron que la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* contiene los reguladores de transcripción LasR y RhIR con sus respectivos autoinductores y estudiaron la regulación transcripcional dependiente de RhIR del operón *rhIAB*, que codifica la ramnosiltransferasa, la enzima implicada en la síntesis del agente tensoactivo monoramnolípido. Demostraron que RhIR se une a una secuencia específica en la región regulatoria *rhIAB*, tanto en presencia como en ausencia de su autoinductor. Los datos sugieren que en el primer caso se activa la transcripción, mientras que en el segundo actúa como un represor transcripcional de este promotor. Al parecer, RhIR reprime la transcripción de otros genes reguladores de sistemas de comunicación entre células o *Quorum Sensing*, por lo que la actividad represora de RhIR podría ser de importancia en la expresión asociada a los factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* es un agente patógeno oportunista. Por esta razón, Desai y Banat en 1997 lograron la producción heteróloga del biosurfactante por la cepa de *Pseudomonas putida* 1067, considerada como una bacteria cuya manipulación se realiza en condiciones seguras ya que no produce factores de virulencia ni de patogenicidad. Esta condición se logró mediante la clonación molecular de los genes *rhIAB* para la ramnosiltransferasa con el sistema *Quorum Sensing rhIRI*.

Los estudios para la detección de microorganismos de interés en procesos biotecnológicos, así como la comprensión de la dinámica poblacional microbiana en evaluaciones ambientales requieren de la

disponibilidad de métodos moleculares novedosos y avanzados. En este sentido, Van Elsas, en el año 2011 sostuvo que los métodos basados en ácidos nucleicos han revolucionado los estudios de la microbiota ambiental, en particular, la comprensión de la diversidad, funcionalidad y las interacciones microbianas. El autor afirmó que para investigar hipótesis comprobables se necesita un enfoque polifásico basado en metodologías moleculares tales como metagenómica y metatranscriptómica de organismos cultivables y no cultivables. Así, los avances en el conocimiento del funcionamiento y la adaptación de especies bacterianas a su ambiente se fortalecen por métodos combinados de estas técnicas moleculares con enfoques basados en métodos de cultivo.

La identificación molecular de bacterias, basada en la amplificación del gen que codifica los ARNr 16S, o ARNr 23S, su secuenciación y posterior análisis de secuencias se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo. La amplificación del gen, para su posterior secuenciación, parte preferentemente de ADN extraído de un cultivo puro de la bacteria, pero también puede conseguirse directamente de la muestra a evaluar (Rodicio y Mendoza, 2004).

Yilmaz y col., en el año 2011, compararon las secuencias de los ARNr 23S con las del ARNr 16S a partir de 80 muestras metagenómicas tomadas en uno de los estudios más grandes y que cubrió la mayor área geográfica hasta la fecha, la Expedición Global de Muestreo del Océano (GOS). En el estudio, estos autores obtuvieron secuencias de ARNr 23S que resultaron ser alrededor de 100 pb más largas que las secuencias de ARNr16S. Con ambas secuencias encontraron resultados similares de abundancia relativa, sin embargo, las secuencias de ARNr 16S ofrecieron una mayor resolución taxonómica debido a que sus bases de datos son más amplias.

Una de las aplicaciones de los estudios de dinámica poblacional bacteriana es la evaluación de los efectos de compuestos tóxicos en el ambiente. Los compuestos tóxicos pueden interferir con la constitución genética de las poblaciones, ya sea directamente a través de la actividad mutagénica o indirectamente a través de procesos mediados por la población. Estos procesos se inician cuando los compuestos tóxicos reducen la supervivencia o la fecundidad de los organismos expuestos. En este sentido, De Wolf y col. en el año 2004, publicaron una revisión sobre el uso de la técnica de análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD por sus siglas en inglés) aplicado en el contexto ecotoxicológico y proporcionaron información de rutas directas e indirectas a través de las cuales las sustancias tóxicas pueden afectar a la estructura genética de las poblaciones.

Estos autores señalan que, en condiciones estrictamente estandarizadas, la técnica RAPD puede ser una herramienta útil para el estudio de los efectos genéticos provocados por sustancias tóxicas en una población, sobre todo porque esta técnica proporciona información acerca de un gran número de loci a bajo costo y sin tener que obtener datos de la secuencia para su diseño, sin embargo, en la actualidad sólo una pequeña fracción de su potencial se utiliza en ecotoxicología.

También sugieren que se debe aplicar herramientas y parámetros estadísticos en las investigaciones ecotoxicológicas con el fin de explotar plenamente el potencial de esta técnica y añaden que debido a su naturaleza aleatoria, los datos de RAPD deben ser considerados como preliminares y complementados con otros estudios genéticos como la clonación, la secuenciación y las técnicas de huellas moleculares.

En Venezuela, un grupo de investigadores del área de Energía y Ambiente del Instituto de Estudios avanzados (IDEA) han realizado estudios de caracterización funcional y molecular de comunidades bacterianas

cultivables asociadas a rios de perforación mezclados con fluidos de perforación base agua, con la finalidad de identificar potenciales biocatalizadores que puedan ser empleados en procesos de biorremediación de la FPO.

Los resultados de esos estudios fueron publicados en el año 2009 por León y col. En el mismo, los autores indican que aislaron y caracterizaron morfológica y bioquímicamente 88 cepas bacterianas. Posteriormente diferenciaron las cepas mediante análisis de agrupamiento de acuerdo a su actividad funcional. El 100% de las bacterias estudiadas resultaron ser Gram negativas y el 71,25% del tipo coco bastones. Las pruebas bioquímicas y el análisis funcional permitieron identificar 66 grupos funcionales y 14 grupos de identidad funcional.

Estos autores también realizaron estudios moleculares mediante la técnica de huella de ADN ERIC-PCR indicando la existencia de 14 grupos de bacterias genotípicamente diferentes, con alta capacidad hidrocarburoclástica y de producción de biosurfactantes. Estos resultados revelaron que las bacterias aisladas pertenecen a cinco (5) géneros diferentes: Enterobacter (6; 50%), Pantoea (2; 14,29%), Citrobacter (2; 14,29%), Klebsiella (2; 14,29%) y Comamonas (1; 7,14%). El 92,86% corresponde a la familia Enterobacteriaceae, clase gamma-proteobacterias, frecuentemente asociada a ambientes contaminados con hidrocarburos.

3.2 BASES TEÓRICAS

3.2.1 La Faja Petrolífera del Orinoco

La FPO es la fuente de reservas de hidrocarburos líquidos más grande del mundo, comprende una extensión de 55.314 km² y un área de explotación actual de 11.593 km², ubicada al sur de los estados Guárico, Anzoátegui y Monagas de la República Bolivariana de Venezuela (Figura 1).

Este gran reservorio petrolero fue dividido en cuatro grandes áreas, siendo éstas de oeste a este: Boyacá, Junín, Ayacucho y Carabobo, y a su vez segmentado en 29 bloques de 500 km² cada uno aproximadamente (PDVSA, 2010).

De acuerdo con el Oficio N° 1.036 de junio de 2005, el Ministerio del Poder Popular para la Energía y Petróleo asignó a la Corporación Venezolana del Petróleo (CVP) el Proyecto Magna Reserva para cuantificar y certificar las reservas de la FPO. El lineamiento estratégico establecido, persigue el propósito de convertirla en un eje impulsor del desarrollo económico, social, industrial, tecnológico y sustentable del país, mediante la valorización y desarrollo óptimo de sus recursos de hidrocarburos, dentro del marco legal vigente y el plan de desarrollo de la nación (PDVSA 2010).

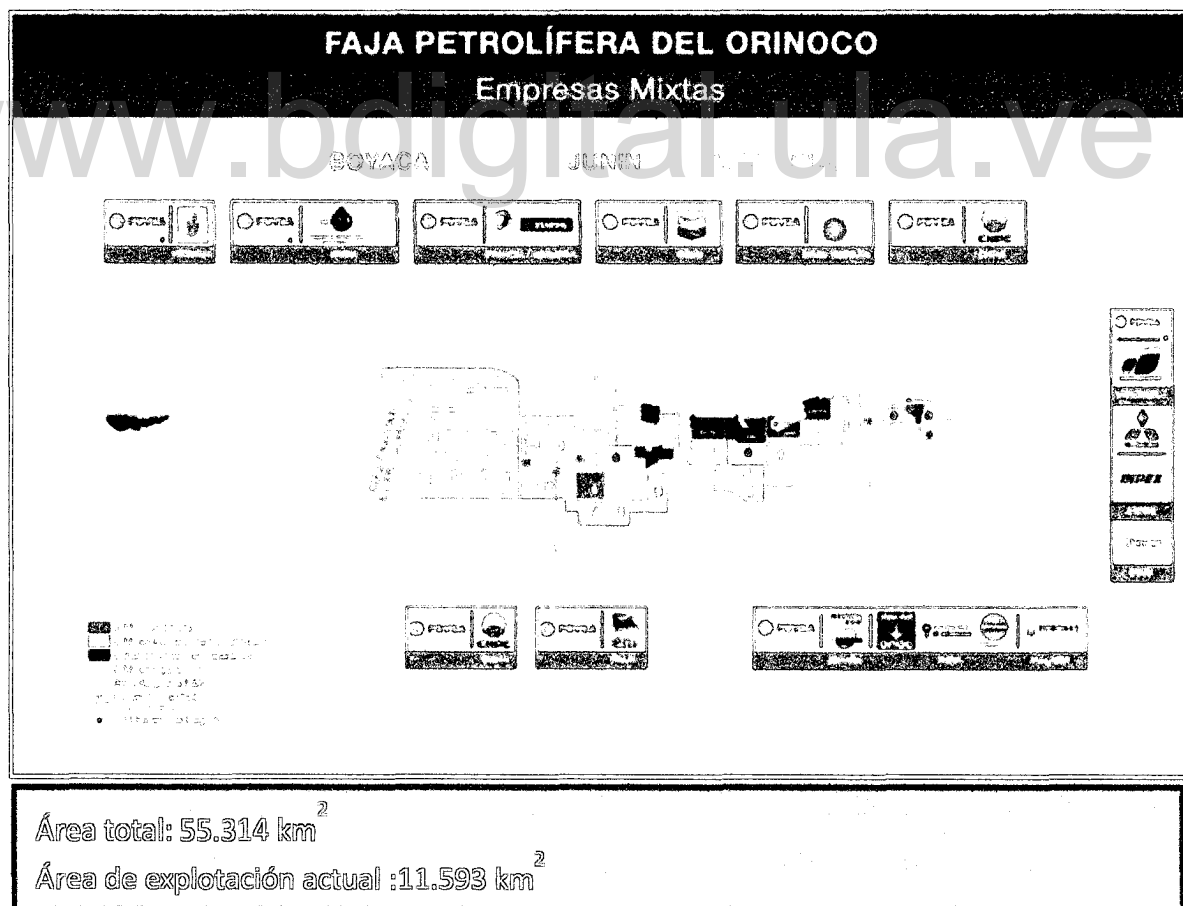


Figura 1. Faja Petrolífera del Orinoco. Fuente: <http://www.pdvsa.com>

En la actualidad, el sector del petróleo enfrenta la disminución de las reservas, precios variables del crudo, el aumento en la demanda de combustibles limpios y una normativa internacional cada vez más estricta en la conservación del ambiente. Con el fin de mejorar la calidad de los crudos, lubricantes y combustibles para aumentar su eficiencia y disminuir el impacto ambiental, se desarrollan procesos biotecnológicos aplicados a la industria del petróleo, como opciones complementarias para la solución a los problemas mencionados anteriormente, los cuales persistirán y se intensificarán en los próximos años (Bonell, 2008).

3.2.2 Los biosurfactantes

Son compuestos anfifílicos, es decir, poseen tanto características hidrofóbicas como hidrofílicas; con actividad tenso activa producidos por una gran variedad de microorganismos. Se producen en la superficie celular o son excretados al medio. Estas características les confieren la capacidad para reducir la tensión superficial de sustancias líquidas inmiscibles. El grupo hidrófilo se compone de oligopolisacáridos, péptidos o proteínas y el resto hidrófobo por lo general contiene ácidos grasos saturados o insaturados y alcoholes hidroxilados. Un rasgo característico de los biosurfactantes es el balance hidrófilo-lipófilo (HLB, por sus siglas en inglés) que especifica la porción de los constituyentes hidrófilo e hidrófobo de las sustancias tensoactivas (Desai y Banat, 1997).

Los Biosurfactantes son clasificados según su composición química y origen microbiano (Tabla 1). En general su estructura la conforma un componente hidrofílico que consiste de aminoácidos o péptidos aniónicos o catiónicos, mono, di o polisacáridos y un componente hidrofóbico que consiste de ácidos grasos saturados o insaturados. De acuerdo a esto, los biosurfactantes incluyen glicolípidos, lipopéptidos y lipoproteínas, fosfolípidos y ácidos grasos, surfactantes poliméricos y surfactantes particulados (Ramana y Karanth, 1989).

Tabla 1. Clasificación de Biosurfactantes

Biosurfactante		Microorganismo
Glicolípidos	Ramnolípido	<i>Pseudomonas</i> sp <i>P. aeruginosa</i>
	Trehalolípidos	<i>R. erythropolis</i> <i>N. erythropolis</i>
	Soforolípidos	<i>Mycobacterium</i> sp <i>T. bombicola</i> <i>T. apicola</i> <i>T. petrophilum</i>
	Celobiolípidos	<i>U. zeae</i> <i>U. maydis</i>
	Lipopéptido	<i>B. licheniformis</i>
Lipopéptidos y lipoproteínas	Serrawetina	<i>S. marcescens</i>
	Viscosina	<i>P. fluorescens</i>
	Surfactina	<i>B. subtilis</i>
	Subtilisina	<i>B. subtilis</i>
	Gramicidina	<i>B. brevis</i>
Ácidos grasos, Lípidos neutros y Fosfolípidos	Polimixina	<i>B. polymyxa</i>
	Ácidos grasos	<i>C. lepus</i>
	Lípidos neutros	<i>N. erythropolis</i>
	Fosfolípidos	<i>T. thiooxidans</i>
	Emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>
Surfactantes poliméricos	Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>
	Mannan-lípido-proteína	<i>C. tropicalis</i>
	Liposan	<i>C. lipolitica</i>
Biosurfactantes particulados	Carbohidrato-proteína-lípido	<i>P. fluorescens</i> <i>D. polymorphis</i>
	Proteína PA	<i>P. aeruginosa</i>
	Vesículas	<i>A. calcoaceticus</i>
	Células enteras	<i>Bacterias varias</i>

Fuente: Desai y Banat, 1997

Los biosurfactantes de mayor interés en la industria petrolera, debido a la facilidad para su obtención como sus múltiples aplicaciones, son los

ramnolípidos, del tipo glicolípidos. Los glicolípidos son carbohidratos en combinación con cadenas largas de ácidos alifáticos o hidroxialifáticos. Los ramnolípidos contienen una o dos moléculas de ramnosa unidas a una o dos moléculas de ácido β -hidroxidecanoico (Figura 2). La unión de las moléculas de ramnosa al ácido β -hidroxidecanoico es realizada por la enzima ramnosiltransferasa (Desai y Banat, 1997).

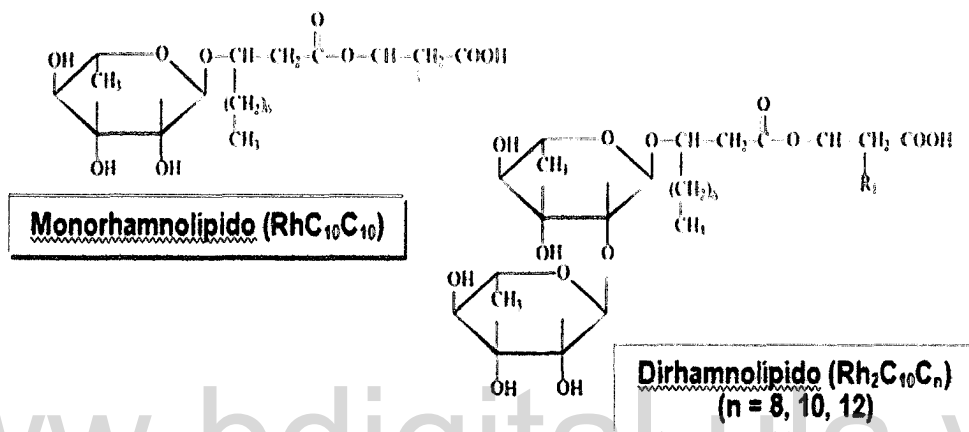


Figura 2. Estructura molecular de los biosurfactantes de tipo ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Fuente: Desai y Banat, 1997

El uso de biosurfactantes ofrece ventajas en relación con los surfactantes químicos debido a su alta biodegradabilidad, baja toxicidad para la mayoría de los procesos donde pueden ser aplicados, producción aceptablemente económica, factibilidad de producción a partir de materiales o sustancias de desecho, biocompatibilidad y digestibilidad, lo que les confiere una gama de aplicación bastante amplia. En la industria petrolera, los biosurfactantes tienen diferentes aplicaciones biotecnológicas potenciales orientadas principalmente a procesos de biotratamientos para la remoción de compuestos tóxicos de suelos y efluentes y, en la limpieza de tanques y tuberías (Desai y Banat, 1997).

Hay que destacar que los suelos y aguas contaminadas con compuestos resistentes a las transformaciones biológicas son difícilmente recuperables y la vía del biotratamiento no aplica en estos casos, sin embargo, el uso de biosurfactantes resulta atractivo por facilitar los procesos de transformación de compuestos contaminantes o tóxicos en los casos donde aplica (Pacwa-Płociniczak, 2011). De esta manera, los biosurfactantes se usan para dispersar los contaminantes, aumentando así su área superficial y facilitando los procesos de biodegradación. El pretratamiento de suelos con un biosurfactante solubiliza compuestos como hidrocarburos poliaromáticos y aumenta la biodegradación de éstos contaminantes. La mayoría de los estudios *in situ* a escala piloto utilizan biosurfactantes junto con solventes (Singh y Tripathi, 2013).

Numerosos estudios de laboratorio indican que los biosurfactantes incrementan el recobro de hidrocarburos y la remoción de metales como cobre, cadmio y zinc. Los biosurfactantes más utilizados en procesos MEOR se producen a partir de cepas bacterianas obtenidas de muestras de suelos y de los yacimientos de petróleo, ya que éstas bacterias resisten a condiciones extremas como las altas temperaturas, presión y concentración de sales (Banat, 1993).

3.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Es una bacteria Gram negativa que pertenece al grupo de las γ -proteobacterias que tiene una amplia distribución en la naturaleza pero es particularmente importante en las poblaciones bacterianas degradadoras de hidrocarburos en ambientes impactados. En el área de la salud pública, podría representar un problema para individuos cuyo sistema inmune se encuentra comprometido ya que es un patógeno oportunista, produce una serie de componentes exógenos y enzimas hidrolíticas que contribuyen en su patogénesis denominados factores de virulencia. Éstos se producen durante la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria, su expresión está

acompañada por la producción de sustancias tenso activas y depende de una respuesta conjunta y eficaz para la colonización del huésped (Soberón, 2009).

La regulación genética de la producción de biosurfactantes en *P. aeruginosa* ha sido estudiada desde hace más de dos décadas. Se conoce que gran parte de los elementos que participan en la virulencia de esta bacteria, se encuentran regulados a nivel de transcripción a través del sistema de respuestas de *Quorum Sensing*. Este mecanismo se caracteriza por la presencia de dos proteínas reguladoras, LasR y RhIR, que modulan su actividad transcripcional cuando interaccionan con los autoinductores 3OC12HSL y C4HSL respectivamente. Los complejos LasR/3OC12HSL y RhIR/C4HSL se unen a secuencias en los promotores de los genes que regulan las denominadas cajas *las*. La proteína LasR interacciona con su autoinductor 3OC12HSL y activa la transcripción de los genes que regula, mientras que RhIR es capaz de activar o reprimir la transcripción de los genes que regula en presencia o ausencia de su autoinductor (Mata-Sandoval, 2001).

Una de las enzimas clave en la producción de ramnolípidos es la ramnosiltransferasa 1, codificada por el operón *rhIAB*. La transcripción de este operón se regula por RhIR. Éste, al estar unido al C4HSL, activa la expresión del operón y cuando no está unido al autoinductor la reprime. A su vez, la transcripción de *rhIR* es activada por LasR(3OC12HSL), aunque se cree que en este proceso participan otros elementos (Desai y Banat, 1997).

Relacionado con el proceso antes descrito, también se encuentra la producción de la enzima Elastasa, que es un producto de la transcripción del gen *lasB* y para expresarse requiere del complejo LasR/3OC12HSL. Este gen tiene una región promotora con dos cajas *las* llamadas OP1 y OP2. Ambos operadores están involucrados en la activación del gen *lasB* por el complejo LasR/3OC12HSL aunque también se sugiere que la activación de

lasB es mucho más compleja y está sujeta a diversos reguladores y autoinductores. Asimismo, estudios realizados en el laboratorio parecen indicar que no es directamente RhlR la que se encuentra involucrada en la regulación de *lasB*, sino C4HSL, el cual se cree que compite con 3OC12HSL y desestabiliza el complejo LasR/3OC12HSL. Esta evidencia indica que existe una interacción de las proteínas LasR y RhlR de *Quorum Sensing* con la caja *las* del gen *lasB*, la cual se ve modificada por la presencia de ambos autoinductores (Sullivan, 1998; Medina y col., 2003; Reis y col., 2011).

En la figuras 3 y 4 se esquematiza el proceso regulatorio de la producción de ramnolípidos en *Pseudomonas aeruginosa*.

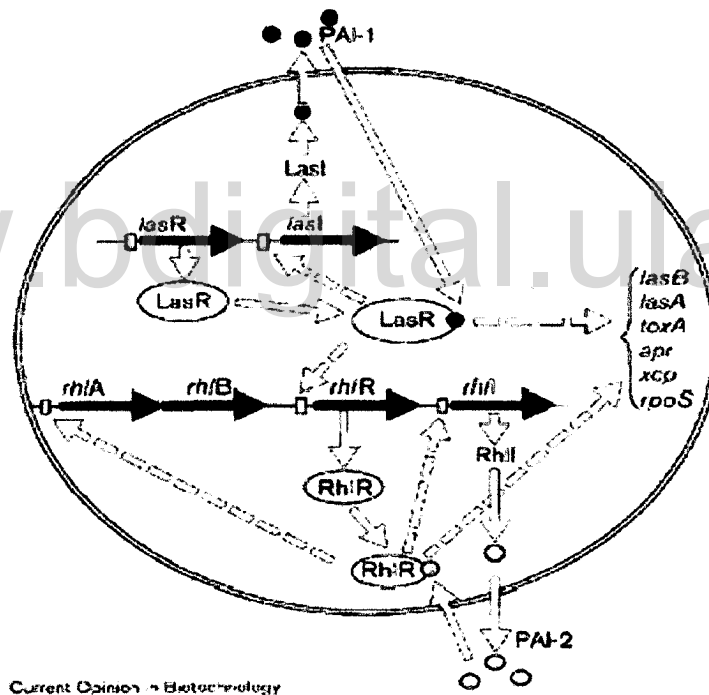


Figura 3. Modelo representativo de los genes requeridos para la producción de ramnolípidos en *Pseudomonas aeruginosa* y su regulación. Fuente: Sullivan, 1998.

formada de exopolisacáridos, que forman canales por donde circulan agua, enzimas, nutrientes, y residuos. Allí las células establecen relaciones y dependencias: viven, cooperan y se comunican a través de señales químicas o *Quorum Sensing*, que regulan la expresión de genes de manera diferente en las distintas partes de la comunidad, como un tejido en un organismo multicelular (Beech y Sunner, 2004).

Para adaptarse a la biopelícula, las bacterias hacen cambios importantes en su estructura y metabolismo. Los avances en proteómica y genómica han permitido identificar genes y proteínas que se activan o silencian a través de las diferentes etapas de desarrollo de la comunidad. La expresión génica de las biopelículas es bastante distinta a la de las células planctónicas ya que los requerimientos y organizaciones son muy diferentes y es necesaria una sincronización de eventos para vivir en comunidad; numerosos estudios han tratado de dilucidar cuales son los cambios y las ventajas de este tipo de organización respecto a la vida planctónica (Beech y Sunner, 2004).

Las biopelículas aparecen en campos diversos de la industria y la medicina y son investigados por diferentes grupos con diferentes puntos de vista. Sin embargo, todas las biopelículas comparten los mismos principios de desarrollo y propiedades. De esta manera, la investigación básica en el campo de las biopelículas provee información para una gran variedad de campos de investigación y aplicaciones. El conocimiento de los principios de la biología, la química y físico química, de los diferentes niveles, mecanismos e interacciones de las redes regulatorias que controlan el desarrollo de las biopelículas, puede ser usado en dos formas: para mejorar los procesos de formación de biopelículas beneficiosas o para desarrollar estrategias más efectivas en el tratamiento para la remoción de biopelículas perjudiciales (Lavania y col., 2011).

En procesos industriales, las biopelículas son usadas comúnmente como una tecnología efectiva y segura para la protección del ambiente. Algunos ejemplos son: tratamiento biológico de aguas, purificación de aguas de desecho, y degradación de desechos biológicos. Las biopelículas también están involucradas en la obtención de productos biológicos en reactores. Las propiedades de absorción y adsorción de las biopelículas son usadas por ejemplo, para la remoción de metales y otros contaminantes de las aguas residuales (Simões y col., 2010).

Las biopelículas también pueden formarse en el momento y lugar equivocado causando por ejemplo, un fenómeno llamado *biofouling*, que es la formación de capas de microorganismos adheridos a la superficie junto con las SPE y sus interacciones con las sales minerales del medio circundante, lo que produce numerosas pérdidas en diversas industrias por problemas de taponamiento en las tuberías. Otro aspecto importante, es el problema de formación de biopelículas en sistemas de distribución de agua potable, causado por la formación de compuestos intermediarios provenientes de la reacción entre las SPE y algunos desinfectantes (Starosvetsky, 2007).

Las células involucradas en una biopelícula pueden llegar a ser hasta 10^3 veces más resistentes a la acción de antibióticos y desinfectantes que las células planctónicas. En una interacción mutua, los antibióticos y los desinfectantes pueden tener efectos en la expresión de las biopelículas. Este problema de resistencia puede crecer dado que el uso de materiales sensibles a la acción de las biopelículas está aumentando cada vez más (Beech y Sunner, 2004).

Para describir el proceso de formación de biopelículas se han propuesto 5 etapas (Figura 5). En la primera y segunda etapa, las células planctónicas presentan una asociación leve y débil al sustrato seguida por una etapa de fuerte adhesión. La tercera y cuarta etapa se caracteriza por la

agregación celular en microcolonias seguido por la maduración de la biopelícula. En la quinta y última etapa, algunas de las células que conforman la biopelícula se desprenden de la colonia y retornan a la vida planctónica transitoriamente y se dispersan (Beech y Sunner, 2004).

En la etapa de adhesión de las células al sustrato la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz de la biopelícula y forma unas estructuras similares a setas entre las cuales se observa la presencia de canales. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celulosa en *S. typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae* o poly-N-acetilglucosamina en *S. aureus*. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz de la biopelícula. Así, algunas cepas de *P. aeruginosa* son capaces de producir además de alginato un polisacárido rico en glucosa que forma una película en la interfase medio aire al que se ha denominado *Pellican* (Beech y Sunner, 2004; Simões y col., 2010).

En la etapa de desprendimiento de las células de la matriz de la biopelícula, las bacterias se liberan para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de desarrollo de formación de la biopelícula. La liberación de las bacterias desde la matriz es el proceso que menos se conoce (Simões y col., 2010).



Figura 5. Etapas de la formación de biopelículas. Cada etapa del diagrama está asociada a una microfotografía del desarrollo de una biopelícula de *P. aeruginosa* (todas las fotografías a la misma escala).

Fuente: <http://es.wikipedia.org/wiki/Biopel%C3%ADcula>

Numerosas evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación de las biopelículas está regulado por una compleja cascada de reguladores. Un trabajo pionero con *P. aeruginosa* demostró que el proceso de formación del biopelículas está regulado por sistemas de comunicación entre células, autoinducción o *Quorum Sensing*. Este sistema es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio de una molécula señal, el autoinductor, que permite a la bacteria sentir la densidad de la población existente. En bacterias Gram negativas el principal autoinductor es acilhomoserina lactona, mientras que en bacterias Gram positivas los autoinductores son péptidos. Cuando en el medio extracelular se acumula una suficiente cantidad del autoinductor, éste activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos. En relación con estos sistemas, se ha identificado una molécula denominada furanona producida por el alga *Delisea pulcra*, con una estructura similar a las acilhomoserina lactonas. Estas moléculas se unen a los mismos receptores, pero en lugar de activarlos, los bloquean, inhibiendo la

consiguiente formación de la biopelículas. En la actualidad se está intentando desarrollar inhibidores de la formación de biopelículas basados en derivados de la furanona, ya que esta molécula es extremadamente tóxica. De forma similar en *S. aureus* se ha descrito un péptido denominado RIP, que inhibe un sistema de *Quorum Sensing* y el proceso de formación de biopelículas (Simões y col., 2010).

3.2.5 La PCR como herramienta para la detección de bacterias en muestras ambientales por técnicas moleculares

En las dos últimas décadas, los avances en la Biología Molecular han evolucionado desde los estudios de clonación de un solo gen hasta convertirse en una ciencia que estudia las propiedades y características de genomas completos. Para esto se requirió del desarrollo de métodos de alto rendimiento en técnicas de secuenciación del genoma y el estudio de la célula en todos los niveles sistemáticos. La base de estos estudios es la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). La PCR amplifica fragmentos específicos de ADN desde concentraciones de pico moles hasta cantidades suficientes de estos fragmentos amplificados para la detección y cuantificación de genes. Los experimentos en micro arreglos para el estudio de expresión de genes, la construcción de librerías de ADNc para el estudio de interacciones entre ADN y proteínas o estudios de polimorfismo genético, por ejemplo, serían imposibles sin la creación de la técnica de la PCR y el éxito de estos estudios depende de la eficiencia y precisión en su aplicación (Delidow y col., 1993).

La PCR es un método extraordinario para la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) *in vitro*, fue creada en 1986 por Kary Mullis y su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo. La PCR puede amplificar un gen o un fragmento específico de ADN en varios millones de veces en menos de dos

horas. Sus vastas aplicaciones dieron lugar a un avance significativo en el área de las ciencias biológicas. Dentro de algunas de las aplicaciones del PCR se encuentran el diagnóstico molecular de enfermedades genéticas humanas, de infecciones virales y bacterianas, en estudios de evolución molecular, clonación y expresión de genes o la identificación de microorganismos (Herveg, 2006).

La PCR es una reacción de varios ciclos en cadena, donde cada ciclo se compone de las siguientes tres etapas: (a) desnaturalización del ADN, (b) hibridación de oligonucleótidos, iniciadores o *primers* con el ADN molde y, (c) síntesis de las nuevas cadenas de ADN. En el primer paso se separan las cadenas de ADN para generar hebras individuales y se eliminan estructuras secundarias, se lleva a cabo a temperaturas de aproximadamente 94°C y entre 2 a 5 minutos. En el segundo paso se hibridan los oligonucleótidos a la región de ADN que se desea amplificar, se lleva a cabo a la temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos; las reacciones típicas utilizan una temperatura de hibridación de 55 ° C, las reacciones más estrictas pueden ser ejecutadas entre 60 a 65 ° C y las reacciones en las que los oligonucleótidos tienen reducida especificidad pueden ser ejecutadas entre 37 a 45 ° C durante 1 a 2 minutos. En el tercer paso la enzima Taq ADN polimerasa lleva a cabo la síntesis de ADN a su temperatura óptima de 72 ° C; el tiempo de amplificación se determina por la longitud de la secuencia a amplificar, en condiciones óptimas la Taq ADN polimerasa tiene una tasa de extensión de 24 kb/min y como regla general se emplea 1 min/kb para amplificar (Herveg, 2006, Delidow y col., 1993).

La ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq ADN polimerasa) es la enzima usada en el procedimiento de la PCR. Originalmente el procedimiento se estableció usando la ADN polimerasa I de *Escherichia coli* (Mullis, 1987). Esta enzima no es resistente a las temperaturas usadas en la desnaturalización del ADN y por ende se adicionaba nueva enzima después del primer paso en cada ciclo de reacción. Posteriormente se aisló una

nueva enzima ADN polimerasa con actividad a temperaturas elevadas. Esta enzima es la Taq ADN polimerasa producida por la bacteria termófila *Thermus aquaticus*. La Taq ADN polimerasa simplificó en gran medida la reacción de PCR al prescindir de la adición de enzima en cada uno de los 30 ciclos que se repite la reacción. La importancia que cobró esta enzima determinó que se establecieran procedimientos para facilitar su purificación, a partir de la bacteria productora de esta enzima, *T. aquaticus*. Posteriormente, con el uso de la tecnología del ADN recombinante el gen de la Taq ADN polimerasa se clonó a partir de *T. aquaticus* y se expresó en *Escherichia coli*. La expresión de este gen en *E. coli* facilitó su producción y purificación. Los desarrollos posteriores han creado nuevas versiones de la enzima Taq polimerasa con modificaciones en su estructura que le confieren la versatilidad de activarse solo al comienzo de la reacción, cuando se alcanzan temperaturas superiores a los 70°C (Huang y Li, 2009).

La Taq ADN polimerasa es una enzima de 94 kDa cuya eficiencia está en el rango de temperatura entre 70 y 80°C. Esta enzima es muy termoestable y con un tiempo de vida a 95°C entre 35 a 40 min. En términos de ciclos térmicos, la reacción de la PCR soporta aproximadamente 100 ciclos (Kolmodin y Birch, 2002). Posee una vida media calentada a 96°C de 40 minutos. Puede ser añadida al comienzo de la reacción y funciona hasta el fin de la reacción de amplificación sin problemas. Tanto la hibridación como la síntesis de ADN se efectúan a temperaturas elevadas para evitar la formación de secuencias que no son complementarias (Merkens y col., 1995; Huang y Li, 2009).

Posee una actividad 5'→3' polimerasa y 5'→3' exonucleasa, pero no tiene actividad exonucleasa 3'→5' y por lo tanto no es capaz de eliminar los nucleótidos que no están correctamente insertados en la cadena que se forma. También posee una actividad terminal transferasa que ajusta un sólo nucleótido, con frecuencia una A, a las dos extremidades 3'-OH del

fragmento amplificado. Esta habilidad es a menudo utilizada en los métodos de clonación.

La Taq ADN polimerasa es capaz de incorporar un nucleótido no apareado con una frecuencia de 2/10.000 nucleótidos por ciclo. La tasa de error observado después de 30 ciclos de amplificación es del orden de 0,25 %, lo cual no constituye un problema significativo cuando se efectúa el análisis global del producto de la PCR. Sin embargo, si los fragmentos van a ser utilizados para métodos de clonación, este error si podría representar un problema, más aún, si la incorporación errónea se produce al comienzo de la amplificación. Este problema se puede resolver parcialmente utilizando una mayor cantidad de ADN molde, o secuencia diana, al comienzo de la PCR, puesto que también es posible también reducir el número de ciclos de amplificación y de la misma manera reducir el número de etapas de la síntesis del ADN (Merkens y col., 1995).

Otra manera de mejorar la técnica de la PCR es utilizar Pfu ADN polimerasa purificada a partir de la archea *Pyrococcus furiosus* que habita a 100°C en sedimentos marinos geotérmicos. Esta enzima posee no solamente una actividad 5'->3' polimerasa, sino también actividad 3'->5' exonucleasa. Es la enzima que produce la tasa de error más baja conocida (4 veces más baja que la de la Taq ADN polimerasa). Su velocidad de polimerización (550 nucleótidos/min) es menos elevada que la de la Taq ADN polimerasa (2.800 nucleótidos/min). Como ésta no tiene actividad terminal transferasa, produce productos PCR con extremidades cortas (Herveg y col., 2006).

3.2.6 Identificación de bacterias mediante secuenciación de fragmentos de genes codificantes del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr)

La comparación de las secuencias de los ARNr (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias. La identificación molecular basada en el ADNr 16S o 23S se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo. La amplificación del gen, para su posterior secuenciación, parte preferentemente de ADN extraído de un cultivo puro de la bacteria, pero también puede conseguirse directamente de la muestra a evaluar (Rodicio y Mendoza, 2004).

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S o 23S incluye tres etapas: a) amplificación del gen a partir de la muestra apropiada; b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, y c) análisis de la secuencia (Poggi y col., 2009).

El ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal (ARNr o rRNA por sus siglas en inglés) es el tipo de ARN más abundante en las células y forma parte de los ribosomas que se encargan de la síntesis de proteínas según la secuencia de nucleótidos del ARN mensajero. Está formado por una sola cadena de nucleótidos, aunque también presenta regiones de doble hélice intracatenaria (Rodicio y Mendoza, 2004).

Los ARN ribosomal se denominan tradicionalmente según su coeficiente de sedimentación, medido en Svedbergs (S). De esta manera, en organismos procariotas existen tres ARNr distintos (5S, 16S y 23S) y en organismos eucariotas cuatro (5S, 5'8S, 18S, 28S). En procariotas los ARNr

23S y 5S forman parte de la subunidad mayor de los ribosomas, mientras que el ARNr 16S forma parte de la subunidad menor. Sobre el armazón constituido por los ARNr se asocian (dentro del núcleo celular) proteínas específicas, formando las subunidades ribosomales, que salen a través de los poros de la membrana nuclear al citoplasma, lugar en el que desarrollan su función de síntesis proteica (Rodicio y Mendoza, 2004).

En las bacterias, los genes que codifican para los ARNr ribosomal se organizan en operones. Cada operón ribosomal, *rrn* incluye genes para ARNr 23S (*rrl*), 16S (*rrs*) y 5S (*rrf*), separados por regiones espaciadoras o intragénicas (IG), conteniendo además genes para uno o más ARN de transferencia (ARNt). El producto de la transcripción del operón a partir de dos promotores, P1 y P2, situados en la región anterior a *rrs* (ARNr 16S), es procesado por la enzima ARNasa III, mediante cortes en sitios específicos que separan las tres clases de ARNr, los ARNt y las IG (Figuras 6 y 7).

www.bdigital.ula.ve

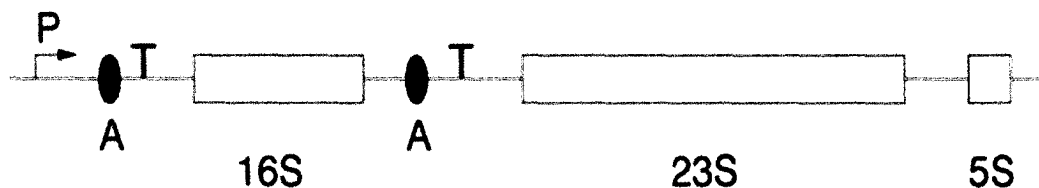


Figura 6. Estructura esquemática de un operón *rrn* con los genes que codifican los ARNr 16S, 23S y 5S. Los óvalos negros representan las secuencias *boxA* del complejo AT. Fuente: <http://www.pnas.org/content/105/47/18159.figures-only>

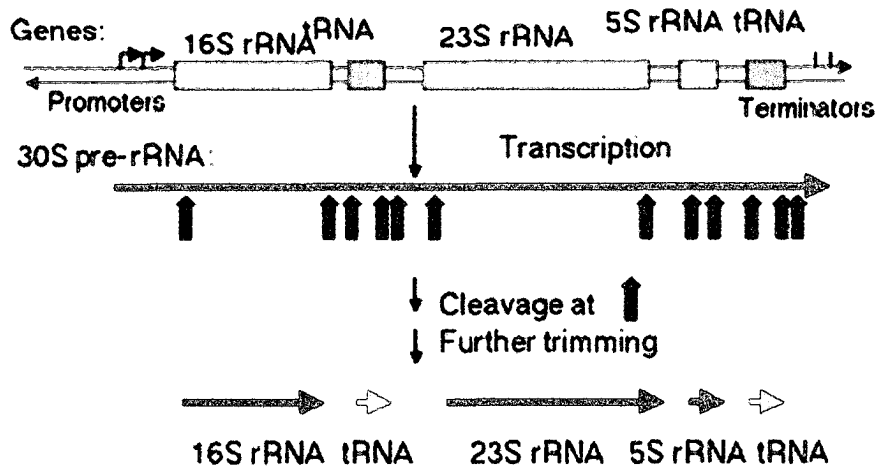


Figura 7. Esquema de escisión de los ARNr a partir de su precursor 30S.

Fuente: <http://www.bx.psu.edu/~ross/workmg/RNAProcessingCh12.htm>

El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nt codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. El ARNr ribosomal 23S, a veces abreviado como ARNr 23S o simplemente 23S, es un componente de la subunidad 50S de los ribosomas de procariontes. Es una cadena de ácido ribonucleico que, en la bacteria *Escherichia coli* posee 2.904 nucleótidos de longitud. En él radica la actividad peptidil transferasa del ribosoma, esencial en la biosíntesis de proteínas. (Rodicio y Mendoza, 2004).

La importancia del ARNr en las líneas filéticas se debe a su alto grado de conservación. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todos los organismos y por lo tanto constituye una diana universal para la identificación de especies. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado por estar involucrado en la síntesis de las proteínas que sostienen la vida y las mutaciones no pueden ser toleradas en una función esencial como lo es esta maquinaria. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los organismos a lo largo de la escala evolutiva. Los ARNr contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no

sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos. En las bacterias, el tamaño relativamente largo de los ARNr 16S minimiza las fluctuaciones estadísticas. La conservación en la estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ADNr 16S existen bases de datos amplias y en continuo crecimiento. Otras regiones del genoma también han sido amplificadas para construir hipótesis sobre las relaciones filogenéticas entre bacterias pero no arrojan tanta información como este gen. Sin embargo, el gen codificante del ARNr 23S también es de interés en identificaciones bacterianas para diferenciar especies que por el ARNr 16S no se pueden distinguir (Rodicio y Mendoza, 2004; Poggi y col., 2009).

La identificación de bacterias mediante la amplificación del ADNr 16S comienza con el diseño de los iniciadores a partir de las regiones conservadas de este gen. Cuando se pretende amplificar el ADNr 16S prácticamente completo, se utilizan iniciadores diseñados en base a secuencias conservadas próximas a los extremos 59 y 39 del gen, que originan amplicones de 1.500 pb, aproximadamente. Se ha demostrado, sin embargo, que una identificación precisa no siempre requiere la amplificación, y posterior secuenciación, del ADNr 16S completo. En estas circunstancias se utilizarán oligonucleótidos que permitan la amplificación de fragmentos de menor tamaño, preferentemente las 500 pb correspondientes al extremo 59. De hecho, aunque existen posiciones filogenéticamente informativas a lo largo de todo el gen, la mayor variabilidad se concentra en las primeras 500 bases en esta región. Generalmente ésta secuencia de 500 bases será suficiente para la correcta identificación de un aislado (Rodicio y Mendoza, 2004; Poggi y col., 2009).

Aunque el ARNr 16S ha sido establecido por los investigadores como molécula estándar en estudios de diversidad taxonómica, el ARNr 23S ofrece ventajas sobre el ARNr 16S. Con una longitud media de 2.900 bases,

es casi dos veces mayor que el ARNr 16S y, por lo tanto, es teóricamente un marcador filogenético más informativo. Las moléculas de ARNr 23S y 16S comparten las mismas propiedades en términos de la conservación de la secuencia y estructura de la molécula. Además, los árboles filogenéticos basados en los genes del ARNr 16S y 23S tienen topologías comparables (Yilmaz y col., 2011).

Una vez amplificado nuestro fragmento de ADNr de acuerdo a los iniciadores usados, se realizan las reacciones de secuenciación para el posterior análisis de secuencias.

Actualmente, se emplea la secuenciación automática, en una reacción similar a la de amplificación, que utiliza un único iniciador por reacción y terminadores marcados con fluorocromos adecuados, que interrumpirán la síntesis de manera aleatoria, y facilitarán la detección posterior de los fragmentos interrumpidos (Poggi y col., 2009).

La disponibilidad de secuenciadores automáticos facilita enormemente la etapa de detección. El número de bases generadas por un secuenciador automático es de 500 a 900, dependiendo del capilar utilizado en la electroforesis. Por ello, para la secuenciación de las dos cadenas del ADNr 16S completo, serán necesarios de 8 a 4 iniciadores, dos de los cuales podrán ser los mismos utilizados en la amplificación. Sin embargo, la secuencia obtenida podría contener errores o presentar posiciones ambiguas. Por ello, la obtención de la secuencia definitiva requiere la evaluación de los electroferogramas y la alineación de la cadena directa con la reversa, para resolver las posibles discrepancias. Así, aunque la secuenciación de una cadena del amplicón puede conducir a una correcta identificación, la calidad de la secuencia será óptima cuando la comparación de ambas cadenas se utiliza para la corrección de errores (Poggi y col., 2009).

Finalmente se realiza el análisis de las secuencias. Aunque existen varias opciones de bases de datos para análisis de secuencias de ADN, la principal y más utilizada es el banco de genes (Genbank) a través de la página web del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI por sus siglas en inglés).

Genbank es una base de datos primaria. Esto quiere decir que es un repositorio de todas las secuencias de proteínas y nucleótidos disponibles. Genbank está administrada por el NCBI y este a su vez depende del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH por sus siglas en inglés). El NCBI es parte de la base de Colaboración de Secuencias de Nucleótidos Internacional (INSC por sus siglas en inglés) un consorcio que también incluye al DNA Data Bank de Japón y al Instituto Europeo de Bioinformática (EBI por sus siglas en inglés) este último a su vez forma parte del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL por sus siglas en inglés). Un laboratorio puede depositar secuencias en cualquiera de estos centros y la información está disponible para todos, porque las bases de datos se sincronizan cada día. Otra base de datos primaria es el Banco de Datos de Proteínas (PDB por sus siglas en inglés) que es el lugar donde se deposita información estructural de proteínas.

RDP es la principal base de datos de secuencias de ADNr, no sólo 16S, sino también 23S de procariontas y, 18S y 28S de eucariotas. Permite la comparación de secuencias *on line*, y ofrece otras muchas posibilidades, incluida la construcción de árboles filogenéticos. Contiene más de 78.000 secuencias de ADNr 16S, que son alineadas, teniendo en cuenta la estructura secundaria de la molécula de ARN. La base de datos RIDOM se limita también a secuencias de ADNr, centrándose exclusivamente en microorganismos patógenos.

La elección de la base de datos es importante, y se recomienda la utilización de más de una de ellas, para comprobar si conducen al mismo

resultado. Finalmente, se podrá construir un árbol filogenético, que refleja, de forma esquemática, el grado de parentesco genético entre las bacterias comparadas (Rodicio y Mendoza, 2004).

3.2.7 Métodos basados en huellas moleculares para el análisis de comunidades bacterianas

La disponibilidad de métodos moleculares novedosos y avanzados basados en ácidos nucleicos ha revolucionado los estudios de la microbiota ambiental. En particular, la comprensión de la diversidad, funcionalidad y las interacciones microbianas. El entorno selectivo del ambiente puede reducir la diversidad de especies, lo que permite una mejor comprensión de su ecología y funcionamiento a través de técnicas moleculares. Para investigar hipótesis comprobables se necesita un enfoque polifásico basado en enfoques moleculares tales como metagenómica y metatranscriptómica en organismos cultivables y no cultivables. Así, los avances en el conocimiento del funcionamiento y la adaptación de especies bacterianas se fomentará por métodos combinados en metagenómica y metatranscriptómica con enfoques basados en métodos de cultivo (Van Elsas, 2011).

En la última década se han realizado rápidos desarrollos en métodos de huellas moleculares para el entendimiento de las poblaciones microbianas, especialmente los métodos para el estudio del ADNr 16S o 23S.

Se requieren análisis posteriores por técnicas de huella molecular del fragmento amplificado por la PCR, ya sea de los genes ADNr o cualquier otro gen filogenético o funcional de elección, para obtener los datos sobre las comunidades microbianas que se buscan. Se puede proceder por ejemplo, a través de los análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) que produce huellas relativamente simples las cuales pueden utilizarse para fines

comparativos. Cuando se realizan técnicas de PCR-RFLP de fragmentos de genes codificantes de los ARNr se denominan análisis de restricción de ADN ribosomal (ARDRA por sus siglas en inglés) (Van Elsas, 2011).

En la técnica de FRLP, el fragmento amplificado es luego tratado con enzimas de restricción específicas para producir fragmentos de ADN de diferentes longitudes. Estas enzimas de restricción o endonucleasas de restricción, son enzimas que hidrolizan los ácidos nucleicos rompiendo enlaces internucleótidos del interior de la cadena. Los fragmentos de restricción se separan mediante electroforesis en geles de agarosa a través del cual corren debido a un campo eléctrico y su disociación obedece a la masa o a la carga eléctrica de las muestras según la técnica utilizada. Esto proporciona un patrón de bandas que es único para un ADN en particular debido a la diferencia en las secuencias del ADN en los individuos donde los sitios de restricción varían. Las bandas pueden ser transferidas por *Southern Blot* a una membrana donde se hibridan con una sonda que permite determinar la longitud y la separación de los fragmentos. En este paso las cadenas de ADN tienen que ser desnaturalizadas y estar en cadena sencilla para permitir la hibridación con las sondas. Las endonucleasas de restricción cortan el ADN de cadena doble en secuencias específicas y cada enzima reconoce un sitio en particular. Este método es muy sensible (el límite de sensibilidad es de aproximadamente 0,5% de la comunidad) pero presenta inconvenientes relacionados con problemas de digestión incompleta de los fragmentos (Tolvanen y Karp, 2011).

Las endonucleasas de restricción son producidas principalmente por bacterias que hidrolizan enlaces fosfodiéster del esqueleto del ADN de doble hebra en secuencias específicas. Las de tipo II son las más útiles en los métodos de ADN debido a su especificidad de secuencia absoluta, tanto para la reacción de unión como para la de ruptura. Estas enzimas se denominan con tres o cuatro letras que corresponden a la primera letra del género y a las dos o tres primeras letras e la especie del organismo de

procedencia. El número señala el orden cronológico de descubrimiento de esa enzima en esa generación.

La hibridación directa de los amplificadores a una sonda específica utilizando una transferencia o *Southern Blot* es otra opción que proporciona información sobre la presencia de regiones de homología con la sonda. Alternativamente, la clonación en una biblioteca seguida de la secuenciación de clones de la biblioteca seleccionada se puede utilizar para proporcionar información acerca de la diversidad y naturaleza de las secuencias en estudio (Van Elsas, 2011).

Las técnicas basadas en la PCR más otros métodos post PCR permiten comprender la dinámica microbiana de una comunidad. La ventaja de estos métodos es que permiten una visión directa de la composición comparativa y la diversidad de la microbiota dominante. También se ha desarrollado una gama de métodos de huella molecular basados en amplicones generados por PCR, tales como la electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE por sus siglas en inglés), electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TGGE por sus siglas en inglés) polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP por sus siglas en inglés) y análisis de espaciador intergénico ribosomal (RISA, por sus siglas en inglés) entre otros. Todos estos métodos permiten conocer los microorganismos de comunidades con diferentes niveles de resolución. Sin embargo, se limitan a los miembros dominantes (el llamado top-1000) de la comunidad microbiana en estudio. Por lo tanto, el método no tendrá acceso a los organismos poco comunes de la biosfera. Otra observación, y una cuestión de precaución, es que todos los métodos basados en técnicas del ADN a partir de muestras directas, sin obtención de aislados, detectarán tanto organismos viables como no viables. Estos dos grupos son difícilmente distinguibles sin realizar evaluaciones adicionales, tales como el análisis de la viabilidad celular (Van Elsas, 2011).

Para aplicar las técnicas de huella molecular del fragmento amplificado por la PCR se siguen los siguientes pasos: 1) El ADN de un individuo se extrae y se purifica. 2) El ADN purificado es amplificado usando la técnica molecular de la PCR y 3) los amplicones son tratados por cualquiera de los métodos antes descritos (Tolvanen y Karp, 2011).

Los métodos basados en análisis de los fragmentos amplificados por técnicas de DGGE se introdujeron en 1993 para detectar la estructura de comunidades bacterianas y desde entonces es común para analizar la diversidad y dinámica poblacional. El principio del método es la separación de cadenas de doble banda de acuerdo a su punto de desnaturalización utilizando un gel en gradiente (Xiaoqi y col., 2007).

Las técnicas de SSCP se basan en el distinto comportamiento electroforético que presentan las moléculas de monocatenarias de ADN según su secuencia en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante, formándose diferentes estructuras tridimensionales dependiendo de la secuencia de la hebra. Los fragmentos de ADN a analizar por esta técnica deben tener un tamaño medio de unas 400 pares de bases. El producto de la PCR se desnaturaliza calentándolo a 94°C y se enfría rápidamente en hielo. El cambio de temperatura debe ser brusco para que las moléculas de cadena simple no vuelvan a hibridar entre sí, sino consigo mismas. Un cambio de una sola base en la secuencia, puede hacer que cambie la conformación. Finalmente, los fragmentos reasociados se someten a electroforesis, pudiéndose detectar tanto en geles de poliacrilamida como mediante electroforesis capilar con control de la temperatura (Schmalenberger y col., 2008).

A pesar de ser una técnica sencilla, también presenta ciertas desventajas, entre las que destacan el carácter imprevisible del comportamiento electroforético de las cadenas simples, el cual se ve influenciado por las condiciones en la que tiene lugar la migración, como por

ejemplo la temperatura. La segunda gran desventaja es que a medida que aumenta el tamaño de la molécula a analizar, ésta se vuelve insensible a determinados cambios, adoptando siempre la misma conformación tridimensional a pesar de haberse producido un cambio en su secuencia. Además, la desnaturalización completa es difícil de conseguir y muchas veces aparecen bandas en el gel correspondientes a doble cadena (Schmalenberger y col., 2008).

La combinación de métodos como DGGE y SSCP son utilizados para caracterizar comunidades bacterianas usando fragmentos amplificados del ADNr 16S para obtener una huella bidimensional (Schmalenberger y col., 2008).

El análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD por sus siglas en inglés) es herramienta eficaz para investigar la diversidad genética de organismos en un ambiente determinado, y es sin duda una técnica muy útil en la etapa inicial de este tipo de estudios. Es compatible con la detección simultánea de polimorfismo en muchos loci en el genoma entero (Kesari y Rangan, 2011).

IV. MARCO METODOLÓGICO

4.1 Área de estudio

Para la toma de muestras de agua de producción de petróleo se seleccionó un pozo representativo de cada uno de los bloques de la FPO (Carabobo, Ayacucho, Junín y Boyacá) con condiciones críticas de presencia de microorganismos. El agua procedente de estos pozos se evaluó como sistema modelo y la metodología desarrollada para la detección e identificación de bacterias presentes se estandarizó para aplicarla en cualquier área de estudio a fin de conocer el perfil de la población bacteriana. Las muestras de agua se tomaron entre los meses de marzo y junio de 2013. A medida que llegaron las muestras al laboratorio se comenzaron a procesar para los análisis microbiológicos.

4.2 Obtención y procesamiento de las muestras de agua

Las muestras de agua de producción de crudo se tomaron en sitios donde no ha sido aplicado ningún tipo de tratamiento químico, siguiendo las precauciones de manipulación para análisis físico químico y microbiológico. Se registró la temperatura del agua en el punto de muestreo. Con el uso de un equipo medidor de multiparámetros se determinó el pH, salinidad y conductividad de las muestras en el laboratorio.

4.3 Detección de bacterias por métodos de siembra

Los métodos microbiológicos descritos a continuación permiten conocer el contenido de bacterias, así como, la dinámica de crecimiento de bacterias cultivables, su capacidad para producir biosurfactantes y formar biopelículas.

4.3.1 Determinación de bacterias heterótrofas totales y bacterias productoras de ácido

Se determinó el contenido de bacterias heterótrofas totales por dilución seriada en medio caldo nutritivo y bacterias productoras de ácido en medio caldo rojo fenol siguiendo los procedimientos descritos en la norma NACE TM0194-2004, recomendados para la detección de bacterias en aguas de yacimientos de petróleo.

4.3.2 Aislamiento y purificación de bacterias cultivables

Para aislar las bacterias cultivables se realizaron diluciones seriadas de cada una de las muestras de agua con solución salina (NaCl 0,9% P/V) y se sembraron por el método de siembra en placa vertida en placas de Petri con agar nutritivo. Las placas de siembra se incubaron a la temperatura de crecimiento para organismos mesófilos (30°C) durante 24 a 48 horas, hasta la formación de las colonias.

Las colonias representativas se seleccionaron tomando en cuenta el número y su frecuencia de aparición. Las colonias se aislaron y purificaron por el método de agotamiento en el mismo medio de cultivo agarizado. Se observaron las características de las colonias crecidas en el medio de cultivo y se clasificaron de acuerdo a su morfotipo.

4.3.3 Caracterización morfológica y bioquímica de las bacterias aisladas

A fin de realizar la clasificación fenotípica de las bacterias, se estudiaron las características morfológicas y bioquímicas de las cepas bacterianas aisladas. Se realizó tinción de Gram y se observaron las células al microscopio para anotar sus características.

Para las pruebas bioquímicas se utilizó el kit de pruebas API 20E[®] de la casa comercial BioMérieux.

La batería de pruebas API 20E[®] es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia Enterobacteriaceae y otras bacterias Gram negativas. Básicamente consta de 21 pruebas bioquímicas estandarizadas. Este sistema presenta las ventajas de ser rápido y de permitir realizar numerosas pruebas a la vez. Cada tira de API 20E[®] contiene 20 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cada tubo es una prueba bioquímica distinta.

Los microtubos se inocularon con una suspensión de microorganismos en solución salina (NaCl 0,9% P/V). Las tiras o galerías se incubaron a 30°C. Por efecto del metabolismo bacteriano, después del período de incubación (24 a 48 h) se producen cambios de color espontáneos o por la adición de reactivos para revelar el resultado (Figura 8). Todos los resultados obtenidos se registraron en una tabla.

	ONPG	ADH	LDC	ODC	ICIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
Negativo																					
Positivo																					

Figura 8. Cambios de color de la galería de prueba API 20 E[®]. Fuente: ficha técnica galerías API 20 E[®], BioMérieux, <http://perso.wanadoo.es/microdominguez/API.htm>

La lectura de las reacciones se hace mediante comparación con la tabla de lectura (Tabla 2) donde se indica si los microorganismos deben

considerarse positivos o negativos para cada reacción según el color aparecido.

Tabla 2. Lectura de la galería de prueba API 20 E®

Pueba	Reacción / Enzimas	Negativo	Positivo
ONPG	beta-galactosidasa	sin color	amarillo
ADH	arginina deshidrolasa	amarillo	rojo o naranja
LDC	lisina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
ODC	ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
CIT	utilización del citrato	verde	azul oscuro o turquesa
H2S	producción de H ₂ S	sin precipitado negro	precipitado negro
URE	ureasa	amarillo	rojo o naranja
TDA	triptófano desaminasa	amarillo	marrón-rojo
IND	producción de indol	amarillo	color rosa o anillo rosa-rojo
VP	producción de acetoina (Voges-Proskauer)	sin color	rosa-rojo
GEL	gelatinasa	sin difusión	difusión de pigmento
GLU	fermentación/oxidación de glucosa	azul o verde	amarillo
MAN	fermentación/oxidación de manitol	azul o verde	amarillo
INO	fermentación/oxidación de inositol	azul o verde	amarillo
SOR	fermentación/oxidación de sorbitol	azul o verde	amarillo
RHA	fermentación/oxidación de ramnosa	azul o verde	amarillo
SAC	fermentación/oxidación de sacarosa	azul o verde	amarillo
MEL	fermentación/oxidación de melobiosa	azul o verde	amarillo
AMY	fermentación/oxidación de amigdalina	azul o verde	amarillo
ARA	fermentación/oxidación de arabinosa	azul o verde	amarillo
OX	citocromo oxidasa		

4.3.4 Determinación de la dinámica de crecimiento de las bacterias aisladas, su capacidad para formar biopelículas y producir biosurfactantes

La producción de biosurfactantes se realizó por la medición de la capacidad de los sobrenadantes libres de células para formar emulsiones estables al mezclar con querosén en tubos de ensayo. Se sembró cada uno de los aislados bacterianos por separado en 2 ml de medio PYG que contiene peptona y extracto de levadura al 0,5% c/u y glucosa al 10%. De esta manera, el medio PYG proporciona la glucosa suficiente para activar el metabolismo celular de las bacterias productoras de biosurfactantes.

Los cultivos se incubaron a 30°C durante 24 horas. Se centrifugó a máxima velocidad en una microcentrífuga. Se recuperó el sobrenadante y se mezcló en tubos de ensayo con 2 ml de querosén. Luego se agita fuertemente en un vortex por dos minutos. La suspensión se deja en reposo hasta que la fase emulsionada es completamente estable. Se asigna un número arbitrario a cada uno del 1 al 5 en el cual el número 1 corresponde al no emulsionado y el número 5 corresponde al más emulsionado.

La capacidad de las bacterias para formar biopelículas se determinó siguiendo la metodología descrita por Hasanshahian y Emtiazi, 2008 con algunas modificaciones descritas a continuación.

Se prepararon microplacas de cultivo tomando las precauciones de esterilidad. Se dispensó en cada pocillo 180 µl de caldo nutritivo. Se prepararon suspensiones de cada una de las cepas bacterianas en 5 ml de solución salina (NaCl 0,9% P/V) contenida en tubos de ensayo con tapa de rosca. Se inoculó con 20 µl de cada suspensión bacteriana por triplicado. Se dejaron pocillos control con medio de cultivo libre de bacterias.

La microplaca con las bacterias inoculadas se incubó a 30°C en un equipo Bioscreen C® por un período de cinco días hasta la formación de las biopelículas. En el mismo equipo se leyó la absorbancia a 600 nm diariamente en cada pocillo para realizar las curvas de crecimiento bacteriano.

Una vez formadas las biopelículas, la microplaca, se extrajo del equipo y se eliminó el cultivo por inversión de la placa. Se lavó con abundante agua destilada y se colocó en cada pocillo 150 µl de etanol para fijar las células. Se lavó nuevamente con agua destilada y se secó en la estufa a 50°C. En la microplaca seca, se colocó 150 µl de violeta cristal en cada uno de los pocillos, se tiñó durante veinte minutos. Se lavó con abundante agua destilada, se secó nuevamente en la estufa. El colorante adherido se liberó con la adición de 150 µl de ácido acético al 30% y se leyó la absorbancia a 540 nm en el equipo Bioscreen C® para la cuantificación de las biopelículas formadas.

Se determinó el Índice de Formación de biopelículas (IFB) según la ecuación 1

$$\text{IFB} = \text{D.O } 540 \text{ nm muestra} - \text{D.O } 540 \text{ nm control} \quad (1)$$

4.4 Detección de bacterias presentes en aguas de pozos productores de petróleo por técnicas moleculares

La identificación de las bacterias cultivables contenidas en las muestras de agua en estudio se realizó por extracción y purificación del ADN de cada aislado, amplificación del gen codificante del ARNr 23S, su secuenciación y análisis de la secuencia para comparar con las bases de datos disponibles y obtener la identificación de las especies encontradas.

4.4.1 Extracción y purificación de ADN bacteriano

Para extraer el ADN de las bacterias aisladas se siguió el protocolo descrito en el kit para purificación de ADN marca Promega (*Wizard® DNA Genomic Purification Kit*) con algunas modificaciones para adaptar al tipo de muestra en estudio indicadas a continuación.

Como se trata de células bacterianas, para la ruptura de la pared celular se resuspendió el pellet de cultivos *over night* en medio LB, en 480 μ L de EDTA 50 mM, luego se añadió 120 μ L de lisozima 10 mg/ml y se incubó a 37 °C por una hora. El resto del procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se determinó la concentración del ADN extraído y se verificó su pureza por lectura de la densidad óptica a 260 y 280 nm con el uso de un espectrofotómetro marca Variant.

4.4.2 Diseño de iniciadores para la amplificación del ADNr 23S

El diseño de iniciadores es uno de los aspectos más importantes de la PCR ya que, si no se tiene cuidado, se podrían amplificar otros fragmentos de ADN distintos a los buscados (amplificación inespecífica) o no obtenerse amplificados. Para obtener iniciadores óptimos se siguen algunas reglas útiles, por ejemplo: 1) Cada primer individual debe contar con una longitud de 18-24 bases, si son muy cortos pueden alinearse en diversas posiciones del ADN templado lo cual resulta en amplificaciones no específicas y si son muy largos incrementan la temperatura de alineamiento; 2) Se debe mantener un contenido de G:C (Guanina:Citosina) entre 40 y 60 % ya que si es menor a 40 %, el complejo molde-oligonucleótido no es tan estable e induce la separación del complejo y si es mayor a 60%, se incrementa la temperatura de alineamiento; 3) Ambos iniciadores deben tener temperatura de fusión (T_m) cercanos y alrededor de los 5 °C; 4) La secuencia de los iniciadores

individuales debe iniciarse y terminarse con 1 o 2 bases GC para aportar un fuerte apareamiento y mayor estabilidad a la hibridación del oligonucleótido con su secuencia diana y 5) Evitar regiones con potencialidad para formar estructuras secundarias internas.

Para el diseño de iniciadores se tomaron las secuencias reportadas en el banco de genes del NCBI para el gen de interés y se alinearon por comparación múltiple de secuencias empleando la herramienta ClustalW <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> y a través de la herramienta MUSCLE <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/> del MBL-EBI. También se alinearon con el programa BioEdit. Se buscaron en las secuencias las regiones consenso y se procedió con el diseño de iniciadores para la obtención de dicho gen con el uso del software Oligo Explorer <ftp://ftp.cecalc.ula.ve/bioinfo/>.

Alternativamente, se empleó la herramienta Primer BLAST del NCBI, en el cual la eficiencia de estos iniciadores es probada y analizada virtualmente. Los iniciadores se analizaron a través de estas herramientas para verificar el contenido de G-C, formación de hetero y homo dímeros, formación de horquillas y la determinación de su Tm, con el fin de obtener unos iniciadores óptimos.

Como el éxito en la obtención de los fragmentos amplificados y la precisión de los resultados depende en gran medida de la selección de los iniciadores, para comprobar su eficiencia se realizó un análisis virtual con la herramienta Test Prime de la base de datos SILVA <http://www.arb-silva.de/search/testprime>, un recurso integral en línea para comprobar la calidad y alineado de datos de secuencias de ARN ribosomal. SILVA provee información integral, de calidad comprobada y conjuntos de datos actualizados periódicamente de alineado de secuencias de la subunidad ribosomal pequeña (16S/18S, SSU) y la subunidad grande (23S/28S, LSU) de ARN ribosomal (ARNr) de los tres dominios de la vida (bacterias, Archaea

y Eukarya). Se analizaron los iniciadores de diseño propio y los reportados por Kotilainen y col., 1998 (Tabla 3).

Tabla 3. Lista de iniciadores analizados virtualmente

Nombre	Secuencia	Autor
MS37 F	5'AGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCA3'	Kotilainen y col., 1998
MS38 R	5'CCCGACAAGGAATTCGCTACCTTA3'	Kotilainen y col., 1998
CR23 F	5'-GAAACCCACTGCTCGTAATG-3'	Autoría propia
CR23 R	5'-CCTGGACATGGGTAGATCAC-3'	Autoría propia

4.4.3 Amplificación del gen ADNr 23S

La amplificación de los fragmentos del gen ADNr 23S se realizó siguiendo una metodología estándar con el uso de un termociclador marca Eppendorf modelo Master Cycler Nexus. Las condiciones de reacción se estandarizaron hasta obtener amplificadas de calidad para los secuenciamientos.

A partir del ADN extraído de los aislados se amplificaron las regiones variables del gen utilizando los iniciadores reportados por Kotilainen y col., 1998.

La mezcla de reacción consistió de 0,3 µl del ADN purificado; 0,7 µM de cada iniciador MS37 F y MS38 R; 200 µM de la mezcla de nucleótidos (dNTPs); 5 µM de MgCl₂; 1,5 U/µl de Taq ADN polimerasa y 2,5 µl de su correspondiente buffer 10 X, en un volumen final de 25 µl. Todos los reactivos usados en la mezcla de reacción son de la marca Invitrogen.

El programa de amplificación incluyó un paso inicial de desnaturalización de 2 min a 95 °C, 30 ciclos de 30 s a 95 °C; 20 s a 60 °C; y 45 s a 72 °C. La extensión final se realizó a 72 °C por 10 min. Este programa de reacción se adaptó y estandarizó para las muestras evaluadas.

Los productos de PCR obtenidos son analizados por medio de una electroforesis con un gel horizontal sumergido de poliacrilamida. El protocolo para la preparación del gel se realizó de acuerdo a Cruz y Quintero (comunicación personal) para obtener una mejor resolución de las bandas que las obtenidas en un gel de agarosa.

El gel de poliacrilamida se prepara con 6 ml de poliacrilamida 19:1; 500 µl de glicerol al 10%; 250 µl de buffer TAE 10X (400mM Tris-acetato, 10mM EDTA); 800 µl de persulfato de amonio al 10% y 80 µl de TEMED.

La corrida electroforética se realiza aplicando un voltaje de acuerdo al peso molecular de las moléculas de ADN que se va a separar. Para el caso de productos de PCR obtenidos (entre 800 pb a 1 kb), se aplicó 120 voltios.

El gel se visualizó con el uso de un transiluminador luego de teñir el gel por 10 min en un envase conteniendo bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/ml.

4.4.4 Digestión por enzimas de restricción de productos de PCR (PCR-RFLP) de los fragmentos de ADNr 23S

Se busca un método certero, reproducible, simple y de bajo costo que permita la diferenciación genotípica de las especies mayormente encontradas en las muestras evaluadas. Para ello se realizó el análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del producto amplificado del ADNr 23S.

Para escoger las enzimas de restricción se realizó una digestión *in silico* utilizando el programa NEBcutter V2.0 <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

Se escogió la enzima HpyCH4V (New England, Biolabs). Esta enzima tiene ventajas con respecto a otras enzimas de restricción porque reconoce secuencias cortas y muy repetidas en el ADN, por lo tanto, los sitios de corte son de fácil reconocimiento y se garantiza la obtención de fragmentos cortos en la digestión del fragmento original. En la tabla 4 se muestra el sitio de corte en el ADN por esta enzima.

Tabla 4. Sitio de corte en el ADN de la enzima de restricción seleccionada

Enzima	Sitio de corte
HpyCH4V	5' ... T G C A ... 3' 3' ... A C G T ... 5'

La mezcla de restricción consistió de 1 μ l (0,5 U) de enzima HpyCH4V de New England Biolabs; 1,5 μ l de NEBbuffer de New England Biolabs; 5 μ l de ADN amplificado y 7,5 μ l de agua desionizada para un volumen final de 15 μ l. La mezcla se incubó por 5 horas a 37° C y se inactivó la enzima por calentamiento a 65° C por 10 min con el uso de un equipo controlador térmico programable PTC-100™ de la marca MJ Research, Inc. Para visualizar el patrón de bandas digeridas, 5 μ L del digerido se sometió a electroforesis en gel de agarosa 2,5 % en tampón TBE 1X, 120 V durante 1 hora a temperatura ambiente y se tiñó con bromuro de etidio (1 μ g/ml). El patrón fue comparado contra patrones de digestión obtenidos por el análisis virtual para su identificación.

4.4.5 Purificación de los amplificados

Los fragmentos de ADNr 23S se purificaron con el kit *FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit* de FAVORGEN.

Los productos de PCR se purificaron a partir de un gel preparativo de agarosa al 1,5%. Con el uso de un escalpelo se escindió la banda de ADN del gel de agarosa y se transfirió el fragmento de aproximadamente 300 mg a un tubo de micro centrifuga. El resto del procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.4.6 Secuenciación de los fragmentos de ADNr 23S

Se realizó la PCR para secuenciación con el kit *Sequencing Reaction Mix* de la marca Applied Biosystems cuya mezcla de reacción consistió de 7 μ l de *Buffer Terminator Reaction Mix*, 0,5 μ l (10 pmoles/ μ l) de cada uno de los iniciadores (en reacciones separadas) y 11 μ l del ADN purificado.

El programa de amplificación consistió de 25 ciclos que incluye 10 s a 96°C, 5 s a 60°C y 4 min a 60°C en un equipo Master Cycler Nexus de la marca Eppendorf.

Una vez realizada la PCR, los productos se precipitaron con isopropanol al 65% por 20 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 12000 x g durante 25 min para eliminar el alcohol. Posteriormente se lavaron con etanol al 60% e igualmente se centrifugó en igual condición que la anterior. Al pellet de ADN lavado se le agregó 15 μ l de formamida para desnaturar las bandas de ADN.

Los amplificadores purificados se secuenciaron en un equipo modelo ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer de la marca Applied Biosystems con las siguientes condiciones de secuenciación: Dye Set Primer: KB_310_P0P4_BDTV3_36 std.mob; Módulo de corrida: P4 std Seq (1 mL) E.md4; Inyección: 30 s a 1 K volt y la corrida se realizó a 11,4 K volt, 7 μ Amp y a 50°C por 32 min.

Las secuencias se analizaron, alinearon y compararon con las bases de datos de la NCBI.

4.4.7 Análisis de las secuencias

Se buscó la homología de las secuencias obtenidas por comparación con las bases de datos utilizando la herramienta Microbial Nucleotide BLAST del NCBI. Se obtuvieron las secuencias con mayor homología en base al porcentaje de máxima identidad. Luego se realizó un alineamiento múltiple con la herramienta ClustalW del NCBI introduciendo todas las secuencias obtenidas en formato FASTA. Posteriormente, en la herramienta ClustalW - Phylogeny se colocaron las secuencias alineadas en formato FASTA y se seleccionó el método Neighbor-Joining para construir el árbol filogenético. Alternativamente se usó el software MEGA 5.10 para estudios filogenéticos siguiendo los pasos de la herramienta y se construyó un árbol filogenético representado en forma de cladograma que mostró la diversificación de las especies encontradas a partir de una especie ancestral.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Área de estudio

Se seleccionó un pozo representativo de cada uno de los bloques de la FPO (Carabobo, Ayacucho, Junín y Boyacá) escogidos por sus condiciones críticas de presencia de microorganismos. La ubicación aproximada de cada pozo se puede apreciar en la Figura 9 y sus nomenclaturas en la Tabla 5.

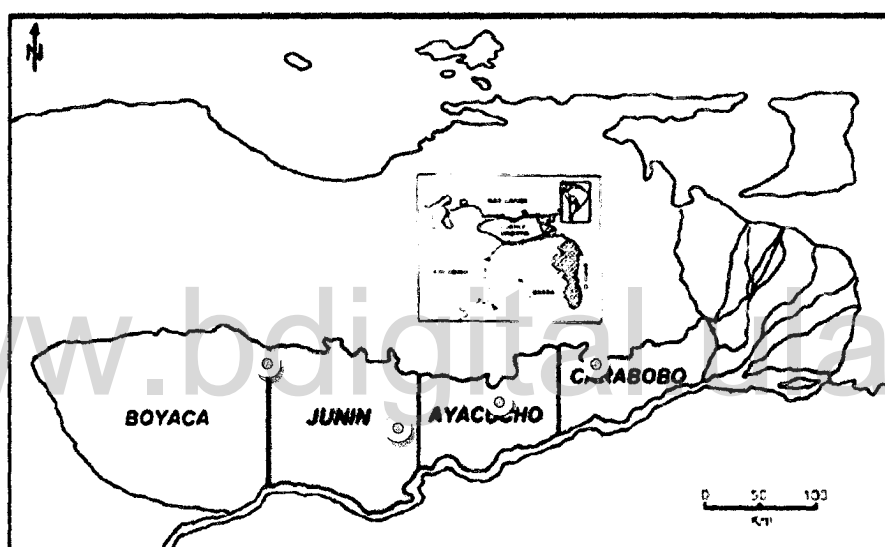


Figura 9. La faja Petrolífera del Orinoco

Tabla 5. Pozos de la FPO en los cuales se tomaron las muestras de agua para la evaluación

Bloque	Carabobo	Ayacucho	Junín	Boyacá
Campo	Jobo	Bare	Cabrutica	Guárico
Pozo	JN9	MFB 888	JV14	MCH 7-26

5.2 Parámetros físico químicos de las muestras de agua

La temperatura del agua en cada punto de muestreo está relacionada con el tipo de operación existente en el sitio. En todos los casos la temperatura a boca de pozo es cercana a los 50°C.

En todas las muestras de agua analizadas el pH se encontró ligeramente básico (Tabla 6).

La conductividad es la capacidad de un determinado elemento para conducir la corriente eléctrica. La unidad de medida más habitual de la conductividad es el Siemens (S). Debido a que la corriente eléctrica se transporta por medio de iones en solución, la conductividad aumenta cuando aumenta la concentración de iones, así, la conductividad del agua potable puede estar entre 0.005 a 0.05 S/m. Si la conductividad del agua aumenta, sabemos que también aumentó la cantidad de sustancias disueltas en ella.

La salinidad es el contenido de sales minerales disueltas en un cuerpo de agua. El porcentaje medio que existe en el mar es de 3,5%.

Tabla 6. Parámetros físico químicos de las muestras de agua en estudio

Muestra de agua	Temperatura (°C)	pH	Conductividad (mS/cm)	Salinidad (‰)
Carabobo	42	7,6	42,2	26,9
Ayacuecho	48	8,4	25,2	15,3
Junín	50	7,57	8,95	5,0
Boyacá	49	8,8	4,05	2,1

Tanto los valores de salinidad como los de conductividad son menores a medida que el lugar de muestreo es más cercano a la región centro sur del país. Estas características podrían influir en el número y tipo

de microorganismos presentes en las muestras de agua provenientes de los yacimientos de crudo.

5.3 Detección de bacterias por métodos de siembra

Tanto para la caracterización bioquímica de las bacterias como para aplicar las técnicas de detección molecular, partimos de métodos basados en cultivos, ya que la identificación se realizó a partir de los aislados obtenidos de las muestras de agua. Así, el primer paso es la siembra de la muestra en un medio de cultivo enriquecido y a partir del mismo proceder con el aislamiento de las bacterias.

5.3.1 Determinación de bacterias heterótrofas totales y bacterias productoras de ácido

La determinación del contenido de bacterias heterótrofas totales nos proporciona información sobre el número total de bacterias presentes en las muestras evaluadas. La presencia de bacterias productoras de ácido en estructuras de áreas operativas es crítico, ya que los productos de su metabolismo intervienen en procesos de corrosión en condiciones aeróbicas. Estos grupos bacterianos pueden representar riesgos de daños a estructuras metálicas cuando se encuentran en cantidades superiores a tres órdenes de magnitud de bacterias por mililitro ($> 10^3$ Bac/ml).

El contenido de bacterias heterótrofas totales se encontró entre 1×10^3 y 1×10^6 Bact/ml según se muestra en la Tabla 7. En cuanto al contenido de bacterias productoras de ácido, no se detectaron en las muestras de agua Ayacucho y Junín. En la muestra de agua Carabobo están presentes pero no representan riesgos porque su contenido por unidad de volumen no es suficiente para proliferar. Solo es verdaderamente crítico su contenido en la muestra de agua Boyacá (Figura 10).

Tabla 7. Contenido de bacterias en las muestras evaluadas

Muestra de agua	Contenido de bacterias heterótrofas totales (Bac/ml)	Contenido de bacterias productoras de ácido (Bac/ml)
Carabobo	10^5	10^1
Ayacucho	10^3	0
Junín	10^4	0
Boyacá	10^6	10^6

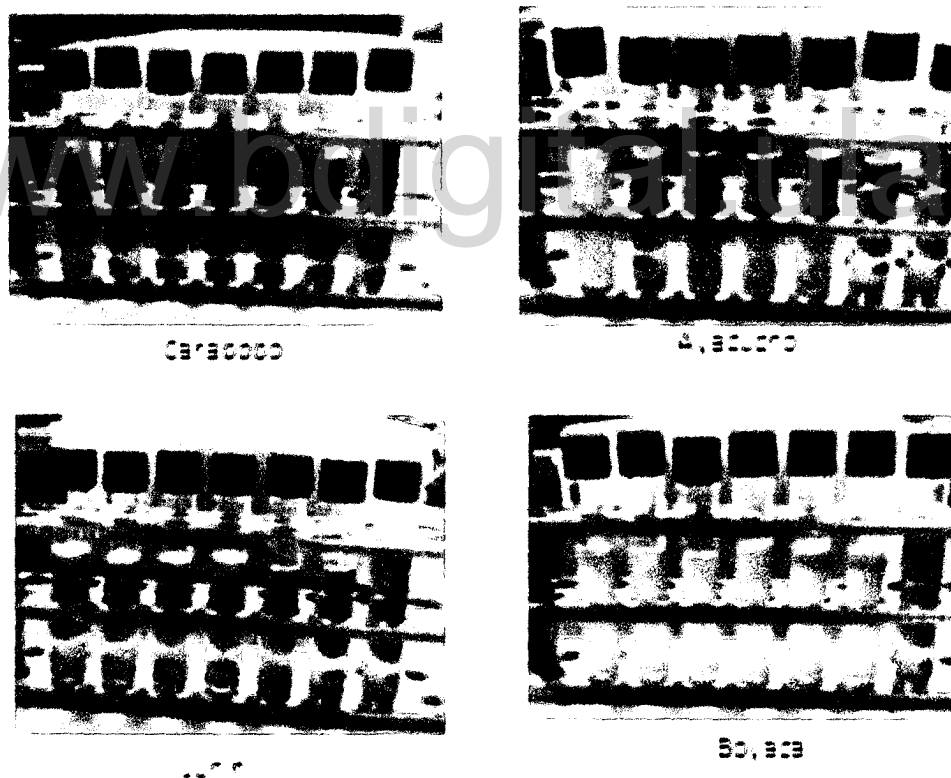


Figura 10. Determinación de bacterias productoras de ácido en las muestras evaluadas

Aun cuando no se conozcan las especies involucradas, en los procesos operativos de producción de petróleo es importante conocer los parámetros antes descritos, ya que de ello depende la toma de decisiones en cuanto a la aplicación de productos químicos para mitigar o controlar el crecimiento de microorganismos que podrían comprometer la integridad de las estructuras, los procesos o productos del petróleo. Sin embargo, si se conocen las especies involucradas, esta toma de decisiones puede ser mejor orientada.

Además, tenemos en cuenta que en estos casos no todas las bacterias encontradas son perjudiciales, es decir, algunos tipos de bacteria podrían estar participando en procesos que ocasionan daños estructurales, pero también es posible capturar bacterias de estos ambientes con uso potencial en bioprocesos. Así, al realizar evaluaciones microbiológicas de rutina, se tiene la oportunidad para obtener bacterias con uso en aplicaciones biotecnológicas. En estos casos si es determinante conocer la especie bacteriana con la cual se está trabajando.

5.3.2 Aislamiento y purificación de las bacterias provenientes de las muestras de agua

Las bacterias encontradas en cada una de las muestras de agua se seleccionaron atendiendo a los distintos morfotipos encontrados, ya que esta es la primera característica de clasificación. Se aislaron y purificaron en medio agar nutritivo. Se encontraron seis morfotipos diferentes en las muestras Carabobo, Junín y Boyacá y cuatro en la muestra Ayacucho. Los distintos morfotipos se describen en la tabla 8 y se ilustran en las Figuras 11 a 16.

Tabla 8. Descripción de los morfotipos bacterianos

Morfotipo	1	2	3	4	5	6
Características de la colonia	Blanca, grande, opaca, irregular	Beig, pequeña, brillante, redonda	Beig, grande, mucosa, irregular	Beig, grande, brillante, redonda	Blanca, grande, mucosa, irregular	Amarilla, pequeña, brillante, redonda

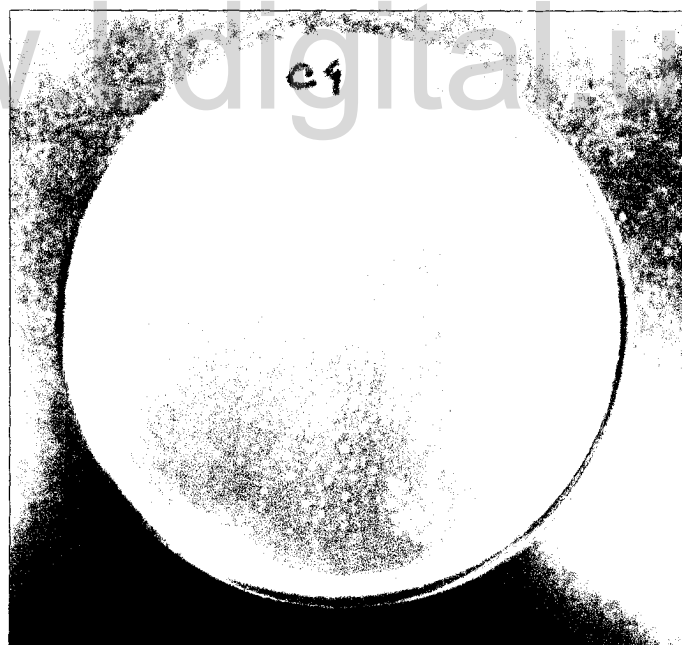


Figura 11. Aspecto del morfotipo 1

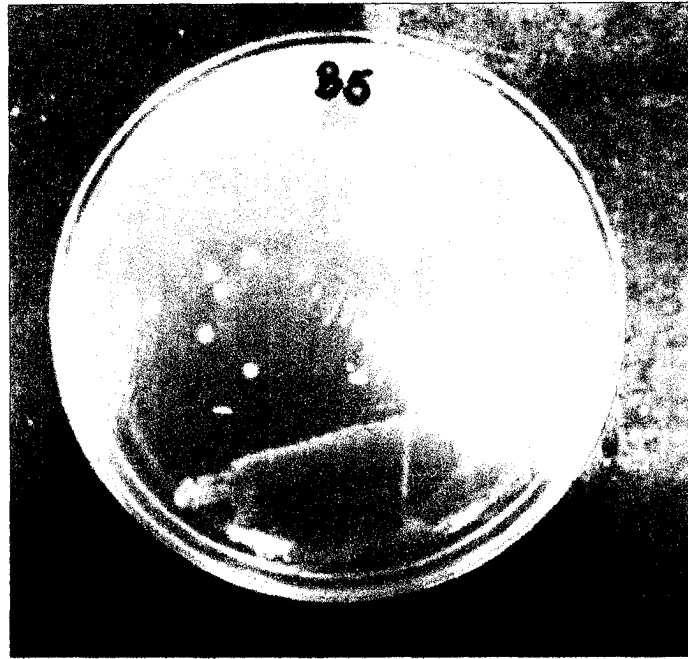


Figura 12. Aspecto del morfotipo 2



Figura 13. Aspecto del morfotipo 3

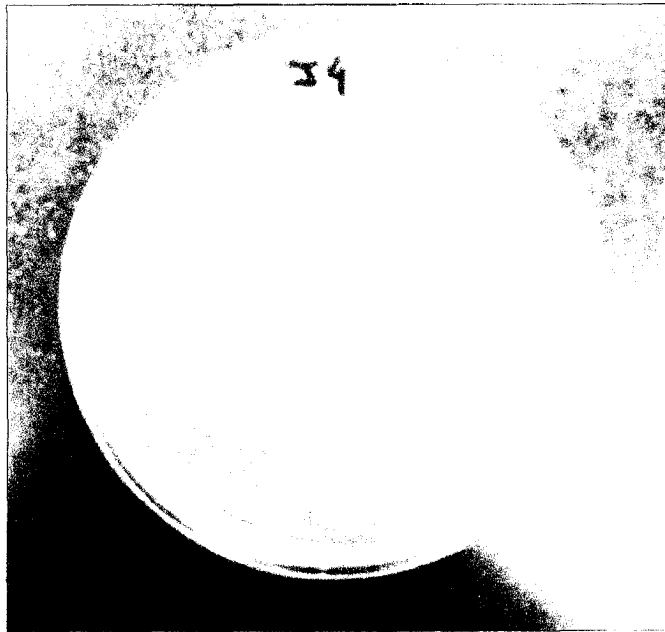


Figura 14. Aspecto del morfotipo 4



Figura 15. Aspecto del morfotipo 5

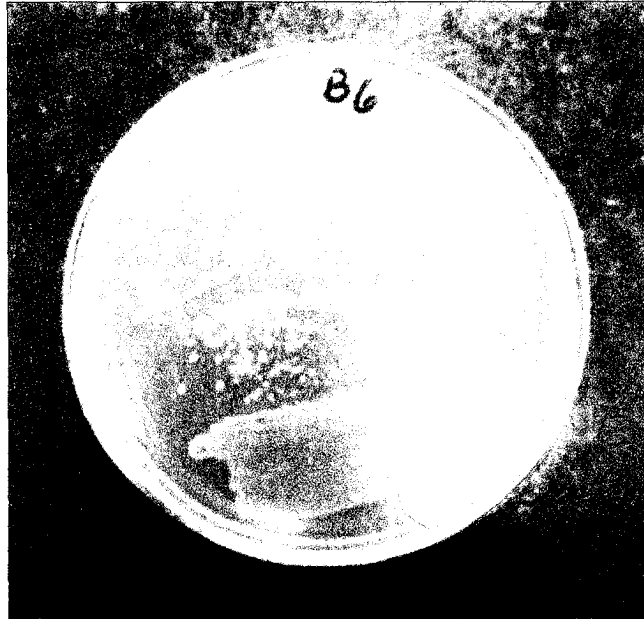


Figura 16. Aspecto del morfotipo 6

www.bdigital.ula.ve

5.3.3 Caracterización celular y bioquímica de las bacterias aisladas

Para llegar a un mayor nivel de clasificación se realizó una tinción de Gram y cada aislado se sembró en las galerías API 20 E[®]. La mayoría de las bacterias encontradas son bacilos Gram⁻. Los resultados se muestran en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9. Morfología celular de los aislados y tinción de Gram

CEPA	Gram	Morfología celular
A1	+	Bacilos grandes esporulados
A2	+	Bacilos grandes esporulados
A3	-	Bacilos grandes cortos
A4	-	Cocobacilos
B1	-	Bacilos pequeños
B2	-	Bacilos
B3	-	Bacilos
B4	-	Bacilos
B5	-	Bacilos pequeños
B6	+	Bacilos
C1	-	Cocobacilos
C2	-	Cocobacilos
C3	-	Bacilos pequeños
C4	+	Bacilos grandes
C5	-	Bacilos
C6	+	Bacilos
J1	-	Bacilos pequeños
J2	-	Bacilos pequeños
J3	-	Bacilos pequeños
J4	-	Bacilos pequeños
J5	-	Bacilos
J6	-	Cocobacilos

Tabla 10. Resultados de la lectura de la galería API 20 E® correspondiente a cada uno de los aislados

CEPA	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
A1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A4	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B3	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B4	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B6	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
C1	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
C2	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
C3	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
C4	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C5	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
J1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J4	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J5	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J6	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

www.bdigital.ula.ve

Las pruebas bioquímicas nos proporcionan información para un siguiente nivel de clasificación y en algunos casos podemos tener una aproximación de clasificación a nivel de Género. Los resultados de las galerías antes de incubar y con resultados positivos se muestran en las Figuras 17 y 18.



Figura 17. Aspecto de la galería antes de incubar

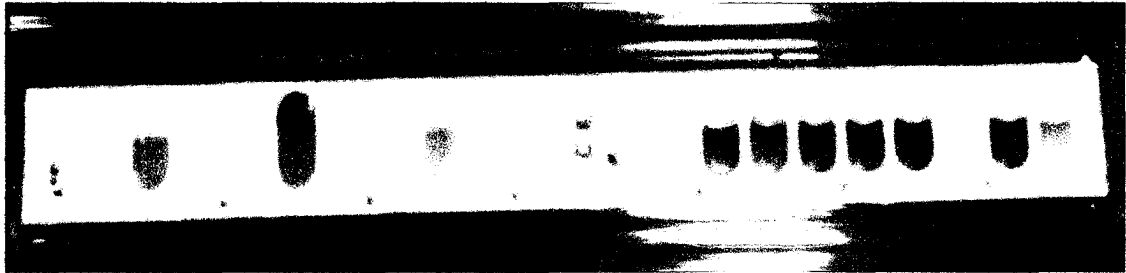


Figura 18. Aspecto de la galería con algunos resultados positivos

Los resultados de la Tabla 10 conducen a un código de siete dígitos que luego es comparado con una base de datos que se proporciona con el kit para la identificación de las bacterias y ésta se establece por similitud de esos códigos con los de microorganismos conocidos. Los resultados de la identificación se muestran en la tabla 11. Las bacterias Gram positivas se identificaron solo por las características morfológicas, ya que el kit está diseñado para bacterias Gram negativas, sin embargo, se sembraron en la galería para obtener información sobre sus características bioquímicas.

Muchos de los aislados bacterianos presentan las mismas características entre sí, por lo cual se escogió un aislado representativo de cada género o especie sugerida en esta identificación para las pruebas moleculares.

Tabla 11. Identificación de las bacterias aisladas con el kit API 20E®

CEPA	Código API 20E®	Identificación (Taxa)
A1	NA	<i>Bacillus</i> sp
A2	NA	<i>Bacillus</i> sp
A3	0205000	<i>Acinetobacter cacoaceticus</i>
A4	0205000	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
B1	2204000	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
B2	0204000	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
B3	2204000	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
B4	0204000	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
B5	0204000	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
B6	NA	<i>Bacillus</i>
C1	2225040	<i>Chromobacterium</i> sp
C2	2225042	<i>Chromobacterium</i> sp
C3	2225040	<i>Chromobacterium</i> sp
C4	NA	<i>Bacillus</i> sp
C5	2202000	<i>Pseudomonas putida</i>
C6	NA	<i>Bacillus</i> sp
J1	0200000	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
J2	0200000	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
J3	0010000	<i>Klebsiella</i> sp
J4	0200000	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
J5	2200000	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J6	2200000	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

NA: no aplica

5.3.4 Determinación de la dinámica de crecimiento de las bacterias aisladas, su capacidad para formar biopelículas y producir biosurfactantes

La producción de biosurfactantes es una propiedad deseable en las bacterias con uso biotecnológico aplicado a operaciones de la industria petrolera, por eso es de interés capturar bacterias que generen este metabolito.

La capacidad de las bacterias aisladas para producir biosurfactantes fue determinada en mezclas de los sobrenadantes libre de células de cultivos puros en medio PYG con querosén. El biosurfactante producido por las bacterias forma emulsiones estables en la interfase de esta mezcla. La producción se midió con la asignación de números arbitrarios del 1 al 5, siendo el número 5 el que corresponde a la capa emulsionada más gruesa. Las bacterias mejor productoras de biosurfactantes son los aislados 4 y 6 de la muestra de agua Carabobo. En la Tabla 12 se muestran los resultados de la determinación de la capacidad emulsificante de los cultivos y en la Figura 19 se ilustra la formación de la emulsión en comparación con una muestra no emulsificada.

Tabla 12. Resultados de la prueba de emulsificación en mezclas de sobrenadante libre de células y querosén

Cepa	1	2	3	4	5	6
Carabobo	1	1	1	5	3	4
Ayacucho	1	3	3	1	-	-
Junín	2	3	1	1	1	1
Boyaca	1	2	2	1	2	1

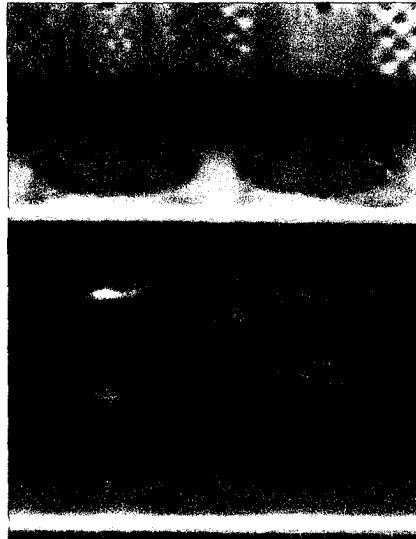


Figura 19. Aspecto de la emulsión formada en comparación con la muestra sin emulsificar

La dinámica de crecimiento de los aislados fue evaluada en microplacas de cultivos con caldo nutritivo.

Casi todas las bacterias aisladas presentan la misma tendencia de crecimiento en éstas condiciones de evaluación. Alcanzan el máximo crecimiento entre los 2 y 4 días de incubación y no se observa una clara fase estacionaria, es decir, permanecen metabólicamente activas en este período de tiempo. Solo los aislados de la muestra de agua Ayacucho presentan patrones de crecimiento diferente. Este fue muy débil en el aislado A2 y el aislado A1 presenta un máximo de crecimiento a los 2 días de incubación y posteriormente tiende a decrecer (Figuras 20 a 23). Este resultado indica la capacidad de las bacterias para mantenerse metabólicamente activas en el tiempo y proliferar en el medio si las condiciones son favorables.

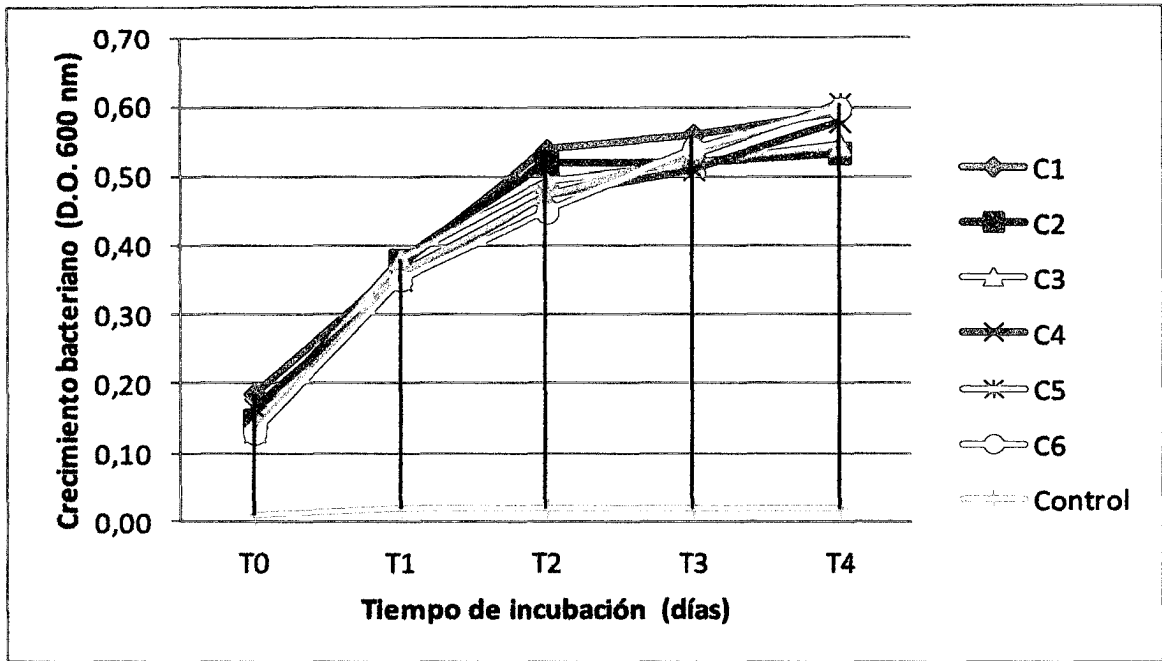


Figura 20. Crecimiento de las bacterias aisladas de la muestra de agua Carabobo

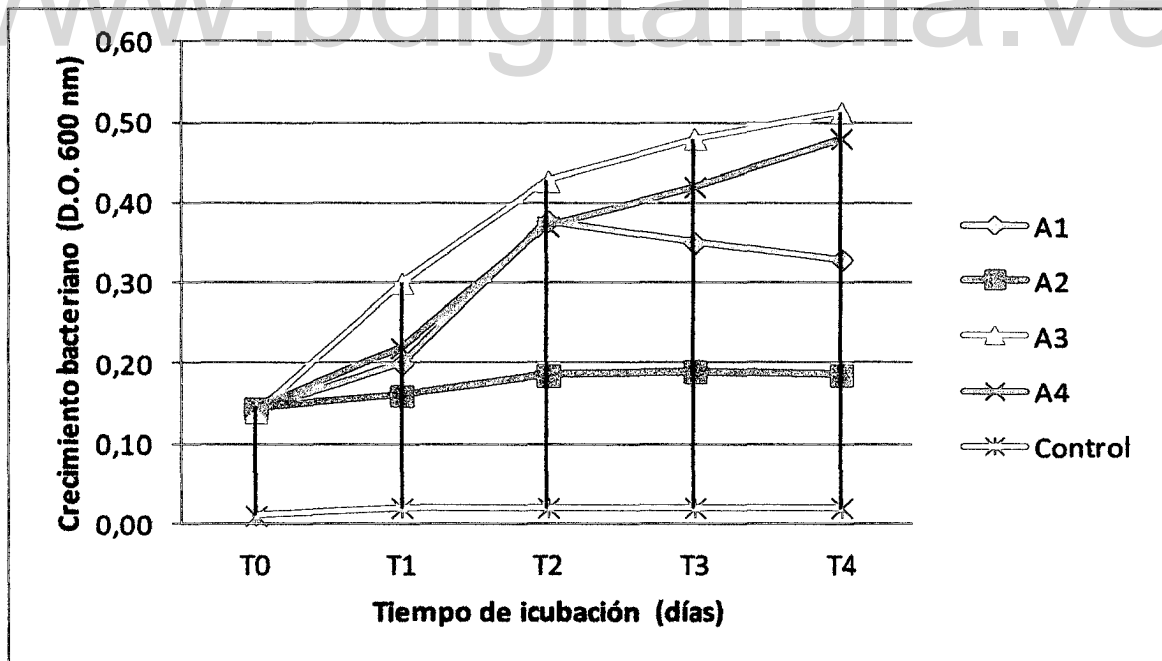


Figura 21. Crecimiento de las bacterias aisladas de la muestra de agua Ayacucho

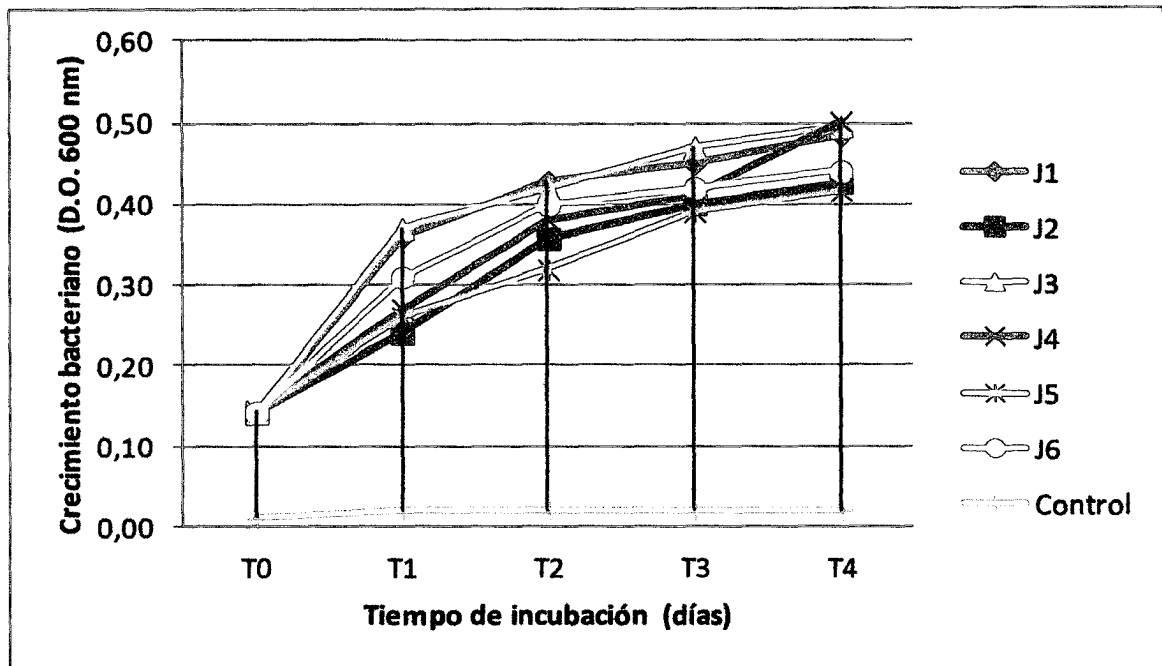


Figura 22. Crecimiento de las bacterias aisladas de la muestra de agua Junín

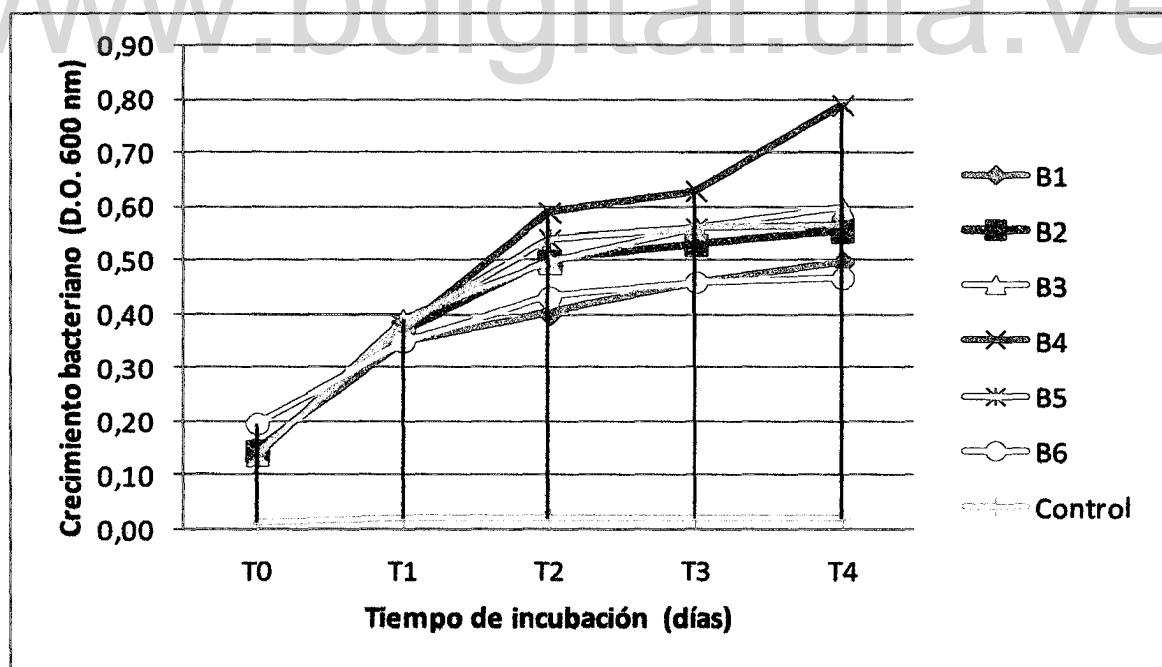


Figura 23. Crecimiento de las bacterias aisladas de la muestra de agua Boyacá

La capacidad de cada uno de los aislados para formar biopelículas en las placas de siembra también es similar. No se detecta la formación de una biopelícula apreciable por el método empleado, a excepción de la generada por el aislado A1 (Figura 24, Tabla 13) lo cual corresponde con su dinámica de crecimiento. El proceso de formación de biopelículas se inicia cuando el contenido de bacterias en la fase acuosa disminuye (bacterias planctónicas) y las células se adhieren a la superficie.

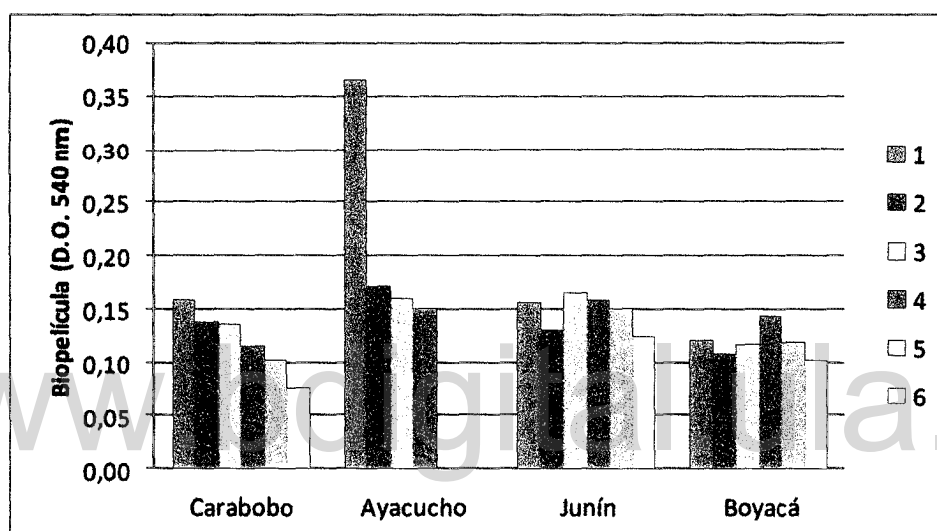


Figura 24. Capacidad de las bacterias aisladas para formar biopelículas

Tabla 13. Índice de formación de biopelículas (IFB)

	Carabobo	Ayacucho	Junín	Boyacá
1	0,08	0,29	0,08	0,04
2	0,06	0,09	0,05	0,03
3	0,06	0,08	0,09	0,04
4	0,04	0,07	0,08	0,06
5	0,02		0,07	0,04
6	0,00		0,04	0,02

5.4 Detección de bacterias presentes en aguas de pozos productores de petróleo por técnicas moleculares

5.4.1 Extracción y purificación de ADN bacteriano

El kit usado para la extracción del ADN bacterial rindió ADN en todos los aislados, aunque concentraciones muy variables, entre 16,60 y 233,39 ng/ μ l (Tabla 14).

Tabla 14. Concentración y pureza de los ADN bacterianos

Muestra	D.O.260 nm	D.O. 280 nm	Pureza (D.O. 260nm/D.O. 280nm)	Concentración (ng/ μ l)
C1	2,2950	1,3780	1,67	114,75
C2	1,7132	1,0089	1,6981	85,66
C3	4,4279	2,2054	2,0078	221,40
C4	1,6880	1,1106	1,5199	84,40
C5	1,1078	0,8531	1,2986	55,39
C6	1,3647	0,9026	1,5120	68,24
J1	3,1087	1,5865	1,9595	155,44
J2	2,7829	1,6541	1,6824	139,15
J3	2,4772	1,2064	2,0534	123,86
J4	4,3426	2,2984	1,8894	217,13
J5	3,9077	2,0033	1,9506	195,39
J6	1,9391	1,0092	1,9214	96,96
A1	0,3646	0,3835	0,9507	18,23
A2	1,3699	0,8121	1,6869	68,50
A3	2,6525	1,5138	1,7522	132,63
A4	1,9304	1,2289	1,5708	96,52
B1	4,6678	2,8180	1,6564	233,39
B2	3,0908	1,7452	1,7710	154,54
B3	1,7930	1,2388	1,4474	89,65
B4	2,4277	1,3535	1,7936	121,39
B5	3,1728	1,6338	1,9420	158,64
B6	1,2818	0,8371	1,5312	64,09
86	1,4374	0,8505	1,6901	71,87
124	1,3859	0,8664	1,5996	69,30
135	2,4697	1,4292	1,7280	123,49
180	0,3319	0,3276	1,0131	16,60
181	0,4960	0,6569	0,7551	24,80

El grado de pureza también varía y aunque todas las muestras se trataron en iguales condiciones y al mismo tiempo, estas variaciones se deben a la heterogeneidad en el tipo de células y la densidad del cultivo inicial de las baterías.

5.4.2 Diseño de iniciadores para la amplificación del ADNr 23S

Para el diseño de iniciadores se toman las secuencias reportadas en el banco de genes del NCBI para el gen ADNr 23S y se alinearon por comparación múltiple de secuencias empleando las herramientas ClustalW y MUSCLE del MBL-EBI. También se usó el programa BioEdit para Se buscan en encontrar las regiones consenso y se procedió con el diseño de los iniciadores con el software Oligo Explorer y con la herramienta Primer BLAST del NCBI.

No fue posible obtener un par de iniciadores óptimos debido a la dificultad para encontrar las secuencias representativas en las bases de datos.

Los iniciadores diseñados contienen las siguientes secuencia: F 5'GAAACCCACTGCTCGTAATG3' y R 3'CCTGGACATGGGTAGATCAC5'

Para la comprobación de la eficiencia de los iniciadores se realizaron análisis virtuales con la herramienta Test Prime de la base de datos SILVA (Figuras 25 y 26). De acuerdo al análisis SILVA, con los amplificadas obtenidos a partir de estos iniciadores podríamos identificar principalmente bacterias del género *Bacillus*.

También se evaluaron por esta herramienta los iniciadores reportados por Kotilainen y col., 1998: MS37 F 5'AGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCA3' y MS38 R 5'CCCGACAAGGAATTCGCTACCTTA3'. Estos iniciadores arrojaron

mejores resultados con la herramienta SILVA y fueron los usados para la amplificación de los ADNr 23S en este estudio.

Con este par de iniciadores la eficiencia de la reacción de PCR para la amplificación del ADNr 23S es mucho mayor ya que cubre un amplio rango de especies bacterianas para la identificación incluyendo todos los grupos bacterianos principalmente encontrados en muestras ambientales (Figuras 27 y 28)

The screenshot shows the TestPrime 1.0 web interface. At the top, there is a navigation menu with links: Home, SILVAngs, Browser, Search, Aligner, Download, Documentation, Projects, FISH & Probes, Shop, and Contact. The main content area is titled "TestPrime 1.0" and includes a "Sequence Data" section with input fields for "Forward Primer (5'...3')" containing "GAAACCCACTGCTCGTAATG" and "Reverse Primer (5'...3')" containing "CCTGGACATGGGTAGATCAC". Below this is a "Database" section with dropdown menus for "SILVA Database" (set to "LSU r115") and "Sequence Collection" (set to "Ref"). A "Mismatches" section contains dropdowns for "Maximum number of mismatches" (set to "0 mismatches") and "Length of 0-mismatch zone at 3' end". On the right side, there is a "ProbeBase Search" section with a text input field and a "Search" button. At the bottom, there is a "Job name" field, a "Reset form" button, and a "Run TestPrime" button. A large watermark "www.bdigital.ula.ve" is overlaid across the center of the image.

Figura 25. Análisis virtual de la eficiencia de los iniciadores con diseño propio por la herramienta bioinformática SILVA

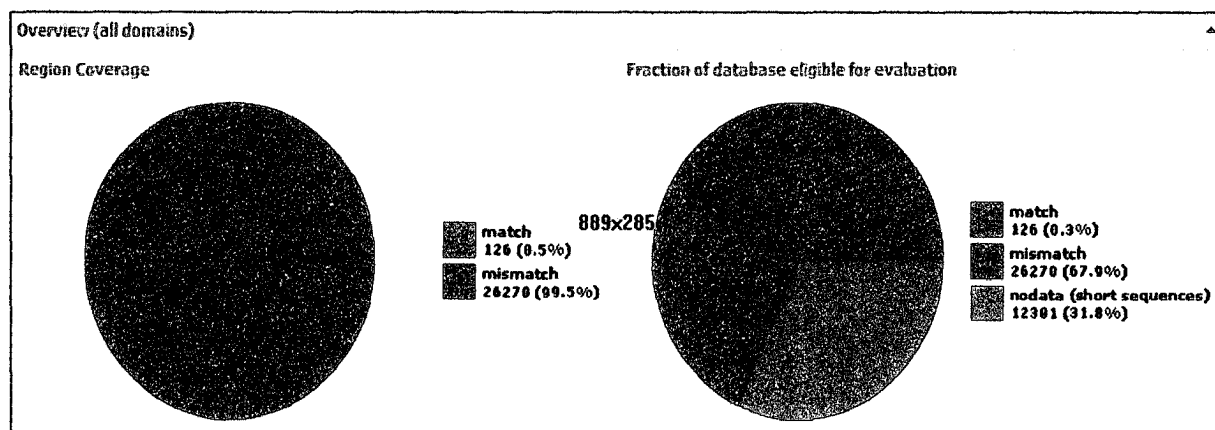


Figura 26. Resultado del análisis virtual de la eficiencia de los iniciadores diseñados por la herramienta bioinformática SILVA

Home SILVAngs Browser Aligner Download Documentation Projects FISH & Probes Shop Contact

TestPrime 1.0

Sequence Data

Forward Primer (5'...3')
AGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCA

Reverse Primer (5'...3')
CCCGACAAGGAATTTTCGCTACCTTA

Database

SILVA Database: LSU r115

Sequence Collection: Ref

960x354

mismatches

Maximum number of mismatches: 0 mismatches

Length of 0-mismatch zone at 3' end

Cart: 0

Show

Clear

Download

ProbeBase Search

Please enter the probe name or sequence:

This service is provided by

Search

Job name

Reset form Run TestPrime

Figura 27. Análisis virtual de la eficiencia de los iniciadores seleccionados (Kotilainen y col., 1998) por la herramienta bioinformática SILVA

www.bdigital.ula.ve

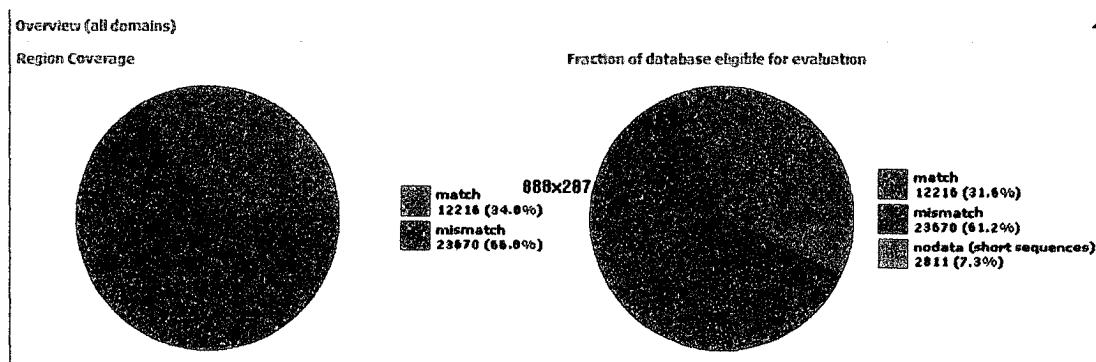


Figura 28. Resultado del análisis virtual de la eficiencia de los iniciadores seleccionados (Kotilainen y col., 1998) por la herramienta bioinformática SILVA

5.4.3 Amplificación del gen ADNr 23S

Los fragmentos de ADNr 23S amplificados se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 19:1. Las PCR de las muestras de los aislados amplificaron el fragmento de ADN de interés, de un tamaño aproximado entre 700 y 800 pb. Los fragmentos son equivalentes en tamaño a los obtenidos con las muestras de bacterias de referencia.

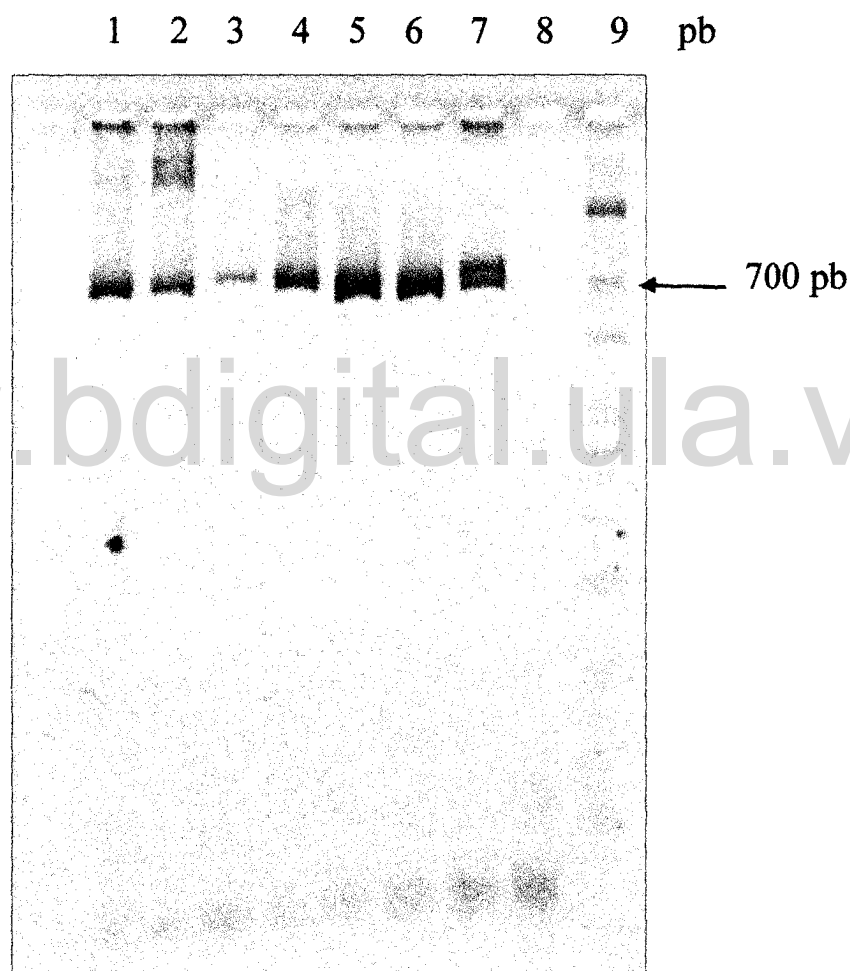


Figura 29. Amplificados de ADNr 23 S de muestras de referencia en gel de poliacrilamida 19:1. Línea 1: cepa 26, Línea 2: cepa 86, Línea 3: cepa 124, Línea 4: cepa 135, Línea 5: cepa 180, Línea 6: cepa 181, Línea 7: cepa *E. coli* K12, Línea 8: control negativo, Línea 9: Marcadores de peso molecular *HMW DNA Ladder*

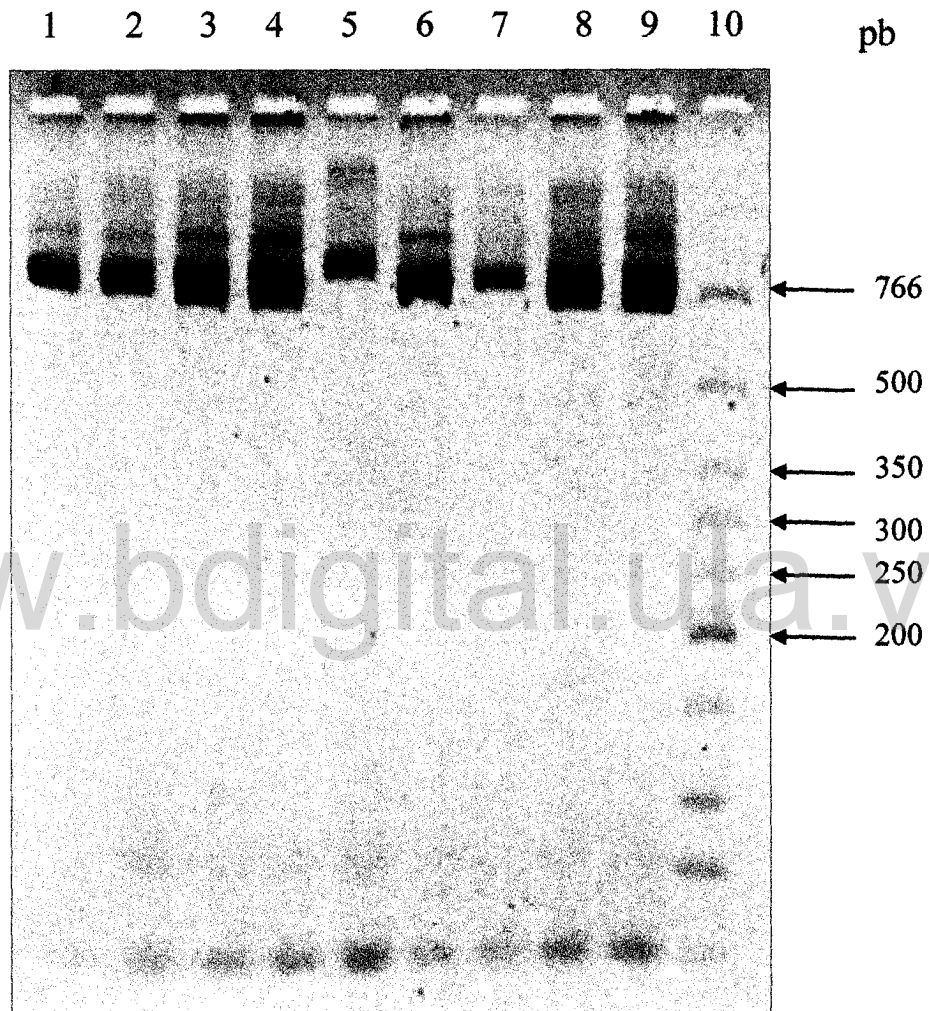


Figura 30. Amplificados de ADNr 23 S de los aislados en gel de poliacrilamida 19:1. Línea 1: aislado A3, Línea 2: aislado B1, Línea 3: aislado B2, Línea 4: aislado B3, Línea 5: aislado B6, Línea 6: aislado C2, Línea 7: aislado C5, Línea 8: aislado C6, Línea 9: aislado J3, Línea 10: Marcadores de peso molecular *LMW DNA Ladder*

5.4.4 Digestión por enzimas de restricción de productos de PCR (PCR-RFLP) de los fragmentos de ADNr 23S

A fin de realizar el análisis de restricción de los amplificadores del ADNr 23 S de las bacterias aisladas de las muestras de agua, se realizaron pruebas de digestión *in silico* utilizando la herramienta informática NEBcutter V2.0 con secuencias obtenidas de las bases de datos correspondientes a especies de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, ya que son los grupos bacterianos mayoritarios encontrados en ambientes de áreas operativas de la industria petrolera. La enzima de restricción se escogió de acuerdo a número de fragmentos obtenidos en la digestión y el tamaño de los mismos, así como, las diferencias entre las huellas moleculares entre las especies bacterianas. Se escogió la enzima HpyCH4V aunque con su uso no sería posible distinguir entre especies distintas en el género *Bacillus* pero si en *Pseudomonas*. Los resultados se muestran en las Tablas 15 a 19.

Tabla 15. Fragmentos obtenidos en la digestión virtual del ADNr 23S de *Pseudomonas aeruginosa*

Fragmento	Extremos	Nucleótidos	Longitud (bp)
1	(LeftEnd)-HpyCH4V	1-743	743
2	HpyCH4V-(RightEnd)	744-894	151

Tabla 16. Fragmentos obtenidos en la digestión virtual del ADNr 23S de *Pseudomonas putida*

Fragmento	Extremos	Nucleótidos	Longitud (bp)
1	HpyCH4V-HpyCH4V	98-744	647
2	HpyCH4V-(RightEnd)	745-895	151
3	(LeftEnd)-HpyCH4V	1-97	97

Tabla 17. Fragmentos obtenidos en la digestión virtual del ADNr 23S de *Pseudomonas huttiense*

Fragmento	Extremos	Nucleótidos	Longitud (bp)
1	(LeftEnd)-HpyCH4V	1-342	342
2	HpyCH4V-HpyCH4V	413-687	275
3	HpyCH4V-(RightEnd)	800-876	77
4	HpyCH4V-HpyCH4V	343-412	70
5	HpyCH4V-HpyCH4V	734-799	66
6	HpyCH4V-HpyCH4V	688-733	46

Tabla 18. Fragmentos obtenidos en la digestión virtual del ADNr 23S de *Bacillus liqueniformis*

Fragmento	Extremos	Nucleótidos	Longitud (bp)
1	(LeftEnd)-HpyCH4V	1-667	667
2	HpyCH4V-(RightEnd)	668-881	214

Tabla 19. Fragmentos obtenidos en la digestión virtual del ADNr 23S de *Bacillus subtilis*

Fragmento	Extremos	Nucleótidos	Longitud (bp)
1	(LeftEnd)-HpyCH4V	1-666	666
2	HpyCH4V-(RightEnd)	667-880	214

Las huellas moleculares obtenidas con la digestión de los ADNr 23S tanto de las bacterias de referencia como los aislados de las muestras de agua, coinciden con el análisis virtual en cuanto al número y tamaño aproximado de los fragmentos (Figuras 31 y 32). Estos resultados son confirmados posteriormente con la identificación de las bacterias por secuenciación y análisis de las respectivas secuencias.

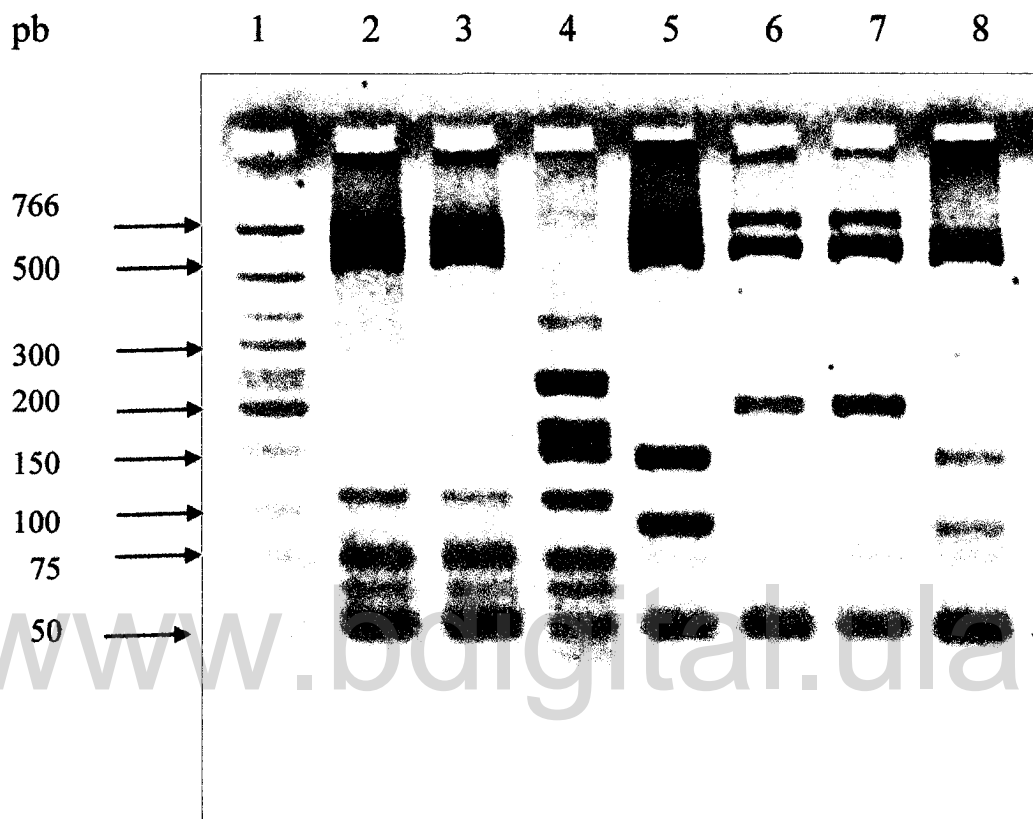


Figura 31. Huella molecular de las muestras de referencia digeridas con la enzima HpyCH4V en gel de poliacrilamida 29:1. Línea 1: Marcadores de peso molecular *LMW DNA Ladder*. Línea 2: cepa 26, Línea 3: cepa 86, Línea 4: cepa 124, Línea 5: cepa 135, Línea 6: cepa 180, Línea 7: cepa 181, Línea 8: cepa *E. coli* K12

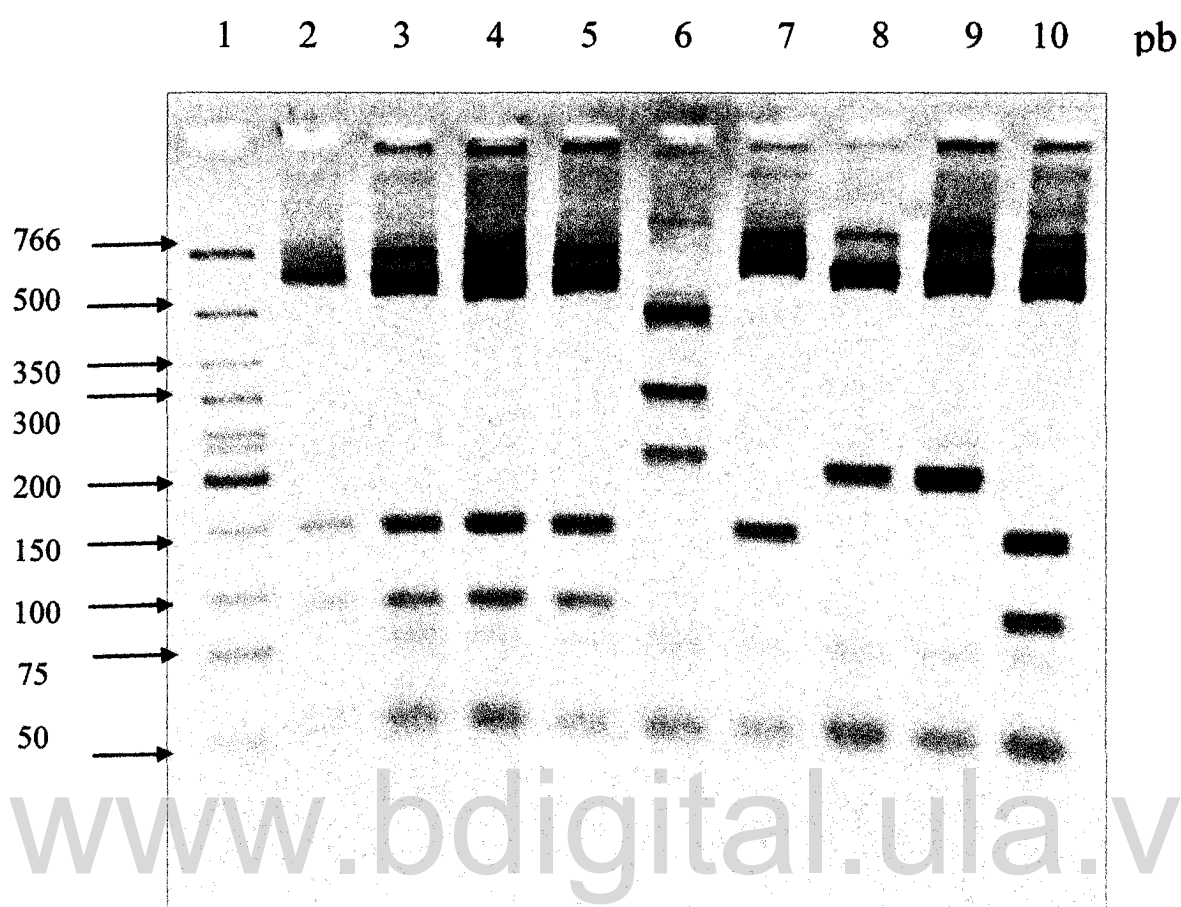


Figura 32. Huella molecular de las muestras de referencia digeridas con la enzima HpyCH4V en gel de poliacrilamida 29:1. Línea 1: Marcadores de peso molecular *LMW DNA Ladder*. Línea 2: aislado A3, Línea 3: aislado B1, Línea 4: aislado B2, Línea 5: aislado B3, Línea 6: aislado B6, Línea 7: aislado C2, Línea 8: aislado C5, Línea 9: aislado C6, Línea 10: aislado J3

5.4.5 Identificación de los aislados bacterianos por secuenciación y análisis de los ADNr 23S

Para proceder con la secuenciación, los productos de PCR del ADNr 23S se purificaron mediante un gel preparativo de agarosa, escisión del fragmento obtenido y extracción del ADN del fragmento de gel, ya que los

productos de PCR de la mayoría de las muestras presentaron fragmentos inespecíficos. La Figura 33 muestra la imagen de los geles preparativos de las muestras de referencia.

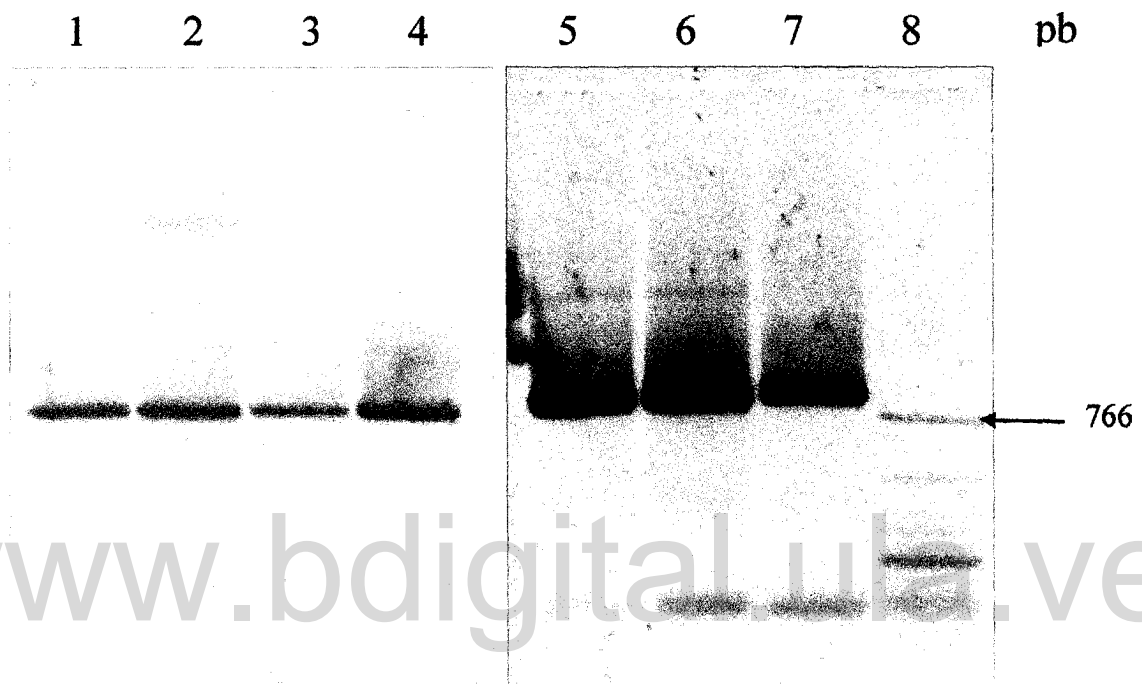


Figura 33. Geles preparativos en agarosa 1,5 % de las muestras de referencia. Línea 1: cepa 26, Línea 2: cepa 86, Línea 3: cepa 124, Línea 4: cepa 135, Línea 5: cepa 180, Línea 6: cepa 181, Línea 7: cepa *E. coli* K12, Línea 8: control negativo, Línea 9: Marcadores de peso molecular *LMW DNA Ladder*

Las secuencias obtenidas se analizaron por la herramienta BLAST del NCBI para obtener la identificación de las bacterias y se realizó el análisis filogenético para conocer la relación entre las especies bacterianas encontradas.

Los resultados de la identificación de las bacterias por alineamientos de las secuencias obtenidas del ADNr 23S se muestran en la tabla 20. De acuerdo a estos resultados, la mayoría de las especies encontradas pertenecen al género *Pseudomonas*. Estos resultados no son muy consistentes con los de las pruebas de identificación bioquímica por las cuales se detectó un mayor número de especies que por los alineamientos del ADNr 23S.

Tabla 20. Identificación de los aislados bacterianos mediante el análisis de las secuencias de ADNr 23S

Aislado bacteriano	Identificación	% de identidad	Nº de acceso Gen Bank
26	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	100	HE798385.1
86	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	96	HE798385.1
124	<i>Acidovorax avenae</i>	91	NR 103114.1
135	<i>Pseudomonas putida</i>	91	CP005976.1
180	<i>Bacillus licheniformis</i>	98	CP000002.1
181	<i>Bacillus subtilis</i>	99	CP006881.1
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	98	3J5KA
A3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	95	CP003607.1
B1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100	CP003071.1
B2	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	98	CP003071.1
B3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003071.1
B6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	88	CP006952.1
C2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98	AM181176.4
C5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98	AM181176.4
C6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	88	CP006952.1
J3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	96	CP003725.1

Los resultados de las pruebas bioquímicas muestran mayor variabilidad ya que se pueden encontrar diferencias en el comportamiento metabólico entre variedades de una misma especie. Así, las pruebas bioquímicas servirían para establecer ese tipo de diferencias entre los organismos de una población pero no es una buena herramienta para la identificación precisa de especies. Las secuencias de ADN 23S analizadas se muestran en el anexo 1.

En el análisis filogenético se observa que todas las especies encontradas se encuentran estrechamente relacionadas, lo cual podría explicar la inconsistencia con la identificación de las especies por los métodos de identificación empleados (Figura 34).

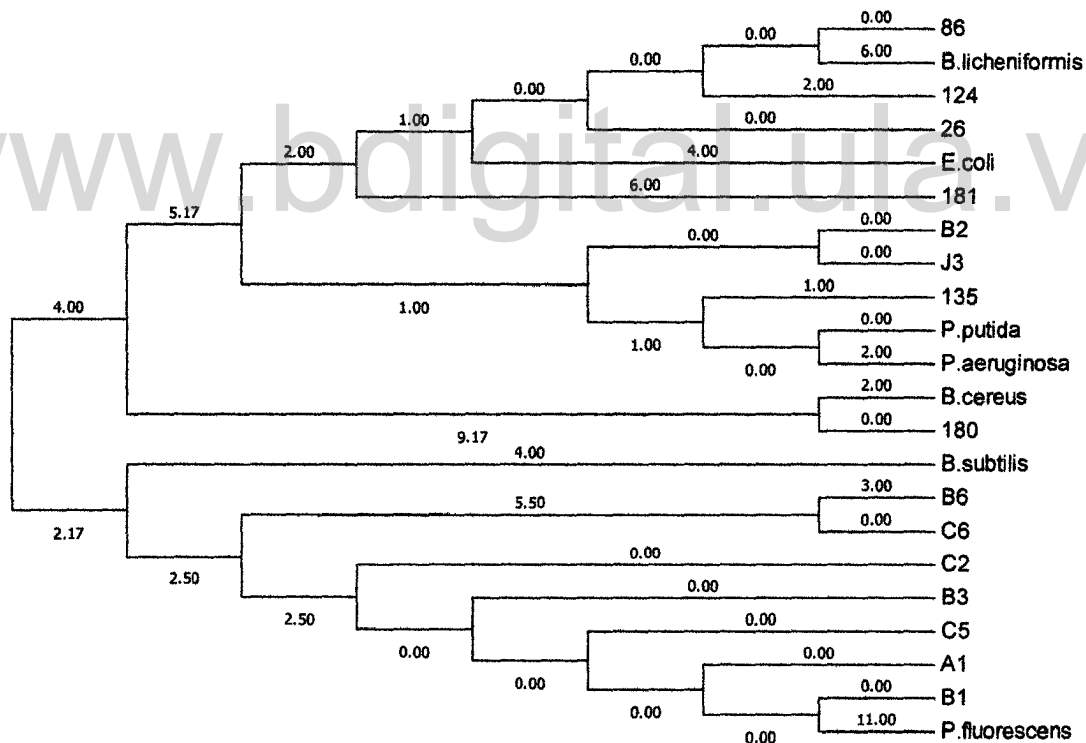


Figura34. Árbol filogenético basado en el alineamiento múltiple por el método Neighbor-Joining de secuencias parciales del ADNr 23S de las especies encontradas

Es posible que las pequeñas diferencias entre las secuencias de los ADNr 23S de los aislados no sea suficiente para discriminar entre especies de un mismo género. Así, sería necesario ahondar en el estudio de estos fragmentos para obtener alineamientos con un mayor índice de similitud con las secuencias de las bases de datos, en los casos donde la misma fue inferior al 90%.

No obstante, existe correspondencia entre la identificación de las especies bacterianas por los métodos empleados y su huella molecular por el análisis ARDRA, por lo cual, si se desea detectar uno de los géneros encontrados en este estudio de manera rápida y no se requiere del conocimiento exacto de la especie en cuestión, la técnica ARDRA diseñada y aplicada en este estudio sería una buena herramienta a utilizar para estudios posteriores.

www.bdigital.ula.ve

VI. CONCLUSIONES

1. Los métodos basados en cultivo para la identificación bacteriana tanto por técnicas microbiológicas como por técnicas moleculares, proporcionan información de los grupos dominantes en un ambiente determinado.
2. Las técnicas microbiológicas son útiles cuando se desea conocer el tipo de metabolismo presente en el área y estimar el número de microorganismos en la muestra, pero los resultados son confusos cuando se desea identificar las especies presentes.
3. Si el objetivo es la identificación a nivel de género y especie, las técnicas moleculares son las herramientas más precisas.
4. La enzima HpyCH4V fue útil para obtener huellas moleculares del ADNr 23S ya que localiza y corta fácilmente secuencias cortas en el ADN y arrojó un patrón para todas las muestras evaluadas, sin embargo, no fue posible discriminar entre patrones de restricción correspondientes a especies de *Bacillus*.
5. El análisis de restricción del ADNr 23S con la enzima de restricción HpyCH4V se complementó con la técnica de identificación por secuenciación y el análisis de las secuencias de ADNr 23S.
6. Fue posible identificar los géneros dominantes en ambientes relacionados con operaciones petroleras como son *Bacillus* y *Pseudomonas* por el secuenciación y el análisis de las secuencias de ADNr 23S.

VII. RECOMENDACIONES

1. Profundizar en el estudio de comunidades bacterianas relacionadas con ambientes petroleros con técnicas basadas en el genoma, ya que es la mejor herramienta de detección de microorganismos para el conocimiento de los grupos dominantes en un ecosistema.
2. Complementar los resultados de este estudio con la evaluación de diversidad funcional para obtener un conocimiento global de la población bacteriana.
3. Perfeccionar la metodología de PCR-RFLP del gen ADNr 23S así como estudiar la técnica con el ADNr 16S para de identificación y estudios de diversidad de bacterias ambientales.
4. Diseñar una metodología basada en las técnicas de PCR-RFLP para la detección específica de bacterias productoras de surfactantes y que intervienen en los procesos de formación de biopelículas, mediante el análisis de los genes involucrados en la producción de ramnolípido (*rhIA* y *rhIB*) en *Pseudomonas*, surfactina (*srfA*) en *Bacillus subtilis* y lichenisina (*licA*) en *Bacillus licheniformis*.
5. Diseñar una metodología basada en RAPD para el estudio de los efectos de compuestos tóxicos producto de las operaciones petroleras en el ambiente, mediante las variaciones genéticas ocasionadas en los grupos bacterianos mayoritarios encontrados en este estudio.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Arutchelvi J., Christeen J., y Mukesh D. 2011. Process optimization for the production of rhamnolipid and formation of biofilm by *Pseudomonas aeruginosa* CPCL on polypropylene. *Biochemical Engineering Journal*, 56, 37-45

Banat, I. 1993. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. *Biotechnol. Lett*, 15, 591-594.

Beech, I y Sunner, J. 2004. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 181-186.

Bonell, S. 2008. Petróleo y biotecnología: análisis del estado del arte y tendencias. *Acimed* 2009;19(1). [on line]. Última consulta: 6 de julio de 2011. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/aci/vol19_1_09/aci03109.htm.

Cha, M., Lee, N., Kim, M. y Lee, S. 2008. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. *Bioresource Technology*, 99, 2192-2199.

Delidow, B., Lynch, J., Peluso, J. White, B. 1993. Polymerase Chain Reaction. *Basic Protocols*. Chapter 1. En: *Methods in Molecular Biology*, Vol 15. PCR Protocols. Current Methods and Applications. Ed. B A White Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Desai, J. y Banat, I. 1997. Microbial production of surfactants and their comercial potential. *Microbial and Molecular Biology Reviews*, Mar, 47-64.

De Sousa, C.; Colmenares, M. y Correia, A. 2008. Contaminación bacteriológica en los sistemas de distribución de agua potable: Revisión de

las estrategias de control. Boletín de Malariología y Salud Ambiental Vol. XLVIII, N° 1, Enero-Julio, 2008.

De Wolf, H., Blust, R. y Backeljau, T. 2004. Review. The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutation Research* 566, 249-262.

Etoumi, A. 2007. Microbial treatment of waxy crude oils for mitigation of wax precipitation. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 55, 111-121.

Hasanshahian, M. y Emtiazi, G. 2008. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62, 170–178.

Herveg, J.; Barcia-Macay, M. y Lethe, B. 2006. Las ADN polimerasas (las ADN pols). Universidad Catholica de Louvain, Facultad de Medicina. *Biologia molecular*, Cochabamba, Bolivia, abril 2006. [online]. Última consulta: 20 Agosto de 2009. Disponible en: <http://genemol.org/biomolespa/Enzimas/ADN-POL.html>

Huang, Q. y Li, Q. 2009. Characterization of the 5' to 3' nuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase on fluorogenic double-stranded probes. *Molecular and Cellular Probes*, 23, 188-194.

Kesari, V. y Rangan, L. 2011. Genetic diversity analysis by RAPD markers in candidate plus trees of *Pongamia pinnata*, a promising source of bioenergy. *Biomass and Bioenergy*, 35, 3123-3128.

Kilbane, J. 2006. Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 305-314.

Kolmodin y Birch. 2002. *Methods in Molecular Biology. PCR Cloning Protocols*. 2d edition. Vol 192. Bing-Yuan Chen Ed.

Kotilainen, P., Jalava, J., Meurman, O., Lehtonen, O., Rintala, E., Seppala, O., Eerola, E., Nikkari, A. 1998. Diagnosis of Meningococcal Meningitis by Broad-Range Bacterial PCR with Cerebrospinal Fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, Aug. 1998, p. 2205–2209.

Lasa, J.; Del Pozo, J.; Penadés, R. y Leiva, J. 2011. Biofilms bacterianos e infección. *Anales del sistema sanitario de Navarra*. [online]. Última consulta: 30 de julio de 2012. Disponible en: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol28/n2/colaba.html>

León, Y., De Sisto, A., Inojosa, Y., Malaver, N. y Naranjo, L. 2009. Identificación de biocatalizadores potenciales para la remediación de desechos petrolizados de la Faja Petrolífera del Orinoco. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, vol. 1, núm. 2, julio-diciembre, 2009, pp.12-25. IDEA.

Mata-Sandoval, J., Karrs, J. y Torrents, A. 2001. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. *Microbiology Research*, 155, 249-256.

Medina, G., Juárez, K., Valderrama, B. y Soberón-Chávez, G. 2003. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR Transcriptional Regulation of the rhlAB Promoter. *Journal of Bacteriology*, 185 (20) 5976-5983.

Merkens, L.; Bryan, S. y Moses, R. 1995. Inactivation of the 5'-3' exonuclease of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1264, 243-248.

Mulligan C. y Gibbs B. 1989. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Microbiol. Biotech. 55, 3016-3019.

Mullis, Kary B. y Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology, 155, 335-350.

NACE International Publication 11206. 2006. Biocide Monitoring and Control in Cooling Towers. National Association of County Engineers.

NACE Standard TM0194-2004. Standard Test Method. Field Monitoring of Bacterial Growth in Oil and Gas Systems. National Association of County Engineers.

PDVSA - PETRÓLEOS DE VENEZUELA, S. A. Página oficial. Faja Petrolífera del Orinoco. Proyecto Magna Reserva. Informe de gestión 2010. [online]. Última consulta: 30 de noviembre de 2012. Disponible en: http://www.pdvsa.com/index.php?tpl=interface.sp/design/readmenu princ.tpl.html&n_ewsid_temas=96

Ochsner, U., Koch, A. 1994. Fiechter, A. y Reiser, J. Isolation and Characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology, 176 (7) 2044-2054.

Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G., Piotrowska-Seget, Z. y Cameotra, S. 2011. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. Int. J. Mol. Sci., 12, 633-654

Perez, F.; Baridon, M. y Henen, J. 2006. Obtención de ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* en un laboratorio de mediana complejidad. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. Oct./Dic. 2006, vol.40, no.4, p.521-524. [online]. Última

consulta: 20 Agosto 2009. Disponible en:
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572006000400013

Prensa PDVSA. 2011. Rafael Ramírez evaluó planes de producción temprana en la Faja Petrolífera del Orinoco. Correo del Orinoco, 19 de abril de 2011. [online]. Última consulta: 6 de julio de 2011. Disponible en: <http://www.correodelorinoco.gob.ve/energia/rafael-ramirez-evaluo-planes-produccion-temprana-faja-petrolifera-orinoco/>

Poggi, H., Guzmán, A., García P. y Lagos M. 2009. PCR universal o de amplio espectro. Un aporte a la detección e identificación de bacterias y hongos en la práctica clínica. *Revista Médica de Chile*, 137, 1122-1125.

Ramana, K. y Karanth, N. 1989. Factors affecting biosurfactants production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. *J. Chem. Technol. Biotechnology*, 45, 249-257.

Reis, R., Pacheco, G., Pereira, A. y Freire, D. 2013. Biosurfactants: Production and applications. – En: *Agricultural and Biological Sciences . "Biodegradation-Life of Science"*. Chapter 2. DOI: 10.5772/56144. [online]. Última consulta: 15 de noviembre de 2013. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/biodegradation-life-of-science/biosurfactants-production-and-applications>

Reis, R., Pereira, A., Neves, B. y Freire, D. 2011. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*– A review. *Bioresource Technology*, 6377–638.

Rodicio, M. y Mendoza, M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22 (4) 238-45.

Sacaca C., Iniguez, S.; Volga, R. y Roulet, M.. 2009. Diversidad y distribución de bacterias sulfato reductoras en sedimentos de lagunas de la cuenca Milluni contaminada por desechos mineros. *BIOFARBO*, vol.17, no.2, p.39-50. ISSN 1813-5363.

Sambrook, J. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schmalenbergera, A.; Tebbe, C.; Kertesz, A.; Drake, H. y Kusel., K. 2008. Two-dimensional single strand conformation polymorphism (SSCP) of 16S rRNA gene fragments reveals highly dissimilar bacterial communities in an acidic fen. *European Journal of Soil Biology*, 44, 495-500.

Simões, M., Simões, L. y Vieira, M. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 573-583.

Singh, D. y Tripathi A. 2013. Coal induced production of a rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas stutzeri* isolated from the formation water of Jharia coalbed. *Bioresource Technology*, 128, 215-221.

Soberón, G. 2009. *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios en línea*. Capítulo 3. ISBN 968-36-8879-9 [online]. Última consulta: 15 de noviembre de 2013. Disponible en:http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_06/Capitulo06.pdf

Sullivan, E. 1998. Molecular genetics of biosurfactant production. *Current Opinion in Biotechnology*, 9, 263-269.

Tolvanen, K. y Karp, M. 2011. Molecular methods for characterizing mixed microbial communities in hydrogen-fermenting systems. *International journal of hydrogen energy*, 36, 5280-5288.

Van Elsas, J. y Boersma, F. 2011. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *European Journal of Soil Biology*, 47, 77-87.

Xiaoqi, Z.; Yanfen, W.; Ying, K.; Xiangzhong, H.; Yanbin, H.; Jianqing, T. y Tuanyao, C. 2007. PCR-DGGE detection of the bacterial community structure in the Inner Mongolia steppes with two different DNA extraction methods. *Acta Ecologica Sinica*, 27 (5) 1684-1689.

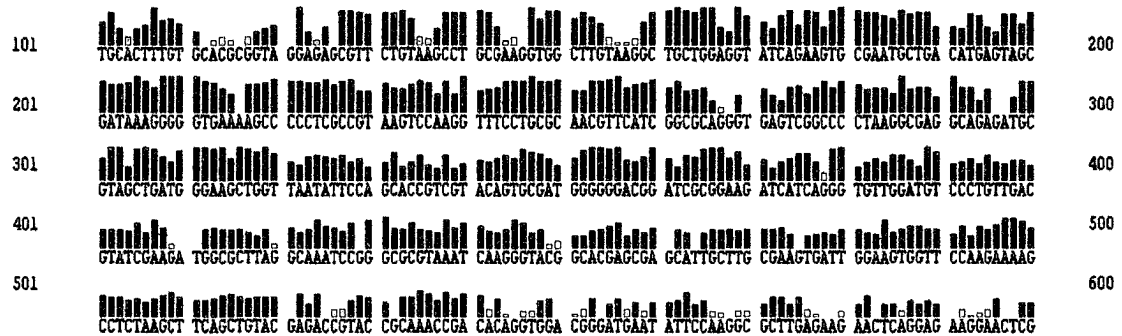
Yilmaz, P., Kottmann, R., Pruesse, E., Quast, C., Glöckner, F. 2011. Analysis of 23S rRNA genes in metagenomes – A case study from the Global Ocean Sampling Expedition. *Systematic and Applied Microbiology*, 34, 462-469.

ANEXOS

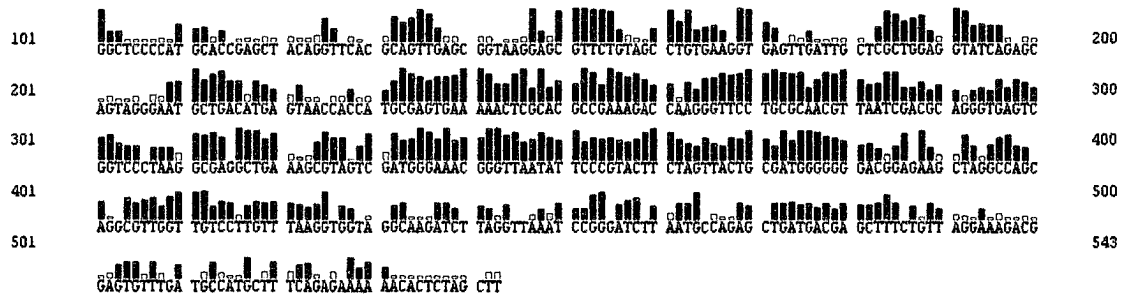
www.bdigital.ula.ve

Anexo 1. Secuencias obtenidas de cada una de las muestras

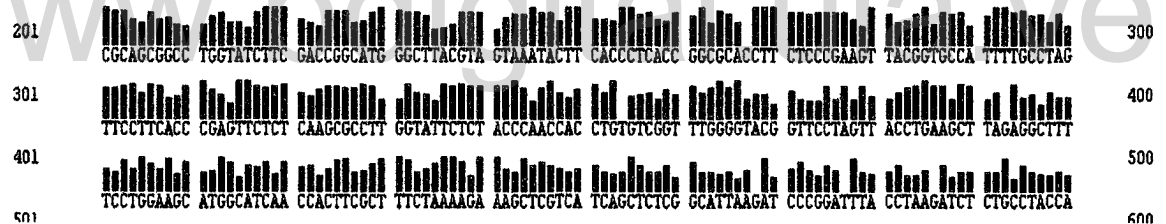
F26



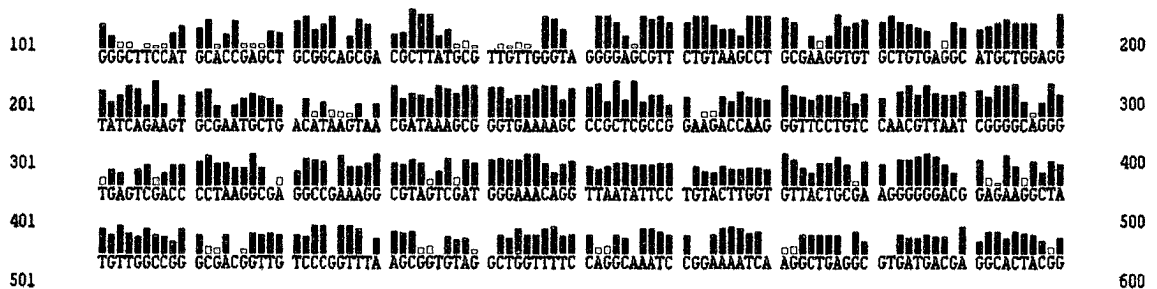
FB2



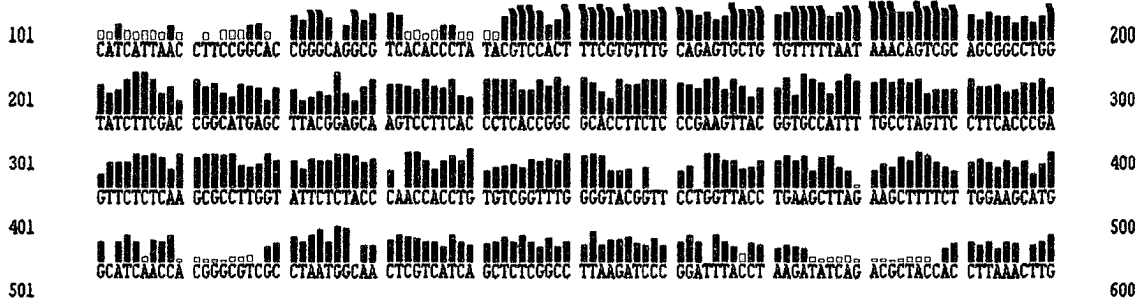
RB3



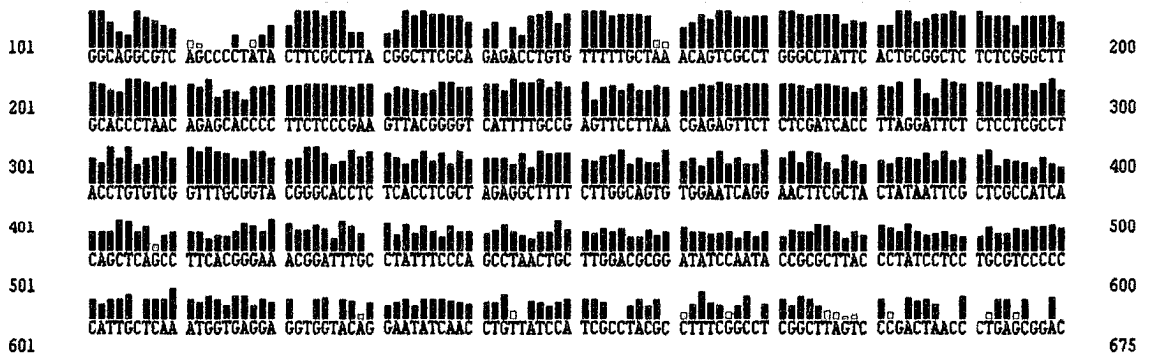
FC



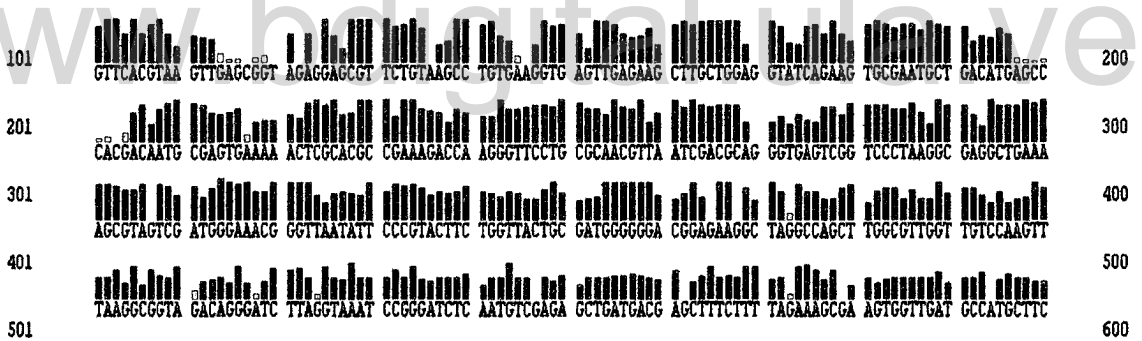
RC2



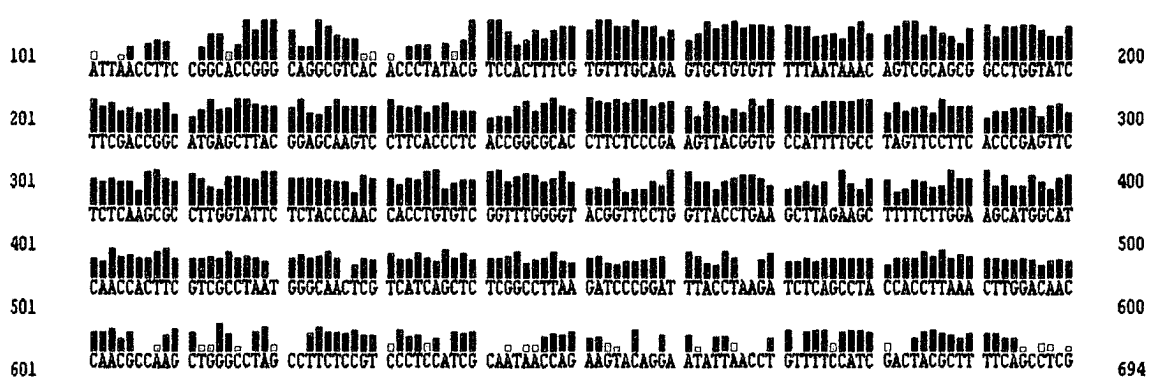
RC6



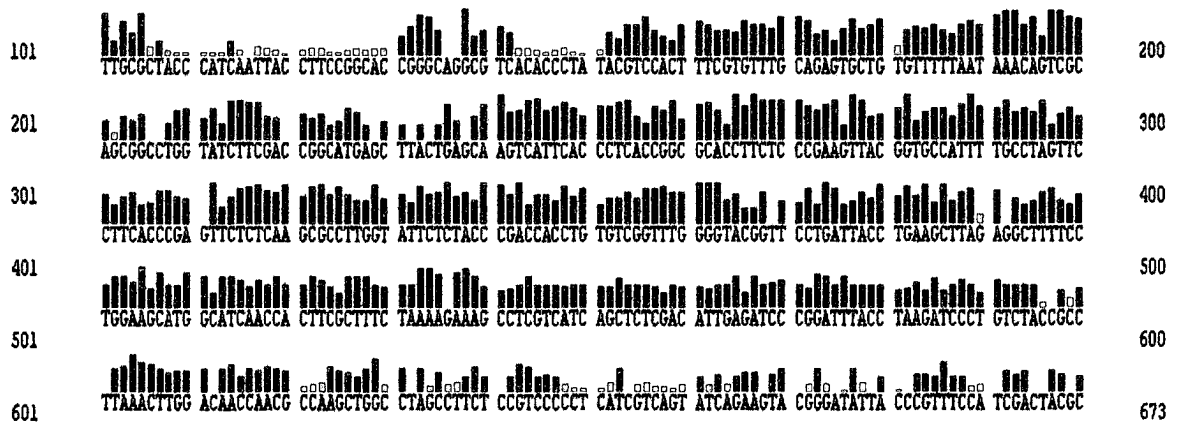
FJ3



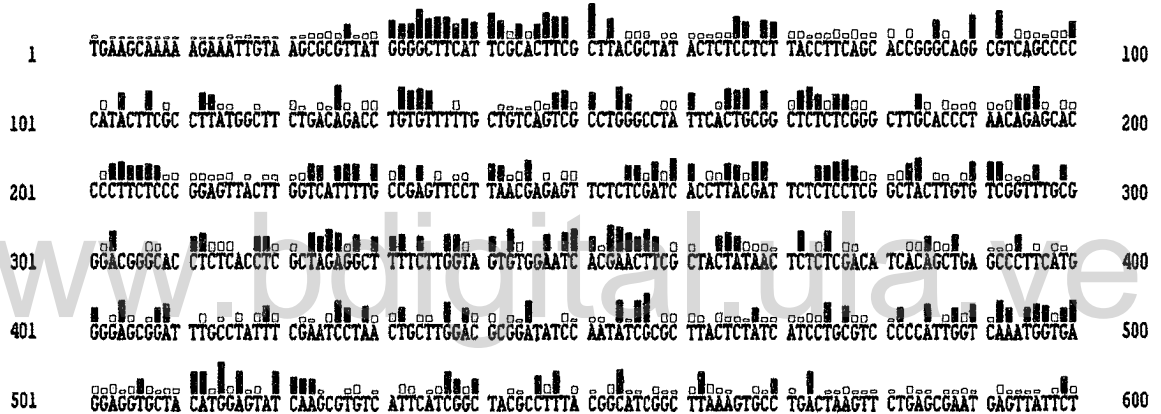
RC5



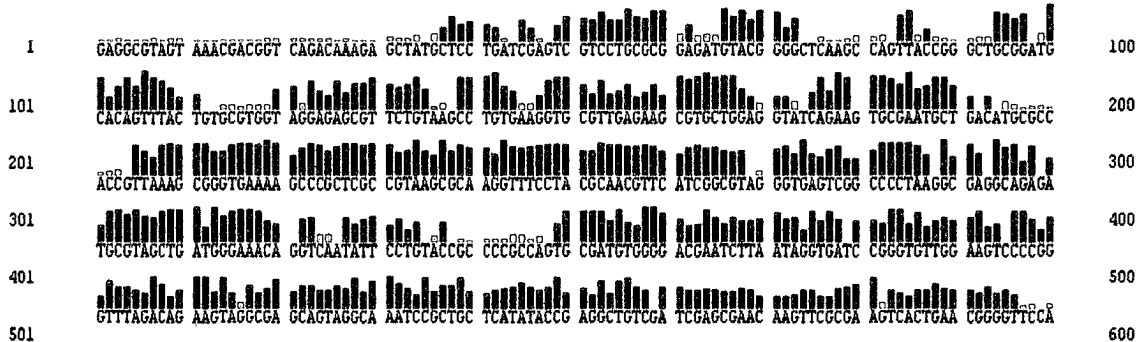
RA3



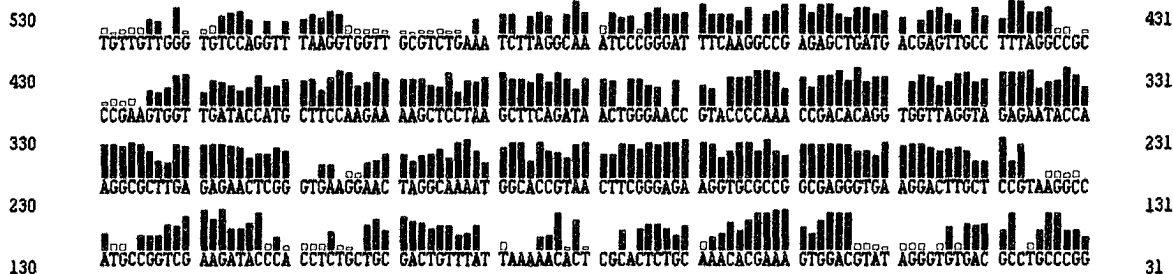
RB6



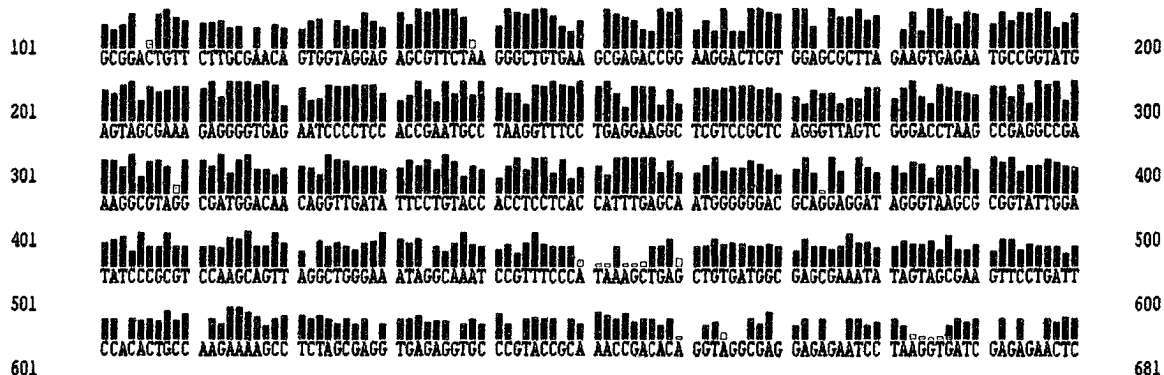
F124



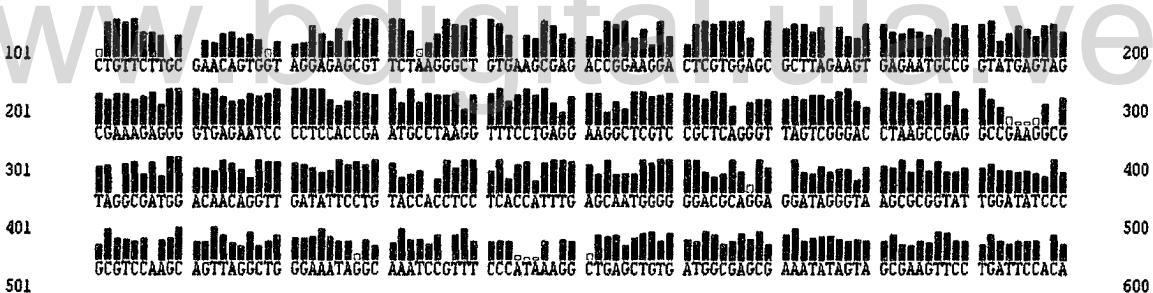
R135



F180



F181



F86

