

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO**

**INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL:**

**“Detección de genes 16S RNA de bacterias y arqueas procedentes de  
núcleos de perforación de petróleo”.**

**PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO:**

**“Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y  
productos biológicos”.**

**ALUMNO:** Castillo López María Trinidad      **Matrícula:** 99233000

**ASESOR(ES):** Dr. Hugo César Ramírez Saad

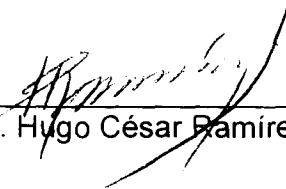
M. en B. Aida Hamdan Partida


**LUGAR DE REALIZACIÓN:** Laboratorio de Ecología Molecular

**FECHA DE INICIO Y TERMINACIÓN:** 15 de Marzo del 2004 y 15 de  
Septiembre del 2004.

ENERO, 2005.

Vo. Bo. DE LOS ASESORES

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Hugo César Ramírez Saad

  
\_\_\_\_\_  
M. en B. Aída Hamdan Partida

## 1. ÍNDICE

1. ÍNDICE .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	4
3. MARCO TEÓRICO .....	4
3.1 CARACTERÍSTICAS DEL SUBSUELO .....	4
3.1.2 MICROBIOLOGÍA DEL SUBSUELO .....	7
3.2 MICROORGANISMOS QUE HABITAN EN AMBIENTES EXTREMOS .....	11
3.3 IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA DE LOS MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS .....	13
3.3.1 HIPERHALÓFILOS .....	14
3.3.2 BAROFÍLICAS .....	14
3.4 COMUNIDADES MICROBIANAS .....	15
3.4.1 MICROORGANISMOS NO CULTIVABLES .....	16
3.5 16S rRNA COMO BIOMARCADOR .....	17
3.6 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR .....	20
3.7 EXTRACCIÓN DE DNA DE COMUNIDADES MICROBIANAS .....	20
3.8 AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....	21
3.8.1 ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DE DESNATURALIZACIÓN (DGGE) .....	22
3.9 PURIFICACIÓN DE DNA DE PRODUCTOS DE PCR .....	22
3.10 CLONACIÓN .....	23
3.11 SECUENCIACIÓN .....	24
4. OBJETIVO GENERAL .....	25
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES .....	25
5. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO .....	26
5.1 MATERIAL Y MÉTODOS .....	26
5.1.2 ELECTROFORESIS .....	27
5.2 REACCIÓN DE PCR PARA EL GEN 16S rRNA .....	28
5.3 REACCIÓN DE PCR PARA LA REGIÓN V6-V8 DEL GEN 16S rRNA .....	31
5.4 REACCIÓN DE PCR PARA LA REGIÓN V1-V8 DEL GEN 16S rRNA .....	33

5.5 REACCIÓN DE PCR PARA EL GEN 16S rRNA DE ARQUEAS. ....	35
5.6 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR DEL GEN 16S rRNA.....	37
5.7 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR CON FILTROS MONTAGE®	37
5.8 PURIFICACIÓN CON WIZARD® DNA CLEAN-UP RESINA.....	38
5.9 ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DE DESNATURALIZACIÓN (DGGE).....	39
5.9.1 TINCIÓN DE PLATA DEL GEL DE POLIACRILAMIDA.....	42
5.10 CLONACIÓN.....	43
5.10.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA CLONACIÓN.....	43
5.10.2 CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR CON UN VECTOR PGEM®- T SYSTEM II.....	44
5.10.3 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES JM109 DE ALTA EFICACIA.....	45
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
6.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR.....	48
6.1.1. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN 16S rRNA.....	48
6.1.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN V6-V8 DEL GEN 16S rRNA .....	49
6.1.3 REAMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN 16S rRNA.....	50
6.1.4 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN V1-V8 DEL GEN 16S rRNA .....	51
6.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN 16S rRNA DE ARQUEAS.....	51
6.3 PURIFICACIÓN DE PRODUCTO DE PCR DE LA REGIÓN V1-V8 DEL GEN 16S rRNA.....	52
6.3.1 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR DE LA REGIÓN V1-V8 DEL GEN 16S rRNA CON WIZARD®.....	52
6.3.2 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR DE LA REGIÓN V1-V8 DEL GEN 16S rRNA CON FILTROS MONTAGE®.....	52
6.3.3 DINÁMICA DE POBLACIONES.....	53
6.4 CLONACIÓN.....	54
6.4.1 SECUENCIACIÓN.....	55

7. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS .....	63
8. CONCLUSIONES .....	64
9. BIBLIOGRAFÍA .....	65
10. ANEXO 1.....	70

## **2. INTRODUCCIÓN**

Los microorganismos extremófilos tales como bacterias y arqueas están siendo estudiados por sus características de adaptación a ambientes extremos, estos microorganismos son susceptibles a ser usados en diversos procesos biotecnológicos como recuperación mejorada de petróleo, la desulfuración de hidrocarburos, la lixiviación de metales, en donde las condiciones de temperatura, salinidad y presión son generalmente elevadas. Por otro lado, existe un gran interés en las enzimas que estos microorganismos poseen, debido a la estabilidad que presentan ante las condiciones extremas como pueden ser temperatura alta, elevada salinidad, etc.

Como un primer acercamiento al estudio de las comunidades procarióticas de yacimiento petroleros. Se detectarán mediante PCR-DGGE, el gen 16S rRNA de las bacterias presentes en núcleos de perforación.

## **3. MARCO TEÓRICO**

### **3.1 CARACTERÍSTICAS DEL SUBSUELO**

El término subsuelo, es el espacio físico comprendido dentro de los sistemas intermedio y regional donde las comunidades microbianas que no tienen contacto alguno con el exterior. Esta consideración es independiente de la profundidad total y toma en cuenta las características hidrológicas de los sistemas bajo estudio. Los sistemas intermedios tienen una tasa de recambio de material de  $0.01-1 \text{ cm}^3/\text{año}$  y un flujo de agua de  $0.1-1 \text{ m}^3/\text{año}$ . Por otro lado en los sistemas regionales, el recambio de material se realiza sólo en la zona que divide al sistema intermedio del regional; y la descarga de agua sucede en el fondo de la base mismo sistema, además, la conexión con la superficie terrestre es mínima. En el subsuelo, las formaciones rocosas generalmente están constituidas por compuestos que contienen carbono, nitrógeno, fósforo y trazas de metales, que son utilizados por los microorganismos y que permiten sintetizar sus constituyentes celulares (Smith, 1997; Madigan y col., 1998).

El tipo de formación geológica y el tamaño del poro de la roca son importantes, porque permiten que los microorganismos se adhieran, crezcan y proliferen en esos hábitat (Krumholz, 1998), aunque se pensaría que las rocas de origen ígneo, por poseer poca o ninguna materia orgánica, son inadecuadas para promover la vida de los microorganismos. Sin embargo, en 1995 se encontraron comunidades microbianas, a una profundidad de 1500 m, en rocas ígneas pertenecientes a una formación geológica de basalto, en la cuenca del Río Columbia, Washington (Stevens y McKinley, 1995). Científicos suecos han demostrado la existencia de microorganismos quimiolitótrofos a una profundidad de 400 m en formaciones de granito, al sur de Suecia (Pedersen, 1993; Monasiersky, 1997).

En los ambientes sedimentarios, la materia orgánica está compuesta por azúcares, aminoácidos, ácidos grasos y monoaromáticos, que pueden ser mineralizados a  $\text{CO}_2$  cuando el  $\text{O}_2$  disponible es el que se encuentra disuelto en el agua de formación o de subsuelo (Figura 1) (Smith, 1997). Por otro lado, los reductores de nitrato de amonio (proceso desasimilatorio), compiten con los desnitrificadores por el nitrato (Lovley y Chapelle, 1995).

SUPERFICIE TERRESTRE

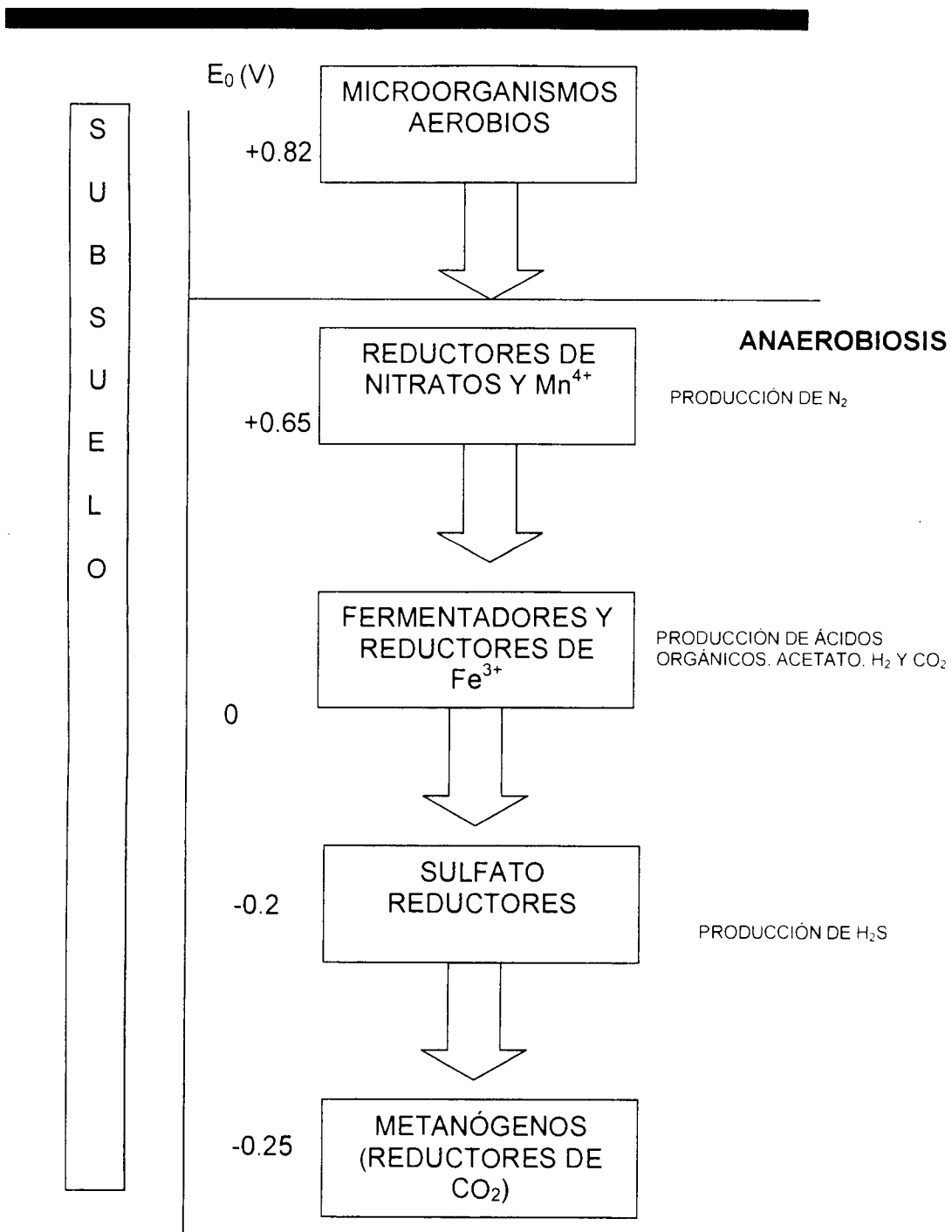


Figura 1. Esquema de la distribución de algunos consorcios de microorganismos en el subsuelo.  $E_0$  es el potencial redox en voltios en el cual pueden ocurrir los procesos metabólicos mencionados.



### 3.1.2 MICROBIOLOGÍA DEL SUBSUELO

La microbiología del subsuelo tiene sus raíces en al menos tres disciplinas: Microbiología, Geología e Hidrología y se enfoca en la Ecología Microbiana y Biogeoquímica de sedimentos continentales, de rocas porosas del subsuelo, de sedimentos de grandes profundidades oceánicas y de zonas del ártico. Por otro lado, la Ecología de los acuíferos o de los sistemas de agua del subsuelo, es más antigua y sus raíces son la Ecología y la Limnología. Hace más de una década, la investigación dentro de la Microbiología del subsuelo, sufrió un avance acelerado gracias a la urgente necesidad de comprender los procesos de contaminación en los acuíferos (Ghiorse, 1997). Sin embargo, otra porción importante de estos avances, se ha debido a las tecnologías innovadoras para perforar y obtener muestras de agua de subsuelo o salmuera y núcleos de formaciones geológicas; a pesar de ello, obtener una muestra representativa de sólidos, de agua, o de aceite, se convierte en una tarea difícil de realizar. Tomar las precauciones necesarias para prevenir la contaminación de las muestras, ha significado el rediseño de una parte de equipo de perforación, así como el uso de fluidos especiales, (que remueven los cortes de perforación), cuya formulación contiene moléculas marcadoras que indican, en el sólido cortado (núcleo), hasta donde es posible que se encuentren microorganismos que no son precisamente del subsuelo o del sistema en cuestión. El conocimiento de las comunidades del subsuelo ha sido limitado, porque los costos de perforación y de obtención de las muestras, en muchas ocasiones, rebasan los costos de los análisis y de la propia investigación; generalmente se aprovechan los programas de exploración, en los que se perforan pozos para la extracción de petróleo, de aguas o de algún material de interés, muchos de estos programas se encuentran bien establecidos y financiados, por lo que se hace aún más difícil adecuar las condiciones microbiológicas necesarias para obtener una muestra representativa (Fredrickson y Phelps, 1997).

### 3.1.3 MICROORGANISMOS DEL SUBSUELO.

El ambiente del subsuelo brinda las condiciones necesarias para promover el crecimiento de microorganismos ya que estos poseen adaptaciones fisiológicas que les permiten crecer y sobrevivir por largos períodos. Se propone que las comunidades microbianas que se han encontrado a grandes profundidades, han llegado hasta allí a través de los procesos de recirculación de material y agua, y han sido susceptibles de selección natural dentro del ambiente del subsuelo (Harvey y col., 1997). La emanación de gases reducidos del interior de la Tierra, que posiblemente forman parte muy importante en los microambientes, es otro factor que permite la existencia de los microorganismos en el subsuelo (Lovley y Chapelle, 1995).

Uno de los primeros reportes de que existen microorganismos en el subsuelo se encuentran registrado de 1926 cuando se comprobó la presencia de bacterias reductoras de sulfatos en pozos petroleros, éstas fueron aisladas de una muestra de agua obtenida de un yacimiento, a varios cientos de metros de la superficie terrestre (Fredrickson y Onstott, 1996).

En los años 40 y 50, Zhou y col. estudiaron los microorganismos existentes en yacimientos petroleros y algunos procesos metabólicos microbianos que se presentan en los sedimentos marinos. Durante los años 60 y 70, las investigaciones acerca de los microorganismos del subsuelo disminuyeron notablemente, debido a la ausencia de una metodología confiable que permitiera obtener muestras de microorganismos de subsuelo, sin que esta se contaminara con microorganismos existentes en la superficie terrestre (Fredrickson y Phelps, 1997).

La evidencia indica que la mayoría de los ambientes del subsuelo posee comunidades ecológicas, cuyas características estructurales, fisiológicas y reproductivas, que les han permitido sobrevivir y dispersarse bajo condiciones tan estrictas como las del subsuelo (Harvey y col., 1997). Microorganismos que reducen el hierro de manera desasimilatoria como: *Geobacter*, *Shewanella*.

*Pelobacter*, *Geovibrio*, *Geospirillum*, *Ferrimonas*, *Geotrix*, *Desulfuromusa* y *Desulfuromonas*, son ejemplos de bacterias aisladas de agua localizada en el subsuelo, algunos termofilicos se han incluido en esta lista, como *Bacillus infernus*, *Thermoterrabacterium*, *Deferribacter thermophilus*, *Thermoanaerobacter spp.*, y el últimamente incluido, *Thermus*, hallado en una muestra de agua de formación de subsuelo, tomada a una profundidad de 3200 m, de una mina de oro en el Sur de África, cuya formación rocosa tiene una temperatura de 65°C (Kieft y col., 1999).

Dependiendo del aceptor final de electrones presente en los ambientes del subsuelo, se definen las comunidades microbianas en consorcios que responden a un gradiente determinado como se muestra en la Figura1 (Madigan y col., 1998).

Por otra parte hay que destacar que la luz solar no está disponible, por lo que el fenómeno de fotosíntesis no se lleva cabo, sin embargo, la vida microbiana se abastece de fuentes de energía química que han sido incorporadas por el proceso de sedimentación o que se han incorporado al sistema como componentes solubles en agua; estas fuentes de energía son la materia orgánica y otros compuestos inorgánicos reducidos ( $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $NH_4^+$ , y  $S^0$ ), que pueden ser oxidados para obtener energía (Ehrlich, 1996; Smith, 1997).

En 1987, el Departamento de Energía de los Estados Unidos, junto con geólogos y microbiólogos colaboradores de Onstott, perforaron una formación geológica en Carolina del Sur, cerca del Río Savannah, los núcleos eran colectados en contenedores estériles y con atmósfera libre de oxígeno; lograron aislar microorganismos, de varios pozos de extracción de profundidades desde 500 hasta 2800 m, con temperaturas de 75°C y en ocasiones más altas (Monasiersky, 1997). Los hallazgos que se describieron, sugieren que la presión es un factor que no afecta la sobrevivencia de los microorganismos, ya que éstos pueden adaptarse paulatinamente a una presión determinada. Sin embargo, la presencia de oxígeno y la temperatura son factores decisivos para la vida de éstos microorganismos (Fredrickson y Onstott, 1996; Mcinerney y Sublette, 1997).

Analizando el gradiente que se muestra en la Figura 1, se logra observar que la cantidad de oxígeno es cada vez menor por lo que, los microorganismos están limitados en cuanto al tipo de compuestos orgánicos que pueden oxidar completamente; aquellos que utilizan el  $\text{Fe}^{3+}$  como aceptor de electrones, pueden mineralizar vía oxidativa ácidos orgánicos simples, ácidos grasos de cadena larga y compuestos monoaromáticos hasta  $\text{CO}_2$ .

Cuando el nitrato se encuentra disminuido, los microorganismos fermentadores se hacen cargo de la hidrólisis de compuestos orgánicos, produciendo acetato,  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$  (Smith, 1997).

El consorcio que sigue es el de las bacterias anaerobias sulfato-reductoras (SBR), éste también puede oxidar compuestos orgánicos con la reducción desasimilatoria de sulfato a  $\text{H}_2\text{S}$  (Lovley y Chapelle, 1995). El  $\text{H}_2\text{S}$  que produce este grupo es muy reactivo, y dentro del contexto biogeoquímico es importante porque provee la fuente de azufre necesaria para los microorganismos oxidadores de azufre. Además de su capacidad para utilizar el azufre en diferentes estados intermediarios de óxido-reducción, se ha comprobado que las SRB son capaces de oxidar productos de fermentación, tales como ácidos grasos, alcoholes, algunos ácidos aromáticos, aminoácidos e hidrógeno (Hines y col., 1997).

Los microorganismos que se encuentra a mayor profundidad, son las metanógenicas, su existencia está limitada a cierto tipo de condiciones y de compuestos orgánicos. El aceptor de electrones ( $\text{CO}_2$ ) para este consorcio es generado por la misma comunidad microbiana del subsuelo, y también por los carbonatos que muchas veces están presentes en las formaciones rocosas. Sin embargo, no todo el metano que está presente es derivado de la reducción del  $\text{CO}_2$ , también es producido por la utilización microbiana del acetato, mismo que es generado durante el proceso de fermentación (Smith, 1997).

Estas comunidades presentan un arreglo muy particular, la estructura está definida por microorganismos quimiolitótrofos, el aceptor de electrones de los metanógenos, de los sulfato-reductores y el gas  $\text{H}_2$  que usan los homoacetógenos

como donador de electrones para reducir el CO<sub>2</sub>, son producidos abióticamente. Estas estructuras microbianas son llamadas "SlIMEs (Subsurface Lithoautotrophic Microbial Ecosystems) (Stevens y McKinley, 1995; Fredrickson y Onstott, 1996).

### **3.2 MICROORGANISMOS QUE HABITAN EN AMBIENTES EXTREMOS**

Una gran cantidad de microorganismos, se distinguen por su adaptación a los ambientes extremos en temperatura, salina, presión, pH y a cantidades pequeñas de oxígeno, por lo que se les ha llamado microorganismos extremófilos (Madigan y col., 1998).

La investigación acerca de microorganismos extremófilos ha tomado tal fuerza, que la Fundación Nacional para la Ciencia en Estados Unidos (NSF), ha emprendido un ambicioso programa llamado LexEN "Life in Extreme Environments" (Holden, 1997).

Algunos de los extremófilos que han sido estudiados, comprenden especies que habitan en ambientes donde las temperaturas rebasan los 60°C. Por ejemplo, bacterias como *Thermus aquaticus* que se desarrolla en aguas termales a una temperatura óptima de 75°C, *Thermotoga sp.* que crece a 90°C y comprende tanto especies de fuentes termales marinas como continentales, *Aquifex* que crece a 95°C en fuentes termales submarinas de origen volcánico. *Thermotoga* y *Aquifex* representan el más antiguo de todos los linajes del dominio Bacteria (Figura 2) (Madigan y col., 1998).

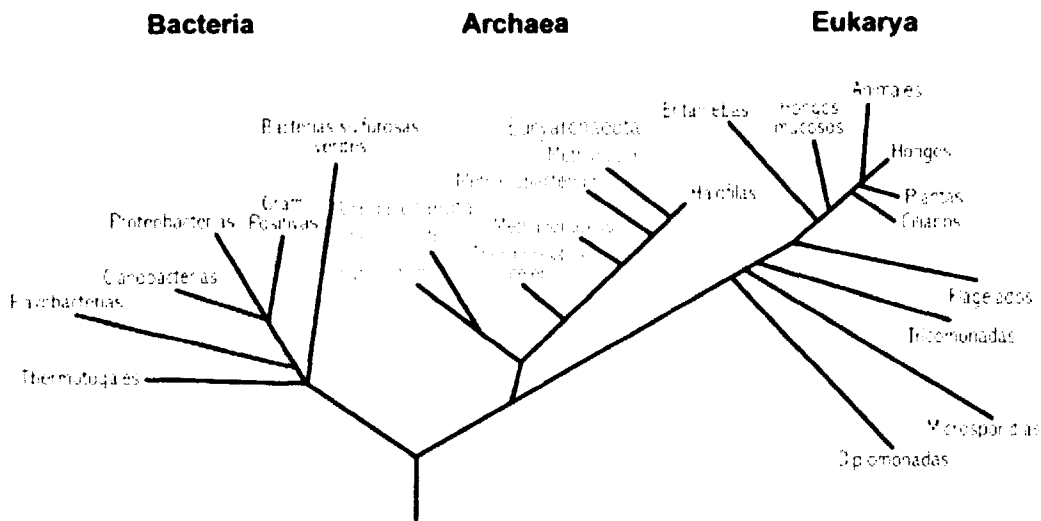


Figura 2. Árbol filogenético de la diversidad microbiana (Madigan y col., 1998).

Existen varios reportes de arqueas extremófilas, tal es el caso de *Sulfolobus sp.* que crece a 85°C, con un pH de 3 y metaboliza azufre elemental en condiciones aerobias, este microorganismo habita en ambientes de aguas continentales y marinas termales (Seegerer y Stetter, 1992).

*Pyrococcus woesei* es anaerobia, su temperatura óptima de crecimiento es de 104°C, tiene la capacidad de producir H<sub>2</sub>S a partir de H<sub>2</sub> y S<sup>0</sup> como una fuente accesoria de energía (Zilling, 1992).

*Pyrodictium occultum* es un quimiolitioautótrofo de ambientes volcánicos marinos, que obtienen energía de la reducción de azufre con hidrógeno, produciendo H<sub>2</sub>S, usa el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono y crece de manera óptima a los 110°C (Huber y Stetter, 1992).

*Methanopyrus* produce metano en el fondo oceánico (a 2000 m) cerca de las emanaciones de gases de solfataras, donde la temperatura está por arriba de 100°C. Este microorganismo ha atraído el interés en el ambiente científico, porque dentro del árbol filogenético del dominio Archaea (Madigan y col., 1998).

El descubrimiento de termofilicos reductores de  $Fe^{3+}$  y productores de cristales extracelulares de magnetita ( $Fe_3O_4$ ) y maghemita ( $\gamma-Fe_2O_3$ ), y aislados de la superficie terrestre por millones de años, tiene un gran significado dentro del contexto evolutivo, porque se propone que la reducción desasimilatoria de  $Fe^{3+}$ , es una de las primeras formas de respiración microbiana y que quizá haya influido microorganismos fueron encontrados en formaciones geológicas del triásico (en Virginia) y del Cretácico (en Colorado), a profundidades de 2096 m y de 2798 m, respectivamente, y a temperaturas que oscilan entre los  $65^{\circ}C$  y los  $85^{\circ}C$ . El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA, arroja una similitud de  $\approx 98\%$  con respecto a las especies de *Thermoanaerobacter* (Liu y col., 1997).

Los ecólogos microbianos han estudiado los microorganismos representativos del mundo microbiano que muestran adaptaciones a las condiciones más extremas que pueden tolerar la vida (Atlas, 2002). Muchos microorganismos que crecen a altas temperaturas poseen adaptaciones que les confieren termoestabilidad a componentes como las enzimas, los ácidos nucleicos y los lípidos. Se ha registrado el funcionamiento de estos componentes a temperatura tan altas como a los  $80^{\circ}C$  y un a calor de  $114^{\circ}C$ , muy por encima del punto de ebullición del agua (Madigan y Mairs, 1997).

### **3.3 IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA DE LOS MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS**

Las aplicaciones biotecnológicas de los extremófilos están encaminadas a la utilización de sus características adaptativas de estos microorganismos, mismas que les permite habitar en ambientes con condiciones muy particulares.

Un ejemplo del uso de este potencial, se demuestra con la enzima termoestable *Taq* DNA polimerasa, que actualmente es usada para PCR. Fue encontrada en la bacteria extremófila *Thermus aquaticus*, aislada del Parque Nacional de Yellowstone, en Estados Unidos y fue descrita por primera vez en 1996 por Brock y Freeze, esta enzima puede trabajar a temperaturas que van desde los  $70^{\circ}C$

hasta los 95°C (Saiki y col, 1998). La *Tth* es otra polimerasa comercial aislada de *Thermus thermophilus*, se emplea en procesos de transcripción reversa como la RT-PCR. Otra enzima termoestable comercial aislada de la misma especie es *Tth* pirofosfatasa, que elimina los pirofosfatos orgánicos (PPi) que son originados durante la incorporación de los nucleótidos trifosfato (dNTP's) en una reacción. La *Pwo* es una polimerasa comercial de muy alta fidelidad y que fue aislada de la arquea termofílica *Pyrococcus woesei*, su actividad oscila entre los 70 y los 95°C.

De los microorganismos aislados del subsuelo, sólo un porcentaje bajo de estas cepas se han estudiado para fines biotecnológicos. De ellas, una gran proporción ha presentado capacidades potenciales para degradar compuestos orgánicos tóxicos, así como la producción de antibióticos, de enzimas estables a altas temperatura y pigmentos nuevos. La empresa Pfizer está experimentado con 3200 cepas diferentes de microorganismos del subsuelo para la producción de antibióticos, por su parte, ZymoGenetics está buscando sustancias de uso biotecnológico en aproximadamente 800 cepas (Frederickson y Onstott, 1996).

### **3.3.1 HIPERHALÓFILOS**

Los hiperhalófilos están estrechamente relacionados con algunos miembros del grupo de los metanógenos, porque crecen en condiciones en donde la cantidad de oxígeno es escasa y por su metabolismo fermentativo. Por otro lado, se han aislado metanógenas alcalofílicas y sean descrito nuevas especies de arqueas metanógenas halofílicas (Madigan y col., 1998).

### **3.3.2 BAROFÍLICAS**

Existen otros microorganismos extremófilos que viven bajo una combinación muy particular de factores ambientales, y que por lo mismo son difíciles de cultivar, tal es el caso de bacterias marinas-psicrofílicas-barofílicas, cuya temperatura óptima



de crecimiento es de 4°C y crecen bajo una presión hidrostática óptima de 690 atm (Rice y Oliver, 1992).

Microorganismos barofílicos obligados, cuya presión óptima de crecimiento es de 80 MPa y que no crecen por debajo de los 50 MPa, se han aislado de trincheras marinas que tienen una profundidad de 11 000 m. Los análisis filogenéticos revelan que se están emparentados con las bacterias *Shewanella bética* y *Moritella*, que se encuentra dentro de la subdivisión  $\gamma$ -*Proteobacteria* (Kato y col., 1998).

### **3.4 COMUNIDADES MICROBIANAS.**

En las comunidades microbianas cada población de microorganismos ejerce un papel funcional (nicho) que permite la supervivencia ya que son capaces de adaptarse. Estas adaptaciones, así como las interacciones dentro de la población, contribuyen a la estabilidad de las comunidades. Generalmente, las comunidades pasan por cambios sucesionales característicos que pueden conducir a su vez a una mayor estabilidad.

La distribución ecológica y el funcionamiento de las poblaciones microbianas están fuertemente influidos por factores ambientales diversos como son la limitación de nutrientes y la tolerancia ambiental regulan o excluyen la existencia de microorganismos en diferentes ambientes. Los microorganismos poseen límites superiores e inferiores de tolerancia, así como óptimos con respecto a la temperatura, la radiación, la presión, la salinidad, la actividad del agua, el pH y el potencial redox.

Las comunidades que están dominadas por interacciones complejas entre los diferentes microorganismos, cada una de las especies individuales tiene un papel específico en el mantenimiento del sistema. Las comunidades activas pueden obtener nutrientes eficientes a partir del medio, eliminando los compuestos tóxicos. Sin embargo, no todas las especies están activas; muchos de ellas están inactivas hasta que las condiciones del ambiente cambian para favorecer su

crecimiento. Debido a la gran diversidad metabólica y flexibilidad de su organización, los ecosistemas microbianos se pueden encontrar en todas partes (Muyzer y col., 1993).

### **3.4.1 MICROORGANISMOS NO CULTIVABLES.**

Los microorganismos constituyen el principal componente de biodiversidad, pero se requiere unas herramientas (avances tecnológicos e intelectuales) apropiadas para cuantificar esta diversidad, tanto en "modelos" como en las comunidades naturales. La evaluación de la diversidad, distribución, y funciones de los microorganismos han estado limitados durante muchos años al estudio de la microbiota que puede ser cultivada en el laboratorio. Las técnicas de enriquecimiento y aislamiento de microorganismos establecen unas condiciones ambientales artificiales que sólo permite el desarrollo de unos pocos microorganismos, los más aptos para este ambiente fabricado. Sin embargo, estas "condiciones" son resultado de la habilidad, persistencia y suerte del investigador.

El método microbiológico clásico que se emplea en el estudio del suelo, originalmente desarrollado para muestras acuosas, consta de cinco etapas: (i) dilución de la muestra (paso optativo); (ii) cultivo en medios de cultivo generales, que proporcionan las condiciones de crecimiento para todos los microorganismos de la muestra; (iii) cultivo en medios específicos, para la selección de grupos de organismos; (iv) conteo; e (v) identificación taxonómica, mediante la evaluación de parámetros bioquímicos, como la fermentación de diferentes substratos. Uno de los inconvenientes que se presenta es que no se logra una dilución homogénea de la muestra en el caso de los suelos; segundo, debido a que los organismos están estrechamente unidos a las partículas del suelo, no se puede lograr una dilución representativa de todas las especies; y tercero, las condiciones del medio de cultivo general, no aseguran el crecimiento de todos los microorganismos presentes en la muestra de suelo, ya que las condiciones aeróbicas, así como las concentraciones de los substratos, no serán óptimas para todas las comunidades

microbianas. Por lo cual, se aceptaba que la metodología clásica sólo lograba la identificación de una submuestra "representativa" de los organismos aeróbicos presentes en las muestras analizadas. Con los hallazgos de Torsvik y col. (1994), que señalaban que entre el 99,5 a 99,9 % de los microorganismos de suelo no eran cultivables por el método microbiológico clásico, se estableció la poca representatividad estadística del método clásico. A lo que se sumaron posteriormente, las discordancias entre las clasificaciones taxonómicas realizados mediante el método clásico y los estudios del DNA .

Se considera que los microorganismos no cultivables requieren nutrientes particulares que sólo se encuentran en condiciones naturales. Algunos nutrientes tal vez sean proporcionados por microorganismos asociados. En la naturaleza, es común encontrar comunidades bacterianas en las que coexisten varias especies y géneros de bacterias. En estas comunidades pueden existir dependencias metabólicas complejas. El enfoque de microbiología tradicional tiene como primer paso el obtener cultivos puros de bacterias y tal vez esto ocasiona que sólo se cultive parte de los miembros de la comunidad. Otra posibilidad es que los medios típicos de crecimiento sean demasiado ricos y que los medios mínimos tienen un exceso de carbono o de nitrógeno o de fósforo, e inhiban el crecimiento de microorganismos, aunque otro factor que puede influir son las condiciones de la atmósfera (Mauricio y col., 1999).

### **3.5 16S rRNA COMO BIOMARCADOR**

Se define como biomarcador a cualquier compuesto que puede ser empleado como indicador de la presencia de la actividad del grupo microbiano en específico. Debido a sus características, los ácidos nucleicos pueden ser manejados como biomarcadores ya que su ubicuidad entre los seres vivos, así como su diferencia en la secuencia de la estructura primaria permite utilizarlos en la relación evolutiva para la detección altamente especializada de microorganismos en muestras ambientales (Ramírez, 1999). En la actualidad se pueden determinar relaciones filogenéticas entre los microorganismos basándose en comparaciones de las

secuencias de ácidos nucleicos, particularmente en la secuencia del RNA ribosómico; el RNA estructural del ribosoma que constituye la estructura clave de la célula implicada en la traducción. De hecho, uno de los descubrimientos recientes más importantes en biología es que los cambios en la secuencia nucleotídica del rRNA (determinados en definitiva por mutaciones en el DNA que codifica el rRNA) pueden ser usados como una medida para establecer relaciones evolutivas entre células. Estos biomarcadores nos permiten conocer de manera más directa la estructura de las comunidades microbianas, incluyendo a especies no cultivables por métodos convencionales (Amman, 1995).

A partir de estudios sobre secuencias del gen rRNA se pueden definir tres linajes celulares evolutivamente diferentes, dos de los cuales presentan estructura procariótica y uno que es eucariótico (Figura 2).

Los genes ribosomales que codifican en bacterias a tres moléculas de RNA (16S, 23S y 5S) y forman parte de la estructura del ribosoma. Debido a su estructura plegada, las curvas de tallo y asa así como las interacciones con proteínas ribosomales, hacen que la estructura primaria del gen ribosomal está relativamente bien conservada en todos los organismos y se ha utilizado como un biomarcador molecular para establecer relaciones filogenéticas entre los microorganismos. Los genes ribosomales contiene dominios muy conservados y variables, lo que su uso en la clasificación de los microorganismos y la diferenciación entre grupos taxonómico (Pace y col., 1986).

El rDNA y específicamente la subunidad pequeña del ribosoma que contiene el gen 16S rRNA es muy utilizado como marcador en estudios de ecología microbiana (Liesack y col., 1997). Lo que sustenta el empleo del gen 16S rRNA como biomarcador es:

- ◆ Están presentes en todos los organismos realizando la misma función, síntesis de proteínas.
- ◆ Su estructura secundaria y terciaria es altamente conservada.
- ◆ La estructura primaria consiste de regiones conservadas y variables alternadas, ofreciendo posibilidades únicas para la detección, amplificación y secuenciación.

- ♦ La cantidad de secuencia de información presente en las (gen 16S rRNA) moléculas es suficiente para realizar comparaciones estadísticamente significativas.
- ♦ Los genes del rRNA están libres de artefactos o de la transferencia lateral de otros genes.

El gen 16S rRNA contiene aprox. 1500 nucleótidos en *E. coli*, el tamaño de éste gen nos permite hacer la diferenciación filogenética, cabe destacar que la amplificación del gen 16S rRNA en procariontes es más complicada debido al tamaño del gen (Figura 3).

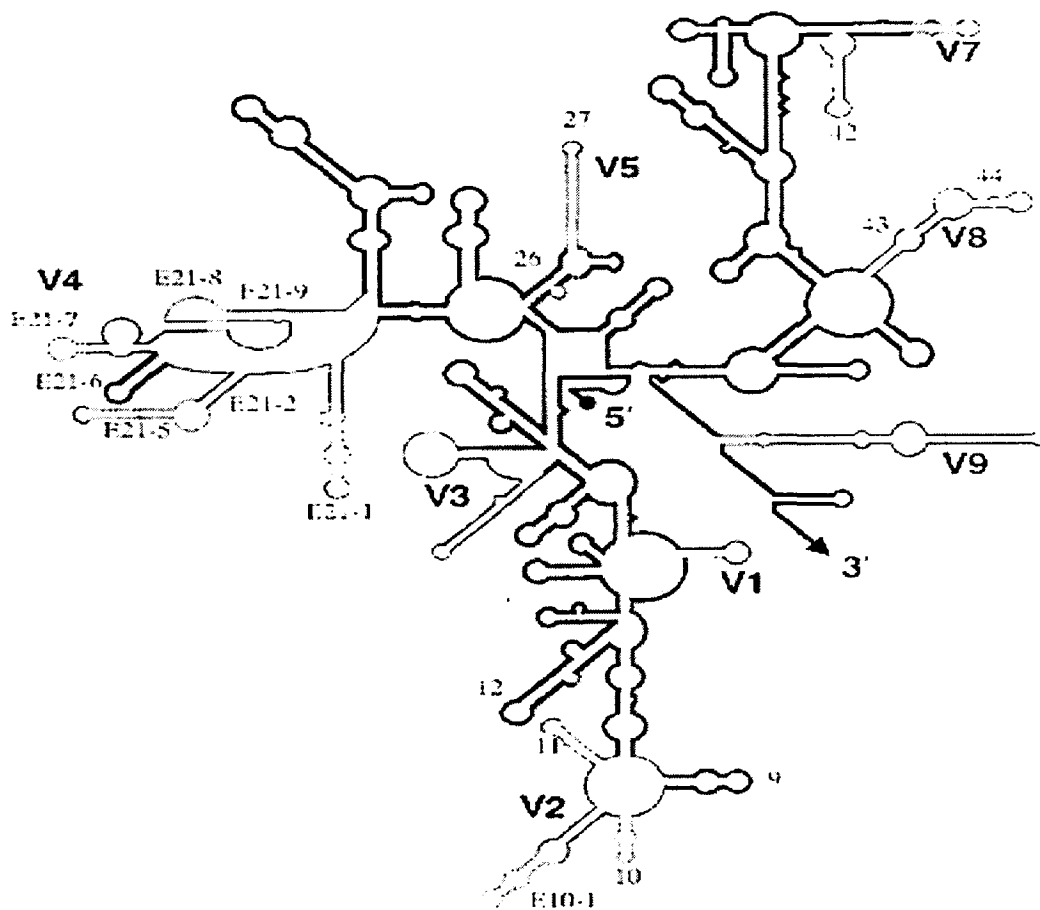


Figura 3. Configuración del gen 16S rRNA en el cual se logran observar 9 regiones.

### **3.6 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

Las técnicas de biología molecular ofrecen nuevas oportunidades para el análisis de la estructura y composición de las especies de comunidades microbianas.

Se lleva a cabo estudios de la secuencia total de nucleótidos del genoma de los microorganismos, pero actualmente se utilizan estudios del gen 16S rRNA, porque son secuencias que se han mantenido bastante uniformes a lo largo de la evolución, y por eso se ven claramente las diferencias entre distintos microorganismos y se pueden realizar árboles filogenéticos y esquemas evolutivos (Mauricio y col., 1999), estas técnicas nos ayudan a poder clasificar organismos de un modo más correcto sin importar que estos no sean cultivables. Por tal motivo la biología molecular, ha hecho posible el desarrollo de sofisticados procedimientos para el aislamiento, manipulación y expresión del material genético.

### **3.7 EXTRACCIÓN DE DNA DE COMUNIDADES MICROBIANAS**

Se han descrito muchos métodos para la extracción de DNA de comunidades microbianas totales de muestras de suelos y sedimento. Los cuales varían debido a la diversidad de suelos y al tipo de análisis al cual será sometido el DNA. La variación en la eficacia de la lisis, el rendimiento y pureza son fundamentales para utilizar el DNA en diferentes técnicas analíticas como PCR, hibridación, clonación, etc. (Leff y col., 1995). En este proceso debe considerarse obtener el DNA de la comunidad microbiana con un rendimiento alto y una pureza que permita llevar a cabo las técnicas moleculares.

Durante la extracción de DNA del suelo se pueden variar los tratamientos de extracción y purificación, lo que afecta al final el rendimiento y pureza del DNA (Krsek y col., 1999).

El método de extracción de DNA que se utilizó fue el protocolo propuesto por Zhou y col. en 1996 y el DNA obtenido se purificó.

### 3.8 AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de PCR permite la replicación *in vivo* de secuencias definidas de DNA. Una de sus aplicaciones consiste en aumentar la detección de la sonda génica de secuencias de DNA específicas. Al amplificar exponencialmente una secuencia diana, la PCR aumenta significativamente la probabilidad de detección de secuencias extrañas en mezclas heterólogas de DNA.

La PCR se lleva a cabo mediante la fusión del DNA para convertir el DNA de doble cadena en DNA de cadena sencilla, la unión de iniciadores al DNA diana que se desea amplificar, y la extensión de DNA por adición de nucleótidos a partir de los iniciadores y mediante la acción de la *Taq* DNA polimerasa. Los iniciadores están diseñados de manera que se hibriden a las regiones de DNA que flaquean la secuencia de genes diana deseada. Los iniciadores se extienden entonces a través de la secuencia diana por medio de la *Taq* DNA polimerasa o de otras DNA polimerasa termoestable en presencia de desoxirribonucleótidos trifosfato libres (dNTPs), lo que da lugar a la duplicación del material diana de partida. Cuando el DNA de doble cadena obtenido vuelve a separarse por aumento de temperatura y este proceso se repite sucesivas veces, la cantidad de DNA diana obtenida aumenta exponencialmente. Los componentes de la mezcla en la PCR son la *Taq* DNA polimerasa, u otras DNA polimerasas termoestables, iniciadores, dNTPs, DNA molde, e iones magnesio. El ciclo de temperatura de la PCR puede ser controlado usando un termociclador automatizado (Atlas, 2002).

Diferentes métodos de biología molecular se han utilizado para determinar la diversidad genética de comunidades microbianas. Los ácidos nucleicos, tanto el DNA como RNA se extraen de comunidades microbianas y se utilizan para determinar la complejidad de las poblaciones e identificar a cada uno de sus miembros. Análisis directos de DNA utilizando experimentos de reasociación de DNA aunque técnicas como el DGGE permiten visualizar directamente la diversidad genética de comunidades microbianas complejas (Höfle, 1992).

### **3.8.1 ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DE DESNATURALIZACIÓN (DGGE)**

La aplicación de electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante, como el DGGE permite separar fragmentos de la misma longitud pero con diferentes secuencias, que son las características de los obtenidos mediante la amplificación de regiones de los genes ribosomales del DNA de una comunidad microbiana. De hecho es posible separar fragmentos que difieren en una sola base. Los agentes desnaturalizantes (una mezcla de urea y formamida en el DGGE) provocan la separación de las cadenas dobles de DNA. Éstas contienen dominios con temperaturas de fusión ( $T_m$ ) característicos, de manera que cuando se alcanza una determinada temperatura o concentración de desnaturalizante, la molécula se funde total o parcialmente y disminuye su velocidad de migración en el gel. Para evitar la separación completa de las dos cadenas, se une una secuencia rica en GC (que requiere condiciones más drásticas de desnaturalización), llamada pinza-GC, en el extremo 5' de uno de los iniciadores, que se coamplifica con el segmento de DNA. Para la visualización de las bandas se realiza una tinción de plata del gel de acrilamida (Muyzer y Smalla, 1998).

### **3.9 PURIFICACIÓN DE DNA DE PRODUCTOS DE PCR**

Diferentes métodos se han reportado para la purificación de extractos crudos de DNA en donde después de la reacción en cadena del polimerasa que amplifica el DNA debe ser separado de los componentes de la reacción que se encuentren en exceso, los componentes en exceso pueden interferir como las subsecuentes manipulaciones del DNA. Entre los métodos utilizados se encuentra el de purificación de productos de PCR con filtros Montage®-PCR que promueve una excelente capacidad para aumentar el rendimiento y un alto grado de pureza. El método es rápido y altamente reproducible, por lo que es ideal para uno o varias operaciones.

Otro método de purificación es con Wizard® DNA Clean-up Resina de Promega efectivo para purificar DNA lineal y circular de 200-50 000 pb. este se fundamenta



en la capacidad de adsorción del DNA en una resina de tiocianato guanidina 6M, la cual después es retirada obteniendo así el DNA purificado.

Cada método tiene diferentes porcentajes de rendimiento y grado de pureza.

### **3.10 CLONACIÓN**

La clonación molecular, es una técnica de la ingeniería genética, que implica el aislamiento, purificación y replicación de fragmentos específicos de DNA, ya que la disponibilidad de grandes cantidades de DNA puro, permite la localización, caracterización y manipulación de genes y sus productos.

La clonación molecular, se divide en varios pasos:

- ◆ Aislar y fragmentar el DNA del que se parte; que puede ser DNA genómico total, o DNA sintetizado por la reacción en cadena de la polimerasa.
- ◆ Unir los fragmentos de DNA a un vector de clonación con la DNA ligasa.
- ◆ Introducir y mantener el vector de clonación en un organismo hospedador.
- ◆ Detectar y purificar el clon deseado.
- ◆ Producir un gran número células hospedadoras que tengan el clon deseado, para el aislamiento y estudio del gen clonado.

Por lo tanto los métodos moleculares pueden ser usados para obtener esencialmente cualquier gen directamente del medio ambiente sin cultivar el organismo en cuestión que lo posee. Así se puede obtener genes de una comunidad total de DNA con la ayuda de genes ya conocidos de organismos que ya se conocen. Y los genes nuevos pueden también seleccionarse del DNA clonado del medio ambiente por sus actividades, usando vectores diseñados para activar promotores extraños. Por ejemplo, las comunidades de organismos termófilos ofrecen posibilidades de aislamiento de nuevas enzimas como proteasas termófilas, DNA polimerasa u otras enzimas. La tecnología molecular hace necesario el cultivo de estos organismos para su estudio (Mauricio, 1999).

Posteriormente el manejo del análisis del gen 16S rRNA posee múltiples aplicaciones, desde lo molecular hasta lo ambiental, sobretodo en estudios en el ámbito de la evolución.

### **3.11 SECUENCIACIÓN**

Las técnicas moleculares auxilian en la detección e identificación de las secuencias de DNA encontradas en los microorganismos, debido a que muchos microorganismos no son cultivables es difícil poderlos identificar, por lo que es necesario llevar a cabo la el proceso de clonación. Para la separación de los fragmentos del gen 16S rRNA amplificados, es necesario construir bibliotecas de clonas del gen 16S rRNA, cuya posterior secuencia y análisis permite determinar la diversidad microbiana.

Con el DNA clonado se puede determinar la secuencia de nucleótidos de un gen, a partir de la cual es posible conocer, gracias al código genético, la secuencia de aminoácidos de su proteína.

#### **4. OBJETIVO GENERAL:**

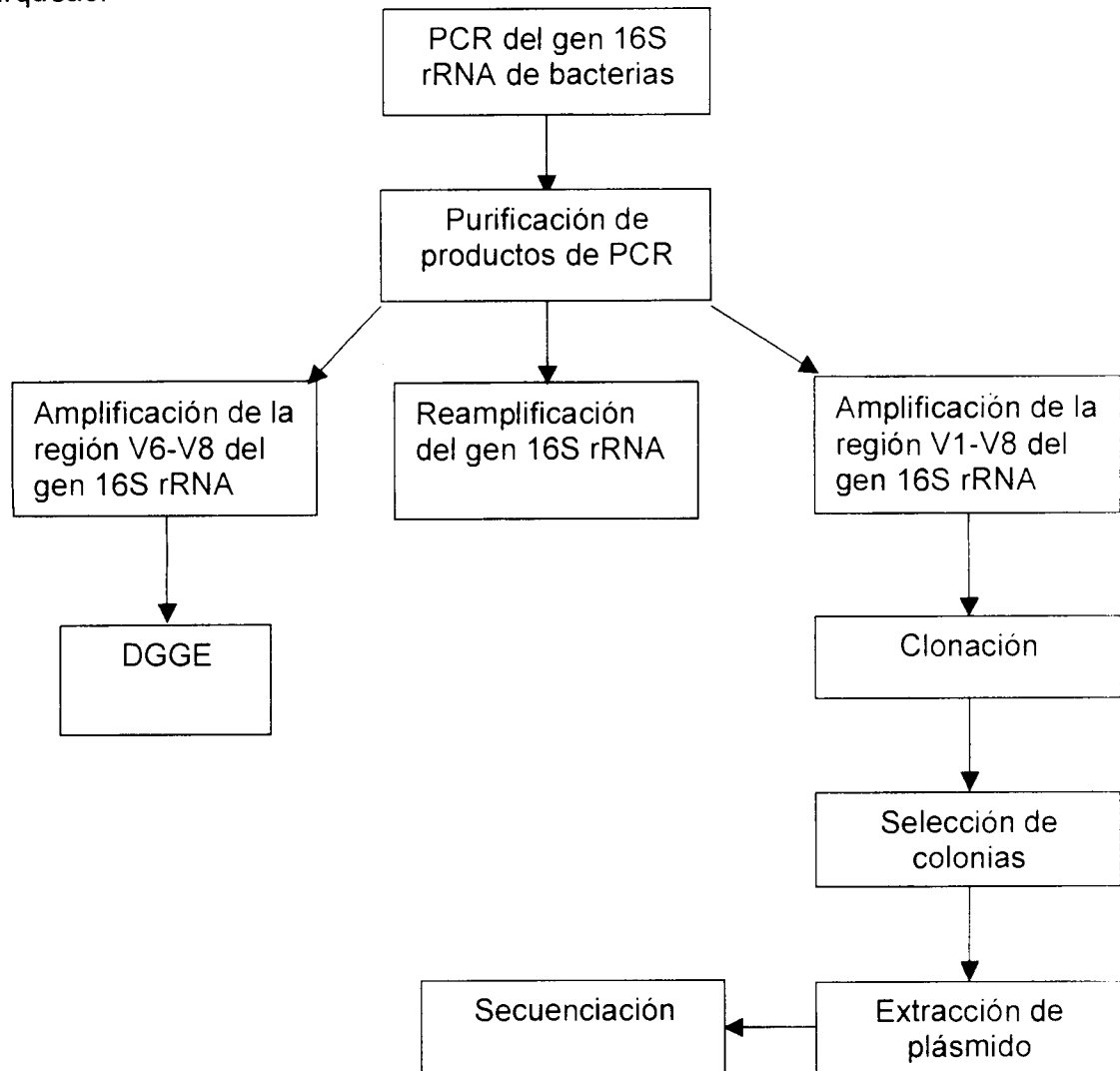
- Detección del gen 16S rRNA de bacterias y arqueas, en núcleos de perforación de pozos petroleros.
- Identificar comunidades microbianas por diferentes técnicas de biología molecular.

#### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Aislar los microorganismos que se encuentren en los medios de cultivos mixtos (que están en conservación), para su estudio individual.
- Estudiar las comunidades del yacimiento mediante DGGE del V6-V8 del gen 16S rRNA de bacterias y arqueas.
- Clonar fragmentos de las muestras de bacterias crecidas a diferentes temperaturas provenientes de diferentes medios de cultivo.
- Seleccionar los insertos más relevantes obtenidos durante la clonación.

## 5. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

A continuación se presentan las fases principales que constituyen el trabajo y el DNA utilizado es de bacterias de núcleos de perforación de pozos petroleros incubadas a distintas temperaturas. Este mismo procedimiento será el utilizado para arqueas.



### 5.1 MATERIAL Y MÉTODOS

A partir de una muestra de petróleo que se extrajo del pozo productor Jujo 25, con un flujo de (Q<sub>o</sub>) de 4277 barriles por día, 0% de agua y que se encuentra en el campo Jujo Tecominoacán, Cárdenas, Tabasco. El pozo tiene una profundidad de 5894 metros, una temperatura de fondo de 140°C, con una presión de fondo de

270.22 Kg/cm<sup>2</sup>, el yacimiento pertenece a la formación geológica del Jurásico Superior Kimmeridgiano.

Las muestras obtenidas se cultivaron en medios enriquecidos (mixtos) proporcionándoles características parecidas a las del yacimiento petrolero, incubándose con atmósfera de H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> en una proporción 80/20 (vol/vol), a una presión de 30 lbs/pulg<sup>2</sup>; para lo cual fue necesario equipo especial. Cada uno de estos sistemas se incubó a diferentes temperaturas 50°C, 55°C, 70°C, 80°C, 100°C y 120°C, 140°C. Después de 97 días los medios de cultivos (mixtos), presentaron suficiente crecimiento, y se procedió a la extracción de DNA, enseguida se aplicó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de las cuales las muestras crecidas a la temperatura de 50°C, 55°C, 80°C, 140°C fueron proporcionadas por el Instituto Politécnico Nacional, para evidenciar la presencia de DNA se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% (como se muestra en la Tabla 1) con un regulador TAE 1x (tris-acetato-EDTA) y bromuro de etidio (10 mg/ml), donde se empleó cámara de electroforesis Gel Plus<sup>Plus</sup> (Mini Gel Electrophoresis System), el gel se corrió a 100 volts durante 20 minutos y se observó la imagen con una cámara digital Kodak ID 3.6 a 290C con luz ultravioleta durante 90 segundos, para calcular la concentración de DNA se utilizó el programa KODAD ID Image Análisis Software.

### **5.1.2 ELECTROFORESIS.**

Mediante esta técnica se puede determinar de forma precisa el tamaño de cualquier fragmento de DNA ya que permite la separación y visualización de dichos productos.

#### **5.1.2.1 GEL AGAROSA**

Para un gel chico (25 ml)

1. Pesar 0.25 g de agarosa en un matraz erlenmeyer.

2. Adicionar 25 ml de TAE (1x).
3. Calentar en el microondas hasta que se disuelva la agarosa.
4. Dejar enfriar.
5. Adicionar 1  $\mu$ l de bromuro de etidio (10mg/ml).
6. Homogenizar y vaciar el recipiente del gel.
7. Colocar el peine en el gel.
8. Esperar  $\pm$  30 minutos hasta que solidifique el gel.
9. Retirar el peine.
10. Adicionar TAE (1x) hasta que cubra el gel.
11. Poner gotas de 1  $\mu$ l de buffer de carga en una pieza de parafilm.
12. Adicionar 5 o 10  $\mu$ l de la muestra, mezclar con la gota de buffer y ponerlos dentro del pozo en el gel.
13. Poner marcador (*NEco RI-Hind III*) en un pozo.
14. Aplicar 120 V por  $\pm$  20 minutos.
15. Visualizar el gel con un iluminador de UV.

## **5.2 REACCIÓN DE PCR PARA EL GEN 16S rRNA**

Cabe mencionar que la cantidad de muestra es pequeña al igual que la concentración de DNA (consorcio), por lo que se procedió a amplificar por la técnica de PCR la región 16S rRNA, las condiciones de la reacción de PCR para el gen 16S rRNA se muestran en la Tabla 1, donde el par de iniciadores utilizados fue el siguiente:

**8 for.** 5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'

T<sub>m</sub>=56.3°C

**1492 rev.** 5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'

T<sub>m</sub>=57.5°C

Tabla 1. Componentes para la reacción de PCR del gen 16S rRNA

Componentes de la reacción	Volumen de la reacción	Concentración final
Agua MQ	15.8 µl	variable
Buffer 10 X	2.5 µl	1 x
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3 µl	3.0 mM
dNTP's 10 mM de c/nucleótido	0.5 µl	200 mM de c/nucleótido
Iniciador 8 for	1 µl	10 pmol/µl
Iniciador 1492 rev	1 µl	10 pmol/µl
Taq polimerasa	0.2 µl	1 unidades/reacción
DNA muestra	1 µl	

Para quitar algunos contaminantes de las muestras es necesario utilizar albúmina sérica bovina (ABS), en donde las condiciones de la reacción de PCR para el 16S rRNA se observan en la Tabla 2.

Tabla 2. Componentes para la reacción de PCR del gen 16S rRNA con ABS.

Componentes de la reacción	Volumen de la reacción	Concentración final
Agua MQ	13.3 $\mu$ l	Variable
Buffer 10 x	2.5 $\mu$ l	1 x
MgCl <sub>2</sub> 25mM	3 $\mu$ l	3.0 mM
Albúmina sérica bovina	2.5 $\mu$ l	400 ng/ $\mu$ l
dNTP's 10mM de c/nucleótido	0.5 $\mu$ l	200 $\mu$ M de c/nucleótido
Iniciador 8 for	1 $\mu$ l	10 pmol/ $\mu$ l
Iniciador 1492 rev	1 $\mu$ l	10 pmol/ $\mu$ l
Taq polimerasa	0.2 $\mu$ l	2.5 unidades/reacción
DNA muestra	1 $\mu$ l	

Las condiciones para el termociclador se muestran en la Tabla 3.



Tabla 3. Condiciones para el Termociclador para amplificación por PCR del gen 16S rRNA.

	Temperatura	Tiempo
Pre-desnaturalización	94 ° C	5 minutos
Desnaturalización	94 ° C	30 segundos
Alineamiento	54 ° C	30 segundos
Elongación	72 ° C	1 minuto
Post-elongación	72 ° C	5 minutos

### 5.3 REACCIÓN DE PCR PARA LA REGIÓN V6-V8 DEL GEN 16S rRNA.

Una vez obtenido el producto de PCR el gen 16S rRNA se procede a la amplificación de la región V6-V8. Donde las condiciones para la reacción de PCR para la región V6-V8 del gen 16S rRNA se muestra en la Tabla 4, y el par de iniciadores utilizados fue el siguiente:

**GC 968 for.** 5' CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA  
CGG 3' Tm=75°C

**UNI 1401 rev.** 5' GCG TGT GTA CAA GAC CC 3' Tm=55.2°C

Tabla 4. Componentes para la reacción de PCR para la región V6-V8 del gen 16S rRNA.

Componentes de la reacción	Volumen de la reacción	Concentración final
Agua MQ	15.8 $\mu$ l	Variable
Buffer 10 x	2.5 $\mu$ l	1 x
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3 $\mu$ l	3.0 mM
dNTP's 10 mM de c/ nucleótido	0.5 $\mu$ l	200 mM de c/nucleótido
Iniciador GC 968 for	1 $\mu$ l	10 pmol/ $\mu$ l
Iniciador UNI 1401 rev	1 $\mu$ l	10 pmol/ $\mu$ l
Taq polimerasa	0.2 $\mu$ l	1 unidades/reacción
DNA muestra	1 $\mu$ l	

Las condiciones para el termociclador se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones para el Termociclador para amplificación por PCR de V6-V8 del gen 16S rRNA.

	Temperatura	Tiempo
Pre-desnaturalización	94° C	5 minutos
Desnaturalización	94° C	30 segundos
Alineamiento	56° C	20 segundos
Elongación	68° C	40 segundos
Post-elongación	68 ° C	7 minutos

#### 5.4 REACCIÓN DE PCR PARA LA REGIÓN V1-V8 DEL GEN 16S rRNA

A partir del gen 16S rRNA purificado se amplifica la región V1-V8. Las condiciones para la reacción de PCR de la región V1-V8 se muestra en la Tabla 6, y el par de iniciadores utilizados fue el siguiente:

**124 for.** 5' GGA CGG GTG AGT AAC ACG3' T<sub>m</sub>=61.7°C

**UNI 1401 rev.** 5' GCG TGT GTA CAA GAC CC 3' T<sub>m</sub>=55.2°C

Tabla 6. Componentes para la reacción de PCR V1-V8 del gen 16S rRNA.

Componentes de la reacción	Volumen de la reacción	Concentración final
Agua MQ	15.8 $\mu$ l	Variable
Buffer 10 x	2.5 $\mu$ l	1 x
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3 $\mu$ l	3.0 mM
dNTP's 10 mM de c/ nucleótido	0.5 $\mu$ l	200 mM de c/nucleótido
Iniciador 124 for	1 $\mu$ l	10 pmol/ $\mu$ l
Iniciador UNI 1401 rev	1 $\mu$ l	10 pmol/ $\mu$ l
Taq polimerasa	0.2 $\mu$ l	1 unidades/reacción
DNA muestra	1 $\mu$ l	

Las condiciones para el termociclador se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones para el Termociclador para amplificación por PCR de la región V1-V8 del gen 16S rRNA.

	Temperatura	Tiempo
Pre-desnaturalización	94 ° C	5 minutos
Desnaturalización	94 ° C	30 segundos
Alineamiento	54 ° C	30 segundos
Elongación	72 ° C	1 minuto
Post-elongación	72 ° C	5 minutos

### 5.5 REACCIÓN DE PCR PARA EL GEN 16S rRNA DE ARQUEAS.

Debido a que la cantidad de muestra proporcionada era pequeña y la concentración muy pequeña se procedió a amplificar el gen 16S rRNA de arqueas, las condiciones de la reacción se muestran en la Tabla 9, y los iniciadores utilizados son los siguientes

**46 for.** 5' YTA AGC CAT GCR AGT 3'      Tm=60.0  
**1100 rev.** 5' YGG GTC TCG CTC GTT RCC 3'      Tm=51.5

Tabla 9. Componentes para la reacción de PCR del gen 16S rRNA para arqueas

Componentes de la reacción	Volumen de la reacción	Concentración final
Agua MQ	15.8 $\mu$ l	variable
Buffer 10 x	2.5 $\mu$ l	1 x
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3 $\mu$ l	3.0 mM
dNTP's 10 mM de c/nucleótido	0.5 $\mu$ l	200 mM de c/nucleótido
Iniciador 46 for	1 $\mu$ l	10 pmol/ $\mu$ l
Iniciador 1100 rev	1 $\mu$ l	10 pmol/ $\mu$ l
Taq polimerasa	0.2 $\mu$ l	1 unidades/reacción
DNA muestra	1 $\mu$ l	

Las condiciones para el termociclador se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Condiciones para el Termociclador para amplificación por PCR del gen 16S rRNA de arqueas.

	Temperatura	Tiempo
Pre-desnaturalización	95 ° C	5 minutos
Desnaturalización	95 ° C	15 segundos
Alineamiento	50 ° C	30 segundos
Elongación	72 ° C	3 minutos
Post-elongación	72 ° C	5 minutos

## 5.6 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR DEL GEN 16S rRNA

Una vez obtenidos 100 µl de los productos de PCR del gen 16S rRNA de las muestras llevar a cabo la purificación.

## 5.7 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR CON FILTROS MONTAGE®

1. Insertar el filtro en el tubo Montage®-PCR.
2. Colocar en el tubo 300 µl de agua purificada. Adicionar 100 µl de reacción de PCR al reservorio.
3. Ajustar el volumen de PCR a un volumen final 400 µl, sin importar que el volumen de PCR sea menor del requerido.
4. Centrifugar todo esto 1000 x g durante 15 minutos para óptimos resultados no sobrepasar del tiempo y r.p.m.

5. Para recuperar el DNA adicionar 25  $\mu$ l de agua al filtro.
6. Retirar el filtro e invertirlo y colocarlo en un tubo limpio.
7. Centrifugar todo esto 1000 x g durante 2 minutos para óptimos resultados no sobrepasar del tiempo y r.p.m.

### **5.8 PURIFICACIÓN CON WIZARD® DNA CLEAN-UP RESINA**

1. Usar una minicolumna Wizard® para cada muestra. Armar la minicolumna con la jeringa.
2. Agregar un mililitro de resina Wizard® DNA clean-up a un tubo de 1.5 ml de microcentrífuga. Adicionar la muestra (50-500  $\mu$ l) al tubo del paso 1. Mezcle por inversión leve varias veces.
3. Adicionar la resina Wizard® DNA clean-up que contiene el DNA de interés dentro de la jeringa e inserte el embolo despacio y con cuidado presione.
4. Separar la jeringa de la minicolumna y remueva el embolo de la jeringa. Atornillar la jeringa a la minicolumna. Lavar la columna con 2 ml de isopropanol al 80% dentro de la jeringa e insertar el embolo y presionar con cuidado para sacar la solución de la columna.
5. Remover la jeringa de la mini columna, y transferir la mini columna a un tubo de centrífuga de 1.5 ml. Centrifugar por 2 minutos a máxima velocidad (10 000 x g) para secar la resina.
6. Transferir la mini columna a un nuevo tubo de microcentrífuga. Aplicar 50  $\mu$ l de agua precalentado (65-70°C) a la mini columna espera un minuto (el DNA permanece intacto en la mini columna por 30 minutos). Centrifugar la minicolumna por 20 segundos a máxima velocidad para eluir fragmentos de DNA de interés.



7. Remover y desechar la mini columna. El DNA purificado puede ser guardado a una temperatura de 4°C a -20°C.

## **5.9 ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DE DESNATURALIZACIÓN (DGGE).**

Después de obtener productos de PCR de la región V6-V8 del gen 16S rRNA se realiza la electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización (DGGE).

Los reactivos utilizados son los mencionados a continuación:

Amortiguador TAE 50 x: Pesar 242 g de tris base, adicionar aprox. 500 ml de agua destilada, 57.1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0.5 M a pH 8 y aforar con agua destilada a un 1 Lt.

Solución desnaturalizante al 0%: Mezclar 50 ml de solución de acrilamida-bisacrilamida al 40% (37.5:1) al 40%, agregar 2.5 ml de buffer TAE 50 x, adicionar 5 ml de glicerol y aforar a 250 ml de agua destilada.

Solución desnaturalizante al 100%: Pesar 105.4 g de urea, agregar 50 ml de solución de acrilamida-bisacrilamida al 40% (37.5:1), adicionar 100 ml de formamida y mezclar hasta que se disuelva la urea, adicionar 5 ml de amortiguador TAE 50 x, agregar 5 ml de glicerol y aforar con agua destilada hasta 250 ml.

Solución de Carlos 8 x para fijar: Mezclar 200 ml de etanol al 96 %, con 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua destilada.

Solución de Carlos de preservación: Mezclar 50 ml de etanol al 96 % con 20 ml de glicerol y 130 ml de agua destilada.

Solución para fijar: Se toma 50 ml de solución de Carlos 8 x se la adiciona 350 ml de agua destilada.

Solución de tinción de plata: Pesar 0.4 g de nitrato de plata y se disuelven en 200 ml de solución para fijar.

Solución de revelación: Pesar 10 mg de  $\text{NaBH}_4$  y agregar solución de  $\text{NaOH}$  1.5%, se disuelve y agregar 750  $\mu\text{l}$  de formaldehído.

Solución de persulfato de amonio (APS) al 10%.

Amortiguador TAE al 1%: Se diluyen en 1000 ml de agua destilada 20 ml de solución TAE 50 x.

El porcentaje de soluciones desnaturizantes para el DGGE se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de soluciones desnaturizantes para DGGE.

% desnaturizante	Volumen final ml	Solución 0%	Solución 100%	TEMED	APS
0 %	6	6	---	6 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$
30 % (Baja)	12	8.40	3.60	12 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
60 % (Alta)	12	4.80	7.20	12 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$

En la utilización del equipo para el DGGE (Bio Rad) se deben seguir los siguientes pasos:

1. Limpiar los vidrios con agua y jabón sin rayar y posteriormente secar y uno de los lados es limpiado con etanol al 96% con cuidado de no dejar pelusas.
2. Limpiar los espaciadores con etanol al 96%.

3. Determinar el lado hidrofóbico del gel bond y pegarlo al vidrio cuidadosamente utilizando un poco de agua, ajustándolo a la parte inferior del vidrio.
4. Eliminar el agua resultante entre el gel bond y el vidrio y las burbujas de aire.
5. Colocar los espaciadores y el vidrio pequeño de tal forma que quede ajustado y poner los broches a los costados del vidrio adicionar vaselina en la parte inferior.
6. Poner los vidrios en la base y nivelar.
7. Verificar que el espacio entre los vidrios es el suficiente midiendo con el separador y medir enseguida con el peine a utilizar.
8. La preparación de soluciones 0%, baja y alta (tabla 6) colocar en baño en hielo agitar suavemente.
9. Agregar el TEMED (N, N, N', N'-tetrametil-etilenodiamonio) y mezclar.
10. Adicionar 25  $\mu$ l de APS a la solución alta, mezclar y poner en el primer compartimiento de la bomba peristáltica (verificar que las llaves estén cerradas).
11. Agregar 50  $\mu$ l de APS a la solución baja, mezclar y colocar en el segundo compartimiento.
12. Colocar la manguera con la aguja en la parte media de los vidrios.
13. Encender la bomba peristáltica a una velocidad baja y abrir las llaves de los compartimentos al mismo tiempo, y cerrar una vez que estos estén vacíos.
14. Agregar 18  $\mu$ l de APS a la solución de 0% de desnaturalizante, mezclar y colocar en el primer compartimiento.

15. Encender la bomba peristáltica a baja velocidad.
16. Al terminar de adicionarse la solución al 0% colocar el peine.
17. Dejar que solidifique el gel durante una hora.
18. Colocar el buffer el recipiente del DGGE.
19. Encender el equipo de DGGE hasta alcanzar una temperatura de 60°C.
20. Montar los vidrios en el equipo de DGGE.
21. De las muestras de PCR de la región V6-V8 colocar la muestra con el buffer de carga, en cada uno de los carriles.
22. Programar la fuente de poder por 16 horas a 85 Volts.

#### **5.9.1 TINCIÓN DE PLATA DEL GEL DE POLIACRILAMIDA**

1. Después de terminar el tiempo de corrida se retiran los broches y los vidrios del gel.
2. Con el gel bond hacia abajo se coloca en la charola para fijar, donde se adicionan 200 ml de solución para fijar.
3. Agitar a 26 r.p.m. durante 3 minutos.
4. Colocar la solución para fijar en vaso de precipitado para volverla a utilizar.
5. Adicionar 200 ml de solución de plata.
6. Agitar por 10 minutos a 26 r.p.m.
7. Lavar el gel y enjuagar la charola con agua destilada.
8. Lavar durante 2 minutos y retirar el agua.

9. Colocar el gel en la charola de revelado, agregando 20 ml de solución de revelado y enjuagar el gel, retirar la solución.
10. Colocar el resto de la solución de revelado y agitar a 26 r.p.m., hasta observar la presencia de bandas (aprox. 30 minutos).
11. Reutilizar la solución para fijar, agitando por 5 minutos a 26 r.p.m.
12. Desechar la solución de fijado y enjuagar el gel con agua destilada por 3 minutos.
13. Agitar con la solución de preservación por 7 minutos a 26 r.p.m.
14. Retirar el gel de la charola y colocarlo sobre un vidrio de soporte. Humedecer la hoja de celofán con la solución de preservación y colocar este encima del gel.
15. Sujetar con las pinzas la hoja de celofán sobre el vidrio, evitando que queden burbujas.
16. Colocar el gel en el horno a 60°C y secarlo durante 20 horas.
17. Quitar los broches de los vidrios separando el gel, recortar y visualizar con luz blanca y capturar la imagen en el sistema Kodak.

## **5.10 CLONACIÓN**

### **5.10.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA CLONACIÓN**

#### **Composición de las soluciones Buffer**

Solución de isopropiltiogalactósido (IPTG) 0.1M

1.2 g de IPTG.

Adicionar 50ml de agua de volumen final. Esterilizar por filtrado. Almacenar a 4°C.

Medio de cultivo LB

5 g de Bacto® triptona.

2.5 g de Bacto®extracto de levadura.

2.5 g NaCl.

Ajustar pH a 7.0 con NaOH.

Medio LB con ampicilina

Adicionar 7.5 g de agar a 500 ml de medio enseguida esterilizar en autoclave. Posteriormente dejar enfriar a una temperatura de 50°C y agregar 50µl/ml de ampicilina y mezclar. Verter en las cajas petri y dejar endurecer. Almacenar a 4° C por una semana o un mes.

Medio de cultivo LB/ampicilina/IPTG/X-Gal

Una vez hecho el medio LB/ampicilina suplementar con 0.5 mM IPTG y 80 µl/ml X-Gal por caja. Alternativamente, 100 µl de 100mM de IPTG y 20 µl de 50 mg/ml X-gal colocar sobre la superficie del medio dejándola absorber por 30 minutos a 37°C antes de usar.

### **5.10.2 CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR CON UN VECTOR PGEM®-T SYSTEM II**

Ligación usando Buffer 2 x de rápida ligación.

1. Centrifugar el vector **pGEM®-T System II** y tener un tubo control formando un sedimento.

- Colocar la reacción de ligación como se describió en la Tabla 11. Al Buffer 2x de rápida ligaciones le da un vortex vigorosamente antes de usar. Utilizar tubos de 0.5 ml para que el DNA tenga la capacidad de unirse.

Tabla 11. Componentes para la reacción de ligación.

Reactivos	Reacción estándar	Control positivo	Control negativo
Buffer 2X de rápida ligación, DNA ligasa T <sub>4</sub>	5µl	5µl	5µl
Vector pGEM®-T System II (50 ng)	1µl	1µl	1µl
Producto de PCR	X µl	2 µl	-
Inserto de DNA control	-	-	-
DNA Ligasa T <sub>4</sub>	1µl	1µl	1µl
Agua desionizada a volumen final de	10µl	10µl	10µl

- Mezclar las reacciones con la pipeta. Incubar las reacciones durante una hora a temperatura ambiente ó incubar a 4°C toda la noche obtendrá mayor número de transformantes.

### 5.10.3 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES JM109 DE ALTA EFICACIA

- Preparar medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal.
- Centrifugar las reacciones de ligación brevemente. Agrega 2 µl de cada reacción de ligación a un tubo estéril de 1.5 ml que este en hielo. Prepara un tubo control con 0.1 ng de plásmido entero.

3. Colocar células competentes JM190 de alta eficacia en un baño en hielo por 5 minutos mezclar las células invirtiendo el tubo suavemente.
4. Transferir con cuidado 50  $\mu$ l de células a los tubos del paso 2. Utilizar 100  $\mu$ l de células para el tubo control (el que contiene el plásmido complemento). Con cuidado invierte los tubos suavemente e incúbalos en hielo por 20 minutos.
5. Lisar las células con calor por 40-50 segundos en un baño de agua a exactamente 42°C. **No agitar.** Inmediatamente regresa los tubos al hielo por 2 minutos.
6. Agregar 950  $\mu$ l de medio LB a temperatura ambiente a las reacciones de ligación transformadas y 900  $\mu$ l para el tubo control ( el que contiene el plásmido entero). Incuba durante una 1 hora 30 minutos a 37°C con agitación  $\pm$ 150 r.p.m..
7. Adicionar 100  $\mu$ l de cada uno de los siguientes tubos al medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal. Para el DNA control es recomendable una dilución 1:10 con medio LB. (Para cerciorar se puede realizar por duplicado).

#### 5.10.4. AISLAMIENTO DEL PLÁSMIDO

1. Colocar 1.5 ml de cultivo en un tubo de microcentrifuga y centrifugar 2-3 minutos a 1200 r.m.p., si no hay suficiente crecimiento (será un pellet pequeño), desechar el sobrenadante y agregar un segundo volumen del cultivo.
2. Resuspender el pellet en 100  $\mu$ l buffer TGE (vortex).
3. Adicionar 200  $\mu$ l 0.2N NaOH/1% SDS, mezclar bien y dejarse 3 minutos en hielo.



4. Agregar 150  $\mu$ l de 3 M acetato de potasio a un pH 4.8 frío (4°C) mezclar suavemente, dejarse 5 minutos en hielo.
5. Centrifugar 5 minutos a 1300 r.p.m.
6. Adicionar 200  $\mu$ l fenol/TE saturado y 200  $\mu$ l cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), vortex por 10 segundos y centrifugar 5 minutos a 1300 r.p.m.
7. Recobrar el sobrenadante cuidadosamente en un nuevo tubo de microcentrifuga, si tiene partículas suspendidas en la interfase llevar a una segunda extracción.
8. Adicionar dos volúmenes de etanol al 96% frío (-20°C) o un volumen de alcohol isopropílico, mezclar suavemente y dejarse 15 minutos a -70°C.
9. Centrifugar 30 minutos a una velocidad máxima, desechar el solvente y resuspender el pellet en 500  $\mu$ l de etanol al 70% frío.
10. Centrifugar 10 minutos a 1300 r.p.m., desechar hasta la última gota de etanol.
11. Dejar secar en una centrifuga de vacío de 8-10 minutos.
12. Adicionar 18  $\mu$ l de agua.
13. Tomar una alícuota de 2  $\mu$ l en 18  $\mu$ l de agua.
14. Llevar acabo la electroforesis.
15. Visualizar la banda de interés en un gel de agarosa al 1%.

Una vez obtenido el plásmido llevar acabo la amplificación del inserto de interés mediante la técnica de PCR, utilizando los iniciadores específicos T7 y SP6.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el laboratorio de Microbiología General de la Esc. Nal. De Ciencias Biológicas, obtuvieron muestras del núcleo de perforación de un pozo petrolero que se encuentra en Cárdenas, Tabasco. Alícuotas de las muestras se sembraron en medios enriquecidos (mixtos), e incubaron a diferentes temperaturas 50°C, 55°C, 80°C, 140°C. Después de 97 días los cultivos presentaron algún crecimiento, y se extrajo DNA, del cual nos proporcionaron alícuotas.

Debido a que estas muestras de DNA se mantuvieron mucho tiempo en almacenamiento, fue necesario evidenciar la presencia del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde no se obtuvieron resultados. Por lo que se decidió emplear la técnica de PCR puesto que permite la amplificación de pequeñas cantidades de DNA (Atlas, 2002).

### 6.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR.

#### 6.1.1. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN 16S rRNA

Se procedió a la amplificación del gen 16S rRNA de las bacterias de núcleos de perforación de pozos petroleros incubadas a temperaturas de 50°C, 55°C, 80°C, 140°C, para lo cual se utilizaron los iniciadores 8 for y 1492 rev, enseguida se sometieron a una separación electroforética en agarosa de los productos de amplificación por PCR.

Dado que no se conocían las mejores condiciones de amplificación para estos DNA, se probaron diferentes temperaturas de alineación de 52°C a 54°C logrando mejores resultados a la temperatura de 53°C (Figura 5).

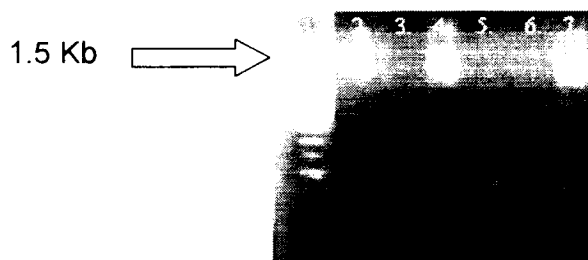


Figura 5. Electroforesis de la amplificación por PCR del gen 16S rRNA de las bacterias de núcleos de perforación de pozos petroleros incubadas a distintas temperaturas. Carril 1: Marcador de peso

molecular (100 bp DNA Ladder), Carril 2: a 50°C, Carril 3: a 55°C, Carril 4: a 80°C, Carril 5: a 140°C, Carril 6: Control negativo, Carril 7: Control positivo

Al no tener resultados satisfactorios en la amplificación de las muestras incubadas a 55°C y 140°C, se consideró la presencia de algunos contaminantes del DNA, por lo que se utilizó albúmina sérica bovina (Romanowski y col., 1993), y una temperatura de alineación de 53°C (Figura 6).

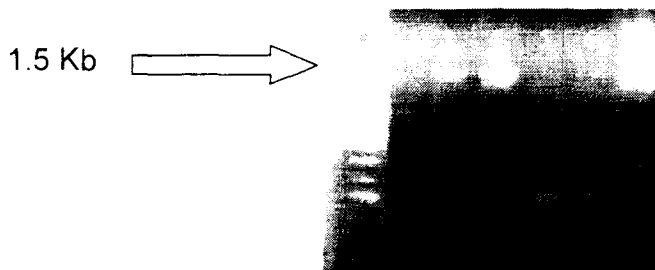


Figura 6. Electroforesis de la amplificación por PCR del gen 16S rRNA con albúmina sérica bovina, de las bacterias de núcleos de perforación de pozos petroleros incubadas a distintas temperaturas Carril 1: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder), Carril 2: a 50°C, Carril 3: a 55°C, Carril 4: a 80°C, Carril 5: a 140°C, Carril 6: Control negativo, Carril 7: Control positivo

Bajo estas condiciones se logró la amplificación del gen 16S rRNA de las bacterias de núcleos de perforación de pozos petroleros incubados a temperatura de 55°C. En ambas PCR no se pudo amplificar el DNA de la muestra de 140°C aunque se utilizaron las enzimas *Taq* polimerasa de Quiagen y Promega y se varió la concentración de  $MgCl_2$  (1.5 mM a 3.0 mM). Lo más probable es que a esta temperatura no exista ningún microorganismo viable, pues no se han encontrado reportes al respecto.

### 6.1.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN V6-V8 DEL GEN 16S rRNA

Con la finalidad de determinar las comunidades microbianas presentes en cada una de las muestras, se amplificó la región V6-V8 del gen 16S rRNA de bacterias de núcleos de perforación de pozos petroleros utilizando los iniciadores GC 968 for y 1401rev (Figura 7). Estos productos de amplificación permitieron identificar posteriormente a través de la movilidad electroforética y el número de bandas en el DGGE la cantidad de poblaciones microbianas presentes en cada una de las muestras.

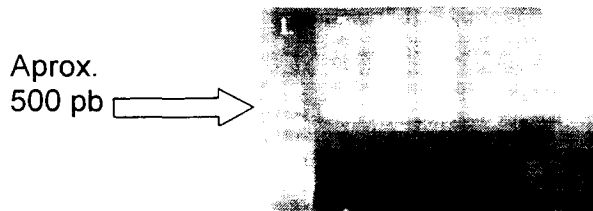


Figura 7. Electroforesis de la amplificación de la región V6-V8 del gen 16S rRNA de las bacterias de núcleos de perforación de pozos petroleros incubadas a distintas temperaturas Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: a 50°C, Carril 3: a 55°C, Carril 4: a 80°C, Carril 5: a 140°C, Carril 6: Control negativo, Carril 7: Control positivo

### 6.1.3 REAMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN 16S rRNA

De los productos de amplificación de PCR del gen 16S rRNA al purificarse se obtuvo una concentración baja o casi nula de DNA como se muestra en la Figura 8, con los cuales no se logró llevar a cabo la clonación.

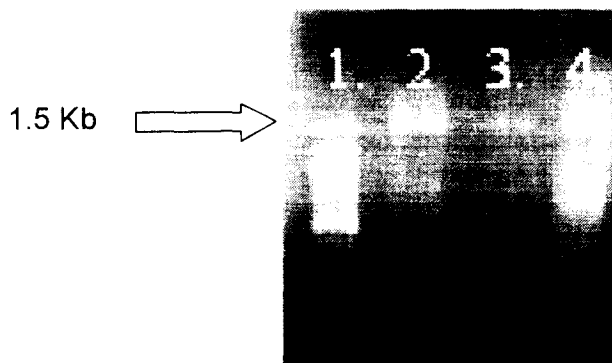


Figura 8. Electroforesis de productos de PCR purificados con filtros MONTAGE®-PCR de las bacterias de núcleos de perforación de pozos petroleros incubadas a distintas temperaturas Carril 1: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder), Carril 2: a 50°C, Carril 3: a 55°C, Carril 4: a 80°C.

Por tal motivo se procedió a una reamplificación del mismo gen. Sin embargo para llevar a cabo la clonación se requería la obtención de una banda intensa, aunque al no obtenerse la reamplificación del gen 16S rRNA se consideró que era por tres posibles razones: a) obtención de barrido de bandas en la reacción de PCR; o b) una mayor concentración del producto de PCR (Wiesner y Wiesnerová, 2003), c) que los iniciadores no pueden unirse en los extremos por lo cual no se puede reamplificar. De acuerdo con lo anterior el inciso c es el más posible, por lo que se reamplificó la región V1-V8 del gen.

#### 6.1.4 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN V1-V8 DEL GEN 16S rRNA

Para obtener productos de PCR de las muestras de bacterias crecidas a diferentes temperaturas, provenientes de diferentes medios de cultivo y al no lograrse la reamplificación del gen 16S rRNA se procedió a amplificar la región V1-V8 del gen 16S rRNA utilizando los iniciadores 124 for y UNI 1401 rev, obteniendo una mayor cantidad de producto de amplificación como se muestra en la Figura 9.

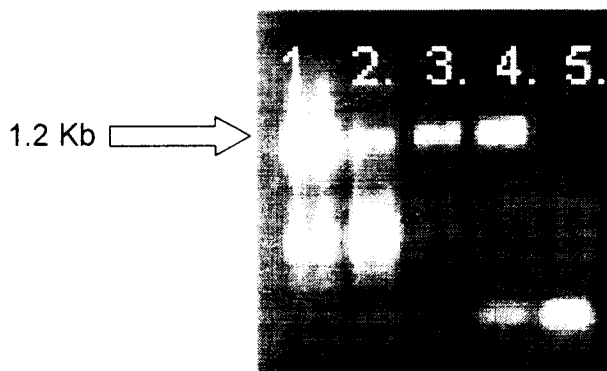


Figura 9. Electroforesis de la amplificación de la región de V1-V8 del gen 16S rRNA de las bacterias de núcleos de perforación de pozos petroleros incubadas a distintas temperaturas Carril 1: a 50°C, Carril 2: a 55°C, Carril 3: a 80°C, Carril 4: Control positivo: Carril 5: Control negativo.

#### 6.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN 16S rRNA DE ARQUEAS

Se procedió a la amplificación del gen 16S rRNA de arqueas de un núcleo de perforación de pozos petroleros incubadas a temperaturas de 80°C y 85°C para lo cual se utilizaron los iniciadores 46 for y 1100 rev, enseguida se sometieron a una separación electroforética en agarosa de los productos de amplificación por PCR. No se logró la amplificación de dicho gen en arqueas a pesar de que se modificó la temperatura de alineación, esto quizás se deba a que el método de extracción utilizado no fue el adecuado ó las condiciones de almacenamiento de dichas muestras no fueron las idóneas y por último que las alícuotas proporcionadas simplemente no contenían DNA de arqueas

### 6.3 PURIFICACIÓN DE PRODUCTO DE PCR DE LA REGIÓN V1-V8 DEL GEN 16S rRNA.

#### 6.3.1 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR DE LA REGIÓN V1-V8 DEL GEN 16S rRNA CON WIZARD®.

Para llevar a cabo la clonación fue necesario la purificación de los productos de PCR de la región V1-V8 del gen 16S rRNA, para lo cual se probaron dos métodos de purificación. Con el método Wizard® solo se obtuvieron las bandas de las bacterias incubadas a 50°C y 80°C (como se observa en la Figura 10), aunque cabe mencionar que se obtiene mayor cantidad de muestra (50 µl) es menor la concentración de DNA.

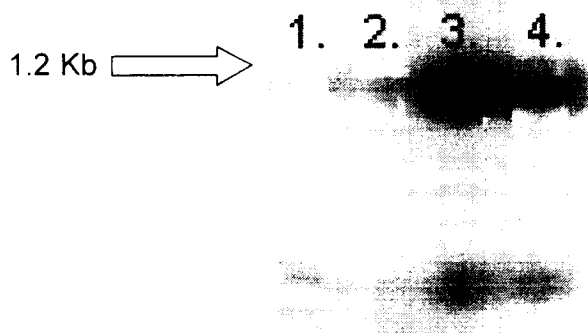


Figura 10. Electroforesis de productos purificados con Wizard® de la región V1-V8 del gen 16S rRNA de las bacterias de núcleos de perforación de pozos petroleros incubadas a distintas temperaturas. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: a 50°C, Carril 3: a 55°C, Carril 4: a 80°C.

#### 6.3.2 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR DE LA REGIÓN V1-V8 DEL GEN 16S rRNA CON FILTROS MONTAGE®

El otro método utilizado fue con filtros MONTAGE®-PCR, del cual se obtuvo un menor volumen del producto purificado (20 µl), pero se obtiene mayor concentración de DNA como se muestra en la Figura 11.

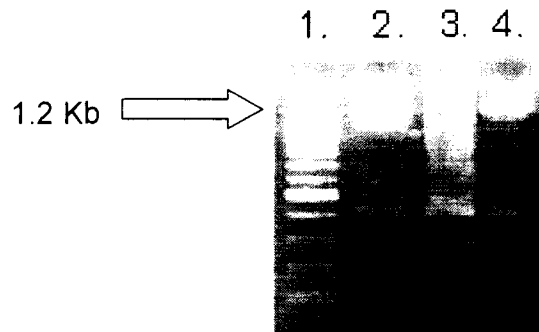


Figura 11. Electroforesis de productos de PCR V1-V8 purificados con filtros MONTAGE®-PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: a 50°C, Carril 3: a 55°C, Carril 4: a 80°C

Con ninguno de los dos métodos se lograron obtener resultados positivos de la muestras incubadas a 55°C. Por otra parte se obtuvieron mejores resultados con el método de purificación de filtros MONTAGE®-PCR y fue el utilizado para llevar acabo la clonación.

De estos productos se calculó la concentración de DNA con el programa KODAK ID Image Analysis Software, utilizando el marcador 100 bp DNA Ladder para determinar la concentración de DNA. La cuantificación de la cantidad de DNA necesario para la clonación Se realizó de la siguiente forma:

$$(50\text{ng de vector}) (1.2 \text{ Kb})/3 \text{ Kb vector}(3/1)=60 \text{ ng}$$

En donde 1.2 Kb es el tamaño del producto amplificado. Para el proceso de ligación se utilizó 91.54 ng de DNA de la muestra incubada a temperatura de 50°C, mientras que de la de 80°C fue una concentración de 80.72 ng de DNA. Se utilizó mayor concentración de DNA de la indicada (60 ng) para que se lleve de una manera adecuada la reacción de ligación del inserto con el vector.

### 6.3.3 DINÁMICA DE POBLACIONES

El análisis DGGE permite conocer la estructura, diversidad y dinamismo de las poblaciones microbianas. Con el propósito de conocer el perfil electroforético de las bacterias de núcleos de perforación de pozos petroleros incubadas a temperaturas de 50°C, 55°C, 80°C, se corrió un gel de DGGE con un gradiente de

desnaturalizantes del 30 al 60%, donde los volúmenes de productos de PCR de la región V6-V8 del gen 16S rRNA fueron variables tomando en cuenta la intensidad de las bandas obtenidas, se trató de homogenizar la cantidad de DNA que se utilizó en el gel.

De acuerdo con la Figura 12 en todas las muestras se observan alrededor de dos bandas, que posiblemente corresponden a dos poblaciones bacterianas. La banda común se encontró que las muestras incubadas a 50°C, y 80°C presentaron un corrimiento electroforético igual en sus bandas 2 y 3, y solo coincidieron con la muestra incubada a temperatura de 55 °C en la banda 2.

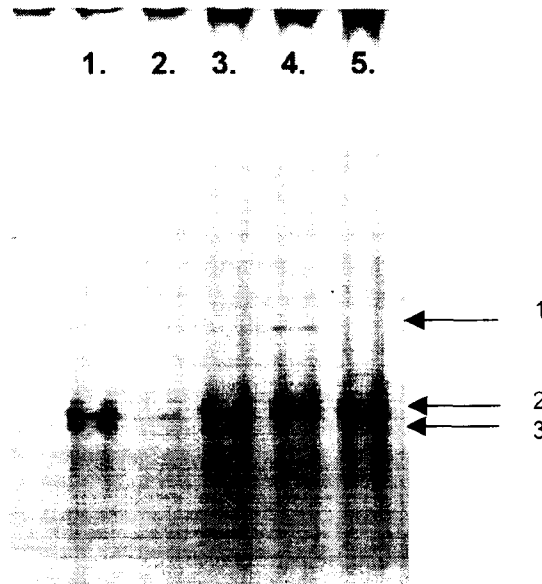


Figura 12. DGGE con porcentaje de desnaturalización de 30 a 60% utilizando productos de PCR de las regiones V6-V8 del gen 16S rRNA de las bacterias de núcleos de perforación de pozos petroleros incubadas a distintas temperaturas. En el Carril 1. Control positivo(cepa UAM1), Carril 2. Control negativo, Carril 3. a 80°C, Carril 4: a 55°C, Carril 5: a 50°C.

#### 6.4 CLONACIÓN

Se obtuvieron solo tres colonias blancas de las cuales al resembrar solo dos lograron crecer posteriormente en medio LB con ampicilina. Una vez seleccionadas y propagadas las colonias recombinantes, se obtiene el plásmido con el fragmento de interés (minipreps). Después de la lisis de la bacteria se realiza la amplificación de una porción del plásmido en la cual se encuentra el inserto, esto se puede lograr utilizando los iniciadores T7 y SP6 dirigidos a regiones específicas del plásmido. Los resultados se muestran en la Figura 14.



Aprox 1.4 Kb 



Figura 14. Electroforesis de la amplificación del inserto. Carril 1: Control positivo, carril 2: inserto, carril 3: Control negativo, carril 4: Marcador de peso molecular

Al realizar la amplificación por PCR del inserto, se nota que el iniciador T7 flaquea la región de inserción con 52 pb, mientras que el iniciador SP6 flaquea la región de inserción con 141 pb, esto aunado a los 1277 pb del amplicón, nos proporciona un fragmento de DNA de 1470 pb, como se observa en la Figura 14. Es importante destacar que de no haber aceptado el inserto solo se obtendrían bandas de 193 pb.

### 6.4.1 SECUENCIACIÓN

Para la secuenciación se requería (en el caso de DNAs clonados en plásmidos) una concentración de DNA de 400 ng/μl a partir del aislamiento del plásmido, la cual no se alcanzó, por lo que se realizó la secuenciación a partir de productos de PCR utilizando los iniciadores T7 y SP6 (ver anexo 1) donde la secuencia analizada fue la siguiente:

```
> Fionella
TGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATACATTTCBAATCGGA
TGGTTTGAAATTGAAAGGCAGCTTCGGCTGCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCAATTAGCTAGTTGCTGAB
TAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGCCACACTTGGACTGACACAG
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATCCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGACCAACCCGCGCT
AGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAAATAAGCTGGTAA
TTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACTAGGTGGAAAGCT
TATCCGGAAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAGGCCACGGGTCGAA
GTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAA
CCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGGCAAGGCAGCTACCTGGACCAACACTGAACTGAGGCAAGAAAG
GTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTCGGTAGTCCCGCCCTAAACGATGCGAACTGAACTGTGGGTGCAAT
GCACCGAGTATCGAAGCTAACCGGTTAAGTTCGCGCCTGGGGAGTACGGTCGCACAGCTGAAACTGAAAG
ATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTGATGCAACGCGAAAGACCTTACCTGCGCT
TGACATGTCGAGAACTTTCCAGAGATGGATGGGTGCCCTTCGGGAACTCGAACACAGTGGTGCATGGCTAT
TCAGCTCGTGTGCTGAGATGGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCAATTABTTGCCATCAT
```

ATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCT  
 TGACATGTCGAGAAGCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCCTCGGGAACCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTGCG  
 TCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGGCAACGAGCGCAACCCCTGTCATTAGTTGCCATCATTGCG  
 GTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGGCGTCAAGTCCTCGTGGCCCT  
 TATAACCAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGTACAGAGGGTAGCCAAGCCGCGAGGCGGAGCCAATCTC  
 AAAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGG  
 TCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCC.

Las reacciones de secuenciación "forward y reverse" permitieron crear una secuencia de aproximadamente 1268 nucleótidos, que comprenden aproximadamente el 82% del gen 16S RNA. Se realizó la comparación de la secuencia obtenida, contra la base de datos GenBank, utilizando el programa Blast. Los resultados se muestran en la Figura 15.

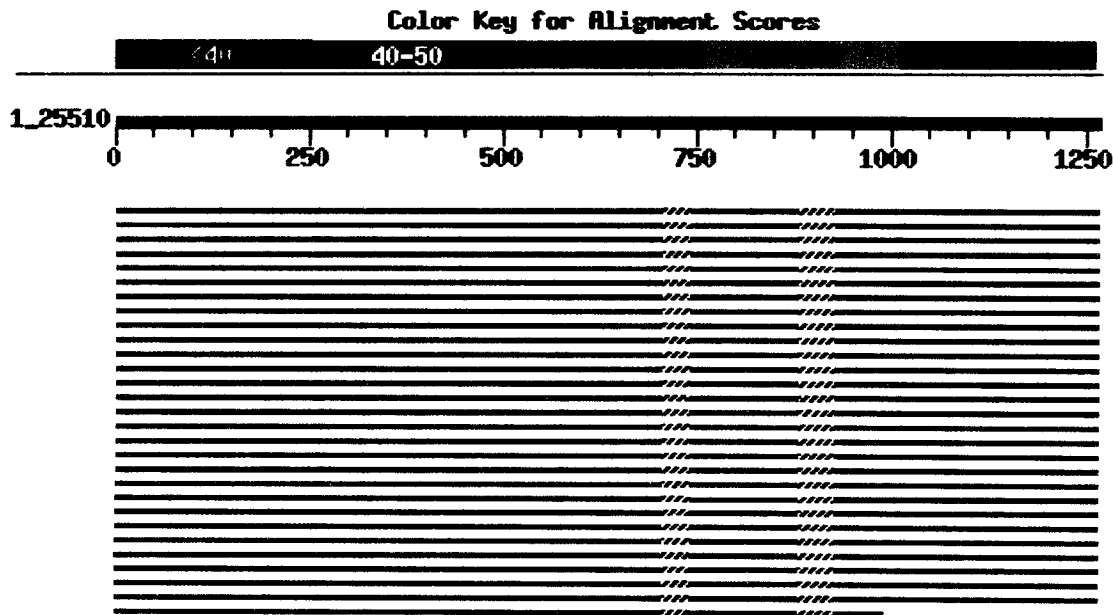


Figura 15. Representación gráfica de los resultados del programa BLAST para la secuenciación de 1268 nucleótidos, las líneas rojas representan la porción comparada en la base de datos, y la porción en gris la no comparada.

Conforme a estos resultados (Figura 15), se puede apreciar que en las 25 secuencias más cercanas a la nuestra, existen dos regiones entre las posiciones 707 a 742 y 828 a 928, en las que no hay suficiente similitud para establecer la comparación, por lo que el alineamiento en esas zonas está truncado. Sin embargo, cuando se considera la secuencia total se obtuvieron porcentajes de similitud elevados (Tabla 12).

Tabla 12. Resultados del Blast (GenBank), porcentajes de similitud con la secuencia de 1268 pb.

Similitud con otros microorganismos	Registro	Porcentaje de similitud
Unidentified bacterium clone W4B-B03 16S ribosomal RNA gene	<a href="#">gi 33392175 gb AY345491.1 </a>	97%
<i>Bacillus cereus</i> strain J-1 16S r	<a href="#">gi 32351138 gb AY305275.1 </a>	97%
<i>Bacillus</i> sp. A4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">gi 40218217 gb AY489119.1 </a>	97%
<i>Bacillus anthracis</i> strain 2000031664 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">gi 23429641 gb AY138383.1 </a>	97%

Al no compararse dos zonas con la base de datos, se seleccionó la zona de 707 a la 928 la cual abarca los fragmentos no comparados y se analizó con el mismo programa obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 16.

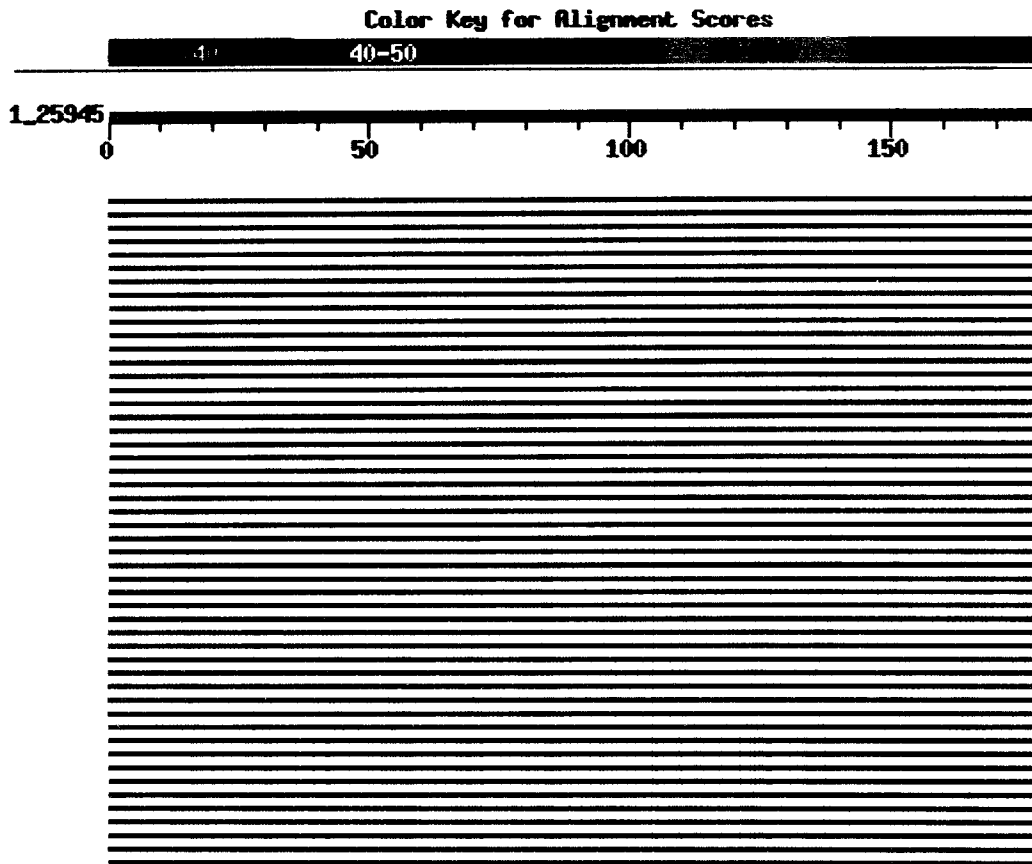


Figura 16. Secuenciación del fragmento 707 al 928 pares de bases, donde las líneas rojas representan la porción comparada en la base de datos la cual fue de un 100%.

Los perfiles obtenidos de los fragmentos 707 al 928 muestran una similitud del 100%, los resultados de dichas comparaciones se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Resultados del Blast (GenBank), porcentajes de similitud con la secuencia de 707 a la 928 pb.

Similitud con otros microorganismos	Registro	Porcentaje de similitud
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<a href="#">gi 38259908 gb AY445079.1 </a>	100 %
Uncultured bacterium clone	<a href="#">gi 56122965 gb AY838525.1 </a>	100%
Uncultured <i>Stenotrophomonas</i> sp.	<a href="#">gi 31540961 gb AY307998.1 </a>	100%
Uncultured <i>gamma proteobacterium</i>	<a href="#">gi 46451461 gb AY587207.1 </a>	100%
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<a href="#">gi 22658451 gb AY131216.1 </a>	100%
Bacterium 'Smarlab BioMol-230108	<a href="#">gi 29568979 gb AY230768.1 </a>	100%
<i>Pseudomonas</i> sp.	<a href="#">gi 34525870 emb AJ551156.1 PSP551156</a>	100%
<i>Pseudomonas beteli</i>	<a href="#">gi 4165412 dbj AB021406.1 </a>	100%
<i>Pseudomonas geniculata</i>	<a href="#">gi 4165410 dbj AB021404.1 </a>	100%

Dado que los resultados que arrojaba el programa BLAST para nuestra secuencia total y parcial eran muy diferentes, es decir, ninguna de las secuencias más cercanas, obtenidas para la comparación total, se encontraba en los resultados de la comparación parcial. Esto podría indicar que se trataba de una secuencia de tipo quimérica. A fin de comprobar lo anterior, se utilizaron los servicios de análisis en línea del RDP (Ribosomal Database Project versión 8.), que contiene el programa Chimera\_Check versión 2.7, el cual realiza comparaciones por fragmentos de la secuencia total, y aporta resultados (Figura 17) que permiten decidir si la secuencia en cuestión corresponde a una secuencia quimérica.



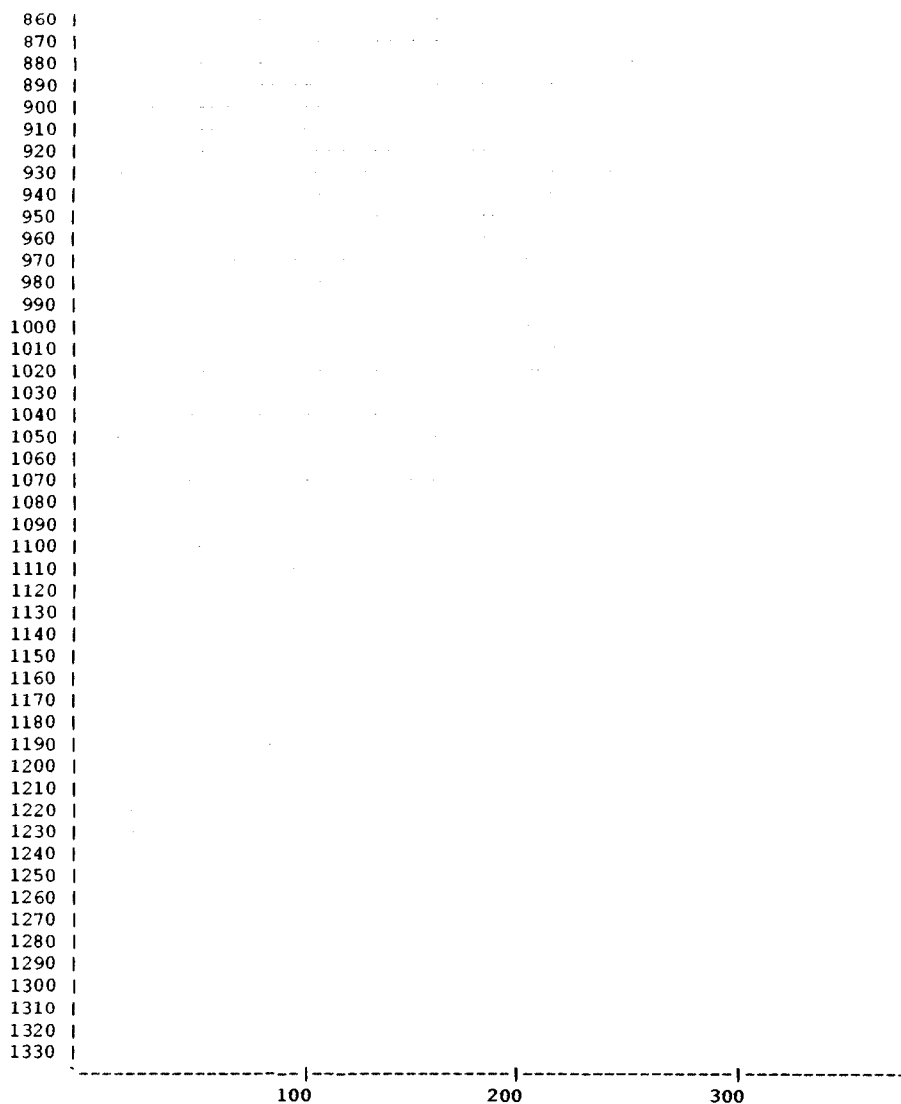


Figura 17. Interpretación de resultados de la secuencia de tipo quimérico.

Los datos obtenidos del Chimera\_check se muestran en a Tabla 14.

Tabla 14. Interpretación de los resultados por detección quimérica.

<b>Fragmento 1, secuencia aproximada de la posición 1 a 580</b>
---

*Bacillus cereus* 16S rRNA gene, strain TA32-5, partial.

*Bacillus cereus* 16S rRNA gene, strain ATCC10702, partial

*Bacillus cereus* 16S rRNA gene, strain RC607, partial.

*Bacillus cereus* str. TA32-5.

*Bacillus cereus* str. RC607.

*Bacillus cereus* VKM 684.

*Bacillus cereus* str. CH70-2.

*Bacillus thuringiensis* str. WS 2617.

*Bacillus* BSID723 str. BSID723.

---

**Fragmento 2, secuencia aproximada de la posición 581 a 1262**

---

*S. maltophilia* 16S rRNA gene, strain LMG 958-T.

*Stenotrophomonas* sp. str. S3.

*Stenotrophomonas maltophilia* LMG 958 (T).

*Stenotrophomonas* sp. 16S rRNA gene, isolate S3.

*Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637 (T).

*Stenotrophomonas maltophilia* LMG 10873.

*Stenotrophomonas maltophilia* LMG 10877.

*Stenotrophomonas maltophilia* str. VUN 10, 012.

*Stenotrophomonas maltophilia* LMG 11003.

*Stenotrophomonas maltophilia* LMG 957.

---

**Fragmento 3, secuencia aproximada de la posición 1 a 1262**

---

*Bacillus cereus* 16S rRNA gene, strain ATCC10702, partial.

*Bacillus cereus* 16S rRNA gene, strain TA32-5, partial.

*Bacillus cereus* 16S rRNA gene, strain RC607, partial.

*Bacillus cereus* str. TA32-5.

*Bacillus cereus* str. RC607.

*Bacillus cereus* VKM 684.

*Bacillus cereus* str. CH70-2.

*Bacillus cereus* 16S rRNA gene, strain CH70-2, partial.

*Bacillus megaterium* str. MK64-1.

*Bacillus megaterium* 16S rRNA gene, strain MK64-1, partial.

*Bacillus* sp. str. S23440.

str. G11137.

*Bacillus* sp. str. S23402.

str. G21021.

str. STS\_R2A\_54.

str. is049.

clone ACK-DE58.

Unidentified *gamma proteobacterium* clone ACK-DE58 16S ribosomal



RNA

*Bacillus* sp. str. AG-05

clone ACK-DE52.

Por lo tanto, con estos datos es difícil determinar a que tipo de microorganismo corresponde el DNA secuenciado, inclinándonos mas a pensar que se trata de una secuencia quimérica.

## **7. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS**

Se logró la detección del gen 16S rRNA de bacterias, en núcleos de perforación de pozos petroleros de todas las muestras analizadas a 50°C, 55°C, 80°C y 140°C, sin embargo en la purificación se perdió considerable cantidad de producto. En la amplificación del gen 16S rRNA de arqueas de un núcleo de perforación de pozos petroleros incubadas a temperaturas de 80°C y 85°C no se obtuvo la amplificación de dicho gen debido a que el método de extracción ó almacenamiento no fue el adecuado, aunado a que la cantidad DNA proporcionada era insuficiente por lo cual no se logró seguir con el esquema de trabajo establecido para arqueas.

Por otra parte se amplificó la región V6-V8 del gen 16S rRNA de las bacterias muestras analizadas a la temperatura de 50°C, 55°C, 80°C y 140°C, con ello se identificaron dos poblaciones microbianas mediante el análisis de DGGE.

Cabe mencionar que estas poblaciones son no cultivables o que no pudieron ser aisladas con las técnicas utilizadas, por lo cual no se logró cumplir con el objetivo de aislar los microorganismos que se encontraban en los medios de cultivos mixtos, para un estudio individual.

Debido a que los iniciadores no se pudieron acoplar al DNA no se logró reamplificar el gen 16S rRNA, por lo tanto se amplifico la región de V1-V8 del gen 16S rRNA obteniendo así los productos de PCR de las muestras de 50°C y 80°C para llevar acabo la clonación.

Se obtuvieron dos clonas de la muestra 80°C, de las cuales se llevo acabo la extracción del plásmido para comprobar la presencia del inserto y con ello realizar la secuenciación para determinar el microorganismo procedente de dicha muestra.

Debido a que la secuencia obtenida es de tipo quimérico no se logró determinar la filogenia del microorganismo presente.

## **8. CONCLUSIONES**

Se obtuvo la amplificación del gen 16S rRNA de bacterias en núcleos de perforación de pozos petroleros en las muestras incubadas a temperatura de 50°C, 55°C, 80°C mientras que no se logro la amplificación de la muestra incubada a 140°C. Aunque a partir de estos productos de PCR no era posible llevar acabo la clonación se decidió reamplificar el gen sin lograrlo.

Por lo cual se amplifico la región V1-V8 del gen 16S rRNA donde solo se pudo amplificar las muestras incubada a 50°C y 80°C a partir de las cuales se llevo acabo la clonación, obteniéndose dos clonas de la muestra incubada a 80°C, de la que se realizó una secuenciación, lo cual no permitió la determinación filogenética del DNA del microorganismo insertado durante la clonación, ya que la secuencia obtenida se considera que es de procedencia quimérica, lo cual no permite una comparación especifica con el Genbank, aunado a que los porcentajes de similitud no son confiables.

Por otra parte se amplifico la región V6-V8 para llevar acabo el DGGE con el cual se pudieron identificar aproximadamente dos poblaciones microbianas en cada una de las muestras. Con este método se pudieron identificar las bandas con mayor intensidad lo cual nos indica que estas poblaciones son parte importante dentro del consorcio ya que son microorganismos no cultivables debido a que requirieren condiciones estrictas para su crecimiento.

No se logro la amplificación del gen 16S rRNA de arqueas de un núcleo de perforación de pozos petroleros incubadas a temperaturas de 80°C y 85°C por lo cual no fue posible cubrir con los objetivos propuestos.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Amman R.; Ludwig W. and Schleifer K. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143.

Atlas R. y Bartha R. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson educación, S.A., Madrid.

Ehrlich H. 1996. *Geomicrobiology*. Ed. Marcel Dekker. U.S.A. pp 719

Fredrickson J. and Phelps T. 1997. Subsurface drilling and sampling. pp: 526. In: Hurst, J.; Knudsen G.; McInerney M.; Stetzenback L.; Walter M. (Eds). *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press. Washington.

Fredrickson K. and Onstott R. 1996. Microbes deep inside the earth. *Scientific American*. October. pp: 42.

Ghiorse W. 1997. Subterranean life. *Science*. **275**:789.

Harvey R. 1997. In situ and laboratory methods to study subsurface microbial transport. Pp:586-599. In Hurst, J.C; G.R. Knudsen; M.J. McInerney; L.D. Stetzenback M. Walter (Eds) *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press. Washington.

Hines M.; Visscher P., and Devereux R. 1997. Sulfur Cycling. pp:324-333. In: Hurst, J.; Knudsen G.; McInerney M.; Stetzenback L.; Walter M. (Eds) *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press. Washington.

Höfle M. 1992. Bacterioplankton community structure and dynamics after large scale release of nonindigenous bacteria as revealed by low molecular weight RNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3387-3394.

Holden C. 1997. Money for extremophiles. *Science*. **275**:623.

Huber R. and Stetter K. 1992. The Order Thermoproteales. Chapter 28, pp: 677-683. In Balows, A., H.G. Truper; M. D. Workin; W. Hander; K.H. Schleifer (Eds) *The*

prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria, ecophysiology, isolation, identification, applications. Springer-Verlag. New York.

Kieft T.; Fredrickson J.; Onstott T.; Gorby Y.; Kostandarithes H.; Bailey T.; Kennedy D.; Li S.; Plymale A.; Spandoni C., and Gray M. 1999. Dissimilatory reduction of Fe (III) and other electron acceptors by a *Thermus* isolate. Appl. Environ. Microbiol. **65**:1214.

Kato Ch.; Li L.; Nakamura Y.; Tamaoka J. and Horikoshi K. 1998. Extremely Barophilic Bacteria Isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a Depth of 11 000 meters. Appl. Environ. Microbiol. **64**:1510.

Krsek M.; and Wellington E. 1999. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. J. Microbiol. Meth. **39**:1.

Krumholz R. 1998. Microbial ecosystems in the earth's subsurface. ASM/New. **64**:197.

Leff L., Dana J., McArthur J. and Shimkets J. 1995. Comparison of methods for DNA extraction from stream sediments. Appl. Environ. Microbiol. **61**:1141.

Liesack W.; Janssen, P.; Rainey, F.; Ward-Rainey N. and Stackebrandt E. 1997. Microbial diversity in soil: The need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. En: Modern Soil Microbiology, pp 375-438. (Eds) Van Elsas J., Trevors J., and Wellington E. Marcel Dekker Inc., New York.

Liu S.; Zhou J.; Cole D.; Gajdarziska-Josifovska M.; and Phelps T. 1997. Thermophilic Fe (III)-reducing bacteria from the deep subsurface: the evolutionary implications. Science. **277**:1106.

Lovley R. and Chapelle F. 1995. Deep subsurface microbial process. Rev. Geophysics. **33**:365.

Madigan M., and Mairs B. 1997. Extremophiles. Scientific American. April. pp:82.

Madigan M.; Martinko J. and Parker J. 1998. Brock. Biología de los microorganismos. Prentice may- Hispanoamérica. México.

Malhotra K.; Sharma P. and Capalash N. 2004. Cooper and dyes enhance laccase production in *gamma-proteobacterium* JB. *Bioltechnol Lett.* 26:1047.

Mauricio J., y Herrera C. 1999. Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S. UNAM.

McInerney M. and Sublette K. 1997. Petroleum microbiology: biofouling, souring, and improved oil recovery pp:600-607. In Hurst, J.; Knudsen G.; McInerney M.; Stetzenback L.; Walter M. (Eds). *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press. Washington.

Monasiersky R. 1997. deep Dwellers. Microbes thrive far below ground. *Science.* 151:192-193.

Muyzer G. and Smalla K.. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. 73:127.

Muyzer G.; Waal E. and Uitterlinden, A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ Microbiol.* 59:695.

Pace R.; Stha, D.; Lane, D. and Olsen G. 1986. The analysis of natural Microbial populations by ribosomal rRNA sequences. En: *Advances in Microbial Ecology.* 9:1.

Pedersen K. 1993. The deep subterranean biosphere. *Earth-Science Reviews.* 34:243.

Ramirez S., 1999., *Molecular Ecology of Frankia and other soil bacteria under natural and chlorobenzoate-stressed conditions.* Tesis doctoral. Laboratory of

Ramirez S., 1999., Molecular Ecology of *Frankia* and other soil bacteria under natural and chlorobenzoate-stressed conditions. Tesis doctoral. Laboratory of Microbiology, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.

Rice S. and Oliver J. 1992. Starvation response of the marine barophile CNPT-3. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2432.

Romanowski G.; Lorenz, M.; Wackernagel, W. 1993. Use of polymerase chain reaction and electroporation of *Escherichia coli* to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3438.

Saiki R.; Gelfand D.; Stoffel S.; Scharf S.; Higuchi R.; Horn G. and Erlich H. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487.

Seeger H. and Stetter K. 1992. The Orden Sulfolobales. Chapter 29. pp: 684-701 in: Balows, A., H.G. Truper; M.D. Working; W. Hander; K.H.Shleifer (Eds). The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria ecophysiology, isolation, identification, applications. Springer-Verlag, New York.

Smith R. 1997. Determining the terminal electron-accepting reaction in the saturated subsurface. pp: 577-585.

Stevens T. and McKinley J. 1995. Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. *Science.* **270**:450.

Torsvik V.; Goksoryr J.; Daae F., Sorheim R.; Michalsen J.; and Salte K. 1994. Use of DNA analysis to determine the diversity of microbial communities. En *Beyond the biomass*, pp39-48. Edited by K. Ritz, J. Dighton and K. E. Giller. British Soc. Soil Science Chichester.

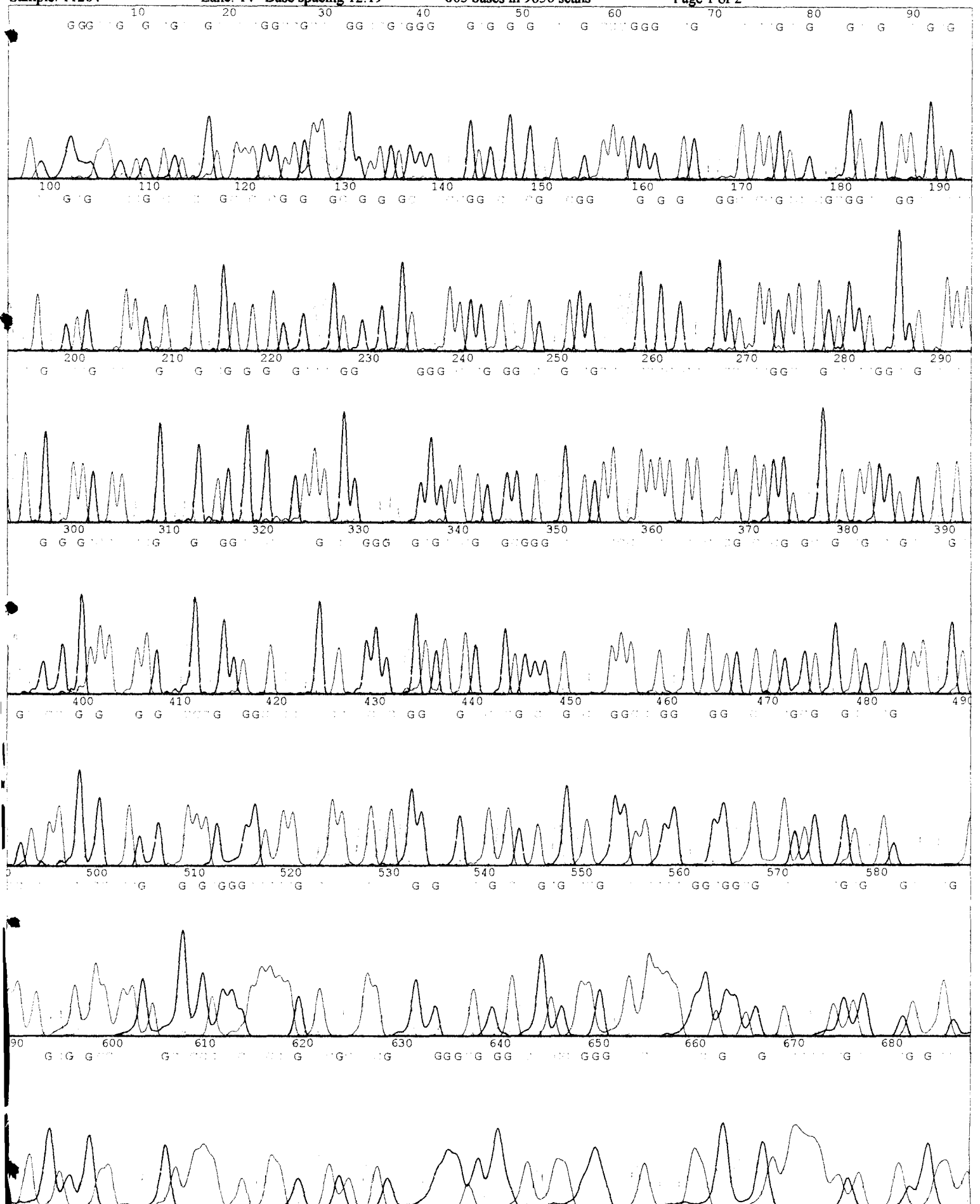
Wiesner I. and Wiesnerová D. 2003. Insertion of a reamplification round into the ISSR-PCR protocol gives new flax fingerprinting patterns. *Cellular & Molecular biology Letters.* **8**:743.

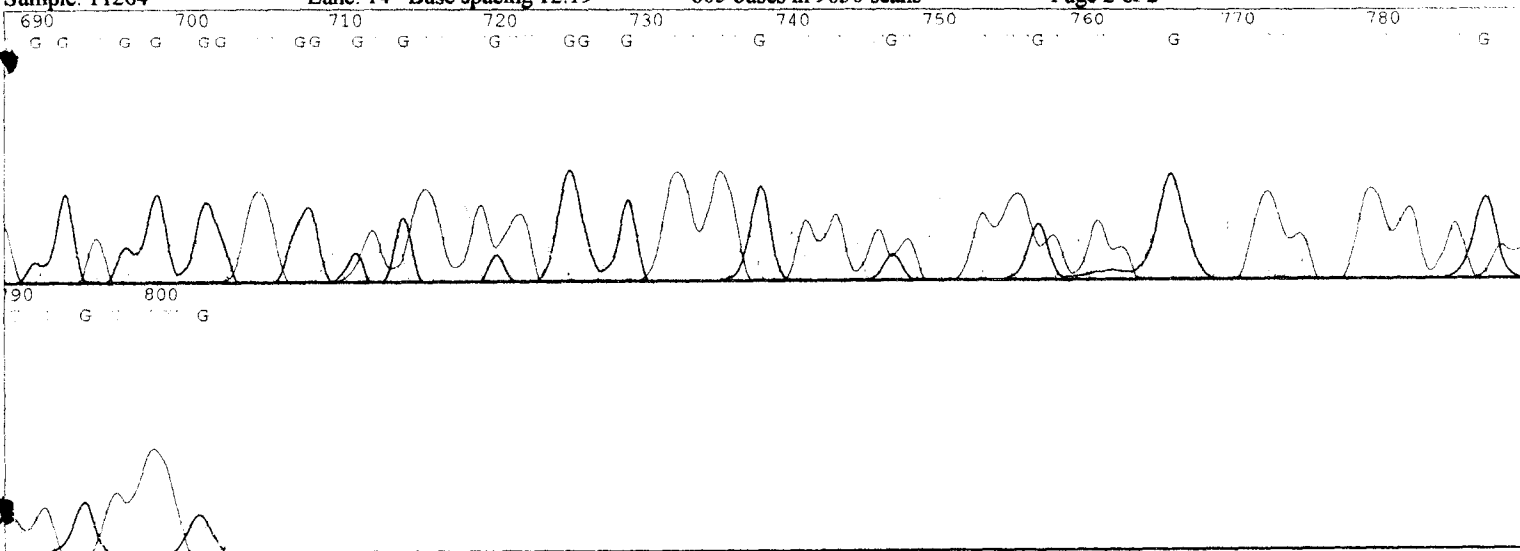
Zhou J.; Bruns, M. and Tiedje, J. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:316.

Zilling W. 1992. The order Thermococcales. Chapter 30. pp: 702-706. In Balows A., Truper H.; Workin M.; Hander W.; Schleifer K. (Eds). *The Prokaryotes. A handbook on the Biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer-Verlag, New York.

# **10. ANEXO 1.**

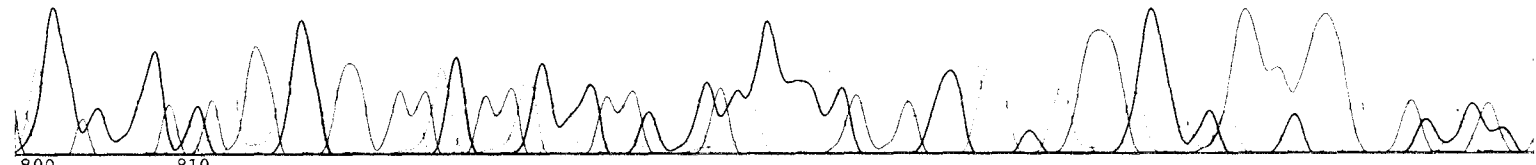








700 710 720 730 740 750 760 770 780 790  
GG G GGG G G GG G G G GGG GG GGG GGGG G GG GG GG G GG G G G



800 810  
G GG G GGG GC GG



## **“Detección de genes 16S RNA de bacterias y arqueas procedentes de un núcleo de perforación de petróleo”**

### **Resumen**

Castillo López M.T.

Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. Departamento Sistemas Biológicos. Calzada del Hueso N° 1100 Col. Villa Quietud. México D. F.

Palabras claves: Extremófilos, gen 16S rRNA, bacterias, arqueas, clonación, secuenciación.

Los microorganismos extremófilos tales como bacterias y arqueas han despertado interés por sus características de adaptación a ambientes extremos, estos microorganismos son susceptibles a ser usados en diversos procesos biotecnológicos como recuperación mejorada de petróleo, la desulfuración de hidrocarburos y la lixiviación de metales, en donde las condiciones de temperatura, salinidad y presión son generalmente elevadas. Por otro lado, existe un gran interés en las enzimas que estos microorganismos poseen, debido a la estabilidad que presentan ante las condiciones extremas como pueden ser temperatura alta, elevada salinidad, etc (Torsvik, 1994).

Los microorganismos que se encuentran en el subsuelo a gran profundidad, han desarrollado adaptaciones fisiológicas que les permiten crecer y sobrevivir en condiciones extremas de presión y temperatura.

Tal es el caso de las bacterias que se encuentran en los yacimientos petrolíferos, que se supone han llegado hasta allí a través de los procesos de recirculación de material y agua. Los microorganismos que se encuentren en un núcleo de perforación, (recorte del subsuelo en

la zona de perforación de un pozo petrolero) pueden considerarse representativos de las comunidades presentes en el yacimiento. Sin embargo, su cultivo y caracterización representa grandes desafíos ya que se requiere reproducir las condiciones ambientales que originalmente tenían.

Por tal motivo, en este trabajo se utilizaron técnicas moleculares, independientes del cultivo, a fin de caracterizar los microorganismos presentes en núcleos de perforación.

En la E.N.C.B obtuvieron muestras del núcleo de perforación de un pozo petrolero. Alícuotas de las muestras se sembraron en diferentes medios enriquecidos (mixtos), e incubaron a diferentes temperaturas de 50°C, 55°C, 80°C, 85°C y 140°C. Después de 97 días los cultivos presentaron algún crecimiento, y se extrajo el DNA, del cual nos proporcionaron alícuotas.

Debido a que la concentración de DNA era baja, se amplificó el gen 16S rRNA de bacterias (incubadas a 50°C, 55°C, 80°C y 140°C de temperatura) y arqueas (incubadas a 80°C y 85°C). Los productos de PCR obtenidos de las primeras muestras (bacterias) fueron muy pobres. Por lo que se procedió a la reamplificación del gen 16S rRNA de dichas

muestras. Las reacciones de PCR para arqueas fueron negativos.

Posteriormente sé reamplifico la región V1-V8 del gen 16S rRNA que comprende aproximadamente el 80% del gen. Solo amplificaron las muestras de bacterias incubadas a la temperatura de 50°C y 80°C las que fueron utilizadas para el proceso de clonación. Lográndose solo dos clones de los productos de PCR procedentes de núcleos de perforación de pozos petroleros incubados a 80°C, de esta muestra se secuenció el producto de PCR.

El análisis filogenético basado en la secuencia de 1268 pb realizado por Blas nos indica que puede tratarse de una secuencia de tipo quimérica. Posteriormente al ser analizada la secuencia con el programa Ribosomal Database Project versión 8, indico que se trataba de una secuencia quimérica, donde al realizar una comparación del fragmento de la posición 1 a 580, se trato de *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis*, de la posición 581 a 1262 se trata de *Stenotrophomonas maltophilia* y *Stenotrophomonas sp.*, por ultimo se realizó una comparación

de la posición 1 a 1262 la cual indicó tratarse de *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, clone ACK-DE58, Unidentified *gamma proteobacterium*, *Bacillus sp.*, clone ACK-DE52.

Aunado a lo anterior las comunidades de bacterias del núcleo de perforación del pozo petrolero fueron estudiadas mediante DGGE para lo cual fue necesario la amplificación de la región V6-V8 del gen 16S rRNA, donde se determino la presencia de aproximadamente dos poblaciones bacterianas.

### Bibliografía

Torsvik V.; Goksoryr J.; Daae, F., Sorheim R.; Michalsen J.; and Salte K. 1994. Use of DNA analysis to determine the diversity of microbial communities. En *Beyond the biomass*, pp39-48. Edited by K. Ritz, J. Dighton and K. E. Giller. British Soc. Soil Science Chichester.

Wiesner I; and Wiesnerová D.; 2003. Insertion of a reamplification round into the ISSR-PCR protocol gives new flax fingerprinting patterns. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 8:743-748.