

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



“Evaluación de la diversidad metagenómica de una fuente termal del Santuario de Ampay-Apurímac, mediante el uso de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)”

Presentada por:

Raquel Alvarez Ccoscco

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú
2017

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**“Evaluación de la diversidad metagenómica de una fuente termal del
Santuario de Ampay-Apurímac, mediante el uso de electroforesis
en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)”**

Presentada por:
Raquel Alvarez Ccoscco

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dr. Víctor Meza Contreras
PRESIDENTE

Dra. Doris Zúñiga Dávila
MIEMBRO

Mg. Sc. Rosa Espejo Joya
MIEMBRO

Ph. D Gretty Villena Chávez
ASESORA

Ph. D. Gabriel Marcel Gutiérrez Correa
Co ASESOR

Dedicatoria

Quiero dedicar esta tesis a mi madre Francisca Ccoscco Huaraca, porque me enseñó a soñar y a luchar por lo que quiero. A mi hermana Irma y a Yurgen Romero quienes fueron mis pies cuando no pude caminar. A don Baldomero Palomino por su invaluable apoyo. Desde el fondo de mi corazón ¡Gracias!

Agradecimiento

Agradecimientos especiales a mis tutores Gretty Villena y Marcel Gutierrez, por haberme guiado con toda su voluntad, paciencia y cariño. Así mismo, agradezco la colaboración de mis compañeros del laboratorio, en especial a Yvette Ludeña y Sujay Paul.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Micología y Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria la Molina, Financiado por el Proyecto “Análisis metagenómico de la diversidad microbiana en fuentes termales del Santuario de Ampay-Apurímac. Contrato N° 143-FINCYT-IB-2013.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	
ABSTRACT	
K'USKISQAP PISIKAYNI	
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
II. REVISIÓN LITERARIA	4
2.1 METAGENÓMICA	4
2.2 GENES PARA EL ANÁLISIS TAXONÓMICO	6
2.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN	8
2.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	10
2.5 ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE)	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN DE LA TESIS	14
3.2 UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	14
3.3 MUESTREO	14
3.4 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	15
3.4.1 Materiales de uso rutinario	15
3.4.2 Soluciones	15
3.4.3 Reactivos de Uso Molecular	16
3.4.4 Equipos	17
3.5 ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS AMBIENTALES.	17
3.5.1 Estandarización del protocolo de extracción de ADN a partir de la muestras de agua.	17
3.5.2 Estandarización del protocolo de extracción de ADN a partir de la muestra de sedimento.	19

3.5.3	Análisis cuantitativo de ADN metagenómico	21
3.5.4	Análisis cualitativo de ADN metagenómico	21
3.6	ESTANDARIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE HIBRIDACIÓN DE LOS CEBADORES DE LOS GENES 16S Y 18S PARA LAS MUESTRAS AMBIENTALES	22
3.7	ESTANDARIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL DGGE	25
3.8	RECUPERACIÓN DE LOS AMPLICONES	26
3.9	PCR DE LOS AMPLICONES DEL DGGE	27
3.10	SECUENCIAMIENTO	27
3.11	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS	27
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	28
4.1	ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE ADN EXTRAÍDO A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA Y SEDIMENTO	28
4.2	OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO DE LOS CEBADORES DE LOS GENES 16S Y 18S PARA LAS MUESTRAS AMBIENTALES	31
4.3	ESTANDARIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL DGGE	38
4.4	PCR DE LOS AMPLICONES DEL DGGE	40
4.5	EVALUACIÓN DE LOS AMPLICONES SECUENCIADOS DE LA MUESTRA AMBIENTAL	42
V.	CONCLUSIONES	49
VI.	RECOMENDACIONES	50
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
VIII.	ANEXO	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencias de cebadores para los genes ribosomales 16S y 18S.	23
Tabla 2: Mezcla de reacción de PCR para los genes ribosomales 16S y 18S.	23
Tabla 3: Parámetros de la PCR para los genes ribosomales 16S y 18S.	24
Tabla 4: Componentes para la preparación de gel de poliacrilamida al 7% con diferentes concentraciones de UF.	26
Tabla 5: Parámetros de programación del equipo de DGGE para los genes 16S y 18S.	26
Tabla 6: Lecturas de absorbancia correspondientes al análisis cuantitativo del ADN metagenómico de fuente termal de Ampay.	28
Tabla 7: Determinación del tamaño de los amplicones de ADN metagenómico de agua y sedimento, con el uso del software Quantity One ® del analizador de imágenes Chemidoc. BIORAD®.	37
Tabla 8: Análisis <i>Blast</i> para identificación de microorganismos presentes en las muestras ambientales de agua y sedimento, en base a secuencias del gen 16S separadas mediante DGGE.	46
Tabla 9: Análisis Blast para identificación de hongos presentes en las muestras ambientales de agua y sedimento, en base a secuencias del gen 18S separadas mediante DGGE.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa de ADN metagenómico de muestras de agua.	29
Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa de muestras de ADN metagenómico de sedimento.	29
Figura 3: Comparación del Tamaño promedio de ADN metagenómico extraído a partir de muestras de agua y sedimento de una fuente termal de Ampay.	31
Figura 4: Electroforesis de los productos de la PCR con el ADN molde de <i>E. coli</i> , cebadores GC-948F/ L1401R.	33
Figura 5: Electroforesis de los productos de la PCR con el ADN molde de las muestras ambientales y los cebadores GC-948F/ L1401R.	33
Figura 6: Electroforesis de los productos de la PCR con el ADN molde de <i>E. coli</i> y los cebadores 1055F/1406R-GC.	34
Figura 7: Electroforesis de los productos de la PCR con el ADN molde de las muestras ambientales y los cebadores 1055F/1406R-GC.	34
Figura 8: Electroforesis de los productos de la PCR con el ADN molde de <i>E. coli</i> y los cebadores F16SrRNA-GC/R16S rRNA.	35
Figura 9: Electroforesis de los productos de la PCR con el ADN molde de las muestras ambientales y los cebadores F16SrRNA-GC/R16S RNA.	35
Figura 10: Electroforesis de los productos de la PCR con el ADN molde de <i>Aspergillus</i> y los cebadores NS1/GC-Fung.	36
Figura 11: Electroforesis de los productos de la PCR con el ADN molde de las muestras ambientales y los cebadores NS1/ GC-Fung.	36
Figura 12: DGGE de los productos de la PCR del ADN metagenómico con distintos pares de cebadores del gen 16S.	38
Figura 13: Bandas del DGGE de los productos de PCR del ADN metagenómico con los cebadores 1055F/1406R-GC del gen 16S.	39
Figura 14: Bandas del DGGE de los productos de PCR del ADN metagenómico con los cebadores NS1/GC-Fung del gen 18S.	40
Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa de los amplicónes del gen 16S, 1055F/1406R.	41
Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa de los amplicónes 18S, NS1/Fung.	42
Figura 17: Alineamiento múltiple de todas las secuencias del gen ribosomal 16S bacteriana	43

del presente estudio.

Figura 18: Alineamiento múltiple de todas las secuencias del gen ribosomal 18S de hongo del presente estudio. 44

Figura 19: Árbol filogenético basado en el algoritmo *Neighbor-Joining* de los genes ribosomales 16S y 18S de las muestras de agua y sedimento. 45

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Composición de las soluciones.	60
Anexo 2: Datos estadísticos de la determinación del tamaño de ADN ambiental.	61
Anexo 3: Datos estadísticos de la determinación del tamaño de los amplicones de ADN metagenómico de agua y sedimento.	61

RESUMEN

En los últimos años, la metagenómica ha ganado gran acogida entre los investigadores de diversos campos de la microbiología. La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) se utiliza como una estrategia básica para la caracterización microbiana mediante el uso del ADN metagenómico. La Técnica del DGGE es altamente sensible y confiable ya que es capaz de detectar por encima del uno por ciento de la diversidad presente en una comunidad microbiana, incluyendo microorganismos no cultivables. En el presente trabajo se realizó la evaluación de la diversidad microbiana de una fuente termal Carboncañana del Santuario de Ampay a partir de las secuencias obtenidas del DGGE. El ADN fue extraído a partir de dos muestras ambientales: sedimento y agua. Se utilizaron los cebadores GC-948F/ L1401R, 1055F/ 1406R-GC y F16SrRNA-GC/ R16S rRNA para el gen 16S de bacterias, 0348F-GC/0691R para arqueas y NS1/ GC-Fung para hongos. Las bandas generadas en el DGGE a partir de los productos generados por los cebadores 1055F/1406R-GC presentaron perfiles más definidos y claros respecto al resto de los cebadores del gen 16S. De acuerdo a la estandarización del protocolo DGGE, se logró una mejor resolución de las bandas utilizando gel de poliacrilamida a una concentración de siete por ciento para amplicones de los genes ribosomales de bacterias y hongos; con rangos de desnaturalizante del 36-65 y 25-55 por ciento para bacterias y hongos respectivamente. En el análisis de la diversidad microbiana se encontró que en la fuente termal predominan las accesiones que pertenecen a las familias: Pseudomonadaceae, Aspergillaceae, Patellariaceae, Sporormiaceae y Tubeufiaceae. Los géneros predominantes fueron: *Pseudomonas* y *Aspergillus*. Así mismo, también se encontraron bacterias y hongos no cultivables. En la muestra de agua se encontró mayor diversidad de hongos que en la muestra de sedimento.

Palabras claves: Apurímac, electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE), ARNr 16S, ARNr 18S, metagenómica.

ABSTRACT

Nowadays, metagenomics is being used by many researchers in different fields of microbiology. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) is used as a basic strategy in microbial characterization through using metagenomics DNA. DGGE technique has high sensitivity and accuracy due to the fact it is able to detect over one per cent of the microbial diversity present in a community, including uncultured microorganisms. In the current work, the microbial diversity evaluation was performed from the spring thermal Carboncañana of Ampay Sanctuary using sequences which were obtained from DGGE gel. The DNA was extracted from two environmental samples: sediment and water. It was used GC-948F/L1401R, 1055F/ 1406R-GC y F16SrRNA-GC/ R16S rRNA primers to bacteria, 0348F-GC/0691R to archaea and NS1/ GC-Fung to fungi. DGGE bands from 1055F/1406R-GC primer were clearer and more definite than other 16S primers. According to DGGE protocol standardization, good resolution of bands was achieved using polyacrylamide gel at six per cent to both amplicóns from bacteria and fungi: 36-65 and 25-55 per cent of denaturant to bacteria and fungi respectively. After the microbial diversity analysis, it was found that in the thermal spring their predominant accessions belong to the following families: Pseudomonadaceae, Aspergillaceae, Patellariaceae, Sporormiaceae and Tubeufiaceae. The predominant genders were *Pseudomonas* and *Aspergillus*. In addition, we found uncultured bacteria and fungi. The water sample had more fungi diversity than the sediment sample.

Key words: Apurimac, Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), 16S rRNA, 18S rRNA, metagenomics.

K'USKISQAP PISIKAYNIN

Qhipa watakunapiqa, microbiologíamanta k'uskiqkunaqa ancha chaninchasqam llamk'ankun metagenómica sutichakuqwan. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) sutichakuqqa, ADN metagenómico nisqawan llamk'an, kusapunitaq microorganismokunap sutinta riqsinapaq. Técnica DGGE sutichakuqqa, kusatam llamk'kan, chaymi uno por ciento yupayta wasapaspam llapan microorganismos nisqakuna kawsasqanta rikuchin, hinam, mana tarpukuq microorganismo nisqakunatapas rikuchillanmi. Kay llamk'ayqa ñawpa willka llaqta Carboncañana del Santuario de Ampay, sutichakuq quñi p'ukyukuna kasqanpi apakurqan, chaypim DGGE niqaway ima microorganismos kasqankuta qhawaspam aymurayku. ADN sutichakuqqa hurqurukurqan iskay k'itimanta; huktaq yakup qunchu ukhunmanta hukaqtaq kikin ch'uya yakumanta. Kayniraq cebadorkunawanmi llamk'arqayku, bacterias gen 16S nisqapaqtaq GC-948F/ L1401R, 1055F/ 1406R-GC sutichakuqwan, F16SrRNA-GC/ R16S rRNA sutichakuqwanpas, hinallataq, arqueas nisqapaqtaq 0348F-GC/0691R nisqata, chaymanta hongos nisqakunapaqtaq NS1/ GC-Fung sutichakuqwan. DGGE sutichakuq secuencias nisqankunata llamipaspaqa, gen16S nisqamantaqa 1055F/1406R-GC sutichakuq cebadorkunan aswam ch'uyata bandas nisqakunataqa rikurparichin, wakinkunataq manam. DGGE nisqawan llamk'aspa, poliacrilamida gel nisqa, siete por ciento yupaypi llamk'achkaptin allin kasqanta taripayku, kaytaq bacteriapi hongospi genes ribosomales kaqkunamanta amplicónes nisqakunata kusa llamk'anapaq karqan; chay geltaqa desnaturizantiwan tupachikurqan, kaytaq 36-65 por ciento yupaywan bacteriaskunapaq llamk'arqan, kaqlataq 25-55 por ciento yupaywan hongoskunapaqpas llamk'arqallantaq. K'uskiypiqa, kayniraq ch'iñi kawsaq microbiokunap ayllunkunatam taripayku: Pseudomonadaceae, Aspergillaceae, Patellariaceae, Sporormiaceae hinallataq Tubeufiaceae sutichakuqtawan. Géneros nisqakunamantataq tariyku: Peudomonas nisqata Aspergillus nisqatawan. Hinaspapas, bacterias hongos mana tarpukuqkunatapas tarirqallayku. K'uskisqaykumantaqa kikin ch'uya yakupiqa hongoskunatam tariyku ichaqa yaku qunchunpiqa as pisillallatam taripayku.

Hatun rimaykuna. Apurimac, electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) sutichakuq, ARNr 16S, ARNr 18S, metagenómica nisqa.

I. INTRODUCCIÓN

La falta de investigación básica en nuestro país repercute a que muchas investigaciones aplicadas no alcancen los objetivos y resultados esperados (Ceroni 2010). El desconocimiento de la diversidad microbiana en las fuentes termales del Perú, no solo impide aplicar dicha información en diferentes campos de investigación como el taxonómico, ecológico, evolutivo y filogenético; sino también, en la explotación de la diversidad en la biotecnología y en la cuantificación de la abundancia de los taxones (Hugenholtz et al. 1998).

La metagenómica es el estudio de todo el material genético de una muestra ambiental, no se basa en las técnicas de cultivo ni requiere previo conocimiento de la diversidad microbiana (Riesenfeld, 2004). Un primer paso para el estudio de la metagenómica es la caracterización microbiana. En el Perú, los estudios de la taxonomía microbiana generalmente son realizados mediante las técnicas de cultivo convencional acoplados a una posterior identificación molecular de genes ribosomales. Sin embargo, debido a que el 99% de los microorganismos del ambiente no son cultivables, se han desarrollado nuevas tecnologías que utilizan directamente el material genético, por ejemplo las técnicas de *fingerprinting*, que se basan en el análisis directo de los productos de la PCR amplificados a partir del ADN metagenómico (Joshi y Deshpande 2010). Uno de estos métodos es la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) (Muyzer et al. 1993). Esta técnica es utilizada para separar los fragmentos de ADN de corta a mediana longitud, en base a sus temperaturas de fusión o *melting*; posteriormente los fragmentos de ADN separados son secuenciados para la caracterización taxonómica. Los fragmentos de ADN, productos de la PCR, son obtenidos a partir del ADN ambiental con el uso de los cebadores diseñados para un marcador molecular específico como son los genes ribosomales 16S y 18S.

La técnica del DGGE puede identificar polimorfismo genético de hasta un solo nucleótido sin la necesidad de secuenciar el ADN. Esta es una ventaja frente las técnicas moleculares convencionales de *DNA fingerprinting* que si lo requieren. Sin embargo para la caracterización taxonómica de los perfiles del DGGE es necesario el secuenciamiento de sus amplicones. La principal aplicación de esta técnica es la caracterización de comunidad microbiana de los ecosistemas complejos mediante el uso de los amplicones de los genes ribosomales 16S y 18S (Strathdee y Free, 2013). Esta técnica tiene alta sensibilidad y confiabilidad ya que es capaz de detectar por encima del uno por ciento de la diversidad de una comunidad microbiana (Muyzer et al. 1993 y Murray et al. 1996). Además, respecto al uso del cultivo convencional, el DGGE es una técnica que está cobrando gran acogida en el campo de la investigación taxonómica microbiana, no solo por su alta sensibilidad y confiabilidad sino también por ser menos costosa y más rápida (Green et al. 2009).

Numerosos estudios taxonómicos de muestras ambientales se han realizado con esta técnica: agua de mar (Lai et al. 2006), aguas termales (Aminin 2010), suelos (Nakatsu et al. 2000), Fangos (Deng et al. 2012); así como en el campo industrial (Fontana et al. 2005 y Piterina et al. 2013). En el Perú se ha reportado un solo estudio relacionado con la aplicación del DGGE, que correlaciona la diversidad microbiana con los ciclos biogeoquímicos en sedimentos marinos (Fry et al. 2006); sin embargo, no se han reportado estudios similares por los grupos de investigación a nivel nacional.

En el presente trabajo se utilizó la técnica de DGGE acoplada al secuenciamiento para la evaluación de diversidad microbiana presente en la fuente termal del Santuario de Ampay, en Huancavelica; constituyendo uno de los estudios iniciales de la metagenómica en el país.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la diversidad microbiana de la fuente termal del santuario de Ampay, mediante el uso de la técnica de DGGE.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar el protocolo de extracción de ADN metagenómico de una fuente termal para muestras de agua y de sedimento.
- Amplificar los genes ribosomales 16S y 18S, con cebadores diseñados para DGGE.
- Estandarizar el protocolo de DGGE para amplicones de 16S y 18S.
- Purificar y secuenciar los amplicones 16S y 18S, separados mediante DGGE

II. REVISIÓN LITERARIA

2.1 METAGENÓMICA

Convencionalmente se utilizó las técnicas de cultivo para la caracterización de la ecología microbiana. El uso de los medios de crecimiento, tales como el Agar nutritivo, los medios de Luria-Bertani, etc., permitieron el aislamiento y la caracterización de los microorganismos (Ahmad y Pichtel 2011). La mayor limitación de estas técnicas basadas en el cultivo es que no pueden ser utilizadas para la caracterización de la mayor parte de los microorganismos presentes en un ambiente, ya que más del 99 por ciento de estos no son cultivables (Riesenfeld et al. 2004). Sin embargo, aunque muchos microorganismos no pueden ser cultivados en los laboratorios, estos poseen fuentes de información en sus biomoléculas tales como los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. En la actualidad los genes del ARNr (ARN ribosomal) 16S y 18S son ampliamente utilizados para la caracterización filogenética de los microorganismos.

La metagenómica es el estudio de todo el genoma microbiano recuperado directamente a partir de una muestra ambiental, sin la necesidad de haber pasado por un proceso de cultivo o aislamiento previo (Mardis 2008, Kunin et al. 2008); además, el estudio de la metagenómica es importante para entender la bioquímica de los microorganismos cultivables y no cultivables, y sus interacciones con factores bióticos y abióticos (Ahmad et al. 2011). La metagenómica es ampliamente utilizada por los microbiólogos para los estudios de la diversidad microbiana, la interacción de las comunidades microbianas en los procesos geoquímicos, la asociación de los microorganismos con el hospedero dentro de una comunidad y la evaluación de los cambios ambientales debido a los efectos de la actividad microbiana. Las librerías producidas a partir de los metagenomas son importantes fuentes de información para la obtención de nuevas enzimas, antibióticos, etc. Así mismo tienen una

amplia aplicación en la industria, la biotecnología y la medicina (Handelsman et al. 2007). La construcción de las librerías a partir de los metagenomas, comprende las siguientes etapas: 1) aislamiento del ADN a partir de una muestra ambiental, 2) La muestra de ADN metagenómico puede ser analizado directamente o clonado en un hospedero bacteriano, creando una librería que contiene el genoma de todos los microorganismos presentes en el ambiente. La librería pueden ser utilizados de dos formas: mediante el estudio directo de las secuencias clonadas o la determinación de la proteína expresada a partir del gen introducido en el clon (Handelsman et al. 2007). La gran ventaja de la metagenómica es que analiza toda la composición genética de una muestra ambiental; mientras, las técnicas de cultivo solo permiten analizar las poblaciones cultivables.

En general para el secuenciamiento de las librerías metagenómicas se pueden utilizar distintos métodos de secuenciación: tecnologías de primera generación (FGS, “First Generation Sequencing”), como el método *Sanger* y capilaridad (Yu y Halonen 2015) y las tecnologías de segunda generación (NGS, “Next Generation Sequencing”) , como *Roche/454*, *Illumine* y *Helicos HeliscopeTM* (Mardis 2008).

En 1977, Frederick Sanger desarrollo una tecnología de secuenciación, basado en el método enzimático de terminación de la cadena (método de Sanger). Este método fue adoptado como la primera tecnología de la FGS aplicado para el secuenciamiento a nivel de laboratorios y a nivel comercial. Las tecnologías de NGS son diferentes que el método de Sanger. La secuenciación del ADN con métodos de NGS se realiza en paralelo de forma masiva, con alto rendimiento, costo reducido y no requiere de la clonación. Sin embargo, estas tecnologías todavía tiene grandes dificultades en los análisis de datos y la explicación biológica (Liu et al. 2012, Yu y Halonen 2015).

Generalmente para el estudio de la metagenómica se lleva a cabo una primera etapa de “screening” donde se evalúa la diversidad microbiana presente en la potencial muestra de

interés, este tipo de evaluación se basa en los métodos de análisis de los genes ARNr 16S y 18S (Handelsman et al. 2007), enfoque parcial del análisis de la comunidad microbiana presente en la muestra (Ahmad y Pichtel 2011). Esta primera etapa requiere la amplificación colectiva de los genes de ARNr 16S o 18S con un conjunto de cebadores para PCR tomando como plantilla el ADN metagenómico extraído, los productos amplificados pueden ser analizados mediante métodos de “fingerprinting”, librería de clones, etc. (Ahmad y Pichtel 2011). Los productos de ADN obtenidos a partir de estas técnicas pueden ser secuenciados para el análisis de la filogenia microbiana.

2.2 GENES PARA EL ANÁLISIS TAXONÓMICO

El ribosoma bacteriano es un complejo macromolecular que consta de una subunidad grande (50S) y una pequeña (30S), donde S (Svedberg) es la unidad de velocidad de sedimentación. Los pesos moleculares de las subunidades 50S y 30S son aproximadamente 1500 y 800 kDa respectivamente. La subunidad grande contiene 34 proteínas y dos secuencias de ARNr (Ácido Ribonucleico ribosomal) 23S y 5S que contienen 2971 pb y 120 pb respectivamente, mientras que la subunidad pequeña consta de 21 proteínas diferentes y una secuencia de ARNr 16S que contiene 1522 pb (Bouchet et al. 2008 y del Rosario y del Carmen 2004). Debido al papel fundamental de los ARN ribosomales, el número de copias, el tamaño del operón ribosómico, las secuencias de sus bases y la estructura secundaria de los tres ARNr están altamente conservados dentro de las especies bacterianas. Entre los tres tipos de los genes ribosomales (23S, 5S y 16S), el gen 16S es el más conservado (Bouchet et al. 2008, Woese 1987).

En 1983, Carl Woese y compañeros establecieron las líneas filogenéticas básicas de los procariotas mediante el análisis de las macromoléculas de ARNr 16S. Este estudio que dio lugar a una nueva visión del mundo microbiológico, demostrando que el gen 16S puede ser utilizado como un cronómetro molecular. La característica más resaltante del gen 16S, para su

uso como un marcador genético, es la presencia de nueve regiones hipervariables (HVRs) V1-V9; secuencias sujetas a la variación que se han ido distanciando a lo largo de la evolución (Chaudhary et al. 2015). Las HVRs están flanqueadas por regiones conservadas, usadas para el diseño de cebadores que permiten la amplificación de las regiones variables. En muchas investigaciones, las secuencias HVRs fueron utilizadas para la identificación taxonómica (Nubel et al. 1996, Lane 1991, Jun Wang 2008, Xintian Lai 2006, Achenbach y Woese 1995, Watanabe 2004, McIlhatton et al. 2002, Das et al. 2006, Van Hannen 1999). Así, las secuencias del ADNr 16S sirvieron para la caracterización de muchas especies, cuyas secuencias se encuentran en la NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y el RDP (*Ribosomal Database Project*).

El gen 16S es ampliamente usado para los estudios taxonómicos y filogenéticos de los procariontes, debido a que presenta características importantes (Janda y Abbott 2007, Woese 1987):

- Tiene una distribución universal, que permite la relación entre los taxones distantes.
- Débil transferencia horizontal (Daubin et al. 2003).
- Posee una constancia funcional; lo que sugiere que la tasa de cambio, al menos en una parte de la molécula, es lo suficientemente baja como para permitir la detección de las relaciones evolutivas lejanas.
- La longitud de la secuencia del gen 16S (1500 pb) es lo suficientemente grande como para permitir que las estimaciones de semejanza tengan validez estadística.

La presencia de un variable número de copias de ADNr 16S por genoma (Klappenbach et al. 2001), y la variación de estas secuencias dentro del mismo genoma o dentro de la misma especie, limitan su interpretación taxonómica (Veřtrovsky' y Baldrian 2013, Janda y Abbott 2007).

Actualmente, la mayoría de los estudios de caracterización microbiana a nivel de especie no realizan el secuenciamiento de las 1500 bases del gen 16S; ya que ello significa mayores costos a nivel de reactivos y mano de obra. Por lo tanto, aunque la información filogenética completa se encuentra a lo largo del gen, la región con alta variabilidad se encuentra en las primeras 500 bases (Woese et al. 1983). Así, estudios realizados por Wang et al. (2007) muestran que las secuencias de 400 y 200 bases son suficientes para la clasificación taxonómica a nivel de género y familia respectivamente. Un ejemplo a ello, es el estudio realizado por Patel (2001) quien concluye que 500 bases son suficientes para la identificación de aislados clínicos.

En los eucariotas el ARNr 18S es el homólogo al ARNr 16S de los procariotas. La molécula del ARNr 18S es parte de la pequeña subunidad ribosomal (40S). Esta molécula es usada para inferir las relaciones filogenéticas de los eucariotas a nivel de especies y género (con algunas excepciones) (Campo et al. 2015 y Anderson et al. 2003). Su idoneidad como herramienta filogenética se debe a que: tiene una función conservada, una tasa de mutación variable que depende de la posición estructural, y su ubicación en todo el taxón. Además cada célula eucariota posee un gran número de copias y permite el diseño de cebadores de PCR con mucha facilidad (Ouvrard et al. 2000). Diversos estudios de diversidad microbiana se han desarrollado mediante el uso del gen 18S en muestras ambientales; suelos (Smit et al. 1999, Chimutsa et al. 2015 y Oros-Sichler et al. 2006), aguas marinas (Keeling et al. 2014) y sedimentos fluviales (Nikolcheva et al. 2003).

2.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

En la naturaleza el ADN se encuentra en distintas formas: empaquetados en las células procariota y eucariota, fragmentos de ADN libre y partículas de virus. Las células pueden estar suspendidos en agua, unidos a una matriz sólida o aglomeradas formando de biopelículas (Tringe y Rubin 2005). La extracción y purificación de ácidos nucleicos constituyen la

primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular, y es seguida por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los métodos de extracción de ADN permiten obtener ácidos nucleicos purificados a partir de diversas fuentes para después realizar los análisis específicos de las modificaciones genéticas mediante la PCR. En este sentido la calidad y la pureza de los ácidos nucleicos son dos de las características más importantes en la extracción del ADN.

En el mundo de la investigación se aplican diversos métodos para la extracción de ADN, cuya elaboración y aplicación depende de la naturaleza de la muestra y el interés por una población de ADN. En la literatura se encuentran cientos de protocolos, por ejemplo, a partir de muestras de plantas (Sarwat et al. 2006), suelos (Zhou et al. 1996), y aguas marinas (Keeling et al. 2014), etc. Así mismo, también existen en el mercado diversos kits de extracción de ADN, pero en general todos los protocolos siguen los mismos principios que se detallan a continuación:

- Rotura mecánica o química de las células y suspensión de los núcleos en un buffer.
- Acción de los agentes que producen la lisis de las membranas celulares. Separan el ADN de los otros componentes celulares (proteínas, carbohidratos, membranas y paredes celulares), y lo liberan en la solución.
- Purificación del ADN mediante sucesivas precipitaciones, resuspensiones y concentraciones.

Las células de las muestras acuáticas son concentradas mediante la filtración. En este proceso algunas células pueden ser omitidas por su tamaño, por ello es importante escoger el filtro adecuado (Somerville et al. 1989). En las muestras sólidas (suelos y sedimentos) es más difícil concentrar las células y extraer el ADN sin contaminantes. Los suelos en su mayoría presentan inhibidos enzimáticos, como los ácidos húmicos que inhiben la actividad de la polimerasa (Tringe y Rubin 2005).

El ADN presente en una matriz sólida se puede aislar de forma directa, las células son lisadas dentro del material de la muestra; o de forma indirecta, donde son aisladas del material no celular antes de ser lisadas. En ambos casos, el ADN extraído de la muestra contiene contaminantes de materia orgánica que pueden ser removidos por los métodos tales como la electroforesis en gel de agarosa o la columna de cromatografía (LaMontagne et al. 2002). Si se desea obtener ácidos nucleicos muy purificados que no contengan contaminantes o inhibidores enzimáticos, es preciso aplicar los métodos de extracción adecuados, teniendo en cuenta diversos factores como el tipo de ácido nucleico, el organismo fuente, el material elegido, los resultados deseados y el uso posterior del ADN (Weighardt 2011). Además, se debe considerar como afectan las técnicas de extracción en la composición de las librerías del ADN metagenómico. Los métodos, con robustos procesos de lisis, son necesarios para la extracción del ADN de muchos microorganismos, pero pueden causar la degradación del ADN de otros (Tringe y Rubin 2005).

2.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En 1984 Kary Mullis dio a conocer el invento que revolucionó el mundo de la biología molecular, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica consiste en amplificar exponencialmente una secuencia específica del ADN bicatenario, generando grandes cantidades de amplicones a partir de cantidades inferiores de 1 µg de ADN como muestra (Tamay de Dios et al. 2013). La PCR es una técnica poderosa utilizada en la biología molecular por su fácil uso, rapidez y bajo costo (Joshi y Deshpande 2010).

El principio básico de la PCR es el uso de una molécula de ADN para la producción de dos copias, luego cuatro, ocho y así sucesivamente. Esta continua duplicación es acompañada por una proteína específica llamada polimerasa, que requiere un conjunto de componentes para su reacción enzimática: ADN molde, la enzima (polimerasa), los oligonucleótidos o cebadores, los desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina),

el ion magnesio (Mg^{+}), una solución amortiguadora y H_2O (Costa 2004). Todos estos componentes interactúan en tres principales etapas que componen a la PCR: desnaturalización, hibridación o alineamiento y extensión (Joshi y Deshpande 2010).

En la primera etapa, el ADN se desnaturaliza por las altas temperaturas (90-97 °C) durante un periodo que depende de la secuencia del templado. Las bases del ADN se unen entre sí por enlaces de hidrógeno; la Adenina (A) se enlaza con la Timina (T) por dos enlaces, mientras la Guanina (G) y la Citosina (C) por tres enlaces. La ruptura de la unión G-C requiere más tiempo y energía que la unión de la A-T. En la segunda etapa, los cebadores se alinean al extremo 3' del templado, previamente separados, y se hibridan con su secuencia complementaria hasta que la longitud sea suficiente para formar híbridos estables (20-30 nucleótidos). Es importante establecer la temperatura de hibridación o “*melting temperature*” (T_m) óptima (generalmente oscila entre 50-60 °C), que permita la formación del complejo templado-cebador. En la tercera etapa, una polimerasa resistente a altas temperaturas, la polimerasa *Taq*, actúa sobre el complejo templado-cebador y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; se extiende de 5' a 3' adicionando dNTPs para la formación de las cadenas complementarias. La temperatura óptima para esta reacción es de 72 °C y el tiempo de extensión depende del tamaño de los amplicones (Costa 2004).

La finalización de un ciclo concluye con la extensión y vuelve a reiniciar con la desnaturalización; así, al cabo del primer ciclo se obtienen dos moléculas bicatenarias del ácido nucleico original. El ciclo inicial se repite muchas veces (el número óptimo es de 20 a 50 veces en una PCR típica), sin la adición de más enzima y con el uso de las moléculas obtenidas en los ciclos anteriores como plantillas. De esta forma se produce un aumento exponencial del número de copias de la secuencia específica igual a 2^n , donde n es el número de ciclos (Joshi y Deshpande 2010)

Un enfoque parcial del análisis de una comunidad microbiana presente en una muestra ambiental es la caracterización de microorganismos mediante el uso de los métodos basados en la PCR; donde todo el ADN extraído de una muestra ambiental es usado como plantilla

(Ahmad y Pichtel 2011). Los productos de la PCR de los genes conservados, tales como los genes ribosomales 16S y 18S, son utilizados en muchos procedimientos de investigación como el DGGE, la clonación y el secuenciamiento (Joshi y Deshpande 2010). Generalmente, la caracterización microbiológica por la PCR se usa en la microbiología clínica para el diagnóstico de infecciones microbianas y es también utilizada en los laboratorios forenses (Chaudhary et al. 2015, Valones et al. 2009)

2.5 ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE)

Debido a que más del 99 por ciento de microorganismos no son cultivables, es esencial el desarrollo de nuevos métodos de identificación; para ampliar el conocimiento de la diversidad genética, la estructura poblacional y el rol ecológico de los microorganismos (Riesenfeld 2004). En los últimos años, la metagenómica o análisis genómico de una comunidad microbiana sin cultivar es una poderosa herramienta molecular ampliamente utilizada para el análisis de la diversidad microbiana (Handelsman 2004).

Frecuentemente, en el estudio de la metagenómica, se lleva a cabo una primera evaluación que consiste en la caracterización microbiana del ambiente en estudio, mediante los métodos basados en la PCR (Handelsman et al. 2007, Klindworth et al. 2013), en el que se analizan los genes 16S y 18S. La electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE) es uno de los métodos más utilizados para el primer sondeo de la diversidad microbiana (Kuřar y Avguštin 2012).

Esta técnica consiste en la separación de los fragmentos de ADN parcialmente desnaturados a través de un gel de poliacrilamida, estos fragmentos tienen similar tamaño pero diferentes secuencias. El gel de poliacrilamida contiene un gradiente lineal de desnaturante (mezcla de urea y formamida). La separación consiste en la disminución de la

movilidad de la doble hebra del ADN parcialmente desnaturalizada a través de la matriz de poliacrilamida, la hebra simple se moviliza mucho más lenta que la doble hebra (Handelsman 2004, Strathdee y Free, 2013). Dicha variación de movilidad se basa en la distinta composición de guanina (G) y citosina (C) que poseen las secuencias de los fragmentos, ya que la fuerza de unión de las bases nitrogenadas varían una de otra de acuerdo a la cantidad de puentes de hidrogeno que los enlaza. Así, cada banda corresponde a un conjunto de fragmentos de ADN que tiene semejante secuencia y cantidad de guanina y citosina (Green et al. 2009). La adición de una cola de guanina y citosina al extremo 5' de uno de los cebadores da como producto de la PCR un fragmento de ADN rico en contenido de GC, que requiere alta energía para su disociación. Esta cola de GC previene la completa desnaturalización de los productos, evitando así la formación de fragmentos de simple cadena que podrían migrar fuera del gel.(Green et al. 2010, Muyzer y Smalla 1998).

Estudios realizados por Muyzer et al. (1993) y Murray et al. (1996) en el análisis filogenético de una comunidad microbiana, demuestran que la técnica DGGE es una técnica sensible y confiable, ya que detecta por encima del 1 por ciento de la diversidad microbiana que habita en una comunidad determinada. En general esta técnica electroforética solo muestra los ADN ribosomales de las especies predominantes de una comunidad, aunque se vienen desarrollando estrategias para especies de baja abundancia (Wang et al. 2014, Green et al. 2010). Así mismo el máximo tamaño de fragmento de ADN que puede detectar esta técnica es de aproximadamente 500 pares de bases (Myers et al. 1985).

La migración de los amplicones en el DGGE resulta en un complejo patrón de bandas que representan las poblaciones predominantes; sin embargo, su análisis en el gel se dificulta por la comigración de las moléculas con secuencias diferentes, y por la variación del patrón y la intensidad de las bandas en cada repetición del experimento (Green et al. 2010). Esta dificultad puede ser superada con una posterior secuenciación de los amplicones presentes en cada banda (Ercolini 2004). El desarrollo de los métodos de secuenciación, de alto rendimiento y de bajo costo han permitido que el DGGE continúe siendo una de las técnicas más utilizadas en el análisis y exploración de la comunidad microbiana (Shah 2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN DE LA TESIS

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Micología y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

3.2 UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

Se trabajó con las muestras de la Fuente de agua de Carboncañana del Santuario de Ampay, ubicada en el departamento de Apurímac. A una altitud de 3255 m.s.n.m. con las coordenadas: 18 L - 0729683 VTM 8496068.

3.3 MUESTREO

Se tomaron dos tipos de muestras ambientales de la fuente: agua y sedimento. Se colectaron ambas muestras en frascos estériles de un litro y fueron transportados a una temperatura similar a la de la fuente termal hasta el laboratorio.

Las temperaturas de las muestras y del ambiente fueron de 20 °C y 14 °C respectivamente. El muestreo se ejecutó el día sábado 22 de Febrero del 2013 a las 7 am. Debido a que el muestreo se realizó en la temporada de lluvias, las temperaturas del ambiente y de la fuente fueron más bajas de lo habitual.

3.4 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

3.4.1 Materiales de uso rutinario

- Gorro.
- Guantes.
- Marcarilla.
- Matraces de 125 y 250 ml.
-
- Microtubos de 0.5, 1.5 ml y 2ml.
- Papel filtro de paso rápido.
- Pipetas graduadas.
- Probetas.
- Puntas de micropipeta de 1-10 μ l, 10-200 μ l, 100-1000 μ l.
- Vasos de precipitado.
- Micropipetas.
- Membranas microbiológicas de 0.22 μ m.
- Kitazato.
- Matraces de 1L, 500ml, 250 ml.

3.4.2. Soluciones. La extensión de las soluciones se detalla en el Anexo 1.

- Acetato de Potasio (8M).
- Alcohol al 70% y al 96%.
- Acrilamida al 40% (19:1, acrilamida: bisacrilamida).
- Agua esteril destilada y bidestilada.
- CTAB al 10%.
- EDTA 50mM, 100mM.
- Isopropanol (grado molecular).
- Fosfato de sodio 100 mM.
- Formamida deionizada.
- MgCl₂ (25 mM).
- NaCl 1.2M y 1.5M.

- SDS al 10% y al 20%.
- TAE 50X (Tris-base 2M, 0.5M de EDTA, ajustar el pH a 8 con ácido acético glacial).
- TE.
- TES (Tris 10 mM, EDTA 1mM pH 8, Sacarosa 25%).
- Tris-HCl 100 mM.
- Urea.
- Persulfato de amonio al 10% (APS).

3.4.3. Reactivos de Biología Molecular

- Agarosa.
- Agua ultrapura libre de Nucleasas.
- Buffer de corrida de ADN para electroforesis.
- Bromuro de etidio 5 µg/ml.
- Cebadores 16S y 18S rARN para PCR convencional.
- Cebadores 16S y 18S rARN para PCR-DGGE.
- DinucleotidosTrifosfatados (dNTPS).
- EDTA.
- Gel Red™.
- Proteinasa K.
- Lisozima.
- RNA asa.
- Taq Polimerasa.
- Marcador de corrida.
- Tampón de reacción Taq.
- TEMED (N,N,N,N-tetrametilendiamino)
- Trizma base.

3.4.4. Equipos

- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Bomba de vacío
- Cámara de flujo laminar.
- Cámara y peines de electroforesis.
- Congeladora de -20°C.
- Congeladora de -80°C.
- Equipo de Baño María.
- Equipo de DGGE Cleaver scientific ®
- Espectrofotómetro.
- Horno de secado.
- Horno microondas.
- Microcentrífuga.
- Micropipetas.
- Potenciómetro.
- Refrigeradora.
- Termociclador
- Transiluminador.

3.5 ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS AMBIENTALES.

3.5.1 Estandarización del protocolo de extracción de ADN a partir de la muestra de agua.

– Procesamiento de la muestra

Se filtró al vacío 1 litro de agua de la fuente utilizando una membrana de nylon de 47 mm de diámetro y 0.2 µm de tamaño de poro. Luego se cortó la membrana en asepsia para

obtener pequeños fragmentos. Estos se colocaron en tubos de 2 ml y se almacenaron a -80°C hasta proceder con la extracción del ADN.

– **Estandarización del protocolo de extracción de ADN de agua**

Para la estandarización del protocolo de extracción de ADN se tomó como base el protocolo de Ludeña (2007) con modificaciones en los volúmenes de los reactivos como se detalla a continuación:

- a. Se adicionaron 500 µL de TES (Tris 10 mM, EDTA 1mM pH 8, Sacarosa 25%) a cada tubo que contenía los fragmentos de membrana y se homogenizó por agitación en vórtex durante 15 minutos para resuspender las células retenidas en el filtro.
- b. Se adicionaron 60 µl de lizosima (5 mg/ml) y 50 µl de EDTA (0.25 M), se mezcló por inversión 15 veces y se incubó la suspensión a 37 °C durante 15 minutos.
- c. Se adicionaron 175 µl de H₂O bidestilada, 7.5 µl SDS (10%) y 10 µl de RNAasa (10 mg/ ml) a la mezcla anterior; se mezcló con vórtex durante 2 segundos y se incubó a 37°C durante 30 minutos.
- d. Para completar el proceso de lisis celular, se añadió 10 µl de Proteinasa K (10mg/ml) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.
- e. Se adicionaron 90 µl de TE (Tris base 10 mM, EDTA 1mM, pH 8) y 120 µl de NaCl (5M); se homogenizó e incubó a 65°C durante 25 minutos.
- f. Luego, se adicionaron 75 µl de acetato de Potasio 8M para precipitar las proteínas y el *debris* celular; se mezcló por inversión 30 veces e incubó a 4°C por 15 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 13500 rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante.
- g. El sobrenadante (que contiene el ADN total) fue centrifugado a 13500 rpm por 5 minutos, tres veces. Después de cada centrifugación se recuperó el sobrenadante en un tubo.

- h. Se adicionaron 0.6 V de isopropanol y se dejó incubar durante 30 minutos a -20 °C. Una vez transcurrido dicho tiempo, se centrifugó a 13500 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante cuidadosamente.
- i. Se lavó el *pellet* de ADN con etanol al 70%, se centrifugó a 13500 rpm durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante.
- j. Se secó el ADN al ambiente y se resuspendió en 25 µl de agua ultrapura libre de nucleasas.

3.5.2 Estandarización del protocolo de extracción de ADN a partir de la muestra de sedimento

– Procesamiento de la muestra

Se colocó la muestra de sedimento en tubos de 50 ml, se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos, se secó a 70°C y posteriormente se almacenó a -80°C hasta proceder con la extracción del ADN.

– Estandarización del protocolo de extracción de ADN

Para la extracción de ADN a partir de la muestra de sedimento, se tomaron en cuenta los protocolos utilizados por Lai et al. (2006), Zhou et al. (1996) y Murray y Thompson (1980), que siguen el método de CTAB como se detalla a continuación:

- a. Lisis celular y recuperación del sobrenadante. Se pesaron 300 mg de sedimento en un tubo de 2 ml, luego se adicionaron 810 µl de Buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM, EDTA 100mM, fosfato de sodio 100 mM, NaCl 1.5M (ajustado a pH=8), 90 µl de SDS al 20%, 117 µl de CTAB al 10% y se mezcló en vórtex durante 1 minuto. Se incubó a 68 °C durante 1 hora, homogenizando por inversión cada 15 minutos. Posteriormente la mezcla, se centrifugó a 13500 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 2 ml.

- b. Segunda recuperación del sobrenadante. A cada tubo con el *pellet*, se adicionaron 270 μ l del buffer de extracción, 30 μ l de SDS al 20%, 40 μ l de CTAB al 10% y luego se incubó a 68 °C durante 10 minutos. Posteriormente la solución, se centrifugó a 13500 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se colocó en el tubo anterior de 2 ml.
- c. Eliminación de proteínas y compuestos orgánicos. La mezcla de los dos sobrenadantes anteriores se repartieron en dos tubos nuevos de 2 ml en volúmenes iguales. A cada tubo se le adicionó 1 volumen de cloroformo y se homogenizó por inversión y se centrifugó a 13500 rpm durante 10 minutos. Se colocó el sobrenadante a un tubo nuevo de 2 ml.
- d. Digestión de los ARNs. Se adicionaron 15 μ l de ARNsA (10 mg/ ml) a cada tubo y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Seguidamente, se adicionaron 10 μ l de proteinasa K (20mg/ml), se homogenizó por inversión 5 veces y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.
- e. Eliminación de polisacáridos mediante la precipitación del complejo CTAB-ADN. Se adicionaron 250 μ l de CTAB 2X (NaCl 1.4M, EDTA 0.1 M y CTAB 2%) y se incubó a 68° C durante 15 minutos. Posteriormente se adicionaron 2.2 V de solución de precipitación (0.5% de CTAB y 0.04 M de NaCl) y se incubó en hielo durante 1 hora. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos y se descartó todo el sobrenadante. El complejo CTAB-ADN se forma en concentraciones de NaCl menores de 0.5M y precipita por debajo de 15 °C.
- f. Resuspensión y separación del complejo CTAB-ADN. Se adicionaron 300 μ l de NaCl 1.2M a cada tubo con *pellet* y luego se unificaron las resuspensiones en un solo tubo.
- g. Eliminación del resto de contaminantes orgánicos. Se añadió 1 volumen de cloroformo al tubo con la mezcla anterior, se homogenizó por inversión y se centrifugó a 13500 rpm durante 15 minutos. En un nuevo tubo de 1.5 ml se recuperó todo el sobrenadante que contiene ADN.
- h. Precipitación del ADN. Se adicionó 0.6 V de isopropanol y se incubó a -20 °C durante 1 hora, luego se centrifugó a 13500 rpm durante 15 minutos.
- i. El *pellet* se lavó con 500 μ l de etanol al 70% y se secó a temperatura ambiente.

- j. Finalmente el *pellet* seco de ADN se resuspendió en 20 μ l de agua ultrapura libre de nucleasas.

3.5.3 Análisis cuantitativo de ADN metagenómico

El análisis cuantitativo se realizó de la siguiente manera:

- a. Se leyeron las absorbancias de las muestras de ADN extraído en el espectrofotómetro UV (SmartSpec Plus-BioRad) a 230, 260, y 280 nm.
- b. Se calculó la concentración de ADN extraído; considerando que 1 unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 ng/ μ l de ADN de doble cadena, basado en el coeficiente de extinción del ADN en agua (Sambrook et al.1989).

$$[\text{ADN}] \text{ ng}/\mu\text{l}=(A_{260}) (\text{dilución})(\text{factor de conversión})(\text{factor del equipo})$$

- A_{260} = absorbancia a 260 nm.
 - Dilución = factor de dilución
 - Factor de conversión= 50 ng/ μ l
 - Factor del equipo= 10
- c. Se determinó el grado de la pureza del ADN mediante el análisis de las relaciones de absorbancia entre las longitudes de onda de 260, 230 y 280 nm. Una muestra de ADN extraído se considera de alta pureza cuando la relación de A_{260}/A_{280} está dentro del rango 1.8-2 (Liang et al. 2009). $A_{260}/A_{280} < 1.8$ indica contaminación con proteínas y sustancias aromáticas. $A_{260}/A_{280} > 2$ indica posible contaminación con ARN. La relación A_{260}/A_{230} debe estar en el rango de 2 a 2.4 para tener un ADN de alta pureza (Varma et al. 2007).

3.5.4 Análisis cualitativo de ADN metagenómico

La pureza de ADN ambiental es importante para su amplificación por la PCR. Para la evaluación de la calidad de ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa para descartar la presencia de contaminantes, como se detalla a continuación:

- a. Se realizó la electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% (0.3 g de agarosa y 0.3 µl de bromuro de etidio (5 µg/ml) para un volumen de 30 ml) en tampón TAE 1X. Se cargó en cada pozo 5µl (4µl de ADN y 1 µl de tampón de carga) y 12µl (10µl de ADN y 1µl de tampón de carga) de las muestras de agua y de sedimento respectivamente.
- b. Se cargó a un pozo 1.8 µl el marcador de peso del fago lambda digerido con Hind III. Se corrió en gel en una fuente de alimentación a 70 Voltios durante 45 minutos.
- c. El gel de agarosa se colocó en el documentador de imágenes (ChemiDoc XRS-BioRad) para capturar la imagen, se evaluó el tamaño de las bandas de ADN y la presencia de contaminantes.

3.6 ESTANDARIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE HIBRIDACIÓN DE LOS CEBADORES PARA LOS GENES 16S Y 18S.

La diversidad metagenómica se evaluó en base a los genes ribosomales 16S y 18S; se escogieron cebadores específicos y eficaces para la obtención de amplicones, cuyas secuencias se muestran en el Tabla 1. Posteriormente, se realizó la DGGE con los productos de la PCR.

La obtención de amplicones se inició con la estandarización de la T_m de cada par de cebadores, mediante el uso del ADN estándar de bacterias (*E. coli*) y hongos (*Aspergillus*); los parámetros de PCR que se detallan en los Tablas 2 y 3. La programación del gradiente de la T_m se realizó en el termociclador S1000 (BioRad), de 48-65° C (48; 49.2; 52.2; 54.5; 58.3; 61.5; 63.7 y 65°C) y de 40-60 °C (40; 41.2; 43.9; 47.7; 52.6; 6.5; 58.8 y 60 °C) para los cebadores de los genes ribosomales 16S y 18S respectivamente. Posteriormente, una vez que la T_m se estandarizó para cada par de cebadores, se realizó la amplificación de los genes 16S y 18S con las plantillas del ADN extraído de las muestras ambientales, ambos con los mismos parámetros de extensión y desnaturalización.

Tabla 1: Secuencias de cebadores para los genes ribosomales 16S y 18S.

Dominio	Cebador	Secuencias (5' a 3')	Referencia
Prokarya	GC-948F	AACGCGGAAGAACCTTAC	Nubel et al. 1996
	948F	AACGCGGAAGAACCTTAC	
	L1401R	CGGTGTGTACAAGAAGACCC	Lane 1991
	1055F	ATG GCT GTC GTC AGC T	Jun Wang 2008
	1406R-GC	ACG GGC GGT GTG TAC	
	1406R	ACG GGC GGT GTG TAC	
	F16SrRNA- GC	CCTACGGGAGGCAGCAG	Xintian Lai 2006
	F16SrRNA	CCTACGGGAGGCAGCAG	
	R16S rRNA	ATTACCGCGGCTGCTGG	
Archaea	0348F-GC	TCC AGG CCC TAC GGG	Achenbach y Woese 1995.
	0348F	TCC AGG CCC TAC GGG	
	0691R	GGA TTA CAR GAT TTC AC	Watanabe 2004
Eukarya-Fungi	NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	Das et al. 2006
	GC-fung	ATTCCCCGTTACCCGTTG	
	fung	ATTCCCCGTTACCCGTTG	
GC: secuencia CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCC (Das et al. 2006) adicionada.			

Tabla 2: Mezcla de reacción de PCR para los genes ribosomales 16S y 18S.

Componentes	Volumen de reacción (µl)	Concentración final
Tampón (5X)	10	1X
MgCl ₂ (25 mM)	5	2.5 mM
dNTP's (10mM de cada uno)	2.5	0.5 mM
Cebador_F (10mM)	1	0.2 mM
Cebador_R (10mM)	1	0.2 mM
GoTaq (5U/µl)	0.375	1.875 U/50 µl
Agua libre de DNAsa	26.125	-
ADN (100ng)	4	100 ng/50 µl
Total	50	-

Tabla 3: Parámetros de la PCR para los genes ribosomales 16S y 18S.

Etapas	Reacción	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos (n°)
1	Desnaturalización inicial	94	1	-
2	Desnaturalización	94	1	35
	Hibridación	Variable	1	
	Extensión	72	2	
3	Extensión final	72	10	-
4	-	4	α	-

– **Análisis cualitativo de los productos de PCR**

Este análisis de los amplicones tiene como objetivo evaluar la especificidad de los cebadores y el tamaño de productos de la PCR de la amplificación de los genes 16S y 18S a partir del ADN metagenómico. El procedimiento se detalla a continuación:

- a. Se realizó la electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% (0.45 g de agarosa y 0.3 μ l de Bromuro de Etidio 5 μ g/ml para un volumen de 30 ml de gel de agarosa) con tampón TAE 1X.
- b. Se cargó en cada pozo 5 μ l de los productos de la PCR.
- c. Como marcador de peso molecular, se cargó un 1 μ l del marcador de peso Fermentas 100 pb plus.
- d. Se conectó a una fuente de alimentación a 70 Voltios durante 1 hora.
- e. Se llevó el gel de agarosa al documentador de imágenes (ChemiDoc XRS-BioRad) para capturar la imagen y evaluar el tamaño de las bandas de los amplicones y la presencia de contaminantes.

3.7 ESTANDARIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL DGGE

El experimento del DGGE se realizó con el uso del gel de poliacrilamida con una solución desnaturizante (UF al 100%, donde UF al 100% contenía urea 7M y formamida al 40%) y el buffer TAE 1X (Tris acetato 40 mM, acetato de sodio 20mM y EDTA 1mM; ajustado a pH 8). El ajuste de la concentración de poliacrilamida y el porcentaje de desnaturizante (UF) se desarrolló considerando el tamaño de los amplicones y el dominio taxonómico. Los gradientes de desnaturizante en el gel poliacrilamida para los amplicones de los genes 16S y 18S fueron de 36-65% y 25-55% respectivamente; la concentración de poliacrilamida fue del siete por ciento para ambos taxones, la mezcla se detalla en el Tabla 4.

Antes de formar el gradiente desnaturizante, se adicionó 180 μ l de Persulfato de Amonio al 10% y 9 μ l TEMED a cada 15 ml de solución, se homogenizó la solución con vórtices durante un minuto y posteriormente se procedió a preparar el gel de poliacrilamida con el gradiente desnaturizante. Para ello, se utilizó el equipo de DGGE con dos placas de vidrio y se unió con una separación de 1 mm. Se cargó con dos volúmenes de 15 ml, cada uno con distinta concentración de desnaturizante; se empezó con el de mayor porcentaje de UF y se finalizó con el de menor concentración. El gel de poliacrilamida con el gradiente desnaturizante se dejó polimerizar durante 30 minutos, en el transcurso de este tiempo se puso a calentar el buffer TAE 1X. Posteriormente se colocó las placas con el gel polimerizado en el equipo del DGGE, se lavó los pocillos con una jeringa y se cargó 18 μ l de cada producto de PCR; se siguió la metodología planteada por Green et al. (2009). Posteriormente, se realizó la electroforesis en el buffer TAE 1X con los parámetros del DGGE que se detallan en el Tabla 5. Por último se realizó la tinción con Gel Red™ por 30 minutos en agitación. El gel se llevó al documentador de imágenes (ChemiDoc XRS-BioRad) para capturar la imagen, analizar y cortar las bandas.

Tabla 4: Componentes para la preparación de gel de poliacrilamida al 7% con diferentes concentraciones de UF.

Componentes	Concentración de UF (%) y Volumen de componentes (ml)				
	0%	25%	36%	55%	65%
Acrilamida 40%; 19:1	0.525	2.625	2.625	2.625	2.625
TAE 10X	0.3	1.125	0.96	0.675	0.525
UF 100%	0	3.75	5.4	8.25	9.75
Agua ultrapura	2.175	7.5	6.015	3.45	2.1
Volumen total (ml)	3	15	15	15	15

Tabla 5: Parámetros de programación del equipo de DGGE para los genes 16S y 18S.

Parámetros	Programa de corrida de DGGE	
	Amplicónes del gen 16S	Amplicónes del gen 18S
Voltaje (Voltios)	160	50
Tiempo (horas)	3.5	16
Temperatura (°C)	60	56

3.8 RECUPERACIÓN DE LOS AMPLICONES

La recuperación de los amplicónes a partir de cada banda del gel de poliacrilamida se realizó mediante el corte de cada una de las bandas, en condiciones estériles; cada banda se colocó en un tubo de 600µl y se adicionó 30 µl de agua ultrapura libre de nucleasas; Posteriormente la mezcla, se incubo a 37 °C durante 30 minutos y luego se dejó toda la noche a 4 °C para permitir la suspensión de los amplicónes en la fase acuosa (Green et al. 2010). Al día siguiente, se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo de 1.5 ml y se almaceno a 4 °C hasta su posterior uso.

3.9 PCR DE LOS AMPLICONES DEL DGGE

Los fragmentos recuperados del ADN contenido en las bandas del DGGE contienen cola GC. Se eliminaron las colas GC de los fragmentos recuperados mediante la amplificación con los cebadores normales (sin cola GC). Se realizó el análisis cualitativo siguiendo los procedimientos anteriores descritos para la amplificación a partir del ADN metagenómico, Tablas 2 y 3.

3.10 SECUENCIAMIENTO

El secuenciamiento se realizó en Macrogen Inc., Seoul, Korea del Sur (<http://www.macrogen.com>). Mediante el uso de la tecnología de secuenciación Sanger.

3.11 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS

Se realizó el alineamiento, el análisis computacional y el alineamiento múltiple de las secuencias, mediante el uso del programa Bioedit. Se construyó el árbol filogenético con el *software* MEGA7. El porcentaje de similitud se obtuvo mediante la comparación entre las secuencias del presente estudio y las secuencias existentes en la base de datos de La NCBI Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), con el uso del sistema de búsqueda BLAST. Se seleccionaron las accesiones que presentaron el mayor porcentaje de similitud con las secuencias en estudio.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 ANÁLISIS CUANTITATIVO Y CUALITATIVO DEL ADN EXTRAÍDO A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA Y SEDIMENTO.

La calidad del ADN metagenómico se analizó de forma cuantitativa y cualitativa. En el análisis cuantitativo de ambas muestras, se observó proporciones de las $A_{260}/A_{230} < 1.8$. Este valor indica que ambas muestras presentan contaminación de proteínas y/o sustancias aromáticas, Tabla 6. La proporción de las A_{260}/A_{280} fueron < 2 y > 2 para las muestras de agua y sedimento respectivamente; que indica que el ADN de la muestra de agua fue de alta pureza, mientras que la muestra de sedimento presento contaminantes de ARN. Por otro lado, el ADN de la muestra de sedimento presento mayor concentración respecto a la muestra de agua, aprox. 25 veces más Tabla 6.

Tabla 6: Lecturas de absorbancia correspondientes al análisis cuantitativo del ADN metagenómico de fuente termal de Ampay

Muestra	Absorbancias			Relaciones		[ADN]	Rendimiento
	230 nm	260 nm	280 nm	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	ng/ μ l	
Agua	0.022	0.034	0.014	1.55	2.43	85	1.7 μ g/l (agua termal)
Sedimento	0.424	0.353	0.305	0.83	1.16	882.5	5.9 μ g/g (peso seco de sedimento)
Sedimento*	0.098	0.088	0.073	0.90	1.21	220	1.6 μ g/g (peso seco de sedimento)

* ADN purificado con el kit de purificación de QIAGEN a partir del ADN extraído de la muestra de sedimento.

Para el análisis cualitativo del ADN, se realizó la electroforesis en el gel de agarosa al uno por ciento. Se cargó 4 μl del ADN extraído de la muestra de agua (85.00 $\text{ng}/\mu\text{l}$) por pocillo y 10 μl de ADN extraído del sedimento (882.00 $\text{ng}/\mu\text{l}$) por pocillo, Figura 1 y 2 respectivamente. La cantidad de ADN que se cargó por pocillo de la segunda muestra, fue 25 veces la cantidad del ADN de la primera muestra, Tabla 6.

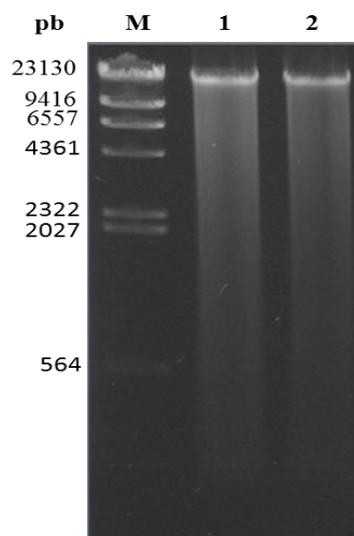


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa de ADN metagenómico de muestras de agua. Carriles 1 y 2: ADN de la muestra de agua, M: Marcador de peso lambda Hind III.

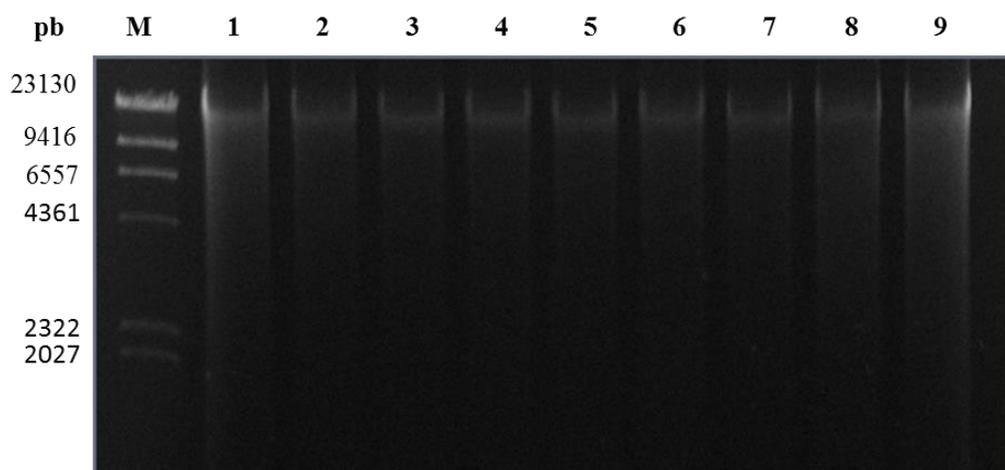


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa de muestras de ADN metagenómico de sedimento. Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9: ADN sedimento (10 μl), M: Marcador de peso lambda Hind III.

En el gel de electroforesis, las bandas del ADN de la muestra de agua presentaron mayor intensidad respecto al sedimento, Figura 1 y 2. Este resultado puede parecer incongruente con el análisis cuantitativo; ya que teóricamente, el ADN que se cargó de la muestra del sedimento fue 25 veces más respecto a la del agua. Sin embargo, el ADN extraído a partir del sedimento fue de color oscuro, lo que indica que contiene un alto porcentaje de ácidos húmicos (Nakatsu 2007, Zhou et al. 1996). Los ácidos húmicos presentan absorbancias tanto a 230 como a 260 nm (Felczykowska et al. 2015, Lai et al. 2006), por lo tanto, influyen en la pureza y en la cuantificación del ADN.

El resultado del contraste entre los análisis cualitativos y cuantitativos del ADN metagenómico fue que la muestra de agua presentó mayor pureza que la del sedimento. Considerando que el ADN de la muestra de sedimento presentó una alta cantidad de ácidos húmicos (Muyzer et al. 1998), se realizó la purificación del ADN con el kit QIAEX II (QIAGEN ®) de acuerdo a las instrucciones del proveedor, cuyo resultado dio una concentración de ADN de 220 ng/μl, Tabla 6. Por otro lado, aunque este ADN purificado no presentó coloración oscura, sus valores de pureza fueron similares a los que presentaron el ADN sin purificar. El ADN extraído de la muestra de agua y el purificado de la muestra de sedimento fueron utilizados como plantillas para la amplificación de los genes ribosomales 16S y 18S.

El tamaño del ADN extraído se analizó en base a los geles de la electroforesis, Figura 1 y 2. El tamaño promedio del ADN procedente del agua no se diferencia significativamente a la del sedimento, Figura 3 y Anexo 2; aunque se observe que numéricamente se diferencien en aproximadamente 2 kb. Esta diferencia estadísticamente no significativa puede que se deba a la aplicación de distintos procesos de lisis celular. En el protocolo de extracción del ADN de la muestra de sedimento, se empleó tanto la lisis química como física; mientras que, en la muestra de agua se empleó solo la lisis química. Así, la combinación de los diferentes métodos de lisis puede afectar a la integridad de las hebras del ADN (Muyzer et al. 1998).

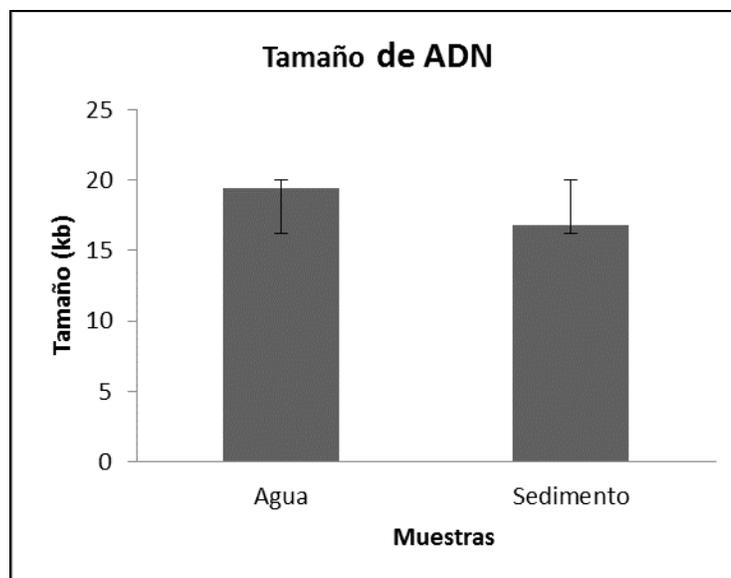


Figura 3: Comparación del Tamaño promedio de ADN metagenómico extraído a partir de muestras de agua y sedimento de una fuente termal de Ampay.

Una vez extraído el ADN y realizado el análisis cuantitativo y cualitativo para ambas muestras, se procedió con la estandarización de las T_m, cuyos resultados se detallan a continuación.

4.2 OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE HIBRIDACIÓN DE LOS CEBADORES DE LOS GENES RIBOSOMALES 16S Y 18S.

Para la optimización de las temperaturas de hibridación de los cebadores de 16S y 18S, se utilizó el ADN estándar de los microorganismos *E.coli* y *Aspergillus* respectivamente. Así mismo, se realizó la PCR con la mezcla de la reacción que se menciona en el Tabla 2 y los parámetros del Tabla 3. La temperatura óptima de hibridación para los cebadores de los genes 16S y 18S, se determinó mediante el uso de la PCR con los gradientes de temperaturas de 48-65 °C y 40-60 °C respectivamente.

Las temperaturas donde se amplificaron los cebadores del gen 16 S fueron los siguientes: para los cebadores GC-948F/ L1401R: 48, 49.2 y 52.2 °C; 1055F/1406R-GC: 48, 49.2, 52.2, 54.5 y

58.3, 61.5 °C; F16SrRNA-GC/R16S: de 48 a 65 °C, que se observan en las Figuras 4, 6 y 8 respectivamente.

Se realizó la revalidación de la temperatura de hibridación de cada par de cebadores con el ADN de las muestras de agua y de sedimento. Se escogieron las T_m de cada par de cebadores cuyos productos en el gel de agarosa presentaron bandas intensas y libres de artefactos: GC-948F/ L1401R: 48 °C; 1055F/1406R-GC: 55 °C; F16SrRNA-GC/R16S: 55 °C, que se observan en las Figuras 5, 7 y 9 respectivamente.

Por otro lado, en la determinación de la T_m de los cebadores NS1/GC-Fung, se encontró que estos cebadores amplificaron dentro del rango de temperatura 40-58.8 °C, Figura 10. Se eligió la T_m de 55 °C, con los mismo criterios que se aplicaron para los cebadores del gen 16S y se realizó la PCR con el ADN metagenómico. Los productos de la amplificación se corrieron en el gel de agarosa, Figura 11; donde se observan los productos amplificados a partir de las muestras ambientales.

El resultado de la electroforesis de los productos de la PCR se observan en las Figuras 5,7, 9 y 11. Las bandas de los controles positivos fueron más intensas respecto a las que presentaron las muestras ambientales. La intensidad de la bandas depende de muchos factores como de la calidad del ADN, la taxonomía microbiana, la localización de los cebadores y los errores metodológicos. Sin embargo, es claro que las temperaturas de hibridación fueron las más adecuadas, debido a que todas generaron productos de PCR sin artefactos.

– Cebadores GC-948F/ L1401R.

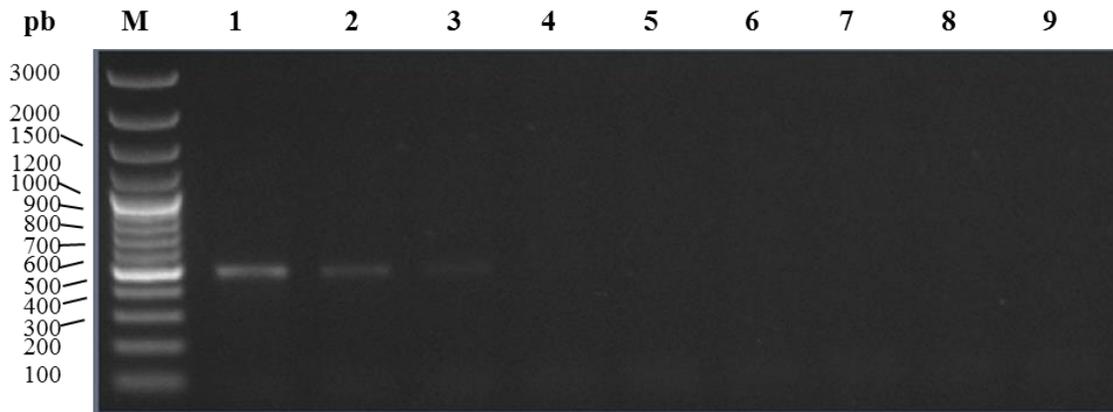


Figura 4: Electroforesis de los productos de la PCR con el ADN molde de *E. coli*, cebadores GC-948F/ L1401R. ADN molde) 1: 48°C; 2: 49.2°C; 3: 52.2°C; 4: 54.5°C; 5:58.3°C; 6: 61.5°C; 7: 63.7°C; 8: 65°C y control negativo). 9: 48°C. M: marcador de peso Fermentas 100 pb plus.

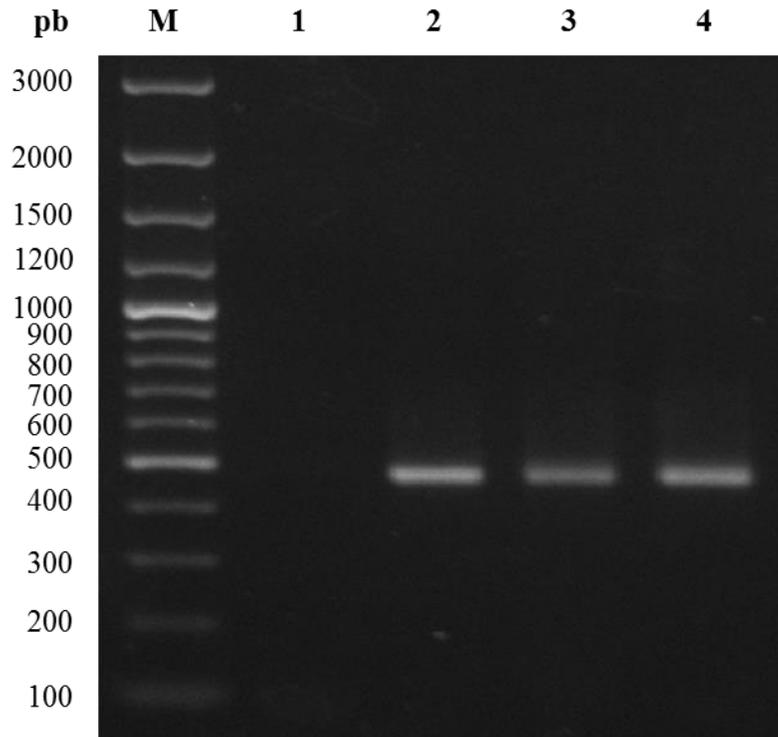


Figura 5: Electroforesis de los productos de la PCR con el ADN molde de las muestras ambientales y los cebadores GC-948F/ L1401R. Temperatura de hibridación: 48°C. 1: control negativo, 2: *E. coli*, 3: sedimento y 4: agua. M: marcador de peso Fermentas 100 pb plus.

– Cebadores 1055F/1406R-GC

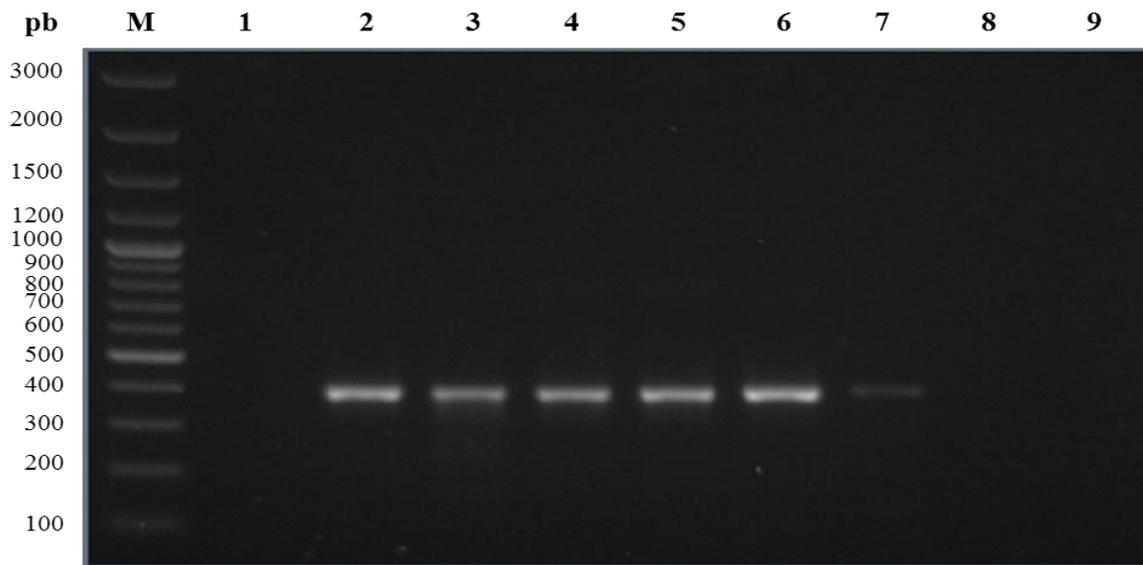


Figura 6: Electroforesis de los productos de la PCR con el ADN molde de *E. coli* y los cebadores 1055F/1406R-GC. ADN molde) 2: 48°C; 3: 49.2°C; 4: 52.2°C; 5: 54.5°C; 6:58.3°C; 7: 61.5°C; 8: 63.7°C; 9: 65 °C y control negativo) 1: 54.5°C. M: marcador de peso Fermentas 100 pb plus.

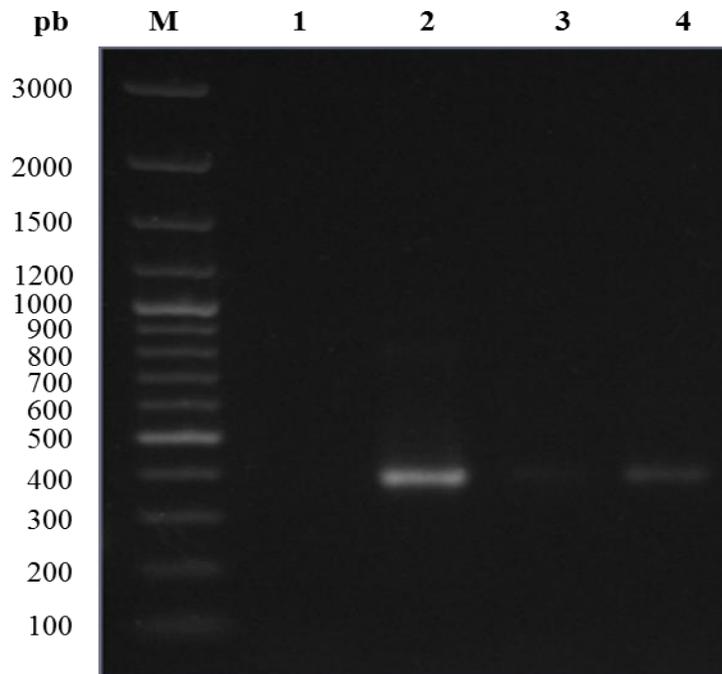


Figura 7: Electroforesis de los productos de la PCR con el ADN molde de las muestras ambientales y los cebadores 1055F/1406R-GC. Temperatura de hibridación: 55°C, para:1: control negativo, 2: *E. coli*, 3: sedimento y 4: agua. M: marcador de peso Fermentas 100 pb plus.

– Cebadores F16SrRNA-GC/R16S rRNA

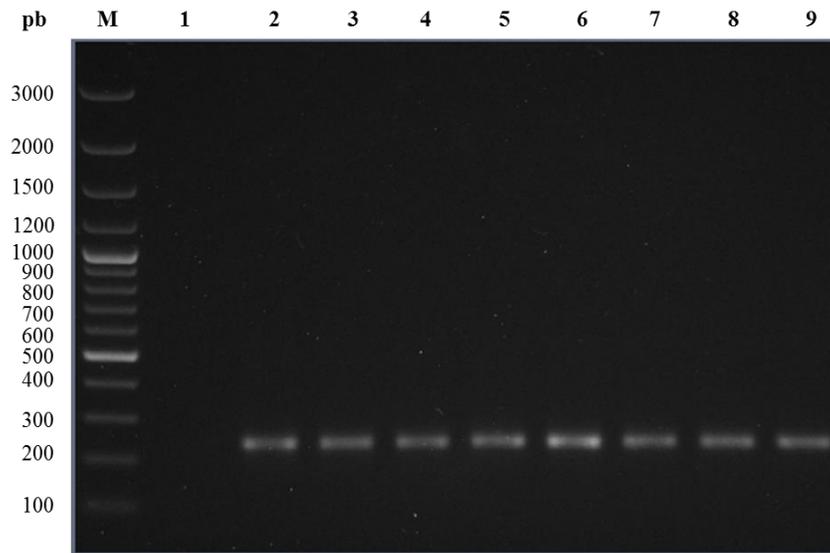


Figura 8: Electroforesis de los productos de la PCR con el ADN molde de *E. coli* y los cebadores F16SrRNA-GC/R16S rRNA. ADN molde) **2:** 48°C; **3:** 49.2°C; **4:** 52.2°C; **5:** 54.5°C; **6:**58.3°C; **7:** 61.5°C; **8:** 63.7°C; **9:** 65 °C y control negativo) **1:** 54.5°C. M: marcador de peso Fermentas 100 pb plus.

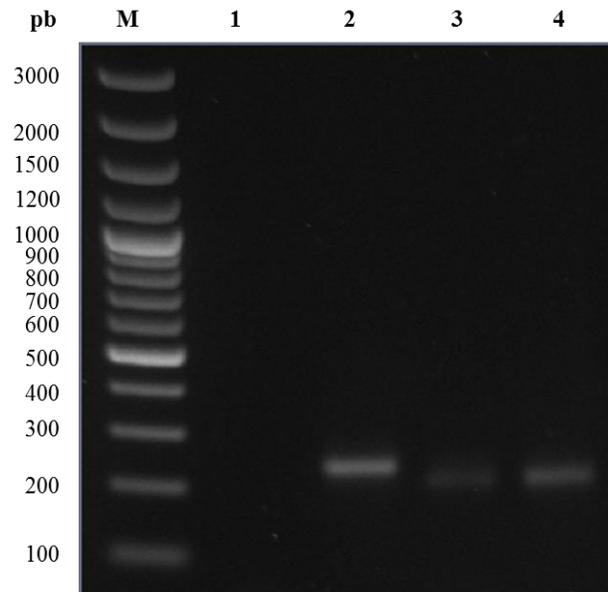


Figura 9: Electroforesis de los productos de la PCR con el ADN molde de las muestras ambientales y los cebadores F16SrRNA-GC/R16S rRNA. Temperatura de hibridación: 55°C. 1: control negativo, 2: *E. coli*, 3: sedimento y 4: agua. M: marcador de peso Fermentas 100 pb plus.

– Cebadores NS1/GC-Fung

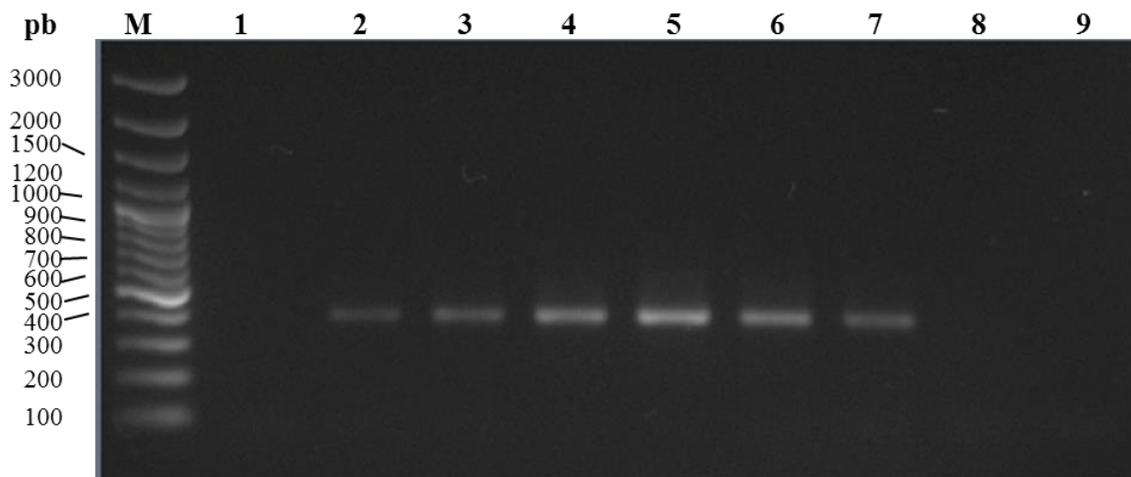


Figura 10: Electroforesis de los productos de la PCR con el ADN molde de *Aspergillus* y los cebadores NS1/GC-Fung. ADN molde) 1: 40°C; 2: 41.2°C; 3: 43.9°C; 4: 47.7°C; 5: 52.6°C; 6: 56.5°C; 7: 58.8°C; 8: 60°C y control negativo) 9: 47.7°C. M: marcador de peso Fermentas 100 pb plus.

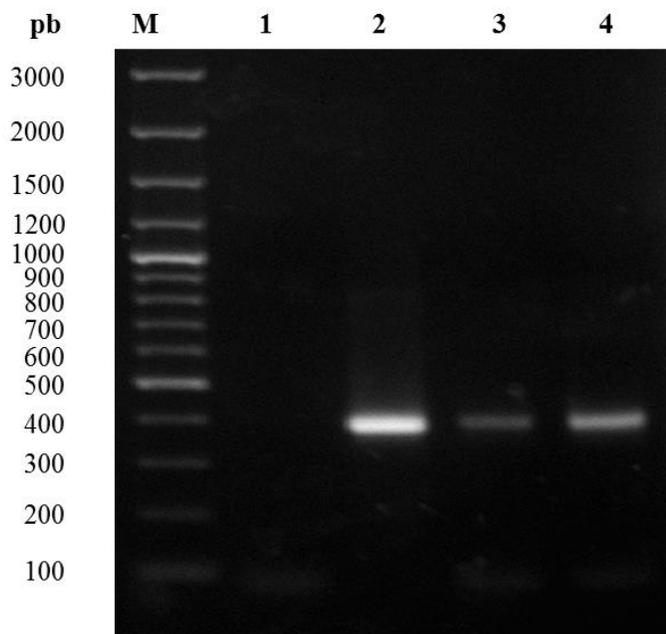


Figura 11: Electroforesis de los productos de la PCR con el ADN molde de las muestras ambientales y los cebadores NS1/ GC-Fung. Temperatura de hibridación: 55°C. 1: control negativo, 2: *Aspergillus*, 3: sedimento y 4: agua. M: marcador de peso Fermentas 100 pb plus

Al evaluar el tamaño de los productos de la PCR, se encontró que no hubo diferencias significativas entre los amplicones de las dos muestras ambientales en cada par de cebadores, ya que todos los coeficientes de variabilidad fueron menores al 0.05, Tabla 7 y Anexo 3.

Tabla 7: Determinación del tamaño de los amplicones de ADN metagenómico de agua y sedimento, con el uso del software Quantity One ® del analizador de imágenes Chemidoc. BIORAD®.

Amplicón	Cebadores	Tamaño de los amplicones (pb)		
		Control positivo*	Sedimento	Agua
V6-V8, ARNr 16S	GC-948F/ L1401R	472.195	469.501	469.501
V8, ARNr 16S	1055F/ 1406R-GC	400	398.054	406.276
V3, ARNr 16S	F16SrRNA-GC/ R16S rRNA	225.869	212.541	212.541
18S ARNr	NS1/ GC-Fung	382.006	390.899	393.155

*: Amplicones de *E. coli* y *Aspergillus* de los genes 16S y 18S respectivamente.

Finalmente, no se pudo encontrar la temperatura de hibridación para los cebadores del gen ribosomal 16S de arqueas (0348F-GC/0691R), debido a que no se generó ningún producto de amplificación tras realizar la PCR con gradiente de temperatura. En la reacción se utilizó el ADN molde de las muestras ambientales, un gradiente de temperatura (48-65 °C) y se siguió el mismo procedimiento que se utilizó para el gen 16S de bacterias. En el gel de la electroforesis no se observó ninguna banda a ninguna temperatura; en consecuencia, se descartó el uso de estos cebadores en las metodologías posteriores. Posiblemente este resultado sea debido a que los cebadores utilizados no sean los adecuados para detectar la diversidad de las arqueas presentes en la muestra, o que la población sea muy pequeña, pudiendo ser fraccionada y/o eliminada en los procesos de extracción del ADN.

4.3 ESTANDARIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL DGGE

Posteriormente a la amplificación de los genes ribosomales 16S y 18S, se realizó la estandarización de los parámetros del DGGE. Estos fueron: el porcentaje de poliacrilamida, el gradiente desnaturante, el voltaje y el tiempo. La mejor resolución y separación de los amplicones del gen 16S se observaron en los geles de poliacrilamida al 7% con 36-65% de UF, 160 Voltios y 3,5 horas de corrida, Figura 12 y Tabla 5.

También se probó otras concentraciones de poliacrilamida; sin embargo, tanto a mayores como a menores concentraciones los amplicones no se separaron con una adecuada resolución. Por otro lado, el gradiente desnaturante óptimo se ajustó a partir de los datos teóricos de UF de cada par de cebadores (Tabla 1).

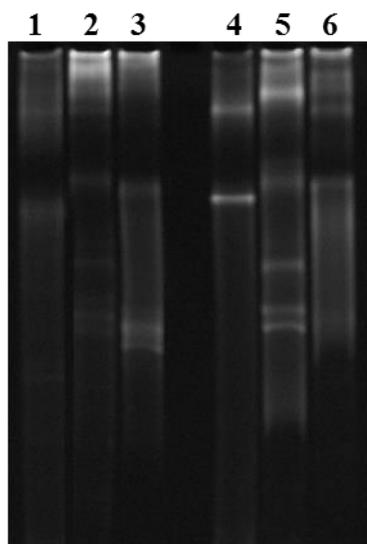


Figura 12: DGGE de los productos de la PCR del ADN metagenómico con distintos pares de cebadores del gen 16S. Los carriles 1, 2 y 3 muestran los amplicones obtenidos a partir de la muestra de sedimento (18 μ l). Los carriles 4, 5 y 6 muestran los amplicones obtenidos a partir de muestra de agua (18 μ l). 1 y 4: F16SrRNA-GC/R16SrRNA, 2 y 5: 1055F/1406R-GC, 3 y 6: GC-948F/ L1401R.

Para la evaluación de la diversidad bacteriana se escogieron los cebadores 1055F/1406R-GC; dicha elección se debió a que, los productos de estos cebadores migraron en mayor número de bandas definidas y separadas respecto a los amplicones de los cebadores F16SrRNA-GC/R16SrRNA y GC-948F/L1401R, Figura 12 (carries 2 y 5). Posteriormente se repitió el experimento solo con los cebadores 1055F/1406R-GC; en el que se obtuvo seis (1b-6b) y ocho (7b-14b) bandas de las muestras de sedimento y de agua respectivamente, Figura 13.

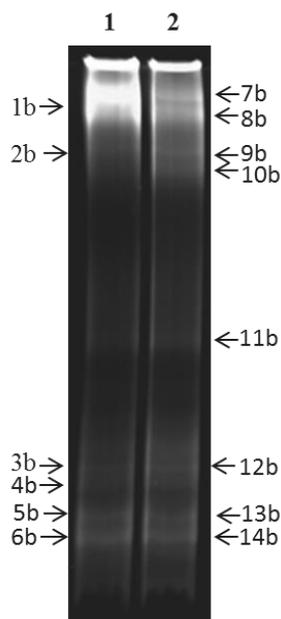


Figura 13: Bandas del DGGE de los productos de PCR del ADN metagenómico con los cebadores 1055F/1406R-GC del gen 16S. **1** (1b-6b): sedimento (18 μ l); **2** (7b-14b): agua (18 μ l).

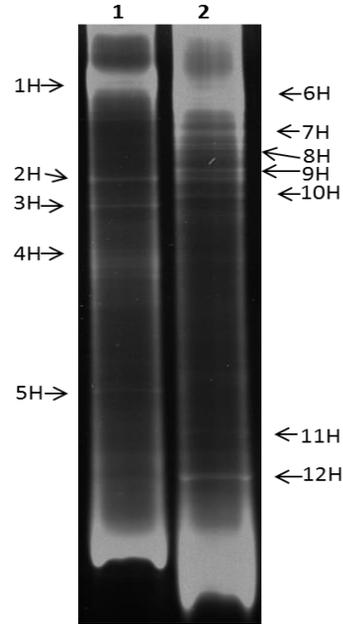


Figura 14: Bandas del DGGE de los productos de PCR del ADN metagenómico con los cebadores NS1/GC-Fung del gen 18S. **1** (1H-5H): sedimento (18µl); **2** (6H-12H): agua (18µl).

Así mismo, se encontró que los amplicónes del gen 18S (Reino Fungi), migraron y se separaron mejor en un gel de poliacrilamida al 7% con un gradiente desnaturalizante de 25-55%, en 50 Voltios y 16 horas de corrida, cuyo resultado se observa en la Figura 14, se formaron 5 (1H-5H) y 7 (6H-12H) bandas de las muestras de sedimento y de agua respectivamente. Los parámetros para el DGGE del gen 18S se estandarizaron del mismo modo que para los amplicónes del gen 16S.

4.4 PCR DE LOS AMPLICÓNES DEL DGGE

A partir de los geles de DGGE se recuperaron los amplicónes presentes en cada banda de los geles de poliacrilamida de las Figuras 13 y 14, como se detalla en Materiales y Métodos. Los amplicónes recuperados de cada banda se utilizaron como ADN molde para la amplificación, con sus respectivos cebadores de los genes ribosomales 16S (1055F/1406R) y

18S (NS1/Fung) sin cola GC. Se utilizaron los mismos parámetros de la PCR que se usó para los cebadores con cola GC. Las bandas de los productos de la re-amplificación se observan en las Figuras 15 y 16. Los productos de la PCR con los cebadores con cola CG tuvieron un tamaño de 400 pb, Figura 7, mientras de amplificación con los cebadores sin cola presentaron un tamaño aproximado a 360 pb, Figuras 15 y 16.

Por el contrario, no todas los productos de re-amplificaciones del gen 18S dieron productos visibles; posiblemente sea debido a que la cantidad amplificada sea muy pequeña. Sin embargo, se enviaron todos los productos de la re-amplificación a secuenciar, una muestra por cada banda. El número total de las muestras fueron 26, 14 de bacterias y 12 de hongos.

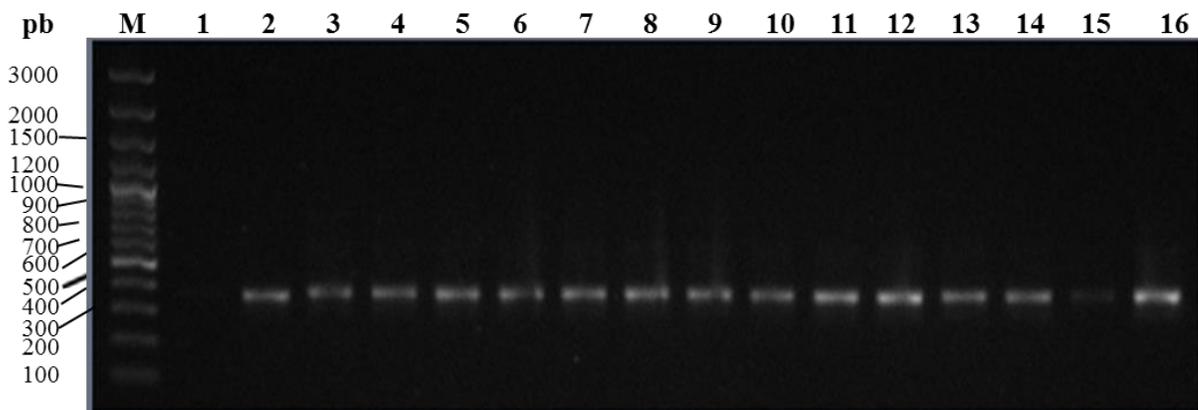


Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones del gen 16S, 1055F/1406R. 1: control negativo; 2: control positivo; 3 al 8 amplicones de ADN de sedimento y del 9 al 16 amplicones de ADN de la muestra de agua; M: marcador de peso Fermentas 100 pb plus.

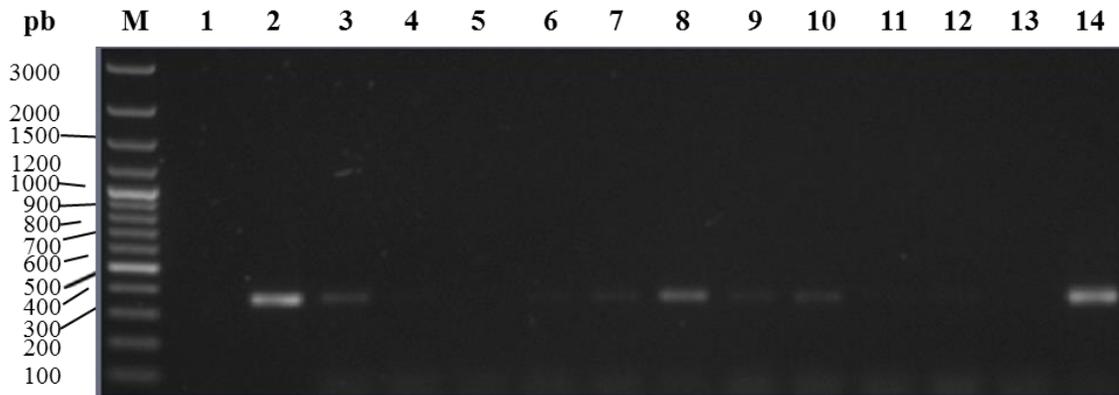


Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones 18S, NS1/Fung. 1: control negativo; 2: control positivo; 3 al 5 amplicones de ADN de sedimento y del 6 al 14 amplicones de ADN de la muestra de aguas M: marcador de peso Fermentas 100 pb plus.

4.5 EVALUACIÓN DE LOS AMPLICONES SECUENCIADOS DE LA MUESTRA AMBIENTAL

Los amplicones de las muestras ambientales se enviaron a secuenciar. De las 26 muestras, no se lograron secuenciar las muestras 1b y 7b de las bacterias y 4H, 9H, 10H y 11H de los hongos. Se realizó los alineamientos múltiples de las secuencias *forward* de los amplicones de los genes ribosomales 16S y 18S, Figuras 17 y 18 respectivamente.

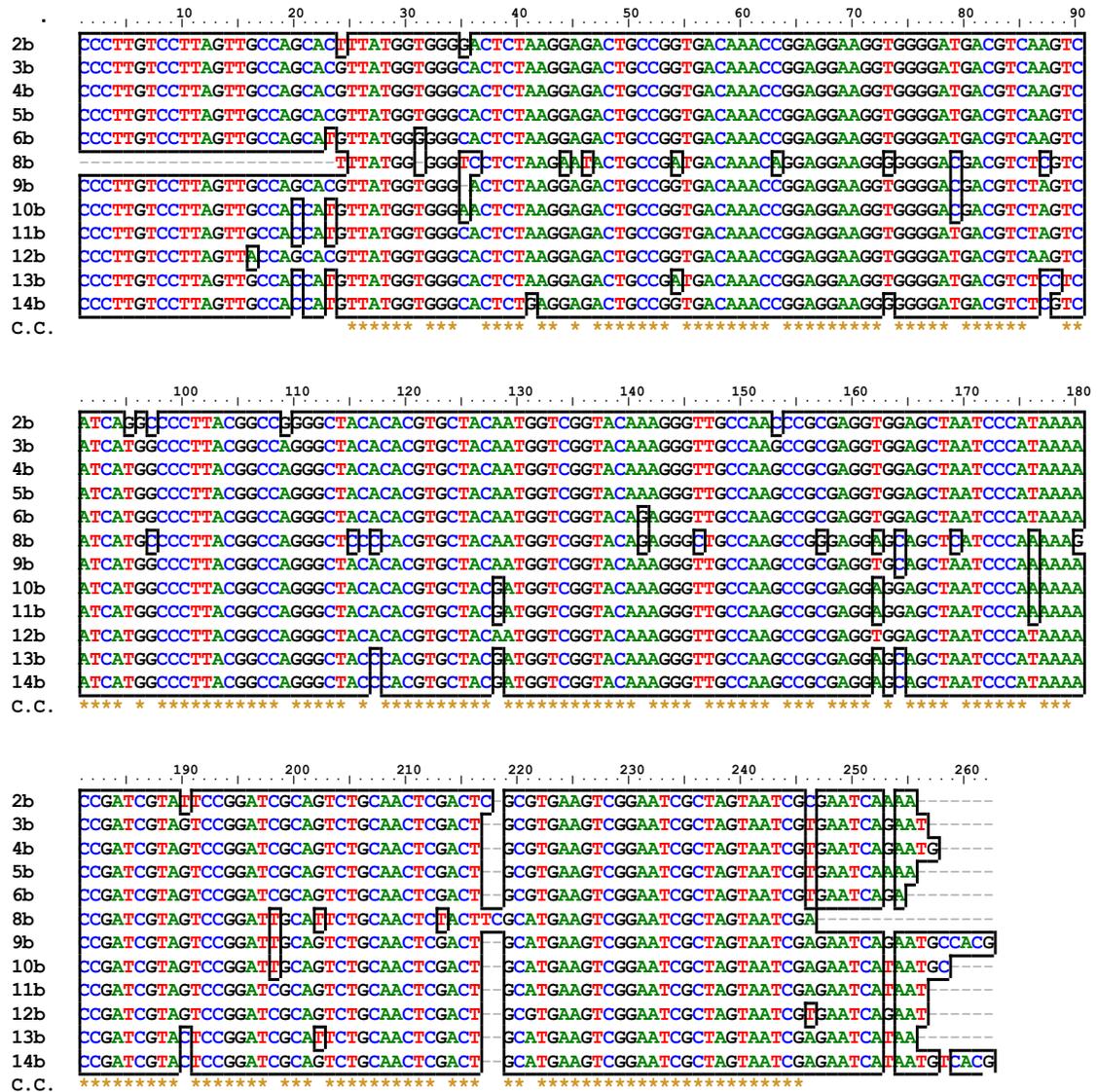


Figura 17: Alineamiento múltiple de todas las secuencias del gen ribosomal 16S bacteriana del presente estudio. Programa de alineamiento *ClustalW multiple alignment* (BioEdit). C.C: *Clustal consensus*. Regiones conservadas están delimitadas con la línea negra y las regiones variables están fuera de la delimitación.

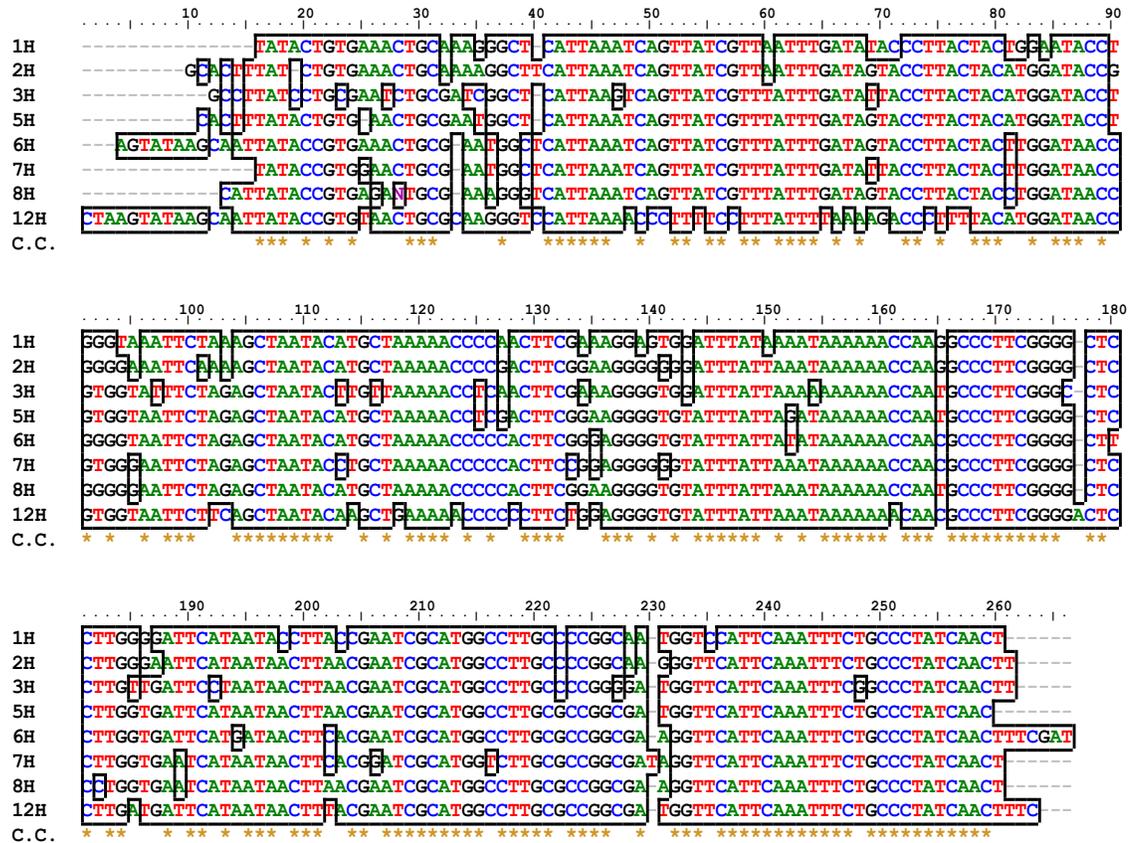


Figura 18: Alineamiento múltiple de todas las secuencias del gen ribosomal 18S de hongo del presente estudio. Programa de alineamiento *ClustalW multiple alignment* (BioEdit). C.C: *Clustal consensus*. Regiones conservadas están delimitadas con la línea negra y las regiones variables están fuera de la delimitación.

Para el alineamiento múltiple, se realizó el análisis de las secuencias “crudas” de los amplicones con el editor de secuencias BioEdit, se obtuvieron secuencias de un tamaño promedio de 252 pb. Posteriormente se realizó el alineamiento múltiple con el programa *ClustalW multiple alignment* del editor de secuencias BioEdit. Los *clusters* de las secuencias de ambos genes ribosomales presentaron regiones conservadas y variables, ambas regiones se observan claramente al analizar cada secuencia consenso (C.C.) de la Figuras 17 y 18.

El árbol filogenético se construyó con las secuencias de ambas muestras con el uso del algoritmo *Neighbor-Joining*, Figura 19. Así mismo, mediante la comparación entre las secuencias encontradas en el presente trabajo y las secuencias presentes en la base de datos de la NCBI, se asignaron las accesiones que presentaron el mayor porcentaje de identidad (similitud), Tabla 8 y 9.

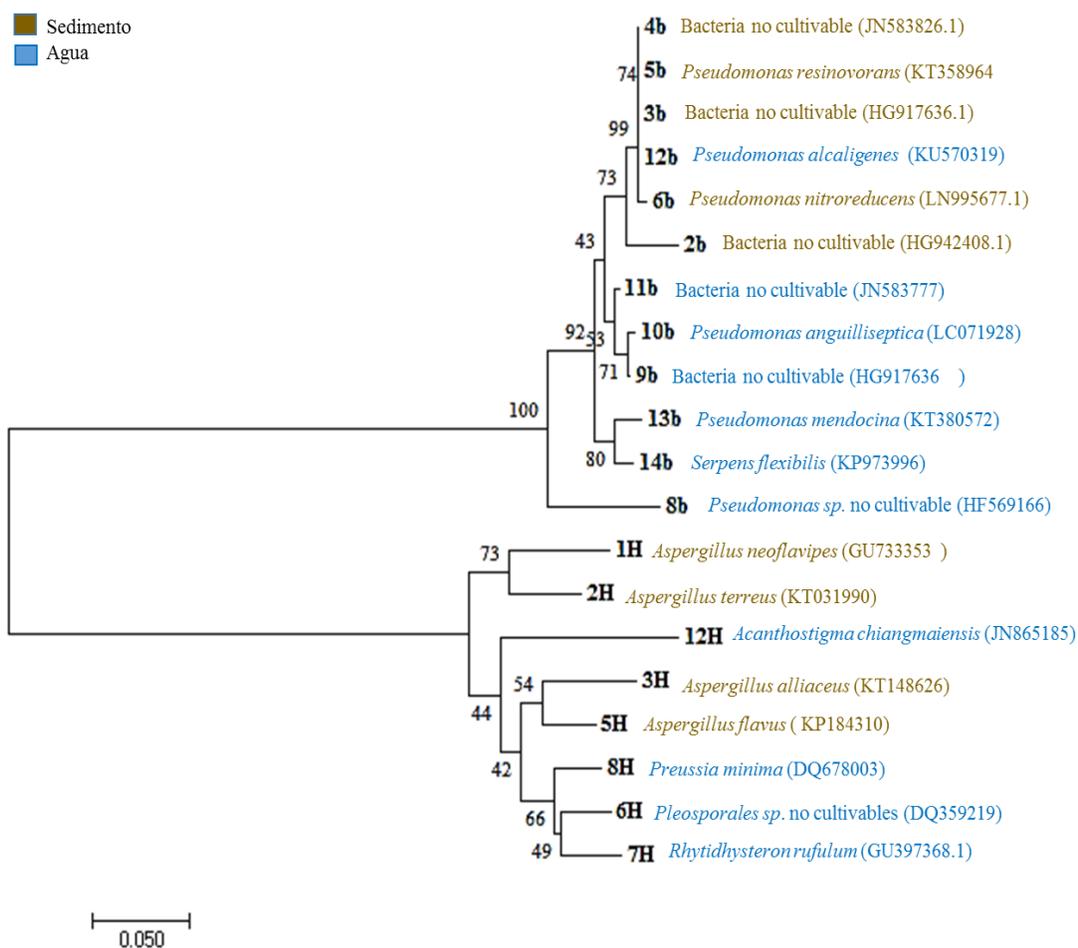


Figura 19: Árbol filogenético basado en el algoritmo *Neighbor-Joining* de los genes ribosomales 16S y 18S de las muestras de agua y sedimento. El número de accesión del *GenBank* como referencia de la secuencia se observa en paréntesis. El árbol fue construido con el uso de *software* MEGA7, con el modelo p-distancia y 500 réplicas de inicio. Los números de los nodos de cada rama representan los valores de arranque. La barra inferior = 0.05, indica el número de sustituciones de bases por el sitio.

Para la determinación de la diversidad microbiana de la fuente termal de Ampay se tomó en cuenta el criterio recomendado por Wang et al. (2007), que menciona que una secuencia de 200 bases del gen ribosomal 16S son suficientes para la clasificación a nivel de familia. Este criterio, definió que las accesiones encontradas en la NCBI pertenecen a las familias Pseudomonadaceae en procariotas y Aspergillaceae, Pleosporomycetidae, Patellariaceae, Sporormiaceae y Tubeufiaceae en eucariotas, Tablas 8 y 9 respectivamente. Así mismo, se encontraron bacterias no cultivables (HG942408.1, HG917636.1, JN583826.1, HG917636 y JN583777).

Tabla 8: Análisis *Blast* para identificación de microorganismos presentes en las muestras ambientales de agua y sedimento, en base a secuencias del gen 16S separadas mediante DGGE.

DGGE (banda)	Longitud (pb)	Microorganismo (Accesoión)	Identidad (%)	Familia
ADN metagenómico de sedimento				
2b	279	Bacteria no cultivable (HG942408.1)	97	No determinada
3b	254	Bacteria no cultivable (HG917636.1)	100	
4b	255	Bacteria no cultivable (JN583826.1)	100	
5b	253	<i>Pseudomonas resinovorans</i> (KT358964)	99	Pseudomonadaceae
6b	266	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> (LN995677.1)	98	
ADN metagenómico de agua				
8b	222	<i>Pseudomonas sp.</i> no cultivable (HF569166)	89	Pseudomonadaceae
9b	259	Bacteria no cultivable (HG917636)	96	No determinada
10b	256	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> (LC071928)	95	Pseudomonadaceae
11b	254	Bacteria no cultivable (JN583777)	96	No determinada
12b	254	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (KU570319)	100	Pseudomonadaceae
13b	253	<i>Pseudomonas mendocina</i> (KT380572)	94	
14b	260	<i>Serpens flexibilis</i> (KP973996)	94	Pseudomonadaceae

Dentro del Dominio Prokaryota, siete de las 12 accesiones encontradas pertenecen a la familia Pseudomonadaceae, Tabla 8; y las cinco restantes son bacterias no cultivables. En la muestra de sedimento se encontró un importante representante de la producción de bioemulsificantes, *Pseudomonas nitroreducens* (De Sousa y Bhosle 2012), que se encuentra frecuentemente en agua, suelo y vegetación. En la muestra de agua se encontró un importante microorganismo en el campo de la bioremediación, *Pseudomonas alcaligenes* (Elkarmi et al. 2008); y en la producción de lipasas extracelulares, *Pseudomonas mendocina* (Kiryszewska 2015); *P. alcaligenes* se encontró en aguas y *P. mendocina* en sedimentos. Por otro lado, todas las bacterias no cultivables, de acuerdo a su registro en la base de datos, proceden de muestras ambientales, hábitad natural de las Pseudomonas (De Sousa y Bhosle 2012). Similares resultados al presente trabajo encontraron Aminin et al. (2010), Pseudomonas en aguas termales a 70.2 °C

En el reino Fungi, las ocho accesiones pertenecen al Phylum Ascomicota. Las accesiones de la muestra de sedimento pertenecen a la familia Aspergillaceae. Así mismo, en la muestra de agua se encontró Pleosporales sp. no cultivable y microorganismos que pertenecen a las familias Patellariaceae, Sporormiaceae y Tubeufiaceae, Tabla 9.

Tabla 9: Análisis Blast para identificación de hongos presentes en las muestras ambientales de agua y sedimento, en base a secuencias del gen 18S separadas mediante DGGE.

DGGE (banda)	Longitud (pb)	Microorganismo (Accesión)	Identidad (%)	Familia
ADN metagenómico de sedimento				
1H	242	<i>Aspergillus neoflavipes</i> (GU733353)	91	Aspergillaceae
2H	249	<i>Aspergillus terreus</i> (KT031990) <i>Aspergillus nomius</i> (KR108917)	92	
3H	247	<i>Aspergillus alliaceus</i> (KT148626)	91	
5H	245	<i>Aspergillus flavus</i> (KP184310)	100	
ADN metagenómico de agua				
6H	260	<i>Pleosporales sp.</i> no cultivables (DQ359219)	98	No determinada
7H	243	<i>Rhynchostyrium rufulum</i> (GU397368.1)	95	Hysteriaceae
8H	245	<i>Preussia minima</i> (DQ678003)	95	Sporormiaceae
12H	264	<i>Acanthostigma chiangmaiensis</i> (JN865185)	88	Tubeufiaceae

En el presente estudio se encontraron importantes microorganismos que tienen relevancia en el campo de la biotecnología. *R. rufulum* de la familia Patellariaceae, es un saprofito que habita en una gran variedad de plantas de Costa Rica. Produce el compuesto palmarumicina, un importante antibiótico y antifúngico (Murillo et al. 2009). *Preussia minima*, de la familia Sporormiaceae, es un importante endófito productor de α -amilasa (Zaferanloo et al. 2014). Entre los microorganismos, con importancia biotecnológica, de la familia Aspergillaceae se encontró la especie *Aspergillus flavus*, un importante productor de aflatoxinas (Rodrigues et al. 2007). Por otro lado, también se encontraron la accesión DQ359219 no cultivable y dos miembros cuya bioquímica poco se conoce; uno es miembro de la familia Tubeufiaceae, *Acanthostigma chiangmaiensis* (Boonmee et al. 2011), y el otro es miembro de la familia Aspergillaceae, *Aspergillus neoflavipes* (NCBI).

V. CONCLUSIONES

1. La diversidad microbiana que predomina en la Fuente termal Carbocañana del Santuario de Ampay son: las familias Pseudomonadaceae, Aspergillaceae, Patellariaceae, Sporormiaceae y Tubeufiaceae, y los microorganismos no cultivables de bacterias y hongos.
2. Las familias predominantes en la muestra de agua corresponden a Pseudomonadaceae para bacterias y Patellariaceae, Sporormiaceae y Tubeufiaceae para hongos.
3. Las familias predominantes en la muestras de sedimento corresponden a Pseudomonadaceae para bacterias y Aspergillaceae para hongos.
4. De acuerdo al análisis DGGE realizado se encontró una mayor diversidad de hongos que de bacterias en la fuente termal de Ampay. Así mismo, se encontró mayor diversidad microbiana en la muestra de agua que en la de sedimento.
5. Los parámetros óptimos del protocolo de DGGE fueron: el gradiente desnaturizante de 36-65% urea/formamida para la separación de los amplicones del gen 16S y 25-55% urea/formamida para los amplicones del gen 18S de hongos. Para todos los casos la mejor resolución de bandas se obtuvo a una concentración de 7% de poliacrilamida en el gel desnaturizante.
6. El DGGE con los pares de cebadores 1055F/ 1406R-GC y NS1/ GC-Fung mostraron el mayor número de bandas de sus amplicones.
7. El presente estudio constituye una aproximación inicial del estudio de la diversidad microbiana, cuya información debe servir de base para futuros estudios de la metagenómica.

VI. RECOMENDACIONES

1. Respecto a la técnica de DGGE, para tener una mayor aproximación a nivel de especie, se recomienda probar con cebadores cuyos productos sean mayores a 200 pb y/o usar otras tecnologías de secuenciamiento.
2. Se recomienda el estudio de la diversidad metagenómica presente en la fuente termal del Santuario de Ampay para comprender la dinámica espacio-temporal de la comunidad microbiana presente.
3. Se recomienda realizar estudios posteriores como el análisis de la diversidad metabólica de las comunidades microbianas encontradas, ya que dicha información puede ser de gran interés a nivel industrial.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achenbach, L; Woese, C. 1995. 16S and 23S rRNA-like primers. pp. 521-523. In: Archaea. A Laboratory Manual, (Sowers, K.R. y Schreier, H.J., Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Ahmad, I; Ahmad, F; Pichtel, J. 2011. Microbes and microbial technology: Agricultural and environmental applications: Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. Illustrated. Springer Science & Business Media. 516 p.
- Aminin, ALN; Madayanti, F; Aditiawati, P. 2010. 16S Ribosomal RNA-Based Analysis of Thermophilic Bacteria in Gedongsongo Hot Spring. Microbiology Indonesia 1(1).
- Anderson, IC; Campbell, CD; Prosser, JI. 2003. Potential bias of fungal 18s rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. Environmental Microbiology 5:36–47.
- Boonmee, S; Zhang, Y; Chomnunti, P; Chukeatirote, E; Tsui, CKM; Bahkali, AH; Hyde, KD. 2011. Revision of lignicolous Tubeufiaceae based on morphological reexamination and phylogenetic analysis. Fungal Diversity 51:63–102.
- Bouchet, V; Huot, H; Goldstein, R. 2008. Molecular Genetic Basis of Ribotyping. Clinical Microbiology Reviews, 21(2):262.
- Bouchet, V; Huot, H; Goldstein, R. 2008. Molecular genetic basis of ribotyping. Clinical microbiology reviews 21(2): 262-273.
- Campo, J; Sieracki, ME; Molestina, R; Keeling, P. 2015. The others : our biased perspective of eukaryotic genomes. Trends in Ecology & Evolution 29:252–259.
- Ceroni Galloso, M. 2010. ¿Investigación básica, aplicada o sólo investigación? Revista de la Sociedad Química del Perú 76, n° 1. p 5-6.

- Chaudhary, N; Sharma, AK; Agarwal, P; Gupta, A; Sharma, VK; 2015. 16S classifier: A tool for fast and accurate taxonomic classification of 16S rRNA hypervariable regions in metagenomic datasets. *PLoS ONE* 10:1–13.
- Chimutsa, M; Olakanye, AO; Thompson, TJU; Ralebitso-Senior, TK; 2015. Soil fungal community shift evaluation as a potential cadaver decomposition indicator. *Forensic Science International* 257:155–159.
- Costa, J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22:299–305.
- Das, M; Royer, TV; Leff, L G.2006. Diversity of Fungi, Bacteria, and Actinomycetes on leaves decomposing in a stream. *Applied and Environmental Microbiology* 73(3): 756-767.
- Daubin, V; Moran, NA; Ochman, H. 2003. Phylogenetics and the cohesion of bacterial genomes. *Science* 301: 829–832.
- De Sousa, T; Bhosle, S. 2012. Isolation and characterization of a lipopeptide bioemulsifier produced by *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 isolated from a mangrove ecosystem. *Bioresource Technology* 123:256–262.
- Del Rosario Rodicio, M; Del Carmen Mendoza, M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 22(4): 238-245.
- Deng, B; Shen, CH; Shan, XH; Ao, ZH; Zhao, JS; Shen, XJ; Huang, ZG. 2012. PCR-DGGE analysis on microbial communities in pit mud of cellars used for different periods of time. *Journal of the Institute of Brewing* 118(1): 120-126.
- Elkarmi, A; Abu-elteen, K; Khader, M; 2008. Modeling the biodegradation efficiency and growth of *Pseudomonas alcaligenes* utilizing 2,4-dichlorophenol as a carbon source Pre- and Post-exposure to UV radiation. *Jordan Journal of Biological Sciences* 1:7–11.
- Felczykowska, A; Krajewska, A; Zielińska, S; Łos, JM; 2015. Sampling, metadata and DNA extraction - Important steps in metagenomic studies. *Acta Biochimica Polonica* 62:151–160.

- Fontana, C; Vignolo, G; Cocconcelli, PS. 2005. PCR–DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. *Journal of Microbiological Methods* 63(3): 254-263.
- Fry, JC; Webster, G; Cragg, BAJ; Weightman, AJ; Parkes, RJ. 2006. Analysis of DGGE profiles to explore the relationship between prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep seafloor sediments from the Peru Margin. *FEMS Microbiology and Ecology* 58:86–98
- Green, SJ; Leigh, MB; Neufeld, JD. 2010. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) for Microbial Community Analysis. Springer Berlin Heidelberg. 4716 p.
- Green, SJ; Leigh, MB; Neufeld, J.D. 2009. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. pp 4137-4158 in: Timmis, K.N. (Ed) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer (Heidelberg, Germany).
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and molecular biology reviews* 68(4): 669-685.
- Handelsman, J; Tiedje, J; Alvarez-Cohen, L; Ashburner, M; Cann, IKO; Delong, EF; y Schmidt, TM. 2007. The new science of metagenomics: Revealing the secrets of our microbial planet. *Nat Res Council Report*, 13.
- Hugenholtz, P; Goebel, BM; Pace, NR. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* 180:4765–4774.
- Janda, JM; Abbott, SL. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 2761–2764.
- Joshi, M; Deshpande, J;D. 2010. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research* 1:81–97.
- Keeling, PJ; Burki, F; Wilcox, HM; Allam, B; Allen, EE; et al. 2014. The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP): Illuminating the Functional Diversity of Eukaryotic Life in the Oceans through Transcriptome Sequencing. *PLoS Biology* 12(6).

- Kiryszewska, A. 2015. *Pseudomonas mendocina* as an Agent of Bacteremia, Case Study and Literature Review. *Journal of Clinical Case Reports* 05:9–11.
- Klappenbach, JA; Saxman, PR; Cole, JR; Schmidt, TM. 2001. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Research* 29: 181–184.
- Klindworth, A; Pruesse, E; Schweer, T; Peplies, J; Quast, C; Horn, M; Glöckner, FO. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41:1–11.
- Kunin, V; Copeland, A; Lapidus, A; Mavromatis, K; Hugenholtz, P. 2008. A bioinformatician's guide to metagenomics. *Microbiology and molecular biology reviews* : 72(4):557–578.
- Kušar, D; Avguštin, G; 2012. Optimization of the DGGE band identification method. *Folia Microbiologica* 57:301–306.
- Lai, X; Zeng, X; Fang, S; Huang, Y; Cao, L; Zhou, S.2006. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of bacterial community composition in deep-sea sediments of the South China Sea. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22(12):1337-1345.
- LaMontagne, MG; Michel, FC; Holden, PA; Reddy, CA. 2002. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *Journal of Microbiological Methods* 49:255–264.
- Lane, DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing in *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. E. Stackebranty M. Goodfellow. John Wiley & Sons, London, UK. 115–175 p
- Liang, W; Fenge, L; Changyan, D y Dequan, X. 2009. A method for obtaining DNA from compost. *Applied and Microbiology Biotechnology* 84:389-395.
- Liu, L; Li, Y; Li, S; Hu, N; He, Y; Pong, R; Lin, D; Lu, L; Law, M. 2012. Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012:11p.
- Ludeña Hinojosa, Y. 2007. *Cianobacterias en la Bahía de Mayagüez: Abundancia, distribución y su relación con las propiedades bio-ópticas*. Tesis de maestría Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez.

- Mardis, ER. 2008. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9:387–402.
- McIlhatton, BP; Keating, C; Curran, MD; McMullin, M F; Barr, JG; Madrigal, JA; Middleton, D. 2002. Identification of medically important pathogenic fungi by reference strand mediated conformational analysis (RSCA). *Journal of Medical Microbiology* 51(6): 468–478.
- Murillo, C; Albertazzi, FJ; Carranza, J; Lumbsch, HT; Tamayo, G. 2009. Molecular data indicate that *Rhytidhysterium rufulum* (ascomycetes, Patellariales) in Costa Rica consists of four distinct lineages corroborated by morphological and chemical characters. *Mycological Research* 113:405–416.
- Murray, AE; Hollibaugh, JT; Orrego, C. 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 62(7): 2676-2680.
- Murray, MG; Thompson, WF.1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, 8(19): 4321-4326.
- Muyzer, G; De Waal, EC; Uitterlinden, AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* 59(3): 695-700.
- Muyzer, G; Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:127–141.
- Myers, RM; Fischer, SG; Lerman, LS; Maniatis, T. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic acids research* 13(9): 3131-3145.
- Nakatsu, CH. 2007. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science Society of America Journal*, 71(2), 562-571.

- Nakatsu, CH; Torsvik, V; Øvreås, L. 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal* 64(4): 1382-1388.
- Nikolcheva, LG; Cockshutt, AM; Bärlocher, F. 2003. Determining diversity of freshwater fungi on decaying leaves: Comparison of traditional and molecular approaches. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2548–2554.
- Nübel, U; Engelen, B; Felske, A; Snaidr, J; Wieshuber, A; Amann, RI; Ludwig, W; Backhaus, H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacilluspolymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of bacteriology* 178(19): 5636-5643.
- Oros-Sichler, M; Gomes, NCM; Neuber, G; Smalla, K. 2006. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. *Journal of Microbiological Methods* 65:63–75.
- Ouvrard, D; Campbell, BC; Bourgoïn, T; Chan, KL; 2000. 18S rRNA secondary structure and phylogenetic position of Peloridiidae (Insecta, hemiptera). *Molecular phylogenetics and evolution* 16:403–417.
- Patel, JB. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular diagnosis* 6(4): 313-321.
- Piterina, AV; Pembroke, JT. 2013. Use of PCR-DGGE Based Molecular Methods to Analyze Microbial Community Diversity and Stability during the Thermophilic Stages of an ATAD Wastewater Sludge Treatment Process as an Aid to Performance Monitoring. *International Scholarly Research Notices* 2013.
- Riesenfeld, CS; Schloss, PD; Handelsman, J. 2004. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics*. 38:525–552.
- Rodrigues, P; Soares, C; Kozakiewicz, Z; Paterson, RRM; Lima, N. 2007. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins:527–534.
- Sambrook y Russell 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Sping Harbor. N.Y.
- Sarwat, M; Negi, MS; Lakshmikumaran, M; Tyagi, AK; Das, S; Srivastava, PS. 2006. A standardized protocol for genomic DNA isolation from *Terminalia arjuna* for genetic

diversity analysis. *Electronic Journal of Biotechnology* 9:86–91.

- Shah, MP. 2015. Exploitation of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in Analysis of Microbial Diversity. *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 07:112–119.
- Smit, E; Smit, E; Leeftang, P; Leeftang, P; Glandorf, B; et al. 1999. Analysis of Fungal Diversity in the Wheat Rhizosphere by Sequencing of Cloned PCR-Amplified Genes Encoding 18S rRNA and Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Society* 65:2614–2621.
- Somerville, CC; Straube, WL; Colwell, RR; Knigh, IT. 1989. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *Applied and environmental microbiology* 55:548–554.
- Strathdee, F. y Free, A. 2013. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). In *DNA Electrophoresis: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1054. Svetlana Makovets (ed.), Springer Science+Business Media New York 2013
- Tamay de Dios, L; Ibarra, C y Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. SitioWeb: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invis/ir-2013/ir132d.pdf>. Consultado el 05 de Septiembre del 2014.
- The new science of metagenomics, revealing the secrets of our microbial planet (2007, Grossblatt, N). 2007.(Reporte). Eds. Handelsman, J; Tiedje, J. National Academy of Sciences. Washington. 152p.
- Tringe, SG; Rubin, EM. 2005. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nature reviews. Genetics* 6:805–14.
- Valones, MAA; Guimarães, RL; Brandão, LAC; De Souza, PRE; De Albuquerque Tavares Carvalho, A; Crovela, S. 2009. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: *Brazilian Journal of Microbiology* 40:1–11.
- Van Hannen, E J; Zwart, G; Van Agterveld, M P; Gons, HJ; Ebert, J; Laanbroek, HJ. 1999. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2): 795–801.
- Varma, A; Padh, H; Shrivastava, N. 2007. Plant genomic DNA isolation: An art or a

science. *Biotechnology Journal* 2:386–392.

- Větrovský, T; Baldrian, P. 2013). The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One* 8(2): e57923.
- Wang, Y.F; Zhang, FO; Gu JD. (2014) Improvement of DGGE analysis by modifications of PCR protocols for analysis of microbial community members with low abundance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98:5655–5663
- Wang, J; Ma, T; Zhao, L; Lv, J; Li, G; Liang, F; Liu, R. 2008. PCR–DGGE method for analyzing the bacterial community in a high temperature petroleum reservoir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(9): 1981-1987.
- Wang, Q; Garrity, GM; Tiedje, JM; Cole, JR. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology* 73(16): 5261-5267.
- Wang, Q; Garrity, GM; Tiedje, JM; Cole, JR. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology* 73(16): 5261-5267.
- Watanabe, T; Asakawa, S; Nakamura, A; Nagaoka, K; Kimura, M. 2004. DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenicarchaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiology Letter* 232: 153-163.
- Weighardt, F. 2011. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Sesión 10. PCR Cuantitativa para la detección de OGM. Enlace consultado el 6 de Septiembre del 2014: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/User%20Manual%20ES%20full>.
- Woese, C R; Gutell, R; Gupta, RAMESH; Noller, HF. 1983. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiological reviews* 47(4): 621.
- Woese, CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51: 221-271.
- Yu, H;-W; Halonen, MJ. 2015. Metagenomics Using Next- Generation Sequencing. *Environmental Microbiology* Febrero 2014:245–269.
- Zaferanloo, B; Bhattacharjee, S; Ghorbani, MM; Mahon, PJ; Palombo, EA. 2014.

Amylase production by *Preussia minima*, a fungus of endophytic origin: Optimization of fermentation conditions and analysis of fungal secretome by LC-MS. BMC microbiology 14:55–67.

- Zhou, J; Bruns, MANN; Tiedje, JM. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. Applied and Environmental Microbiology 62(2): 316.

VIII. ANEXO

Anexo 1. Composición de las soluciones.

Soluciones	Composición
EDTA(0.25M)	<ul style="list-style-type: none"> - 7.3 g EDTA - 100ml H₂Odestilada
KAc (acetato de potasio 8M)	<ul style="list-style-type: none"> - 78.512 g Acetato de potasio - 100 ml H₂O destilada
NaCL 5M	<ul style="list-style-type: none"> - 29.22 g NaCL - 100 ml H₂O destilada
SDS (dodecil sulfato de sodio 10%)	<ul style="list-style-type: none"> - 10g SDS - 100 ml H₂O - La mezcla, no refrigerar ni colocar en autoclave
TE-1 (tris 10mM, EDTA 1mM, pH8)	<ul style="list-style-type: none"> - 0.1211g Tris - 0.0292g EDTA - 100ml H₂O destilada - *Ajustar a pH8 con NaOH
TE-2 (Tris 25 mM, EDTA 1mM, pH8)	<ul style="list-style-type: none"> - 0.302 g Tris - 0.029g EDTA - 100 ml H₂O destilada - *Ajustar a pH=8 con NaOH
TES (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH8, sacarosa 25%)	<ul style="list-style-type: none"> - 0.1211g Tris - 0.0292g EDTA - 100ml H₂O destilada - Ajustar pH=8 con HCL. Añadir 25 g de sacarosa (sucrose)
Lisozima (5mg/ml)	<ul style="list-style-type: none"> - 5mg lisozima - 1ml de TE(0.25mM) - *Preparar stock TE 0.25M (1.25ml TE-1 en 50 ml H₂O Destilada y desionizada)
Proteinasa K (10mg/ml)	<ul style="list-style-type: none"> - 10 mg Proteinasa K - 1ml TE (0,25 mM, pH8) - Caliente a 70°C por 15 min. Almacenar a -20°C

Continua

Continuación

RNAse (10mg/ml)	<ul style="list-style-type: none"> - 10 mg RNAse - 1 ml TE (0.25mM, pH8) - Calentar la mezcla a 70°C por 15 minutos, enfriar y almacenar a -20°C.
Tampón tris Acetato EDTA (TAE 1X)	<ul style="list-style-type: none"> - 242 g Tris Base - 100 ml 0.5M EDTA pH=8 - 57.1 ml Ac. Acetic

Anexo 2: Datos estadísticos de la determinación del tamaño de ADN ambiental.

Muestras	Tamaño	DS	CV
	promedio (pb)		
Agua	19470.432	951.412	0.049
Sedimento	16797.254	1090.749	0.065

DS: desviación estándar y CV: coeficiente de variación.

Anexo 3: Datos estadísticos de la determinación del tamaño de los amplicones de ADN metagenómico de agua y sedimento.

Amplicón	Cebadores	Tamaño de los amplicones (pb)			Promedio (pb)	DS	CV
		Control positivo*	Sedimento	Agua			
V6-V8, ARNr 16S	GC-948F/ L1401R	472.195	469.501	469.501	470.399	1.555	0.00
V8, ARNr 16S	1055F/ 1406R-GC	400	398.054	406.276	401.443	4.297	0.01
V3, ARNr 16S	F16SrRNA-GC/ R16S rRNA	225.869	212.541	212.541	216.984	7.695	0.04
18S ARNr	NS1/ GC-Fung	382.006	390.899	393.155	388.687	5.895	0.02

*: Amplicones de *E. coli* y *Aspergillus* para los genes 16S y 18S respectivamente.