



UNAP



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS

**PURIFICACIÓN DE ADN METAGENÓMICO A PARTIR DE CONSORCIOS
BACTERIANOS BIODEGRADADORES DE PETRÓLEO CRUDO. LORETO –
PERÚ**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA**

PRESENTADO POR:

MARJORIE TATIANA DEL AGUILA RÍOS

ASESORES:

Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.

Blgo. HICLER NAPOLEÓN RODRIGUEZ MASHACURI, MSc(c).

IQUITOS, PERÚ

2022

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 020-CGT-UNAP-2022

En la ciudad de Iquitos, Departamento de Loreto, mediante sala virtual, a los 03 días del mes de agosto del 2022, a horas 11:00hr se dio inicio a la sustentación pública de la Tesis titulada: "PURIFICACIÓN DE ADN METAGENÓMICO A PARTIR DE CONSORCIOS BACTERIANOS BIODEGRADADORES DE PETRÓLEO CRUDO. LORETO - PERÚ", presentado por la Bachiller MARJORIE TATIANA DEL AGUILA RÍOS, autorizada mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 317-2022-FCB-UNAP, para optar el Título Profesional de BIÓLOGA, que otorga la UNAP de acuerdo a Ley 30220, su Estatuto y el Reglamento de Grados y Títulos vigente.

El Jurado Calificador y dictaminador designado mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 209-2021-FCB-UNAP, de fecha 17 de mayo de 2021, integrado por los siguientes Profesionales:

- | | |
|---|--------------|
| - Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr. | - Presidente |
| - Blga. JANETH BRAGA VELA, Dra. | - Miembro |
| - Blga. MARX PEÑA HIDALGO, Dr. | - Miembro |

Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas, las cuales fueron respondidas:

Satisfactoriamente

El jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública y la Tesis ha sido aprobada con la calificación de buena estando la Bachiller apta para obtener el Título Profesional de BIÓLOGA.

Siendo las 12:40 hr se dio por terminado el acto de sustentación.

Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr.
Presidente

Blga. JANETH BRAGA VELA, Dra.
Miembro

Blga. MARX PEÑA HIDALGO, Dr.
Miembro

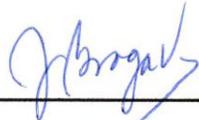
Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.
Asesor

Blgo. HICLER NAPOLEÓN RODRÍGUEZ MASHACURI
Asesor

JURADO



Blgo. Jorge Luis Marapara Del Aguila, Dr.
Presidente



Blga. Janeth Braga Vela, Dra.
Miembro



Blgo. Marx Peña Hidalgo, Dr.
Miembro

ASESORES



Blgo. Juan Carlos Castro Gómez, Dr.



Blgo. Hicler Napoleón Rodríguez Mashacuri, MSc(c).

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme estar con vida y por darme las fuerzas y sabiduría.

A mis padres, Eduardo y Martha, por su apoyo incondicional, por motivarme a seguir adelante y creer siempre en mí.

A mi hermana, Nicole, por acompañarme cada día y confiar siempre en mí.

A mi familia por incentivarne y ser un ejemplo de unión y superación.

AGRADECIMIENTO

Al proyecto de investigación RR-1152-2020-UNAP “Purificación de ADN metagenómico de aguas termales” por brindarme los reactivos necesarios para el desarrollo de la tesis.

Al proyecto de investigación convenio 018-2018-FONDECYT/BM “Adquisición de un sistema de secuenciamiento masivo NextSeq 550 como soporte para estudios genómicos y metagenómicos de la biodiversidad de la Amazonía peruana” por brindarme los reactivos necesarios para el desarrollo de la tesis.

Al jefe de la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana, SERNANP, por brindarme todas las facilidades y la autorización para la colecta de las muestras de suelos.

A mis asesores, Juan Carlos Castro Gómez y Hicler Napoleón Rodríguez Mashacuri, por guiarme, brindarme sus conocimientos y consejos que son muy valiosos para mi crecimiento personal y profesional.

A la Unidad Especializada del Laboratorio de Investigación de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonía, por recibirme desde mi etapa de voluntariado y darme la oportunidad de iniciar en el campo de la investigación, y por proporcionarme sus instalaciones, equipos y materiales para el desarrollo de la tesis.

Al Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú por brindarme los equipos y materiales necesarios para realizar la presente tesis.

A todos mis compañeros y amigos de laboratorio, Levi Estela, Gabriela Ríos, Remy Rodríguez, Pedro Vela, Miguel Grandez, entre otros, por el apoyo brindado en el transcurso de la tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
PORTADA	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN	ii
JURADO	iii
ASESORES	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	4
1.1. Antecedentes	4
1.2. Bases teóricas	9
1.2.1. Consorcios bacterianos	9
1.2.2. Métodos de extracción y purificación de ADN	9
1.2.3. Análisis de la purificación de ADN	12
1.2.4. Aplicaciones metagenómicas	16
1.2.5. Composición del petróleo crudo	16
1.3. Definición de términos básicos	17
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES	19
2.1. Formulación de la hipótesis	19

2.2. Variables y su operacionalización	20
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	22
3.1. Diseño metodológico	22
3.2. Diseño muestral	22
3.2.1. Población de estudio	22
3.2.2. Tamaño de la población de estudio	22
3.2.3. Muestreo o selección de la muestra	23
3.2.4. Criterios de selección	23
3.3. Procedimientos de recolección de datos	24
3.3.1. Área de estudio	24
3.3.2. Colecta y procesamiento de las muestras de suelo y agua	25
3.3.3. Obtención de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo	26
3.3.4. Purificación de ADN metagenómico a partir de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo	28
3.4. Procesamiento y análisis de datos	31
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	32
4.1. Obtención de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo a partir de muestras de suelos y aguas de ríos	32
4.1.1. Muestras de suelos	32
4.1.2. Muestras de aguas de ríos	33
4.2. Purificación de ADN metagenómico a partir de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo	35
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	39
5.1. Obtención de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo a partir de muestras de suelos y aguas de ríos	39

5.2. Purificación de ADN metagenómico a partir de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo	41
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	44
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mapa de ubicación de los puntos de colecta de las muestras de suelos y aguas.	25
Figura 2. Crecimiento de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo obtenidos de suelos de la RNAM. El momento en que se realizaron subcultivos están marcados con ↓↑.	32
Figura 3. Consorcios bacterianos obtenidos de cultivos enriquecidos con petróleo crudo a partir de suelos de la RNAM. A: Cultivo control. B, C: Tratamiento.	33
Figura 4. Crecimiento de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo obtenidos de aguas de los ríos Itaya y Nanay. El momento en que se realizaron subcultivos están marcados con ↓↑.	34
Figura 5. Consorcios bacterianos obtenidos de cultivos enriquecidos con petróleo crudo a partir de aguas de los ríos Itaya y Nanay. A: Cultivo control. B: Tratamiento.	35
Figura 6. Análisis electroforético, espectrofotométrico y fluorométrico del ADN metagenómico purificado a partir de consorcios bacterianos enriquecidos con petróleo crudo de muestras de suelos y aguas de los ríos.	36
Figura 7. Rendimiento de ADN metagenómico ($\mu\text{g/g}$ de biomasa fresca) purificado a partir de consorcios bacterianos enriquecidos con petróleo crudo de muestras de suelos y aguas de los ríos.	36
Figura 8. Análisis electroforético de los amplicones de ADN metagenómico purificado a partir de consorcios bacterianos enriquecidos con petróleo crudo de muestras de suelos y aguas de los ríos.	37
Figura 9. Amplificación del ADN _m de los consorcios bacterianos enriquecidos con petróleo crudo de muestras de suelos y aguas de los ríos mediante qRCP. El número de ciclos (C _q) detectados están marcados con ↓.	38

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Permiso de colecta de las muestras de suelo en la RNAM.	58
Anexo 2. Flujograma de los procedimientos realizados.	59
Anexo 3. Densidades ópticas a 600 nm de los consorcios bacterianos de las muestras de suelos.	60
Anexo 4. Densidades ópticas a 600 nm de los consorcios bacterianos de las muestras de aguas.	61

RESUMEN

La purificación del ADN metagenómico es el primer paso para descifrar la información genética mediante análisis metagenómicos de los consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo. Este tipo de análisis moleculares son fundamentales para ayudar a resolver los problemas de contaminación por hidrocarburos de los suelos y ríos de la Amazonia peruana. El objetivo general de la presente investigación fue purificar el ADN metagenómico a partir de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo de la región Loreto. Primero, se obtuvieron consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo a partir de muestras de suelos de la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana (RNAM) y de aguas de los ríos Itaya y Nanay. Para obtener estos consorcios bacterianos, las muestras fueron cultivadas por 10 días en medio Bushnell Haas (BH) suplementado con 1% de petróleo crudo y después se realizaron tres subcultivos (en medio BH + 1% de petróleo) consecutivos cada 10 días haciendo un total de 40 días de cultivo. Después, a partir de los consorcios bacterianos se purificó y evaluó la calidad y cantidad del ADN metagenómico con métodos estandarizados. Se obtuvieron con éxito consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo tanto de las muestras de suelos y aguas. Estos estuvieron conformados por cocos, bacilos, cocobacilos Gram positivos y Gram negativos. Asimismo, a partir de los consorcios bacterianos se obtuvo ADN metagenómico caracterizado por su pureza, alta calidad y cantidad. En conclusión, el protocolo estandarizado nos permitió obtener a partir de los consorcios bacterianos ADN metagenómico puro, de alta calidad y cantidad apropiados para realizar estudios a nivel molecular.

Palabras claves: ADN metagenómico, biodegradación de petróleo, biorremediación microbiana, consorcio bacteriano.

ABSTRACT

Metagenomic DNA purification is the first step to deciphering the genetic information through metagenomic analysis of petroleum biodegrading bacterial consortia. This type of molecular analysis is fundamental to help solve the hydrocarbon contamination problems of soils and rivers in the Peruvian Amazon. The general objective of the present investigation was to purify metagenomic DNA from crude petroleum biodegrading bacterial consortia from the Loreto region. First, petroleum biodegrading bacterial consortia were obtained from soil samples from the Allpahuayo Mishana National Reserve (RNAM) and from the waters of the Itaya and Nanay rivers. To obtain these bacterial consortia, the samples were cultured for 10 days in Bushnell Haas (BH) medium supplemented with 1% crude petroleum and then three consecutive subcultures (in BH medium + 1% petroleum) were performed every 10 days totalling 40 days of culture. Then, metagenomic DNA was purified from the bacterial consortia and evaluated its quality and quantity using standardized methods. Petroleum biodegrading bacterial consortia were successfully obtained from both soil and water samples. These consisted of Gram-positive and Gram-negative cocci, bacilli, coccobacilli bacteria. Moreover, metagenomic DNA obtained from the bacterial consortia was characterized by its purity, high quality, and quantity. In conclusion, the standardized protocol allowed us to get from the bacterial consortia pure metagenomic DNA of high quality and quantity appropriate for studies at the molecular level.

Keywords: metagenomic DNA, petroleum biodegradation, microbial bioremediation, bacterial consortium.

INTRODUCCIÓN

La contaminación por petróleo de ambientes terrestres y acuáticos es una gran amenaza para el medio ambiente y la salud humana debido a su toxicidad y a sus efectos carcinogénicos y mutagénicos ⁽¹⁾. Si bien es cierto, que la contaminación por petróleo provoca toxicidad en el ambiente, sin embargo, tiene un efecto enriquecedor sobre los consorcios bacterianos adaptados que lo utilizan como fuente de carbono y energía para su crecimiento ^(2,3), puesto que, las bacterias son degradadores primarios del petróleo ^(4,5).

Por tal motivo, para evaluar la adaptación y supervivencia de las bacterias tolerantes al petróleo se utilizan cultivos enriquecidos con petróleo ⁽⁶⁾, siendo la mejor alternativa el cultivo de un conjunto de bacterias, puesto que el petróleo crudo contiene una mezcla compleja de hidrocarburos y sus derivados que necesitan ser metabolizados por bacterias de diferentes especies ⁽⁷⁻⁹⁾ que forman entre sí consorcios bacterianos mediante su unión y cooperación, por lo cual tienen una mejor capacidad metabólica y eliminación de contaminantes ^(8,10,11). Seguidamente se aplican enfoques moleculares que permiten el acceso al potencial genético de las bacterias ⁽¹²⁻¹⁴⁾. Sin embargo, al aplicar enfoques moleculares, existen muchos desafíos en la extracción de material genético para obtener ADN metagenómico (ADNm) de alta calidad y cantidad en la purificación ⁽¹⁵⁾, debido a pérdidas del ADNm, cuando la purificación o eliminación de contaminantes (restos inorgánicos, proteínas, sustancias húmicas, iones metálicos y compuestos fenólicos) es extensa ⁽¹⁶⁾. Consecuentemente, existen limitadas investigaciones que detallan la purificación de ADNm de consorcios

bacterianos tolerantes al petróleo obtenidos de muestras ambientales, mediante el uso de métodos convencionales ^(6,17-21). Por lo que, muchas investigaciones se enfocan en métodos más rápidos a través del uso de kits comerciales, sin embargo, éstos no funcionan con la misma eficiencia para todas las muestras, además, son costosos y los componentes de sus reactivos no se detallan, al igual que sus volúmenes son limitados impidiendo realizar modificaciones ^(22,23). En tal sentido, no existe un protocolo universal de purificación de ADN metagenómico a partir de consorcios bacterianos de muestras ambientales tolerantes al petróleo, de manera que, los protocolos dependerán del tipo y características de la muestra ^(24,25), además, no se han reportado estudios relacionados con la presente investigación en la amazonia peruana.

Por consiguiente, obtener ADN metagenómico puro es una etapa crucial y es el primer paso para dilucidar la capacidad biodegradadora de los consorcios bacterianos tolerantes a la presencia de petróleo a partir de suelos y ríos amazónicos, empleando medios enriquecidos con petróleo crudo. Posteriormente, este ADN metagenómico de alta calidad y cantidad es necesario para continuar con investigaciones referentes a la diversidad bacteriana, mediante secuenciamiento masivo de todos los genomas bacterianos presentes, que proporcionará una base de datos de consorcios bacterianos con capacidad de biodegradar petróleo crudo y permitirá descubrir nuevas rutas metabólicas y, a su vez, nuevas enzimas con potencial para estudios de biorremediación ⁽²⁶⁻³²⁾. De manera que, obtener consorcios bacterianos y purificar su ADNm, es esencial

para desarrollar aplicaciones biotecnológicas que puedan ayudar a resolver los graves problemas de contaminación de suelos y ríos amazónicos.

Por tanto, el objetivo general de la presente investigación fue purificar el ADN metagenómico a partir de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo de la Región Loreto, y los objetivos específicos fueron: 1) Obtener consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo a partir de muestras de suelos y aguas de ríos de la Región Loreto y 2) Elaborar un protocolo de purificación de ADN metagenómico a partir de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

En 2009, se comparó 2 métodos de cultivo para obtener consorcios microbianos de suelos agrícolas de plantas de tratamiento de petróleo. El primero, fue un método clásico en el que usaron medio mineral Tanner con 250 mg/L de antraceno y se incubaron a 150 rpm a 30°C, con 8 transferencias a medio fresco que se realizaron cada semana. El segundo, fue un método modificado que se utilizó un análisis respirométrico previo al enriquecimiento, con 3 transferencias a medio fresco después de 1 semana. Además, el ADN fue extraído y purificado con tampón TE, SDS, proteinasa K, solución CTAB/NaCl, cloroformo-alcohol isoamílico (C-AI) y fenol-C-AI. Los productos amplificados fueron purificados con kit de extracción de gel QIAEX II. En el método clásico, el consorcio (C) presentó 3 aislados que fueron más abundantes, identificándose como *Pseudomonas*. Por otra parte, el método modificado reveló un consorcio (M) con 6 bacterias (*Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium* sp., *Gordonia polyisoprenivorans*, una *Microbacteriaceae* y una bacteria que utiliza el naftaleno) y 1 hongo (*Fusarium oxysporum*). Por tanto, el consorcio M presentó mayor degradación de antraceno. Finalmente, la investigación concluye que, el corto tiempo asegura el enriquecimiento de los degradadores debido a que no impone nuevas adaptaciones a las condiciones de biodegradación ⁽²¹⁾.

En 2010, se desarrolló una investigación que incluyó como población de estudio consorcios microbianos obtenidos de suelos contaminados con petróleo en Japón. Este consorcio microbiano fue enriquecido con querosene al 1% durante

6 meses, con la finalidad de investigar su capacidad para degradar fracciones de carbono equivalente en el querosene. El cultivo fue enriquecido en medio Bushnell Haas (BH) a 30°C en agitación, con transferencias sucesivas cada 2 semanas. Asimismo, el consorcio microbiano fue cosechado por centrifugación para extraer y purificar su ADN mediante 2 ciclos de congelación/descongelación, también se agregaron proteinasa K, tampón TTNE (Tris-HCl, Tween 20, Nonidet P-40, EDTA) y fenol saturado de TE. La composición del consorcio microbiano adaptado se analizó mediante la clonación del gen ARNr 16S, y fue dominado por el filo Proteobacteria (Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria) y Bacteroidetes (Flavobacteria y Bacteroides). Los géneros más representativos en el filo Proteobacteria fueron: *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Cupriavidus*, *Burkholderia* y *Rhodanobacter*, *Pseudoxanthomonas*. El trabajo concluyó que el consorcio estuvo dominado por 3 géneros de Betaproteobacteria: *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Cupriavidus*, que son una fuente potencial para degradar hidrocarburos aromáticos tóxicos en ambientes contaminados con petróleo ⁽¹⁷⁾.

En 2014, se realizaron etapas de lavados y se evaluaron diferentes métodos para la extracción de ADN metagenómico de muestras de suelos contaminados con petróleo de la India, los métodos consistieron en lisis suave, métodos duros (golpeo de perlas y sonicación) y una combinación de ellos. El trabajo obtuvo mejores resultados con el método de lisis enzimática, el cual presentó ratios de 2,31, 2,34, 2,12 (A260nm/A230nm), 1,83, 1,82 (A260nm/A280nm) y concentraciones de ADN de 173,2, 171,5, 167,9 ng/μL; otro método exitoso fue

la combinación del método de golpeo de perlas y lisis enzimática en el que se registraron ratios de 1,95, 1,99, 1,98 (A260nm/A230nm), 1,79, 1,73, 1,70 (A260nm/A280nm) y concentraciones de ADN de 189,9, 183,1 y 173,4 ng/ μ L⁽³³⁾.

En 2015, se investigó 2 consorcios bacterianos: MARA y MARB de sedimentos del Atlántico Medio Sur. Los sedimentos fueron enriquecidos en medio ONR7a con 1% de petróleo crudo, e incubados en agitación a 115 rpm, 25°C por 2 semanas; después se transfirió 2% del inóculo a medio fresco, repitiéndose estos pasos 3 veces más. El ADN fue extraído por el método de CTAB/NaCl y los productos amplificados fueron purificados con un kit de extracción de gel de ADN y, secuenciados por MiSeq. A nivel de filo, en ambos consorcios el más dominante fue Proteobacteria, seguido de Actinobacteria. Asimismo, el consorcio MARA estuvo representado por los filos Deinococcus-Thermus, Bacteroidetes, Firmicutes; y el consorcio MARB, por Planctomycetes y Bacteroidetes. Además, las clases más dominantes fueron Alfacaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Actinobacteria; siendo Alfacaproteobacteria la clase más dominante en el consorcio MARA y, Gammaproteobacteria en el consorcio MARB. La investigación concluye que los miembros de Gammaproteobacteria fueron superiores a otros degradadores de petróleo crudo⁽¹⁹⁾.

En 2015, se comparó 5 métodos de extracción de ADN con muestras de suelo contaminadas con querosene en Rumania (S, SP, S-CTAB, GnS-GII (ISOm) y mediante el kit Norgen Biotek) en donde utilizaron 2 tamaños de perlas de vidrio (0.1 y 0.5 mm) para la lisis, y presentaron ciertas modificaciones en el contenido de tampón fosfato de sodio, EDTA, SDS, fenol-cloroformo-alcohol isoamílico,

proteínasa K y CTAB/NaCl. Los resultados mostraron que el método S fue el más adecuado; presentando una cantidad de ADN de 49,38 $\mu\text{g/g}$ de suelo, ratios de 1,52 (A260nm/A280nm) y 0,69 (A260nm/A230nm) y una amplificación exitosa del gen 16S ARNr, en la que se observó una mayor intensidad en la amplificación cuando se agregó albúmina de suero bovino ⁽³⁴⁾.

En 2017, se trabajó con muestras de sedimentos contaminados con petróleo en México, que fueron pre-tratadas 3 veces con un buffer salino. El ADN metagenómico fue extraído a partir de un protocolo que fue modificado con la adición de la enzima RNasa y una segunda precipitación con isopropanol, seguida de lavados con etanol al 70%, el ADN fue purificado por membrana de diálisis. Los resultados obtenidos muestran una adecuada calidad y concentración de ADN, registrándose A260nm/A280nm desde 1,57 hasta 1,85, A260nm/A230nm desde 0,98 hasta 1,69 y concentraciones de ADN desde 21,9 hasta 321,3 $\text{ng}/\mu\text{L}$. La amplificación del ARNr 16S confirmó la pureza del ADN metagenómico ⁽³⁵⁾.

En 2018, se investigó 4 consorcios bacterianos a partir de 2 suelos (K y R), sedimentos (S) y agua de mar (E), contaminados con petróleo en Túnez. Las muestras fueron enriquecidas en medio BH y petróleo crudo ligero al 1%, durante 1 mes a 28°C con agitación en oscuridad y con transferencias a medio fresco cada 7 días. Asimismo, las 4 muestras enriquecidas, fueron incubadas por 2 meses para la obtención de los consorcios. Luego, el ADN fue extraído usando batido de perlas (1mm de diámetro), tampón de extracción (Tris-HCl, EDTA, SDS, RNasa A) y, las impurezas se eliminaron precipitando 2 veces con acetato de

amonio. Las comunidades bacterianas fueron analizadas por secuenciamiento de los amplicones 16S, en donde el orden más dominante fue Pseudomonadales (con *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Pseudoxanthomonas*) en las muestras R, K y S; seguido de Burkholderiales, Xanthomonadales, Rhizobiales y Flavobacteriales. Mientras que, en la muestra E fue dominante Actinomycetales que mostró un incremento de *Dietzia*. Finalmente, se concluye que los taxones dominantes de los consorcios de suelos mostraron especies conocidas, a comparación de los taxones dominantes de consorcios de sedimentos y agua de mar ⁽¹⁸⁾.

En 2018, se realizó una comparación de la extracción de ADN de comunidades bacterianas de muestras de suelos de áreas circundantes a una refinería. Se empleó un método manual y a través de un kit comercial. Para el método manual se utilizaron un tampón de extracción (Tris-HCl, EDTA, NaCl y CTAB al 1%), lisozima, proteinasa K, SDS al 20%, fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y etanol. La investigación determinó que las concentraciones de ADN con el método manual fueron mejores en comparación con el uso del kit comercial, obteniéndose concentraciones de 15,77 y 17,57 ng/μL con el método de extracción manual y 8,05 y 8,50 ng/μL con el uso del kit comercial, asimismo la concentración del ADNr 16S usando el método manual fue de 57,8 ng/μL y la del kit fue de 45,2 ng/μL, demostrándose que no hubo interferencias de contaminantes presentes en los suelos durante la amplificación ⁽³⁶⁾.

1.2. Bases teóricas

1.2.1. Consorcios bacterianos

Un consorcio bacteriano es una asociación natural conformada por más de una especie bacteriana, poseen relaciones sinérgicas en donde todos se benefician debido a que los productos intermediarios de una ruta catabólica de una especie bacteriana pueden ser transformados por otra especie bacteriana ⁽³⁷⁾.

Existen dos características de un consorcio, la primera se refiere a la capacidad de comunicarse entre sus miembros ⁽³⁷⁾, a través de señales moleculares, usando metabolitos esenciales o enzimas secretadas ⁽³⁸⁾. De esta manera, cada población localiza y responde a los demás miembros que forman parte del consorcio. A partir de esto, la otra característica se basa en la división del trabajo ⁽³⁷⁾.

Además, un consorcio puede ser definido o indefinido. Se denominan consorcios definidos a los grupos de bacterias conocidas que tiene una determinada función. Mientras que los consorcios indefinidos se obtienen de enriquecimientos de muestras ambientales para la selección de diferentes organismos implicados directa e indirectamente en una función de interés, como por ejemplo la biodegradación de petróleo crudo ⁽²⁹⁾.

1.2.2. Métodos de extracción y purificación de ADN

Los métodos para extraer ADN que están siendo empleados en los últimos años son de dos tipos: métodos de extracción celular y métodos de lisis directa ⁽³⁹⁾. La primera consiste en la separación de células de la matriz, para liberar, lisar y purificar el ADN ⁽³⁹⁻⁴²⁾. Una limitación importante del método de extracción celular

es que consume mucho tiempo y que solo algunas muestras pueden procesarse al mismo tiempo ⁽³⁹⁾. En cambio, el método de lisis directa que ocurre dentro de la matriz ⁽⁴²⁾, y se ha utilizado ampliamente durante los últimos 10 años debido a que proporciona mayores rendimientos de ADN dentro de tiempos aceptables y proporciona una lisis completa in situ de todos los microorganismos ⁽⁴⁰⁾. Sin embargo, la lisis directa presenta la principal desventaja de extraer otros componentes orgánicos de la muestra que pueden alterar los posteriores análisis moleculares, por lo que, se necesita realizar una etapa de purificación. Por lo tanto, toda extracción de ADN de muestras ambientales requiere los siguientes pasos: lisis celular, eliminación de fragmentos celulares y purificación del ADN ⁽³⁹⁾.

1.2.2.1. Lisis celular

La lisis celular generalmente es un paso crítico en la extracción del ADN de muestras ambientales. El resultado que se obtiene con ello es la liberación del ADN el cual se logra al romper la pared celular y las membranas de los microorganismos. Adicionalmente, algunos estudios incluyen un paso de lavado de muestra antes de la lisis, con el fin de eliminar los inhibidores solubles y el ADN extracelular ⁽³⁹⁾. Actualmente, se usan en cada protocolo tres tipos de lisis celular, estos pueden ser utilizados solos o en combinación: (i) ruptura física, (ii) química y (iii) enzimática ^(40,42).

Los métodos físicos tienen mayor acceso a toda la comunidad microbiana ⁽⁴⁰⁾. Entre los más utilizados se encuentran la congelación-descongelación o la congelación-ebullición y la homogenización de molino de perlas ^(40,42-44). También

se han informado otros métodos como: trituración en mortero, molienda bajo nitrógeno líquido, ultrasonidos y choque térmico de microondas ⁽⁴⁰⁾.

Por otra parte, la lisis química, sola o en asociación con métodos físicos, se ha utilizado ampliamente. Probablemente el componente químico más utilizado es el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), que presenta la función de disolver el material hidrofóbico de las células y es utilizado a menudo con el tratamiento térmico y con agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Chelex 100 y diversos tampones Tris o de fosfato de sodio. Otros de los componentes químicos utilizados son el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y polivinilpolipirrolidona (PVPP), los cuales eliminan parcialmente los ácidos húmicos, asimismo el CTAB forma complejos insolubles con proteínas estructurales, polisacáridos y residuos celulares, y a diferencia del PVPP no provoca una pérdida de ADN ⁽⁴⁰⁾.

De la misma manera, se han desarrollado muchos protocolos que incluyen una lisis enzimática ⁽⁴⁰⁾. La enzima más utilizada es la lisozima ⁽³⁹⁾ debido a su acción hidrolítica presente en los enlaces de los componentes glicosídicos u otros componentes húmicos ⁽⁴⁰⁾. Algunas proteasas, como la proteinasa K, la acromopeptidasa y la pronasa también pueden ayudar a liberar ácidos nucleicos ^(39,42).

1.2.2.2. Purificación de ADN

Varios métodos han sido investigados para purificar ácidos nucleicos ⁽⁴⁰⁾. El mayor inconveniente para este proceso radica en la presencia de ácidos húmicos y compuestos fenólicos en el suelo, los cuales son difíciles de eliminar y

adicionalmente inhiben la degradación de ciertas endonucleasas de restricción del ADN, disminuyen la eficiencia de la hibridación ADN/ADN e inhiben la Taq polimerasa, enzima clave en la reacción en cadena de polimerasa, mediante la quelación de iones Mg^{+2} ^(39,40).

De acuerdo a lo mencionado, es necesario purificar las muestras incluso si conllevan a pérdidas significativas ⁽³⁹⁾. En la mayoría de los estudios, después de la lisis celular, se logra una primera etapa de purificación del ADN mediante la extracción con una solución saturada de sal (Cloruro de sodio, cloruro de potasio, acetato de sodio, de potasio y de amonio) y solventes orgánicos como fenol y cloroformo, seguido de una precipitación con etanol, isopropanol o polietilenglicol (PEG) ^(39,40). Los métodos de purificación también emplean ultracentrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio, cromatografía, electroforesis, columnas de unión a ADN a base de sílice o, más raramente, diálisis simple ⁽³⁹⁾.

1.2.3. Análisis de la purificación de ADN

1.2.3.1. Cuantificación y pureza del ADN por espectrofotometría

La espectrofotometría sirve para determinar la concentración y la pureza de ADN de una muestra ⁽⁴⁵⁾. Se basa en la ley de Lambert-Beer que menciona la relación de la concentración de una molécula en solución con la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas ⁽⁴⁶⁾, por lo que, a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas ⁽⁴⁷⁾.

El ADN absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm, permitiendo obtener su concentración a partir de la absorbancia emitida ^(45,46). La concentración de ADN se mide en $ng/\mu L$, y en caso de algunos equipos como el espectrofotómetro

Nanodrop que proporciona esta información directamente, por tanto, no es necesario diluir la muestra para obtener los valores adecuados ⁽⁴⁶⁾.

Por otra parte, la pureza del ADN se obtiene de la relación de absorbancias a A260nm/A280nm y a A260nm/A230nm. En la relación A260nm/A280nm se considera un ADN con alta pureza entre valores de 1,8-2,0, valores por debajo de 1.6 se considera que el ADN se encuentra contaminado por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas ^(45,46), y valores por arriba de 2,1 podría deberse a la contaminación por ARN. En la segunda relación A260nm/A230nm, los valores adecuados están entre 1,8-2,2 ⁽⁴⁵⁾, y si la relación es menor significa que el ADN se encuentra contaminado con sales, carbohidratos y fenol ^(45,46).

1.2.3.2. Integridad de ADN por electroforesis

Otro de los aspectos importantes después de la purificación del ADN es analizar y conocer su integridad a través de electroforesis en gel de agarosa ⁽⁴⁶⁾, en donde los fragmentos de ADN de una muestra se separan de acuerdo a su tamaño, concentración. De manera que, los ácidos nucleicos al moverse por la malla tridimensional de un polímero como la agarosa, van a crear fricción, haciendo que las moléculas de mayor tamaño migren con más lentitud, mientras que las de menor tamaño migran más rápido. El rango de tamaño que pueden separarse las moléculas de ADN en el gel de agarosa es desde 50 pb hasta 40 kb. Asimismo, esta separación va a depender de la concentración del gel de agarosa, cuanto más baja es la concentración del gel mayor es el tamaño de las moléculas que pueden separarse y; cuanto más alta es la concentración del gel menor es el tamaño de las moléculas que pueden separarse ⁽⁴⁸⁾.

Los fragmentos de ADN se visualizan por medio de una tinción con bromuro de etidio, estableciendo el contenido de ácidos nucleicos ⁽⁴⁸⁾.

Además, la integridad del ADN está representada por una banda estrecha cercana al pocillo donde se coloca el ADN de una muestra. Si el ADN está fragmentado, se observará un sendero luminoso en el carril de la muestra ⁽⁴⁶⁾.

1.2.3.3. Reacción en cadena de polimerasa

La Reacción en Cadena de Polimerasa (RCP) permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento o secuencia específica de ADN blanco mediante una catálisis provocada por una enzima conocida como ADN polimerasa ^(49,50).

Los componentes que se utilizan en esta reacción son: el ADN que contiene los fragmentos que se van a amplificar, la enzima (polimerasa), los oligonucleótidos o primers o cebadores, los desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), cloruro de magnesio ($MgCl_2$), una solución amortiguadora o buffer y H_2O ^(49,50). El ADN al particionarse y separarse funciona como molde para que la enzima Taq polimerasa sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco. Los cebadores delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar, siendo complementarios a ésta, además, se utilizan dos secuencias diferentes de cebadores (“forward” o sentido y “reward” o antisentido). Los dNTPs son las bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. El $MgCl_2$ es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción. Finalmente, el agua conocida como disolvente, se usa de forma destilada libre de nucleasas que son enzimas que degradan los ácidos nucleicos ⁽⁴⁹⁾.

La RCP consta de tres etapas principales:

1) Desnaturalización: ocurre la separación de la doble hélice de ADN mediante un calentamiento entre 94°C y 96°C durante 20-30 segundos ^(49,50), para romper los puentes de hidrógeno que las une, quedando cada cadena como molde ⁽⁵⁰⁾.

2) Hibridación: ocurre el alineamiento de los cebadores en el extremo 3' del molde y se hibridan con su secuencia complementaria a una temperatura entre 50°C y 60°C ⁽⁴⁹⁾.

3) Extensión: la Taq polimerasa se une a los cebadores y comienza su función catalítica a una velocidad muy rápida, sintetizándose una nueva cadena en sentido 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es a 72°C, debido a que la enzima es funcional a esta temperatura ⁽⁴⁹⁾.

Por otra parte, para que el ADN molde no sea un problema en la reacción se debe tener en cuenta que la integridad del ADN no esté degradada, que la muestra no lleve agentes quelantes como el EDTA que reducen la concentración de iones Mg, asimismo, el ADN no debe presentar contaminantes que inhibirían la actividad de la polimerasa. Por último, se debe contar con una cantidad suficiente de ADN para su amplificación ⁽⁵¹⁾.

- **Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real**

Consiste en un método sensible de detección inmediata de los productos amplificados en cada ciclo de la reacción y permite cuantificar la cantidad de ADN, que se logra por la incorporación de reporteros fluorescentes en la reacción. El reportero más utilizado es el SYBR Green que es una molécula intercalante

que se une al ADN de doble cadena y emite una fluorescencia al ser oxidados, la fluorescencia emitida es proporcional al número de copias de ADN debido a que su captura ocurre en la etapa de extensión de cada ciclo ⁽⁴⁹⁾.

1.2.4. Aplicaciones metagenómicas

La metagenómica proporciona el acceso directo a la información genética de toda una comunidad presente en un determinado hábitat. Un aspecto importante de la metagenómica es el aislamiento y análisis del ADN obtenido de muestras ambientales, por lo que, es necesario la eliminación de contaminantes tóxicos, peligrosos y orgánicos que reducen la efectividad del ADNm ⁽³³⁾.

El enfoque de la metagenómica es obtener información del funcionamiento de las comunidades microbianas con el fin de descubrir nuevos genes que codifican enzimas, antibióticos mediante clonación directa del ADN ambiental en plásmidos, cósmidos para la creación de bibliotecas, por lo que cada enfoque a realizar va a depender del objetivo del estudio. Es así que la metagenómica abarca tres grandes niveles de investigación: procesamiento de la muestra, la secuenciación del ADN y el análisis funcional ^(52,53).

1.2.5. Composición del petróleo crudo

El petróleo crudo, en cualquiera de sus formas, es una combinación de diferentes compuestos orgánicos, siendo el más abundante los hidrocarburos, entre los que se encuentran: los hidrocarburos saturados, hidrocarburos aromáticos, resinas y asfaltenos. Son contaminantes originados por procesos naturales (actividades biosintéticas de microorganismos y plantas) y por procesos geoquímicos lentos,

que actúan sobre compuestos a altas temperaturas y presiones durante periodos geológicos prolongados ^(54–56).

1.3. Definición de términos básicos

ADN: Es una molécula que lleva las instrucciones genéticas. Consiste en dos hebras que se enrollan para formar una doble hélice. Unida a cada azúcar hay 1 de 4 bases nitrogenadas: adenina, citosina, guanina y timina. Las dos hebras se mantienen unidas por enlaces entre las bases ⁽⁵⁷⁾. La carga eléctrica negativa del ADN está dada por los grupos fosfatos ⁽⁴⁹⁾.

Agarosa: Es un polímero lineal compuesto de residuos alternantes de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa unidos por enlaces α y β glucosídicos. Las cadenas de polímero de agarosa forman fibras helicoidales, que al solidificar forma una malla tridimensional de canales ⁽⁴⁸⁾.

Consortio bacteriano: Es un grupo de bacterias de diferentes especies ⁽³⁷⁾.

Purificación: Es la obtención de ADN de alta pureza, libre de inhibidores ⁽⁴⁶⁾.

ADN metagenómico: Es el material genético de un conjunto mixto de microorganismos ⁽⁵⁸⁾.

Taq polimerasa: Es una enzima que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*. Un rasgo que distingue esta enzima bacteriana de otros ADN polimerasas es su capacidad para mantener su estabilidad y funcionalidad a altas temperaturas, lo que le caracteriza como enzima termoestable ⁽⁴⁹⁾.

Petróleo crudo: Es un líquido viscoso de color verde, amarillo, marrón o negro, que está constituido principalmente por hidrocarburos, es decir, por compuestos formados por átomos de carbono e hidrógeno en cantidades variables ⁽⁵⁹⁾.

Biodegradación: Es la descomposición orgánica aeróbica o anaeróbica por acción enzimática de microorganismos, que transforman materiales a sustancias más simples ^(60,61).

Biorremediación: Es la remoción de contaminantes y desperdicios mediante el uso de organismos biológicos ⁽⁶²⁾.

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1. Formulación de la hipótesis

El ADN metagenómico purificado a partir de los consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo de muestras de suelos y aguas de ríos se caracteriza por presentar una buena calidad y cantidad apropiada para realizar estudios de biología molecular.

2.2. Variables y su operacionalización

Variable	Definición	Tipo por su naturaleza	Indicador	Escala de medición	Categoría	Valores de las categorías	Medio de verificación
Purificación de ADNm	El ADNm purificado consiste en obtener el material genético de todas las bacterias libres de contaminantes, con una alta concentración y con bandas bien definidas de ADNm (integridad)	Cuantitativo/ Dependiente	Cuantificación de ADNm por fluorometría y espectrofotometría	Razón	Baja	$\leq 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$	-Registro de los datos en el fluorómetro Qubit 4 y software del NanoDrop® 2000 UV-Vis -Cuaderno de laboratorio -Fotografías
					Alta	$> 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$	
			Calidad de ADNm por espectrofotometría	Razón	Contaminado	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = <1,6; \geq 2,1$ $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = <1,8$	
		Aceptable			$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = \geq 1,6-1,7$ $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = >1,8$		
		Óptimo			$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = \geq 1,8-2,1$ $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = >2-2,2$		
		Cualitativo/ Dependiente	Calidad de ADNm por electroforesis	Ordinal	Totalmente degradado	Fragmentación total del ADN y no se visualiza una banda bien definida con tamaño ≥ 20 kpb	Registro fotográfico del gel en el transiluminador de luz UV BioDocAnalyze
Parcialmente degradado	Bandas con ligera fragmentación, pero se visualiza una banda bien definida con tamaño ≥ 20 kpb						

					Integridad alta	Banda de ADN bien definida con tamaño ≥ 20 kpb y sin fragmentación	
			Calidad de ADNm por amplificación mediante RCP	Ordinal	Producto de RCP del gen ribosomal 16S presente	Amplicones de 450 a ≥ 500 pb	-Registro de los datos en el software del termociclador
					Producto de RCP del gen ribosomal 16S ausente	No hay Amplicones	-Cuaderno de laboratorio -Registro fotográfico de geles
Consortios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo	Conjunto bacteriano que tienen capacidad de metabolizar petróleo crudo	Cuantitativo/ Independiente	Crecimiento bacteriano a 600 nm	Razón	Bajo	$\leq 0,010$	-Registro de los datos en el software del NanoDrop® 2000 UV-Vis -Cuaderno de laboratorio
					Mediano	0,011-0,100	
					Alto	$>0,101$	
		Cualitativo/ Independiente	Tinción Gram	Nominal	Tipo	Positivo, negativo	-Fotografías de láminas en el microscopio
Forma	Coco, bacilo, cocobacilo						

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Diseño metodológico

Según la intervención del investigador fue descriptivo-observacional, puesto que, para obtener los consorcios bacterianos, las muestras de suelos y aguas de los ríos fueron cultivados en medio Bushnell Haas (BH) enriquecido con petróleo crudo. Asimismo, se evaluó el efecto sobre la calidad y cantidad del ADN metagenómico de los consorcios bacterianos en diferentes tampones de extracción y en varios tipos de solventes orgánicos (p.ej., cloroformo, fenol, fenol-cloroformo) y en distintas proporciones para eliminar contaminantes. Además, la investigación fue transversal porque las variables fueron medidas en un tiempo específico. Según la planificación de la toma de datos fue prospectivo porque los datos fueron obtenidos a medida que se realizaron los procedimientos correspondientes.

3.2. Diseño muestral

3.2.1. Población de estudio

Estuvo constituida por todos los consorcios bacterianos presentes en los suelos de la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana (RNAM) y de los ríos Itaya y Nanay.

3.2.2. Tamaño de la población de estudio

Estuvo constituida por todos los consorcios bacterianos colectados de 2 puntos de muestreo de suelos de la RNAM y de 1 punto de muestreo de los ríos Itaya y Nanay.

3.2.3. Muestreo o selección de la muestra

Las muestras fueron obtenidas mediante muestreo no probabilístico, por conveniencia, de acuerdo a los criterios de selección.

3.2.4. Criterios de selección

- **Criterios de inclusión:**

Para colecta de muestras de suelos:

- Muestras de suelos compuesta (constituida por 13 submuestras).
- Muestras de suelos superficial (hasta 10 cm de profundidad).
- Muestras de suelos obtenidas de 2 tipos de varillales (Chamizal y alto seco).

Para colecta de muestras de aguas:

- Muestras de aguas compuestas (constituida por 13 submuestras).
- Muestras de aguas superficial (hasta 20 cm de profundidad).
- Muestras de aguas ubicadas en la desembocadura hacia el río Amazonas.
- Muestras de aguas obtenidas de los ríos Itaya y Nanay.

- **Criterios de exclusión:**

Para colecta de muestras de suelos:

- Muestras de suelos incompletas (menor de 13 submuestras).
- Muestras de suelos obtenidas de más de 10 cm de profundidad.
- Muestras de suelos ubicadas en otros tipos de varillales (diferentes a Chamizal y alto seco).

Para colecta de muestras de aguas:

- Muestras de aguas incompletas (menor de 13 submuestras).
- Muestras de aguas mayor de 20 cm de profundidad.
- Muestras de aguas que se encontraban lejos de la desembocadura hacia el río Amazonas.
- Muestras de aguas obtenidas de otros ríos (diferentes al río Itaya y Nanay).

3.3. Procedimientos de recolección de datos

3.3.1. Área de estudio

A) Muestras de suelos

Los suelos fueron colectados en la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana (Anexo 1), ubicada al suroeste de la ciudad de Iquitos en la Amazonía peruana, entre el río Nanay en el noroeste y la carretera Iquitos-Nauta en el sur, en el distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas y departamento de Loreto ⁽⁶³⁾. Los suelos se obtuvieron de dos tipos de varillales con texturas diferentes: 1) Varillal muy bajo o Chamizal en donde se encontró suelo franco arcilloso (3°58'19,2576"S - 73°25'53,5955"O) y 2) Varillal alto seco con suelo arenoso (3°57'55,7604"S - 73°26'11,1128"O) (Figura 1).

B) Muestras de agua

Las muestras de agua se obtuvieron de los ríos Itaya (3°44'30,1848"S - 73°14'17,5169"O) y Nanay (3°41'24,3600"S - 73°15'30,5676"O), en la zona norte de la ciudad de Iquitos, provincia de Maynas, departamento de Loreto (Figura 1).

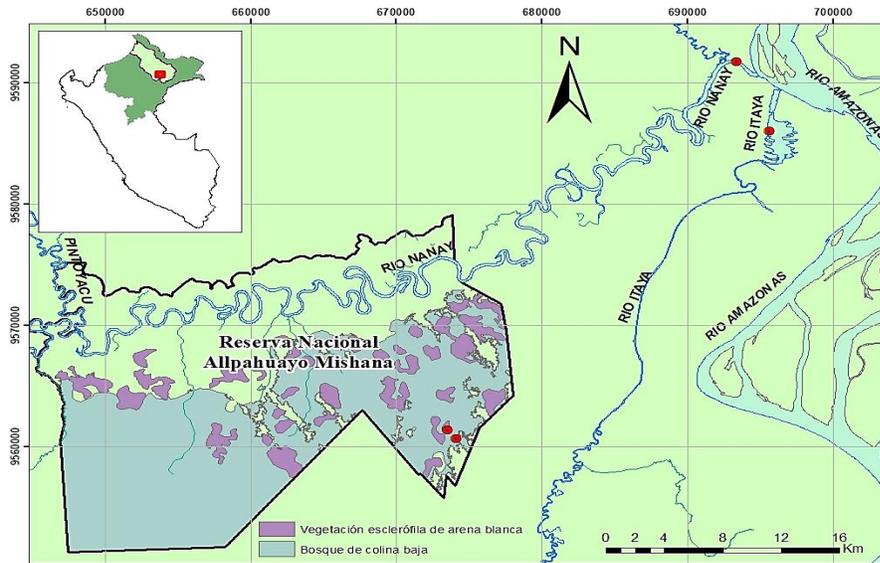


Figura 1. Mapa de ubicación de los puntos de colecta de las muestras de suelos y aguas.

3.3.2. Colecta y procesamiento de las muestras de suelo y agua

A) Muestras de suelos

Por cada punto de muestreo para obtener una muestra representativa de las bacterias presentes en el suelo, se colectaron a lo largo de los cuatro puntos cardinales 13 submuestras de 100 g cada una, con una profundidad de 10 cm; de manera que, la parte central del eje cardinal fue tomada como referencia para las coordenadas geográficas y en cada dirección cardinal se obtuvo 3 submuestras en intervalos de 10 m ⁽⁶⁴⁾. Las submuestras fueron colectadas con una pala de mano y se depositaron en bolsas ziploc estériles rotuladas ⁽¹⁸⁾ para transportarlas al laboratorio de la UELIB. Luego, las 13 submuestras se homogenizaron para obtener una muestra compuesta, se secaron a temperatura ambiente durante 24 h y se pasaron por un tamiz de 2 mm de diámetro. Posteriormente, las muestras se almacenaron temporalmente a -20°C ⁽⁶⁴⁾ (Anexo 2).

B) Muestras de agua

La colecta de las muestras de agua se realizó superficialmente hasta una profundidad de 20 cm. Con una botella de vidrio estéril, se colectaron 13 submuestras cerca de las orillas del río y en el centro formando un zigzag. Las submuestras fueron colocadas para su homogenización en un balde de plástico estéril. Seguidamente, se colocaron 1 L de la muestra de agua homogenizada en una botella de vidrio estéril rotulada y fueron transportadas al laboratorio de la UCP (Anexo 2).

3.3.3. Obtención de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo

Se colocaron por triplicado 2,5 g de una muestra mixta de suelos en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Seguidamente, se enriquecieron las muestras utilizando 50 mL de medio Bushnell Haas (BH) con pH 7 de acuerdo al trabajo modificado de Obi et al. ⁽⁶⁵⁾ y se añadió 1% de petróleo crudo estéril como fuente de carbono, y fueron colocados en agitación a 130 rpm a temperatura ambiente. Después de los primeros 10 días, se filtraron los cultivos en un sistema de filtración con una bomba de presión y vacío (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) en donde se colocaron filtros de diferentes tamaños para eliminar las partículas del suelo y retener en los filtros las bacterias para ser transferidos a medios frescos. Primero, el sobrenadante se colocó en papel filtro N°41 de 20 µm e inmediatamente se utilizó papel filtro N°1 de 11 µm (Whatman International Ltd, Maidstone, Inglaterra), seguidamente se utilizaron filtros estériles: Membrana Isopore™ de 5 µm (Millipore, São Paulo, Brasil), Isopore™ Membrana de PC de 3 µm (Merck

Millipore, Tullagreen, Irlanda) y finalmente se colocó un filtro Isopore™ Membrana de PC de 0,2 µm (Merck Millipore, Tullagreen, Irlanda). Los filtros de 0,2 µm se colocaron en placa Petri estéril y se añadió 2 mL de medio BH; inmediatamente, con la ayuda de un bisturí estéril se desprendieron las bacterias adheridas al filtro y fueron transferidas a microtubos de 2 mL y se distribuyeron homogéneamente en 4 matraces con 50 mL de medio BH de los cuales 3 matraces tenían 1% de petróleo crudo.

Para las muestras de agua, se utilizó 300 mL de agua de cada punto de muestreo y fueron filtradas bajo las mismas condiciones que las muestras de suelo, y se colocaron por triplicado en 50 mL de medio BH con 1% de petróleo crudo, con agitación a 130 rpm a temperatura ambiente.

Las muestras de suelo y agua se cultivaron para obtener consorcios bacterianos durante 40 días, con transferencias cada 10 días del 10% de cultivo a medios frescos enriquecidos con 1% de petróleo crudo. Además, el cultivo control, sin la adición de petróleo crudo ⁽²⁶⁾, se incubaron en las mismas condiciones.

Asimismo, se evaluó el crecimiento de los consorcios bacterianos cada 2 días midiendo su densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EE.UU.) ⁽²⁶⁾. Finalmente, para corroborar la obtención de consorcios bacterianos al término de los 40 días se realizó una tinción de Gram, siguiendo los procedimientos de González et al. ⁽⁶⁶⁾ y seguidamente se observaron en un microscopio Leica DM1000 LED (Leica Microsystems, Suiza) (Anexo 2).

Luego, se recuperaron los consorcios bacterianos con la ayuda de un bisturí estéril, para lo cual se colocaron los filtros de 0,2 µm y de 3 µm de acuerdo a cada muestra en placas Petri con 4 mL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8) y se transfirieron a microtubos de 2 mL y fueron colocados en una centrífuga MicroCL 21R (Thermo Scientific, EE.UU.) a 21 000 xg por 5 min, seguidamente, se descartó el sobrenadante y al precipitado se le volvió a lavar con 1 mL de TE mediante centrifugación. Al precipitado se le resuspendió en 100 µL de TE para su purificación de ADNm.

3.3.4. Purificación de ADN metagenómico a partir de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo

La purificación de ADNm se realizó y modificó de acuerdo al protocolo descrito por Verma et al. ⁽⁶⁷⁾, de modo que, se colocó en microtubos 34,9 mg y 22,9 mg de biomasa fresca obtenidos de los cultivos de las muestras de suelos y aguas de ríos respectivamente, y se agregó 200 mg de perlas de vidrio de 0,1 mm (Cell Disruption Media, Scientific Industries, Inc., EE.UU.) y se añadió inicialmente 1 mL de tampón de extracción 75% de CTAB (Tris-HCl 300 mM, EDTA 25 mM, NaCl 2 M, CTAB 2% (p/v) y PVP-40 3% (p/v); pH 8,5) y 25% de Tris-SDS (Tris-HCl 300 mM, EDTA 100 mM, NaCl 2 M, SDS 3% (p/v), PVP-40 3% (p/v) y Sarcosyl 0,5% (p/v); pH 8), el cual fue previamente atemperado a 65°C en baño maría (CDK-S12, Tomos, USA Science Tech Group). Seguidamente, las muestras fueron llevadas a un disruptor celular Genie™ Digital (Scientific Industries, Inc., EE.UU.) a 3000 rpm por 10 min. Luego, se agregó 10 µL de β-mercaptoetanol y 10 µL de proteinasa K (10 mg/mL) para incubarlos a 65°C

durante 1 h con homogenización por inversión cada 10 min. Después de los 10 min iniciales de incubación se añadió 500 μ L de tampón de extracción para completar los 1,5 mL por muestra. Terminado la incubación, se agregó 5 μ L de ribonucleasa (1 mg/mL) y se incubó en un Thermo Block (USA Scientific, Inc., EE.UU.) a 37°C por 30 min con homogenización por inversión cada 10 min. Luego, se colocó la mitad de la muestra en otro microtubo de 2 mL y se añadió igual volumen de cloroformo-álcool isoamílico (24:1, v/v). Inmediatamente, se homogenizó por inversión y se centrifugó a 14 000 xg por 10 min. A continuación, se transfirió el sobrenadante a microtubos de 2 mL, se agregó igual volumen de cloroformo-álcool isoamílico y se homogenizó por inversión para centrifugarlos a 15 000 xg por 5 min. Seguidamente, el sobrenadante fue transferido a nuevos microtubos de 2 mL y se agregó 100 μ L de acetato de potasio frío 5 M, 50 μ L de etanol absoluto frío e igual volumen que la muestra de cloroformo-álcool isoamílico y fueron incubados a 4°C por 5 min. En seguida, se centrifugó a 15 000 xg por 5 min. Se transfirió 750 μ L del sobrenadante a microtubos de 1,5 mL y el ADN fue precipitado con 675 μ L de isopropanol frío y 75 μ L de acetato de sodio frío 3 M durante 1 h a 4°C. Luego, se centrifugó a 21 000 xg por 20 min, se descartó el sobrenadante y al precipitado se agregó 500 μ L de etanol absoluto y fue centrifugado a 10 000 xg por 10 min. Seguidamente, el sobrenadante fue descartado y al precipitado se lavó con 1 mL de etanol frío al 70% a 10 000 xg por 10 min. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y el resto de etanol del microtubo fue evaporado en baño seco en el Thermo Block a 50°C por 5 min. Finalmente, el precipitado fue resuspendido en 50°C con 30 μ L de Tris-HCl 10 mM pH 8 y se almacenó a -20°C (Anexo 2).

La cantidad del ADNm (ng/ μ L) se determinó empleando un fluorómetro Qubit 4 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.) ⁽⁶⁸⁾ y un espectrofotómetro Nanodrop 2000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EE.UU.) ^(16,23). La cantidad de ADNm permitió realizar el cálculo para el rendimiento en μ g por g de biomasa, mediante la multiplicación de la cantidad de ADNm por el volumen resuspendido de ADN (μ L), que se dividió por el peso de la biomasa (g) ⁽⁶⁹⁾. Asimismo, el espectrofotómetro se empleó para determinar la calidad del ADNm expresados en ratios de absorbancia A260nm/A280nm y A260nm/A230nm ^(23,24), además, para determinar la calidad se realizó electroforesis en gel de agarosa para visualizar la integridad del ADNm ^(23,67), por tanto, se sembró 1 μ L de ADNm y 1 μ L de marcador de ADN lambda/ Hind III (Fermentas, EE.UU.) en un gel de agarosa al 1% que se preparó con tampón TBE al 0,5x (Tris-Borato-EDTA) y 4 μ L de bromuro de etidio para que se tiña el gel, luego se visualizó y fotografió el gel en un transiluminador UV usando un sistema BioDocAnalyze (Biometra, Alemania) (Anexo 2).

Para verificar y demostrar que el ADNm purificado pertenece a las bacterias y que se encuentra con buena calidad se realizó dos técnicas de RCP: RCP de punto final en un Termociclador Mastercycler nexus gradient (Eppendorf, Alemania) y RCP en tiempo real (qRCP) en un Termociclador CFX96 Deep Well Real-Time System C1000 Touch™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Calif., EE.UU.). En la RCP de punto final, se hizo de acuerdo a Gao et al. ⁽¹⁹⁾ modificado, que consistió en la amplificación de las regiones hipervariables V4 – V5 del gen de ARNr 16S utilizando los cebadores 515F (5'-TGTGNCAGCMGCCGCGGTAA-

3') y 926R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT-3') en un volumen final de reacción de 26 μ L que contenía 22 μ L de Platinum® PCR Super Mix (Invitrogen, EE.UU.) 1 μ L de cebadores (10 μ M) y 2 μ L de ADNm (60 ng). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 40 s, hibridación a 55°C por 40 s y extensión a 72°C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 7 min. Posteriormente, los productos de la amplificación fueron resueltos mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador UV usando un sistema BioDocAnalyze (Biometra, Alemania).

Por otra parte, la qRCP se realizó en un volumen final de reacción de 20 μ L que contenía 10 μ L de KAPA SYBR® Fast qPCR Master Mix 2x (KAPA Biosystem, Wilmington, MA, EE.UU.), 0,4 μ L de los cebadores 515F y 926R, 8,2 μ L de agua destilada y 1 μ L de ADNm (570 ng y 378 ng); además, las condiciones fueron: 95°C durante 5 min, con 35 ciclos de 95°C durante 40 s, 55°C durante 40 s y de 72°C durante 1 min (con una lectura de placa), seguido de una curva de fusión de 65°C por 1 min a 95°C con incremento de 1°C.

3.4. Procesamiento y análisis de datos

Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos obtenidos fueron almacenados en una base de datos en el programa Microsoft Excel 2016. Los análisis estadísticos descriptivos e inferenciales (p.ej., determinación de la distribución normal de los datos, cálculo del promedio, desviación estándar, etc.) se realizaron con el programa R versión 3.6.1.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. Obtención de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo a partir de muestras de suelos y aguas de ríos

4.1.1. Muestras de suelos

De acuerdo a las mediciones de la densidad óptica de los cultivos bacterianos con 1% de petróleo (tratamiento) obtenidos de las muestras de suelos (Anexo 3), se observó que el crecimiento promedio osciló entre 0,084 y 0,330, a excepción de la etapa inicial de aclimatación en donde las densidades ópticas fueron mucho más altas, fluctuando entre 0,165 y 0,548. De los 3 subcultivos realizados, la mayor densidad óptica se registró a los 36 días, es decir, a los 6 días del subcultivo 3 (Figura 2).

Por el contrario, los cultivos bacterianos sin petróleo (control) mostraron bajas densidades ópticas, oscilando entre 0,001 y 0,011 después de los 10 días (Figura 2).

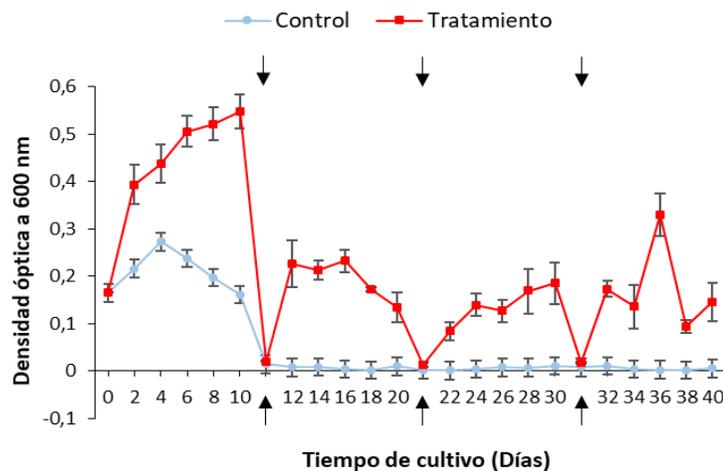


Figura 2. Crecimiento de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo obtenidos de suelos de la RNAM. El momento en que se realizaron subcultivos están marcados con ↓↑.

Además, se demostró mediante tinción Gram que el cultivo control presentaba escasas bacterias en forma de bacilo Gram negativo y se observaron mayormente manchas de tinción Gram (Figura 3A), mientras que, los consorcios bacterianos obtenidos de las muestras de suelos enriquecidos con petróleo presentaron abundantes cocos y bacilos Gram positivos (Figura 3B) así como bacilos y cocobacilos Gram negativos (Figura 3C).

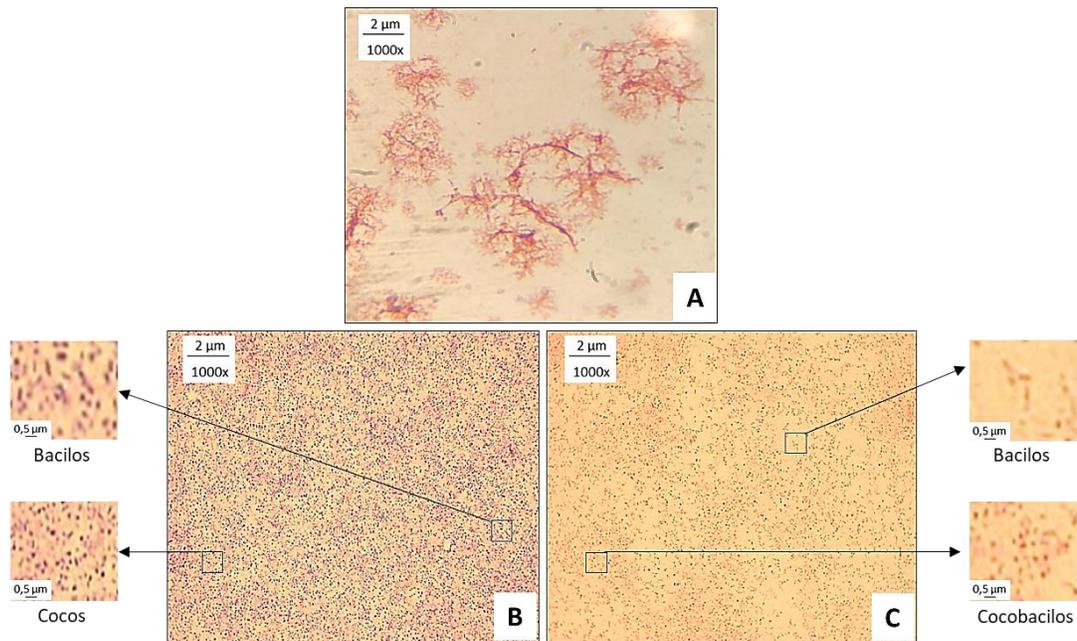


Figura 3. Consorcios bacterianos obtenidos de cultivos enriquecidos con petróleo crudo a partir de suelos de la RNAM. A: Cultivo control. B, C: Tratamiento.

4.1.2. Muestras de aguas de ríos

Los consorcios bacterianos de los ríos sometidos a petróleo crudo (Anexo 4) presentaron un crecimiento promedio entre 0,055 y 0,186. Además, la mayor densidad óptica se registró a los 28 días, es decir, a los 8 días del subcultivo 2. Asimismo, los cultivos control presentaron un crecimiento mucho más bajo

que los cultivos sometidos a tratamiento, oscilando sus densidades ópticas entre 0,001 y 0,013 (Figura 4).

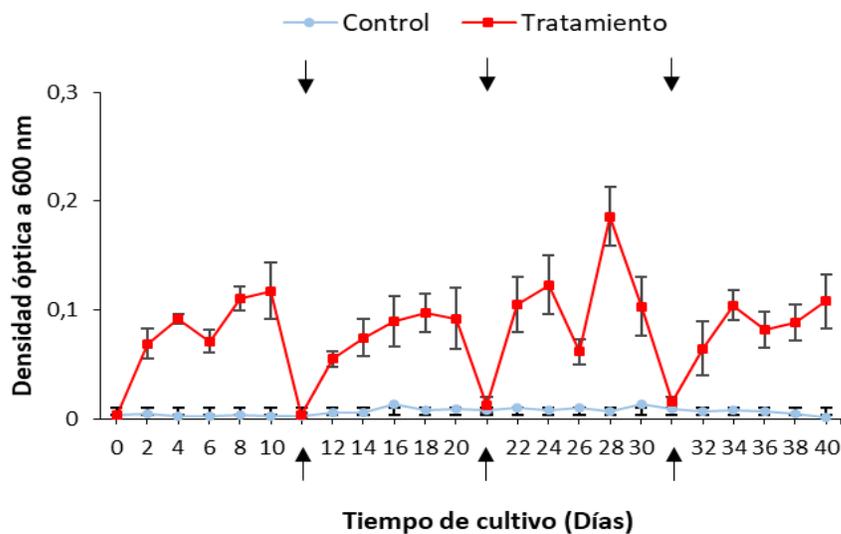


Figura 4. Crecimiento de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo obtenidos de aguas de los ríos Itaya y Nanay. El momento en que se realizaron subcultivos están marcados con ↓↑.

En el cultivo control se observaron pocas bacterias en forma de coco Gram negativo y se observaron manchas de los colorantes de tinción Gram (Figura 5A). Los consorcios bacterianos identificados en los cultivos con petróleo crudo fueron cocos, bacilos y cocobacilos Gram negativos (Figura 5B).

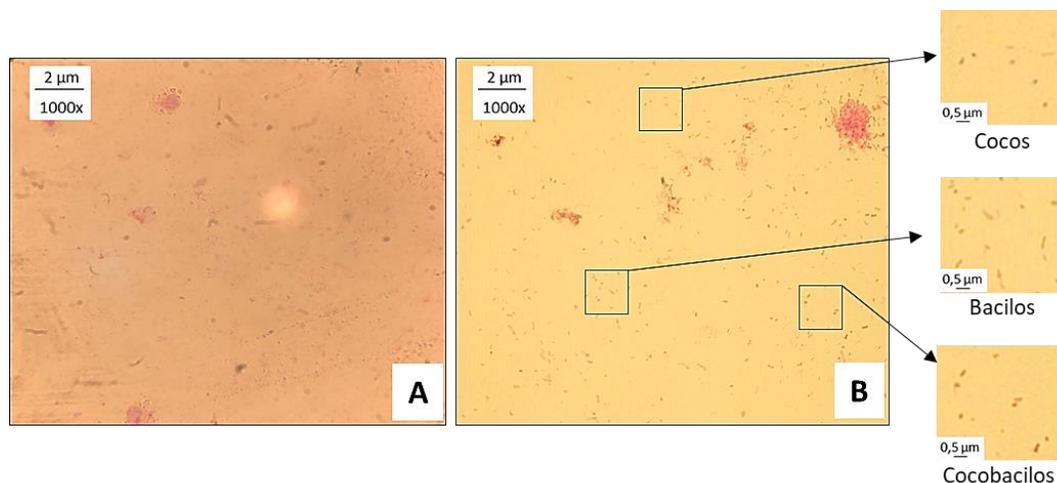


Figura 5. Consorcios bacterianos obtenidos de cultivos enriquecidos con petróleo crudo a partir de aguas de los ríos Itaya y Nanay. A: Cultivo control. B: Tratamiento.

4.2. Purificación de ADN metagenómico a partir de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo

El protocolo estandarizado permitió la purificación de ADNm de los consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo obtenidos mediante cultivos enriquecidos con petróleo crudo a partir de muestras de suelos y aguas de los ríos, de modo que, se obtuvieron altas concentraciones de ADNm en los análisis fluorométrico y espectrofotométrico en donde se registraron una buena calidad del ADNm con ratios de absorbancias A_{260nm}/A_{280nm} de 1,92 y 1,93 y A_{260nm}/A_{230nm} de 1,97 y 2,11. Estos valores nos indicaron que el ADNm se encontró libre de contaminación por proteínas, compuestos fenólicos, sales y/o carbohidratos, respectivamente. Además, en el análisis electroforético se visualizó un ADNm íntegro, es decir, sin degradación, ni contaminación por carbohidratos (Figura 6).

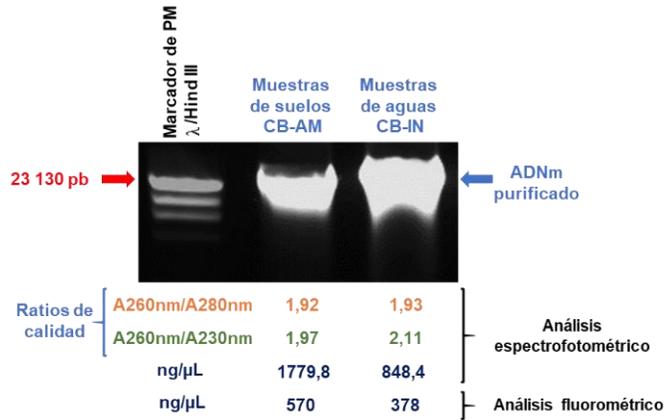


Figura 6. Análisis electroforético, espectrofotométrico y fluorométrico del ADN metagenómico purificado a partir de consorcios bacterianos enriquecidos con petróleo crudo de muestras de suelos y aguas de los ríos.

Asimismo, se obtuvo un elevado rendimiento de ADNm. A partir de los datos del espectrofotómetro, los consorcios bacterianos de las muestras de suelos fueron los de mayor rendimiento de ADNm con 1529,9 μg/g de biomasa fresca, y en los datos del fluorómetro se obtuvo una mínima diferencia de 5,2 μg/g del rendimiento de ADNm entre las muestras, siendo los consorcios bacterianos de las muestras de aguas los que presentaron un valor ligeramente superior (Figura 7).

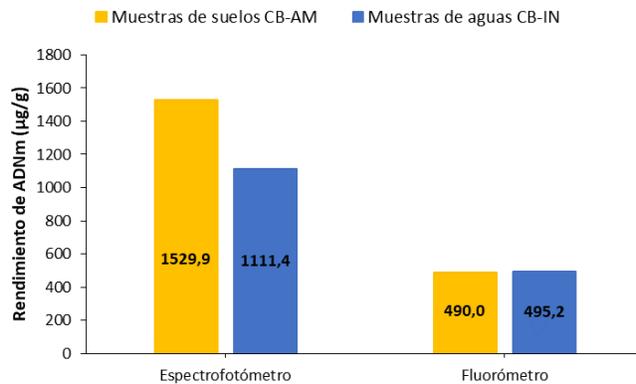


Figura 7. Rendimiento de ADN metagenómico (μg/g de biomasa fresca) purificado a partir de consorcios bacterianos enriquecidos con petróleo crudo de muestras de suelos y aguas de los ríos.

Adicionalmente, para corroborar la alta calidad del ADNm obtenido de los consorcios bacterianos, este fue amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Para ello se emplearon cebadores específicos que permiten amplificar las regiones variables V4 – V5 del ARNr 16S. Los resultados de la amplificación fueron exitosos y muestran productos de RCP con tamaños que oscilaron de 400 pb a 500 pb (Figura 8).

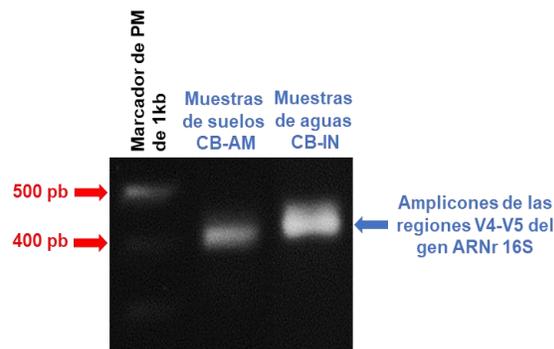


Figura 8. Análisis electroforético de los amplicones de ADN metagenómico purificado a partir de consorcios bacterianos enriquecidos con petróleo crudo de muestras de suelos y aguas de los ríos.

Finalmente, se realizó la Reacción de Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qRCP) que nos proporcionó, mediante la emisión de la fluorescencia, el número de ciclos (Cq) en el que ocurre la amplificación, que es proporcional a la cantidad de ADNm, por tanto, las muestras de suelos que presentaron mayores concentraciones de ADNm fue la que amplificó primero, necesitando menos números de ciclos (Cq = 3,40), mientras que el ADNm obtenido de los consorcios bacterianos de muestras de agua necesitaron un mayor número de ciclos para ser amplificados (Cq = 11,11) (Figura 9). Además, la temperatura de fusión para las muestras de suelos y aguas de

los ríos fue de 84°C y en el control (sin muestra) no se evidenció una temperatura, lo que indica que la amplificación tardía del control se pudo deber a la presencia de dímeros.

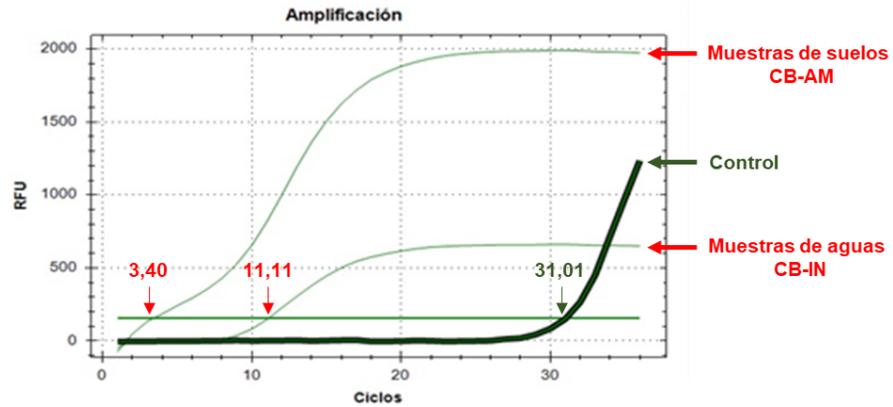


Figura 9. Amplificación del ADNm de los consorcios bacterianos enriquecidos con petróleo crudo de muestras de suelos y aguas de los ríos mediante qRCP. El número de ciclos (Cq) detectados están marcados con ↓.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Las bacterias representan a los microorganismos más activos en la degradación de petróleo, por ende, son considerados como degradadores primarios de una variedad de componentes presentes en el suelo y el agua ⁽⁴⁾. Debido al potencial que presentan las bacterias para solucionar problemas ambientales, actualmente se vienen desarrollando diferentes herramientas, como el enriquecimiento mediante sucesivas inoculaciones en medios minerales con los contaminantes como única fuente de carbono con la finalidad de aislar y obtener consorcios bacterianos que degraden el petróleo ⁽¹⁸⁾. Asimismo, el desarrollo de métodos moleculares es de gran importancia, pues nos permite obtener respuestas de la supervivencia y tamaño del consorcio bacteriano implicado en la degradación de petróleo ⁽¹³⁾.

5.1. Obtención de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo a partir de muestras de suelos y aguas de ríos

En el presente estudio, la etapa inicial de cultivo de las muestras de suelo correspondió a la aclimatación debido a que los suelos fueron agregados directamente al medio de cultivo para liberar las bacterias, y empiecen su proceso de adaptación a los cultivos. De esta manera, los crecimientos de la mayoría de los consorcios bacterianos enriquecidos con petróleo crudo de las muestras de suelo fueron mayores de 0,100, siendo estos datos similares a lo reportado por Ahirwar et al. ⁽⁷⁰⁾ quienes evaluaron el crecimiento de consorcios bacterianos con naftaleno, registrando valores entre 0,136 a 0,409, a pesar que trabajaron con

suelos contaminados con petróleo no se mostró una diferencia significativa respecto a nuestro estudio, de manera similar, registraron el máximo crecimiento a los 6 días. En cambio, Liu et al. ⁽⁷¹⁾ observaron mediante turbidez el aumento en gran medida de los consorcios bacterianos a los 7 días. Al igual que en nuestro estudio, en donde se registraron mayores crecimientos a los 6 y 10 días, Molina et al. ⁽⁷²⁾ también obtuvieron mayores crecimientos en diferentes tiempos, es decir, en el día 1 y a los 10 días y de acuerdo a los autores esto se relaciona a la presencia de diferentes especies que existen en un consorcio bacteriano.

Sin embargo, nuestros resultados son diferentes a lo reportado por Guerra et al. ⁽²⁸⁾ quienes obtuvieron consorcios bacterianos con un crecimiento rápido, a los 2 y 4 días con densidades ópticas de ~0,42 y 0,8 de crecimiento, esto pudo corresponder al pre-enriquecimiento que realizaron con medios de cultivo muy nutritivos que ocasionó el crecimiento del cultivo control de uno de los consorcios bacterianos que no tenían petróleo.

Por otra parte, el mayor crecimiento registrado de los consorcios bacterianos de las muestras de aguas de los ríos de nuestro estudio, fue a los 8 días, por el contrario, Araújo et al. ⁽²⁹⁾ quienes trabajaron con muestras de agua de producción de un yacimiento de petróleo, el mayor crecimiento fue registrado a los 4 días, similar al reportado por Gao et al. ⁽¹⁹⁾ utilizando muestras marinas cuyo mayores crecimientos de las principales bacterias de los consorcios, fueron registrados a los 3 y 5 días.

Asimismo, las bacterias en forma de bacilo y cocobacilo Gram negativos son los que predominaron en los consorcios bacterianos en nuestro estudio obtenidos de

las muestras de suelos y aguas de los ríos, coincidiendo con los reportes de Ahirwar et al. ⁽⁷⁰⁾, Liu et al. ⁽⁷¹⁾, Gao et al. ⁽¹⁹⁾, Molina et al. ⁽⁷²⁾ y Jacques et al. ⁽²¹⁾. Por tanto, los valores de crecimiento y la resistencia a las condiciones de estrés reflejan la adaptación de las bacterias ⁽⁷³⁾, por consiguiente, las diferencias en el crecimiento de los consorcios bacterianos enriquecidos con petróleo crudo y en el control (sin petróleo) manifiestan la asimilación del petróleo crudo para el crecimiento de consorcios bacterianos con capacidad catabólica específica para degradar el petróleo. Además, Kumar et al. ⁽⁵⁾ demostró que fuentes de nitrógeno y fósforo mejoran el crecimiento bacteriano y la degradación de petróleo, por lo que, el medio de cultivo utilizado en nuestro estudio contenía principalmente estos componentes.

5.2. Purificación de ADN metagenómico a partir de consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo

En nuestro estudio, se obtuvo ADNm de alta calidad, con ratios de absorbancia $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ de $\sim 1,9$ y mayores de $1,9$ en $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$, asimismo, la cantidad de ADNm fue alta con más de $800 \text{ ng}/\mu\text{L}$ en análisis espectrofotométrico y mayores de $300 \text{ ng}/\mu\text{L}$ en análisis fluorométrico (Figura 6). Estos resultados fueron similares a lo reportado por Akbari et al. ⁽³³⁾ quienes realizaron diferentes métodos de purificación de ADNm (lisis enzimática y golpeo con perlas-lisis enzimática) a partir de suelos contaminados con petróleo, obteniendo ratios de $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ de $1,79$ a $1,83$ y en las $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ de $1,95$ a $2,34$, con concentraciones de ADNm entre $167,9 \text{ ng}/\mu\text{L}$ y $189,9 \text{ ng}/\mu\text{L}$ analizados

espectrofotométricamente. Sin embargo, existen ligeras diferencias a lo reportado por Dasgupta et al. ⁽³⁶⁾ que obtuvieron ratios de absorbancia A260nm/A280nm de 1,74 y 1,76, y concentraciones de ADNm de 17,57 ng/μL y 15,77 ng/μL. Nuestros resultados fueron mejores a lo reportado por Sei et al. ⁽⁷⁴⁾ que extrajeron ADN de bacterias presentes en muestras de agua de mar enriquecidas con petróleo crudo mediante un método modificado con proteinasa K, por congelación descongelación y purificaron con kit, registrando ratios de absorbancias A260nm/A280nm entre ~1,4 a 1,7. Asimismo, fueron mejores a lo reportado por Tanase et al. ⁽³⁴⁾, sin embargo, existen diferencias muy marcadas con los resultados reportados por García-Bautista et al. ⁽³⁵⁾, a pesar que desarrollaron pasos adicionales de lavado y purificación de ADN obtuvieron A260nm/A280nm entre 1,57 y 1,85 y las A260nm/A230nm fueron entre 0,98 y 1,69, con concentraciones de ADN que fluctuaron entre 21,9 ng/μL y 321,3 ng/μL. De acuerdo a nuestras bandas electroforéticas, nuestro ADNm fue íntegro coincidiendo con estudios realizados por Akbari et al. ⁽³³⁾ y Dasgupta et al. ⁽³⁶⁾. Sin embargo, hubo diferencias con respecto al tamaño de los productos amplificados de ADNm, siendo en nuestro estudio entre 400 pb a 500 pb, y los estudios realizados por Akbari et al. ⁽³³⁾ y Dasgupta et al. ⁽³⁶⁾ fueron de ~1500 pb. Por otra parte, las temperaturas de fusión reportado en nuestro estudio fueron similares a lo reportado por Powell et al. ⁽⁷⁵⁾, quienes evaluaron bacterias degradadoras de alcano, mostrando temperaturas de fusión de 80,5°C a 85°C. Asimismo, reportaron la presencia de dímeros de los cebadores en los controles

que frecuentemente ocurre cuando se utiliza SYBR Green que son sensibles a cualquier ADN de doble cadena.

En consecuencia, la purificación de ADNm de consorcios bacterianos previamente cultivados permitió la eliminación de contaminantes comunes presentes en los suelos, tales como ácidos húmicos, ácidos fúlvicos que suelen ser co-purificados con el ADNm y reducen la eficiencia de amplificación por RCP al degradar o capturar ácidos nucleicos o al inactivar el ADN polimerasa ^(33,76,77). En tal sentido, los productos amplificados mediante RCP de punto final y RCP en tiempo real demuestran la alta calidad del ADNm purificado ^(34,35).

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

- Se logró obtener consorcios bacterianos biodegradadores de petróleo crudo a partir de muestras de suelos de la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana y de muestras de aguas de los ríos Itaya y Nanay sometidos a cultivos enriquecidos con petróleo crudo. Estos consorcios bacterianos podrían ser usados en el futuro, para desarrollar sistemas bacterianos de biorremediación en derrames petroleros.
- El ADN metagenómico purificado se caracterizó por su buena calidad y alta cantidad, apropiados para realizar estudios moleculares, demostrándose la eficiencia del protocolo de purificación de ADN metagenómico mediante análisis espectrofotométrico, fluorométrico, electroforético, RCP de punto final y RCP en tiempo real.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

- Realizar la secuenciación del ADN metagenómico de los consorcios bacterianos obtenidos y continuar realizando análisis moleculares, con la finalidad de conocer las bacterias, sus rutas metabólicas y enzimas que están implicadas en la biodegradación del petróleo crudo.
- Realizar la purificación de ADN metagenómico de consorcios bacterianos presentes en diferentes muestras de suelos y aguas de la Amazonía peruana que contiene una importante diversidad de bacterias, muchas de ellas no descubiertas y que tienen potenciales biotecnológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eze MO, Hose GC, George SC, Daniel R. Diversity and metagenome analysis of a hydrocarbon-degrading bacterial consortium from asphalt lakes located in Wietze, Germany. *AMB Express*. 14 de junio de 2021;11:89.
2. Zafra G, Absalón ÁE, Anducho-Reyes MÁ, Fernandez FJ, Cortés-Espinosa DV. Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil. *Chemosphere*. abril de 2017;172:120-6.
3. Bidja Abena MT, Chen G, Chen Z, Zheng X, Li S, Li T, et al. Microbial diversity changes and enrichment of potential petroleum hydrocarbon degraders in crude oil-, diesel-, and gasoline-contaminated soil. *3 Biotech*. febrero de 2020;10(2):42.
4. Koshlaf E, Ball AS. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiol*. 19 de enero de 2017;3(1):25-49.
5. Kumar AG, Rajan NN, Kirubakaran R, Dharani G. Biodegradation of crude oil using self-immobilized hydrocarbonoclastic deep sea bacterial consortium. *Mar Pollut Bull*. septiembre de 2019;146:741-50.
6. Ma M, Zheng L, Yin X, Gao W, Han B, Li Q, et al. Reconstruction and evaluation of oil-degrading consortia isolated from sediments of hydrothermal vents in the South Mid-Atlantic Ridge. *Sci Rep*. 14 de enero de 2021;11(1):1-14.

7. Brzeszcz J, Kapusta P, Steliga T, Turkiewicz A. Hydrocarbon Removal by Two Differently Developed Microbial Inoculants and Comparing Their Actions with Biostimulation Treatment. *Molecules*. enero de 2020;25(3):661.
8. Mishra S, Lin Z, Pang S, Zhang W, Bhatt P, Chen S. Recent Advanced Technologies for the Characterization of Xenobiotic-Degrading Microorganisms and Microbial Communities. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:26.
9. Acosta Diaz S, Barrios San Martin Y, Toledo León H, Comesaña García Y, Aldana Jiménez K. Evaluación de la capacidad hidrocarburoclástica de un consorcio bacteriano aislado de zonas costeras de cuba. *Rev CENIC Cienc Quím*. 18 de julio de 2021;52(2):79-88.
10. Patowary K, Patowary R, Kalita MC, Deka S. Development of an Efficient Bacterial Consortium for the Potential Remediation of Hydrocarbons from Contaminated Sites. *Front Microbiol*. 14 de julio de 2016;7:1092.
11. Mukherjee AK, Bordoloi NK. Bioremediation and reclamation of soil contaminated with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: a pilot-scale study. *Environ Sci Pollut Res Int*. marzo de 2011;18(3):471-8.
12. Bacosa HP, Suto K, Inoue C. Degradation potential and microbial community structure of heavy oil-enriched microbial consortia from mangrove sediments in Okinawa, Japan. *J Environ Sci Health Part A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2013;48(8):835-46.

13. Bacosa HP, Suto K, Inoue C. Bacterial community dynamics during the preferential degradation of aromatic hydrocarbons by a microbial consortium. *Int Biodeterior Biodegrad.* 1 de octubre de 2012;74:109-15.
14. Napp AP, Pereira JES, Oliveira JS, Silva-Portela RCB, Agnez-Lima LF, Peralba MCR, et al. Comparative metagenomics reveals different hydrocarbon degradative abilities from enriched oil-drilling waste. *Chemosphere.* 1 de octubre de 2018;209:7-16.
15. Vishnivetskaya TA, Layton AC, Lau MCY, Chauhan A, Cheng KR, Meyers AJ, et al. Commercial DNA extraction kits impact observed microbial community composition in permafrost samples. *FEMS Microbiol Ecol.* 1 de enero de 2014;87(1):217-30.
16. Venturini AM, Nakamura FM, Gontijo JB, da França AG, Yoshiura CA, Mandro JA, et al. Robust DNA protocols for tropical soils. *Heliyon.* 1 de mayo de 2020;6(5):6.
17. Bacosa H, Suto K, Inoue C. Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. *Int Biodeterior Biodegrad.* 1 de diciembre de 2010;64(8):702-10.
18. Omrani R, Spini G, Puglisi E, Saidane D. Modulation of microbial consortia enriched from different polluted environments during petroleum biodegradation. *Biodegradation.* 1 de abril de 2018;29(2):187-209.
19. Gao X, Gao W, Cui Z, Han B, Yang P, Sun C, et al. Biodiversity and degradation potential of oil-degrading bacteria isolated from deep-sea

- sediments of South Mid-Atlantic Ridge. *Mar Pollut Bull.* 15 de agosto de 2015;97(1-2):373-80.
20. Thomassin-Lacroix EJ, Yu Z, Eriksson M, Reimer KJ, Mohn WW. DNA-based and culture-based characterization of a hydrocarbon-degrading consortium enriched from Arctic soil. *Can J Microbiol.* diciembre de 2001;47(12):1107-15.
 21. Jacques RJS, Okeke BC, Bento FM, Peralba MCR, Camargo FAO. Improved enrichment and isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-degrading microorganisms in soil using anthracene as a model PAH. *Curr Microbiol.* junio de 2009;58(6):628-34.
 22. Guerra V, Beule L, Lehtsaar E, Liao HL, Karlovsky P. Improved Protocol for DNA Extraction from Subsoils Using Phosphate Lysis Buffer. *Microorganisms.* abril de 2020;8(4):532.
 23. Cheng F, Hou L, Woeste K, Shang Z, Peng X, Zhao P, et al. Soil pretreatment and fast cell lysis for direct polymerase chain reaction from forest soils for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of fungal communities. *Braz J Microbiol.* 1 de octubre de 2016;47(4):817-27.
 24. Narayan A, Jain K, Shah AR, Madamwar D. An efficient and cost-effective method for DNA extraction from athalassohaline soil using a newly formulated cell extraction buffer. *3 Biotech.* 13 de febrero de 2016;6(1):62.
 25. Saha J, Saha BK, Pal Sarkar M, Roy V, Mandal P, Pal A. Comparative Genomic Analysis of Soil Dwelling Bacteria Utilizing a Combinational Codon

- Usage and Molecular Phylogenetic Approach Accentuating on Key Housekeeping Genes. *Front Microbiol.* 2019;10:2896.
26. Lee Y, Jeong SE, Hur M, Ko S, Jeon CO. Construction and Evaluation of a Korean Native Microbial Consortium for the Bioremediation of Diesel Fuel-Contaminated Soil in Korea. *Front Microbiol.* 2018;9:11.
27. Blanco-Enríquez EG, Zavala-Díaz de la Serna FJ, Peralta-Pérez MDR, Ballinas-Casarrubias L, Salmerón I, Rubio-Arias H, et al. Characterization of a Microbial Consortium for the Bioremoval of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Water. *Int J Environ Res Public Health.* mayo de 2018;15(5):14.
28. Guerra AB, Oliveira JS, Silva-Portela RCB, Araújo W, Carlos AC, Vasconcelos ATR, et al. Metagenome enrichment approach used for selection of oil-degrading bacteria consortia for drill cutting residue bioremediation. *Environ Pollut.* 1 de abril de 2018;235:869-80.
29. Araújo WJ, Oliveira JS, Araújo SCS, Minnicelli CF, Silva-Portela RCB, da Fonseca MMB, et al. Microbial Culture in Minimal Medium With Oil Favors Enrichment of Biosurfactant Producing Genes. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:16.
30. Zafra G, Taylor TD, Absalón AE, Cortés-Espinosa DV. Comparative metagenomic analysis of PAH degradation in soil by a mixed microbial consortium. *J Hazard Mater.* 15 de noviembre de 2016;318:702-10.

31. Tiralerdpanich P, Sonthiphand P, Luepromchai E, Pinyakong O, Pokethitiyook P. Potential microbial consortium involved in the biodegradation of diesel, hexadecane and phenanthrene in mangrove sediment explored by metagenomics analysis. *Mar Pollut Bull.* 1 de agosto de 2018;133:595-605.
32. Li J, Wu C, Chen S, Lu Q, Shim H, Huang X, et al. Enriching indigenous microbial consortia as a promising strategy for xenobiotics' cleanup. *J Clean Prod.* 10 de julio de 2020;261:10.
33. Akbari VG, Pandya RD, Singh SP. Extraction of the metagenomic DNA and assessment of the bacterial diversity from the petroleum-polluted sites. *Environ Monit Assess.* octubre de 2014;186(10):6351-62.
34. Tanase AM, Mereuta I, Chiciudean I, Ionescu R, Milea L, Cornea CP, et al. Comparison of Total DNA Extraction Methods for Microbial Community Form Polluted Soil. *Agric Agric Sci Procedia.* 1 de enero de 2015;6:616-22.
35. García-Bautista I, Toledano-Thompson T, Dantán-González E, González-Montilla J, Valdez-Ojeda R. Inexpensive metagenomic DNA extraction protocol with high quality from marine sediments contaminated by petroleum hydrocarbons. *Genet Mol Res.* 21 de septiembre de 2017;16(3):11.
36. Dasgupta A, Handique PJ, Saikia R. A Rapid and Effective Method for Extraction of Bacterial DNA From Crude Oil-Contaminated Soil. *Curr Sci.* 2018;115(2):211-2.
37. Villegas LB, Martínez MA, Rodríguez A, Amoroso MJ. Microbial Consortia, a Viable Alternative for Cleanup of Contaminated Soils. En: Alvarez A, Polti MA,

- editores. Bioremediation in Latin America: Current Research and Perspectives. Cham: Springer International Publishing; 2014. p. 135-48.
Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-05738-5_8
38. Smith RP, Tanouchi Y, You L. Chapter 13 - Synthetic Microbial Consortia and their Applications. En: Zhao H, editor. Synthetic Biology. Boston: Academic Press; 2013. p. 243-58. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123944306000133>
39. Roose-Amsaleg CL, Garnier-Sillam E, Harry M. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Appl Soil Ecol.* 1 de septiembre de 2001;18(1):47-60.
40. Robe P, Nalin R, Capellano C, Vogel TM, Simonet P. Extraction of DNA from soil. *Eur J Soil Biol.* 1 de octubre de 2003;39(4):183-90.
41. Nair HP, Vincent H, Bhat SG. Evaluation of five in situ lysis protocols for PCR amenable metagenomic DNA from mangrove soils. *Biotechnol Rep.* diciembre de 2014;4:134.
42. Miller D, Bryant J, Madsen E, Ghiorse W. Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. *Appl Environ Microbiol.* 1 de noviembre de 1999;65(11):4715-24.
43. Kauffmann IM, Schmitt J, Schmid RD. DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1 de junio de 2004;64(5):665-70.

44. Bürgmann H, Pesaro M, Widmer F, Zeyer J. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. *J Microbiol Methods*. 1 de mayo de 2001;45(1):7-20.
45. Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca). 2020;2:10.
46. Velázquez LPA, Aragón Martínez M del C, Cornejo Romero A. Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. 2014;1:25.
47. Díaz NA, Ruiz AB, Fernández Reyes E, Galván Cejudo A, Jorrín Novo J, Peinado Peinado J, et al. *Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. 2010;8.
48. Fierro Fierro F. *Electroforesis de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. 2014;27:27-51.
49. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en discapacidad*. 2013;2(2):70-8.
50. Díaz AS, Flores Rentería L, Aportela Cortez J, Sierra Palacios E. *PCR: reacción en cadena de la polimerasa. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. 2014;53-73.
51. Mas E, Poza J, Ciriza J, Zaragoza P, Osta R, Rodellar C. *Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*. *Rev Aquat*. 2001;(15).

Disponible

en:

<http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/139>

52. Rolf D. The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3(6):470-8.
53. Balagurusamy N. *Metagenómica: Concepto y Aplicaciones en el Mundo Microbiano*. 2014;185-207.
54. Eskandari S, Hoodaji M, Tahmourespour A, Abdollahi A, Baghi T, Eslamian S. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Bacillus licheniformis* ATHE9 and *Bacillus mojavensis* ATHE13 as Newly Strains Isolated from Oil-Contaminated Soil. *J Geogr Environ Earth Sci Int*. 2017;11(2):1-11.
55. Juck D, Charles T, Whyte L, Greer. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiol Ecol*. 2000;33(3):241-649.
56. Hidalgo KJ, Sierra-Garcia IN, Dellagnezze BM, de Oliveira VM. Metagenomic Insights Into the Mechanisms for Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Oil Supply Chain. *Front Microbiol*. 18 de septiembre de 2020;11:561506.
57. Corella D, Ordovas JM. Conceptos básicos en biología molecular relacionados con la genética y la epigenética. *Rev Esp Cardiol*. 1 de septiembre de 2017;70(9):744-53.

58. Segre J. Metagenómica | NHGRI. Genome.gov. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Metagenomica>
59. Jimeno C. El petróleo, el recorrido de la energía. 2002;19.
60. Ruiz M, Pastor K, Acevedo A. Biodegradabilidad de artículos desechables en un sistema de composta con lombris. Inf Tecnológica. 2013;24(2):47-56.
61. Gómez Alarcón G, Sáiz Jiménez C. Biodeterioro de monumentos y biorremediación: estado actual y perspectivas futuras. R Acad Farm. 2013;79(4):562-79.
62. Cota-Ruiz K, Nuñez-Gastelúm JA, Delgado-Rios M, Martinez-Martinez A. Biorremediación: actualidad de conceptos y aplicaciones. Biotecnia. 2019;21(1):37-44.
63. García-Villacorta R, Ahuite-Reátegui M, Olortegui-Zumaeta M. Clasificación de bosques sobre arena blanca de la zona reservada Allpahuayo-Mishana. Folia Amaz. 2003;14(1):17-33.
64. Castro JC, Maddox JD, Rodríguez HN, Orbe RB, Grandez GE, Feldheim KA, et al. Metagenomic 16S rDNA amplicon data on bacterial diversity profiling and its predicted metabolic functions of varillales in Allpahuayo-Mishana National Reserve. Data Brief. 28 de abril de 2020;30:8.
65. Obi LU, Atagana HI, Adeleke RA. Isolation and characterization of crude oil sludge degrading bacteria. SpringerPlus. 9 de noviembre de 2016;5(1):1946.

66. González Meléndez RC, Elizalde Cuevas B, Cortés Cruz ME, Orduña Sánchez M. Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios superiores Zaragoza; 2020. 236 p.
67. Verma SK, Singh H, Sharma PC. An improved method suitable for isolation of high-quality metagenomic DNA from diverse soils. *3 Biotech*. 29 de junio de 2017;7(3):171.
68. Sáenz J s., Roldan F, Junca H, Arbeli Z. Effect of the extraction and purification of soil DNA and pooling of PCR amplification products on the description of bacterial and archaeal communities. *J Appl Microbiol*. 2019;126(5):1454-67.
69. Devi SG, Fathima AA, Radha S, Arunraj R, Curtis WR, Ramya M. A Rapid and Economical Method for Efficient DNA Extraction from Diverse Soils Suitable for Metagenomic Applications. *PLOS ONE*. 13 de julio de 2015;10(7):16.
70. Ahirwar S, Dehariya K. Isolation and characterization of hydrocarbon degrading microorganisms from petroleum oil contaminated soil sites. *Bull Environ Sci Res*. 13 de diciembre de 2013;2(4):5-10.
71. Liu Y, Li C, Huang L, He Y, Zhao T, Han B, et al. Combination of a crude oil-degrading bacterial consortium under the guidance of strain tolerance and a pilot-scale degradation test. *Chin J Chem Eng*. 1 de diciembre de 2017;25(12):1838-46.

72. Molina MC, González N, Bautista LF, Sanz R, Simarro R, Sánchez I, et al. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. *Biodegradation*. noviembre de 2009;20(6):789-800.
73. Truskewycz A, Gundry TD, Khudur LS, Kolobaric A, Taha M, Aburto-Medina A, et al. Petroleum Hydrocarbon Contamination in Terrestrial Ecosystems— Fate and Microbial Responses. *Molecules*. 19 de septiembre de 2019;24(18):3400.
74. Sei K, Sugimoto Y, Mori K, Maki H, Kohno T. Monitoring of alkane-degrading bacteria in a sea-water microcosm during crude oil degradation by polymerase chain reaction based on alkane-catabolic genes. *Environ Microbiol*. 2003;5(6):517-22.
75. Powell SM, Ferguson SH, Bowman JP, Snape I. Using Real-Time PCR to Assess Changes in the Hydrocarbon-Degrading Microbial Community in Antarctic Soil During Bioremediation. *Microb Ecol*. 1 de octubre de 2006;52(3):523-32.
76. Lozano-A. LC, Bautista MA, Dussan-G. J, Vives-Flórez MJ. DNA extraction from heavy oil contaminated microcosms and rpoB gene PCR amplification. *Actual Biológicas*. enero de 2008;30(88):7-14.
77. Fortin N, Beaumier D, Lee K, Greer CW. Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. *J Microbiol Methods*. 1 de febrero de 2004;56(2):181-91.

ANEXOS

Anexo 1. Permiso de colecta de las muestras de suelo en la RNAM.



RESOLUCION JEFATURAL DE LA RESERVA NACIONAL ALLPAHUAYO MISHANA N° 010-2020-SERNANP-JEF

Iquitos, 05 de octubre de 2020

VISTO:

El Informe N° 072-2020-SERNANP-RNAM-J de fecha 05 de octubre de 2020, que evalúa la solicitud presentada por la señora Marjorie Tatiana Del Aguila Ríos para realizar la investigación científica denominada: "Purificación de ADN metagenómico a partir de consorcios bacterianos biodegradadores de crudo de petróleo. Loreto - Perú", en el ámbito de la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana, por el periodo de un (01) año.

CONSIDERANDO:

Que, según lo previsto en los incisos g) e i) del artículo 2° de la Ley N° 26834, Ley de Áreas Naturales Protegidas, unos de sus principales objetivos de protección es servir de sustento y proporcionar medios y oportunidades para el desarrollo de la investigación científica;

Que, en concordancia con ello, en el artículo 29° de la precitada Ley, se establece que el Estado reconoce la importancia de las Áreas Naturales Protegidas para el desarrollo de la investigación científica básica y aplicada, siempre que no afecte los objetivos de conservación, se respete la zonificación y las condiciones establecidas en el Plan Maestro;

Que, la actualización del Plan Director de las Áreas Naturales Protegidas, aprobada por Decreto Supremo N° 016-2009-MINAM, refiere que la investigación científica constituye una herramienta básica para la generación de información que permita mejorar el conocimiento sobre la diversidad biológica, así como para el manejo de recursos naturales y la gestión de riesgos y amenazas;

Que, mediante Decreto Supremo N° 010-2015-MINAM, publicado el 23 de setiembre de 2015, se declara de interés nacional el desarrollo de investigaciones al interior de las Áreas Naturales Protegidas de administración nacional, determinándose su gratuidad, así como los procedimientos de aprobación automática y evaluación previa para su otorgamiento;

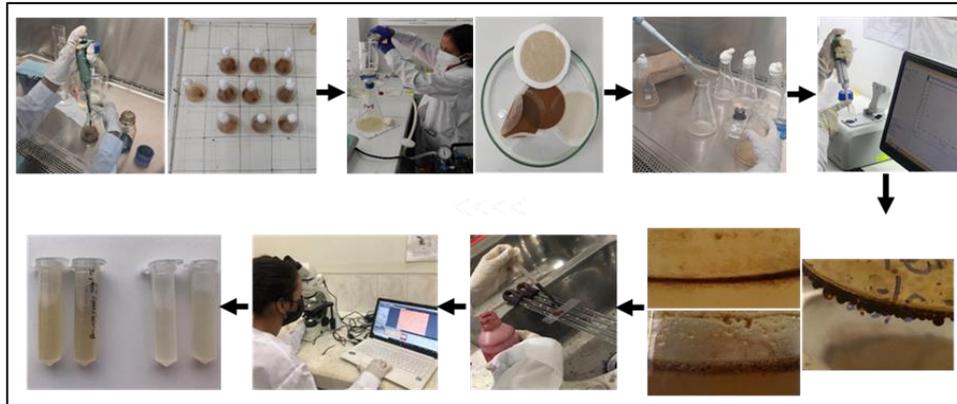
Que, en el artículo 4° del mencionado Decreto Supremo, se prevé cinco supuestos en los que la autorización de investigación requiere de evaluación previa: a) ingreso a ámbitos de acceso restringido, b) la colecta o extracción de muestras biológicas, c) se prevea la alteración del entorno o instalación de infraestructura en el caso de áreas naturales protegidas de administración nacional, d) el uso de equipo o infraestructura perteneciente a las ANP de administración nacional, e) investigación en predios privados;



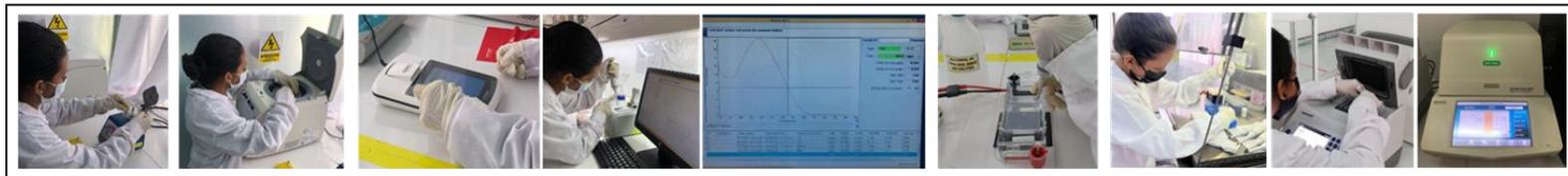
Anexo 2. Flujoograma de los procedimientos realizados.



Colecta de muestras de suelos y aguas



Obtención de consorcios bacterianos



Purificación de ADN metagenómico

Anexo 3. Densidades ópticas a 600 nm de los consorcios bacterianos de las muestras de suelos.

ETAPA	DIAS	CONTROL	TRATAMIENTO		
			1	2	3
Inicial (Aclimatación)	0	0,165	0,165	0,165	0,165
	2	0,216	0,364	0,441	0,376
	4	0,273	0,423	0,407	0,484
	6	0,238	0,478	0,497	0,542
	8	0,197	0,482	0,535	0,548
	10	0,161	0,550	0,511	0,582
Subcultivo 1	S	0,015	0,019	0,021	0,021
	12	0,008	0,177	0,275	0,226
	14	0,009	0,208	0,194	0,234
	16	0,004	0,210	0,230	0,257
	18	0,002	0,167	0,176	0,174
	20	0,010	0,145	0,100	0,158
Subcultivo 2	S	0,002	0,015	0,016	0,009
	22	0,001	0,080	0,068	0,105
	24	0,004	0,167	0,131	0,122
	26	0,008	0,141	0,100	0,140
	28	0,007	0,155	0,129	0,221
	30	0,011	0,235	0,171	0,151
Subcultivo 3	S	0,008	0,018	0,019	0,015
	32	0,011	0,174	0,156	0,190
	34	0,004	0,123	0,187	0,098
	36	0,003	0,381	0,315	0,293
	38	0,002	0,083	0,110	0,091
	40	0,006	0,128	0,191	0,117

S: medidas obtenidas al realizar el Subcultivo.

Anexo 4. Densidades ópticas a 600 nm de los consorcios bacterianos de las muestras de aguas.

ETAPA	DIAS	CONTROL	TRATAMIENTO		
			1	2	3
Inicial (Aclimatación)	0	0,004	0,004	0,004	0,004
	2	0,005	0,058	0,084	0,065
	4	0,002	0,087	0,093	0,096
	6	0,002	0,060	0,075	0,079
	8	0,004	0,106	0,102	0,123
	10	0,002	0,145	0,115	0,093
Subcultivo 1	S	0,002	0,001	0,004	0,005
	12	0,006	0,047	0,06	0,059
	14	0,006	0,055	0,082	0,087
	16	0,013	0,065	0,094	0,111
	18	0,008	0,098	0,079	0,115
	20	0,009	0,118	0,096	0,063
Subcultivo 2	S	0,008	0,021	0,009	0,008
	22	0,010	0,117	0,123	0,076
	24	0,008	0,148	0,127	0,094
	26	0,010	0,074	0,052	0,059
	28	0,007	0,162	0,181	0,215
	30	0,013	0,108	0,128	0,074
Subcultivo 3	S	0,009	0,012	0,013	0,021
	32	0,007	0,039	0,088	0,067
	34	0,008	0,095	0,120	0,098
	36	0,007	0,063	0,087	0,095
	38	0,005	0,069	0,098	0,098
	40	0,001	0,080	0,128	0,116

S: medidas obtenidas al realizar el Subcultivo.