

**OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR PARA
MICROORGANISMOS DE INTERÉS EN EL CEPARIO DEL LABORATORIO DE
BIOCORROSIÓN DE LA CORPORACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN DE LA
CORROSIÓN CIC**

DIANA CAROLINA GARZA ESTEBAN

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA- NORTE DE SANTANDER**

2018

**OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR PARA
MICROORGANISMOS DE INTERÉS EN EL CEPARIO DEL LABORATORIO DE
BIOCORROSIÓN DE LA CORPORACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN DE LA
CORROSIÓN CIC**

DIANA CAROLINA GARZA ESTEBAN

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
MICROBIÓLOGO**

TUTOR ACADÉMICO

JOSÉ FÉLIX ORTIZ LEMUS

EDINSON ANDRÉS PUENTES

DIRECTOR DEL PROYECTO

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA- NORTE DE SANTANDER**

2018

Tabla de contenido

	pág.
Introducción	8
1 Objetivos	10
2 Justificación.....	11
3 Marco legal.....	12
4 Marco referencial.....	13
4.1 Definición y conceptos relacionados a corrosión	13
4.1.1 El biofilm.....	15
4.1.2 Mecanismos de la CIM.....	16
4.2 Identificación de microorganismos generadores de corrosión	17
4.2.1 Técnicas moleculares.....	17
5 Metodología.....	20
5.1 Extracción de ADN forma rápida	20
5.2 Extracción de ADN genómico	20
5.3 Estandarización de los protocolos a trabajar	21
5.3.1 PCR Primers	21
5.3.2 Amplificación de genes marcadores definidos por medio de miniPCR.	22
5.3.3 Marcador de peso molecular trabajado	23
6 Cronograma de Actividades	24
7 Resultados y discusión.....	26
7.1 Implementación biología molecular	26
7.1.1 Comparación entre los dos protocolos usados para la extracción de ADN	26
7.1.2 Identificación de microorganismos por medio de marcadores filogenéticos universales	27
7.1.3 Uso de primers.....	28
7.1.4 Identificación BSR.....	29

7.1.5	Uso de gradiente PCR para determinar la temperatura de alineamiento óptima	32
8	Conclusiones.....	36
9	Recomendaciones.....	37
10	Bibliografía	38
11	Anexos	42
	Actividades desarrolladas en el laboratorio de biocorrosión de la CIC	42
	Pruebas de estabilidad a medios de cultivo BioCIC en viales	42
	Control calidad viales medios de cultivo producidos	43
	Verificación de dispensadores y micropipetas.....	44
	Control de ambientes	45
	Limpieza química de piezas metálicas para análisis microbiológico (biocupones).....	45
	Microscopia confocal de Biocupones y Cupones Laminares tipo espejo	47
	Procesamiento para análisis microbiológico de muestras líquidas y sólidas...	48
	Determinación de ferrobacterias por examinación en microscopio	49

Lista de Tablas

pág.

Tabla 1 *Oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de amplificación por PCR.....* 22

Tabla 2 *Ensayos Primers genes específicos para la identificación de BSR y condiciones evaluadas.....* 31

Tabla 3 *Temperaturas usadas para PCR en gradiente.....*33

Figura 1. Marcador de ADN de 100 pb, 0,5 µg..... 23

Figura 2. Ensayo protocolos de extracción de ADN. A, extracción de ADN forma rápida y B, protocolo con algunas modificaciones de Marmulla et al. Carriles 1-2-3-5-6 cargados con material genético. Carriles 4-7 conroles negativos. MP: Marcador de peso molecular..... 26

Figura 3. Ensayo protocolos de extracción de ADN. A, extracción de ADN forma rápida, B y C método Marmulla et al con algunas modificaciones. Carroñes 1-2-5-6-8-9 cargados con material genético. Carriles 3-4-7 controles negativos. MP: Marcador de peso molecular..... 27

Figura 4 A-B. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los fragmentos obtenidos por PCR usando primers universales. **A.** Alineamiento 52°C **B.** Alineamiento 56°C. Carriles: MP. Marcador de peso molecular D. *Desulfovibrio* spp. E. *Escherichia coli*. 28

Figura 5 Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los fragmentos obtenidos por PCR usando primers específicos para BSR. Alineamiento 47°C. Carriles: 1. Marcador de peso molecular, los carriles 2 al 5 corresponde a las PCR realizadas con DSR1F/DSR4R, los carriles 2 al 5 corresponde a la PCR realizada con 2. *Desulfovibrio* spp. 3. *Desulfovibrio* spp. 4. *Escherichia coli* 5. Control negativo, los carriles 6 al 9 corresponde a la PCR realizada con APS7#F/APS8#R 6. *Desulfovibrio* spp. 7. *Desulfovibrio* spp. 8. *Escherichia coli* 9. Control negativo.30

Figura 6 Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los fragmentos obtenidos por PCR usando primers DSR (DSR1F-DSR4R) específicos BSR. Alineamiento 56°C. Carriles: 1. Marcador de peso molecular. Los carriles 2 al 5 corresponden a las PCR realizadas con DSR1F/DSR4R 2. *Desulfovibrio* sp MgCl₂ 1.5mM. 3. *Desulfovibrio* spp. MgCl₂ 2 mM 4. *Desulfovibrio* spp MgCl₂ 3 mM 5. *Desulfovibrio* spp MgCl₂ 4.mM 32

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los fragmentos obtenidos por PCR gradiente usando primers DSR1F-DSR4R específicos para BSR. MP: Marcador de peso molecular, carriles del 1 al 11 corresponden a las temperaturas en los pocillos del gradiente que se presentan en la tabla 3. 34

Figura 8 Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los fragmentos obtenidos por PCR gradiente usando 16S_8F_MOD5/907R universales para bacterias. MP: Marcador de peso molecular, carriles del 1 al 12 corresponden a las temperaturas en los pocillos del gradiente que se presentan en la tabla 3. 34

Figura 9 Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los fragmentos obtenidos por PCR gradiente usando 340F/1000R universales para bacterias. MP: Marcador de peso molecular, carriles del 1 al 12 corresponden a las temperaturas en los pocillos del gradiente que se presentan en la tabla 3. 35

Introducción

La corrosión metálica es un fenómeno espontáneo común en materiales metálicos refinados. Esta se puede describir como una oxidación acelerada y continua que desgasta, deteriora y que incluso llega a afectar la integridad física de las estructuras. Entre sus implicaciones industriales importantes se encuentran: pérdida de producción por la degradación de los materiales, contaminación ambiental, reducción en la eficiencia y rentabilidad de las operaciones. La corrosión influenciada microbiológicamente (CIM) es un tipo de corrosión en donde por acción del metabolismo bacteriano se origina o aceleran el proceso de degradación de metales y aleaciones, es una preocupación importante para industrias que van desde la producción de petróleo y gas hasta la aviación. Muchos de estos daños a la integridad mecánica de estructuras de producción, transporte y almacenamiento de hidrocarburos resultan en pérdidas de fluido con consecuencias ambientales. Por esta razón, el monitoreo de poblaciones bacterianas potencialmente corrosivas, así como la búsqueda de alternativas de biorremediación tienen gran importancia en la industria de los hidrocarburos.

Desde hace varias décadas se emplean metodologías que permiten determinar el grado de criticidad microbiológica de sistemas susceptibles, tales como la cuantificación de bacterias asociadas a corrosión y la determinación de las velocidades de corrosión. A pesar de ser herramientas útiles para monitorear la integridad mecánica, las metodologías tradicionales de monitoreo presentan serias limitaciones tales como los largos tiempos requeridos para la obtención de resultados y que en su mayoría dependen del cultivo de los variados y muy exigentes grupos de microorganismos involucrados en el proceso de corrosión. A razón de ello, se ha visualizado la necesidad de implementar técnicas que permitan la detección de dichos microorganismos en menor tiempo, asegurando de esta forma la ejecución de medidas encaminadas a la mitigación de los daños y pérdidas ocasionados por corrosión.

Los métodos moleculares tienen una importante repercusión en el estudio de las comunidades microbianas. Las técnicas basadas en el análisis de los ácidos nucleicos son fundamentales a la hora de detectar, identificar y cuantificar microorganismos en muestras ambientales. Estas permiten detectar los microorganismos presentes en comunidades microbianas prescindiendo de la necesidad de cultivos, reduciendo así los tiempos y requerimientos para el tratamiento y procesamiento de las muestras. Algunos de dichos análisis se basan en la amplificación de los ácidos nucleicos los cuales permiten su detección e identificación. Uno de los genes marcadores moleculares más utilizados para la

identificación de microorganismos es el gen de ARN ribosómico 16S (16S ARNr) en el caso de procariotas y ARN ribosómico 18S (ARNr 18S) en el caso de eucariotas. En la actualidad existen bases de datos de ADN que contienen todas las secuencias de ADN conocidas. En el marco del presente trabajo se planteó estandarizar técnicas de biología molecular que permitan detectar e identificar molecularmente a dos grupos de bacterias aisladas de campos de producción petrolera, un primer grupo con potencial corrosivo de tipo sulfato reductor, y un segundo grupo conformado por bacterias que han mostrado actividad degradadora de hidrocarburos. Un aspecto relevante del cumplimiento del objetivo es que al final de este trabajo, la Corporación para la investigación de la corrosión (CIC) habrá iniciado la organización de un laboratorio de biología molecular que ampliará las capacidades técnicas de la institución.

1 Objetivos

General

- Estandarizar protocolos de extracción de ADN y PCR utilizando microorganismos del cepario del laboratorio de Biocorrosión en la Corporación para la Investigación de la Corrosión CIC.

Específicos

- Definir protocolo de extracción de AND usando cultivos de microorganismos del cepario del laboratorio de Biocorrosión en la Corporación para la Investigación de la Corrosión.
- Ajustar protocolos de PCR usando primers específicos de grupos de microorganismos de interés que hacen parte del cepario del laboratorio de Biocorrosión de la Corporación para la Investigación de la Corrosión.

2 Justificación

La Corporación para la Investigación de la Corrosión - CIC es un Centro de Desarrollo Tecnológico, enmarcado en la Ley de Ciencia, Tecnología e Innovación. Su portafolio de servicios es muy amplio e interdisciplinar, sin embargo, se encuentra relegado en algunos aspectos tales como el uso de tecnologías y técnicas de biología molecular. Razón por la cual se plantea la creación de un laboratorio encaminado a la incorporación del análisis molecular como estrategia que permitirá mejorar los procesos de cuantificación de bacterias asociadas a corrosión.

Con este proyecto se pretende estandarizar los protocolos de extracción de material genético y PCR que permitan caracterizar microorganismos con potencial corrosivo de tipo sulfato reductor y bacterias con actividad degradadora de hidrocarburos que hacen parte del cepario del laboratorio de Biocorrosión en la CIC, ofreciendo un análisis con mayor sensibilidad y la obtención de resultados en menor tiempo a la vez que se pretenden sentar bases para la formación a futuro de un laboratorio que permita ampliar la oferta de servicios prestados por la corporación.

3 Marco legal

NACE International The corrosion society

NACE Standard TM0194-94 Item no. 21224

Standard Test Method. Field Monitoring of Bacterial Growth in Oilfield Systems (Monitoreo de campo del crecimiento bacteriano en sistemas petroleros).

Este estándar describe métodos de prueba de campo que son útiles para estimar poblaciones bacterianas, incluidas poblaciones bacterianas sésiles, que se encuentran comúnmente en sistemas de campos petroleros. Los métodos de prueba descritos son aquellos que se pueden hacer en el sitio y que requieren un mínimo de equipo o suministros de laboratorio. Los métodos de prueba descritos no son los únicos métodos que pueden usarse, pero son métodos que han demostrado ser útiles en situaciones de yacimientos petrolíferos. Este estándar está destinado a ser utilizado por personal técnico y de campo, incluidos aquellos que no necesariamente tienen una capacitación extensa o específica en microbiología. Sin embargo, debido a que la microbiología es un campo especializado, se proporciona al usuario cierta información y explicación técnica pertinente y específica.

Finalmente, las implicaciones de los resultados obtenidos por estos métodos de prueba están más allá del alcance de esta norma. La interpretación de los resultados es específica del sitio y del sistema y puede requerir más experiencia de la que puede proporcionar esta norma.

Este estándar se basa libremente en un documento producido por la antigua Asociación de Ingeniería de Corrosión (CEA). CEA operó en el Reino Unido bajo los auspicios de la NACE y el Instituto de Corrosión (Icorr). Esta norma internacional de la NACE fue desarrollada por el Grupo de trabajo NACE T-1C-21 bajo la dirección del Comité de Unidad T-1C sobre Monitoreo de la corrosión en la producción de petróleo y se emite bajo los auspicios del Comité de grupo T-1 sobre Control de la corrosión en la producción de petróleo.

4 Marco referencial

La Corporación para la Investigación de la Corrosión - CIC es un Centro de Desarrollo Tecnológico, enmarcado en la Ley de Ciencia, Tecnología e Innovación, dedicado a la prestación de servicios especializados, ejecución de proyectos y programas y desarrollo de productos tecnológicos para la gestión de corrosión e integridad, con el fin de ofrecer al sector productivo soluciones que contribuyan al fortalecimiento tecnológico, económico y sostenible del país. Cuenta con un portafolio muy amplio de servicios dentro de los cuales se encuentran el laboratorio de biocorrosión, fisicoquímica, recubrimientos, protección catódica, y ofrece productos como medios de cultivo, entre otros. Esta posee una larga trayectoria ofreciendo soluciones a las problemáticas y necesidades de la industria energética dentro y fuera de Colombia, lo cual la ha consolidado como una institución de renombre. La investigación en las diferentes líneas tecnológicas ha sido un pilar clave para el éxito de esta, facilitando la generación de soluciones y el desarrollo de innovaciones promisorias.

4.1 Definición y conceptos relacionados a corrosión

La corrosión metálica es un proceso electroquímico que genera el deterioro de un material metálico a consecuencia de un ataque químico por su entorno. Siempre que la corrosión esté originada por una reacción química, su velocidad dependerá de la temperatura, salinidad del fluido y propiedades de los metales expuestos [Orozco R. et al, 2007]. La corrosión es el proceso de reacción de los metales con el medio ambiente para volver a su estado combinado, el cual es el termodinámicamente más estable que en su forma refinada [Anónimo, 2011]. Este fenómeno tiene implicaciones industriales muy importantes, pues la degradación de los materiales provoca interrupciones en actividades fabriles, pérdida de productos, contaminación ambiental, reducción en la eficiencia de los procesos, mantenimientos y sobrecostos. El costo de la corrosión de los metales es considerado a partir de dos puntos de vista: el costo para la economía de una nación y el costo de las medidas de control de corrosión. Se estima que los gastos atribuidos a los daños por corrosión representan entre el 3 y el 5 por ciento del producto interno bruto de los países industrializados. Se calcula que de cada diez toneladas de acero fabricadas por año se pierden dos y media por corrosión [H. H. Uhlig, 2011]. En un esfuerzo por minimizar estas pérdidas, permanentemente se desarrollan nuevos recubrimientos, se optimizan diseños, se crean nuevos

materiales, se sintetizan mejores inhibidores y se optimizan los sistemas de monitoreo [H. H. Uhlig, 2011].

La importancia de los microorganismos en la corrosión de materiales metálicos fue reportada por primera vez por von Volzogen Kuhr y van der Vlugt hace ya más de 70 años [H. H. Uhlig, 2011]. Hoy día, la corrosión influenciada microbiológicamente (CIM) es considerada una amenaza importante para productividad de la industria y se estima que representa el 20% del costo total anual de corrosión [Blackwood D.J, 2018]. Hoy en día el coste anual de la corrosión microbiológica en España es del 2,2% de su PIB. La utilización de técnicas adecuadas de protección frente a la corrosión supone un ahorro de hasta el 25% de este coste [Anónimo, 2011]. De 1999 a 2001, Estados Unidos tuvo un total anual de costos directos de aproximadamente 276 mil millones de dólares, algo así como 3.1% del PIB de ese país. De la misma manera, en Perú, de acuerdo con la empresa Teknoquímica, en el año 2000 las pérdidas por corrosión representaron 8% del PIB, es decir, aproximadamente 1,200 millones de dólares [Orozco R et al, 2007].

En los procesos CIM, diferentes grupos microorganismos participan directa o indirectamente en el deterioro de la integridad de estructuras metálicas mediante el favorecimiento de la formación física de celdas de corrosión y/o la generación de metabolitos altamente corrosivos para la matriz metálica. Una amplia gama de procesos microbianos puede causar corrosión. En general, la presencia de depósitos inorgánicos y las concentraciones diferenciales de oxígeno y cloruro son parámetros importantes que determinan el grado de corrosión. La presencia de una microflora y fauna en superficies de los materiales alteran el ambiente local, proporcionando condiciones para la disolución del metal [Cortés M et al, 2004] Los principales mecanismos de corrosión microbiológica incluyen: (i) la despolarización catódica; (ii) el ataque por sulfuros; (iii) la captación directa de electrones por parte de los microorganismos, incluso a través de mediadores redox; y (iv) el impacto de los microorganismos en la mineralogía de las películas de superficie. El ataque microbiano se evidencia mayoritariamente por la formación de puntos localizados de pérdida de material denominado picado [Blackwood D.J, 2018].

La amenaza por corrosión microbiológica se extiende a una amplia gama de industrias que incluyen yacimientos petrolíferos, industrias del papel, de energía nuclear, industrias alimentarias, entre otros [H. H. Uhlig 2011, Cortés M et al 2004].

Se ha asociado a una amplia gama de microorganismos con la CIM; entre ellos se cuentan bacterias anaerobias y aerobias, protozoos, algas, diatomeas y hongos. Los hongos son conocidos en la degradación de hormigón, piedra, vidrio y polímeros

utilizados con fines de protección contra corrosión [H. H. Uhlig 2011]. Por su parte las bacterias, especialmente las bacterias reductoras de sulfato (BSR), han recibido mayor atención al estar asociadas a mayores pérdidas económicas [Blackwood D.J, 2018]. Además de causar corrosión de manera directa, los microorganismos pueden metabolizar ciertos inhibidores de la corrosión [Blackwood D.J, 2018], así como los aceites lubricantes, lo que lleva a la corrosión por desgaste y fatiga.

El advenimiento de técnicas de biología molecular ha facilitado el análisis detallado de la composición y dinámica de diversas poblaciones microbianas, lo cual ha hecho evidente que el fenómeno de la CIM es más complejo de lo anticipado. Esto se debe en gran parte, a la variedad de microorganismos y a sus interacciones con el metal y con el ambiente. Entre los organismos más representativos se cuentan bacterias reductoras de nitrato (NRB), bacterias productoras de ácido (BPA), bacterias oxidantes del azufre (SOB), bacterias oxidantes del hierro (BOH), bacterias reductoras del hierro (BRH) y metanógenos [Blackwood D.J, 2018].

4.1.1 El biofilm

La CIM es causada en mayor medida por células establecidas en biopelículas adheridas a la superficie del metal (bacterias sésiles), y en menor medida por células planctónicas (bacterias en solución). Las principales fuerzas impulsoras para la formación de biopelículas son: acceso a fuentes de nutrientes, la formación de micronichos favorables, protección frente a condiciones ambientales nocivas y establecimiento de relaciones de cooperación con otras especies [Blackwood D.J, 2018]. Aunque una biopelícula puede consistir en una sola especie, la mayoría de las biopelículas naturales contienen consorcios de múltiples especies, cuyas acciones pueden combinarse para generar problemas de corrosión mucho más graves que las biopelículas de una sola especie [Blackwood D.J, 2018]. Por ejemplo, además de ser corrosivas por sí mismas, las bacterias productoras de ácido pueden producir productos metabólicos, como los acetatos, que actúan como una fuente de carbono para BSR que también puede acelerar significativamente la velocidad de corrosión [Blackwood D.J, 2018]. Incluso si los aerobios no son corrosivos en sí mismos, seguirán consumiendo oxígeno, lo que permitirá que se desarrolle un ambiente anaeróbico en la interfaz biofilm/metal donde las BSR u otros microorganismos anaeróbicos corrosivos pueden prosperar. Sin embargo, la situación se complica por el hecho de que en un consorcio los BSR corrosivos tienen que competir por los recursos con otros microorganismos anaeróbicos no corrosivos.

Típicamente, cuando un metal se sumerge en agua la unión de moléculas orgánicas e inorgánicas ocurre dentro de unas pocas horas y se forma un biofilm [Blackwood D.J, 2018]. Irregularidades en las superficies metálicas tales como juntas porosas de soldadura, grietas, límites de grano bordes rayados son sitios que presentan una mayor susceptibilidad a la colonización microbiana y por ende a eventos biocorrosivos. Una vez formadas las biopelículas, éstas alteran la fisicoquímica local, favoreciendo la formación de celdas de corrosión [Blackwood D.J, 2018].

Generalmente, las rutinas de monitoreo de corrosión microbiológica consisten en su mayoría de la toma y análisis del componente bacteriano plantónico, dada su la facilidad de recolección y análisis. En contraste, la toma de muestras de las paredes internas de una tubería, lugar en el cual se encuentran los microorganismos que comprenden la biopelícula y generan corrosión, comprende una logística más compleja.

4.1.2 Mecanismos de la CIM

Los mecanismos de la CIM en ambientes aeróbicos incluyen la acción directa de subproductos de reacciones metabólicas, como el caso de ácidos producidos por *Thiobacillus* el cual oxida compuestos de azufre produciendo ácido sulfúrico y el desarrollo de una forma de corrosión por fisuras que surge cuando las bacterias oxidantes convierten los iones ferrosos solubles en óxidos / hidróxidos férricos no solubles que forman tubérculos en la superficie de los metales [Blackwood D.J, 2018].].

En entornos anaeróbicos, se han propuesto una serie de mecanismos para explicar la CIM, la mayoría basados en BSR. El más importante de estos mecanismos se puede dividir en cuatro grupos según: (i) teoría de la despolarización catódica; (ii) ataque por sulfuros; (iii) la captación directa de electrones por parte de los microorganismos, incluso a través de mediadores redox; y (iv) el impacto de los microorganismos en la mineralogía de las películas de superficie [Blackwood D.J, 2018].

Teoría de la despolarización catódica: Consiste en una reducción de sulfato asistida por BSR en la que los átomos de hidrógeno adsorbidos se eliminan de la superficie [Blackwood D.J, 2018].

Ataque por sulfuros: Costello et al. y King y Miller, concluyeron que la despolarización observada se debe también en parte al sulfuro de hidrógeno disuelto producido por las bacterias, que causa el desarrollo de una capa conductora de sulfuro de hierro y se conoce como ataque por sulfuros [Blackwood D.J, 2018].

La captación directa de electrones: La seria consideración de la captación directa de electrones como un posible mecanismo de CIM surgió del trabajo de Dinh et al 2004. Estos autores demostraron que algunas cepas de BSR y metanógenos que no pueden utilizar el hidrógeno generado por la corrosión anaeróbica abiótica de los aceros como intermedios para la transferencia de electrones mostraron tasas de corrosión mucho más altas que sus contrapartes que utilizan hidrógeno. Se propuso así que estos microorganismos facilitaban la eliminación de electrones del hierro a través de un mecanismo que no involucraba al hidrógeno como reacción catódica [Blackwood D.J, 2018].

Impacto de los microorganismos en las películas de superficie: En la corrosión abiótica, es bien sabido que la naturaleza de la película que se forma en la superficie del metal tiene un fuerte impacto en las tasas de corrosión, causando tanto la corrosión acelerada como la pasiva. Si estas películas son protectoras o agresivas o no, depende de su mineralogía y esto puede ser alterado por lo que pueden parecer sólo cambios sutiles en el entorno local. Ya está bien establecido que BSR puede conducir a la formación de películas de sulfuro de hierro no protectoras y que estas películas pueden actuar como cátodos extendidos para acelerar el proceso de corrosión [Blackwood D.J, 2018].

4.2 Identificación de microorganismos generadores de corrosión

4.2.1 Técnicas moleculares

La introducción de métodos moleculares ha facilitado el estudio del comportamiento de las comunidades microbianas. Las técnicas moleculares permiten detectar, sin necesidad de cultivo, los microorganismos presentes en comunidades microbianas

puntuales [Amann, R.I., et al 1995, Muyzer G., et al 1998]. Ello ha revelado la existencia de una diversidad microbiana anteriormente insospechada, de manera que por ejemplo, en suelos, de los cuales se pensaba que estaban bien caracterizados, se ha evidenciado que contienen una diversidad microbiana mayor que la reportada previamente [Portillo M. 2007; Fuslong et al, 2002; Axelrood P.E et al, 2002; Bintrim S.C et al, 1997; Nogales B et al, 1999; Dunbar J et al, 1997; Kuske C.R et al, 1997; Felske A et al, 1998; Felske A et al, 2000; O'Donnell A.G et al, 1999].

A pesar de que existen distintos métodos moleculares disponibles, las técnicas basadas en el análisis de los ácidos nucleicos se presentan en la actualidad como las más prometedoras a la hora de detectar microorganismos en muestras naturales.

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica que permite obtener millones de copias de un fragmento específico de ADN, mediante el uso de una Taq polimerasa que sintetiza cadenas de ADN a partir de un molde existente con la adición de nucleótidos puntuales en condiciones específicas. Luego del proceso de amplificación, el fragmento de ADN puede ser objeto de un sin número de aplicaciones que incluyen la visualización de la diversidad microbiana mediante la obtención de perfiles de comunidades microbianas (o "fingerprints"), la identificación de los principales componentes microbianos de la comunidad estudiada, así como para protocolos de clonación, secuenciación, análisis de restricción [Portillo M. 2002].

Cada microorganismo posee secuencias de ácidos nucleicos únicas que pueden ser utilizadas para su detección e identificación. El gen más utilizado para la identificación de microorganismos es el gen de ARN ribosómico, un cronómetro molecular estable. De hecho, esta macromolécula presenta una serie de características, en base a las cuales fue considerado por Woese como cronómetro molecular definitivo:

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado.
3. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información de toda la escala evolutiva.
4. El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1.500 nt) minimiza las fluctuaciones estadísticas.

5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ADNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento [Rodicio M.R et al, 2004].

El uso de otros genes marcadores facilita el monitoreo y estudio filogenético de grupos bacterianos más discretos. Tal es el caso de los genes *apsA* y *dsrA* usados para la detección de bacterias sulfato reductoras. Estos genes participan en el metabolismo del sulfato, el principal aceptor de electrones para este amplio grupo de microorganismos [Wagner M et al, 2005].

5 Metodología

5.1 Extracción de ADN forma rápida

Con el fin de realizar análisis preliminares, se estableció un protocolo de preparación de un extracto crudo de ADN. Para ello se centrifugaron 1.5ml de un cultivo microbiano en fase exponencial-tardía de crecimiento a 12000 rpm durante diez minutos. El sobrenadante fue descartado cuidadosamente asegurando la conservación del pellet. A éste se adicionaron 100 μ L de agua tipo I y se homogenizó cuidadosamente. La suspensión fue calentada a 95°C durante diez minutos, luego de lo cual se centrifugó a 12000 rpm durante diez minutos. El sobrenadante fue utilizado inmediatamente como template para PCR.

5.2 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN se llevó a cabo según Marmulla et al. [Marmulla et al, 2016], con algunas modificaciones. Brevemente, a partir de un cultivo microbiano en fase exponencial de crecimiento se centrifugaron 2 ml a 12000rpm durante diez minutos descartando el sobrenadante y conservando el pellet. Este fue resuspendido en 150 μ L de buffer de suspensión (Tris-Cl 50Mm, 10Mm EDTA, pH 8, 50 unidades RNasaA). A continuación, se adicionaron 150 μ L de buffer de lisis (200mM NaOH, 1% w/v SDS), se mezcló vigorosamente y se incubó a 96°C durante 20 minutos. Posteriormente, se añadieron 225 μ L de buffer neutralizante (3M Acetato de sodio, pH 5.5), mezclando por inversión y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se añadió un volumen de etanol absoluto frío, incubando a -20°C por 20 minutos, posterior se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos. Una vez descartado el sobrenadante se realizó el lavado del pellet de DNA con etanol 70% (v/v) frío, centrifugando a máxima velocidad durante 10 minutos y cuidadosamente se retiró el sobrenadante. El pellet fue disuelto en 40 μ L de buffer TE y conservado a -20°C hasta su uso.

5.3 Estandarización de los protocolos a trabajar

5.3.1 PCR Primers

Los primers usados en este estudio se encuentran listados en la Tabla 1 y fueron sintetizados por Biomers.net GmbH [Söflinger, Germany]. Las soluciones stock y de trabajo de cada primer (100 y 10 pmol/μL, respectivamente) fueron preparadas con H₂O PCR. Las temperaturas de alineamiento teóricas se calcularon tomando en cuenta el número de purinas y pirimidinas de cada primer usando la siguiente fórmula:

$$\textit{Annealing temperature} = (4 (G + C) + 2 (A + T)) - 5$$

G: guanina; C: citosina; A: adenina; T: timina.

Se realizaron ensayos probando las temperaturas de alineamiento para los primers usando como temperatura $\pm 5^{\circ}\text{C}$ de los valores teóricos, buscando determinar la temperatura la óptima.

La amplificación de material genético se realizó en un termociclador mini8 (miniPCR, Boston, MA). La portabilidad, robustez y bajo precio de este equipo lo perfilan como una herramienta fácilmente usable en campo [Kwon et al., 2016].

Tabla 3 Oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de amplificación por PCR.

Primer	Secuencia (5'-3')	Temperatura alineamiento °C	Referencia	
Gen sulfato reductasa disimilatoria (<i>dsrA</i>)				
DSR1F	ACCCACTGGAAGCACG	47	Wagner. M et al. 2005	
DSR4R	GTGTAGCAGTTACCGCA	47		
Gen Adenosina-5'-fosfosulfato reductasa (<i>apsA</i>)				
APS7#F	GGGTCTGTCCGCTATCAAT	53		
APS8#R	GCACATGTCTGAGGAAGTCTTC	59		
16SRNA				
16S_8F_	AGACTTTGATTATGGCTCAG	51		
MOD5				
907R	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	51		
340F	CCCTAYGGGGYGCASCAG	57	(Gantner et al. 2011)	
1000R	GGCCATG NCACYWCYTCTC	51		

5.3.2 Amplificación de genes marcadores definidos por medio de miniPCR.

Las mezclas de amplificación de PCR contenían 5 µl de ADN total, 3 µL EZ PCR Master Mix, 5X Load Ready, 0.5 µL cada primer (10pmol), y ajustada a un volumen total de 15 µL. La PCR se llevó a cabo en un termociclador mini8 (miniPCR, Boston, MA) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 ° C durante 300 segundos; 30 ciclos de desnaturalización (30 segundos a 94 ° C), alineamiento (30 segundos a la temperatura de alineamiento de cada primer ensayado) y extensión (150 segundos a 72 ° C); seguido de una extensión final a 72 ° C. Los amplicones se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (p / v) en 1 x tampón TBE y usando como colorante Gelgreen (2 µL por 20 µL de buffer TBE usado en la preparación del gel).

5.3.3 Marcador de peso molecular trabajado

El marcador que se usó en los diferentes ensayos correspondía a: Marcador de ADN de 100 pb, listo para usar.

El marcador de ADN miniPCR™ de 100 pb contiene 12 fragmentos de ADN discretos que van desde los 100 pb hasta los 3,000 pb.

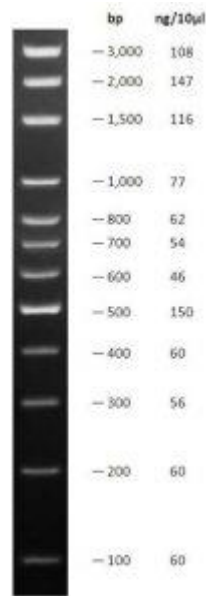


Figura 1. Marcador de ADN de 100 pb, 0.5 µg

6 Cronograma de Actividades

PROYECTO

Semana	Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre				Enero			
Actividad	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Revisión bibliográfica	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Adecuación de las instalaciones donde se realizara el trabajo y organización de equipos	■	■	■	■	■	■	■	■												
Charla de introducción al tema, descripción de los objetivos, metodología, resultados esperados y cronograma			■	■																
Recepción del material biológico y posterior rotulación	■	■	■	■	■	■														
Puesta en marcha la estandarización de protocolos para la extracción de DNA		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
Amplificación por medio PCR y posterior visualización usando electroforesis						■	■	■	■	■	■	■	■	■	■					
Charla de resultados parciales											■	■								
Presentación de resultados universidad													■	■						

Informe final de resultados aprobado luego de revisiones internas.																			
Entrega de bitácora de laboratorio y archivos digitales completos y organizados en las rutas del servidor designadas.																			
Revisión manuales internos para el trabajo en el laboratorio de biocorrosión		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

7 Resultados y discusión

7.1 Implementación biología molecular

7.1.1 Comparación entre los dos protocolos usados para la extracción de ADN

Se presentan resultados de diferentes ensayos realizados en los cuales se evaluó la calidad del producto obtenido por los dos métodos de extracción usando cultivos de *Desulfovibrio* spp, para este análisis se discrimino el par de primers usados, el objetivo fue determinar con cuál de los dos se obtenían bandas bien definidas y ausencia de inespecíficas.

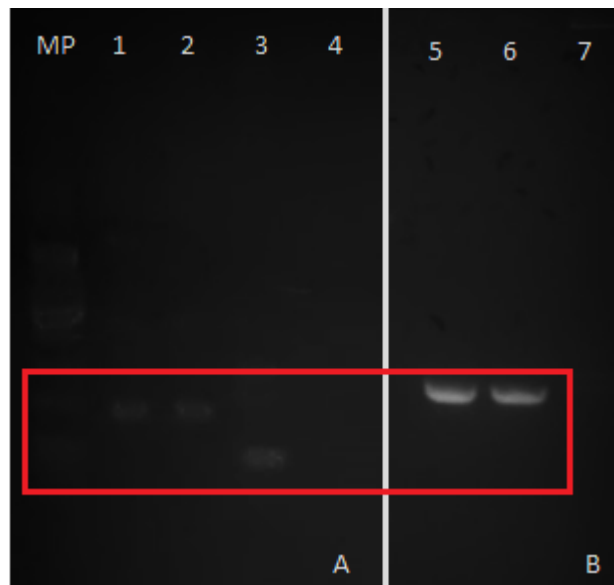


Figura 2. Ensayo protocolos de extracción de ADN. A, extracción de ADN forma rápida y B, protocolo con algunas modificaciones de Marmulla et al. Carriles 1-2-3-5-6 cargados con material genético. Carriles 4-7 conroles negativos. MP: Marcador de peso molecular.

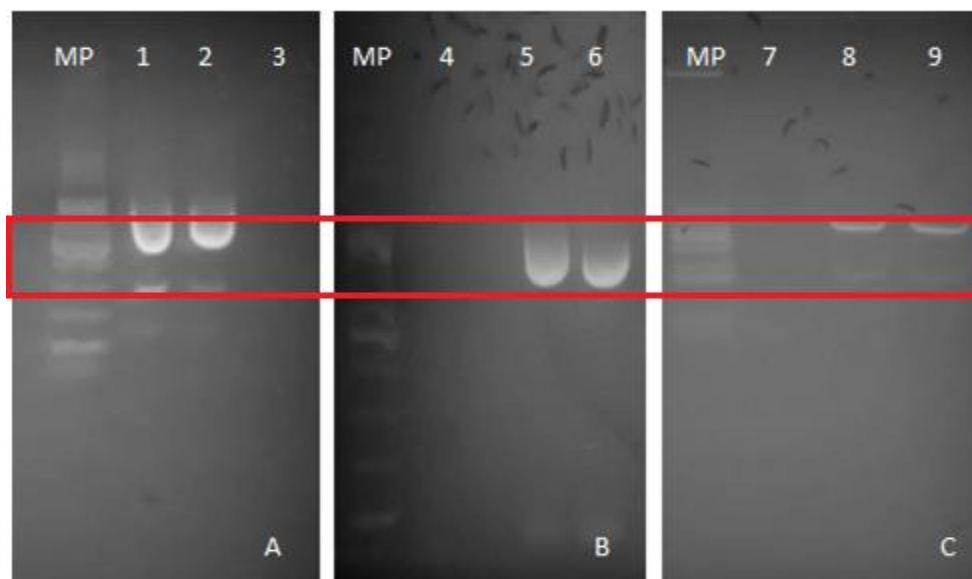


Figura 3. Ensayo protocolos de extracción de ADN. A, extracción de ADN forma rápida, B y C método Marmulla et al con algunas modificaciones. Carroñes 1-2-5-6-8-9 cargados con material genético. Carriles 3-4-7 controles negativos. MP: Marcador de peso molecular.

En las figuras 2 y 3, se presentan los resultados obtenidos en diferentes ensayos de PCR usando primers universales y específicos para BSR comparando los dos métodos de extracción de ADN. Se evidencia la obtención de bandas específicas que corresponden a las esperadas en los dos geles (Figura 2, B. Figura 3, B y C) lo que permite indicar que los dos protocolos funcionan de forma adecuada, sin embargo, los demás ensayos se realizaron usando el segundo protocolo ya que este asegura la obtención de resultados más fiables producto de la calidad del material extraído.

7.1.2 Identificación de microorganismos por medio de marcadores filogenéticos universales

Los primers universales de 16S usados fueron el par 16S_8F_MOD5 y 907R específico para bacterias para el cual se esperaba obtener bandas con 939 pb aproximadamente en tamaño, en el caso de los primers 340F y 1000R específico para arqueas el tamaño en la banda esperada se encuentra aproximado a las 660 pb. Debido a que la molécula de rRNA 16S contiene regiones altamente variables,

es usualmente posible el encontrar regiones de 20 a 30 bases que son completamente exclusivas de una sola especie de bacterias.

7.1.3 Uso de primers

Se trabajó con el par de primers 16S_8F_MOD5 y 907R, usando material genético obtenido a partir de cultivos de *Desulfovibrio* spp y de *Escherichia coli*. El fragmento del gen amplificado contiene regiones hipervariables incluyendo V2 hasta V7 [G.C. Baker et al. 2003], permitiendo la obtención de fragmentos de tamaños que abarcan 220 pb hasta 1200 pb. En este caso el tamaño de la banda producto se debe encontrar en una longitud próxima a las 930 pb.

Se usó una temperatura inicial de alineamiento de 52°C luego de realizar el cálculo teórico de acuerdo con la composición de cada uno (purinas y pirimidinas) y correspondientes correcciones, obteniendo como resultado bandas de ADN de aproximadamente 900 pb para *E. coli*, el tamaño esperado (Fig. 4A). Se efectuó un segundo ensayo usando una temperatura de alineamiento de 56°C, en esta se obtuvieron bandas de ADN de aproximadamente 900 pb para *Desulfovibrio* spp y de *Escherichia coli* (Fig. 4B). Sin embargo, se presentaron bandas inespecíficas que pueden deberse a la formación de dímeros de los primers, así como la temperatura de alineamiento.

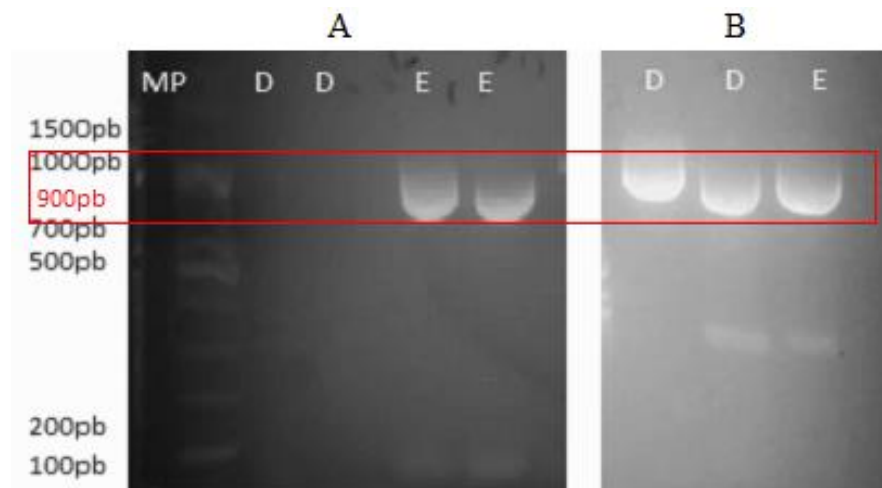


Figura 4 A-B. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los fragmentos obtenidos por PCR usando primers universales. **A.** Alineamiento 52°C **B.** Alineamiento 56°C. Carriles: MP. Marcador de peso molecular D. *Desulfovibrio* spp. E. *Escherichia coli*.

7.1.4 Identificación BSR

El estudio de la diversidad de las bacterias sulfato reductoras (BSR) tiende a ser un poco complejo debido a que se encuentran en muchos filos procarióticos y con frecuencia están estrechamente relacionadas con los no BSR, los análisis basados en el gen 16S rRNA son inadecuados para la identificación de nuevos linajes de manera independiente del cultivo. Wagner M et al, 2005 propuso una alternativa por medio del uso de genes marcadores funcionales para la identificación de procariotas sulfato reductoras. Lo anterior se realiza por medio del análisis que compara secuencias de fragmentos de genes recuperados ambientalmente de (bi) sulfito reductasa desimilatoria (*dsrAB*) y adenosina-5-fosfosulfato reductasa (*apsA*), que codifican enzimas claves en el metabolismo energético de las BSR.

Se trabajó con los pares de primers DSR1F/DSR4R esperando un amplicon de tamaño próximo a 2096 pb y APS7#F/APS8#R con un amplicon de longitud 940 pb, específicos para la identificación de bacterias sulfato reductoras ya que participan directamente en el ciclo del azufre. Las bacterias sulfato reductoras son un grupo fisiológico que incluye organismos de filogenias muy variadas. Entre estas se cuentan BSR mesófilos Gram-negativos (*Desulfobulbus* spp. *Desulfovibrio* spp. etc.), BSR formadoras de esporas Gram-positivas (*Desulfotomaculum* spp.), BSR termofilicas (*Thermodesulfobacterium* spp.) etc [Castro H.F, 2000]. A pesar de su diversidad, este grupo bacteriano conserva genes claves para el metabolismo del azufre y que, en consecuencia, son utilizados como marcadores filogenéticos. Para el presente trabajo, se seleccionaron cebadores dirigidos a la amplificación de los genes *apsA* y *dsrA*, cuyos productos génicos son requeridos para la reducción de sulfato y sulfito, respectivamente.

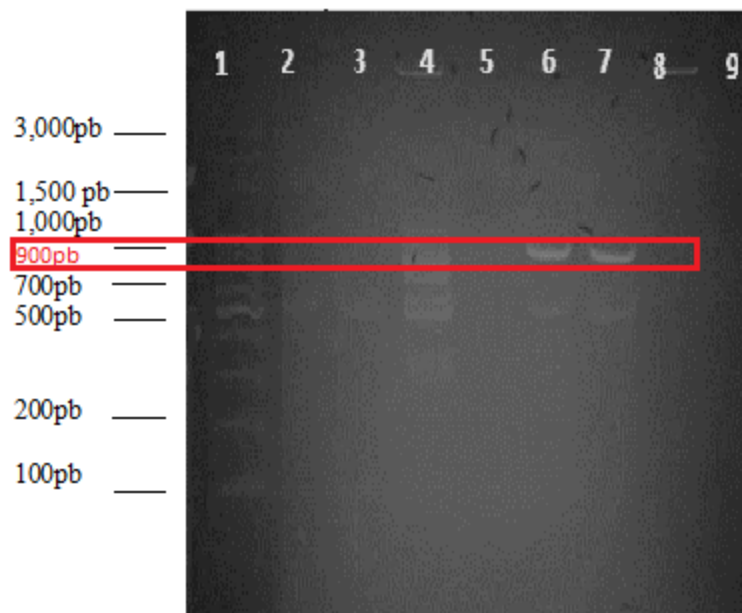


Figura 5 Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los fragmentos obtenidos por PCR usando primers específicos para BSR. Alineamiento 47°C. Carriles: 1. Marcador de peso molecular, los carriles 2 al 5 corresponde a las PCR realizadas con DSR1F/DSR4R, los carriles 2 al 5 corresponde a la PCR realizada con 2. *Desulfovibrio* spp. 3. *Desulfovibrio* spp. 4. *Escherichia coli* 5. Control negativo, los carriles 6 al 9 corresponde a la PCR realizada con APS7#F/APS8#R 6. *Desulfovibrio* spp. 7. *Desulfovibrio* spp. 8. *Escherichia coli* 9. Control negativo.

Las bacterias sulfato reductoras (BSR), han recibido la mayor atención porque son económicamente las más destructivas. Estas poseen genes específicos que codifican enzimas claves de su metabolismo energético. Se realizaron ensayos usando material genético obtenido de *Desulfovibrio* spp. para evaluar la especificidad de estos primers para grupo bacteriano, *Escherichia coli* fue utilizada como control negativo pues esta no posee genes para el metabolismo disimilatorio de azufre inorgánico. Las temperaturas de alineamiento ensayadas (Tabla 2.) para los pares de primers fueron determinadas de acuerdo con la fórmula empírica que permite la inferencia de la temperatura óptima de acuerdo con la característica de cada uno. El ensayo a temperatura de 47°C permitió evidenciar bandas luego de la corrida electroforética para APS7#F-APS8#R como se evidencia en la figura 5. (Carril 6 y 7) tamaño próximo a las 940 pb. Por lo cual, es viable afirmar que las condiciones que trabajaron son adecuadas para el par 2 de primers característicos de las BSR. Se evaluaron estos dos primers con el objeto de estandarizar la metodología y en futuros procesos se facilite su uso en paralelo ya que son clave para la identificación de los microorganismos puntuales de interés. Los dímeros de primers se observan mucho más abajo en el gel (menos de 100 bp). En este caso

se obtuvieron amplicones inespecíficos que sugieren el montaje de una PCR en gradiente.

De acuerdo con los resultados en la PCR anterior se decidió hacer unos ensayos modificando la concentración MgCl₂, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 4 Ensayos Primers genes específicos para la identificación de BSR y condiciones evaluadas.

Nombre del Oligo	Temperatura de alineamiento						
	47°C	48°C	52°C	56°C			
				MgCl ₂ 1.5mM	MgCl ₂ 2 mM	MgCl ₂ 3mM	MgCl ₂ 4mM
Par 1 DSR1F DSR4R	--*	--*	--*	--*	--*	--*	--*
Par 2 APS7#F APS8#R	✓	✓	✓	N.A.**	N.A.**	N.A.**	N.A.**

*--: amplicón no detectado

**N.A.: No aplica.

Como resultado de dichos ensayos se observó que con excepción de algunas bandas inespecíficas (Figura 6), la banda correspondiente al gen *dsrA* de alrededor de 2000 bp no fue detectada en ninguna de las condiciones evaluadas, por lo que se decidió realizar una evaluación sistemática de temperaturas de alineamiento en un ensayo de PCR en gradiente.

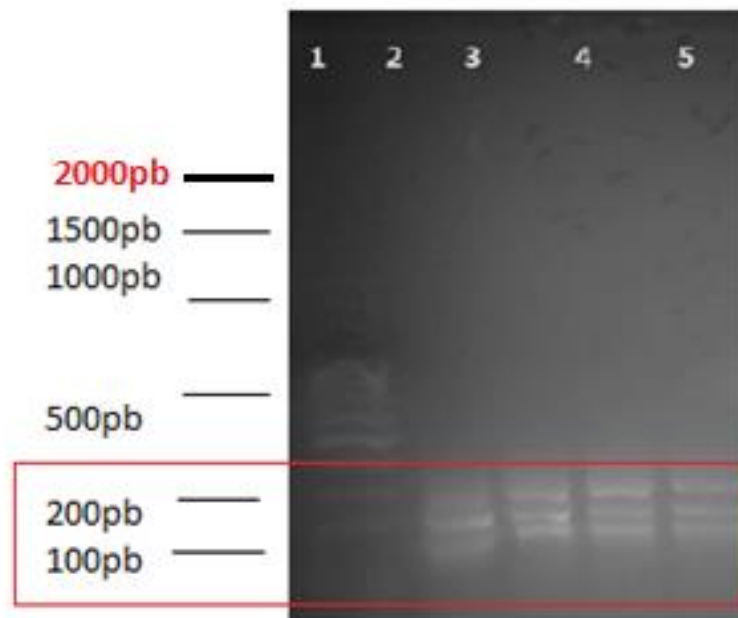


Figura 6 Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los fragmentos obtenidos por PCR usando primers DSR (DSR1F-DSR4R) específicos BSR. Alineamiento 56°C. Carriles: 1. Marcador de peso molecular. Los carriles 2 al 5 corresponden a las PCR realizadas con DSR1F/DSR4R 2. *Desulfovibrio* spp MgCl₂ 1.5mM. 3. *Desulfovibrio* spp. MgCl₂ 2 mM 4. *Desulfovibrio* spp MgCl₂ 3 mM 5. *Desulfovibrio* spp MgCl₂ 4.mM.

7.1.5 Uso de gradiente PCR para determinar la temperatura de alineamiento óptima

Ante el hecho de que los resultados obtenidos con el equipo mini8PCR no fueron satisfactorios para algunos pares de primers al usar las temperaturas de alineamiento calculadas, se realizó una PCR en gradiente (BIO-RAD, California) para determinar la temperatura óptima de alineamiento de 3 pares de primers puntuales. Se usó un gradiente ya que este permite evaluar un rango considerable de temperaturas, en este caso tomando como mínima 43°C y máxima 60°C de acuerdo con las temperaturas calculadas para los primers de interés (tabla 3), el material genético usado fue extraído de un cultivo de *Desulfovibrio* spp.

Tabla 3 *Temperaturas usadas para PCR en gradiente*

POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TEMPERATURA °C	43.0	43.5	44.5	45.8	47.7	50.2	53.0	55.4	57.3	58.7	59.6	60.0

Los primers ensayados y la longitud en los fragmentos esperados correspondieron a: 1. DSR1F/DSR4R, longitud 2096pb; 2. 16S_8F_MOD5/907R, 939pb y 3. 340F/1000R, longitud 660pb. Estas longitudes fueron calculadas por medio de un blast para primers realizado en la página <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> y comparado con el test para primers en <https://www.arb-silva.de/search/testprime/>. Adicionalmente que se consultó literatura científica como es el caso del par 1 el cual también fue trabajado por AL Müller et al (2015) en su estudio analizó la diversidad de tipo dsrAB sulfito reductasas en bacterias aisladas de diferentes ambientes, obteniendo bandas de tamaño superiores a las 2000 pb.

En la figura 7 se presenta el resultado obtenido del gradiente para el par de primers DSR1F/DSR4R. Las bandas que se observan alrededor de 200 pb no corresponden a las de interés, al ser de tamaño muy inferior al esperado (2000 pb). Notablemente, la aparición de dichas bandas ocurrió a temperaturas inferiores a 55°C, probablemente como resultado de la hibridación de los primers en regiones inespecíficas del genoma, lo cual es común cuando se aplican bajas temperaturas de alineamiento. En consecuencia, se debe ensayar nuevamente con estos primers y/o evaluar la síntesis de nuevos primers con el objeto de descartar errores de diseño y síntesis de estos. Una alternativa adicional sería realizar una PCR anidada como la desarrollada por Giloteaux L .et al (2010) para la detección de bacterias sulfato reductoras presentes en ambientes con baja biomasa y probar con los primers presentados en el mismo documento los cuales mostraron muy buenos resultados.



Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los fragmentos obtenidos por PCR gradiente usando primers DSR1F-DSR4R específicos para BSR. MP: Marcador de peso molecular, carriles del 1 al 11 corresponden a las temperaturas en los pocillos del gradiente que se presentan en la tabla 3.

En la figura 8, se presenta el resultado obtenido en el gradiente para el par de primers 16S_8F_MOD5/907R, en donde las bandas que se observan coinciden con los tamaños esperados (935 pb). A temperaturas entre 43-50°C se observa mayor claridad e intensidad de la banda de ADN, siendo entre 47.7 y 50.2°C (pocillo 5 y 6), las temperaturas más altas en las que se observa amplificación adecuada y por tanto las óptimas para evitar, además, la hibridación inespecífica de los primers. Estos resultados confirman lo obtenido en ensayos previos (Figura 1 A-B).

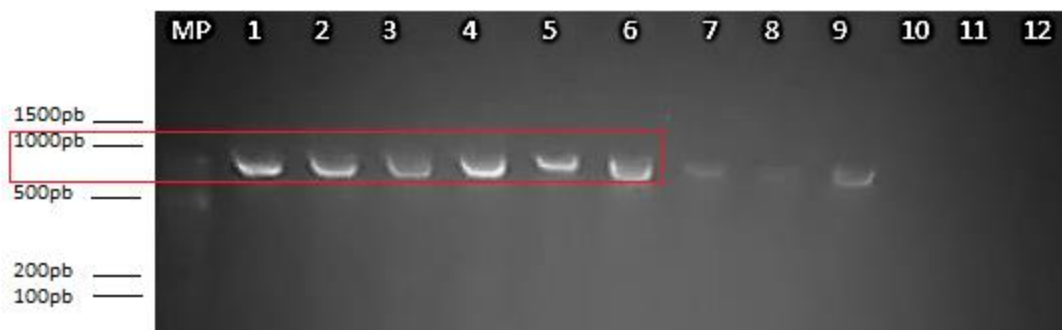


Figura 8 Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los fragmentos obtenidos por PCR gradiente usando 16S_8F_MOD5/907R universales para bacterias. MP: Marcador de peso molecular, carriles del 1 al 12 corresponden a las temperaturas en los pocillos del gradiente que se presentan en la tabla 3.

En la figura 9, se presenta el resultado obtenido en el gradiente para el par de primers 340F/1000R para la amplificación de otra región del gen 16S rRNA que facilita además la detección de Archaea. Allí se observó la formación de bandas primarias de alrededor de 660 pb, las cuales corresponden al tamaño esperado del amplicón; sin embargo, se observaron de manera concomitante bandas de tipo *smear* de alrededor de 150 bp. Para reducir la formación de estas bandas se puede incrementar la especificidad de la reacción mediante la reducción de la cantidad de ciclos, la reducción en la concentración de los primers o la adición de sustancias como formamida o DMSO. En un estudio realizado por S. Gantner et al. (2011) usando el mismo par de primers para el análisis de arqueas presentes en muestras ambientales indicaban que el tamaño del amplicón a esperar correspondía a 660pb a una temperatura de alineamiento de 50°C concluyendo que dichos primers presentan una alta especificidad para arqueas. Además, sugieren usar albumina de suero bovino para obtener un producto de amplificación claro.

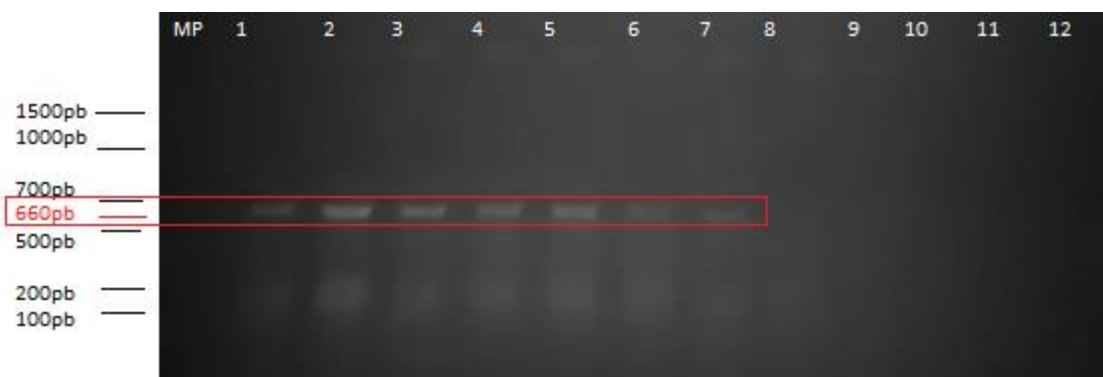


Figura 9 Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los fragmentos obtenidos por PCR gradiente usando 340F/1000R universales para bacterias. MP: Marcador de peso molecular, carriles del 1 al 12 corresponden a las temperaturas en los pocillos del gradiente que se presentan en la tabla 3.

Los resultados anteriores corresponden a los obtenidos hasta la fecha, sin embargo, se continúa realizando ensayos para lograr la estandarización de los primers de mayor interés que corresponden a DSR1F/DSR4R y APS7#F/APS8#R, los cuales son específicos para la identificación de las bacterias sulfato reductoras que corresponden al grupo de mayor importancia en los procesos de corrosión influenciada microbiológicamente sin omitir la influencia de los otros microorganismos.

8 Conclusiones

Los ensayos realizados evaluando los dos métodos de extracción de ADN mostraron resultados similares, lo que permite indicar que aunque con el primer protocolo no se logra un material de buena calidad el que se obtiene funciona de manera óptima en protocolos posteriores, sin embargo, para la obtención de resultados adecuados se debe trabajar con el segundo método ya que por medio de este se logra material de mejor calidad, químicamente limpio y, según la literatura, de un alto peso molecular (no fragmentado).

Los resultados obtenidos en las PCRs realizadas usando los primers específicos para la identificación de las bacterias sulfato reductoras (BSR) mostraron la eficiencia del par de primers APS7#F/APS8#R logrando obtener la banda del tamaño esperado (aprox. 930 pb) y en temperaturas que oscilaron entre los 47 °C y 56°C. Sin embargo, en el caso del par de primers DSR1F/DSR4R en ninguno de los ensayos en los que se variaron las condiciones se logró obtener el tamaño de banda esperado. Referente a los primers universales, los resultados que se obtuvieron correspondieron a los esperados lo que indica que las condiciones trabajadas fueron las óptimas.

9 Recomendaciones

Se recomienda continuar con el proceso de estandarización de los protocolos de extracción y PCR usando los primers específicos para lograr la obtención de resultados óptimos en las bacterias de interés.

Una vez se logre la estandarización de los protocolos con los microorganismos modelo, se debe continuar con la caracterización del cepario del laboratorio de biocorrosión y es de vital importancia realizar ensayos en muestras tomadas directamente de estructuras afectadas, de esta forma se evalúa la especificidad de los mismos en los microorganismos de interés.

Se recomienda adecuar áreas específicas para biología molecular para tener control de las variables ambientales que puedan afectar la calidad (reproducibilidad, repetitividad, etc.) de los resultados.

Finalmente, se sugiere continuar con el plan para promover la introducción de las técnicas de biología molecular al laboratorio de Biocorrosión favoreciendo la ampliación del portafolio de servicios de la Corporación para la Investigación de la Corrosión (CIC).

10 Bibliografía

AL Müller et al. (2015). Diversity of DsrAB-type sulfite reductases. *International Society for Microbial Ecology*. 1751-7362/15.

Anónimo. (2011). *Fundamentos de la corrosión metálica*. Asociación técnica española de galvanización ATEG.

Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews* 59: 143-169.

Axelrod, P. E., Chow, M. L., Radomski, C. C., McDermott, J. M., Davies, J. (2002) Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance. *Canadian Journal Microbiology* 48: 655–674.

Blackwood Daniel J. (2018). *An Electrochemist Perspective of Microbiologically Influenced Corrosion*. Department of Materials Science & Engineering, National University of Singapore, Singapore 117579.

Bintrim, S.C., Donohue, T.J., Handelsman, J., Roberst, G. P., Goodman, R.M. (1997) *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 277-282

Castro, H.F. (2000). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *MiniReview. FEMS Microbiology ecology* 31. 1-9R.

Cortés M, María Teresa. Ortiz H, Pablo. (2004). *Corrosión. Hipótesis / apuntes científicos uniandinos No. 4*.

Dinh, HT; Kuever, J; Mußmann, M; Hassel, AW; Stratmann, M; Widdel, F. (2004). La corrosión del hierro por nuevos microorganismos anaeróbicos. *Nature*. 427-829-832.

Dunbar, J., White, S., Forney, L. (1997). Genetic diversity through the looking glass: effect of enrichment basis. *Applied and Environmental Microbiology* 63:1326-1331.

Felske, A., Akkermans, A. D. L (1998) Prominent occurrence of ribosomes from an uncultured bacterium of the Verrucomicrobiales cluster in grassland soils. *Letters in Applied Microbiology*. 26: 219–223.

Felske, A., de Vos, W. M., Akkermans, A. D. L., (2000) Spatial distribution of 16S rRNA levels from uncultured acidobacteria in soil. *Letters in Applied Microbiology* 31: 118–122.

Felske, A., Wolterink, A., van Lis, R., de Vos, W.M., Akkermans, A. D. L. (1999) Searching for the predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiology Ecology* 30: 137–145.

Furlong, M.A., Singleton, D.R., Coleman, D.C., Whitman, W.B. (2002) Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1265-1279.

G.C. Baker, J.J. Smith, D.A. Cowan. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55-541– 555.

Giloteaux L.et al. (2010). Nested PCR and New Primers for Analysis of Sulfate-Reducing Bacteria in Low-Cell-Biomass Environments. *Equipe Environnement et Microbiologie, UMR IPREM5254, Universite´ de Pau et des Pays de l’Adour, BP 1155, 64013 Pau Cedex, France. American Society for Microbiolog. Vol. 76, No. 9.*

H. H. Uhlig. (2011). *Uhlig’s Corrosion Handbook* 3da ed. (ed. R. W. Revie) .J. KRUGER.

Kuske, C.R., S. M. Barns, S.M., Busch, J.D. (1997) Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3614-3621

Kwon et al. (2016). Performance of miniPCRTM mini8, a portable thermal cycler.

Marmulla et al. (2016). Genomic DNA extraction modified after Marmulla et al. *BMC Microbiology*. 16:57.

Muyzer, G., Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.

NACE International the corrosion society. (1994). Standard TM0194-94. Item no. 21224. Standard Test Method. Field monitoring of bacterial growth in oilfield systems.

Nogales, B., Moore, E.R.B., Abraham, W.R., Timmis, K.N. (1999) Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl-polluted moorland soil. *Environmental Microbiology* 1: 199–212.

O'Donnell, A.G. Gorres, H.E. (1999). 16S rRNA methods in soil microbiology. *Current Opinions in Biotechnology* 10: 225-229.

Orozco-Cruz, R. et al. (2007). Corrosión: fenómeno natural, visible y catastrófico. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad de Veracruzana*. Volumen XX. Número 2.

Portillo G. María del Carmen. (2007). Aplicación de técnicas moleculares basadas en ADN y ARN al estudio de la diversidad microbiana en la cueva de Altamira (Cantabria, España). Universidad de Sevilla.

Rodicio M. R y Mendoza M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr16S: fundamento, metodología y aplicaciones en

microbiología clínica. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. España.

S. Gantner et al. (2011). Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* 84 12–18

Wagner M, Loy A, Klein M, Lee N, Niels B. Ramsing , Stahl D, and Friedrich. M. (2005). Functional Marker Genes for Identification of Sulfate-Reducing Prokaryotes. *Methods in enzymology*, Vol. 397

11 Anexos

Actividades desarrolladas en el laboratorio de biocorrosión de la CIC

Pruebas de estabilidad a medios de cultivo BioCIC en viales

Periódicamente se realizan ensayos de estabilidad en los viales BioCIC en los cuales se busca comprobar las características de los medios de cultivo producidos por el laboratorio de biocorrosión de la CIC.

Metodología

El procedimiento consiste en la selección de lotes de viales BioCIC para cada uno de los seis tipos de medios producidos de acuerdo al grupo bacteriano puntual, medio lactato para las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR), medio Dextrosa Rojo Fenol (DRF) para las Bacterias Productoras de Ácido (BPA), medio Tioglicolato para las Bacterias Anaerobias Totales (BAnT), medio Luria Bertani (LB) para las Bacterias Heterótrofas Totales (BHT), medio citrato para las Bacterias Oxidadoras de Hierro (BOH) y medio tiosulfato para las Bacterias Tiosulfato Reductoras (BTR), formando paquetes con los mismos con los cuales se realiza el ensayo. De cada medio de cultivo se le realiza una caracterización inicial, analizando los siguientes parámetros peso en gramos, volumen aproximado de forma visual, pH mediante electrodo potenciométrico, productividad y selectividad utilizando cepas ATCC (American Type Culture Collection, por sus siglas en inglés). Estos son sometidos a diferentes condiciones ambientales para evaluar de esta forma la influencia del ambiente en el que se dispongan sobre las características de los mismos. Las condiciones evaluadas son: refrigeración a 5 °C, incubación a 35°C y 70°C, oscuridad, e intemperie. Los monitoreos se realizan al mes cero y mes uno para incubación a 70°C, y para las demás condiciones al mes cero, mes cinco y mes seis finalizando así la prueba de estabilidad. En cada monitoreo se registran los cambios que se hayan presentado en los viales expuestos tales como, cambio de color, pérdida de peso, pérdida de volumen, variación en pH y demás que puedan indicar deficiencias en la calidad de los productos evaluados.

En la Figura A se presenta un ejemplo de los paquetes para dos medios DRF y Lactato.



Figura A Registro fotográfico medios de cultivo usados para pruebas de estabilidad. Izquierda medio DRF específico para bacterias productoras de ácido, derecha medios lactato específico para bacterias sulfato reductoras.

Control calidad viales medios de cultivo producidos

La estrategia usada en el laboratorio de biocorrosión de la CIC para evaluar la calidad de los viales producidos consiste en una prueba de productividad y selectividad, usando microorganismos ATCC para cada medio de cultivo y la toma de pH posterior al proceso de esterilización para verificar si cumple con lo establecido la norma TM 0194 de 2014.

Metodología

Se seleccionan cinco viales de cada lote producido de viales BioCIC con los cuales se realiza el ensayo, se usan dos para productividad y selectividad los cuales son inoculados con cepas puntuales para cada medio producido. El tercer vial se usa para determinar el pH posterior al proceso de esterilización. Los dos viales restantes se almacenan como respaldo por si se llegase a presentar algún inconveniente.

Cada lote de preparación de medios de cultivo BioCIC es de aproximadamente 200 viales, se le realiza el control productividad, selectividad (Figura B) y pH antes de ser entregados al cliente. Los criterios de productividad en los resultados esperados van de 0 a 2, entendiéndose 2 como resultado óptimo lo cual indica que el medio cuenta con las características adecuadas para permitir el crecimiento de los microorganismos de interés y 0 indica que el medio no presenta las características y condiciones adecuadas para su uso, lo cual implica realizar un proceso de trazabilidad para identificar el origen del defecto y controlarlo y de esta manera, evitar la producción de lotes defectuosos.

En cuanto a los criterios de selectividad, los resultados se esperan que sean 0 ya que los medios en su composición son puntuales para los grupos de microorganismos de interés por ende el desarrollo de otro microorganismo diferente al espectro de interés es difícil y si se presenta esto indica un producto no conforme de acuerdo con los criterios del laboratorio de Biocorrosión de CIC. En cuanto al pH después de autoclavados los medios de cultivo, si este se encuentra fuera de los criterios establecidos por norma, pero se obtiene un resultado adecuado en productividad y selectividad se acepta ya que este no afecta el desarrollo de los microorganismos de interés.



Figura B Resultado productividad y selectividad conforme a los criterios establecidos para medio DRF izquierda y Lactato derecha.

Verificación de dispensadores y micropipetas

Mensualmente se realiza una verificación de los equipos de medición volumétricos del laboratorio de Biocorrosión de la CIC, tanto de las micropipetas utilizadas en diferentes ensayos de investigación como especialmente al dispensador usado para servir los viales BioCIC producidos, garantizando así la calidad de los mismos y cumpliendo con las normativas implementadas en el laboratorio como es el caso de la ISO 17025, la cual exige la verificación de las herramientas anteriormente nombradas. Se cuentan con rangos de precisión y exactitud establecidos los cuales garantizan que los equipos funcionan de manera óptima.

Metodología

Se realizan 10 mediciones de los volúmenes puntuales depositando el agua en un recipiente previamente tarado en balanza analítica y se toma los pesos a medida que se adicionan los volúmenes, para cada uno de los equipos este procedimiento se repite en tres ocasiones. Luego, los datos son registrados en la carta control correspondiente obteniendo los resultados referentes a precisión y exactitud. Con

base en los valores que se obtengan para estas condiciones se determina si el equipo cumple o no con los parámetros establecidos en el laboratorio.

Control de ambientes

Mensualmente se realiza un control de la calidad ambiental usando un método de sedimentación en placa por las diferentes áreas del laboratorio, lo cual incluye zona de mecheros, incubadoras, cabina de seguridad biológica con flujo encendido, frotis en la superficie para la misma y trimestralmente se evalúa el estado de la lámpara UV de la cabina de seguridad biológica.

Metodología

El método usado corresponde al de sedimentación en placa el cual consiste en exponer cajas con medios puntuales durante un determinado tiempo en las diferentes áreas a monitorear. En el laboratorio para bacterias se usa medio Standard Plate Count (SPC por sus siglas en inglés), y para hongos Agar Papa Dextrosa (PDA por sus siglas en inglés), cada caja es expuesta durante treinta minutos, esto se realiza en las áreas previamente mencionadas. La lectura de los resultados de crecimiento refleja la calidad ambiental, entendiéndose como resultado óptimo la ausencia de crecimiento en los medios expuestos lo cual asegura que el laboratorio cumple con condiciones óptimas en los diferentes espacios monitoreados y así evitando posibles contaminaciones.

Limpieza química de piezas metálicas para análisis microbiológico (biocupones)

Los biocupones es otro producto tecnológico de CIC, los cuales son sistemas de monitoreo diseñados, producidos y ofrecidos al mercado de acuerdo a la norma NACE SP 0775-13, como estrategia para monitorear la influencia microbiológica en la generación de corrosión en sistemas de tanques de almacenamiento o líneas de transporte del sector hidrocarburos. Estas piezas metálicas tienen un diseño específico con un área conocida, instalados con un material plástico aislante. Cuando las facilidades de instalación no cuentan con sistemas para la instalación de los biocupones se utilizan otros diseños de piezas metálicas alargadas de forma rectangular lijados tipo espejo (cupón) lijados de la misma forma que los biocupones.

Para cada punto de muestreo, se instala cuatro biocupones y se exponen por periodos de tiempo (30, 60 o 90 días). Posterior, se realiza el proceso de retiro y desmonte. Una vez estos son entregados al laboratorio, se les realiza un proceso llamado decapado, el cual consiste en un tratamiento superficial de metales para eliminar impurezas, tales como manchas, contaminantes inorgánicos, herrumbre o

escoria, de aleaciones de metales ferrosos entre otros. En la siguiente Tabla A se muestran ejemplos claros de cupones y biocupones una vez son retirados de los sistemas y luego del proceso de decapado.

Metodología

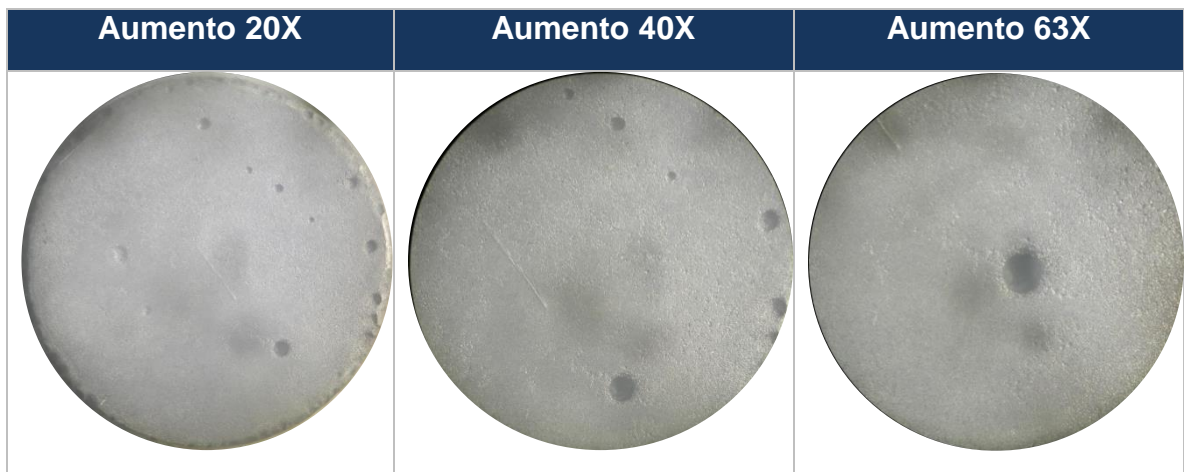
Una vez son entregados los biocupones o cupones al laboratorio se realiza un registro fotográfico de los mismos en las condiciones que llegan luego que son retirados de los sistemas en los cuales habían sido expuestos. Posterior, son sometidos a un proceso de limpieza conocido como decapado en el cual se usan sustancias que promueven la eliminación de materia orgánica, así como residuos de óxido que pueden estar presentes en las probetas de interés. Se aplica Xileno, HCl con inhibidor de corrosión, agua, carbonatos, agua y etanol en el orden mencionado dejando en exposición durante dos minutos y en sonicación. Finalizada la limpieza, se realiza un registro fotográfico y son sometidos a proceso de reconstrucción usando técnica de microscopía confocal.

Tabla A. Cupón laminar tipo espejo una vez retirado del sistema, antes de limpieza química y después del proceso de decapado. Biocupones retirados del sistema y biocupones nuevos listos para instalar.

Antes de Limpieza Química	Después de Limpieza Química
	
Antes de Limpieza Química	Después de Limpieza Química
	

Se realiza una observación utilizando un estereoscopio y se realiza un registro fotográfico en aumentos de 20X, 40X y 63X antes y después de la limpieza química, como se observa en la Tabla B para identificar el posible tipo de corrosión y la ubicación de picaduras localizadas relacionadas con microorganismos, u otros tipos de corrosión como gases disueltos o incrustación.

Tabla B. Registro fotográfico en 20X, 40X y 63X de un biocupón después de limpieza química retirado de un tanque de almacenamiento



Microscopia confocal de Biocupones y Cupones Laminares tipo espejo

Una vez se ha realizado el decapado y el registro fotográfico en estereoscopio después de la limpieza química de los biocupones o cupones laminares tipo espejo se procede a realizar microscopia confocal, lo cual permite obtener una reconstrucción de las zonas afectadas y da un aproximado de la profundidad de las picaduras en micrómetros (μm). En la figura C A y B, se observan unas reconstrucciones en 3D de biocupones expuestos en tanques de almacenamiento de crudo.

Metodología

Los cupones o biocupones son observados en aumentos que van desde 140X, 280X, 560X y reconstrucción 560X 3D. Se aplica el principio de la microscopía confocal el cual se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los

planos fuera de foco. Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de los planos inferiores y superiores. Con los valores obtenidos de picadura, junto con el tiempo de exposición y otros factores, se procede a realizar el cálculo de velocidad máxima de picadura en mpy (milésimas de pulgada por año, por sus siglas en inglés).

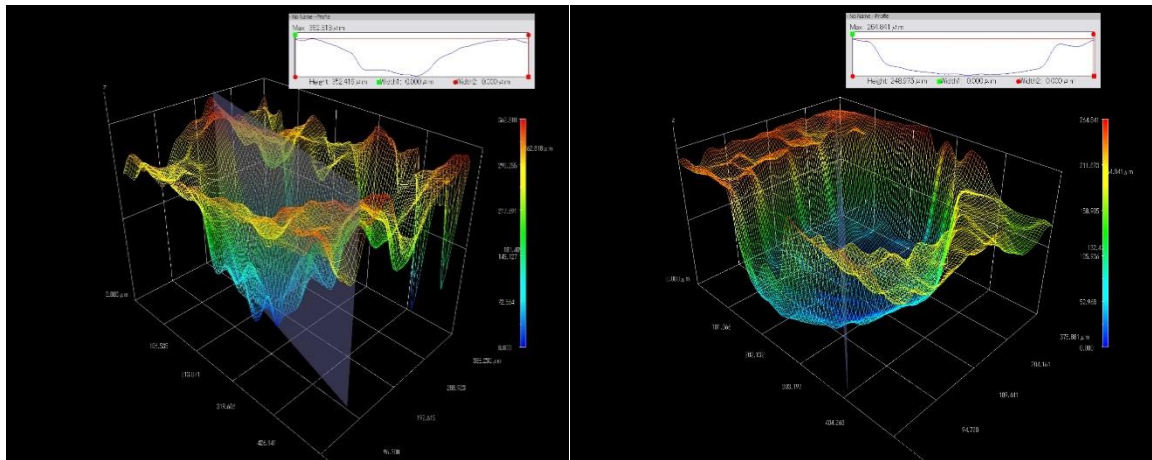


Figura C A y B se presenta una reconstrucción a 560X 3D por medio de microscopia confocal de biocupones expuestos en tanques de almacenamiento de crudo.

Una vez realizados los cálculos se clasifica según la categorización de la norma NACE SP 0775-13 para determinar el grado de criticidad, menores a 5 mpy se clasifican en Baja, de 5 mpy a 7,9 mpy en Moderada, de 8 mpy a 15 mpy en Alta y mayores a 15 mpy en SEVERA.

Procesamiento para análisis microbiológico de muestras líquidas y sólidas

El laboratorio ofrece a los clientes, kits de recolección de muestras de tipo líquidas y sólidas para el monitoreo de sistemas asociados a hidrocarburos, para su posterior envío al laboratorio de biocorrosión y su respectivo procesamiento. Dependiendo de la concentración de bacterias que se obtengan se determina el nivel de criticidad microbiológica en el que se encuentra el sistema monitoreado.

Metodología

El procesamiento de las muestras se realiza usando viales BioCIC con medios específicos para grupos bacterianos de interés, los cuales son procesados de acuerdo a la técnica Extinción por Dilución Seriada (EDS) establecida en la norma TM 0194 de 2014, realizando diluciones consecutivas buscando así determinar la

concentración bacteriana en la muestra y el grado de corrosividad microbiológica causada por bacterias plantónicas y/o sésiles en los sistemas de interés. El tiempo para la obtención de resultados depende del grupo bacteriano, para el caso de las bacterias sulfato reductoras el resultado se reporta a los 14 días como parcial y final a los 28 días, para los demás grupos bacterianos el reporte final se realiza a los 14 días.

Determinación de ferrobacterias por examinación en microscopio

Estas son bacterias oxidadoras del hierro que se encuentran de manera habitual en ambientes próximos a tanques de almacenamiento de crudo, contraincendios y áreas que brinden condiciones para su proliferación.

Metodología

Muestras procedentes de campos inoculas en medio citrato y con tiempos de incubación finalizados, son observadas bajo microscopio para la determinación de ferrobacterias. En microscopio se observan estructuras semejantes a ferrobacterias acompañadas de depósitos de hierro. La presencia o ausencia se correlaciona con el crecimiento que se haya obtenido en el procesamiento previo de muestras de las zonas puntuales de interés usando viales con medio citrato específico para bacterias oxidadoras de hierro. Figura D, estructura típica que se asemeja a ferrobacterias. Se realizan registros fotográficos en 100X.



Figura D Se observa estructura que se asemeja a ferrobacteria acompañada de depósitos de hierro.

