

Estudio de microorganismos causantes de biodeterioro mediante técnicas de biología molecular en el IAPH

Víctor M. Menguiano Chaparro | Laboratorio de Biología, IAPH

José Román Pérez Castiñeira | Dpto. de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Universidad de Sevilla

Marta Sameño Puerto | Laboratorio de Biología, IAPH

URL de la contribución <www.iaph.es/revistaph/index.php/revistaph/article/view/3379>

RESUMEN

El Laboratorio de Biología del IAPH, en colaboración con el Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla y el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis del CSIC, ha comenzado a aplicar técnicas de biología molecular para el estudio del biodeterioro causado por microorganismos sobre el patrimonio histórico.

El objetivo fundamental es identificar aquellos microorganismos que pudieran estar afectando a los bienes culturales, y especialmente, aquellos que por sus características intrínsecas no pueden ser fácilmente detectados e identificados mediante métodos tradicionales de microbiología, basados en técnicas de aislamiento y cultivo en laboratorio. La detección e identificación de los microorganismos involucrados en los procesos de biodeterioro de los bienes culturales es el primer paso necesario para su conservación.

En este trabajo se describen las diferentes técnicas empleadas y se presentan dos ejemplos en los que se han aplicado. Hasta el momento, los resultados han sido satisfactorios. No obstante, dada la gran diversidad microbiana presente en muestras naturales, a menudo se obtiene una mezcla de ADN procedente de diferentes microorganismos, dando lugar a una superposición de secuencias que imposibilita la identificación. En este caso, se contemplan técnicas de clonación de los fragmentos de ADN obtenidos por la técnica de PCR, así como el uso de marcadores moleculares más específicos para conseguir una mayor definición taxonómica.

Palabras clave

Microbiología | Biología molecular | Bienes culturales | Biodeterioro | Microorganismos | Hongos xilófagos | ADN |



Pudrición en la madera soporte de una de las pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra de Granada | foto Fondo Gráfico IAPH (Víctor Menguiano Chaparro)

INTRODUCCIÓN

Los proyectos de investigación en ciencias del patrimonio aplicadas para la conservación de los bienes culturales van dirigidos a conocer la estructura y composición de la materia, a estudiar y diagnosticar los factores y mecanismos de alteración, concretamente los biológicos y, conocidos estos datos, a evaluar los distintos tratamientos de conservación.

El patrimonio cultural, como consecuencia de las condiciones medioambientales que lo rodean, está expuesto a sufrir alteraciones producidas por la acción de los factores físicos, químicos y biológicos. Estos factores biológicos que se encuentran interaccionando con los materiales que constituyen las obras son el objeto de los estudios de biodeterioro.

Los organismos y microorganismos presentes en los bienes culturales generan procesos físicos y químicos sobre los materiales que colonizan como consecuencia de su crecimiento y de sus reacciones metabólicas. Los estudios de este deterioro de origen biológico se basan tanto en la identificación y diagnóstico como en los posibles tratamientos para combatirlo.

Para el estudio de los microorganismos, los métodos tradicionales de microbiología proporcionan una información muy útil pero también muy limitada sobre los agentes microbianos que se desarrollan sobre las superficies en estudio, por lo que se ha hecho necesario recurrir a las técnicas de biología molecular que aportan una información más completa. La detección e identificación de los distintos microorganismos involucrados en estos procesos son importantes, por un lado, para verificar su presencia y, por otro lado, para evaluar sus funciones y su efecto sobre los diversos materiales.

La utilización de métodos microbiológicos tradicionales, basados en técnicas de cultivo en laboratorio y aislamiento en cultivos puros, permite estudiar el papel de ese microorganismo en los procesos de biodeterioro. Sin embargo, estos métodos presentan la desventaja de que sólo una pequeña parte de los microorganismos presentes en la comunidad son susceptibles de ser cultivados, por lo que la aplicación de métodos moleculares, especialmente la amplificación y análisis de regiones concretas del genoma, permiten el estudio de las poblaciones microbianas no cultivables. La combinación de las técnicas de biología molecular y las de microbiología tradicional persigue un mismo objetivo: facilitar el estudio de las comunidades microbianas naturales involucradas en procesos de biodeterioro del patrimonio.

La biología molecular, por tanto, es la ciencia que va a permitir, a partir del conocimiento y estudio de las comunidades responsables del biodeterioro, diseñar estrategias para la conservación y protección de los bienes culturales y así controlar la colonización microbiana.

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ADN

Las técnicas moleculares empleadas en el IAPH se basan en la amplificación específica de determinadas secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir del genoma completo de un microorganismo. Dichas secuencias han sido seleccionadas por ser únicas y características de cada especie, lo que permite utilizarlas para diferenciar distintas especies dentro de una comunidad microbiana compleja, como puede ser el caso de una colonización microbiana en un determinado bien cultural (monumentos, obras de interés histórico-artístico, etc.).

El método molecular de detección e identificación de microorganismos incluye varias etapas: extracción de ADN; amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una secuencia diana; secuenciación (determinación de la secuencia de bases) del ADN amplificado; análisis *in silico* de la secuencia.

Extracción de ADN

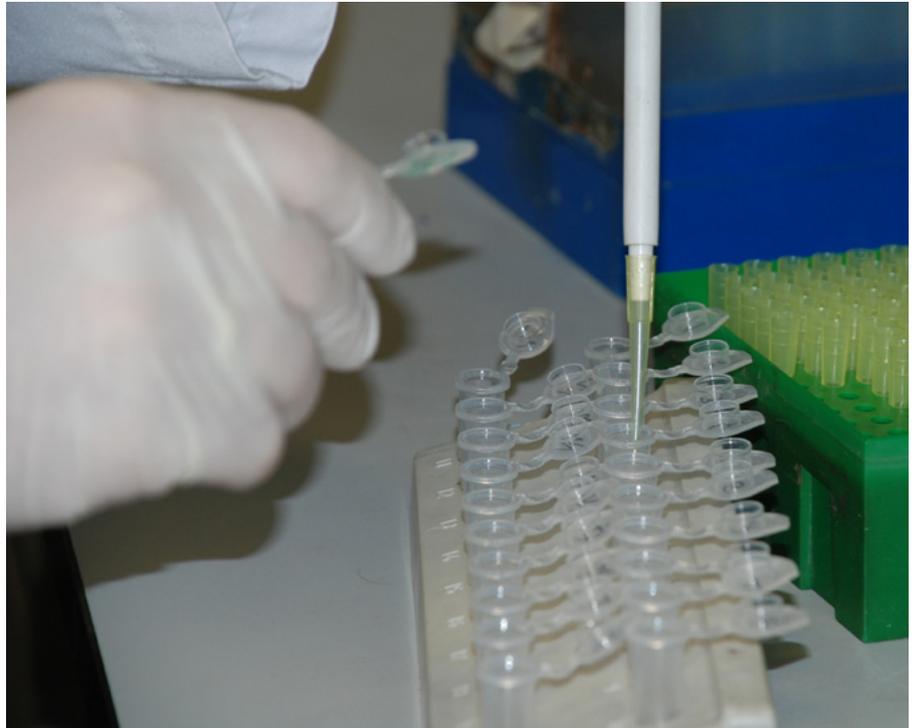
La extracción de ADN se realiza a partir de un cultivo del microorganismo o bien directamente de la muestra tomada sobre el bien cultural. Existen diversos protocolos de extracción, así como kits comerciales de extracción de ADN específicos para cada tipo de microorganismo.

Amplificación por PCR

La detección de microorganismos se basa principalmente en la secuencia de genes (o de fragmentos de los mismos) que codifican alguna de las moléculas de ARN ribosómico (ARNr): 16S en procariotas, 18S y/o 28S en eucariotas. Estas son secuencias universales, presentes en todos los organismos vivos, y con bajo polimorfismo, es decir, con poca o ninguna variación dentro de una misma especie. Por otro lado, aunque están altamente conservadas, presentan ciertas divergencias que permiten identificar con bastante fiabilidad a los organismos en general y microorganismos en particular.

La amplificación de los genes que codifican el ARNr se consigue en un termociclador, gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como molde el ADN genómico del microorganismo a identificar previamente extraído y purificado.

La PCR permite multiplicar una región específica del ADN varios millones de veces. Es un método automatizado de síntesis enzimática *in vitro* de ADN. La especificidad de la reacción se consigue usando un par (uno para cada cadena) de oligonucleótidos sintéticos de 15 a 30 bases, que son complementarios a las secuencias que flanquean al segmento de ADN que se desea amplificar y que actuarán como cebadores o *primers*. Estos se unen específicamente al ADN molde, permitiendo a la enzima ADN-polimerasa



Preparación de ADN para amplificación por PCR
| foto Fondo Gráfico IAPH (Marta Sameño Puerto)

termofílica de *Thermus aquaticus* (Taq ADN-polimerasa) la replicación del mismo en presencia de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs). Las regiones conservadas facilitan el diseño de cebadores universales, utilizables para un amplio rango de microorganismos.

La reacción consiste en la repetición de un ciclo de tres etapas, cada una de las cuales se realiza a una temperatura determinada. En la primera etapa (desnaturalización), entre 92-95 °C, la doble cadena de ADN se desnaturaliza, es decir, sus dos cadenas se separan. En la segunda etapa (hibridación) se reduce la temperatura para permitir que los cebadores se unan a las secuencias homólogas de ADN monocatenario. Y, en la tercera etapa (elongación), tiene lugar la síntesis de la región que flanquean los cebadores gracias al ajuste de la temperatura óptima de la Taq ADN polimerasa (entre 68 y 72 °C). La repetición secuencial de este ciclo de tres etapas da como resultado la acumulación exponencial del fragmento de ADN que se desea amplificar. La cantidad de ADN molde necesaria es del orden de nanogramos, si bien esto depende del tamaño del genoma del organismo que está siendo objeto de estudio.

La efectiva amplificación del fragmento de ADNr deseado se comprueba mediante electroforesis en gel de agarosa del producto de la PCR, para



Vista del reverso de una de las bóvedas de la Alhambra, donde se aprecian zonas con pudrición
| foto Fondo Gráfico IAPH (Marta Sameño Puerto)

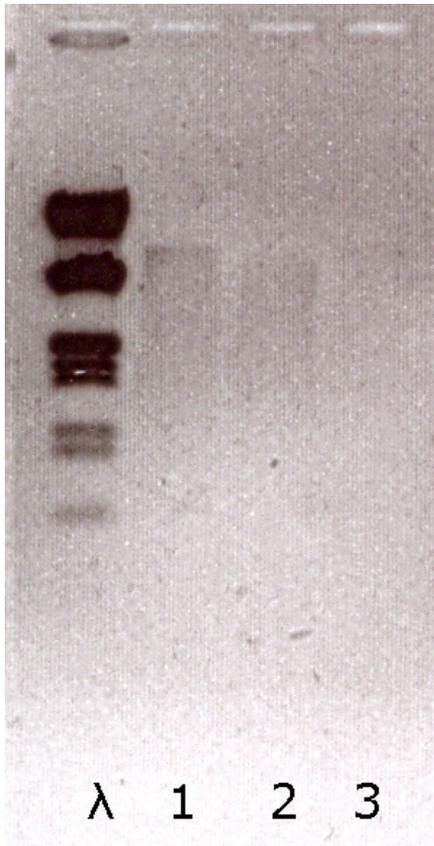
asegurar la presencia de un único tipo de fragmento amplificado del tamaño adecuado.

Las bandas de ADN incluidas en el gel de agarosa se recuperan y purifican, obteniéndose una solución de ADN puro, que es posteriormente cuantificado mediante electroforesis en gel de agarosa y comparado frente a un marcador de pesos moleculares, y/o mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (A260) con un espectrofotómetro.

Secuenciación del ADN amplificado

Actualmente se utilizan secuenciadores automáticos que emplean la secuenciación cíclica (en una reacción similar a la de amplificación de la PCR, que utiliza un único iniciador por reacción y terminadores marcados con fluorocromos adecuados, que interrumpirán la síntesis de manera aleatoria y facilitarán la detección posterior de los fragmentos interrumpidos) y electroforesis en sistema multicapilar.

En nuestro laboratorio se han utilizado los Servicios de Secuenciación Automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (CSIC) de Granada.



Electroforesis en gel de agarosa mostrando el ADN obtenido.

λ = patrón ADN del fago lambda
| foto José Román Pérez Castiñeira

Análisis de la secuencia

Consiste en la comparación de la secuencia de ADN_r obtenida con las depositadas en bases de datos utilizando programas desarrollados a tal efecto. Actualmente esta labor se puede realizar mediante distintos programas y bases de datos, algunas públicas y de acceso libre, a través de internet. La más utilizada es la utilidad BLAST del GenBank, del NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA), disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa que busca regiones de similitud entre una secuencia dada de nucleótidos o proteína con aquéllas disponibles en las bases de datos. Además calcula la significación estadística de las identidades o similitudes encontradas.

La homología de la secuencia con las existentes en la base de datos nos proporciona la identificación taxonómica del microorganismo, permitiendo también un análisis filogenético que refleja, de forma esquemática, el grado de parentesco genético entre los microorganismos comparados.

APLICACIÓN PRÁCTICA. EJEMPLOS EN EL IAPH

En el IAPH se están empleando las técnicas de biología molecular como apoyo a las técnicas tradicionales para el estudio de las alteraciones biológicas de los bienes culturales.

A continuación se presentan los resultados de dos de los trabajos realizados por el IAPH en colaboración con el Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla y el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Identificación de hongos causantes de pudrición en las bóvedas de las pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra de Granada

Esta investigación se enmarca dentro del Convenio Específico de Colaboración entre el Patronato de la Alhambra y Generalife y el Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico para el desarrollo del Proyecto de Conservación de las Pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra.

El estudio previo reveló que la madera soporte de las bóvedas (*Populus alba*), sobre las que se asientan las pinturas, sufría un proceso de biodeterioro causado por hongos de pudrición de la madera.

Por sus características intrínsecas, los hongos de pudrición no pueden ser fácilmente detectados e identificados mediante técnicas microbiológicas tra-

dicionales, basadas en aislamiento y cultivo en laboratorio para posterior caracterización de sus micelios y estructuras reproductoras.

La observación de varias muestras de madera con pudrición al microscopio óptico con luz polarizada evidenció la presencia de hifas fúngicas que no pudieron ser identificadas, por lo que se recurrió a técnicas de biología molecular, aislando ADN fúngico directamente de las muestras de madera con pudrición.

Material

Se utilizaron tres pequeñas muestras de madera con pudrición tomadas del reverso de una de las bóvedas, que se mantuvieron previamente en una cámara húmeda (90% H.R.) a temperatura ambiente.

Extracción de ADN

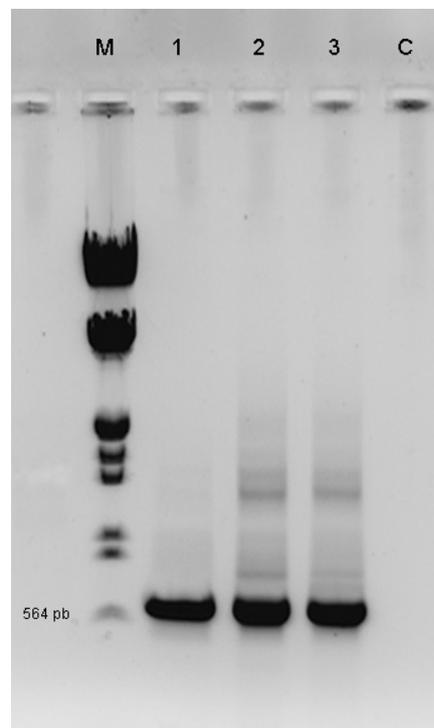
Para la extracción de ADN, las muestras de madera con pudrición se pulverizaron en un mortero de porcelana, con ayuda de nitrógeno líquido. Posteriormente, se utilizó el kit comercial de extracción de ADN ZR Fungal/Bacterial DNA Kit (Zymo Research Co. Irvine, USA), siguiendo el protocolo del fabricante. De esta forma, se obtuvieron preparaciones de unos 100 µl de ADN.

La extracción de ADN fue verificada mediante electroforesis, de 18 µl de cada solución obtenida, en gel de agarosa al 0,7% en tampón TBE ½ y teñido con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 120V, durante 30 minutos, y se usó como patrón ADN de fago λ (Promega) digerido con las endonucleasas de restricción HindIII y EcoRI con un patrón de bandas en un rango de 564 a 21226 pb.

La observación bajo luz ultravioleta de la electroforesis de verificación de extracción revela bandas de ADN muy tenues, es decir, se obtuvo poco ADN. Esto es lógico si tenemos en cuenta que no partíamos de cultivos fúngicos, sino directamente de muestras de madera con pudrición, cuyo tamaño era reducido (unos 5 cm³). No obstante, la cantidad obtenida fue suficiente para amplificar por PCR.

Amplificación por PCR

El ADN extraído se utilizó como molde para la amplificación mediante PCR de un fragmento del gen que codifica el ARN de 28S de la subunidad grande (60S) del ribosoma de eucariotas. Para ello se utilizaron como cebadores dos oligonucleótidos correspondientes a sendas secuencias consenso utilizados convencionalmente para la amplificación y secuenciación de dicho fragmento: 5'-ACCCGCTGAATTTAAGCAT-3' (FW) y 5'-TCCGTGTTTCAAGACGG-3' (REV). Estos cebadores amplifican una sola banda de ADN de unas 600 pares de bases (pb) de longitud.



Electroforesis en gel de agarosa mostrando los productos amplificados por PCR.
M=marcador molecular, C=control sin ADN molde
| foto José Román Pérez Castiñeira

```

>gb|DQ470969.1| Petriella setifera isolate AFTOL-ID 956 28S large subunit rib
RNA gene, partial sequence
Length=1297

Score = 1009 bits (1118), Expect = 0.0
Identities = 568/574 (99%), Gaps = 0/574 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 18  TGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGCCTCTGG 77
Sbjct 1   TGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGCCTCTGG 60

Query 78  GCCGTCGAGTTGTAATTTGAGAGGATGCTTTTGGCGAGGCGCCTTCCGAGTGCCCTGG 137
Sbjct 61  GCCGTCGAGTTGTAATTTGAGAGGATGCTTTTGGCGAGGCGCCTTCCGAGTGCCCTGG 120

Query 138 AACGGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCCGTATGGTTGGACGCCGAGCCTCTGTAAAGCT 197
Sbjct 121 AACGGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCCGTATGGTTGGACGCCGAGCCTCTGTAAAGCT 180

Query 198  CCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAATGGGAGGTAACCCCTTCTAA 257
Sbjct 181  CCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAATGGGAGGTAACCCCTTCTAA 240

Query 258  AGCTAAATACTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCA 317
Sbjct 241  AGCTAAATACTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCA 300

Query 318  CTTTGAAAAGAGAGTTAAATAGCACGTGAAATTTGTTGAAAGGGGAAAGCGCTTGCGACCAGA 377
Sbjct 301  CTTTGAAAAGAGAGTTAAATAGCACGTGAAATTTGTTGAAAGGGGAAAGCGCTTGCGACCAGA 360

Query 378  CTTGTGCCCGTCGAATCAGCCGCGCTCGCCGGCGGCACCTTCGGCGGGCTCAGGCCAG 437
Sbjct 361  CTTGTGCCCGTCGAATCAGCCGCGCTCGCCGGCGGCACCTTCGGCGGGCTCAGGCCAG 420

Query 438  CATCATTTTCGCTGCAGGGGGAGAAAGCGCGGGGAATGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGC 497
Sbjct 421  CATCATTTTCGCTGCAGGGGGAGAAAGCGCGGGGAATGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGC 480

Query 498  CCGCCGCGCAATACCCCTCGGCGGACTGAGGACCGCGCATCTGCAAGGATGCTGGCGTAA 557
Sbjct 481  CCGCCGCGCAATACCCCTCGGCGGACTGAGGACCGCGCATCTGCAAGGATGCTGGCGTAA 540

Query 558  TGGTCGTCAGCGACCCGCTTTGAAACACGGAACA 591
Sbjct 541  TGGTCGTCAGCGACCCGCTTTGAAACACGGAACA 574

```

Alineamiento mediante análisis Blast de la secuencia obtenida de la muestra 2 con la aparecida en la base de datos | foto Fondo Gráfico IAPH (Víctor Menguiano Chaparro)

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 µl y contenían: 1µl de ADN molde, 5 µl de tampón Taq DNA polimerasa, 1 µl de Taq DNA polimerasa (5 U), 2 µl de mezcla de dNTPs 10 mM cada uno, 50 pmol de cada cebador, completando con agua grado Biología Molecular (Sigma W4502).

El termociclador se programó con las siguientes condiciones: 2 minutos a 95 °C para la desnaturalización del ADN molde, seguido de 40 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 95 °C, 1 minuto de hibridación de cebadores a 55 °C y 1 minuto de elongación a 72 °C, con un paso de extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Para comprobar la efectiva amplificación del fragmento de DNA, de aproximadamente 600 pb, una muestra de 25 µl del producto resultante de la PCR se corrió mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en 150 ml de tampón TBE ½ teñido con bromuro de etidio, a 120 V, durante 30 minutos. Dicha electroforesis muestra una amplificación satisfactoria, tanto

en cantidad, como en el tamaño del fragmento amplificado, de aproximadamente 600 pb de longitud.

Purificación y cuantificación del ADN

Las bandas de ADN incluidas en el gel de agarosa se recuperaron y purificaron mediante el kit comercial de purificación Isolate PCR and Gel Kit (Bioline, Londres, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante (excepto que se utilizó agua en lugar del tampón de elución del fabricante), obteniéndose una solución de 30 µl de ADN puro.

Se intentó una cuantificación del ADN purificado mediante electroforesis en gel de agarosa y comparación frente a un marcador de pesos moleculares pero, dada la poca cantidad de ADN purificado, no fue posible. Por ello la cuantificación se realizó mediante espectrofotometría. Las concentraciones de ADN obtenidas para las muestras 1, 2 y 3 fueron, respectivamente, 4.4, 6.1 y 4.7 ng/µl.

Secuenciación

Una vez cuantificadas las muestras de ADN, se prepararon y enviaron para su secuenciación al Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (CSIC) de Granada, donde se realiza mediante el procedimiento de secuenciación cíclica y electroforesis en sistema multicapilar automático.

Una vez obtenidas las secuencias de los fragmentos amplificados, se comprobó que no fueron positivas en el caso de las muestras 1 y 3, debido probablemente a que la cantidad de ADN presente en la muestra fuera inferior a la necesaria para la correcta secuenciación.

Análisis de la secuencia

Con el fin de determinar a qué especies corresponden las secuencias de ADN obtenidas a partir de las muestras se realizó una comparación mediante análisis BLAST de éstas con las existentes en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA).

El análisis comparativo Blast de la secuencia de la muestra 2 con las secuencias de referencia mostró que este fragmento amplificado presenta una homología del 99% con la secuencia de referencia de *Petriella setifera*, un ascomiceto causante de pudrición blanda de la madera.

Identificación de microorganismos en el entorno arqueológico de las Murallas Reales y Puerta Califal de Ceuta

Este estudio forma parte del Proyecto de intervención para la consolidación, restauración y adecuación a la visita pública de la cubierta de las Murallas Reales y de los vestigios arqueológicos en el ámbito de la llamada Puerta



Cianobacterias, microalgas, musgos y plantas vasculares sobre la muralla
| foto Fondo Gráfico IAPH (Víctor Menguiano Chaparro)

Califal de Ceuta, como parte del convenio de colaboración entre la Consejería de Educación, Cultura y Mujer de la Ciudad Autónoma de Ceuta y el Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico.

En el caso de las Murallas Reales y vestigios arqueológicos del ámbito de la Puerta Califal de Ceuta, sólo se detectaron agentes biológicos en la llamada Estancia C. En esta estancia, al igual que en el resto, la humedad era elevada y existía una fuerte filtración de agua procedente de las cubiertas de la muralla, pero lo que la hace diferente al resto de estancias, en cuanto a la capacidad de desarrollo de organismos vivos, es la luz natural que entra en ella a través de un ventanal.

En distintos puntos de la Estancia C se pudo ver la presencia de cianobacterias, microalgas verdes, briófitos y plantas superiores, así como gran cantidad de excrementos de paloma.

Las cianobacterias y microalgas verdes se encontraban formando pátinas sobre la piedra, en forma de láminas, escamas y costras de coloración verde o pardo-negrucza según la zona.

Material

Se tomaron 2 muestras con hisopos estériles para analizarlas mediante técnicas moleculares independientes de cultivo.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante congelación, trituración en mortero y agitación mecánica con tampón CTAB. El ADN aislado se precipitó con etanol absoluto. La extracción de ADN fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa.

Amplificación por PCR

El ADN extraído se utilizó como molde para la amplificación mediante PCR, por un lado, del ADNr de 16S de la subunidad pequeña del ribosoma de procariontes, y por otro, del ADNr 28S de eucariotas. Para ello se utilizaron, en el primer caso, el par de cebadores 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 5'-ACCTTGTTACGACTT-3', y en el segundo, el par de cebadores 5'-ACCCGCTGAATTTAAGCAT-3' y 5'-TCCGTGTTTCAAGACGG-3'. De esta forma se amplifica un fragmento de ADN de unas 1.500 pares de bases (pb), en el caso de procariontes, y de unas 600 pares de bases (pb), en el caso de eucariotas.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 µl y contenían: 1 µl de ADN molde, 5 µl de tampón Taq DNA polimerasa, 1 µl de Taq DNA polimerasa (5 U), 2 µl de mezcla de dNTPs 10 mM cada uno, 50 pmol de cada cebador, completando con agua Milli-Q (Sigma W4502).

El termociclador se programó con las siguientes condiciones: 2 minutos a 95 °C para la desnaturalización del ADN molde, seguido de 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 95 °C, 1 minuto de hibridación de cebadores a 55 °C y 5 minutos de elongación a 72 °C, con un paso de extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Para comprobar la efectiva amplificación de los fragmentos de ADN, los productos resultantes de la PCR se corrieron, junto con marcadores de peso molecular, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en 150 ml de tampón TBE ½ teñido con bromuro de etidio, a 120 V, durante 30 minutos, resultando una amplificación satisfactoria.

Purificación y cuantificación del ADN

Las bandas de ADN incluidas en el gel de agarosa se recuperaron y purificaron como en el caso anterior. La cantidad de dicho ADN fue cuantificada midiendo su absorbancia a 260 nm mediante un espectrofotómetro "Nano-Drop".

Secuenciación

Una vez cuantificadas las muestras de ADN, se prepararon y enviaron para su secuenciación al Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (CSIC) de Granada.

Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas se compararon con las existentes en la base de datos pública GenBank (base de datos de secuencias genéticas del NCBI, National Center for Biotechnology Information, USA) mediante el análisis Blast.

Dicho análisis mostró que los fragmentos de ADNr 28S amplificados presentaban elevados porcentajes de homología con dos especies de microalgas unicelulares, *Chlorella elipsoidea* (96%) y *Pseudochlorella sp.* (97%).

En el caso de los fragmentos de ADNr 16S amplificados, presentaban un 99% de homología con las secuencias de referencia de dos tipos de bacterias, *Escherichia coli* y *Shigella sp.* Ambos géneros bacterianos pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y muy probablemente tienen su origen en la gran cantidad de deyecciones de paloma presentes en el lugar.

CONCLUSIONES

Los casos prácticos descritos anteriormente demuestran que es posible la detección e identificación de hongos xilófagos directamente a partir de una muestra de madera con pudrición, en el primer caso, y de microalgas y bacterias de muestras ambientales, en el segundo, evitando la necesidad de cultivo previo, por lo que dicha detección e identificación no estaría limitada por la capacidad de cultivo de las especies a detectar.

Sin embargo, la identificación no resulta sencilla cuando aparecen varias especies en una misma muestra ambiental, algo habitual en comunidades biológicas naturales, de gran diversidad y complejidad. En estos casos es más difícil la identificación de todos los microorganismos, pues los fragmentos amplificados pertenecen a distintas especies y se obtiene una superposición de secuencias.

Para separar el ADN de las diferentes especies en estos casos, se lleva a cabo la clonación: los distintos fragmentos de DNA se insertan en plásmidos bacterianos que además confieren resistencia a un antibiótico, en nuestro caso, ampicilina. Los plásmidos son a su vez introducidos en bacterias de la especie *Escherichia coli*. Las bacterias transformadas (las que han capturado plásmido) se seleccionan en placas de medio de cultivo suplementadas con ampicilina incubadas durante 12 horas a 37 °C. Después de este proceso aparecen colonias aisladas en la placa, cada una de las cuales contiene un solo tipo de plásmido (“clon”). Varias de estas colonias se inoculan separadamente en medio de cultivo líquido con ampicilina y se dejan crecer a 37 °C con agitación durante otras 12 horas. Se extraen entonces los ADN plasmídicos de cada uno de los cultivos líquidos y se analizan mediante análisis con distintas endonucleasas de restricción. Aquellas preparaciones que den patrones de bandas diferentes con alguna de dichas enzimas pertenecerán a distintos organismos.

BIBLIOGRAFÍA

- **AUSUBEL, F. M. et ál.** (ed.) (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons, 1989
- **GONZÁLEZ, J. M.; SÁIZ-JIMÉNEZ, C.** (2005) Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks. *International Microbiology*, 8 (3), 2005, pp. 189-194
- **GUGLIELMO, F.; BERGEMANN, S.E.; GONTHIER, P. et ál.** (2007) A multiplex PCR-based method for the detection and early identification of wood rotting fungi in standing trees. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2007, pp.1490–1507
- **HOGBERG, N.; LAND, C.J.** (2004) Identification of *Serpula lacrymans* and other decay fungi in construction timber by sequencing of ribosomal DNA: A practical approach. *Holzforschung*, 58, 2004, pp. 199-204
- **JASALAVICH, C.A.; OSTROFSKY, A.; JELLISON, J.** (2000) Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2000, pp. 4725–4734
- **JELLISON, J.; JASALAVICH, C.A.** (2000) A review of selected methods for the detection of degradative fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46, 2000, pp. 241–244
- **MORETH, U.; SCHMIDT, O.** (2001) Identification of indoor rot fungi by taxon-specific priming polymerase chain reaction. *Holzforschung*, 54, 2001, pp. 1–8
- **NICOLOTTI, G.; GONTHIER, P.; GUGLIELMO, F.; GARBELOTTO, M.** (2009) A Biomolecular Method for the Detection of Wood Decay Fungi: A Focus on Tree Stability Assessment. *Arboriculture & Urban Forestry*, 35(1), 2009, pp.14–19
- **SARRÓ, M.I.; ARROYO, I.** (2008) Microbiología y biología molecular aplicada al patrimonio en el IPHE. *Revista Bienes Culturales*, 8, 2008, pp. 197-210
- **SARRÓ, M.I.; ARROYO, I.** (2010) Biología molecular aplicada al estudio del biodeterioro causado por microorganismos y la conservación de bienes culturales. *Patrimonio Cultural de España*, 4, 2010, pp. 56-65
- **WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M.** (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345, 1990, pp. 63-65