

**DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN  
Y CUANTIFICACIÓN DE *Fibrobacter succinogenes* POR PCR EN TIEMPO  
REAL EN AGUAS SUPERFICIALES**

**MÓNICA DAYÁN VILLALBA POVEDA**

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BOGOTÁ, 2006**

**DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN  
Y CUANTIFICACIÓN DE *Fibrobacter succinogenes* POR PCR EN TIEMPO  
REAL EN AGUAS SUPERFICIALES**

**MÓNICA DAYÁN VILLALBA POVEDA**

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al Título de Magíster  
en Ciencias Biológicas**

**DIRECTOR**

**Fernando Rodríguez**

**Director del Laboratorio de Microbiología Molecular**

**CORPOICA-Tibaitata**

**Bogotá-Colombia**

**CODIRECTOR**

**Carlos Jaramillo**

**Profesor Titular**

**Departamento de Ciencias Biológicas**

**Universidad de los Andes**

**Bogotá-Colombia**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**

**BOGOTÁ, 2006**

PROGRAMA DE POSGRADO DEPARTAMENTO DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

MA GISTER EN CIENCIAS BIOLOGICAS

SUSTENTACIÓN DE TESIS

CANDIDATA:

MÓNICA DAYÁN VILLALBA POVEDA

COMISIÓN JURADO EXAMINADOR

---

Dr. Fernando Rodriguez, PhD

---

Dr. Carlos Jaramillo, MSc

---

Dr. Rolando Barahona PhD

Bogotá, D.C., 4 de Agosto de 2006

## DEDICATORIA

A MIS TRES AMORES,  
SERGIO, JUAN DAVID Y LAURA SOFIA

## **AGRADECIMIENTOS**

A los doctores Fernando Rodríguez, Rolando Barahona y Carlos Jaramillo por brindarme sus conocimientos y su amistad

A la Universidad de los Andes por su formación en la parte académica, profesional y personal

A CORPOICA C.I Tibaitatá, por permitirme trabajar en sus instalaciones

A los integrantes del grupo de Fisiología y Nutrición Animal de CORPOICA C.I Tibaitatá, por permitirme ser parte de su grupo y compartir momentos tan agradables

A los integrantes del Laboratorio de Microbiología Molecular por su amistad y apoyo para la culminación de esta tesis

A Jorgito Rodríguez por ser un gran amigo y por su ayuda en parte técnica

A mi esposo Sergio por su paciencia y compañía

A mis hijos Juan David y Laura Sofía por su amor incondicional

A Dios por ser quien me acompaña en todos los momentos de mi vida.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. OBJETIVOS</b>	
1.1 Objetivo general	16
1.2 Objetivos específicos	16
<b>2. MARCO TEORICO</b>	17
<b>2.1 EL ECOSISTEMA RUMINAL</b>	17
2.1.1 El rumen	17
2.1.2 La microbiota ruminal	18
2.1.2.1 Dinámica de la microbiota ruminal en la degradación de forrajes	18
2.1.3 Aislamientos iniciales y primeras descripciones de las bacterias del rumen	19
2.1.4 Identificación de bacterias celulolíticas por métodos tradicionales	19
<b>2.2 TÉCNICAS MOLECULARES</b>	20
2.2.1 Secuencias del ADN	21
2.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	21
2.2.2.1 PCR-en tiempo real	23
<b>2.3 LAS PLANTAS DE BENEFICIO DE GANADO BOVINO EN COLOMBIA</b>	24
2.3.1 Impactos ambientales del sacrificio y faenado de ganado	27
2.3.2 Contaminación de aguas por los vertimientos de plantas de beneficio de ganado bovino	28
<b>2.4 EL RÍO TUNJUELITO</b>	30
<b>2.5 DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS EN MUESTRAS AMBIENTALES DE AGUA</b>	34

<b>2.6 <i>Fibrobacter succinogenes</i> COMO BIOINDICADOR ESPECÍFICO DE CONTAMINACIÓN ORGÁNICA DE ORIGEN BOVINO EN AGUAS SUPERFICIALES</b>	<b>35</b>
2.6.1 Clasificación taxonómica	35
2.6.2 Características generales	36
2.6.3 ¿Por qué cuantificar <i>Fibrobacter succinogenes</i> en agua superficiales?	38
 <b>MATERIALES Y METODOS</b>	
 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	 40
3.2 PCR DIRECTA	40
3.2.1 Fijación de células	41
3.2.2 Reacción de PCR directa	41
3.2.2.1 Perfil térmico	42
3.3 PCR CONVENCIONAL	43
3.3.1 Reacción de PCR convencional	43
3.3.2 Perfil térmico	43
3.4 VALIDACIÓN DE PRIMERS ESPECIE –ESPECÍFICA	44
3.5 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	44
3.5.1 Optimización de la metodología para la extracción de ADN a partir de muestras de agua superficial	44
3.6 DETECCIÓN DEL ADN de <i>Fibrobacter succinogenes</i> EN AMBIENTES ACUÁTICOS AERÓBICOS	45
3.7 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA B20105 (Control positivo)	45
3.7.1 Instrumental para el manejo de microorganismos Anaeróbicos	46

3.7.1.2 Procedimiento	46
3.7.2 Técnica roll-tube (Hungate,1968)	47
3.7.2.1 Preparación de medios	47
3.7.2.1.2 Materiales generales	47
3.7.2.1.3 Medio de dilución	47
3.7.2.1.3.1 Procedimiento	47
3.7.2.1.4 Medio de cultivo o caldo-agar celobiosa-glucosa 0.5%	48
3.7.2.1.4.1 Materiales	48
3.7.2.1.4.2 Procedimiento	48
3.7.2.2 Siembra de la muestra en Roll-tube	49
3.8 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE <i>Fibrobacter succinogenes</i> POR PCR EN TIEMPO REAL (PCR-TR) EN EL RIO TUNJUELITO	49
3.8.1 Diseño experimental	49
3.8.2 Análisis estadístico	49
3.8.3 Curva estándar	51
3.8.4 Reacción de PCR en Tiempo Real	52
3.8.4.1 Perfil térmico	52
3.8.5 Cuantificación absoluta	52
4. RESULTADOS	53
4.1 VALIDACIÓN DE PRIMERS ESPECIE –ESPECIFICA	53
4.2 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA SUPERFICIAL	55
4.3 DETECCIÓN DE <i>Fibrobacter succinogenes</i> EN AMBIENTES ACUÁTICOS AERÓBICOS	57
4.4 CINETICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA B20105	58
4.4.1 Técnica Roll-Tube	61



<b>4.5 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE <i>Fibrobacter succinogenes</i> POR PCR EN TIEMPO REAL (PCR-TR) EN UN TRAMO DEL RIO TUNJUELITO</b>	<b>63</b>
4.5.1 Curva Estándar	63
4.5.2 Muestreo en el río Tunjuelito	65
4.5.2.1 Cuantificación absoluta	66
<b>5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>69</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS</b>	

## Lista de figuras

**Figura 1.** Impacto ambiental que genera el proceso de sacrificio y faenado de ganado. Tomado de Guía ambiental Plantas de beneficio animal. Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. República de Colombia. Febrero de 2003.

**Figura 2.** Carga orgánica vertida por año medida en DBO5 del Frigorífico Guadalupe. Tomado de la página Web: <http://www.efege.com/contenidos/03-ambiente.htm#2>.

**Figura 3.** Ubicación del frigorífico Guadalupe y mataderos clandestinos a las orillas del Río Tunjuelito. Mapa digital de la ciudad de Bogotá. Instituto Agustín Codazzi. Año 2000-2001.

**Figura 4.** Ubicación del frigorífico Guadalupe y mataderos clandestinos a las orillas del Río Tunjuelito. Mapa digital de la ciudad de Bogotá. Instituto Agustín Codazzi. Año 2000-2001.

**Figura 5.** Árbol filogenético a partir de las secuencias del gen 16S rRNA de diferentes cepas de *Fibrobacter*. Béra-Maillet *et al.* 2004.

**Figura 6.** Anillamiento de los primers reportados por Tajima *et al.*(2001) sobre la secuencia de *Fibrobacter succinogenes* S85 reportada en el GenBank bajo el número de acceso AJ496032 (Programa Primer Express 2.0)

**Figura 7.** Protocolo para la extracción de ADN a partir muestras de aguas marinas. Boström *et al.* 2004.

**Figura 8.** Anillamiento de los primers reportados por Denman & McSweeney (2005) sobre la secuencia de *Fibrobacter succinogenes* S85 reportada en el GenBank bajo el número de acceso AJ496032 (Programa Primer Express 2.0)

**Figura 9.** Amplificación por PCR de *Fibrobacter succinogenes* con dos parejas de primers secuencia-específica. Líneas 1 y 2 primers reportados por Tajima *et al.* 2001, líneas 3 y 4 primers reportados por Denman & McSweeney, 2005. Líneas 1 y 3 amplificación por PCR directa de un cultivo puro de *F.succinogenes* B20105, líneas 2 y 4 amplificación con ADN extraído de una dilución 1:100 de heces frescas de ganado. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

**Figura 10.** Visualización de las muestras de ADN en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de Etidio. Líneas 1 y 2 extracción de ADN a partir de la cepa B20105, líneas 3 y 4 extracción de ADN a partir de una dilución 1:1000 con heces frescas de ganado.

**Figura 11.** Amplificación por PCR de *Fibrobacter succinogenes* con primers Denman & McSweeney, (2005). Líneas 1-7 amplificación con ADN extraído de una dilución 1:1000 de heces frescas de ganado expuesta a condiciones aeróbicas y temperatura ambiente (20°C-22°C) a las 0, 4, 8, 12, 16, 24 y 48 horas respectivamente. Línea 8 amplificación con ADN extraído de un cultivo puro de *F. succinogenes* B20105 (Control positivo). Línea 9 amplificación con ADN extraído de una dilución 1:100 de heces frescas de ganado. Marcador molecular 50bp. Tamaño de banda esperado 121bp. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

**Figura 12.** Curva de crecimiento de la cepa B20105 de *F. succinogenes* en medio celobiosa-glucosa 0.5%.

**Figura 13.** Ajuste del crecimiento de la cepa B20105 de *F. succinogenes* en medio celobiosa-glucosa 0.5%. a la función exponencial de Gompertz.

**Figura 14.** Diluciones  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  en Roll-tube de *F. succinogenes* B20105

**Figura 15.** Determinación de la cantidad de ADN obtenido (ng/ul) a partir de un número conocido de células/ml.

**Figura 16.** Cuantificación relativa de la población de *F. succinogenes* con respecto al Ct de bacterias totales en la zona de estudio.

**Figura 17.** Anillamiento de los primers reportados por Tajima *et al.*, (2001) sobre la secuencia de *Fibrobacter succinogenes* HM2 reportada en la base de datos del DDBJ con el número de acceso M62689 (Programa Primer Express 2.0)

## Lista de tablas

**Tabla 1.** Primers para la detección de *F. succinogenes* por PCR cualitativa y cuantitativa (Tajima *et al.* 2001)

**Tabla 2.** Mezcla de reacción para PCR directa

**Tabla 3.** Mezcla de reacción para PCR convencional (Tajima *et al.* 2001)

**Tabla 4.** Mezcla de reacción para PCR en tiempo real (Modificación de IAEA, 2004)

**Tabla 5.** Primers para la detección de Bacterias totales por PCR cuantitativa (Denman & McSweeney, 2005)

**Tabla 6.** Primers para la detección de *F. succinogenes* por PCR cualitativa y cuantitativa (Denman & McSweeney, 2005)

**Tabla 7.** Optimización de la metodología para la extracción de ADN a partir de muestras de agua superficial

**Tabla 8.** Datos de la curva de crecimiento de la cepa B20105 de *F. succinogenes* en medio celobiosa-glucosa 0.5%.

**Tabla 9.** Cantidad de ADN obtenido a partir de un número conocido de células.

**Tabla 10.** Cuantificación de *Fibrobacter succinogenes* en muestras de agua de una zona de la cuenca del Rio Tunjuelito sometida al vertimiento de plantas de beneficio de ganado bovino detectada por PCR en tiempo real

**Tabla 11.** Cálculos utilizados para determinar los niveles relativos del gen 16S de *F. succinogenes* a lo largo de la zona de estudio.

**Tabla 12.** Cálculo aproximado de la cantidad de heces de ganado bovino incorporadas al río en cada uno de los puntos analizados

## Justificación

En Colombia, las deficiencias tecnológicas de las plantas de sacrificio y las explotaciones tradicionales de crianza de bovinos para la disposición de los residuos sólidos, líquidos y las emisiones causan daños sobre los recursos naturales, el entorno, el paisaje haciendo que finalmente estos vertimientos fluyan hacia los cuerpos de agua, deteriorando el recurso hídrico y afectando gravemente la calidad del abastecimiento presente y futuro para la comunidad en general. La magnitud de los daños que generan estos vertimientos sobre los diferentes recursos se precisan en el país, mediante caracterizaciones fisicoquímicas y microbiológicas que ayudan a determinar la matriz de impacto ambiental. En el caso del agua, los indicadores cuantitativos y cualitativos que exigen el IDEAM y el DAMA son: caudal, temperatura, grasas, aceites y pH, DBO5 (Disponibilidad bioquímica del oxígeno), DQO (Disponibilidad química del oxígeno), coliformes totales, coliformes fecales, sólidos suspendidos y totales.

En cuanto a la cantidad de materia orgánica agregada por estos vertimientos sobre el agua de los ríos, las entidades regulatorias exigen su cuantificación por parámetros fisicoquímicos tales como DBO5 y el DQO, los cuales toman mucho tiempo para su ejecución y no permiten determinar la fuente de tal contaminación haciendo más difícil la verificación de las acciones correctivas que puedan implementar los planes de gestión ambiental en estos lugares

*Fibrobacter succinogenes* es la principal bacteria fibrolítica del rumen de ganado vacuno y ovino. Por métodos microbiológicos tradicionales de cultivo y herramientas moleculares para el estudio de las poblaciones microbianas del rumen, se ha determinado que esta bacteria se encuentra de manera abundante en este ecosistema cuando el ganado ha sido

alimentado con forrajes de baja calidad (los que presentan menos del 55% de digestibilidad y son deficientes en proteína verdadera y en azúcares solubles) y aunque el porcentaje de este bacilo Gram negativo anaeróbico al igual que todas las demás poblaciones microbianas que habitan en el rumen, puede variar de acuerdo con la dieta suministrada, en términos generales *F. succinogenes* contribuye con cerca del 5 a 6% del total del contenido procariota del rumen en ganado .

Los métodos microbiológicos clásicos para la detección de microorganismo requieren en general, el uso de pre-enriquecimientos no-selectivos, enriquecimientos selectivos, aislamiento en medios selectivos y la confirmación posterior usando pruebas basadas en la morfología y bioquímica propias de cada uno de los organismos objeto de estudio. Por lo tanto, estos métodos son laboriosos, requieren un largo proceso para obtener resultados definitivos y, además, no siempre pueden realizarse. Para solucionar estos inconvenientes se han desarrollado diversas metodologías alternativas para la detección identificación y cuantificación de microorganismos, entre las que destacan los métodos moleculares. En esta última categoría, la técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en la técnica diagnóstica más popular en microbiología, y recientemente, la introducción de una mejora de ésta, PCR en tiempo real, ha producido una segunda revolución en la metodología diagnóstica molecular, como puede observarse por el número creciente de publicaciones científicas.

PCR en tiempo real es una técnica altamente sensible que permite la cuantificación exacta de secuencias de ADN específicas de microorganismos. Además, otras ventajas que favorecen su implantación potencial en laboratorios de análisis son su rapidez, sencillez y la lectura de los resultados que permite evitar contaminaciones post-PCR favoreciendo la automatización y un alto rendimiento.

La cuantificación de *F.succinogenes* por una técnica molecular como PCR en tiempo real en aguas superficiales que reciben los vertimientos de plantas de beneficio de ganado y explotaciones tradicionales de crianza de bovinos, se podría convertir en una herramienta de análisis para que los entes reguladores puedan ejercer políticas de control ambiental con respecto a la contaminación orgánica de origen bovino que llega al río por esta clase de actividades

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo general

Cuantificar *Fibrobacter succinogenes* por PCR en Tiempo real en aguas superficiales sometidas a los vertimientos de plantas de beneficio de ganado y explotaciones tradicionales de crianza de bovinos

### 1.2 Objetivos específicos

- Estandarizar la metodología para extraer ADN a partir de muestras de aguas superficiales
- Validar la utilidad de dos parejas de primers diseñadas para la detección de la especie *F. succinogenes*
- Estandarizar la técnica de PCR en tiempo real para cuantificar *F. succinogenes* en muestras de agua superficiales



## 2. MARCO TEORICO

### 2.1 EL ECOSISTEMA RUMINAL

#### 2.1.1 El rumen

Los rumiantes como las vacas, las ovejas y las cabras son mamíferos herbívoros que poseen un órgano digestivo especial conocido como rumen. En el rumen se lleva a cabo toda la digestión de la celulosa y otros polisacáridos de las plantas gracias a la actividad de las poblaciones microbianas que allí habitan (Hungate, 1988).

Dentro de las características únicas del rumen como sitio de digestión de la celulosa se encuentran su gran tamaño (de 100-150 litros en una vaca y 6 litros en una oveja) y su posición en el tracto digestivo como primer órgano al que llega la comida ingerida para ser fermentada.

La comida entra al rumen mezclada con saliva que contiene bicarbonato y es mezclada con un movimiento rotatorio que ocurre a lo largo de la fermentación microbiana. La comida permanece en el rumen hasta 4-8 horas, tiempo durante el cual las bacterias celulolíticas y protozoos celulíticos hidrolizan la celulosa a disacáridos de celobiosa y unidades libres de glucosa (Harfoot, G.G. 1981). Los microorganismos ruminales fermentan la glucosa para obtener la energía necesaria para crecer, produciendo además ácidos grasos volátiles (AGV) como el acético, propiónico y butírico (Hobson et al. 1982).

Los AGV atraviesan las paredes del rumen y pasan a la sangre, luego son oxidados por el animal y pasan a ser la principal fuente de energía para las células.

Además de las funciones digestivas, los microorganismos del rumen sintetizan aminoácidos y vitaminas, siendo la principal fuente de esos nutrientes esenciales para el animal. El contenido del rumen consiste de grandes cantidades de células microbianas ( $10^{10}$ - $10^{11}$

bacterias/ml de fluidos de rumen) más partículas de plantas parcialmente digeridas (Krause, D.O and Russel, B. 1996).

### **2.1.2 La microbiota ruminal**

La población microbial presente en el rumen está conformada por una gran variedad de microorganismos que se han adaptado a un ecosistema complejo bajo unas condiciones estrictas de temperatura, presión osmótica, potencial de oxidación-reducción y pH, para lograr un crecimiento óptimo. Entre estos microorganismos se encuentran protozoos, hongos y bacterias anaeróbicas, los cuales permiten llevar a cabo la actividad fermentativa.

Existen diversos grupos de bacterias del rumen tales como las metanogénicas, lipolíticas, peptidolíticas y amilolíticas, proteolíticas, deaminativas, bacterias degradadoras de hemicelulosa y las celulolíticas (Preston y Leng, 1989) las cuales han sido clasificadas por su actividad metabólica y de acuerdo al sustrato sobre el cual actúan.

#### **2.1.2.1 Dinámica de la microbiota ruminal en la degradación de forrajes**

Uno de los principales factores que intervienen en la prevalencia de las poblaciones microbiales del rumen es la dieta; y en el caso particular de los bovinos alimentados con forrajes de baja calidad los microorganismos que predominan son las bacterias celulolíticas. Se consideran forrajes de baja calidad los que presentan menos del 55% de digestibilidad y son deficientes en proteína verdadera y en azúcares solubles (Leng, 1990). Estos forrajes no son usados como base de las dietas en los países templados, pero en países tropicales y subtropicales como Colombia, comprenden prácticamente el total de la dieta de rumiantes, y tanto su degradación como aprovechamiento depende totalmente de la actividad de los microorganismos celulolíticos del rumen. Las principales bacterias celulolíticas que habitan en el rumen de bovinos alimentados bajo estas condiciones son: *Fibrobacter succinogenes*,

*Ruminococcus albus*, y *R. flavefaciens* (Hobson, 1998). *F. succinogenes* es considerada la bacteria celulolítica que se encuentra en mayor proporción en este ecosistema (Hungate, 1966), y que presenta mayor capacidad de degradación de los materiales fibrosos incluidos en la dieta.

### **2.1.3 Aislamientos iniciales y primeras descripciones de las bacterias del rumen**

Hace más de 150 años desde que el hombre reconoció la diferencia entre animales con un estomago simple y rumiantes, se pudo establecer el papel de la fermentación ruminal en la digestión de rumiantes. Orla –Jensen aisló por primera vez en 1919 un coco Gram-positivo, facultativo, productor de ácido láctico del rumen, al que clasificó como *Streptococcus bovis* (Hardie, 1984). En 1940, Hungate desarrolló técnicas para el mantenimiento de anaerobios estrictos y medios que contenían agentes reductores y fluido ruminal estéril. Este medio de crecimiento el cual simulaba el hábitat bacterial, permitió el aislamiento de cocos estrictamente anaerobios celulolíticos y bacilos que podían diferenciarse con base en su morfología y pigmentación.

### **2.1.4 Identificación de bacterias celulolíticas por métodos tradicionales**

Los métodos tradicionales han constituido por mucho tiempo la única herramienta disponible para la identificación de microorganismos. Sin embargo, estos procedimientos poseen desventajas debido a que la utilización de un gran número de cultivos que resulta extremadamente laboriosa y consume mucho tiempo. Además, no producen resultados completamente satisfactorios por presentar limitaciones en la diferenciación de las especies bacterianas (Wang et al., 1996/1997)

## **2.2 TÉCNICAS MOLECULARES**

Los métodos de cultivo convencionales para la enumeración de bacterias del rumen están siendo rápidamente reemplazados por el desarrollo de técnicas basadas en la detección y amplificación de regiones específicas de los ácidos nucleicos, las cuales pueden ser utilizadas para caracterizar complejas comunidades bacterianas teniendo en cuenta la variación en la secuencia genética. La utilidad de estas técnicas radica en el corto tiempo de ejecución, alta especificidad y su sensibilidad (Taylor et al., 1993).

Las pruebas moleculares basadas en el ARN ribosomal 16S permiten además de establecer análisis filogenéticos, diseñar pruebas específicas para cuantificar poblaciones bacterianas del rumen ya sean estas cultivables o no. Aunque la subunidad pequeña ribosomal (SSU) 16S del ADNr se encuentra en forma conservada a lo largo del reino bacterial, las regiones variables que se hallan dentro de la molécula pueden ser utilizadas para el diseño de iniciadores prueba –específica para un género, especie o cepa en particular (Woese, 1987). De esta forma, las estimaciones cuantitativas de poblaciones microbianas se pueden realizar por la amplificación del ADNr de la SSU con primers específicas usando PCR en tiempo real (RT-PCR). También las regiones más variables de la secuencia del rDNA 16S son sitios de la hibridación para el género, especie y algunas veces para realizar pruebas de hibridación cepa-específica

### **2.2.1 Secuencias del ADNr**

Los ribosomas bacteriales poseen un coeficiente de sedimentación de 70, pero cada partícula ribosomal puede separarse en dos partículas, la 50S y 30S. Aproximadamente, el 62% del peso ribosomal es ARN, el cual es codificado por varios genes rRNA (Neidhard et al. 1990). La partícula 30S esta compuesta de ARNr 16S y la 50S esta hecha de ARNr 5S y 23S.

Los genes ribosomales poseen estructuras que durante el proceso evolutivo han tenido relativamente poca presión selectiva y transferencia lateral de genes (Woese, C. 1987). Los primeros estudios basados en secuencias de ARNr fueron realizados con la subunidad 5S. Estas comparaciones fueron útiles para dividir los organismos en tres reinos, Eubacteria, Archea y Eucarya, pero la secuencia era demasiado corta para establecer diferencias entre especies cercanamente relacionadas. Las subunidades 16S y 23S son mas largas y contienen mas información que los ARNr del 5S (Stackebrandt, E. and H. Hippe., 1996). En la actualidad, la mayoría de los análisis se centran en el gen 16S RNAr de tal manera que el conocimiento que se tiene hoy en día de la filogenia bacterial se basa en la mayoría de sus secuencias (Stackebrandt, E. and H. Hippe., 1996). Como los genes ribosomales se encuentran flanqueados por secuencias altamente conservadas, en los estudios moleculares se utilizan primers específicos (10-15 bp) como sitios de iniciación para la PCR.

### **2.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en ingles), es un método diseñado para la síntesis enzimática de fragmentos específicos de ADN. Desde su invención por Kary Mullis y sus colaboradores en 1986, la PCR ha ejercido un profundo impacto en la biología molecular y ha revolucionado el campo de diagnóstico de los microorganismos debido a su gran sensibilidad, especificidad y rapidez en la obtención de los resultados, permitiendo la detección de un extenso rango de especies microbianas. El procedimiento es simple en concepto. El proceso requiere de dos primers que hibridizan en las hebras opuestas del ADN objetivo y flanquean la región que va a ser amplificada, también se requiere de una ADN polimerasa, los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's) y  $Mg^{2+}$ . La amplificación resulta de ciclos sucesivos de denaturación y la unión de

los oligonucleótidos al ADN objetivo seguido por la síntesis enzimática de la cadena de ADN que es complementaria al ADN objetivo.

Para llevar a cabo una amplificación por PCR, se necesita una mezcla que contenga todos los reactivos ya mencionados. La mezcla se calienta a una temperatura aproximada de 90°C-95°C para denaturar las cadenas del ADN objetivo (Saiki et al., 1988). Luego la solución se enfría a una temperatura que permite la alineación de los primers a su secuencia complementaria en el ADN objetivo y provee el 3'-OH requerido para la síntesis de ADN. La DNA polimerasa sintetiza entonces una nueva cadena complementaria a la secuencia objetivo. La enzima puede tolerar la alta temperatura de denaturación y permanece estable a través de los ciclos de la reacción. La nueva cadena sintetizada genera sitios adicionales para la unión de los primers. El esquema del ciclo térmico se repite muchas veces con una acumulación exponencial de la secuencia de ADN deseada<sup>1</sup>. De esta forma, los inconvenientes de los métodos tradicionales para la identificación de los microorganismos son superados por las ventajas que ofrece esta técnica molecular, convirtiéndose en una excelente herramienta de identificación que permite en muchos casos la sustitución de los métodos tradicionales (Saiki et al., 1988; Williams, 1989; Rolfs et al., 1992).

### **2.2.2.1 PCR-en tiempo real**

La PCR ha revolucionado la detección del ADN y del ARN debido a la mínima cantidad de templado que puede ser amplificada y detectada específicamente. Teóricamente, hay una relación cuantitativa entre la cantidad de ADN que se tiene como blanco inicial y la cantidad de producto que se genera en cada uno de los ciclos. La implementación de la PCR

---

<sup>1</sup> Advanced Techniques. En : Winfey, M., Rott, M., Wortman, A. Unraveling DNA: Molecular Biology for the Laboratory. Prentice Hall; 1997. Pag 198-199.

cuantitativa en tiempo real ha eliminado la variabilidad asociada tradicionalmente a la PCR, permitiendo así la cuantificación rutinaria y confiable de los productos que se generan (Witter et al. 1997). Por otra parte la posibilidad de detectar la cantidad de producto en la fase exponencial ha permitido a los investigadores realizar medidas muy sensibles, exactas, y reproducibles con varias aplicaciones tales como la cuantificación viral, cuantificación de expresión génica, validación de resultados de microarreglos, medida del daño del ADN, control de calidad, detección de patógenos, screening y genotipificación.

El sistema de PCR en tiempo real se basa en la detección y cuantificación de un reportero fluorescente (Lee, 1993; Livak, 1995). Esta señal aumenta en proporción directa con la cantidad de producto que se genera en cada reacción. Registrando la cantidad de emisión de la fluorescencia en cada ciclo, es posible supervisar la reacción de PCR durante la fase exponencial donde el primer aumento significativo en la cantidad de producto se correlaciona con la cantidad inicial de ADN blanco. Cuanto más copias hay del ADN templado maspronto se observara el aumento significativo en la fluorescencia.

Uno de los reporteros fluorescentes mas utilizados por su relación costo/efectividad es el SYBR Green el cual es un agente intercalante que se une al ADN doble cadena dando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR. A pesar de ser un colorante de fácil manejo, económico y que da buena sensibilidad a la prueba posee una gran desventaja como lo es un extenso proceso de optimización para evitar la formación de dímeros de primers y otros productos inespecíficos que podrían resultar en una sobreestimación de la concentración del ADN blanco.

En conclusión esta técnica permite llevar a cabo una amplificación robusta y confiable, con alta especificidad y sensibilidad, además como no requiere de análisis posteriores como la electroforesis, se puede realizar un mayor número de reacciones por día y posee un amplio rango de aplicaciones.

### **2.3 LAS PLANTAS DE BENEFICIO DE GANADO BOVINO EN COLOMBIA**

En Colombia se conocen como plantas de beneficio de ganado bovino o “mataderos” aquellos lugares donde se lleva a cabo la transformación del ganado en pie en proteína para el consumo humano. Actualmente, el país cuenta con un inventario bovino estimado de 23.000.000 cabezas de diversa composición genética (Fedegan,2004) , distribuidas en los diferentes agrosistemas; estos animales destinados a la producción de carne, en la mayoría de los casos son alimentados con forrajes de baja calidad que abundan en países tropicales y sub tropicales como el nuestro y por esta razón las poblaciones de bacterias celulolíticas son las que predominan en el ecosistema ruminal de nuestros bovinos (Bryant. et al.,1982 y Whitehead, et al., 2000)

En el país existen 1.440 mataderos, los cuales según la legislación vigente están clasificados como de las clases III, IV y planchones, 97.2% sacrifican más del 60% del consumo nacional y abastecen tanto los mercados locales como la demanda de ciudades próximas con sistema de transporte nacional<sup>2</sup>. También están las plantas de corte semi-industrial, clasificadas como de las clases I y II que sacrifican un poco menos del 40% del abasto nacional. Según el INVIMA, sólo de 30 a 40 de estos 1.440 mataderos cumplen con la normativa y requisitos sanitarios exigidos para su funcionamiento (Carta Fedegan Ed. No.75). De esta forma, las plantas de beneficio animal y principalmente las clasificadas como clase III, IV y mínimas están generando un impacto sanitario y ambiental a más del 70% de la población colombiana (Guía empresarial para plantas de beneficio animal del ministerial de ambiente, vivienda y desarrollo territorial del 2003) debido principalmente a dos factores: la ubicación y la ausencia de programas de gestión ambiental.

---

<sup>2</sup> Guía Ambiental para las plantas de beneficio del Ganado bovino.



La mayoría de estas plantas se encuentran ubicadas en zonas urbanas donde la cobertura y la distribución espacial de la actividad han creado una gran presión sobre los recursos de agua y suelo afectando directamente las condiciones del medio ambiente y la calidad de las poblaciones urbanas y rurales<sup>3</sup>. Además en la mayoría de las plantas no existen programas de gestión ambiental ya que se carece tanto de instalaciones y personal calificado para hacer un control de los vertimientos sólidos y líquidos que generan durante el proceso como de recursos para el cumplimiento de la normatividad ambiental la cual exige la remoción de las cargas contaminantes, mediante sistemas de tratamiento final.

En términos generales, durante el desarrollo de las diferentes etapas que componen el sacrificio y faenado del ganado se generan varios tipos de residuos que deterioran la calidad del agua que finalmente llega al río. La figura 1 resume en forma general que tipo de residuos genera cada una de las fases del proceso.

---

<sup>3</sup> Ibid 2

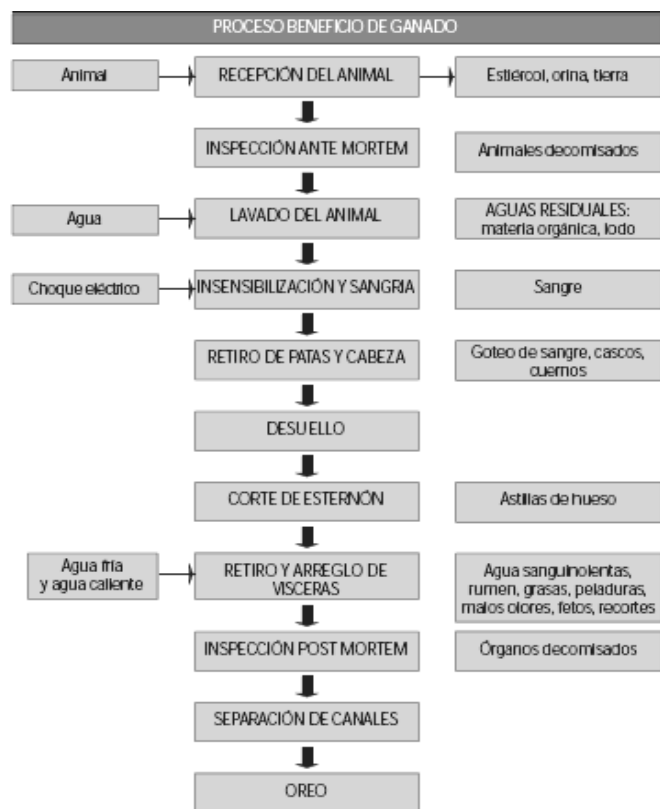


Figura 1. Impacto ambiental que genera el proceso de sacrificio y faenado de ganado. Tomado de Guía ambiental Plantas de beneficio animal. Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. República de Colombia. Febrero de 2003.

### 2.3.1 Impactos ambientales del sacrificio y faenado de ganado

Las deficiencias tecnológicas de las plantas de sacrificio y las explotaciones tradicionales de crianza de bovinos para la disposición de los residuos sólidos, líquidos y las emisiones causan daños sobre los recursos naturales, el entorno, el paisaje y las comunidades. De acuerdo con los datos reportados en la Guía Ambiental para plantas de beneficio de ganado del Ministerio del Medio Ambiente y la SAC (2002) los 1.440 mataderos oficiales que existen en Colombia, sin contar los 1.500 mataderos clandestinos según el INVIMA, poseen un

volumen sacrificio/día de 8.200 bovinos; 47% de las plantas oficiales hacen la disposición final de aguas residuales directo a los ríos, el 85% no posee estercolero, el 45% desecha el contenido ruminal directo a los ríos, el 46% lo dispone en campo abierto y el 99% no posee tratamiento de aguas residuales.

De esta manera las diferentes etapas del proceso como ingreso a la planta, sacrificio, faenado, vertimientos y residuos están generando un gran impacto dentro de la escala proporcionada (bajo, medio y alto impacto) en un recurso tan valioso e indispensable como el agua (Guía Ambiental para plantas de beneficio de ganado del Ministerio del Medio Ambiente y la SAC, 2002).

A continuación se señalan los principales impactos ambientales que genera cada uno de los procesos en el recurso natural: agua (Tabla 1).

**Tabla 1.** Impactos ambientales de las diferentes etapas del proceso que se lleva a cabo en las plantas de sacrificio. Tomado de la Guía Ambiental para Plantas de Beneficio del Ganado. Dirección General ambiental Sectorial. Ministerio del Medio ambiente y SAC. 2002. Páginas 53-55.

Etapa	Impactos ambientales
Transporte de ganado	Arrastre de materiales contaminantes y materia orgánica a fuentes de agua o las lagunas de oxidación con deficiente manejo.
Sacrificio	Vertimientos de orina, sangre y vomito, lavado el animal.
Faenado	Vertimiento con sangre, contenido gastrointestinal, contenido ruminal, grasa y desechos a fuentes naturales. Genera impactos altos.

### **2.3.2 Contaminación de aguas por los vertimientos de plantas de beneficio de ganado bovino**

El excesivo consumo de agua que generan las plantas de sacrificio en general se debe principalmente a que muchas de estos lugares no pagan por el servicio o lo adquieren a precios muy bajos generando un volumen proporcional de vertimientos de aguas residuales (Guía empresarial para la plantas de beneficio animal, 2003). Las aguas residuales vertidas por estas plantas se caracterizan por tener grandes proporciones de desechos orgánicos tales como contenido ruminal, contenido gastrointestinal y estiércol además de sólidos suspendidos, grasas, nutrientes y proteínas. De esta forma los desechos de los mataderos constituyen una demanda bioquímica de oxígeno (DBO5) elevada (una alta carga orgánica), que ocasiona la disminución de los niveles de oxígeno disuelto en los cuerpos de agua, donde estos son descargados. Además los residuos líquidos provenientes tienen una gran riqueza proteica y como resultado generan problemas de eutrofización tales como la disminución en la densidad de las especies, incremento de la turbiedad y del grado de sedimentación y como resultado puede generar condiciones anaeróbicas (Estudio ambiental del sector de mataderos, 1995).

Actualmente en el país, la magnitud de los daños que generan estos vertimientos sobre los diferentes recursos se precisan mediante caracterizaciones físicoquímicas y microbiológicas que ayudan a determinar la matriz de impacto ambiental; en el caso del agua, los indicadores cuantitativos y cualitativos de impacto ambiental que exigen entidades como el IDEAM y el DAMA entre otros son: caudal, temperatura, grasas, aceites y pH, disponibilidad bioquímica del oxígeno (DBO5), disponibilidad química del oxígeno (DQO), coliformes totales, coliformes fecales, sólidos suspendidos y totales (Guía Ambiental para plantas de beneficio de ganado del Ministerio del Medio Ambiente y la SAC, 2002).

En cuanto a la cantidad de materia orgánica que generan estos vertimientos sobre el agua de los ríos, estudios como el realizado en la planta de sacrificio de la Universidad Nacional,

ICTA encontraron que el volumen de rumen, estiércol y agua de lavado es de 480 litros por res, mientras que los efluentes de sangre y agua corresponden a 420 litros. Según lo anterior, lo esperado es que "cada vacuno produzca una descarga media de 900 litros de agua residual." (Hernández, Balcázar, 1985). Si tenemos en cuenta que el desempeño de una planta de sacrificio clase III y IV típica del país difiere ampliamente con respecto a la del ejemplo anterior, se estima una producción de aguas residuales por res sacrificada superior al doble. Por otra parte, con las cargas orgánicas de DBO y sólidos suspendidos totales (SST), se estima que un bovino genera alrededor de 10 kg/día de DBO5 y de SST, es decir, el equivalente a una población de 200 habitantes (Guía empresarial plantas de beneficio animal, 2005)

Por otra parte, las entidades regulatorias exigen la cuantificación de la carga orgánica por parámetros físico-químicos tales como el DBO5 y el DQO, los cuales toman mucho tiempo para su ejecución y no permiten determinar la fuente de tal contaminación haciendo más difícil la verificación de las acciones correctivas que puedan implementar los planes de gestión ambiental en estos lugares. Como una alternativa a estos procedimientos, desde hace varios años muchos países han generado conocimientos y desarrollado técnicas de biomonitorio (Sánchez-Vélez, A y García-Nuñez, R. M., 1999), como el uso de indicadores microbianos que se pueden identificar mediante el uso de métodos moleculares rápidos y de alta sensibilidad. En el caso específico de métodos para identificar las fuentes de contaminación fecal en aguas superficiales, el departamento de Ecología del estado de Washington en Estados Unidos concluye que no hay un método fácil y de bajo costo para la diferenciación entre las fuentes de contaminación bacteriana humana y no humana<sup>4</sup>. Sin embargo, en el momento de la publicación el método más frecuente y mejor calificado fue finger-printing, haciendo énfasis en que los métodos de detección más promisorios que

---

<sup>4</sup> Fecal Contamination Source Identification Methods in Surface Water. Washington State Department of Ecology. *Ecology Report #99-345*. October 1999.

incluyen técnicas para amplificar ADN usando la reacción de PCR y una combinación de indicadores

## **2.4 EL RÍO TUNJUELITO**

El río Tunjuelito es el más largo de los tres ríos que atraviesan la ciudad de Bogotá con una longitud de 28,27Km y un área total de 41427 hectáreas siendo el principal afluente del río Bogotá. En su recorrido baña el sur occidente de la capital desde la localidad de Usme, pasando por Tunjuelito, Ciudad Bolívar, Kennedy y finalmente Bosa. El río nace en el páramo de Sumapaz y es aprovechado mediante los embalses de regulación la Regadera y Chisaca para el suministro de agua de la ciudad. La población que habita en el área de drenaje urbano es de aproximadamente 1.031.556 habitantes los cuales llevan cabo actividades entre las que se destacan las gravilleras, escombreras, curtiembres, transformación y conservación de camicos y el relleno sanitario Doña Juana. Según el análisis estadístico de la información de efluentes industriales recolectada durante la fase VI de monitoreo ambiental durante el año 2002 de IDEAM y el DAMA, la mayor cantidad de vertimientos se encuentran al margen derecho del río y en el sector del Barrio Guadalupe donde algunas empresas de distribución de carne desechan los desperdicios de su actividad a orillas de este. En esta zona existe una planta de sacrificio animal, una serie de centros de distribución de carne y varias explotaciones tradicionales de crianza de bovinos (Figuras 3 y 4). El frigorífico posee una capacidad diaria de sacrificio de 2000 vacunos con la supervisión e inspección sanitaria directa por parte de la secretaria de salud.

En esta planta de beneficio se realiza el servicio de sacrificio de vacunos diurno a partir de las 7:00 a.m. de lunes a sábado, hasta culminación de la faena por volumen de sacrificio; y un servicio de sacrificio de vacunos nocturno desde las 6 p.m. de domingo a viernes. Esta planta de beneficio animal se ha caracterizado por su compromiso con el medio ambiente

implementando sistemas de autogestión que han sido reconocidos por el DAMA haciendo un manejo responsable, eficiente e integral del recurso hídrico. Entre los resultados que se destacan está el del manejo de vertimientos líquidos haciendo que se redujera la contaminación de tipo orgánico medido en DBO5 en un 96.89% entre los años de 1997 y 2000 (Figura 2).

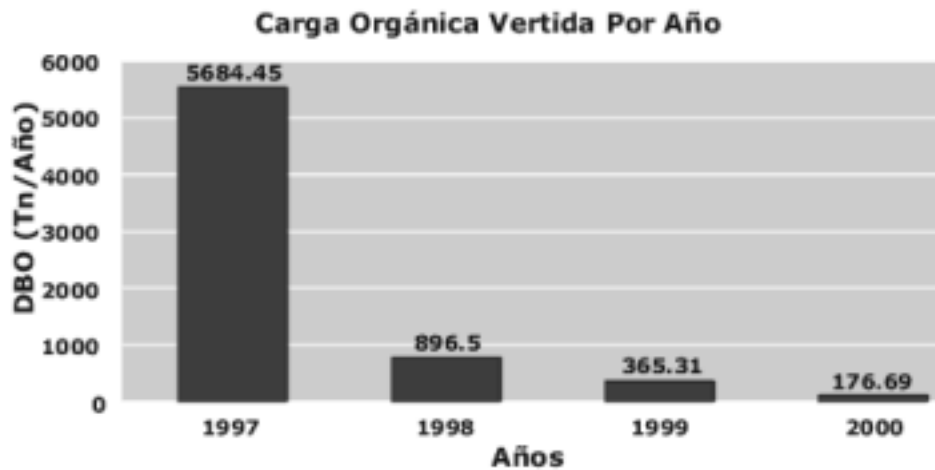


Figura 2 Carga orgánica vertida por año medida en DBO5 del Frigorífico de la zona del barrio Guadalupe. Tomado de la página Web: <http://www.efege.com/contenidos/03-ambientehtm#2>. Fecha de consulta: Julio 1 del 2006.

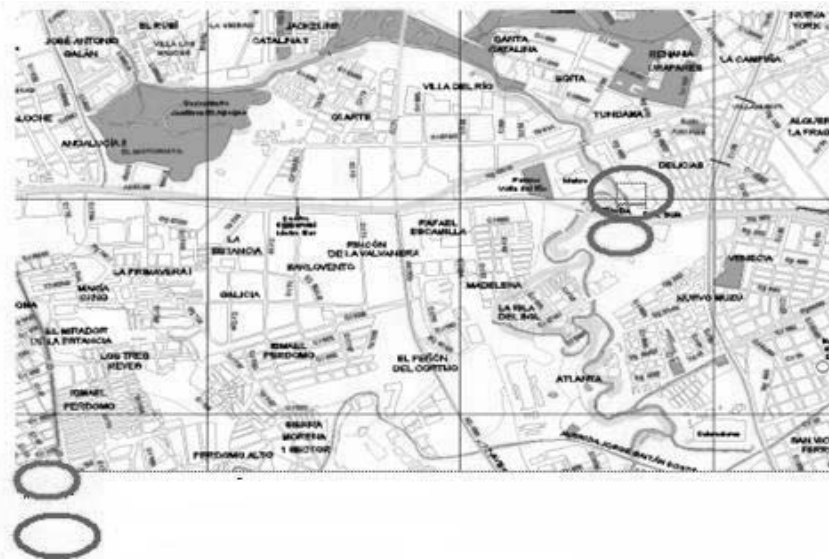


Figura 3 Ubicación de la planta de sacrificio de ganado bovino y expendios de carne a las orillas del río Tunjuelito. Mapa digital de la ciudad de Bogotá. Instituto Agustín Codazzi. Año 2000-2001.

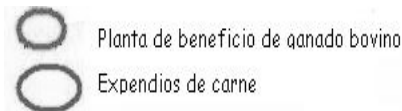


Figura 4 Ubicación de la planta de sacrificio de ganado bovino y expendios de carne a las orillas del río Tunjuelito. Mapa digital de la ciudad de Bogotá. Instituto Agustín Codazzi. Año 2000-2001.

Como el DBO5 es una medida de tipo físico-químico, no permite determinar la fuente de emisión que esta generando el impacto, haciendo mas difícil la verificación de las acciones correctivas que puedan implementar las distintas entidades encargadas mediante la ejecución de los planes de gestión ambiental en las distintas industrias.

En el caso de la zona del barrio Guadalupe ya mencionada, la eliminación de los vertimientos líquidos (material ruminal) y sólidos (estiércol) que generan las plantas de beneficio de ganado y las explotaciones tradicionales de crianza de bovinos están generando un grado de contaminación (alto, medio o bajo) aun no determinado en las aguas superficiales del Río Tunjuelito. Sin embargo, hasta no generar herramientas que permitan verificar que gran parte de la contaminación orgánica que llega al río si proviene de esta



clase de actividades, los entes reguladores no pueden ejercer políticas de control claras ni generar sanciones en cuanto impacto ambiental real que se está generando.

## **2.5 DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS EN MUESTRAS AMBIENTALES DE AGUA**

La presencia de ciertos microorganismos en el agua se utiliza como índice de la calidad de esta o como indicación de una posible contaminación (Manual of environmental microbiology, 2002). Sin embargo, los métodos tradicionales de cultivo no permiten la detección de aquellas bacterias que bajo condiciones de estrés ambiental tales como temperatura, nutrientes, aireación y presencia de desinfectantes, han entrado en un estado viable pero no cultivable (VNC) (Leo *et al.*, 1999).

Entre los indicadores más utilizados para determinar la calidad del agua y la presencia de contaminación de origen fecal en esta, se encuentran los microorganismos pertenecientes a los coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Enterococcus fecales* y bacteriófagos entre otros (Manual of Environmental microbiology, 2002). Aunque se ha visto, que muchos de estos microorganismos se encuentran en ambientes no entéricos y asociados de forma natural con bosques acuáticos, material vegetal y suelos como es el caso de *E.coli* y otras bacterias del grupo de los coliformes, estos microorganismos están siendo utilizados en varios países como indicadores de la calidad del agua y la presencia de contaminación fecal en esta fuente (Manual of Environmental microbiology, 2002).

Teniendo en cuenta lo anterior existe la necesidad de buscar indicadores apropiados que no sean ubicuos y cuya presencia y viabilidad este directamente relacionada con la presencia de los agentes contaminantes y aquellos que generan un riesgo para la salud, además de explorar nuevos métodos de detección que sean más rápidos y sensibles

Entre los nuevos métodos que han demostrado ser validos para la detección de bacterias VNC en diferentes ambientes se encuentra la PCR (Bej *et al*, 1990) ya que es una técnica que permite detectar números muy pequeños de bacterias especificas dentro del microcosmos de otras células eucariotas, procariotas y material orgánico presente en la muestra (Tsai *et al.*,1992 y Tiem *et al*, 1994). Además la PCR cuantitativa es una alternativa valida para los métodos de cultivo estándar que permite la detección y cuantificación de bacterias que se hayan en ambientes acuáticos en cualquier fase fisiológica (Brauns *et al.*, 1991; Lleo *et al.*, 1999,2000) .

## **2.6 *Fibrobacter succinogenes* COMO INDICADOR ESPECÍFICO DE CONTAMINACIÓN ORGÁNICA DE ORIGEN BOVINO EN AGUAS SUPERFICIALES**

### **2.6.1 Clasificación taxonómica**

Super reino:	Bacteria
Super phylum :	Fibrobacteres/Acidobacteria
Phylum:	Fibrobacteres
Clase:	Fibrobacteres
Orden:	Fibrobacterales
Familia:	Fibrobacteraceae
Genero:	<i>Fibrobacter</i>
Especie:	<i>Fibrobacter succinogenes</i>

Tomado de la pagina web:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=834&lvl=3&keep=1&searchmode=1&unlock> Fecha de consulta: 23 Mayo de 2005

### 2.6.2 Características generales

*Fibrobacter succinogenes* es un coco bacilo ruminal, gram negativo, con un diámetro de 0.3-0.4µm por 0.8-2.0µm de longitud; su pleomorfismo es característico y se presenta en formas pequeñas o largas, se pueden encontrar solos, en pares o aun en formaciones en rosetas. En cultivos viejos, se puede lisar fácilmente o encontrar formas elipsoidales y esféricas de tamaño variable (Hobson,1998).

Las colonias de *F.succinogenes* son visibles en agar celulosa con una zona clara correspondiente a la digestión de este sacárido; las colonias en agar fluido ruminal, glucosa y celobiosa tienen forma lenticular, con un diámetro aproximado de 1-3mm. Su superficie es ligeramente convexa entre translúcida y opaca, no pigmentada y ocasionalmente amarilla (Buchanan y Gibbons,1974)

*F. succinogenes* es la principal bacteria fibrolítica del rumen de ganado bovino y ovejas (Stewart *et al.*, 1982). Cuando los rumiantes han sido alimentados con forrajes de baja calidad y se realizan métodos de cultivo tradicional se encuentra en gran cantidad (Esaki *et al.*, 1982) al igual que cuando se han usado herramientas moleculares (Tajima *et al.*, 2001).

El género *Fibrobacter* incluye cepas con un alto grado de variación genética (Kopečný *et al.*, 2003 y Ramsak *et al.*,2000). Actualmente, se conocen solo dos especies *F. succinogenes* y *F. intestinalis* las cuales presentan menos de un 20% de homología de ADN (Amann *et al.*, 1992). La especie *F.intestinalis* proviene de animales monogástricos y ratas, mientras que *F.succinogenes* proviene de poligástricos. Aunque Amann *et al.*, en 1992 propusieron que habían cepas de *F. intestinales* provenientes de bovinos, Bera-Maillet *et al.*, mediante los resultados de su estudio en el 2004 sugieren que todas las cepas de *F. succinogenes* son diferentes a las de *F. instestinalis* y que son de orígenes diferentes, confirmando además la

diversidad genética de nuevos aislamientos de *Fibrobacter* y la homogeneidad genética en términos de filogenia del grupo *F. succinogenes* (Figura. 5)

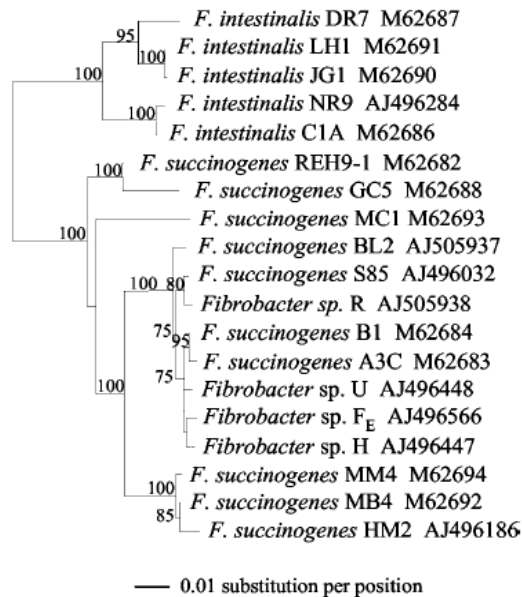


Figura 5. Árbol filogenético a partir de las secuencias del gen 16S rRNA de diferentes cepas de *Fibrobacter*. Bérra-Maillet *et al.*, 2004.

Por otra parte, estos mismos investigadores confirmaron la especificidad del sistema fibrolítico del género *Fibrobacter* mediante la amplificación específica por PCR de los genes de la glicosil hidrolasa (*endB*, *cel3*, *aelF*, y *xynC*), demostrando mediante el diseño de primers específicos, la ausencia de estos genes en otras bacterias fibrolíticas del rumen como lo son *R. albus*, *R. flavefaciens* y *Prevotella ruminicola*.

Esta bacteria presenta un crecimiento óptimo a 40°C y una sobrevivencia entre 30-38°C. Esta bacteria celulolítica no crece a temperaturas tan bajas como 22°C ni tan elevadas como 45°C (Buchanan y Gibbons, 1974). Sin embargo, su ADN se puede recuperar de aguas oxigenadas que se encuentran a 22°C hasta 48 horas después de su incorporación a este ambiente (Schulz *et al.* 2004).

### **2.6.3 ¿Por qué cuantificar *Fibrobacter succinogenes* en aguas superficiales?**

La cuantificación de este microorganismo especie-específico por una técnica molecular como PCR en tiempo real en aguas superficiales que reciben los vertimientos de plantas de beneficio de ganado y explotaciones tradicionales de crianza de bovinos, se podría convertir en una herramienta de análisis para que los entes reguladores puedan ejercer políticas de control ambiental con respecto a la contaminación orgánica de origen bovino que llega al río por esta clase de actividades.

La presencia de *F. succinogenes* se ha comprobado su presencia tanto en fluido ruminal como en las heces del ganado que son los principales vertimientos orgánicos que liberan los mataderos sin ningún tratamiento previo de forma directa a las fuentes de agua (Guía ambiental para mataderos, 2003). Además, esta bacteria no crece en condiciones aeróbicas y que por la dieta en la cual se someten los animales que van para consumo humano en el país, predomina en su flora ruminal y en las heces vertidas a los ríos.

Por otra parte, este microorganismo ya ha sido sugerido como indicador especie-específico de contaminación fecal por ganado rumiante usando técnicas moleculares como Electroforesis en gel por densidad de gradiente (DGGE) en una investigación realizada en la Universidad del sudoeste de Louisiana (Schulz, C. et al., 2003).

La técnica de PCR en tiempo real permitiría monitorear la población de *F. succinogenes* en aguas superficiales y generar datos no solo cualitativos sino cuantitativos de manera confiable.

Por esta razón, este estudio propone implementar el uso de una técnica molecular altamente sensible y específica como lo es PCR en tiempo real para detectar y cuantificar la población de *F. succinogenes* en aguas superficiales sometidas al vertimiento de plantas de beneficio de ganado y explotaciones tradicionales de crianza de bovinos

El estudio se realizará en las aguas superficiales de una parte del tramo del río Tunjuelito considerado por el DAMA como sector de "afectación de Cánicos" y servirá como herramienta para los programas de gestión ambiental en sus diferentes etapas de ejecución en lo que se refiere al vertimiento de residuos líquidos y sólidos por esta clase de industrias.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en el centro de investigaciones de CORPOICA C.I. Tibaitatá usando las instalaciones e infraestructura del Laboratorio de Microbiología Molecular del Programa Nacional de Fisiología y Nutrición Animal de la Corporación.

#### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizó la cepa *F.succinogenes* B20105 del Banco de Germoplasma de Microorganismos con interés en Nutrición Animal de CORPOICA C.I. Tibaitatá como microorganismo de referencia para realizar la curva de calibración en el equipo de PCR en tiempo real y validar la utilidad de dos parejas de primers ya reportadas para la detección de la especie *F.succinogenes* en contenido ruminal.

La cepa provino de las heces recolectadas de un bovino de la raza blanca orejinegro perteneciente a la Universidad de Antioquia en Medellín e inicialmente fue identificada por su crecimiento en medio selectivo, coloración de Gram y su morfología en microscopia de contraste.

#### 3.2 PCR DIRECTA

Para llevar a cabo esta metodología de PCR en donde el templado de ADN que se utiliza son las mismas células, es necesario realizar un proceso de fijación a partir de un cultivo puro fresco que se halle preferencialmente en fase media exponencial (Rodríguez,2005)

### 3.2.1 Fijación de células

- Se tomó 1ml de un cultivo puro en fase media exponencial y se transfirió a un eppendorf limpio de 1.5ml.
- Se centrifugó a 14000rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- El pellet de células fue resuspendido en 200µl de H<sub>2</sub>O destilada estéril y se almacena a -20°C hasta su uso\*

\*Si las células son Gram + se deben almacenar a -20°C como mínimo dos horas antes de utilizarse como templado. Si las células son Gram- la solución se puede utilizar inmediatamente en la reacción de PCR.

### 3.2.2 Reacción de PCR directa

Después de tener las células ya fijas se realizó una PCR con las condiciones descritas en la tabla 2 y los reactivos Expand™ High Fidelity de Boehringer Mannheim. Los primers empleados fueron los reportados por Tajima *et al.*, en el 2001 (Tabla 1, Figura 6) con lo cual se espera una banda de aproximadamente 446bp.

**Tabla 1.** Primers para la detección de *F. succinogenes* por PCR cualitativa y cuantitativa (Tajima *et al.*, 2001)

	Cepa	Primer Forward	Primer Reverse
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	ATCC 19169 <sup>T</sup>	5'-GGTATGGGATGAGCTTGC-3'	5'-GCCTGCCCOCTGAACATC-3'



```

GAAATACCCG TGCCAACGCG CGGTAAATGT CCAGGAGAGT GGCCCTCCGC 150
ATGGAGGGTT GACTAGAGAT TTATCGGTAT GGGATGAGCT TCGTCCGAT 200
TAGCTAGTTG GCGGGGCAAC GGCCACCAA GGCACGATC GGTAGCCGGC 250
CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ATTGGGACTG AGATACGGCC CAGACTCCTA 300
CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TATTGCACAA TGGGGGAAAC CCTGATGCAG 350
CAACGCCACG TGTGGGAAGA AGCATTTCGG TGTGTAAACC ACTGTTCATGA 400
GGGAATAAGG CCCGCCCTCG GCGGGGATTG AATGTACCTT GAGAGGAAGC 450
ACCGCAAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAGGG GTGCAAGCGT 500
TGTTCCGAAT TACTGGGCGT AAAGGGAGCG TAGGCGGAGA TTCAAGCGGA 550
TTGTACAATC CCGGGGCCCA ACCCGGCTC TGCAGTCCGA ACTGGATCTC 600
TTGGATAATT CAGGGGCAGG CGGAATTCCT GGTGTAGCGG TGAATGCGT 650
AGAGATCAGG AAGAACACCG ATGGCGAAGG CAGCCTGCTG GGGACTTATC 700
GACGCTGAGG CTCGAAAGTG CGGGTAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT 750

```

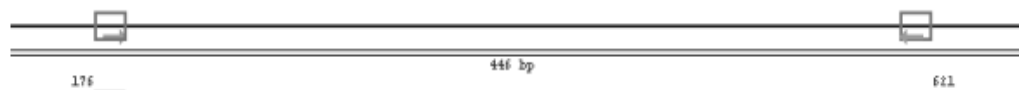


Figura 6 Anillamiento de los primers reportados por Tajima *et al*(2001) sobre la secuencia de *Fibrobacter succinogenes* S85 reportada en el GenBank bajo el número de acceso AJ496032 (Programa Primer express 20)

Tabla 2. Mezcla de reacción para PCR directa

Reactivos	Volumen	Concentración final
Buffer 10X	2.5µl	1X
PCR nucleotidmix 10mM	0.5µl	200µM
Primer Forward 10µM	0.5µl	200nM
Primer Reverse 10µM	0.5µl	200nM
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1µl	2mM
Taq polimerasa	0.4µl	1.4U
AguaparaPCR	176µl	
ADN	2µl	
Volumen final	25µl	

### 3.2.2.1 Perfil térmico

Las mezclas de reacción fueron sometidas a un ciclo de 95°C durante 3 min, treinta y cinco ciclos de 95°C durante 30s, 62°C durante 30s y 72°C durante 1min, un ciclo de 72°C

durante 2 min y 4°C por 24 h utilizando un termociclador PTC-100 de MJ Research para generar los productos de PCR.

Los amplicones fueron separados en geles de agarosa con TBE 1X al 2% y teñidos con bromuro de etidio.

### 3.3 PCR CONVENCIONAL

#### 3.3.1 Reacción de PCR convencional

A diferencia de la PCR directa, el templado que se utiliza en esta técnica es el ADN obtenido de un cultivo puro de *F. succinogenes* B20105.

**Tabla 3.** Mezcla de reacción para PCR convencional (Tajima *et al.*, 2001)

Reactivos	Volumen	Concentración final
Buffer 10X	2.5µl	1X
PCR nucleotid mix 10mM	0.5µl	200µM
Primer Forward 10µM	0.75µl	300nM
Primer Reverse 10µM	0.75µl	300nM
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1µl	2mM
Taq polimerasa	0.4µl	1.4U
AguaparaPCR	18.1µl	
ADN	1µl	
Volumen final	25µl	

#### 3.3.2 Perfil térmico

Las mezclas de reacción fueron sometidas a un ciclo de 95°C durante 3 min, treinta y cinco ciclos de 95°C durante 30s, 62°C durante 30s y 72°C durante 1min, un ciclo de 72°C durante 2 min y 4°C por 24 horas utilizando un termociclador PTC-100 de MJ Research para generar los productos de PCR. Los amplicones fueron separados en geles de agarosa con TBE 1X al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio.

### **3.4 VALIDACIÓN DE PRIMERS ESPECIE –ESPECIFICA**

La especificidad de los primers reportados por Tajima *et al.*, en el 2001 (Tabla 1) se evaluó sobre la cepa Fs B20105 por técnicas de PCR cualitativa empleando las condiciones reportadas en las tablas 2 y 3. Además, se comprobó su utilidad para detectar la especie de interés en una dilución con heces frescas de ganado bovino (Figura 9). Todos los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa con TBE 1X al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio.

### **3.5 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Para llevar a cabo la extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras ambientales de agua y de la cepa utilizada como control positivo se ensayaron varios kits comerciales, pero al no obtener un ADN de alta calidad (Radio >1.8), se decidió ensayar con el protocolo reportado por Boström *et al.* (2004) para obtener ácidos nucleicos de alta calidad a partir de muestras de agua marina. Se realizaron algunas modificaciones para eliminar restos de proteína y obtener un ADN más puro.

#### **3.5.1 Optimización de la metodología para la extracción de ADN a partir de muestras de agua superficial**

En la realización de esta optimización se usó un diseño factorial de 2 X 2 sobre el protocolo original de Boström *et al.* (2004) (Figura 7), utilizando como muestra una dilución 1:1000 en agua con heces frescas de ganado y los siguientes factores.

**A:** Añadir un paso inicial de centrifugación a 300g X 5min para precipitar las partículas grandes y pasar el sobrenadante a un tubo nuevo

**B:** Protocolo de Brostrom *et al.*, (2004)

**1:** Añadir extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamil (125:24:1) al finalizar la lisis celular y antes de iniciar la recuperación de ADN

2: Seguir el protocolo de Brostrom *et al.*, (2004)

Mediante la combinación de estos factores, se lograron 4 tratamientos: A1, A2, B1 y B2. La concentración y el radio  $A_{260}/A_{280}$  de las muestras de ADN se midieron en un espectrofotómetro marca Eppendorf adicionando a la cubeta 73µl de agua destilada estéril y 2µl de la muestra. Además se visualizaron las muestras de ADN en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de Etidio (Figura 10). Los resultados se pueden observar en la tabla 7.

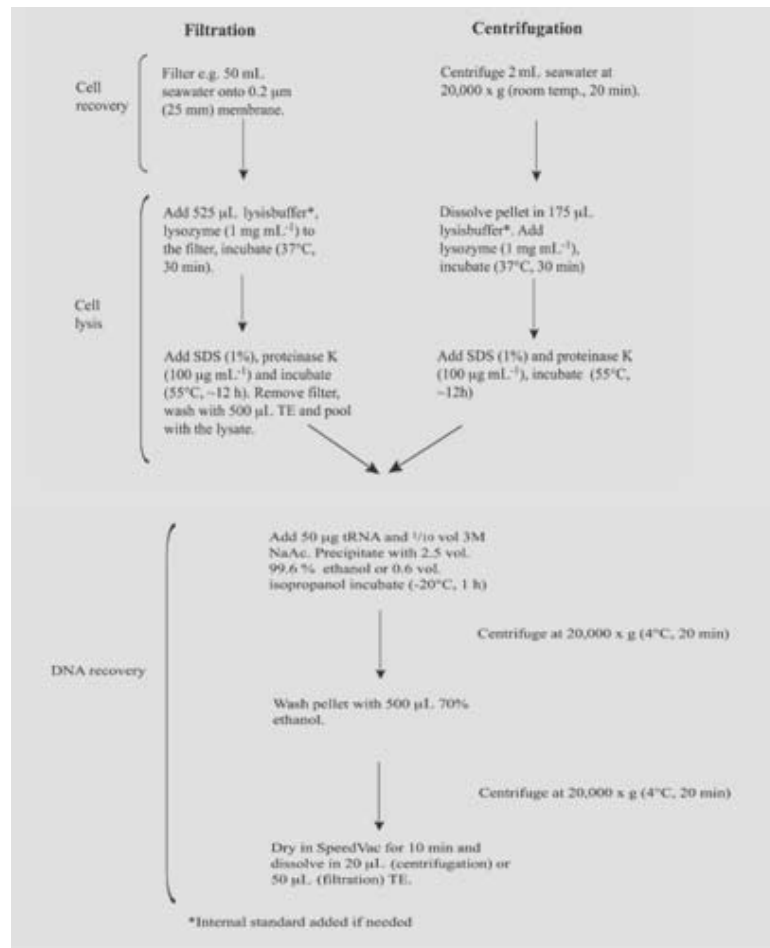


Figura 7. Protocolo para la extracción de ADN a partir de muestras de aguas marinas. Boström *et al.* 2004.

### 3.6 DETECCIÓN DEL ADN *Fibrobacter succinogenes* EN AMBIENTES ACUÁTICOS AERÓBICOS

Para determinar que una bacteria anaeróbica especie-específica como *F.succinogenes* puede ser útil como indicador de contaminación por materia orgánica de origen animal (heces y contenido ruminal), se realizó un ensayo en el cual se buscaba determinar la permanencia de su material genético en aguas oxigenadas a temperatura ambiente 20-22°C.

Se realizó una dilución 1:1000 de heces frescas de ganado la cual se dejó en condiciones de aerobiosis y temperatura ambiente (20°-22°C) durante 48 horas, tomando alícuotas de 2 ml a las 0,4,8,12,16,24 y 48 horas respectivamente y almacenándolas a -20°C hasta su uso (Schultz,2004).

Se extrajo el ADN según las condiciones ya estandarizadas y se realizó una PCR cualitativa con las condiciones descritas en la tabla 2 y los primers especie-específicos reportados por Denman & McSweeney , en el 2005 (Tabla 6).

### **3.7 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA B20105 (Control positivo)**

Después de confirmar por técnicas moleculares que la cepa B20105 sí pertenecía a la especie *F. succinogenes*, se realizó una curva de crecimiento para determinar la fase media exponencial del cultivo y así realizar un recuento en medio sólido de células por la técnica Roll-tube (Hungate,1968), como primer paso para establecer la curva de calibración para desarrollar la técnica de PCR en tiempo real. La cinética de crecimiento se realizó siguiendo la metodología estandarizada por Arcos (1998) para la determinación de la cinética de crecimiento *in vitro* de especies bacterianas celulolíticas ruminales a partir de un cultivo fresco utilizando el medio celobiosa-glucosa al 0.5%.

#### **3.7.1 Instrumental para el manejo de microorganismos anaeróbicos**

**Red de gasificación**, se usó para asegurar el flujo continuo de CO<sub>2</sub> en la preparación de medios de cultivo

**Cámara de flujo laminar con sistema de conducción de CO<sub>2</sub>**, para manejar los medios e inóculos en forma estéril.

**Tubos tipo Hungate de 16 X 25mm con tapón**

**Medio glucosa-celobiosa 0.5%**, para realizar la curva de crecimiento por densidad óptica y el conteo en Roll-tube (Ver preparación de medios en la técnica Roll-tube)

### 3.7.1.2 Procedimiento

Se tomó un cultivo de 24 horas a 39°C de la cepa de interés y en la cámara de flujo laminar con sistema de conducción de CO<sub>2</sub> se inoculó por triplicado 10µl del cultivo en 10ml del medio de crecimiento líquido celobiosa-glucosa 0.5%. En el tiempo cero se leyeron las absorbancias con los medios inoculados en un espectrofotómetro a 620 nm, después los tubos fueron incubados a 39°C y el crecimiento de la cepa se monitoreó por lectura de la absorbancia cada hora hasta que se observó la fase estacionaria. Los resultados se observan en la tabla 8 y la figura 12.

Para evaluar cuantitativamente los diferentes parámetros de la curva de crecimiento se utilizó el modelo matemático de Gompertz el cual describe un comportamiento sigmoideal uniforme (continuo) con un punto de inflexión fijo (Lopez *et al.*, 2000), mediante la conversión de los coeficientes matemáticos (a,b,c) en parámetros con significado biológico como la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ), el tiempo lag y el asintote (A) (Riguelato, 1975). Esta reparametrización es posible derivando los parámetros biológicos a partir de la función básica de crecimiento y sustituyéndola en su respectiva ecuación (Figura 13).

### Ecuación de Gompertz

$$Y = a \cdot \exp(-\exp(b - c \cdot t))$$

e= Numero Eurliano = 0.718281

$\mu=(a.c)/e$

Lambda=  $(b-1)/c$

A=a

### **3.7.2 Técnica roll-tube (Hungate,1968)**

#### **3.7.2.1 Preparación de medios**

##### **3.7.2.1.2 Materiales generales**

-Botella scott	-Probetas	-Gradillas
-Agitador automatico	-Micropipetas y puntas	-Autoclave
-Balanza	-Baño maría	-Red de gasificación
-Agujas Wintrobe	-Jeringas de 5ml	(CO <sub>2</sub> )

##### **3.7.2.1.3 Medio de dilución**

Reactivos para 100ml de medio: 15 ml de Solución salina I, 15 ml de Solución salina II (Anexo 2), resazurin 0.1 ml como indicador redox, agua destilada 40ml, bicarbonato de sodio 0.6gr, HCl cisteina 0.1gr como agente reductor, agua adicional 29.2ml

##### **3.7.2.1.3.1 Procedimiento**

Se mezclaron todos los componentes del medio a excepción del bicarbonato de sodio y la HCl cisteina. Después de ajustar el pH del medio a 7.2, se adicionó el bicarbonato de sodio y esta mezcla se sometió a ebullición durante 10 min. Después el medio fue gasificado con CO<sub>2</sub> para adicionar la HCl cisteina (Lowe *et al.*, 1985 y Wellman,1997). Del medio preparado se tomó un volumen de 9 ml en tubos Hungate en condiciones estrictas de anaerobiosis y se llevó al autoclave por 15 min a 21lb y 121°C.

#### **3.7.2.1.4 Medio de cultivo caldo-agar celobiosa-glucosa 0.5%**

##### **3.7.2.1.4.1 Materiales**

Reactivos para 100ml de medio: 15 ml de Solución salina I, 15 ml de Solución salina II, fluido ruminal clarificado y filtrado 40ml, extracto de levadura 0.25gr, celobiosa 0.5gr, glucosa 0.5gr, resazurin 0.1 ml como indicador redox, agua destilada 40ml, bicarbonato de sodio 0.6gr, HCl cisteina 0.1gr como agente reductor, agua adicional 28.81ml. Para hacer conteo en medio sólido se debe agregar 1.5gr de agar (Rasmussen *et al.*, 1988).

##### **3.7.2.1.4.2 Procedimiento**

Se mezclaron todos los componentes del medio a excepción del bicarbonato de sodio y la HCl cisteina. Después de ajustar el pH del medio a 7.2, se adiciono el bicarbonato de sodio y la mezcla se sometió a ebullición durante 10 min. Después el medio fue gasificado con CO<sub>2</sub> para adicionar la HCl cisteina (Lowe *et al.*, 1985 y Wellman,1997). Del medio preparado se tomó un volumen de 4.5 ml en tubos NMP en condiciones estrictas de anaerobiosis (Bryan, 1972 y Hungate,1966) los cuales fueron sellados con agrafe y se llevaron al autoclave por 15 min a 21lb y 121°C antes de ser utilizados.

##### **3.7.2.2 Siembra de la muestra en Roll-tube**

Se tomo un cultivo fresco y puro de la cepa *F. succinogenes* B20105 en medio celobiosa-glucosa 0.5% en una D.O de 0.5 (Fase media exponencial) y se realizaron las diluciones desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-9</sup>. Posteriormente, se seleccionaron las diluciones 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>,10<sup>-8</sup>,10<sup>-9</sup> para facilitar el conteo de UFC (Unidades formadoras de colonia) y se sembraron en el medio de crecimiento agar celobiosa-glucosa 0.5% tres replicas de cada dilución tomando 0.5ml de cada una de las diluciones con una jeringa gasificada con CO<sub>2</sub>. Los tubos



inoculados se colocaron en el roll-tube (Hungate, 1969 y Mojica, 1963) que es un sistema que permite girar los tubos mientras reciben una caída constante de agua permitiendo una distribución homogénea del medio inoculado a lo largo de la pared del tubo hasta que este se solidifique. Una vez terminado el proceso los tubos se incubaron a 39°C por 24-72 horas (Hennig y Vander,1978). El objetivo de realizar este conteo fue obtener y amplificar con los primers ya validados el ADN de la especie de interés, a partir de un número conocido de células y así realizar la curva de calibración en PCR en tiempo real (Lleo *et al.*, 2005).

### **3.8 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Fibrobacter succinogenes* POR PCR EN TIEMPO REAL (PCR-TR) EN AGUAS SUPERFICIALES**

#### **3.8.1 Diseño experimental**

Se recolectaron cuatro muestras instantáneas de agua por duplicado y solo de la parte superficial de la fuente de agua (0.3m abajo de la superficie), a partir de cuatro puntos previamente establecidos en un tramo del recorrido del Río Tunjuelito sometido a los vertimientos de una planta de beneficio de ganado y explotaciones de crianza de bovinos. Todas las muestras se recolectaron a la misma hora y en días diferentes teniendo en cuenta las recomendaciones que brinda la guía para el monitoreo y seguimiento del agua del Instituto de Hidrología, meteorología y estudios ambientales (IDEAM) del 2004. Las 32 muestras analizadas pertenecían a cuatro sitios diferentes organizados de la siguiente manera: Punto 1, finca urbana con bovinos 1km antes de incorporar el vertimiento generado por una planta de beneficio de ganado bovino al cuerpo de agua, punto 2, zona de mezcla de la planta de beneficio antes de que el recorrido del río tenga acceso a una zona expendios de carne, punto 3, inmediatamente después de esta zona y un punto 4, sitio de pastoreo para ganado a 1km de distancia del último sitio de muestreo. Las muestras fueron

recolectadas en tubos falcon estériles de 50ml y almacenadas a 4°C hasta el momento de comenzar los análisis respectivos (Figura 8).



Figura 8. Puntos de muestreo a lo largo del Río Tunjuelito

### 3.8.2 Análisis estadístico

Todas las muestras de ADN fueron analizadas por cuadruplicado en el equipo de PCR en Tiempo Real bajo las condiciones descritas. Después todos los valores Ct fueron calculados con el mismo Threshold position. Se obtuvo el promedio, la desviación estándar, el error estándar de la media y el coeficiente de variación por cada una de las replicas obtenidas durante el muestreo. La distribución homogénea de los datos se determinó con el coeficiente de variación. Finalmente, se calculó el promedio por cada uno de los puntos y se estableció el número de células por mililitro.

### 3.8.3 Curva estándar

Antes de determinar cuantitativamente la concentración de ADN específico de *F.succinogenes* por PCR en tiempo real en las muestras de agua en un tramo del río Tunjuelito, se construyó una curva estándar extrayendo el ADN de un cultivo puro de *F.succinogenes* B20105 con un número conocido de células y haciendo diluciones de este (Lleo *et al.*,1999,2005).

Para realizar esta curva, la extracción de ADN se hizo a partir de 2ml de un cultivo puro con un número conocido de células según el protocolo ya estandarizado. Después de extraer el ADN y cuantificarlo se procedió a hacer las diluciones en un rango de 1000ng/μl hasta 0,00001ng /μl (0.01pg/μl) que corresponden a una concentración de células que va desde  $4 \times 10^8$  células/ml hasta 4 células/ml.

Como marcador de los productos de amplificación de la reacción se utilizó Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG de Invitrogen con un volumen final de reacción de 25 μl (Tabla 4); además se utilizó ROX para normalizar las fluctuaciones en la señal fluorescente no relacionadas con la PCR. La detección del producto fluorescente se realizó en el último paso de cada ciclo. Las medias y desviaciones estándar fueron calculadas a través de replicas de cada una de las muestras de ADN.

### 3.8.4 Reacción de PCR en Tiempo Real

Tabla 4. Mezcla de reacción para PCR en tiempo real (Modificación de IAEA, 2004)

Reactivos	Volumen	Concentración final
2x SYBR Master mix	12.5µl	1X
50x ROX	0.5µl	1X
Primer Forward 10uM	0.75µl	0.5uM
Primer Reverse 10uM	0.75µl	0.5uM
Agua	9.5µl	
ADN templado	1µl	
Volumen final	25µl	

#### 3.8.4.1 Perfil térmico

La amplificación incluyó un ciclo de 95°C durante 10 min, 45 ciclos de 95°C durante 15s, 62°C durante 1min y 72°C durante 30s. La detección del producto fluorescente se realizó en el último paso de cada ciclo. La curva de disociación se obtuvo con un ciclo de 95 °C X 2 min, 60°C X 15s y un incremento de la temperatura 55 °C a 95°C, 0.5°C/lectura.

#### 3.8.5 Cuantificación absoluta

Para llevar a cabo la cuantificación absoluta de *F. succinogenes* en cada uno de los puntos, se tuvo en cuenta la ecuación generada por la curva estándar y se hizo la conversión del templado inicial de picogramos de ADN/µl al número de células/ml.

**(Ver anexos)**

## 4. RESULTADOS

### 4.1 VALIDACIÓN DE PRIMERS ESPECIE –ESPECIFICA

Después de realizar varios ensayos modificando las condiciones de astringencia de la reacción de PCR para realizar la identificación molecular de la cepa *Fibrobacter succinogenes* B20105 y evaluar la especificidad de los primers especie–especifica diseñados por Tajima *et al.* (2001), no se obtuvo ninguna banda. Por esta razón, se optó por ensayar la detección y cuantificación de la población de esta bacteria utilizando la pareja de primers reportada por Denman & McSweeney (2005) (Tabla 6).

**Tabla 6.** Primers para la detección de *F.succinogenes* por PCR cualitativa y cuantitativa (Denman & McSweeney 2005)

	Primer Forward	Primer Reverse
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	5'GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA-3'	5'-CGCCTGCCCTGAACTATC-3'

El sitio de anillaje de estos primers sobre la secuencia parcial del gen ribosomal 16S de *Fibrobacter succinogenes* S85 y el tamaño del producto de PCR se pueden observar en la figura 8.

CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ATTGGGACTG AGATACGGCC CAGACTCCTA	300
CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TATTGCACAA TGGGGGAAAC CCTGATGCAG	350
CAACGCCACG TGTGGGAAGA AGCATTTCGG TGTGTAACC ACTGTCATGA	400
GGGAATAAGG CCCGCCTTCG GCGGGGATTG AATGTACCTT GAGAGGAAGC	450
ACCGGCAAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAGGG GTGCAAGCGT	500
<u>TGTTCCGAAT TACTGGCCGT AAGGGAGCG TAGGCCGAGA TTCAAGCGGA</u>	550
TTGTACAATC CCGGGGCCCA ACCCCGGCTC TGCAGTCCGA ACTGGATCTC	600
<u>TTGGATAGTT CAGGGGCAGG CGEAATTCCT GGTGTAGCGG TGGAAATGCGT</u>	650
AGAGATCAGG AAGAACACCG ATGGCGAAGG CAGCCTGCTG GGGACTTATC	700
GACGCTGAGG CTCGAAAGTG CGGGTAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT	750
AGTCCGCACC GTAACAATG CATACTGGGT GTCCGGGGGT TCCCCGGGT	800
ACCGTAGCCA ACGCGTTAAG TATGCCGCCT GGGGAGTACG TACGCAAGTA	850
TGAAACTCAA AGGAATTGAC GGGGGCCCGC ACAAGCGGTG GAGCATGTGG	900

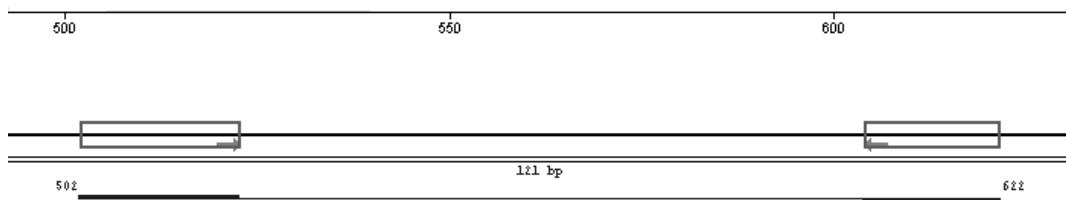


Figura 8 Anillamiento de los primers reportados por Denman & McSweeney (2005) sobre la secuencia de *Fibrobacter succinogenes* S85 reportada en el GenBank bajo el número de acceso [A496032](#) (Programa Primer Express 2.0)

Además, se desarrollo un experimento con la cepa B20105 y el ADN obtenido de una dilución 1:100 de heces frescas de ganado (Schulz, 2004) que probo la utilidad de esta pareja de iniciadores para desarrollar el objetivo de este estudio. Los resultados se pueden observar en la Figura 9.

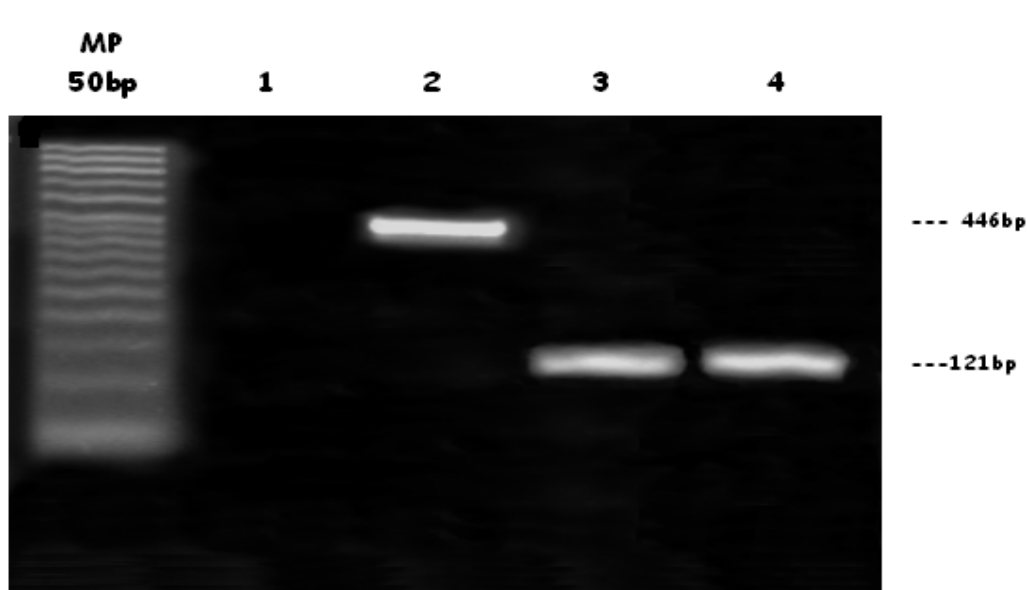


Figura 9. Amplificación por PCR de *Fibrobacter succinogenes* con dos parejas de primers

secuencia-específica. Líneas 1 y 2 primers reportados por Tajima *et al.* (2001), líneas 3 y 4 primers reportados por Denman & McSweeney (2005). Líneas 1 y 3 amplificación por PCR de un cultivo puro de *F.succinogenes* B20105, líneas 2 y 4 amplificación con ADN extraído de una dilución 1:100 de heces frescas de ganado. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

#### 4.2 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA SUPERFICIAL

Los resultados de la tabla 7 se obtuvieron de la interacción de los factores descritos en la sección de materiales y métodos.

**Tabla 7.** Optimización de la metodología para la extracción de ADN a partir de muestras de agua superficial

Tratamiento <sup>1</sup>	Concentración de ADN (ng/ul)	Radio $A_{260}/A_{280}$
A1	1854	1.94
A2	1009	1.67
B1	1187	1.89
B2	894	1.65

<sup>1</sup>Como se define en la sección de materiales y métodos.

En base a lo anterior, el protocolo que se utilizó para la extracción de ácidos nucleicos en este estudio fue el siguiente:

- Centrifugar en un tubo eppendorf 2ml de una muestra de agua a 300g durante 5 minutos para precipitar las partículas grandes
- Pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y centrifugar a 20000g durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Disolver el pellet en 175ul de buffer de lisis.
- Adicionar 3.5ul de lisozima (1mg/ml) e incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Adicionar 20ul de SDS al 1% y 1ul de proteinasa K (1mg/ml) e incubar a 55°C toda la noche.
- Adicionar un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamil (125:24:1) a la solución anterior (200ul aprox).
- Agitar durante 10s con vortex y centrifugar a 8000 rpm a temperatura ambiente durante 1 min.
- Remover cuidadosamente la fase acuosa (aproximadamente 200ul) y transferirla a un eppendorf nuevo.
- Adicionar 5ul de tRNA (10mg/ml) y 22.72ul de NaAc 3M pH 5.2 a la solución que contiene el ADN. Mezclar por inversión.
- Precipitar el ADN con 568.05ul de etanol al 99.6% e incubar a -20°C durante una hora.
- Centrifugar a 13000rpm a 4°C durante 20 minutos.
- Lavar el pellet con 500ul de etanol al 70%.
- Centrifugar a 13000rpm a 4°C durante 20 minutos.
- Secar en SpeedVac durante 10 minutos y disolver el ADN en 20ul de TE1X



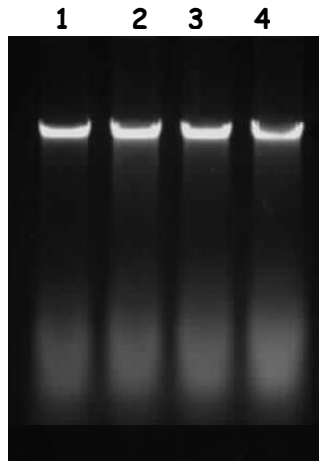


Figura 10. Visualización de las muestras de ADN en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de Etidio. Líneas 1 y 2 extracción de ADN a partir de la cepa B20105, líneas 3 y 4 extracción de ADN a partir de una dilución 1:1000 con heces frescas deganado.

#### 4.3 DETECCIÓN DEL ADN de *Fibrobacter succinogenes* EN AMBIENTES ACUÁTICOS AERÓBICOS

Al realizar la extracción de ADN de las alícuotas obtenidas a los diferentes tiempos de exposición a condiciones aeróbicas y hacer la PCR cualitativa, se logró determinar que se puede detectar la presencia de ADN de *F.succinogenes* incluso 48 horas después de su exposición directa a un ambiente aeróbico y una temperatura que oscila desde los 20°C - 22°C (Figura 11) al igual que lo reporta Schultz *et al.*, en el 2004.

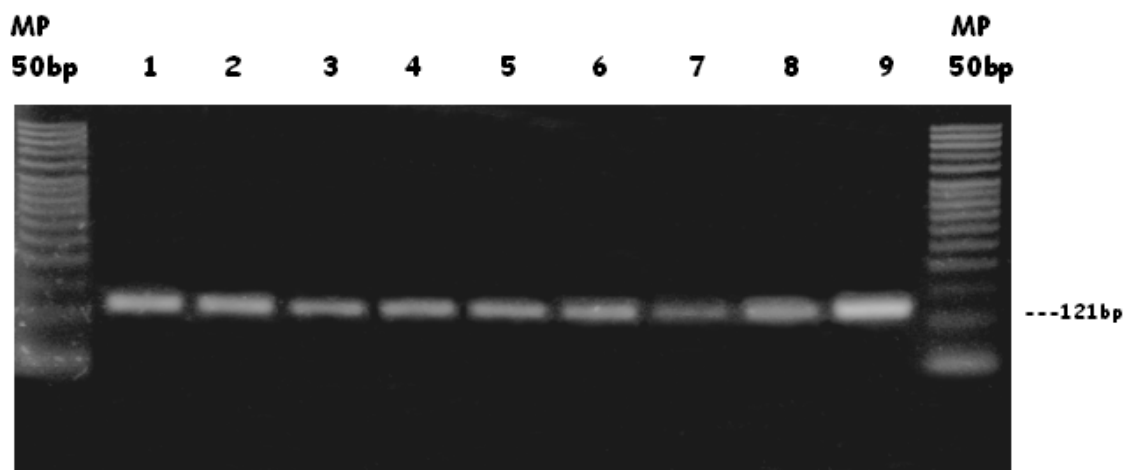


Figura 11. Amplificación por PCR de *Fibrobacter succinogenes* con primers Denman & McSweeney. Líneas 1-7 amplificación con ADN extraído de una dilución en agua de 1:1000 de heces frescas de ganado expuesta a condiciones aeróbicas y temperatura ambiente (20°C-22°C) a las 0, 4, 8, 12, 16, 24 y 48 horas respectivamente. Línea 8 amplificación con ADN extraído de un cultivo puro de *F. succinogenes* B20105 (Control positivo). Línea 9 amplificación con ADN extraído de una dilución 1:100 de heces frescas de ganado. Marcador molecular 50bp. Tamaño de banda esperado 121bp. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

#### 4.4 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA B20105 (Control positivo)

Para llevar a cabo una determinación cuantitativa del ADN específico de *F. succinogenes*, se construyó una curva estándar usando diluciones del ADN extraído de un cultivo puro de la cepa *F. succinogenes* B20105 (Leo *et al.*, 1999) en fase media exponencial. Sin embargo para realizar este paso fue necesario obtener la curva de crecimiento de la cepa y así determinar de manera precisa la densidad óptica (D.O) en la cual la bacteria se encuentra en su fase media exponencial (Figura 12).

**Tabla 8.** Datos de la curva de crecimiento de la cepa B20105 de *F. succinogenes* en medio celbiosa-glucosa 0.5%.

Tiempo (horas)	Absorbancia A620 nm			Promedio	Desviación estándar
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3		
0	0	0	0	0	0
1	0.012	0.017	0.019	0.016	0.003
2	0.033	0.033	0.042	0.036	0.005
3	0.108	0.095	0.139	0.114	0.022
4	0.381	0.34	0.454	0.391	0.057
5	0.802	0.755	0.865	0.807	0.055
6	1.161	1.144	1.203	1.169	0.030
6.5	1.32	1.298	1.322	1.313	0.013
7	1.379	1.361	1.375	1.371	0.009
7.5	1.424	1.408	1.412	1.414	0.008
8	1.444	1.414	1.433	1.430	0.015
8.5	1.444	1.425	1.428	1.432	0.010
9	1.445	1.422	1.437	1.434	0.011
9.5	1.467	1.43	1.445	1.447	0.018
10	1.453	1.43	1.441	1.441	0.011
10.5	1.46	1.432	1.431	1.441	0.016

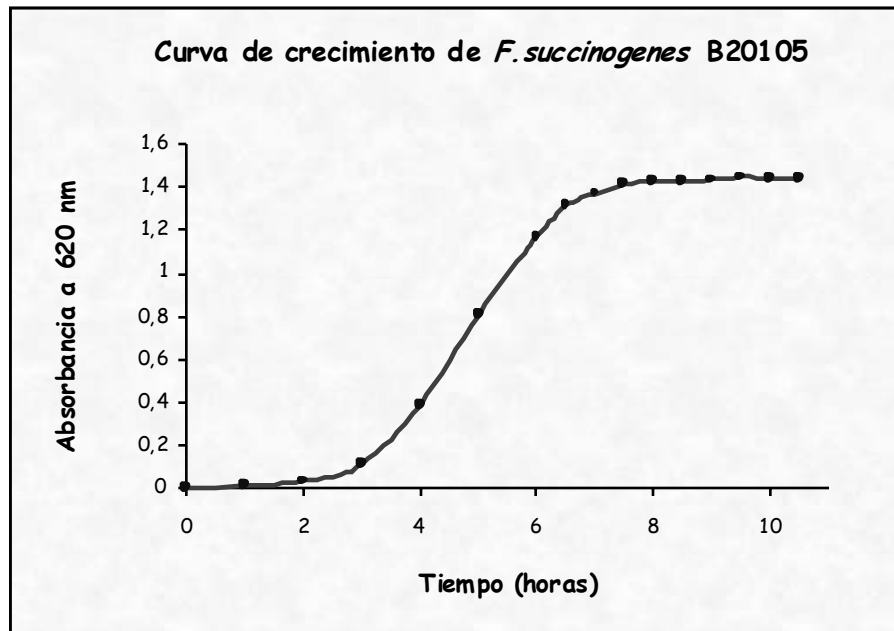


Figura 12 Curva de crecimiento de la cepa B20105 de *F. succinogenes* en medio celobiosa-glucosa 0.5%.

Se realizó una reparametrización utilizando la función exponencial de Gompertz para derivar los parámetros biológicos a partir de la función básica de crecimiento utilizando el programa Curve Expert y se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 13):

Hora al punto de inflexión: 4.315

Absorbancia al Punto de Inflexión: 0.541

Tasa Máxima de Crecimiento: 0.482

Fase Lag: 3.191 horas

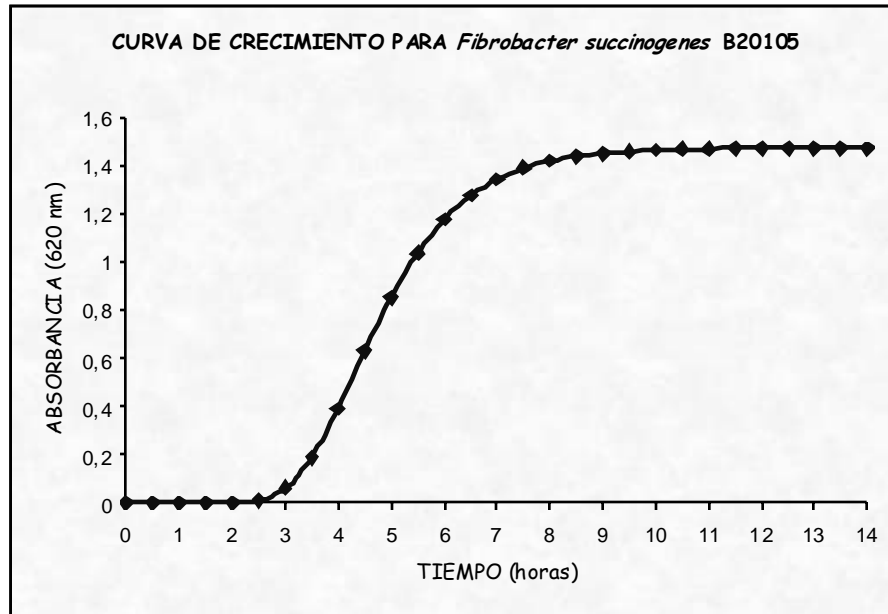


Figura 13. Ajuste del crecimiento de la cepa B20105 de *F. succinogenes* en medio celobiosa-glucosa 0.5% a la función exponencial de Gompertz.

Después de determinar que el cultivo puro de la cepa B20105 logra alcanzar la fase media exponencial a una D.O de 0.5 en medio celobiosa-glucosa al 0.5%, se realizó a técnica de Roll tube reportada por Hungate en 1968 para realizar un conteo celular y dar las bases numéricas de la curva de calibración para hacer PCR en tiempo real.

#### 4.4.1 Técnica Roll-Tube

Después de incubar los tubos en una gradilla inclinada a 39°C durante 72 horas se realizó el conteo en Roll-tube (Tabla 9 y Figura 14) tomando el promedio de las tres replicas y multiplicándolo por dos para dar el numero total de UFC/ml (Hungate, 1968). Como el objetivo de este conteo era obtener y amplificar con los primers ya validados el ADN de la especie de interés a partir de un número conocido de células y así realizar la curva de calibración en PCR en tiempo real (Lleo *et al.*, 2005), se extrajo el ADN de 2ml de cada una de las diluciones y se cuantificó utilizando un espectrofotómetro marca Eppendorf.

**Tabla 9.** Cuento por la técnica Roll-tube de *F. succinogenes* B20105 en medio agar celobiosa-glucosa 0.5%.

Diluciones	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Cuento UFC/ml
$10^{-6}$	304	330	314	$316 \times 10^6$
$10^{-7}$	30	32	35	$33 \times 10^7$
$10^{-8}$	2	2	2	$2 \times 10^8$
$10^{-9}$	0	0	0	0



**Figura 14.** Diluciones  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  en Roll-tube de *F. succinogenes* B20105

#### 4.5 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Fibrobacter succinogenes* POR PCR EN TIEMPO REAL (PCR-TR) EN UN TRAMO DEL RIO TUNJUELITO

##### 4.5.1 Curva Estándar

Se cuantificó el ADN obtenido del cultivo puro de la bacteria de interés según el protocolo estandarizado y se determinó que a partir de  $3 \times 10^8$  células/ml de un cultivo puro de *F. succinogenes* B20105 se puede obtener en promedio 768 ng/ul de ADN.

Teniendo en cuenta ese dato, se calculó que 100 ng/ul de ADN equivalen aproximadamente a  $4 \times 10^7$  células/ml y se hizo una extrapolación entre el número de células/ml y la cantidad de ADN que se obtiene a partir de ellas (Figura 15).

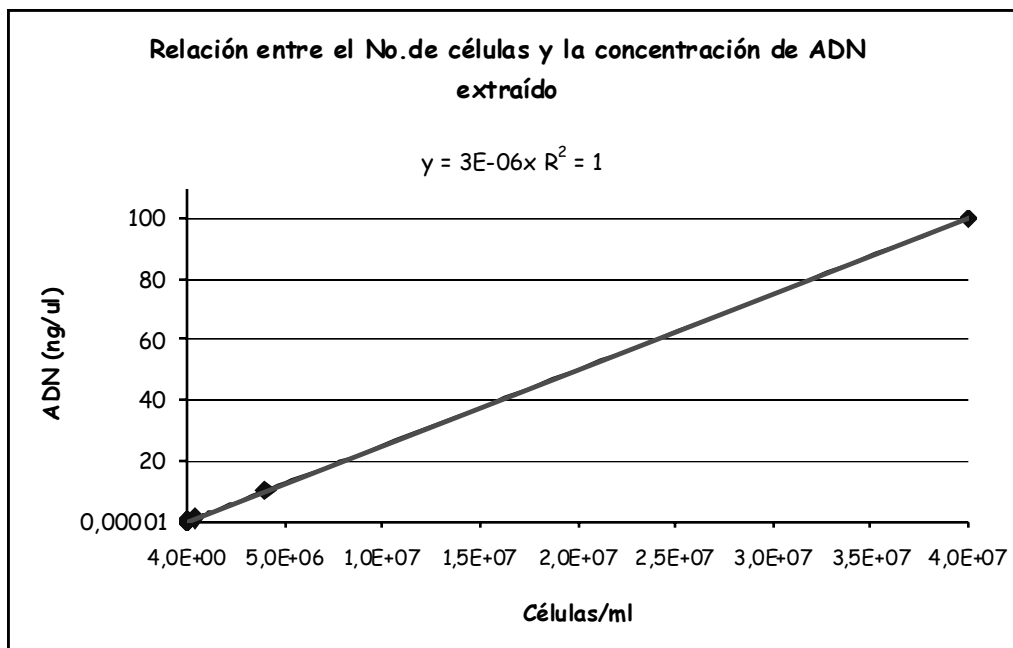


Figura 15. Determinación de la cantidad de ADN obtenido (ng/ul) a partir de un número conocido de células/ml.

**Tabla 9.** Cantidad de ADN obtenido a partir de un número conocido de células.

No.de células /ml	ADN (ng/ul)
4,0E+07	100
4,0E+06	10
4,0E+05	1
4,0E+04	0,1
4,0E+03	0,01
4,0E+02	0,001
4,0E+01	0,0001
4,0E+00	0,00001

Teniendo en cuenta las condiciones y el perfil térmico descritos en la sección de materiales y métodos se realizó la curva de calibración usando como estándares las diluciones realizadas a partir de una concentración de ADN conocido extraído de un cultivo puro de *F. succinogenes* B20105 en un rango de 1000ng/ul hasta 0.01pg/ul (Figura 16). Para disminuir el error experimental se escogieron los puntos que generaron un mayor factor de correlación teniendo en cuenta el análisis de datos que realiza el iCycler iQ™ Real – Time PCR detection System Software Versión 3.1. Como se muestra en la Figura 16 el límite de detección del ensayo fue de 10<sup>-1</sup>pg/ul con un coeficiente de correlación de 0.991, lo cual implica que se puede calcular de una manera precisa concentraciones de ADN que se hallen en un rango de 1000ng/ul-0.1pg/ul el cual corresponde a una concentración de células entre 4 x 10<sup>8</sup> -4 x 10<sup>1</sup> /ml.



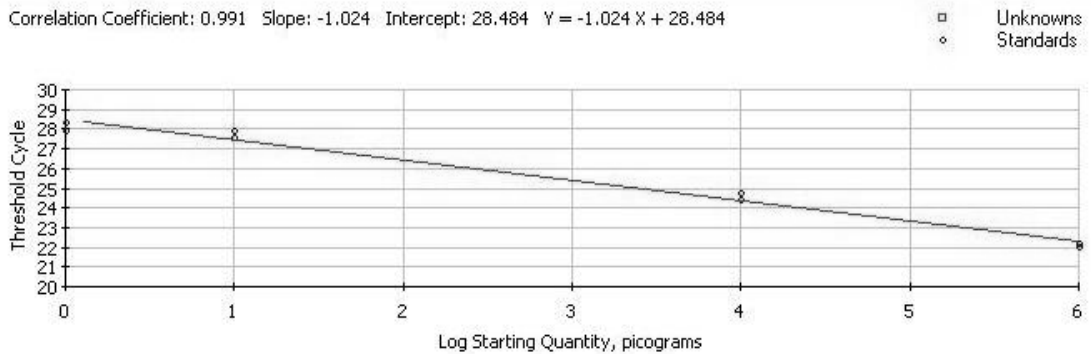


Figura 16. Curva estándar para el análisis en PCR tiempo real de *F. succinogenes* con Sybr-Green. Se reporta la ecuación y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) para la curva

#### 4.5.2 Muestreo en el río Tunjuelito

El análisis de los datos se realizó con todos los valores Ct (Ciclo umbral), teniendo un Threshold position de 6.9.

##### 4.5.2.1 Cuantificación absoluta

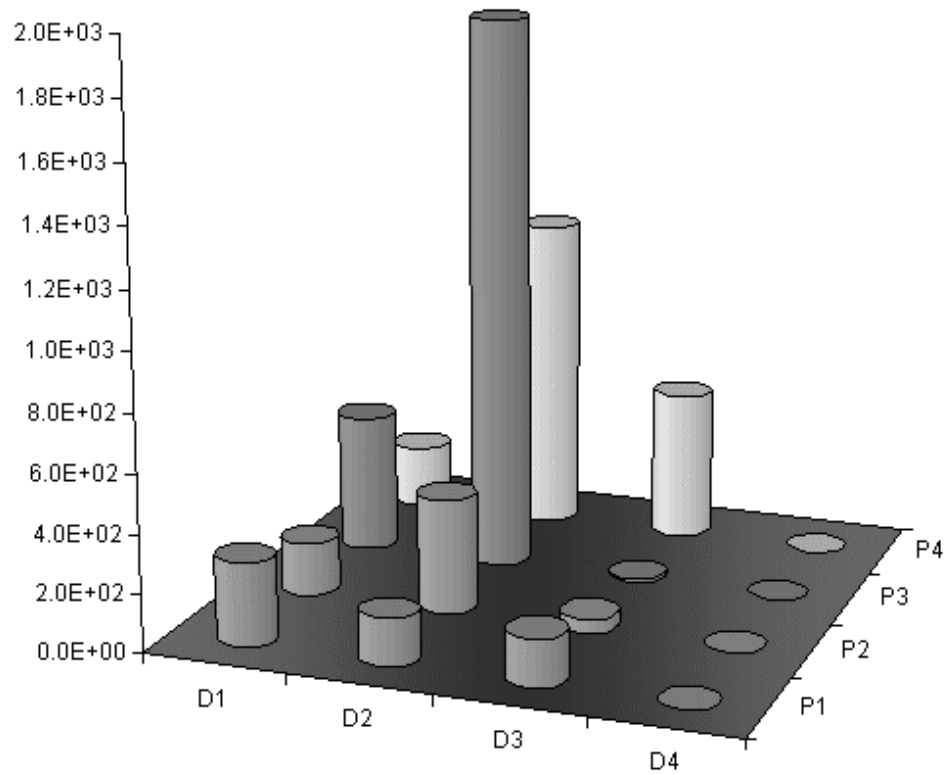
Después de obtener todos los valores Ct de los puntos muestreados sobre el río, se calculó el promedio de cada grupo de las réplicas técnicas por día y duplicado de cada una de las muestras, al igual que la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Como no se observó coeficientes de variación superiores al 5% al comparar los duplicados de las muestras, se decidió agrupar los datos por día y punto de muestreo como un solo promedio y así observar gráficamente la diferencia de la población de *F. succinogenes* en aguas superficiales sometidas a los vertimientos ya mencionados cuando se cuantifica por esta técnica (Tabla 10, figura 15)

Dia	Punto	Ct		
		Promedio	Desvest	CV
D1	Punto 1	28.55	0.57	0.32
D1	Punto 2	28.75	1.48	5.16
D1	Punto 3	28.33	0.04	0.12
D1	Punto 4	28.68	1.31	4.56
D2	Punto 1	28.80	0.12	0.12
D2	Punto 2	28.41	1.06	1.06
D2	Punto 3	27.71	0.76	2.74
D2	Punto 4	27.96	0.09	0.32
D3	Punto 1	28.80	3.19	3.19
D3	Punto 2	29.36	0.78	0.78
D3	Punto 3	30.03	2.45	2.45
D3	Punto 4	28.29	5.21	5.21
D4	Punto 1	32.29	3.37	3.45
D4	Punto 2	32.15	2.77	0.07
D4	Punto 3	31.70	2.70	3.98
D4	Punto 4	31.88	0.38	7.65

**Tabla 10.** Cuantificación de *Fibrobacter succinogenes* en muestras de agua de una zona de la cuenca del río Tunjuelito por PCR en tiempo real

**CV:** Coeficiente de variación



**Figura 15** Comparación de la población de *Fibrobacter succinogenes* en muestras de agua de una zona de la cuenca del río Tunjuelito determinada por PCR en tiempo real

## 5. DISCUSIÓN

Tanto las plantas de beneficio de ganado para consumo humano como las explotaciones tradicionales de crianza de bovinos urbanas, generan una gran cantidad de residuos sólidos, semilíquidos y líquidos que se constituyen como factores contaminantes cuando son vertidos a fuentes naturales como el agua. Dentro de los residuos que se descargan en la mayoría de los casos de forma directa a las fuentes de agua, se encuentran el estiércol, el contenido ruminal y los decomisos del matadero, los cuales consumen el oxígeno para la oxidación y estabilización de todas las fuentes de materia orgánica dentro del ecosistema acuático.

Durante muchos años, la presencia de ciertos microorganismos en los ecosistemas acuáticos como los coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Enterococcus faecalis* y bacteriófagos entre otros, se han utilizado a nivel mundial como índice de la calidad del agua o como indicación de una posible contaminación (Manual of environmental microbiology, 2002). Sin embargo, debido a la falta de correlación entre los indicadores microbianos ya utilizados, el tipo de muestras ambientales que se analizan y los métodos tradicionales de cultivo empleados para su detección, muchos investigadores se han puesto en la tarea de buscar indicadores más apropiados que no sean ubicuos y cuya presencia este directamente relacionada con la presencia de ciertos agentes contaminantes, además de explorar nuevos métodos de detección que sean rápidos, sensibles y de alta reproducibilidad.

*Fibrobacter succinogenes* es una bacteria especie-específica del rumen de bovinos que se ha encontrado en grandes proporciones en aquellos rumiantes sometidos a dietas de baja calidad (Bryant *et al.* 1953; Tajima *et al.* 2001). Teniendo en cuenta lo reportado por Schultz (2004) acerca de esta bacteria y su detección por técnicas moleculares como una buena

alternativa de un indicador de polución por materia fecal de bovinos en fuentes superficiales de agua como los ríos, en este estudio se buscó desarrollar e implementar un método de para cuantificar la población de esta bacteria en aguas superficiales como las del Río Tunjuelito, el cual recibe los vertimientos de las industrias ya mencionadas por un métodos sensible y reproducible como PCR en tiempo real.

Para realizar la detección por técnicas moleculares, inicialmente se validó la especificidad de las parejas de iniciadores reportadas por Tajima *et al.*, (2001) y Denman & McSweeney, (2005) respectivamente para la detección de *F. succinogenes*. Los primers reportados por ambos autores amplificaron la banda del tamaño esperado con el ADN extraído de la dilución con heces frescas de ganado, pero únicamente los primers reportados por el grupo de McSweeney permitieron confirmar que la cepa B20105 pertenece a la especie *F. succinogenes*.

Podría ser que la cepa tomada como referencia posee una diferencia a nivel de nucleótidos que no permite el anillaje del primer forward reportado por el grupo de Tajima, aboliendo la posibilidad de utilizar esta pareja de iniciadores para realizar la cuantificación absoluta de esta población en las muestras de agua superficial por PCR. Con base a lo anterior, para continuar con la investigación se empleó la pareja de primers reportada por el grupo de McSweeney, la cual sólo varía en la secuencia del primer forward con respecto a la pareja de iniciadores reportada por Tajima *et al.* (2001).

Para la extracción de ácidos nucleicos se probó y optimizó una metodología específica para el tipo de muestras ambientales requeridas en el estudio. Durante la optimización del protocolo, se encontró que al añadir un paso de centrifugación para precipitar las partículas grandes y utilizar fenol/cloroformo/alcohol isoamil (125:24:1) para la purificación del ADN, se obtiene un ácido nucleico de muy buena calidad (Razón  $\frac{260}{280} > 1.9$ .) y concentración, debido a que este procedimiento denatura y remueve el exceso de contaminación por proteína en la

muestra al mismo tiempo que disminuye los posibles inhibidores de la reacción de PCR sin necesidad de lavar el pellet de células.

Al utilizar PCR en tiempo real para cuantificar la población de *Fibrobacter succinogenes* en la zona de estudio, se observó una variación en el número de células por mililitro de acuerdo a las actividades que se desarrollaron en cada uno de los días y los puntos en donde se realizó el muestreo. El diseño experimental empleado, logró evidenciar que no hay diferencia significativa en los resultados obtenidos entre la toma de una muestra y su duplicado, lo cual indica que el protocolo de estandarización desarrollado para la extracción de ácidos nucleicos no es una limitante para obtener datos cuantitativos reproducibles.

La reproducibilidad de los datos se midió por el coeficiente de variación y aunque este parámetro está condicionado por varios factores como la extracción del ADN de la muestra, la amplificación, detección final de la secuencia de interés y la precisión del pipeteo, no se observaron datos superiores al 5%, lo cual indica que la técnica funciona y se puede tomar como una alternativa viable a las técnicas tradicionales de cultivo para la detección y cuantificación de la bacteria de interés.

Claramente, la técnica empleada permitió detectar y cuantificar las diferencias en cuanto a la población de *F. succinogenes* de acuerdo a la calidad de los vertimientos en una corriente de agua natural, lo cual la constituye en una herramienta de diagnóstico microbiológico molecular para que los entes reguladores puedan ejercer políticas de control ambiental con respecto a la contaminación orgánica de origen bovino que llega al río por actividades como las explotaciones tradicionales de crianza de bovinos y las plantas de beneficio de ganado. Obviamente, el dato generado por este tipo de análisis debe ser relacionado con los demás parámetros fisicoquímicos y microbiológicos que tienen en cuenta el DAMA y el IDEAM para determinar la matriz de impacto ambiental que generan los diferentes tipos de vertimientos de estas industrias sobre las fuentes de agua superficial.

Al igual que lo reportado por Lleo *et al.*, en el 2005, los resultados de este estudio confirman que la técnica molecular de PCR en tiempo real permite detectar y cuantificar la población bacteriana presente en aguas superficiales aunque no permita distinguir entre células viables y no viables. Sin embargo, se puede considerar que el ADN detectado se encuentra contenido en las células ya que la vida media del ADN que es eliminado al ambiente se considera muy corta debido a la presencia de numerosas nucleasas (Lorenz y Wackemagel, 1994).

La metodología empleada en este estudio, permitió detectar y cuantificar de forma específica el ADN del microorganismo más abundante de la flora ruminal de bovinos, en aguas superficiales de un tramo del Río Tunjuelito sometido a diferentes tipos de vertimientos. De los datos obtenidos se puede deducir que su incorporación al ecosistema acuático proviene exclusivamente de la eliminación de desechos orgánicos como rumen y estiércol.

Este método resultó ser útil, sensible y lo suficientemente específico para detectar la presencia de ADN de *F. succinogenes* en ambientes acuáticos oxigenados y podría ser una buena herramienta para monitorear la calidad microbiológica del agua, la cual le permitiría a las autoridades ambientales conocer el grado de calidad del agua para los diferentes usos y evaluar los efectos que sobre el recurso que tienen los diferentes proyectos que lo utilizan. Además, es una forma de determinar rápidamente si una fuente de agua (lago, río, estuario) tiene contaminación fecal de origen bovino, la cual entre otros datos podría ser un indicativo de que bacterias patógenas, virus o parásitos pueden también estar presentes.

*F. succinogenes* es un indicador cuya presencia esta directamente relacionada con la presencia de contaminación orgánica de origen bovino, su cuantificación por un método de detección rápido, sensible y de alta reproducibilidad lo puede convertir en una herramienta de análisis complementaria a los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos ya establecidos, para que los entes reguladores puedan ejercer políticas de control ambiental con respecto a este tipo de contaminación en fuentes naturales de agua.



## Conclusiones

Se verificó la utilidad de dos parejas de primers reportadas para la detección de la especie *F. succinogenes* en las muestras de interés

Se estableció una metodología para obtener ADN bacterial de alta calidad a partir de las muestras de agua superficial

La metodología de extracción generó datos reproducibles, ya que hubo homogeneidad en los datos obtenidos en los duplicados de las muestras

Aunque la eficiencia de la PCR en tiempo real no fue máxima, permite detectar de manera confiable el ADN de la especie de interés en muestras de agua ambientales

Los datos obtenidos por PCR en tiempo real fueron reproducibles y precisos lo cual permitió cuantificar la población *F. succinogenes* en muestras de agua superficiales

La población de *F. succinogenes* varió de acuerdo a la calidad de los vertimientos lo cual demuestra su utilidad como herramienta para los programas de gestión ambiental en sus diferentes etapas de ejecución en lo que se refiere al vertimiento de residuos líquidos y sólidos por plantas de beneficio de ganado y explotaciones tradicionales de crianza de bovinos

*F. succinogenes* es un indicador cuya presencia esta directamente relacionada con la presencia de contaminación orgánica de origen bovino, su cuantificación por un método de detección rápido, sensible y de alta reproducibilidad lo puede convertir en una herramienta de análisis complementaria a los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos ya establecidos, para que los entes reguladores puedan ejercer políticas de control ambiental con respecto a este tipo de contaminación en fuentes naturales de agua.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Winfrey, M., Rott, M., Wortman, Advanced Techniques. A. Unraveling DNA: Molecular Biology for the Laboratory. Prentice Hall;1997. Pag 198-199.

Amann, R. I., C. Lin, R. Key, L. Montgomery, and D. A. Stahl. 1992. Diversity among *Fibrobacter* isolates: towards a phylogenetic classification. *Syst. Appl. Microbiol.* 15:23–31.

American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Microbiological examination of water. En: Greenberg AE, ed. Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 18 ed. Washington, DC: APHA, AWWA, WEF, 1992:9-69-9-73

Aroos B.M.1998. Aislamiento , conservación y evaluación de la cinética de crecimiento y actividad celulolítica de cepas de *Fibrobacter succinogenes* de bovinos de pastoreo de gramíneas tropicales Tesis, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.

Bach, H-J., Tomanova, J., Schloter, M. & Munch, J. C. (2002). Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *J Microbiol Methods* 49, 235–245.

Bej, A.K., Steffan, R.J., DiCesare, J., Haff, L. and Atlas, R.M. (1990) Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 307-314.

Be'ra-Maillet, C., Ribot, Y. y Forano E. 2004. Fiber-Degrading Systems of Different Strains of the Genus *Fibrobacter*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 2172–2179.

Brauns, L.A., Hudson, M.C. and Oliver, J.D. (1991) Use of PCR in detection of culturable and non culturable *Vibrio vulnificus* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2651–2655

Briesacher, S.L., May, T., Grigsby, K.N. et al. 1992. Use of DNA probes to monitor nutritional effects on ruminal prokaryotes and *Fibrobacter succinogenes* S85. *J. Anim Sci.*, 70, 289-295.

Bryant, M. P., and L. A. Burkey. 1953. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *J. Dairy Sci.* 36:205–217.

Bryant, Mp., 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 25:1324-1328.

Boström, K.H., Simu, K., Hagström, Å., and Riemann, L. 2004. Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. *Limnol. Oceanogr.: Methods* 2, 365–373

Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. Ed. 8. Baltimore. William & Wilkins. 1974.

Carta FEDEGAN. Edición 75. <http://www.fedegan.org.co/edicion73.htm> La carne colombiana: revolución en marcha. Armando Arango r. Director ejecutivo asocarnicas

Esaki, T., and Susuki. 1982. Achromopeptidasa for lysis of anaerobic gram-positive cocci. *J. Clin. Microbiol.* 16:844-846

Fecal Contamination Source Identification Methods in Surface Water. Washington State Department of Ecology. Ecology Report #99-345. October 1999.

Gomez Giraldo Eugenio. Estudio de Impacto ambiental del Matadero EL planchón II sobre el Río Tunjuelo- DAMA . Julio de 1996.

Guerrero, Mauricio y Mandilla, José; Producción Más Limpia en una Planta de Beneficio Bovino y Porcino, Universidad de la Sabana, Chía (Cundinamarca), 2003.

Guía ambiental para mataderos Corporación autónoma regional de chivor . CORPOCHIVOR. Año 2003.

Guía Ambiental para Plantas de Beneficio del Ganado. Dirección General ambiental Sectorial. Ministerio del Medio ambiente y SAC. 2002.

Guía empresarial plantas de beneficio de ganado. Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. Republica de Colombia. Febrero de 2003.

Guía para el monitoreo y seguimiento del agua. Instituto de Hidrología, meteorología y estudios ambientales (IDEAM). Bogotá., Julio de 2004.

Harfoot, G.G. 1981. anatomy, physiology and microbiology of the ruminant digestive tract. In *lipid Metabolism in Ruminants animals*, ed. W.W Cristine. Oxford, pp.

Henning P.A., Vander Walt A.E. 1978. Inclusion of xilan in a medium for the enumeration of total culturable rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 35:1008

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences *Biotechnology (NY)*. Apr;10(4):413-7.

Hobson, P.N. 1988. The rumen microbial ecosystem. Elsevier, Applied Science, 530p.

Hobson, P.N. and Wallace, R.J. 1982. Microbial ecology and activities in the rumen. *Crit. Rev. Microbiol.*, 9:253-273.

Horz, H-P, Kurtz R, Batey D, and Bohannon B. Monitoring Microbial Populations Using Real-Time qPCR on the MJ Research® Opticon™ 2 System. Application Note Vol. 3, No. 1

Higuchi R, Folcker C., Walsh P.S., Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology* 10,413-417

- Hungate R. E. 1966. The rumen and its microbes New York and London., Academic Press,
- Hungate, R.E. 1988. Introduction: the ruminant and the rumen. In the Rumen Microbial Ecosystem. Ed.P.N. Hobson. Elsevier Applied Science. London. P 1-19
- Kopečný, J., M. Zorec, J. Mrazek, Y. Kobayashi, and R. Marinsek-Logar. 2003. *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:201–209.
- Krause, D.O and Russel, B. 1996. Symposium: Ruminant microbiology. How many ruminal bacteria are there. J.Dairy Sci 79:1467-1475.
- Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucleic Acids Res. 1993 Aug 11;21(16):3761-6.
- Leng, R.A. 1990. Factors affecting the utilization of "Poor-Quality" forages by ruminants particularly under Tropical conditions. Nutrition Research. 3: 277-303.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Appl. 1995 Jun;4(6):357-62.
- Lleo,, M.M., Tafi, M.C., Signoretto, C., Dal Cero,C. and Canepari, P. 1999. Competitive polymerase chain reaction for quantification of nonculturable *Enterococcus faecalis* cells in lake water. FEMS Microbiology Ecology 30:345-353.
- Lleo,, M.M., Bonato,B., Tafi, M.C. and Canepari, P. 2005. Molecular vs culture methods for the detection of bacterial faecal indicators in groundwater for human use. Letters in Applied microbiology, 40,289-294.
- Lopez, S.f., Guerris. W.J.J.,M.S. Humphries D.J. y Dijkstra, J. 2000. A generalized Michaelis-Menten equation for the analysis of growth. J. Anim Sciences 78:1816-1828.
- Lowe, S.E., Theodorou M.K., Trinci A.P.J., y Hespell, R.B.1985. Growth of anaerobic rumen fungi on defined and semi-defined media lacking rumen fluid. J.Gen. Microbiol.131:2225-2229
- Manual of Environmental microbiology 2<sup>nd</sup> Edition 2002. Chapter 18. Detection of Microorganisms in Environmental Freshwaters and Drinking waters. ASM Press.
- Montgomery, L., Flesher, B. & Stahl, D. (1988). Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter* gen. nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 38, 430±435.
- Nadkarni, M. A., Martin, F. E. & Jacques, N. A. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. Microbiology 148, 257–266.
- Paveen , S., and Tamplin M.L. Differentiating Sources of Fecal Contamination. Florida EUA.

- Preston, T.R., y Leng, R.A. 1989. Ajustando los sistemas de producción pecuaria a los recursos disponibles: Aspectos básicos y aplicados al nuevo enfoque sobre la nutrición de rumiantes en el trópico. Consultorias para el desarrollo rural integrado en el trópico (CONDRIT) Ltda. Cali. Colombia.
- Rasmussen M.A., Hespell R.B., Whire A.B., Bhotast R.J. ,1988. Inhibitory effects of methyl cellulosa on cellulose degradation by *Ruminococcus flavefaciens*. 54 (4):890-97
- Ramsak, A., M. Peterka, K. Tajima, J. C. Martín, J. Wood, M. E. A. Johnston, R. I. Aminov, H. J. Flint, and G. Avgustin. 2000. Unravelling the genetic diversity of ruminal bacteria belonging to the CFB phylum. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33:69–79.
- Rolfs A., Schuller U., Finckh Y., Weber R. 1992. PCR Clinical Diagnostics and Research. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K.K., Erlich H.A. 1988. Primer-Directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polimerasa. *Science*.239:486-491
- Sambrook, J. S., E. F. Fritsch, and T. Maniatis 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sánchez-Vélez A., García-Núñez R.M. Biomonitorio de ríos en la gestión de cuencas. Una aproximación introductoria. Universidad autónoma de Chapingo. IX Congreso nacional de irrigación Simposio 4 Manejo Integral de Cuencas Hidrológicas Culiacán, Sinaloa, México, 27-29 de Octubre de 1999.
- Schulz, C. J., Stant, B, and Childers G. 2004. Use of Molecular Techniques to Determine the Presence of the Anaerobic Microorganisms *Fibrobacter succinogenes* and *Bacteroides distasonis* in River Water and Investigate Their Use as Species-Specific Fecal Pollution Indicators .
- Spano,G., Beneduce,L., Terzi,V., Stanca,A.M., and Massa,S.2005. Real time PCR for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and cattle wastewater. *Letters in Applied Microbiology*.40,164-171.
- Stewart, C. S., and H. J. Flint. 1989. *Bacteroides (Fibrobacter) succinogenes*, a cellulolytic anaerobic bacterium from the gastrointestinal tract. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30:433-439.
- Suzuki, M. T., Taylor, L. T. & DeLong, E. F. (2000). Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 59-nuclease assays. *Appl Environ Microbiol* 66, 4605–4616.
- Tajima,K., Aminov, R. Nagamine, I. T., Matsui, H., Nakamura, M., and Benno,Y. Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, June 2001, p. 2766-2774, Vol. 67, No. 6
- Taylor, K.A., Paskewitz, S.M., Copeland, R.S., Koros J., Beach, R.F., Githure, J.L., Collins, F.H., 1993. Comparación of Two ribosomal DNA-based methods for differentiating members of the *Anopheles gambiae* Complex (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 30(2): 457-461

Tsai, Y.L. and Olson, B.H. (1992) Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 754-757.

Tiem, S.M., Krumme, M.L., Smith, R.L. and Tiedje, J.M. (1994) Use of molecular techniques to evaluate the survival of a microorganism injected into an aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1059-1067.

Van Gylswyk, N.O. y Van der Toorn, J.J. 1986. Enumeration of *Bacteroides succinogenes* in the rumen of sheep fed maize straws. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 38, 205-9.

Varel, V.H. y Dehority, B.A. 1989. Cellulolytic bacteria and protozoa from bison, cattle bison hybrids, and cattle fed three alfalfa-corn diets. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 148-153.

Wang, R.F., Cao W-W., Ceniglia C.E. 1996. PCR detection and quantification of predominant Anaerobic Bacteria in human and animal fecal samples. *Applied and Environmental microbiology.* 62:1242-1247.

Wellman, A. 1997. Descripción de tres hongos ruminales y sus perfiles de crecimiento en sustratos naturales. Tesis para optar al título de bacteriología. Facultad de ciencias. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Williams, D. W., M. J. Wilson, M. A. O. Lewis, and A. J. C. Potts. 1995. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* 33:2476-2479.

Williams J.F., 1989. Optimization Strategies for the Polymerase Chain Reaction. *Bio Techniques.* 7:762-768.

Witter C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., and Rasmussen R.P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22, 130-138.

Woese, C.R. Bacterial evolution. 1987. *Microbiol. Rev.*, 51, 221-271.

Anexos

**Ajuste del crecimiento de *F. succinigenes* B292 a la función exponencial de Gompertz.**

HORA	R1
0	0
1	0.012
2	0.033
3	0.108
4	0.381
5	0.802
6	1.161
6.5	1.32
7	1.379
7.5	1.424
8	1.444
8.5	1.444
9	1.445
9.5	1.467
10	1.453
10.5	1.46

Gompertz Relation:  $y = a * \exp(-\exp(b - cx))$

Coefficient Data:

a =	1.4871889
b =	3.8278902
c =	0.87940638

PARAMETRIZACION

Hora al Punto de Inflexión =	4.352811495
Absorbancia al Punto de Inflexión =	0.547106388
Tasa Maxima de Crecimiento =	0.481128848
Intercepto =	1.547156794
Fase Lag =	3.215680787

HORA	CRECIMIENTO
0	1.62114E-20
0.5	2.0509E-13
1	7.71484E-09
1.5	6.83778E-06
2	0.000541792
2.5	0.009060833
3	0.05625562
3.5	0.179058215
4	0.38026065
4.5	0.617731787
5	0.844404745



5.5	1.032773352
6	1.175832704
6.5	1.278326077
7	1.349039315
7.5	1.396653113
8	1.428213599
8.5	1.448922452
9	1.462422428
9.5	1.471186031
10	1.476859579
10.5	1.480526219
11	1.482893189
11.5	1.484420061
12	1.485404546
12.5	1.486039124
13	1.486448081
13.5	1.486711602
14	1.486881394

HORA	R2
0	0
1	0.017
2	0.033
3	0.095
4	0.34
5	0.755
6	1.144
6.5	1.298
7	1.361
7.5	1.408
8	1.414
8.5	1.425
9	1.422
9.5	1.43
10	1.43
10.5	1.432

Gompertz Relation:  $y = a * \exp(-\exp(b - cx))$

Coefficient Data:

a =	1.4587962
b =	4.0886826
c =	0.9225368

#### PARAMETRIZACION

Hora al Punto de Inflexión =	4.431999461
Absorbancia al Punto de Inflexión =	0.536661294
Tasa Maxima de Crecimiento =	0.495089793
Intercepto =	1.657576402

Fase Lag =

3.348031862

HORA	CRECIMIENTO
0	1.79245E-26
0.5	6.72703E-17
1	7.3166E-11
1.5	4.67965E-07
2	0.000117428
2.5	0.003825215
3	0.034395634
3.5	0.137368867
4	0.328890702
4.5	0.570305766
5	0.806916721
5.5	1.004282231
6	1.152839287
6.5	1.257601119
7	1.328491834
7.5	1.37522724
8	1.405534592
8.5	1.424985257
9	1.437386697
9.5	1.445261014
10	1.450247798
10.5	1.453400724
11	1.455392113
11.5	1.456649053
12	1.457442091
12.5	1.45794231
13	1.458257778
13.5	1.458456711
14	1.458582149

HORA	R3
0	0
1	0.019
2	0.042
3	0.139
4	0.454
5	0.865
6	1.203
6.5	1.322
7	1.375
7.5	1.412
8	1.433
8.5	1.428

9	1.437
9.5	1.445
10	1.441
10.5	1.431

Gompertz Relation:  $y = a \cdot \exp(-\exp(b - cx))$

Coefficient Data:

a =	1.4674005
b =	3.6169844
c =	0.86935442

### PARAMETRIZACION

Hora al Punto de Inflexión =	4.160540646
Absorbancia al Punto de Inflexión =	0.53982664
Tasa Maxima de Crecimiento =	0.469300676
Intercepto =	1.412717897
Fase Lag =	3.010261799

HORA	CRECIMIENTO
0	9.99712E-17
0.5	5.00096E-11
1	2.44975E-07
1.5	6.00265E-05
2	0.002114957
2.5	0.021228339
3	0.094500701
3.5	0.248504349
4	0.464737268
4.5	0.697009066
5	0.906178618
5.5	1.07401381
6	1.198921824
6.5	1.287442386
7	1.348213447
7.5	1.3890827
8	1.416202896
8.5	1.434044266
9	1.445715785
9.5	1.453323401
10	1.458270471
10.5	1.461482546
11	1.463566052
11.5	1.464916651
12	1.465791793
12.5	1.466358703
13	1.46672588
13.5	1.466963666
14	1.467117646

Coeficientes finales

a	1.471128533
b	3.844519067
c	0.890432533

**PARAMETRO**

Hora al Punto de Inflexión	4.315
Absorbancia al Punto de Inflexión	0.541
Tasa Maxima de Crecimiento	0.482
Intercepto	1.539
Fase Lag	3.191

HORA	CRECIMIENTO
0	3.33291E-17
0.5	1.67383E-11
1	8.42543E-08
1.5	2.24441E-05
2	0.000924726
2.5	0.011371462
3	0.061507299
3.5	0.188310477
4	0.391296207
4.5	0.628348873
5	0.852500028
5.5	1.037023131
6	1.175864605
6.5	1.274456527
7	1.341914865
7.5	1.386987684
8	1.416650362
8.5	1.435983992
9	1.448508303
9.5	1.456590149
10	1.461792616
10.5	1.465136496
11	1.467283785
11.5	1.468661922
12	1.469546143
12.5	1.470113379
13	1.470477246
13.5	1.470710659
14	1.470860396

Dia	Punto	Replica	Rep	Dato Ct	Intercepto (b)	Pendiente(m)	Ct-b	(Ct-B)/-1.024	pg ADN	ng de ADN/ul
1	1	1	1	28.2	28.484	-1.024	-0.284	0.27734375	1.89E+00	1.89E-03
1	1	1	2	28.1	28.484	-1.024	-0.384	0.375	2.37E+00	0.002371374
1	1	1	3		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
1	1	1	4		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
1	1	2	1	28.9	28.484	-1.024	0.416	-0.40625	3.92E-01	0.000392419
1	1	2	2	29	28.484	-1.024	0.516	-0.50390625	3.13E-01	0.000313396
1	1	2	3		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
1	1	2	4		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
1	2	1	1	29.7	28.484	-1.024	1.216	-1.1875	6.49E-02	6.49382E-05
1	2	1	2	29.9	28.484	-1.024	1.416	-1.3828125	4.14E-02	4.14178E-05
1	2	1	3		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
1	2	1	4		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
1	2	2	1	27.6	28.484	-1.024	-0.884	0.86328125	7.30E+00	0.007299301
1	2	2	2	27.8	28.484	-1.024	-0.684	0.66796875	4.66E+00	0.004655526
1	2	2	3		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
1	2	2	4		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
1	3	1	1	28.2	28.484	-1.024	-0.284	0.27734375	1.89E+00	0.001893842
1	3	1	2	28.4	28.484	-1.024	-0.084	0.08203125	1.21E+00	0.001207901
1	3	1	3		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
1	3	1	4		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
1	3	2	1	28.4	28.484	-1.024	-0.084	0.08203125	1.21E+00	0.001207901
1	3	2	2	28.3	28.484	-1.024	-0.184	0.1796875	1.51E+00	0.001512473
1	3	2	3		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
1	3	2	4		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
1	4	1	1	29.7	28.484	-1.024	1.216	-1.1875	6.49E-02	6.49382E-05
1	4	1	2	29.5	28.484	-1.024	1.016	-0.9921875	1.02E-01	0.000101815
1	4	1	3		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
1	4	1	4		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
1	4	2	1	28.6	28.484	-1.024	0.116	-0.11328125	7.70E-01	0.000770404
1	4	2	2	26.9	28.484	-1.024	-1.584	1.546875	3.52E+01	0.035226947
1	4	2	3		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
1	4	2	4		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
2	1	1	1	28.9	28.484	-1.024	0.416	-0.40625	3.92E-01	0.000392419
2	1	1	2	28.1	28.484	-1.024	-0.384	0.375	2.37E+00	0.002371374
2	1	1	3	28.9	28.484	-1.024	0.416	-0.40625	3.92E-01	0.000392419
2	1	1	4	29.2	28.484	-1.024	0.716	-0.69921875	2.00E-01	0.000199885
2	1	2	1	29.9	28.484	-1.024	1.416	-1.3828125	4.14E-02	4.14178E-05
2	1	2	2	28.8	28.484	-1.024	0.316	-0.30859375	4.91E-01	0.000491367
2	1	2	3	28.5	28.484	-1.024	0.016	-0.015625	9.65E-01	0.000964662
2	1	2	4	28.1	28.484	-1.024	-0.384	0.375	2.37E+00	0.002371374
2	2	1	1	28.9	28.484	-1.024	0.416	-0.40625	3.92E-01	0.000392419

2	2	1	2	28.1	28.484	-1.024	-0.384	0.375	2.37E+00	0.002371374
2	2	1	3	27.8	28.484	-1.024	-0.684	0.66796875	4.66E+00	0.004655526
2	2	1	4	28	28.484	-1.024	-0.484	0.47265625	2.97E+00	0.002969315
2	2	2	1	28.5	28.484	-1.024	0.016	-0.015625	9.65E-01	0.000964662
2	2	2	2	30.7	28.484	-1.024	2.216	-2.1640625	6.85E-03	6.8539E-06
2	2	2	3	27.7	28.484	-1.024	-0.784	0.765625	5.83E+00	0.005829415
2	2	2	4	27.6	28.484	-1.024	-0.884	0.86328125	7.30E+00	0.007299301
2	3	1	1	29	28.484	-1.024	0.516	-0.50390625	3.13E-01	0.000313396
2	3	1	2	27.7	28.484	-1.024	-0.784	0.765625	5.83E+00	0.005829415
2	3	1	3	28.9	28.484	-1.024	0.416	-0.40625	3.92E-01	0.000392419
2	3	1	4	27.4	28.484	-1.024	-1.084	1.05859375	1.14E+01	0.011444419
2	3	2	1	27.9	28.484	-1.024	-0.584	0.5703125	3.72E+00	0.003718027
2	3	2	2	27.1	28.484	-1.024	-1.384	1.3515625	2.25E+01	0.022467901
2	3	2	3	26.5	28.484	-1.024	-1.984	1.9375	8.66E+01	0.086596432
2	3	2	4	27.2	28.484	-1.024	-1.284	1.25390625	1.79E+01	0.017943462
2	4	1	1	29.3	28.484	-1.024	0.816	-0.796875	1.60E-01	0.000159634
2	4	1	2	28.5	28.484	-1.024	0.016	-0.015625	9.65E-01	0.000964662
2	4	1	3	27.5	28.484	-1.024	-0.984	0.9609375	9.14E+00	0.009139817
2	4	1	4	26.8	28.484	-1.024	-1.684	1.64453125	4.41E+01	0.04410941
2	4	2	1	28.4	28.484	-1.024	-0.084	0.08203125	1.21E+00	0.001207901
2	4	2	2	28.2	28.484	-1.024	-0.284	0.27734375	1.89E+00	0.001893842
2	4	2	3	27.5	28.484	-1.024	-0.984	0.9609375	9.14E+00	0.009139817
2	4	2	4	27.5	28.484	-1.024	-0.984	0.9609375	9.14E+00	0.009139817
3	1	1	1	27.9	28.484	-1.024	-0.584	0.5703125	3.72E+00	0.003718027
3	1	1	2	28.3	28.484	-1.024	-0.184	0.1796875	1.51E+00	0.001512473
3	1	1	3	28	28.484	-1.024	-0.484	0.47265625	2.97E+00	0.002969315
3	1	1	4	28.4	28.484	-1.024	-0.084	0.08203125	1.21E+00	0.001207901
3	1	2	1	29.1	28.484	-1.024	0.616	-0.6015625	2.50E-01	0.000250287
3	1	2	2	29.8	28.484	-1.024	1.316	-1.28515625	5.19E-02	5.18613E-05
3	1	2	3	30.4	28.484	-1.024	1.916	-1.87109375	1.35E-02	1.34557E-05
3	1	2	4	28.5	28.484	-1.024	0.016	-0.015625	9.65E-01	0.000964662
3	2	1	1	30.6	28.484	-1.024	2.116	-2.06640625	8.58E-03	8.5821E-06
3	2	1	2	27.8	28.484	-1.024	-0.684	0.66796875	4.66E+00	0.004655526
3	2	1	3	29.7	28.484	-1.024	1.216	-1.1875	6.49E-02	6.49382E-05
3	2	1	4	30	28.484	-1.024	1.516	-1.48046875	3.31E-02	3.30774E-05
3	2	2	1		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
3	2	2	2	29.5	28.484	-1.024	1.016	-0.9921875	1.02E-01	0.000101815
3	2	2	3	29	28.484	-1.024	0.516	-0.50390625	3.13E-01	0.000313396
3	2	2	4	29.1	28.484	-1.024	0.616	-0.6015625	2.50E-01	0.000250287
3	3	1	1	29.2	28.484	-1.024	0.716	-0.69921875	2.00E-01	0.000199885
3	3	1	2	30.3	28.484	-1.024	1.816	-1.7734375	1.68E-02	1.68485E-05
3	3	1	3	29.7	28.484	-1.024	1.216	-1.1875	6.49E-02	6.49382E-05
3	3	1	4	30.9	28.484	-1.024	2.416	-2.359375	4.37E-03	4.37144E-06
3	3	2	1		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
3	3	2	2		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
3	3	2	3		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
3	3	2	4		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
3	4	1	1	29	28.484	-1.024	0.516	-0.50390625	3.13E-01	0.000313396
3	4	1	2	29.9	28.484	-1.024	1.416	-1.3828125	4.14E-02	4.14178E-05
3	4	1	3		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24

3	4	1	4	29.1	28.484	-1.024	0.616	-0.6015625	2.50E-01	0.000250287
3	4	2	1		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
3	4	2	2		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
3	4	2	3	27.3	28.484	-1.024	-1.184	1.15625	1.43E+01	0.014330126
3	4	2	4	27.2	28.484	-1.024	-1.284	1.25390625	1.79E+01	0.017943462
4	1	1	1		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
4	1	1	2		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
4	1	1	3	32.1	28.484	-1.024	3.616	-3.53125	2.94E-04	2.94273E-07
4	1	1	4	30.9	28.484	-1.024	2.416	-2.359375	4.37E-03	4.37144E-06
4	1	2	1	32.6	28.484	-1.024	4.116	-4.01953125	9.56E-05	9.56024E-08
4	1	2	2	31.5	28.484	-1.024	3.016	-2.9453125	1.13E-03	1.13419E-06
4	1	2	3	33.6	28.484	-1.024	5.116	-4.99609375	1.01E-05	1.00904E-08
4	1	2	4	34.6	28.484	-1.024	6.116	-5.97265625	1.06E-06	1.06499E-09
4	2	1	1	32.3	28.484	-1.024	3.816	-3.7265625	1.88E-04	1.87688E-07
4	2	1	2	33.5	28.484	-1.024	5.016	-4.8984375	1.26E-05	1.26346E-08
4	2	1	3	30.7	28.484	-1.024	2.216	-2.1640625	6.85E-03	6.8539E-06
4	2	1	4		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
4	2	2	1	34.1	28.484	-1.024	5.616	-5.484375	3.28E-06	3.27812E-09
4	2	2	2		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
4	2	2	3	32.6	28.484	-1.024	4.116	-4.01953125	9.56E-05	9.56024E-08
4	2	2	4	29.7	28.484	-1.024	1.216	-1.1875	6.49E-02	6.49382E-05
4	3	1	1		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
4	3	1	2		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
4	3	1	3		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
4	3	1	4		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
4	3	2	1	33	28.484	-1.024	4.516	-4.41015625	3.89E-05	3.88905E-08
4	3	2	2	32.5	28.484	-1.024	4.016	-3.921875	1.20E-04	1.19709E-07
4	3	2	3	31	28.484	-1.024	2.516	-2.45703125	3.49E-03	3.49115E-06
4	3	2	4	30.3	28.484	-1.024	1.816	-1.7734375	1.68E-02	1.68485E-05
4	4	1	1		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
4	4	1	2		28.484	-1.024		0	1.00E+00	0.001
4	4	1	3	33	28.484	-1.024	4.516	-4.41015625	3.89E-05	3.88905E-08
4	4	1	4	34.2	28.484	-1.024	5.716	-5.58203125	2.62E-06	2.61799E-09
4	4	2	1	31.2	28.484	-1.024	2.716	-2.65234375	2.23E-03	2.22667E-06
4	4	2	2	29.1	28.484	-1.024	0.616	-0.6015625	2.50E-01	0.000250287
4	4	2	3		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24
4	4	2	4		28.484	-1.024	-28.48	27.81640625	6.55E+27	6.55249E+24

- Curva calibración:

$$Y = -1.024X + 28.484$$

$$\downarrow$$

$$C_t = -1.024 \log \text{pg} + 28.484$$

$$\downarrow$$

$$\text{pg ADN} = 10^{(C_t - b)/m}$$

User Bulletin # 2  
 ABI PRISM  
 7700 Sequence Detection System

- Células/ml en muestras de agua

$$\text{pg ADN} \rightarrow \text{ng ADN}$$

$$\downarrow$$

$$(\text{ng}/\mu\text{l ADN}) / 3\text{E-}06 =$$

$$\text{Células/ml}$$

$$\downarrow$$

$$Y = mx + b$$

(Leo et al., 1999, 2005)