

Metagenómica en la identificación de microorganismos que producen biodeterioro: Patrimonio edificado con arquitectura en tierra, Vale Histórico Paulista (São Paulo, Brasil)

Alejandra T. Fazio^{1,a}, Layla Farage Martins^{2,b}, Paulo Marques Pierry^{2,c}, Andrew Thomas^{2,d}, João Carlos Setubal^{2,e}, Aline Maria da Silva^{2,f}, Dalva Lúcia Araújo de Faria^{3,g}

¹ Laboratorio de Micología Experimental, InMiBo UBA-CONICET, DBBE, FCEyN, UBA, Pab II, Piso 4°, lab 9, Int. Güiraldes 2620. Ciudad Universitaria., C1428EHA, Buenos Aires, Argentina

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748. Butantã, 05508-000, São Paulo, Brasil

³ Laboratório de Espectroscopia Molecular, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748. Butantã, 05508-000, São Paulo, Brasil

^afazio.alejandra@gmail.com, ^blaylabiol@gmail.com, ^cpmpierry@gmail.com,
^dandrewmaltezthomas@gmail.com, ^ejoao.c.setubal@gmail.com, ^falmsilva@iq.usp.br,
^gdlafaria@iq.usp.br

Palabras clave: Metagenómica, hongos, bacterias, biodeterioro, arquitectura en tierra

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es presentar resultados obtenidos mediante análisis por metagenómica como herramienta novedosa para la identificación taxonómica de hongos y bacterias a partir de *biofilms* en paredes de arquitectura en tierra (“pau-a-pique”, “taipa de pilão” y adobe), de edificaciones históricas del Vale Histórico Paulista, representativas del período colonial brasileño,

Se extrajo el DNA total de los *biofilms*, que fue amplificado mediante *primers* específicos para regiones variables de los genes 16S y 18S ribosomal, y luego secuenciado obteniéndose bibliotecas del amplificado. El programa QIIME reveló la diversidad taxonómica en los distintos sustratos.

Los géneros más abundantes de bacterias fueron: *Aciditerrimonas*, *Blastococcus*, *Geodermatophilus*, *Arthrobacter*, *Micromonospora*, *Nocardioides*, *Propionibacterium*, *Pseudonocardia*, *Rubrobacter*, *Solirubrobacter*, *Thermoleophilum*, *Sphingobacterium*, *Sphaerobacter*, *Streptococcus*, *Gemmatimonas*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Sphingomonas*, *Massilia*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*. Los géneros más abundantes de hongos: *Passalora*, *Lacazia*, *Anisomeridium*, *Poliblastia*, *Hypocrea*, *Verrucaria*, *Caloplaca*, *Chaetomella*, *Meyerozyma*, *Humicola*, *Oxyporus*, *Corioloropsis*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, *Trichosporon*, *Mucor*, *Syncephalastrum*.

Este trabajo es el primer reporte de comunidades microbianas a partir de paredes hechas con técnicas de arquitectura en tierra con el uso de metagenómica.

INTRODUCCIÓN

Para llevar a cabo la identificación de microorganismos, tanto en estudios de microbiología ambiental como en Patrimonio Cultural, los microbiólogos dependen cada vez más de las técnicas de biología molecular, debido a que son cada vez menos los especialistas en taxonomía clásica, lo cual implica mucho tiempo y conocimiento sobre las características morfológicas de las especies.

Para realizar identificaciones de las especies de microorganismos presentes en una muestra mediante técnicas de biología molecular básica, se precisa obtener cultivos puros. Luego de la obtención de DNA a partir del cultivo y luego con la obtención de secuencias de rDNA mediante amplificación por PCR se logran identificar las especies en estudio. El problema que surge es que para la obtención de una secuencia correcta se necesita cantidades suficientes de DNA y con suficiente pureza.

Por otra parte, los medios de enriquecimiento utilizados en cultivos de microorganismos en laboratorio son selectivos y sólo una pequeña población de los mismos creciendo en un sustrato o muestra ambiental, va a poder crecer en cualquier medio. Aunque se ensaye el crecimiento de los microorganismos en medios de cultivo diferentes con varias condiciones de cultivo, es probable que muchos microorganismos nativos no puedan crecer en condiciones de laboratorio "in vitro". Es así entonces que las técnicas de cultivo tradicionales utilizadas para medir la biodiversidad en muestras ambientales, subestiman la riqueza de especies. Varios trabajos de investigación sugieren que menos del 1% de microorganismos del ambiente pueden ser cultivados en laboratorio utilizando métodos convencionales [1], debido a esto es que utilizando métodos basados en el cultivo de los microorganismos en estado axénico se puede perder la mayor parte de la diversidad microbiana presente en las muestras originales.

En los últimos años los microbiólogos comenzaron a investigar acerca de métodos de identificación que sean independientes de la capacidad de obtener los microorganismos en cultivo, para poder analizar las comunidades presentes en un sustrato.

El desarrollo de procedimientos de extracción y purificación de DNA adecuados para suelos, así como los materiales pertenecientes a las técnicas constructivas de arquitectura en tierra, no son simples. Se trata de una matriz compleja que alberga gran variedad de sustancias de alto contenido orgánico que inhiben la actividad de polimerasas y enzimas de restricción, y que también pueden interferir con la hibridación y los protocolos de extracción [2, 3, 4]. Así por ejemplo, los ácidos húmicos y fúlvicos tienen un amplio espectro de solubilidades y características de carga, haciendo difícil encontrar condiciones de extracción y de separación que puedan eliminar estas sustancias para obtener un DNA limpio e intacto durante su extracción.

En la actualidad, existen metodologías donde la extracción de DNA no requiere del cultivo de los microorganismos, y se trata de la extracción directa de DNA. El procedimiento involucra la extracción directa del DNA a partir del sustrato. Para ello se utilizan métodos físicos y químicos para conseguir lisar las células presentes en la matriz del sustrato. Así es posible generar extractos de DNA puro a partir de sustratos complejos que representen la comunidad microbiana existente.

La metagenómica tiene la ventaja de permitir obtener el DNA total de la comunidad microbiana del sustrato sin tener que obtener cultivos previos, pero tiene la desventaja de que para poder llevar esta técnica a cabo son necesarios equipamientos caros y también una cantidad considerable de DNA inicial en el sustrato, ya que con el lisado directo y con las sucesivas amplificaciones, se pierde DNA y puede no llegar a obtenerse una cantidad suficiente para un buen secuenciamiento. En este trabajo se realizó una aproximación metagenómica sobre las comunidades fúngicas y bacterianas que se podían encontrar formando parte de la microflora del sustrato que conforma las paredes de las "fazendas" realizadas con técnicas de arquitectura en tierra. Se realizó una lisis directa a partir de porciones de sustrato y se logró una extracción de DNA total y su amplificación por PCR.

La importancia de este trabajo reside en ser el primer estudio de metagenómica en

este tipo de sustrato, el cual además, en este caso de estudio, forma parte de técnicas constructivas de Patrimonio edificado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras

Las muestras de *biofilms* fueron colectadas en edificios de estilo colonial de las ciudades de Areias y São José do Barreiro, en marzo de 2015.

Las muestras de “taipa de pilão” fueron colectadas de una pared interna del antiguo cinema, en la calle XV de novembro (Areias), y de una pared externa, en la calle Siqueira Reis n°20 (São José do Barreiro); las muestras de adobe fueron recuperadas de los restos de la Fazenda República (São José do Barreiro). Pequeños pedazos de sustrato con *biofilm* fueron colectados y colocados en frascos estériles y conservados en freezer a -80°C para su posterior análisis (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras colectadas, tomadas por duplicado, a partir de tres fazendas del Vale Histórico Paulista: Antigo Cinema (AC), Fazenda República (FR), y Rua Siqueiros Reis (SR).

Muestra	Edificación	Sustrato
AC1	Antigo Cinema	<i>Biofilm</i> oscuro
AC2	Antigo Cinema	<i>Biofilm</i> grisáceo
FR1	Fazenda República	<i>Biofilm</i> oscuro
FR2	Fazenda República	<i>Biofilm</i> anaranjado
SR1	Rua Siqueiros Reis	Biofilme verde-grisáceo
SR2	Rua Siqueiros Reis	<i>Biofilm</i> oscuro

Extracción de DNA total y preparación de la biblioteca metagenómica

Se realizó una lisis mecánica a través de maceración la cual mostró ser más eficaz que la lisis química o enzimática, así, es altamente improbable que el pre-tratamiento enzimático en el procedimiento de extracción de ADN hubiera favorecido a los grupos bacterianos seleccionados.

Para la extracción se retiraron las muestras del freezer de -80°C donde estaban conservadas y fueron descongeladas a temperatura ambiente. Luego se separaron entre 3 e 6 mg de muestra, fueron rotulados y llevados a la campana de flujo laminar. Cada muestra fue macerada con nitrógeno líquido en mortero y el polvo obtenido fue colocado en un *PowerBead Tube* provisto por el kit *Power Soil DNA Isolation Kit* (Laboratórios MoBio), y a partir de este paso se continuó con el procedimiento del kit de extracción, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La pureza y concentración del DNA fue analizada en un espectrofotómetro ND-1000 (*Nano Drop Technologies*, EE.UU.) a 260 nm, 280 nm. Se realizó cuantificación adicional con el kit de ensayo *dsDNA Quant-iT Picogreen* (*Life Technologies*, EE.UU.). La integridad del DNA metagenómico foi examinada usando *Agilent Bioanalyzer DNA 7500 LabChip*.

Las bibliotecas metagenómicas se prepararon usando el kit de preparación de

bibliotecas de DNA *Illumina Nextera* (*Illumina, Inc., USA*) con una entrada de DNA total de 20-35 ng. Las bibliotecas de fragmentos de DNA resultantes se limpiaron con perlas de *Agencourt AMPure XP* (*Beckman Coulter, Inc., EE.UU.*) y se verificó el tamaño de fragmento dentro del intervalo de 400-700 pb, funcionando en el bioanalizador de 2100 utilizando un chip de DNA *Agilent High Sensitivity*.

Preparación de las Bibliotecas metagenómicas 16S e ITS

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando un par de cebadores basados en las secuencias SD-Bact-0341-BS-17 y SD-Bact-0785-AA-2164 para la amplificación de las regiones variables V3 y V4 del gen rRNA 16S, y los cebadores de hongos: ITS-1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3' 19 Bases, e ITS-4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3' 20 Bases que incluye adaptadores como los sugeridos en el *workflow* de *Illumina* para la preparación de la Biblioteca metagenómica 16S. Para las reacciones de PCR (25 µL), se colocaron 12,5 ng de muestra de DNA metagenómico, la enzima *KAPA HiFi HotStart ReadyMix* (*Kapa Biosystems, EE.UU.*), un cebador directo 341F:

5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG, y uno reverso 785R:

5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATC.

Se utilizaron 200 nM de cada cebador a 95°C durante 3 min, seguido de 25 ciclos a 95°C durante 30 seg, 55°C durante 30 seg y 72°C durante 30 seg, más 72°C durante 5 min. El tamaño esperado de amplicón de ~ 550 pb (16S) y 700pb (ITS) se verificó con el chip *Bioanalyzer DNA High Sensitivity*. La limpieza de los productos de PCR se realizó con perlas de *AMPure XP* (*Beckman Coulter, Inc., EE.UU.*). Se adosaron índices duales utilizando el *Nextera XT Index Kit*, y después de una segunda ronda de limpieza PCR con las perlas *AMPure XP*, las bibliotecas de los amplicones indexados de las regiones V3-V4 16S e ITS 18S, se validaron mediante corrida en un *Bioanalyzer High Sensitivity* para verificar el tamaño esperado de ~ 630 pb (16S) y ~ 800pb (ITS).

Para minimizar el sesgo de la PCR, se establecieron dos reacciones de PCR para cada muestra, y los productos de PCR en las reacciones replicadas se agruparon. Los detalles para la PCR y procedimientos relacionados se describieron anteriormente (Li et al., 2013). Los amplicones de cada muestra se agruparon con una concentración equimolar y se secuenciaron con la plataforma *Illumina MiSeq* (*Illumina Company, San Diego, CA, EE.UU.*).

Secuenciamiento

La cuantificación de bibliotecas de secuencias de *Illumina* se realizó con el *KAPA Library Quantification Kit*, la normalización y agrupación de las secuencias fueron realizadas siguiendo los protocolos estándar para secuenciación de la plataforma *Illumina MiSeq*. Las bibliotecas agrupadas se sometieron a 2-3 ciclos usando el kit de reactivos *MiSeq v2* (formato de 500 ciclos, lecturas de extremos emparejados (PE)) y se combinaron las secuencias resultantes para cada biblioteca. En promedio, *Illumina PE read1* y *read2* presentaron, respectivamente, >80% y >75% de bases con un puntaje de calidad de al menos 30 (Q30).

Procesamiento de datos

El perfil de la comunidad microbiana utilizando amplicones 16S rRNA se realizó mediante la fusión de pares de final de lectura utilizando *Fastq-Join* [5]. Usando el *QIIME* [6] kit de herramientas, se eliminaron las secuencias con un umbral de calidad media por debajo de *phred* 20 utilizando una ventana deslizante de 50 pb y eliminado secuencias menores de 100 pb. Los cebadores de PCR identificados al inicio o al final de las lecturas, permitiendo un máximo de 2 desacoplamiento de nt, se recortaron, y las secuencias sin cebadores identificables se descartaron. Para los amplicones de ITS, se usaron los mismos métodos de filtrado de secuencia, excepto que solo se usó la lectura 1. Las secuencias de rRNA 16S filtradas con calidad, se agruparon de novo en OTUs usando *UPARSE* [7] en el

umbral de identidad del 97% y filtrado por quimera utilizando UCHIME [8]. Se utilizaron secuencias representativas para la identificación taxonómica utilizando el clasificador RDP [9] y un umbral de confianza del 80%. Las secuencias ITS filtradas de calidad se agruparon en OTUs usando un enfoque de referencia abierto [10] con una identidad de secuencia del 97% usando UCLUST [11] y las OTUs de referencia QIIME / UNITE (versión alfa 12_11 - [12]. A los amplicones que no se agruparon con las OTU de referencia se les asignó un rango taxonómico utilizando BLAST [13]. Para el análisis de la diversidad alfa, como los cálculos de riqueza y diversidad, las tablas OTU se enrarecieron a una profundidad pareja entre todas las muestras.

RESULTADOS

Diversidad microbiana de las bibliotecas genómicas.

La información sobre las comunidades bacterianas y fúngicas se obtuvo mediante amplificación por PCR y con el método de biblioteca genómica utilizando DNA genómico extraído de muestras. Se construyeron y analizaron un total de 5 bibliotecas bacterianas y 5 bibliotecas fúngicas de las 6 muestras analizadas en este estudio.

De los filios de hongos obtenidos, Ascomycota fue el filo dominante con el 31,5% del total, que incluyen miembros de las clases Dothideomycetes (*Passalora*, *Aureobasidium*, *Periconia*, *Phoma*, *Alternaria*, *Cochliobolus*, *Epicoccum*, *Leptosphaerulina*), Eurotiomycetes (*Phaeococcomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Lacazia*), Leotiomycetes (*Chaetomella*), Saccharomycetes (*Meyerozyma*, *Candida*, *Lodderomyces*), y Sordariomycetes (*Hypocrea*, *Giberella* y *Humicola*). Dentro de los Ascomycota liquenizados (*Anisomeridium*, *Dermatocarpon*, *Endocarpon*, *Poliblastia*, *Verrucaria*, *Stereocaulon*, *Caloplaca*), El filo Basidiomycota, representó el 21,9 % de los clones, incluyendo a los miembros de las clases Agaricomycetes (*Myriococcum*, *Corioloopsis*, *Peniophora*), Microbotryomycetes (*Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*), y Tremellomycetes (*Cryptococcus* y *Trichosporon*). Por último el filo Zygomycota aportó el 6,3% del total, incluyendo a los miembros de Mucorales (*Absidia*, *Mucor* y *Syncephalastrum*) (Fig. 1).

En cuanto a la comunidad de bacterias, los filios Actinobacteria y Proteobacteria fueron los más abundantes, contribuyendo con el 32,9% y el 38,3% del total de clones. Aunque en algunas muestras se registraron también los filios Cyanobacteria (8,2%), Bacteroidetes (5,6%), Cloroflexi (4,4%), Firmicutes (3,2%), y Acidobacteria (2%), entre los taxones más abundantes (Fig. 2).

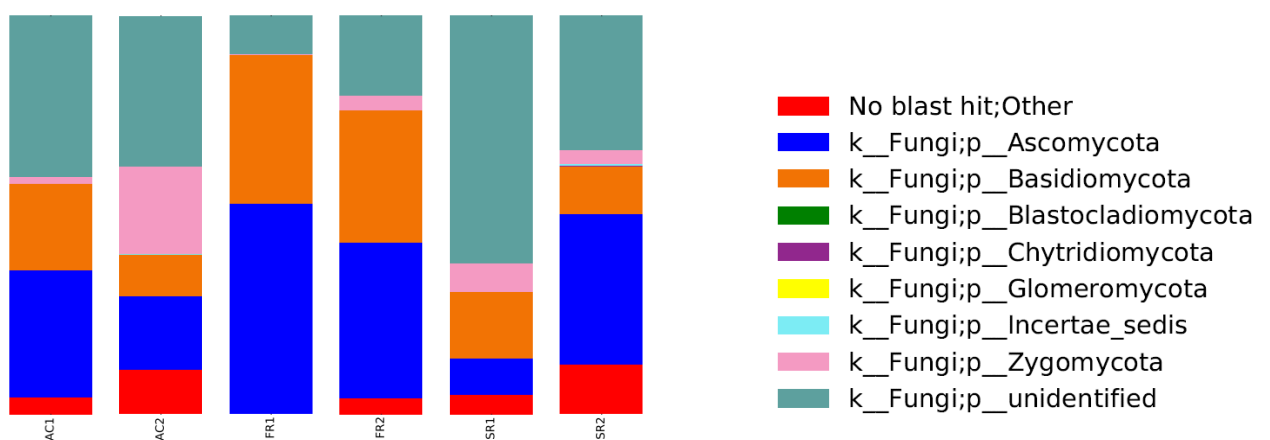


Figura 1. Filum de hongos obtenidos en la biblioteca genómica

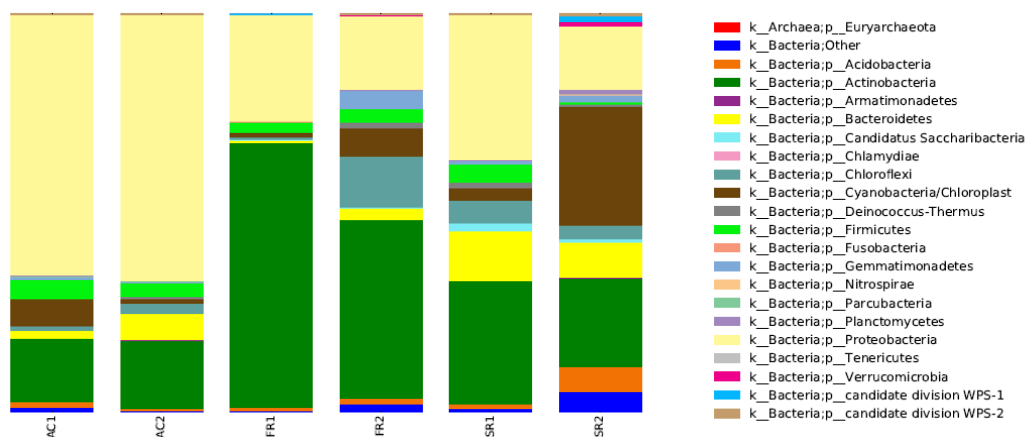


Figura 2. Filum de bacterias obtenidas en la biblioteca genómica

Distribución espacial de las comunidades microbianas.

La composición fúngica de las muestras fue menos diversa que la de las comunidades bacterianas, pero se observó mayor variación entre los distintos tipos de edificaciones. La aparición y distribución de las comunidades microbianas, de hongos y bacterias en cada tipo de sustrato se observan en la Tabla 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2. Géneros de hongos identificados en las muestras de *biofilms* creciendo sobre las paredes de las fazendas analizadas.

Hongos		Taipa de pilao		Taipa de Pilao		Adobe	
		Pared interna		Pared externa		Pared externa	
Clasificación		AC1	AC2	SR1	SR2	FR1	FR2
<i>Passalora</i>	Ascomycota	16,2%	8%	0,9%	1,3%	40,2%	27,3%
<i>Aureobasidium</i>	Ascomycota	-	0,1%	0,5%	-	-	-
<i>Phoma</i>	Ascomycota	0,2%	0,2%	0,9%	0,4%	0,5%	0,2%
<i>Alternaria</i>	Ascomycota	0,1%	0,1%	0,2%	0,8%	0,2%	0,1%
<i>Cochliobolus</i>	Ascomycota	0,2%	0,1%	-	0,1%	0,4%	0,7%
<i>Epicoccum</i>	Ascomycota	0,1%	0,2%	-	-	0,2%	0,3%
<i>Leptosphaerulina</i>	Ascomycota	0,2%	0,1%	-	-	0,5%	0,4%
<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	-	-	-	-	-	0,2%
<i>Penicillium</i>	Ascomycota	0,2%	-	0,1%	-	-	-
<i>Talaromyces</i>	Ascomycota	0,6%	0,1%	-	-	-	-
<i>Lacazia</i>	Ascomycota	3,9%	1,1%	0,1%	0,1%	7,8%	5,9%
<i>Chaetomella</i>	Ascomycota	0,1%	0,1%	0,4%	1,4%	-	-
<i>Meyerozyma</i>	Ascomycota	0,2%	-	-	-	0,3%	0,2%
<i>Lodderomyces</i>	Ascomycota	-	0,2%	1,1%	0,2%	-	-
<i>Hypocrea</i>	Ascomycota	0,1%	0,8%	0,7%	-	-	0,7%
<i>Humicola</i>	Ascomycota	-	-	-	0,5%	-	-

<i>Anisomeridium</i>	Ascomycota liquenizado	1,9%	0,1%	-	0,7%	0,1%	-
<i>Dendrocarpon</i>	Ascomycota Liquenizado	-	-	-	0,6%	-	-
<i>Endocarpon</i>	Ascomycota Liquenizado	-	-	-	0,6%	-	-
<i>Polyblastia</i>	Ascomycota Liquenizado	0,1%	0,1%	-	1,9%	-	0,1%
<i>Verrucaria</i>	Ascomycota Liquenizado	0,5%	0,8%	0,1%	13,3%	-	0,4%
<i>Caloplaca</i>	Ascomycota Liquenizado	0,1%	0,1%	0,1%	2,0%	-	-
<i>Coriolorpsis</i>	Basidiomycota	0,2%	-	-	-	0,2%	0,5%
<i>Peniophora</i>	Basidiomycota	0,2%	-	-	-	-	-
<i>Oxyporus</i>	Basidiomycota	-	1,3%	-	-	-	-
<i>Rhodotorula</i>	Basidiomycota	18,3%	5,3%	1,4%	0,2%	36,2%	31,6%
<i>Cryptococcus</i>	Basidiomycota	0,1%	0,2%	1,3%	0,2%	-	-
<i>Trichosporon</i>	Basidiomycota	1%	2,1%	11,4%	8,3%	0,2%	0,5%
<i>Mucor</i>	Zygomycota	0,4%	0,5%	3,2%	3,2%	0,1%	0,1%
<i>Syncephalastrum</i>	Zygomycota	1,1%	21,1%	3,8%	0,2%	0,1%	3,5%

Tabla 3. Géneros de bacterias identificadas en las muestras de *biofilms* creciendo sobre las paredes de las fazendas analizadas.

Bacterias		Taipa de Pilão		Taipa de Pilão		Adobe	
		Pared interna		Pared externa		Pared externa	
Clasificación		AC1	AC2	SR1	SR2	FR1	FR2
<i>Aciditerrimonas</i>	Actinobacteria	0,2%	-	0,2%	0,9%	0,8%	0,5%
<i>Blastococcus</i>	Actinobacteria	0,7%	1,6%	1,6%	1,5%	0,2%	4,7%
<i>Geodermatophilus</i>	Actinobacteria	1,1%	2,5%	7,7%	0,9%	5,3%	1,4%
<i>Arthrobacter</i>	Actinobacteria	0,1%	1,2%	1,5%	1,1%	19,5%	2,0%
<i>Micromonospora</i>	Actinobacteria	0,5%	0,1%	0,2%	1,4%	-	0,8%
<i>Nocardioides</i>	Actinobacteria	2,1%	1,9%	6%	5,1%	2%	10,8%
<i>Propionibacterium</i>	Actinobacteria	6,2%	5,3%	3,7%	-	4,9%	1,3%
<i>Pseudonocardia</i>	Actinobacteria	0,1%	0,2%	0,3%	1,1%	1,8%	0,6%
<i>Rubrobacter</i>	Actinobacteria	0,8%	1,1%	0,9%	1,9%	12,1%	9,6%
<i>Solirubrobacter</i>	Actinobacteria	0,6%	0,2%	0,5%	1,3%	6,3%	1,0%
<i>Thermoleophilum</i>	Actinobacteria	0,2%	-	0,2%	0,5%	2,8%	0,2%
<i>Sphingobacterium</i>	Bacteroidetes	0,1%	1,9%	3,2%	0,4%	-	-
<i>Sphaerobacter</i>	Chloroflexi	0,6%	2,4%	5,7%	1,8%	0,5%	12%
<i>Streptococcus</i>	Firmicutes	3%	0,7%	0,2%	-	1,0%	1,5%
<i>Gemmatimonas</i>	Gemmatimonadetes	0,4%	0,3%	0,8%	1,7%	0,1%	4,6%
<i>Methylobacterium</i>	Proteobacteria	0,3%	0,6%	0,4%	0,8%	-	0,2%
<i>Microvirga</i>	Proteobacteria	0,4%	-	0,3%	1,4%	0,1%	0,5%
<i>Sphingomonas</i>	Proteobacteria	56,3%	49,7%	11,3%	4,9%	23,4%	10,2%
<i>Massilia</i>	Proteobacteria	0,4%	2,6%	4,2%	0,3%	0,1%	0,1%
<i>Klebsiella</i>	Proteobacteria	0,2%	1,3%	3,5%	-	0,1%	0,1%
<i>Acinetobacter</i>	Proteobacteria	0,5%	4,0%	8,8%	0,1%	0,1%	-

La mayor diversidad de hongos son los del filum Ascomycota, en el cual, dentro de los miembros más abundantes y presentes en ambas técnicas de arquitectura en tierra se identificó el género *Passalora* sp. Dentro de este género la especie *P. personata* que es patógeno de maní. Esta especie se desarrolla en ambientes con alta humedad relativa (mayor al 93%), es muy difícil de aislar en cultivo puro, y es de crecimiento extremadamente lento [14]. El aislamiento exitoso en medios de cultivo agarizado generalmente requiere la transferencia de conidios individuales con una aguja fina, con lo cual sería muy dificultoso obtenerlo en técnicas moleculares convencionales que dependen de aislamiento en cultivo. Se observó mayor porcentaje de *Passalora* sp. sobre adobe, lo cual indicaría que estas paredes contienen alto grado de humedad. También dentro del filum Ascomycota, se registraron los géneros *Phoma* sp. y *Alternaria* sp., los cuales fueron identificados tanto a partir de adobe como de “taipa de pilão”. Ambos géneros son considerados importantes agentes de biodeterioro debido a su habilidad para degradar celulosa, además de producir un deterioro estético debido a que son hongos dematiáceos con un alto contenido de melanina que produce manchas oscuras en la superficie atacada [15]. Tanto *Alternaria* sp. como *Epicoccum* sp., son hongos que colonizan las hojas y luego persisten en el suelo. Estos micromicetos poseen además adaptaciones que les permiten enfrentar las condiciones desfavorables como la formación de esporas pigmentadas y multicelulares. Por otro lado tanto *Alternaria* sp., como *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Talaromyces* sp., e *Hypocrea* sp., son hongos altamente celulolíticos [16].

Lacazia sp. es otro de los géneros que se identificó en alto porcentaje en todas las muestras, aunque en mayor porcentaje sobre adobe. Consta de una sola especie *L. loboii*, la cual es saprofítica en zonas tropicales y ambientes muy húmedos y suele producir infecciones a los agricultores, y, hasta la actualidad, no se ha logrado aislar en cultivo [17]. *Leptospheraulina* sp. crece sobre hierbas en ambientes húmedos y cálidos, que al igual que *Chaetomella* sp., *Phoma* sp., y *Humicola* sp., pertenecen al tipo de hongos termotolerantes [18], y se han encontrado mayormente en la pared externa construida con “taipa de pilão”.

Resultó interesante la identificación de Ascomycota liquenizados formando parte de los *biofilms*. La mayor diversidad se registró en las muestras de la pared externa de taipa de pilão, lo cual podría deberse a que recibe buena cantidad de luz durante el día, tiene una humedad adecuada para su crecimiento y la mayoría de los géneros identificados tiene como hábitat roca caliza. En un trabajo anterior [19], los autores analizaron la granulometría de muestras obtenidas a partir de paredes de adobe y “taipa de pilão” y observaron que en la técnica de “taipa de pilão” la adición artificial de grava en la preparación es mayor que en adobe.

La presencia de géneros del filo Basidiomycota degradadores de madera fue baja, habiéndose registrado los géneros *Oxyporus* sp., *Peniophora* sp. en muestras de la pared interna de Taipa de Pilão, y *Coriolopsis* sp. sobre adobe. La presencia de estos hongos podría indicar la presencia de partículas de madera en la preparación ya que son géneros capaces de degradar celulosa y lignina [20]. También se registró el género *Trichosporon* sp., en adobe y en “taipa de pilão”, que al igual que *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Talaromyces*, *Chaetomella* e *Hypocrea* son hongos celulolíticos, capaces de degradar hojas, frutos, semillas, y otra materia orgánica que se encuentre formando parte del suelo.

También se registraron levaduras dentro del filum Basidiomycota, las cuales son frecuentes en ambientes húmedos. Así, el género *Rhodotorula* sp. se registró con altos porcentajes en todas las muestras, en cuanto que *Cryptococcus* sp. se registró en bajos porcentajes y no fue identificado en las muestras de adobe. Especies del género *Rhodotorula* sp. se caracterizan por formar *biofilms* de color anaranjado debido a la presencia de carotenoides, produce la enzima ureasa y no fermenta carbohidratos [21]. La actividad de la ureasa tiende a incrementar el pH del ambiente y a producir amonio. *Rhodotorula* sp. se diferencia de *Cryptococcus* sp. por no ser capaz de asimilar inositol.

Los géneros *Mucor* sp. y *Syncephalastrum* sp., pertenecientes al filum Zygomycota, fueron identificados en todas las muestras. Los Zygomycota son hongos característicos de ambientes húmedos y son principalmente degradadores de polisacáridos [22].

Con respecto a la presencia de Bacterias, las Actinobacterias resultaron tener la mayor diversidad de los géneros identificados, y fueron registradas en todas las muestras con un mayor porcentaje en las muestras de adobe. En diversos trabajos, se informó la capacidad de las actinobacterias, al igual que el grupo Firmicutes, para inducir la precipitación de carbonatos en el sustrato [23]. Los géneros *Arthrobacter* sp., *Propionibacterium* sp., y *Rubrobacter* sp., resultaron los principales microorganismos metabólicamente activos responsables de los procesos de colonización en ambas técnicas constructivas.

En cuanto a las Proteobacterias, el género *Sphingomonas* sp. ha sido el más frecuentemente detectado. Especies de este género son capaces de producir carotenoides y exopolisacáridos, lo cual podría fomentar la agregación de bacterias indeseables.

También se han registrado el género *Sphaerobacter* sp., perteneciente al grupo de bacterias Chloroflexi. las cuales se conocen como bacterias verdes no sulfurosas, provenientes de sedimentos de lagos o estanques, y fue registrado en mayor porcentaje en las muestras de adobe.

Dentro del grupo bacteriano Bacteroidetes, fue identificado el género *Sphingobacterium* sp.. Las bacterias de este grupo tiene la capacidad de digerir y crecer sobre una gran variedad de sustratos complejos como celulosa, agar y quitina [24]. Ello sugiere que podrían estar relacionadas con procesos implicados en el control natural de crecimiento de hongos de la cueva ya que la quitina es el componente principal de la pared celular de los hongos [25].

CONCLUSIONES

Por primera vez fue realizada una extracción directa de DNA total de comunidades microbianas en este tipo de sustrato de construcciones realizadas con arquitectura en tierra ("Taipa de pilão", y adobe).

Conseguimos obtener una amplificación exitosa de DNA total de hongos y bacterias de las muestras seleccionadas para su estudio, lo cual permitió caracterizar y conocer por primera vez, la diversidad fúngica y bacteriana mediante el uso de metagenómica en paredes de arquitectura en tierra.

Si bien algunos hongos o bacterias pueden desarrollar mejor en cultivos tradicionales de laboratorio, ya que los medios enriquecidos contribuyen a la rápida germinación de las esporas, por otro lado, otras especies pueden requerir medios más complejos o condiciones específicas que se encuentran en el medio natural que no se logran reproducir en condiciones "in vitro", con lo cual no se logran obtener en cultivo. Un ejemplo de ello son dos de los géneros identificados en este trabajo: *Passalora* sp., el cual contiene especies muy difíciles de crecer en laboratorio, y de *Lacazia* sp., género que todavía no se ha logrado obtener en cultivo, los cuales consiguieron identificarse en este trabajo mediante metagenómica y que no se consiguen aislar en laboratorio.

En general los métodos tradicionales de cultivo son inapropiados a la hora de detectar muchos de los microorganismos que participan en el desarrollo de comunidades naturales.

Si bien varios de los géneros identificados no han sido informados anteriormente en biodeterioro de Patrimonio edificado, su presencia en este tipo de técnicas constructivas hechas con arquitectura en tierra, puede explicarse por el hecho de que muchos de ellos crecen en suelo y obtienen nutrientes de él, mientras que otros, debido a su metabolismo, prefieren crecer en materia vegetal y participar en la descomposición de la materia orgánica, por lo tanto también se encuentran fácilmente en el suelo.

Los aspectos saludables y estéticos también se mostraron como posibles problemas. El clima húmedo y las altas temperaturas aumentan el riesgo de crecimiento de las comunidades microbianas, sumado al abandono y falta de prácticas de conservación. Es de destacar la identificación de hongos liquenizados, los cuales no fueron observados en el sitio a ojo desnudo. Los géneros identificados crecen mayormente en “taipa de pilão”, la cual contiene mayor cantidad de material particulado. A su vez estas especies tienen en general como hábitat la piedra caliza, y son formadores de oxalato de calcio que, con el tiempo, produce un deterioro importante en el sustrato. En general se pudo observar que, la abundancia y la biodiversidad de las comunidades microbianas identificadas fueron mayores en los sustratos más ricos en materia orgánica y mostraban una granulometría favorable a la captación de agua y al alojamiento de colonias.

Para futuras prácticas de conservación y preservación se deben tener cuidado de no utilizar biocidas, los cuales puedan ser degradados y generen amonio [26], el cual pueda después ser utilizado por algunos microorganismos que puedan metabolizarlo y agravar el problema de biodeterioro.

En los últimos años fueron desarrolladas nuevas herramientas moleculares e informáticas que permiten el secuenciamento de metagenomas con muy poca cantidad de DNA. La metagenómica proporciona así, una valiosa información de la diversidad genética en un ambiente determinado.

Bibliografía

- [1] Torsvik V, Goksøyr J, Daae FL. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 782-787.
- [2] Steffan RJ, Goksoyr J, Bej AK, Atlas RM. (1988). Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl Environ Microb* 54: 2908–2915.
- [3] Demeke T, Adams RP. (1992). The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques* 12: 332-333.
- [4] Tsai YL, Olson BH. (1990). Effects of Hg²⁺, CH₃-Hg⁺, and temperature on the expression of mercury resistance genes in environmental bacteria. *Appl. Environ. Microbiol* 56: 3266-3272.
- [5] Aronesty, E. (2013). Comparison of Sequencing Utility Programs. *The Open Bioinformatics Journal* 7: 1-8.
- [6] Caporaso, J G., Kuczynski, J, Stombaugh, J, Bittinger, K, Bushman, F D, Costello, E K. (2010a). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*, 335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303.
- [7] Edgar, R C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* 10: 996–998. doi: 10.1038/nmeth.2604.
- [8] Edgar, R C, Haas, B J, Clemente, J C, Quince, C, Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194–2200. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381.
- [9] Wang, Q, Garrity, G M, Tiedje, J M, Cole, J R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5261–5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07
- [10] Rideout JR, He Y2, Navas-Molina JA, Walters WA, Ursell LK, Gibbons SM, Chase J, McDonald D, Gonzalez A, Robbins-Pianka A, Clemente JC, Gilbert JA, Huse SM, Zhou HW, Knight R, Caporaso JG. 2014. Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. *Peer J.* 2: 545. doi: 10.7717/peerj.545. eCollection.
- [11] Edgar, RC. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460-2461.
- [12] Abarenkov K, Henrik Nilsson R, Larsson KH, Alexander IJ, Eberhardt U, Erland S, Høiland K, Kjølner R, Larsson E, Pennanen T, Sen R, Taylor AF, Tedersoo L, Ursing BM, Vrålstad T, Liimatainen

- K, Peintner U, Kõljalg U. (2010). The UNITE database for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives. *New Phytol.* 186:281-5. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03160.x.
- [13] Altschul, S F, Gish, W, Miller, W, Myers, E W, Lipman, D J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215(3):403-10.
- [14] Alderman, S. C. and Nutter, F. W., Jr. (1994). Effect of temperature and relative humidity on development of *Cercosporidium personatum* on peanut in Georgia. *Plant Dis.* 78:690-694.
- [15] Caneva G, Nugari M P, Salvadori O. (1991). Biology in the Conservation of Works of Art, ICCROM, Roma.
- [16] Domsch KH., Gams W, Anderson T. (2007). Compendium of Soil Fungi, second ed., IHW Verlag, Eching..
- [17] Aborda, P. R., V. A. Taborda, and M. R. McGinnis. (1999). *Lacazia loboi* gen. nov., comb. nov., the etiologic agent of lobomycosis. *J Clin Microbiol.* 37:2031-2033.
- [18] Ramesh M, Girish B, Mahalingeshwara K B. (2000). Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:461-488.
- [19] Fazio A T, Cavicchioli A, Penna D S.A, Chambergo F S., de Faria D L.A. (2015). Towards a better comprehension of biodeterioration in earthen architecture: Study of fungi colonisation on historic wall surfaces in Brazil. *J Cult Herit.* 16:934-938.
- [20] Motato-Vázquez V, Pires, RM, Vitalli, VM, de Mello Gulgiotta, A. (2016). Cultural and ligninolytic activity studies of some polypores (Basidiomycota) from Brazilian Atlantic Forest, São Paulo State, Brazil. *Hoehnea* 43:281-292.
- [21] Ahearn D G, Roth F J Jr., Meyers SP. (1962). A comparative study of marine and terrestrial strains of *Rhodotorula*. *Can J Microbiol.* 8:121-32.
- [22] Uckay I, Chalandon Y, Sartoretti P, Rohner P, Berney T, Hadaya K, vanDelden C. (2007) Invasive zygomycosis in transplant recipients. *Clin. Transplant.* 21:577-582.
- [23] Stomeo F. (2008). Análisis de comunidades microbianas presentes en la cueva de DoñaTrinidad (Ardales, Málaga) utilizando cultivos y métodos moleculares basados en ADN y ARN. Edita: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC. pp. 302.
- [24] Gupta, R, Lorenzini, E. (2007). Phylogeny and molecular signatures (conserved proteins and indels) that are specific for the Bacteroidetes and Chlorobi species. *BMC Evolutionary Biology* 7, 71.
- [25] Portillo, M.C.(2007). Aplicación de técnicas moleculares basadas en ADN y ARN al estudio de la diversidad microbiana en la Cueva de Altamira (Cantabria, España). IRNAS-CSIC (Ed), Sevilla.
- [26] Patrauchan, M A, Oriel, P J. (2003). Degradation of benzyldimethylalkylammonium chloride by *Aeromonas hydrophil* K. *J Appl Microbiol.* 94:266-272.