

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN AGRONOMÍA

INFORME FINAL SERVICIO SOCIAL LEGAL

**EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS
POR LA APLICACIÓN DE BIOSÓLIDO Y ESTIÉRCOL COMO FERTILIZANTES
EN EL CULTIVO DE *Triticum aestivum* L.**

Prestador de servicio social:

Blanca Patricia Contreras Ramírez

Matrícula: 210232994

Asesores:

Interno: M. en C. Dorys Primavera Orea Coria

16435

Externo: Dr. Luc Julien Jerome Dendooven

Lugar de realización:

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional,
ubicado en Av. Instituto Politécnico Nacional #2508 Col. San Pedro Zacatenco,
Ciudad de México C.P. 07360

Periodo de realización:

Del 25 de agosto de 2015 al 25 de febrero de 2016

INDICE

1. Resumen.....	3
2. Introducción	4
3. Marco Teórico	5
3.1. Función de los microorganismos en el suelo.....	5
3.2. Efecto de las comunidades microbianas en los cultivos.....	5
3.3. Subproductos como fertilizantes.....	6
3.4. <i>Triticum aestivum</i> L.....	6
3.5. Utilización del gen 16S rRNA para determinar poblaciones microbianas.....	7
4. Objetivos	8
4.1. Objetivo general.....	8
4.2. Objetivos específicos.....	8
5. Metodología utilizada.....	8
5.1. Toma de muestra.....	9
5.2. Eliminación de materia orgánica.....	9
5.3. Extracción de DNA.....	9
5.3.1. Protocolo para lisis de células microbianas encontradas en el suelo.....	9
Método modificado de Valenzuela-Encinas, et al. (2009).....	9
5.3.2. Método modificado de Hoffman y Winston (1987).....	10
5.3.3. Método de Sambrook y Russell (2001).....	10
5.4. Eliminación de proteínas	10
5.5. Confirmación de la calidad del DNA.....	11
5.6. Amplificación del gen 16S rRNA.....	11
5.7. Purificación de muestras y su confirmación.....	13
5.8. Secuenciamiento del gen 16S rRNA.....	13
6. Actividades realizadas.....	13
7. Objetivos y metas alcanzados.....	14
8. Resultados, discusión y conclusiones.....	14
8.1. Realización de lavados con pirofosfato de sodio.....	14
8.2. Extracción de DNA metagenómico.....	15
8.3. Amplificación del gen 16S rRNA.....	17
8.4. Secuenciamiento del gen 16S rRNA.....	20
9. Conclusiones.....	20
10. Literatura citada.....	22

I. RESUMEN

Durante años, se han implementado diferentes opciones nutricionales para lograr la productividad de suelos agrícolas y aumentar su rendimiento; un ejemplo de ello son los estiércoles que logran modificar algunas características del medio físico, beneficiando a los cultivos. Aunado a esto, se han implementado novedosos insumos que tienen como propósito, al igual que el estiércol, nutrir y mejorar las características físicas del suelo. Tal es el caso del biosólido o también llamados lodos, que son subproductos líquidos, sólidos o semisólidos que surgen a través del proceso que se da a las aguas tratadas.

Debido al desempeño que realizan estos insumos en la agricultura, se llevaron a cabo pruebas de laboratorio con la aplicación de técnicas de extracción de DNA metagenómico y PCR dirigidas al gen 16S rRNA para conocer a profundidad su composición y el impacto que genera en la microbiota del medio físico.

Se aplicaron tres protocolos que garantizaron una correcta extracción de DNA metagenómico, esto para verificar que el producto estuviera en óptimas condiciones y se pudiera proceder con la técnica de PCR. En cuanto a los productos de PCR se obtuvo un resultado positivo, de acuerdo con las amplificaciones de la porción que codifica para el gen 16S rRNA realizadas en el laboratorio, concluyendo con la obtención del tamaño esperado. Se observó que la base para la obtención de una amplificación correcta es la aplicación adecuada de los protocolos de extracción de DNA metagenómico, ya que esto permite identificar por medio de la técnica de PCR las comunidades bacterianas presentes en las enmiendas analizadas.

II.INTRODUCCIÓN

Los microorganismos que habitan en el suelo y conforman su parte viva, son uno de los componentes más importantes del medio físico, esto es debido a su intervención en diversos procesos biológicos y de transformación de insumos aplicados en la agricultura. Se encuentran directamente relacionados con la nutrición de los cultivos porque desempeñan actividades como la degradación de sales aplicadas en forma de fertilizante, con lo cual buscan lograr un efecto positivo en la producción agrícola (Paz-Castro *et al.*, 2007).

Tradicionalmente, se han ido implementando alternativas en cuanto al uso de fertilizantes químicos, tales son las enmiendas orgánicas o biosólidos, utilizados con la finalidad de mejorar las características físicas del suelo y reducir costos por la aplicación de productos más sofisticados (Velázquez, 2012).

La aplicación de biosólidos pretende ser una técnica o práctica contrastante de la agricultura, la cual cumpla con el propósito de lograr una sustentabilidad de sistemas agrícolas actuales, y para lograr este fin, se necesitan realizar investigaciones a profundidad sobre su función en el suelo y la interacción que logran con los microorganismos (EPA, 2008) (Paz-Castro *et al.*, 2007).

Actualmente se aplican diversas técnicas y estudios para identificar la diversidad microbiana que existe en el suelo en distintos ambientes. Gran parte de estos estudios tienen la finalidad de conocer la demanda nutricional y las propiedades fisicoquímicas necesarias para lograr un mayor número de comunidades en ambientes naturales. Una de las técnicas más utilizadas actualmente para aislar y determinar el DNA de un organismo está basada en la ingeniería genética, la cual sirve como una herramienta molecular, que permite caracterizar el DNA de diversos organismos; por lo cual se convierte en una de las técnicas más importantes en los estudios moleculares, para conocer e identificar correctamente la diversidad biológica de la microbiota del medio físico (Escalante *et al.*, 2004).

En este trabajo se explican los tres métodos de extracción de DNA, de muestras de suelo cultivado con *Triticum aestivum* L., la diferencia que se presentó en cada técnica y los cambios que se observaron en las comunidades bacterianas.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Función de los microorganismos en el suelo

Los microorganismos, forman una de las partes más importantes del suelo, ya que constituyen la parte viva de éste y se encargan de la dinámica de transformación y desarrollo. La diversidad de microorganismos presentes en cada fracción de suelo lleva a cabo funciones específicas para la transformación de componentes orgánicos e inorgánicos que se incorporan a él; esto permite entender su importancia en la nutrición de las plantas al cumplir con funciones benéficas para las mismas. Entre las funciones que desempeñan los microorganismos en el suelo se encuentran, la mineralización, transformando compuestos orgánicos que no pueden ser tomados por la planta a inorgánicos para su rápida asimilación (Velázquez, 2012).

3.2 Efecto de las comunidades microbianas en los cultivos

La mayor parte de los microorganismos que habitan en el suelo, utilizan los residuos derivados de los animales y las plantas, junto con la materia orgánica proveniente de los alimentos como fuente de alimentación. El proceso mediante el cual descomponen los residuos y la materia orgánica da paso a la liberación de nutrientes dentro del suelo, estos nutrientes liberados en exceso son, nitrógeno, fósforo y azufre quedando en forma asimilable para las plantas (FAO, 2010).

Los residuos generados por los microorganismos ayudan a la formación de la materia orgánica del suelo y es más fácil de descomponer que el material de desecho original proveniente de plantas y animales, pero esto no implica no ser usado por otros organismos. Por medio de la descomposición de los residuos y el almacenamiento del carbón dentro de su propia biomasa, la biota del suelo realiza una función muy importante en el reciclaje de nutrientes, por lo cual le brinda al

suelo la capacidad de abastecer a los cultivos de los nutrientes necesarios para obtener un buen rendimiento al momento de la cosecha (FAO, 2010).

Entre los microorganismos descomponedores, se encuentran las bacterias, las cuales descomponen residuos de cultivos, éstas mediante su ingestión y mezcla con los minerales del suelo, dan paso a un proceso donde se reciclan energía y nutrientes de las plantas. Las bacterias presentes en el suelo son muy importantes, ya que inmovilizan y retienen nutrientes en sus células y como consecuencia de esta acción previenen la pérdida de nutrientes en la zona de las raíces (FAO, 2010).

3.3 Subproductos alternativos fertilizantes

Los subproductos provenientes de residuos orgánicos o de aguas residuales han causado un efecto positivo en la agricultura debido a su aprovechamiento en los últimos años y no solo por el aporte nutricional brindado a los suelos cultivables sino también por su impacto económico, ya que en muchos casos logran abatir costos por la implementación de otros componentes utilizados para la fertilización de suelo agrícola. Un ejemplo de subproductos utilizados como alternativa en la fertilización de cultivos son los biosólidos o lodos, definidos como materiales orgánicos provenientes del tratamiento de aguas residuales (EPA, 2008) (Paz-Castro *et al.*, 2007).

Por otro lado, se encuentran los estiércoles y forman parte de las enmiendas utilizadas en suelos cultivables para abastecer de nutrientes a las plantas (Trinidad, 2005).

La aplicación de biosólidos pretende ser una técnica o práctica contrastante de la agricultura, que cumpla con el propósito de lograr una sustentabilidad o sostenibilidad de sistemas agrícolas actuales y, para alcanzar este fin, se necesitan realizar investigaciones a profundidad sobre su función en el suelo y la interacción que logran con los microorganismos (EPA, 2008).

3.4 *Triticum aestivum* L.

El trigo es una planta anual que pertenece a la familia de las gramíneas y es ampliamente cultivada en todo el mundo. El término trigo refiere tanto a la planta como a la semilla comestible, al igual que el arroz, el trigo es uno de los cereales

más consumidos por el ser humano, por lo cual su producción incrementa con el paso de los años. El grano del trigo es utilizado en gran variedad de productos alimenticios, por tal motivo forma parte de una de las plantas más importantes a nivel mundial en cuestión de alimentación y nutrición humana (SAGARPA, 2005).

3.5 Utilización del gen 16S rRNA para determinar poblaciones microbianas

Desde hace varios años se ha destacado la utilización del gen 16S rRNA debido a su trabajo para identificar diferentes grupos de comunidades microbianas presentes en un medio. En el caso de los suelos no es la excepción, ya que a partir de su utilización existen diferentes estudios que identifican los componentes de diferentes tipos de suelos, como son, forestales, desérticos, pastizales; siendo el suelo destinado a la agricultura uno de los principales para realizar estudios a nivel molecular (Romero-Tepal *et al.*, 2014).

La técnica se basa principalmente en la extracción de DNA por medio de distintas técnicas bioquímicas, cuando es obtenido el DNA bacteriano, se amplifica el fragmento correspondiente del gen 16S rRNA por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés, copia millones de veces el fragmento correspondiente del gen. Posteriormente, se toma el resultado de la amplificación para su secuenciación y cuando se tiene el resultado de la secuenciación de cada uno de los diferentes grupos bacterianos del gen correspondiente, se compara en bases de datos, por medio de las cuales se puede conocer qué tipo y cuantos grupos bacterianos conforman el suelo (Romero-Tepal *et al.*, 2014).

Otra de las técnicas moleculares con mayor relevancia es la pirosecuenciación 454 del gen 16 rRNA la cual permite el estudio de diversas poblaciones bacterianas cuando se presentan afectadas por la aplicación de residuos de cultivos (Ramírez-Villanueva *et al.*, 2015).

IV.OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Obtener DNA metagenómico de suelos con distintos tratamientos para la identificación de comunidades bacterianas, por medio de la técnica de PCR dirigida al gen 16S rRNA.

4.2 Objetivos específicos

1. Aplicar tres protocolos de extracción de DNA metagenómico.
2. Comprobar presencia de DNA metagenómico en muestras.
3. Efectuar pruebas de PCR dirigidas al gen 16S rRNA.
4. Confirmar presencia o ausencia de productos en pruebas de PCR.
5. Purificar los productos de PCR.
6. Confirmar la purificación mediante prueba de electroforesis.

V. METODOLOGÍA UTILIZADA

Se aplicaron 5 tratamientos al cultivo de *Triticum aestivum* L. a nivel invernadero en columnas de PVC de 60 cm de alto por 20 cm de ancho. Cada columna contenía 6kg de suelo agrícola proveniente de Otumba, Estado de México. Los tratamientos se mencionan a continuación:

I) Control, suelo sin la adición de fertilizantes, **II)** Urea, suelo adicionado con urea a una dosis de 100 kg N/h, **III)** Biosólido, suelo con la adición de biosólido a una dosis de 100 kg N/h, **IV)** Biosólido + estiércol, mezcla de biosólido y estiércol a una dosis de 100 kg N/h y **V)** Estiércol, suelo con la adición de estiércol a una dosis de 100 kg N/h.

Cada tratamiento se mezcló de manera homogénea y se agregó a cada uno 5 semillas, a las cuales se les indujo previamente la etiolación en placas de Petri en agar agua para conseguir un 100% de germinación. Después se tomaron muestras

de 6 g de suelo de cada uno de los tratamientos por 120 días, con la finalidad de extraer el DNA metagenómico y aplicar las técnicas que se describen a continuación.

5.1 Toma de muestra

Se tomaron muestras de suelo (6 g) de cada columna en la cual se cultivó la planta de trigo con los distintos tratamientos, tomando también una muestra del control, en los días 0, 3, 80 y 120, con el objetivo de permitirle a la planta concluir con su ciclo de producción, lo anterior con la finalidad de extraer el DNA metagenómico y realizar posteriormente la amplificación del gen 16S rRNA, su secuenciamiento y el análisis.

5.2 Eliminación de materia orgánica

Se pesaron 0.5 g de suelo en un tubo Falcon® de 15 ml, se llevó a cabo el mismo procedimiento en 4 tubos por muestra. Se agregó 10 ml de pirofosfato de sodio 0.15 M y se agitó en vórtex por 3 minutos hasta resuspender perfectamente, después se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante; se repitieron los pasos anteriores hasta que el sobrenadante se tornó transparente.

Para eliminar el pirofosfato de sodio se adicionaron 10 ml de buffer de fosfatos pH 8 y se agitó en vórtex por 3 minutos, se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos y se repitió este paso en tres ocasiones.

5.3 Extracción de DNA

5.3.1 Protocolo para lisis de células microbianas encontradas en el suelo.

Método modificado de Valenzuela-Encinas *et al.*, 2009.

- Se agregó 500 µl de solución lisis I y se resuspendió en vórtex, se agregó 500 µl de solución lisis II y un volumen de arena estéril en cada muestra lavada previamente con pirofosfato y buffer de fosfatos.
- Se agitaron los tubos en vórtex durante 15 minutos a velocidad máxima.

- Las muestras se incubaron en hielo seco de 20-30 minutos a 70°C, concluido el tiempo de incubación se introdujeron inmediatamente al termobañó a 70 °C de 20-30 minutos para que el choque térmico fuera más eficiente.

- Se retiraron las muestras del termobañó y se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos y se pasó el sobrenadante a tubos nuevos eppendorf® de 1.5 ml.

5.3.2 Método modificado de Hoffman y Winston, 1987.

- Se agregó 700 µl de solución lisis de Winston, un volumen de arena estéril y se resuspendió agitando en vórtex.

- Se agitaron los tubos en vórtex durante 15 minutos a velocidad máxima.

- Se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos y se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf® nuevo de 1.5 ml.

5.3.3 Método de Sambrook y Russell, 2001.

- A los suelos lavados con anterioridad, se les adicionó 1ml de buffer para lisozima y 80 µl de lisozima 10 mg/ml y se incubaron a 37 °C durante 1 hora.

- Se adicionó 1 ml de SDS 10% y 0.5 g de arena estéril y se agitaron en vórtex durante 15 minutos.

- Se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos y se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf® nuevo de 1.5 ml.

5.4 Eliminación de proteínas

- A cada uno de los tubos eppendorf® obtenidos de las tres técnicas, se les efectuó el mismo procedimiento para la eliminación de proteínas y contaminantes. A continuación, se describe el procedimiento.

- Se agregaron 1/5 del volumen de EDTA 0.5 M pH 8 y del volumen final, 1/10 de volumen de acetato de potasio 5 M pH 5.

- Se incubaron a 4°C durante 30 minutos.

- Se centrifugaron a 13,000 rpm a 4°C por 10 minutos y se transfirió el sobrenadante (que contiene el DNA) a un tubo nuevo.
- Se hizo extracción con 400 µl de la solución de cloroformo: alcohol-isoamílico 24:1 y se agitó en vórtex a la máxima velocidad.
- Se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo.
- La extracción con cloroformo y la centrifugación se repitieron.
- Se precipitó el DNA de la fase acuosa de la segunda extracción con cloroformo agregando un volumen de PEG al 13% y se agitó en vórtex.
- Se incubó a -20 °C toda la noche.
- Se centrifugaron a 13,000 rpm a 4 °C durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante por decantación.
- Se lavó la pastilla con 500 µl de etanol 70% frío se centrifugaron a 13,000 rpm a 4 °C durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante por decantación cuidando no eliminar la pastilla de DNA.
- Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 50 µl de agua estéril.

5.5 Confirmación de la calidad del DNA

Se verificó la calidad del DNA mediante electroforesis con 3 µl de muestra y 1 µl de buffer de carga en un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X, 90 V 25 minutos.

5.6 Amplificación del gen 16S rRNA

Una vez confirmada la extracción de DNA de cada una de las muestras, comprobando que no se encontrara degradado y se observara una única banda de DNA, se mezclaron las extracciones de cada técnica por cada muestra con el propósito de crear un pool y de éste realizar la amplificación del gen 16S rRNA bacteriano (Tabla 1).

Tabla 1. Reactivos y sus volúmenes de PCR para muestras de DNA metagenómico

Reactivo	Concentración
Reg. 10 X	2.5µL
MgCl ₂ (25 mM)	2.0 µL
BSA	1.0µL
dNTP's	0.5µL
Rev.	0.5µL
Taq. Polimerasa	0.125µL
H ₂ O	17.2µL
DNA	1.0µL
MID	0.5µL

**Taq. Polimerasa, proviene de *Thermus aquaticus* (termófilas).

**MID Secuencia de 10pb que se adiciona a la reacción para identificar cada muestra.

Para poder realizar la amplificación del gen 16S rRNA, se utilizaron los primers que incluyen etiquetas de 10 pb [8-F (5'-AGA GTT TGA TCI TGG CTC A-3') y 556-R (5'-TGC CAG IAG CIG CGG TAA-3')], conteniendo los adaptadores para el secuenciamiento 454 y que codifican para la región V1 -V3.

Para meter las muestras en el termociclador TECHNE Tauchgene Gradient® se adicionó el DNA y MID respectivo y se procedió a utilizar el programa PCR 1500, el cual mantiene la temperatura de inicio en 95°C/10 minutos, confirmando así la desnaturalización del DNA (Tabla 1). Ya que concluyó el tiempo se mantuvo por 50 segundos a la misma temperatura y después descendió a 53°C/45 segundos, es importante mencionar que a esta temperatura los primers (Rev y MID), se alinean a los codones de iniciación para el gen 16S rRNA; para finalizar la amplificación, la temperatura aumenta nuevamente, pero esta vez a 74°C/50 segundos, a esta temperatura la taq polimerasa empieza a adicionar moléculas, llamadas nucleótidos a 100 nucleótidos/segundo, lo que conforma un ciclo de PCR, el cual se repite por 25 veces para lograr mayor síntesis de fragmentos.

Por último, se llevaron las muestras a un termociclador para bajar su temperatura y se realizó la prueba de electroforesis, cargando las muestras en un gel de agarosa al 0.8%, para comprobar la presencia de los productos de PCR.

5.7 Purificación de muestras y su confirmación

Con el propósito de eliminar los restos que quedan de algunos reactivos, como, buffer, primers, taq polimerasa, entre otros; se deben purificar. Esto se lleva a cabo mediante un kit GE Healthcare® que permite eliminar dichos reactivos; en este kit se procede a realizar el pool de PCR con la finalidad de obtener 100µl de muestra (Tabla 2).

Tabla 2. Volúmenes de reactivos de la purificación para productos de PCR.

Buffer	Concentración	Reposo	Centrifugación	Destino del producto
Capture buffer	500µL	20 minutos	1000rpm	Desechado
Wash buffer	500µL	5 minutos	1000rpm	Desechado
Elution buffer	21µL	20 minutos	1300rpm	Electroforesis

5.8 Secuenciamiento del gen 16S rRNA

El proceso de secuenciamiento se realizó en MacroGen inc. Korea, mediante pirosecuenciación 454 utilizando un pirosecuenciador Roche 454 GS-FLX Plus.

VI. ACTIVIDADES REALIZADAS

1. Realización de un muestreo en invernadero de los diferentes tratamientos aplicados a columnas con la planta *Triticum aestivum* L.
2. Extracción de DNA metagenómico mediante tres diferentes técnicas.
3. Identificación de presencia de DNA en las muestras de suelo y confirmación de su calidad.
4. Realización de pruebas PCR dirigidas al gen16s rRNA.

5. Aplicación de técnicas de purificación para los productos de PCR y confirmación de presencia de este.
6. Pruebas de confirmación de la purificación de los productos de PCR.
7. Realización de cuantificación de DNA.
8. Evaluación y discusión de resultados.
9. Elaboración de informe final.

VII. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS

Se logró obtener el DNA metagenómico de las muestras de suelo de la planta *Triticum aestivum* L., con los diferentes tratamientos a través de los diferentes métodos de extracción de DNA aplicados en laboratorio y todo esto, se pudo corroborar por medio de pruebas de electroforesis.

Aunado a esto se pudieron realizar con éxito las amplificaciones mediante la técnica de PCR dirigida al gen 16S rRNA y de igual manera confirmarlo por medio de la prueba de electroforesis.

Por último, se utilizó el kit GE Healthcare® para las purificaciones de los productos PCR con un resultado positivo nuevamente con la implementación de la prueba de electroforesis y de un fluorospectrómetro Nanodrop™ 3300.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Realización de lavados con pirofosfato de sodio

Las matrices de donde se extrae el DNA son diferentes, en cuanto a composición y materia orgánica, esta debe ser eliminada antes de la amplificación, por medio de la prueba de PCR, lo cual refiere a proceder de manera correcta en la técnica de extracción de DNA metagenómico para lograr un resultado positivo en la amplificación de los distintos genes deseados.

Fue indispensable realizar lavados con pirofosfato de sodio a cada tratamiento de cada columna para hacer la extracción de DNA, ya que permite encapsular en su molécula materia orgánica, pero dejando que el DNA permanezca en la matriz del

sustrato, al cual se le está realizando la extracción, tal es el caso del suelo de los distintos tratamientos (biosólido).

Entre más materia orgánica se encuentre presente en la matriz, más serán los lavados que se deban realizar a la muestra, esto con el fin de asegurar la extracción (Figura 1).

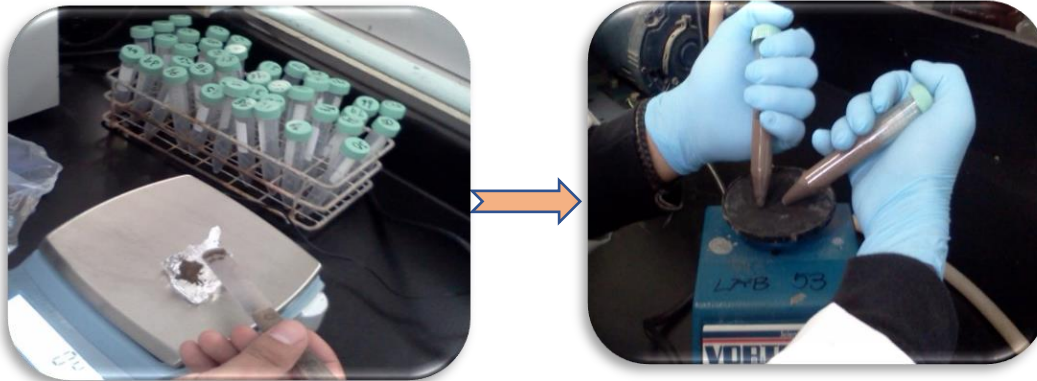


Figura 1. Proceso de pesado y lavado de suelos con pirofosfato.

El biosólido es una enmienda cargada de materia orgánica, lo cual se confirmó con la gran cantidad de lavados realizados a las muestras con su tratamiento, para poderse procesar para la extracción con los distintos protocolos.

En el caso del suelo, a pesar de ser de uso agrícola, lo que implicó que contuviera buena cantidad de materia orgánica, requirió de menos lavados con pirofosfato de sodio (6 lavados), mientras que la muestra con biosólido requirió de 12 lavados totales más los lavados con buffer de fosfatos para la eliminación del pirofosfato de sodio, debido a que la presencia de este en la muestra final pudiera interferir en la amplificación.

8.2 Extracción de DNA metagenómico

En el laboratorio donde se desarrollaron las técnicas y pruebas para la conformación del trabajo, se tienen estandarizados los tres protocolos mencionados con anterioridad para extracción de DNA de una manera rutinaria, ya que si se aplicara un solo protocolo, no se podría asegurar la obtención de DNA perteneciente a la mayoría de los grupos bacterianos en la muestra, esto debido a que su composición membranal y de pared celular presentan una estructura muy diversa con respecto a los distintos filos bacterianos; es así que al aplicar los tres protocolos de extracción

se está considerando extraer el DNA metagenómico de los diferentes grupos bacterianos (Figura 2).

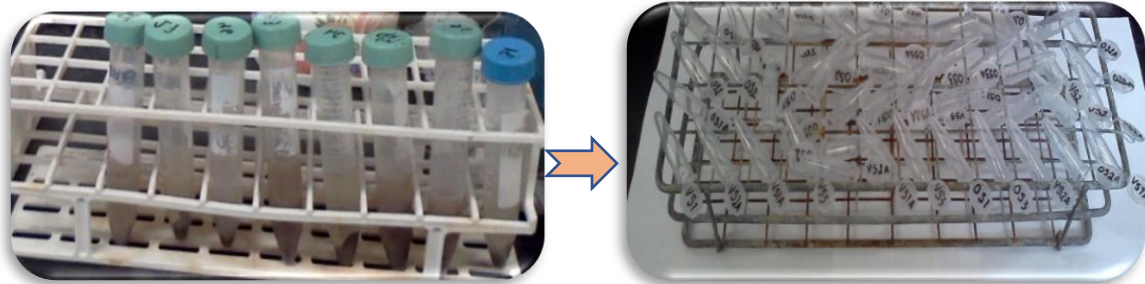


Figura 2. Muestras en proceso de extracción de DNA metagenómico.

Por otro lado, es importante mencionar que no se ha realizado una cuantificación del rendimiento de cada tratamiento, debido a los elevados costos de los reactivos utilizados en el proceso y el poco tiempo del que se dispuso.

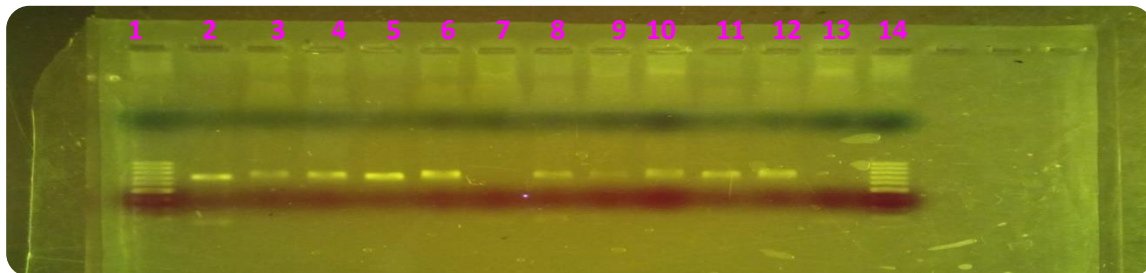


Figura 3. Electroforesis gel de agarosa 0.8% de los diferentes tratamientos de *Triticum aestivum* L.

En la figura 3 se muestra el DNA metagenómico perteneciente a las muestras con los diferentes tratamientos evaluadas en este experimento.

El primer y último carril (1 y 14) corresponde al marcador de tamaño molecular 1000 pb, se toma como referencia del tamaño del DNA extraído. Los carriles 2 y 4 pertenecen al suelo control con los distintos protocolos utilizados, mientras que el 5 y el 7 corresponden al tratamiento con biosólido, siendo el carril 7 el menos perceptible, realizado con el protocolo de lisozima. Por su parte los carriles 8, 9 y 10 pertenecen a la extracción de DNA metagenómico en suelos con tratamiento de urea, donde se pueden observar las bandas con claridad sin efecto de degradado.

Por último, los carriles 11, 12 y 13 corresponden a la extracción de DNA en suelos con biosólido y extraídos por el método de lisis enzimática, donde nuevamente se aprecia menor visibilidad, siendo este el método menos viable para el biosólido a comparación del método de Valenzuela-Encinas *et al.*, 2009, por el cual se obtiene una mejor extracción de DNA metagenómico.

8.3 Amplificación del gen 16S rRNA

Una vez que se obtuvo el DNA metagenómico de cada muestra, se llevaron a cabo las pruebas de PCR para obtener las amplificaciones de la porción que codifica para el gen 16S rRNA basándose en el protocolo utilizado en el laboratorio.

Durante la realización de la técnica fue necesario realizar cambios en los reactivos utilizados en la técnica de PCR, ya que en ocasiones se arrastran sustancias en el DNA e interfieren en la amplificación; así que la tabla de reactivos como las cantidades o concentraciones son de referencia y no se incluyen con exactitud todos los cambios realizados, ya que estos son de manera muy puntual en la mayoría de las ocasiones (Tabla 1).

Por otra parte, para las muestras de biosólido (Figura 3) se incrementó la adición de albumina sérica (BSA por sus siglas en inglés) y se disminuyó el uso de cloruro de magnesio como cofactor; todo esto debido a la naturaleza del biosólido que contiene muchas sales, así como metales pesados.

En este caso la albumina sérica actuó bloqueando sustancias que pudieran intervenir en la reacción y la disminución de cloruro de magnesio fue porque el biosólido en sí puede contenerlo y alterar la reacción al emplear mayor cantidad.

La parte en la que no se realizaron cambios en los reactivos, fue en la amplificación con el suelo control y el suelo con urea, debido a que los protocolos que se utilizan en el laboratorio están adaptados a trabajar suelos con distintas características, no omitiendo los suelos agrícolas.

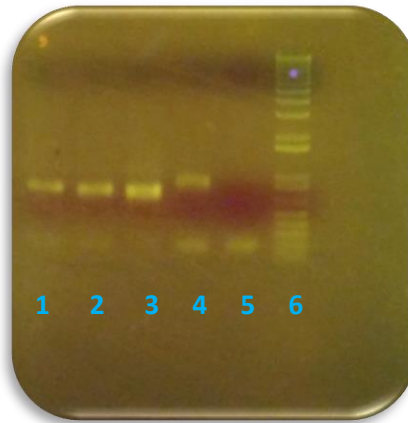


Figura 3. Amplificación del gen 16S rRNA de los distintos tratamientos. Marcador de tamaño molecular 100 pb carril 6.

La amplificación del gen 16S rRNA se muestra en la figura 3, donde se pueden observar los resultados de cada tratamiento y el marcador de tamaño molecular en los carriles, 1) biosólido, 2) suelo + biosólido, 3) suelo control, 4) suelo + urea, 5) control negativo y 6) marcador de tamaño molecular 700 pb, que en este caso sería una amplificación exitosa del amplicón esperado.

En cada caso se puede observar el DNA amplificado, se muestra una banda intermedia muy intensa, por otro lado, en el fondo del carril, una banda muy tenue y corresponde a reactivos no utilizados como la etiqueta utilizada en los primers. Además, en el carril 5, se muestra una banda no existente, pertenece al control negativo en el cual se realiza el procedimiento de PCR con todos los reactivos implicados en la reacción, con el propósito de identificar si estos se encuentran contaminados y así corroborar si la reacción fue errónea. En algunos casos, el tamaño puede variar entre 600 a 700 pb debido a diferentes factores involucrados en la reacción, como puede ser, DNA degradado, número de ciclos, presencia de sales, temperatura de alineamiento, entre otros; así al obtener 700 pb no fue necesario ajustar la PCR ya que era el tamaño deseado.

Por último, antes de construir la librería genómica, se eliminaron las bandas encontradas en el fondo de los carriles, porque son fracciones no deseadas en los

productos de amplificación, mediante la purificación con el kit GE Healthcare®. En la figura III se puede observar la banda eliminada en cada carril, correspondiente a las etiquetas y primers, sin embargo, no siempre se tuvo éxito en las purificaciones, porque en ocasiones se perdieron muestras en el proceso. Ciertos factores que suelen afectar la purificación de muestras son la temperatura, afecta en ocasiones la membrana donde queda atrapado el amplicón, perdiendo afinidad si ésta es alta. Otro de ellos, es el lavado con wash buffer, altera la permeabilidad del amplicón y se puede eluir con el buffer de lavado y a su vez, se ve afectado principalmente por la temperatura y por la acción mecánica, si la adición del buffer sobre la membrana es muy agresiva.

Adicionalmente, otro posible factor perjudicial para la purificación de las muestras es la adición de buffer de elusión, en primera instancia porque también se ve afectado por la temperatura y por otro lado depende de la cantidad añadida, así se puede recuperar en menor o mayor medida el amplicón.

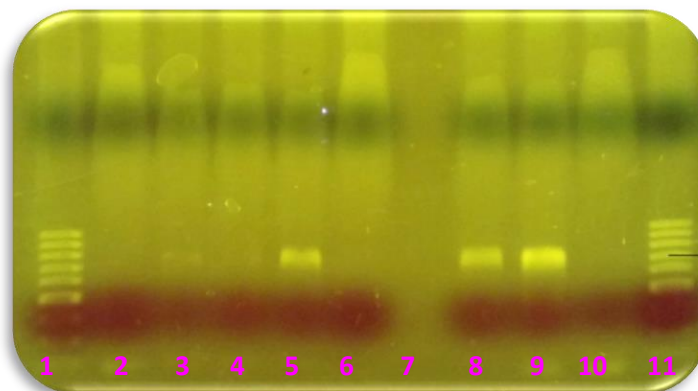


Figura 4. Purificación de amplicones de los tratamientos utilizados.

En los carriles 5 y 8 (Figura 4) se observa una purificación exitosa donde las etiquetas y primers han sido eliminadas y en los carriles 2,4 y 6 se observan purificaciones en las cuales se perdieron las muestras. Los carriles 3 y 9 se observa la purificación no realizada correctamente y se sigue observando la presencia de la banda de primers en la muestra. Por último, se vuelve a utilizar el marcador de tamaño molecular para confirmar que el tamaño corresponda al amplicón esperado.

8.4 Secuenciamiento del gen 16S rRNA

Es importante mencionar que el secuenciamiento contemplado para este experimento no se llevó a cabo durante el transcurso del servicio social, porque este proceso se manda a un servicio de secuenciamiento en otro país y a partir de ese momento, depende exclusivamente de la logística del laboratorio.

En el caso de esta técnica, se incluyeron muestras adicionales a las previamente contempladas al servicio de secuenciamiento, por lo cual los tiempos para concluir esta tarea se tuvieron que extender.

IX. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, no todos los protocolos de extracción se pueden usar de forma extensiva para todos los suelos o matrices, debido a las características fisicoquímicas distintas y a pesar de estar adaptados en el laboratorio. Además, algunos requieren métodos más agresivos o con actividades químicas o físicas más fuertes para que el DNA pueda liberarse o a su vez obtener mayor calidad; como es el caso del método de Valenzuela-Encinas *et al.*, 2009 y del método de Hoffman y Winston 1987, estos son los que arrojaron mejores resultados en cuanto a la extracción en este tipo de ensayos; el tercer protocolo basado en el método de lisis enzimática y extrae un DNA de menor calidad para la amplificación. Sin embargo, para el tipo de suelos utilizados como muestra con los distintos tratamientos, estos protocolos arrojaron resultados positivos, logrando el éxito de la extracción del DNA metagenómico perteneciente a la mayoría de los grupos bacterianos.

En cuanto a la amplificación de las muestras de DNA metagenómico, se puede concluir, los resultados fueron positivos al obtener el tamaño deseado, 700 pb y por ende, todas las amplificaciones de todas las muestras de DNA, esto por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, a la cual se le realizaron cambios puntuales, en los reactivos, con la finalidad de no verse interferida dicha amplificación. Es importante resaltar para el caso del biosólido, se aumentó la adición del reactivo BSA y disminuyó el cloruro de magnesio, esto por la cantidad

de sales y metales pesados contenidos en él e involucrados en la alteración de la amplificación.

De acuerdo con las técnicas de purificación de los productos de PCR, se obtuvieron todas las muestras purificadas con éxito, sin embargo, es importante mencionar que en el proceso se perdieron algunas muestras, por lo cual, se debió repetir el proceso desde un inicio, solo así se confirmó el tamaño correspondiente al amplicón esperado.

Por otro lado, no se pudo obtener el resultado de la secuenciación, debido a que esta técnica no se llevó a cabo en el laboratorio de ecología de suelos, sino que se mandó a otro laboratorio encargado del servicio de secuenciación y el tiempo de entrega era indefinido. Aunado a esto, no se llevó a cabo una cuantificación del rendimiento de cada tratamiento en el cultivo de *Triticum aestivum* L., debido al tiempo limitado en el laboratorio y el costo en la inversión de reactivos para su análisis.

X. LITERATURA CITADA

Environmental Protection Agency. EPA. U.S.A. 2008 *Folleto Informativo de tecnología de biosólidos. Aplicación de biosólidos al terreno*. Office of wáter. Washington, D.C. PP.

Escalante, A, Gosset G., Martínez A, Bolívar F. 2004 Diversidad Bacteriana del suelo; métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. Agrocienza, Fecha de consulta 14 de septiembre de 2019.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO. 2010. *Conservación de los recursos para una agricultura sustentable, material orgánica y actividad biológica*. México. www.fao.org Fecha de consulta: 19/08/2015

Hoffman, C. S y Winston F. 1987. *A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli*. Gene. 57: 267-272.

Paz -Castro, C; Henríquez O. F. R. 2007. *Posibilidades de aplicación de lodos o biosólidos de los suelos del sector norte de la región metropolitana de Santiago*. Revista de geografía norte grande, Santiago de Chile.

Ramírez-Villanueva, D. A. Bello. L. J. M. Navarro N. Y. E. Luna G. M. Bram G. N. V. Dendooven L. 2015 *Bacterial community structure in maize residue amended soil with contrasting management practices*. Applied soil ecology.

Romero-Tepal E. M. Contreras B. E. Navarro N. Y. E. Ruíz V. V. M. Luna G. M. Gutiérrez M. F. A. Dendooven L. 2014. *Changes in bacterial community structure in stored wormbed leachate*. Journal of molecular microbiology and biotechnology.

Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. SAGARPA 2005. OEIDRUS Baja California. *El cultivo del trigo*, México. www.oeidrus-bc.gob.mx Fecha de consulta: 19/08/2015

Trinidad, A. 2005 *Utilización de estiércoles*. SAGARPA Subsecretaria de Desarrollo Rural. Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural, México.

Valenzuela-Encinas C., Neria, G. I., Alcántara, H. R. J., Enrique, A. J. A., Estrada, A. I., Hernández, R. C., Dendooven, L y Marsch, R. 2009. *Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkalina-saline soil of the former lake Texcoco* (México). *Extremophiles*. 12:247-254.

Velázquez, A. 2012. *La importancia de los microorganismos del suelo en la nutrición vegetal*. Biotecnología aplicada. ABIOSA. Biotecnología Aplicada Chihuahua, México. www.unitfrut.com.mx Fecha de consulta: 27/08/2015