

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN
SUPERIOR TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA
GUTIÉRREZ, CHIAPAS.



SEP

TEMA:

**“ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA OBTENCIÓN DEL
RESISTOMA DE SUELOS.”**

RESIDENCIA PROFESIONAL

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA:

JOSÉ RUBÉN TORRES RUIZ

Nº DE CONTROL:

09270418

ASESOR:

DR. JOAQUÍN ADOLFO MONTES MOLINA

REVISORES:

DR. REINER RINCON ROSALES

DR. FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI

TUXTLA GUTIÉRREZ. CHIAPAS A; 2 DE JUNIO DEL 2014

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE CUADROS.....	4
INDICE DE FIGURAS.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. JUSTIFICACIÓN.....	8
3. OBJETIVOS.....	9
3.1 OBJETIVO GENERAL:.....	9
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	9
4 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE SE PARTICIPÓ:.....	10
4.1 MISIÓN.....	10
4.2 VISIÓN.....	10
4.3 LOCALIZACIÓN.....	10
5 PROBLEMAS A RESOLVER.....	11
6 ALCANCES Y LIMITACIONES.....	12
6.1 ALCANCES.....	12
6.2 LIMITACIONES.....	12
7. MARCO TEÓRICO.....	13
7.1 ANTECEDENTES DEL RESISTOMA.....	13
7.2 RESISTOMA DE SUELOS.....	14
7.3 SUELOS:.....	16
7.3.1 <i>Clasificación del suelo de acuerdo al tamaño de partícula:</i>	17
7.3.2 <i>Propiedades físicas:</i>	18
7.3.3 <i>Propiedades químicas:</i>	18
7.3.4 <i>Propiedades biológicas del suelo:</i>	18
8. ANTECEDENTES DE LOS ANTIBIÓTICOS.....	20
8.1 DEFINICIÓN DE ANTIBIÓTICO.....	20
8.2 CLASIFICACIÓN.....	21
8.2.1 Por el tipo de acción del antibiótico.....	21
8.2.1 Por el origen de sus componentes.....	21
8.2.2 Por los mecanismos de sus componentes.....	22
9. ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA).....	23
9.2 REPLICACIÓN DEL DNA.....	24
9.3.1 <i>Semi-conservador:</i>	24
9.3.2 <i>Bidireccional:</i>	25
9.3.3 <i>Semi-discontinuo:</i>	25
10. MECANISMOS DE INTERCAMBIO DE GENES.....	26
10.1 CLASIFICACIÓN DE PROCESOS DE INTERCAMBIO GENÉTICO.....	26

10.2	TRANSFORMACIÓN	27
10.3	CONJUGACIÓN:	27
10.4	RECOMBINACIÓN NO HOMÓLOGA O TRANSPOSON:	28
10.5	TRANSDUCCIÓN.....	29
11.	METODOLOGIA.....	31
11.1	OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y SU CLASIFICACIÓN.	31
12.	RESULTADOS.	34
13.	DISCUSIÓN	38
14.	CONCLUSIÓN.....	39
15.	REFERENCIAS	40
16.	ANEXOS.....	43
I.	PROCEDIMIENTO DEL RESISTOMA DE SUELO.....	43
	<i>Capacidad de Retención de Agua (CRA).....</i>	<i>43</i>
	<i>Incubación 1</i>	<i>43</i>
	<i>Incubación 2</i>	<i>43</i>
	<i>Cosechar</i>	<i>43</i>
	<i>Conservar.....</i>	<i>43</i>
II.	TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE DNA.....	44
III.	TÉCNICA 1 SEGÚN PROTOCOLO DE (KEMP B.M. ET AL, 2011).....	44
I.	TÉCNICA 2 SEGÚN PROTOCOLO DE (KEMP B.M., 2007).....	44
IV.	TÉCNICA 3 SEGÚN PROTOCOLO DE (KEMP B.M., 2007)	45
V.	TÉCNICA PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA EN MUESTRAS DE SUELO.	45

INDICE DE CUADROS

Cuadro Nº		pag.
1	Clasificación de suelo.	17
2	Clasificación de los mecanismos de transferencia de genes	26
3	Clasificación de las muestras de suelo.	31
4	Clasificación de los antibioticos para el proyecto	33

INDICE DE FIGURAS

Fig. N°		pag.
1	Localización geográfica del instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez	10
2	Clasificación del suelo por tamaño de partícula	16
4	Placa con cepa de <i>Penicilium</i> productora de penicilina	21
5	Clasificación de antibióticos de acuerdo al mecanismo de acción en la célula.	22
6	Organización y estructura de la molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA)	23
7	Proceso de replicación del ADN	25
8	Proceso del mecanismo de transformación	27
9	Mecanismo de conjugación a través de los pilis de una célula	27
10	Mecanismos del transposon	28
11	Mecanismos de transducción	30
12	<i>Procedimiento del pre incubación de las muestras de suelo.</i>	34
13	<i>Incubar las muestras a 25°C por 7 días en un ambiente húmedo.</i>	34
14	Procedimiento a la incubación 2 de la técnica del resistoma.	35
15	Depositar 0.95 gr de suelo en tubos falcón con 7.5 ml de medio de cultivo.	35
16	<i>Tomar 1 ml y depositarlo en los matraces correspondientes.</i>	35
17	<i>Incubación de los matraces a 22°C por 100 rpm por 7 días.</i>	36
18	<i>Tubos con medio de cultivo.</i>	36
19	<i>Alicuotar los antibioticos depositándolos en los tubos.</i>	36
20	<i>Adicionar con en el medio de cultivo con antibiótico.</i>	36
21	<i>Segunda incubación ahora con antibioticos.</i>	37
22	<i>Conserva y Cosecha de la incubación 2 en tubos eppendorf.</i>	37
23	<i>Los tubos fueron almacenados a -70°C. Para su conservación.</i>	37

1. INTRODUCCIÓN

El resistòma de suelos se refiere como la identificación de bacterias resistentes a antibioticos siendo (patógenas o no patógenas) (Walsh and Brion, 2013).

El resistòma del suelo es un tema de gran interés, siendo ampliamente investigado, con una gran campo de investigación ya que es importante encontrar una solución oportuna para mejorar los antibioticos volviéndolos más eficientes, o con la búsqueda de nuevos conocimiento sobre la funcionalidad de la resistencia que hay contra los antimicrobianos, para el combate oportuno de enfermedades infecciosas, o la detención oportuna del de la resistencia que hay en la bacterias hoy en la actualidad (Czekalski et al, 2012).

Estos microorganismos están presentes en el suelo, resistiendo en presencia de múltiples sustancias toxicas. Ya que la contaminación es un factor que ha contribuido a la aparición de estos genes de resistencia, como una consecuencia de la mutación encontradas en muchas bacterias, que al ser alteradas genéticamente se vuelven capaces de resistir a muchos antibioticos siendo “invencibles”.

La agricultura también se ha sumado como otro de los factores que ha favorecido a la resistencia ya que las personas todavía recurren a las técnicas conservacionalista, con el uso de fungicidas y plaguicidas erosionando el suelo dañándolo gravemente; ocasionado que las bacterias que están dentro del suelo, se adapten a ecosistemas alterados modificando la estructura genética de las bacterias (Dalkman et al, 2012).

Se han encontrado 2 tipos de resistencia que son la resistencia intrínseca que consiste en mecanismos de defensa internos que están dentro de la célula. Y la resistencia adquirida que es aquel mecanismo que fue obtenido a través del intercambio genético con otro microorganismo, este tipo de resistencia es la más importante ya que es la causante de la desactivación de la mayoría de los antibioticos.

La descripción de estos microorganismos se logra mediante, la cuantificación de DNA seguida de la secuenciación para la identificación de bacterias resistentes, estas lecturas son comparadas con bibliotecas genómicas observando la diferencia que hay en las pares de base (pb) identificando así la bacteria en cuestión (Garza et al 2009).

Para esto, es necesaria la incubación de microorganismos en un medio de cultivo que propicie el óptimo crecimiento de la población microbiana del suelo, con una segunda incubación con antibióticos para la obtención de cepas resistentes. Identificándolas posteriormente. Y así comprender el conjunto de bacterias que conforman el resistoma del suelo como una contribución más en este tema de tal importante relevancia (Sommer and Dantas 2011).

2. JUSTIFICACIÓN.

El descubrimiento de los antibióticos empezó una era moderna interviniendo en la cura oportuna de enfermedades infecciosas, pero con el paso del tiempo, la contaminación y el uso continuo de los antibióticos, propicio que los microorganismos se desarrollaran con genes de resistencia, estos genes están localizados dentro del DNA de las células activando el mecanismo de defensa que desactiva o desvía la función del antibiótico o medicamento. Logrando que la bacteria resista a la acción de dicho antimicrobiano. (Manrique 2012)

En la actualidad encontramos bacterias resistentes a varios antibióticos, debido a que dentro del código genético se encuentran varios genes que activan diferentes mecanismos de resistencia, transformando a la bacteria en un microorganismo multi-resistente. Esto quiere decir que la bacteria crece de manera óptima aun en la presencia de dicho antibiótico. En pocas palabras el antibiótico pierde su mecanismo de acción (Petrova 2011)

Es importante encontrar una técnica que permita la obtención de DNA en muestras de suelo que permitan un análisis detallado del código genético de las bacterias resistentes (Piddock 2006).

En el presente trabajo se pretende estabilizar una técnica para la extracción de DNA de bacterias resistentes a partir de muestras de suelo, para su identificación y así reconocer de forma fácil que tipo de bacterias presentan estos genes de resistencia.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

A. Evaluar la técnica para la obtención del DNA del resistoma de suelo.

3.2 Objetivos específicos:

- a) Evaluar un medio de cultivo para la identificación de microorganismos del suelo.
- b) Estandarizar un método para la extracción del DNA metagenómico del suelo.

4 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE SE PARTICIPÓ:

4.1 Misión.

Formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

4.2 Visión

Ser una institución de excelencia en la educación superior tecnológica del sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

4.3 Localización.

El proyecto se realizó en el Polo Tecnológico Nacional Para El Desarrollo De Investigación y Pruebas Analíticas En Biocombustibles. De Tuxtla Gutiérrez, laboratorio N°4 de biología molecular y laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Carretera Panamericana Km. 1080 s/n (Tuxtla Gutiérrez) C.P. 29050. Coordenadas del lugar del experimento: 16°46'N 93°05'O.

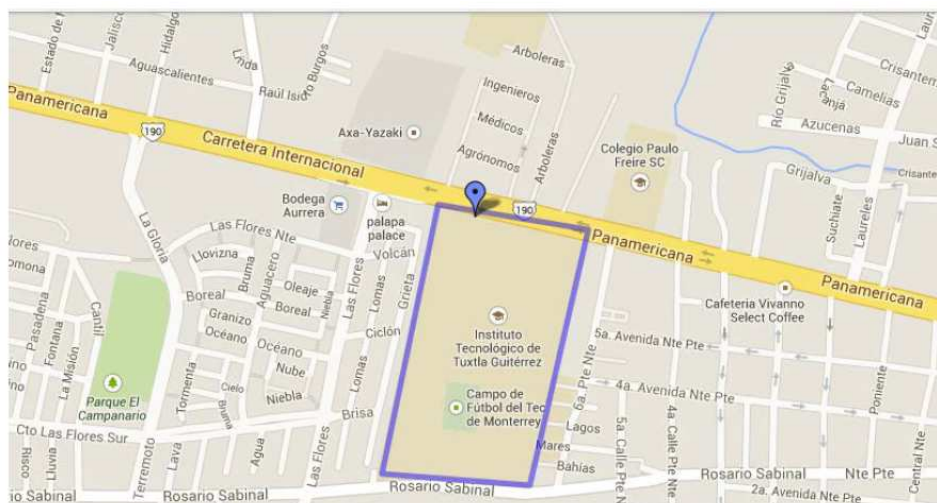


Fig. 1.- localización geográfica del instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

5 PROBLEMAS A RESOLVER

Los microorganismos del suelo, han estado en contacto con la contaminación, presente en el medio ambiente, lo que ha provocado la mutación de varias bacterias, desarrollando genes de resistencia. Al igual que el uso excesivo de los antibióticos, ha contribuido al aumento tan disparado de la resistencia, encontrándose actualmente en las bacterias patógenas o no patógenas; demostrándose en los antibiogramas, realizado en las clínicas (que son pruebas para la verificación del efecto bactericida o bacteriostático de los medicamentos para el combate de enfermedades infecciosas (Czekalski et al, 2012).

Al ser alterado el ecosistema natural de los microorganismos, estos se adaptaron a un nuevo ambiente, en el cual los microorganismos están en un constante intercambio de información genética a través de varios procesos como son: transformación, mutación, conjugación, transposon y por último la transducción (Wiedenbeck et al, 2011).

Estos procesos han conseguido la propagación de la inmunidad de estas bacterias. Encontrando pocos antibióticos que pueden ejercer sus mecanismos de acción bactericida o bacteriostática (Wright 2007).

El presente trabajo consiste en la obtención de cepas, con algún indicio de resistencia, en un medio de cultivo que propicie el crecimiento favorable de bacterias del suelo. Seleccionándolas por medio de 25 antibióticos que funcionaran como filtro para obtener las cepas resistentes, usando una concentración mínima para la observación de crecimiento, y así realizar el análisis metagenómico de su código genético (DNA), mediante una técnica estandarizada de extracción de DNA.

6 ALCANCES Y LIMITACIONES

6.1 Alcances

1. Se identificó un medio de cultivo para la obtención del resistoma de suelo.
2. Crecimiento óptimo de los microorganismos del suelo.
3. Se estandarizó la técnica para la extracción de DNA.

6.2 Limitaciones

1. No tener los equipos y reactivos necesarios para la extracción de DNA.
2. Que no haya crecimiento de microorganismos en el medio de cultivo.
3. No poder estandarizar la técnica por falta de reactivos.

7. MARCO TEÓRICO

7.1 Antecedentes del resistòma.

La resistencia a antibióticos ha existido desde tiempos muy remotos, desde el descubrimiento de la penicilina, la resistencia se clasifica en dos tipos intrínseca y extrínseca.

Cuando hablamos de resistencia intrínseca nos referimos: al mecanismo de resistencia dentro del sistema celular de la propia bacteria y que se transmite por herencia de células padres a hijos. (Melano et al, 2013)

La resistencia adquirida es la de mayor importancia, porque cualquier microorganismo puede obtenerlo, y transmitirlo a cualquier otra bacteria por métodos de transferencia, como: transposones, transformación, conjugación entre otros. Acelerando los procesos naturales de selección natural (Cox and Wright, 2013).

La presencia de un antibiótico en el suelo acelera la selección natural de los microorganismos provocando la aparición de resistencia a antibióticos. Estudios revelan que en el suelo se han encontrado infinidad de sustancias entre las que destacan tetraciclina, tilosina, (Melano et, al 2013). Entre otras como: responsables de la resistencia que hoy encontramos en las bacterias (Chander, 2005).

Los factores de contaminación que hay en el medio ambiente han afectado gravemente a los microorganismos del suelo ya que estos residuos alteran gravemente la estructura genética de las bacterias provocando mutación, acelerando los procesos biológicos. Cambiando el entorno natural de los microorganismos. (ARBs)(Chander, 2005).

Citando algunos ejemplos tenemos: el uso excesivo de antibióticos en la agricultura, las emisiones de residuos tanto doméstico, químico y farmacéutico, así como el uso de fungicidas y las emisiones de contaminantes han provocado la mutación de los microorganismos(Cytryn, 2012).

Es importante señalar que las bacterias resistentes no lleguen a encontrarse dentro de los alimentos, ya que podrían llegar los seres humanos (Czekalski, 2012). Provocando la permanencia de la enfermedad.

7.2 Resistòma de suelos

El resistòma es: la identificación de microorganismos que muestren directa o indirectamente algún tipo de resistencia, encontrados en este caso en el suelo (Cox and Wright, 2013).

El suelo es una de las mayores reservas de bacterias resistentes (stalder, 2012). De allí que el resistòma abarque la colección de todos estos microorganismos que contribuyen al aumento de la resistencia a antibióticos. Estos genes han sido adquiridos por otras bacterias a través de la transferencia horizontal de genes que se lleva a cabo en el suelo. (Yendi et, al 2013). Esta hipótesis sugiere que las ARBs que podrían encontrarse en el futuro hoy puedan ser detectadas; si se examinan los suelos a tiempo para encontrar bacterias resistentes y desentrañar el funcionamiento de los mecanismos de resistencia a antibióticos que hoy se desconocen (Wright, 2007).

Se ha intentado demostrar el origen de estas bacterias a partir de los genes de resistencia, todo indica que fue el tiempo el que hizo posible que las bacterias evolucionaran. Un estudio reciente encontró quizás la muestra de DNA más antigua, que ha proporcionado la evidencia más convincente de que la resistencia es un mecanismo natural, dejando atrás la teoría anterior que se apoyaba de los antibiótico como impulsor de este problema, lo que si se tiene claro es que los antibióticos, la creciente actividad de la agricultura y los residuos químicos han ocasionado la presión acelerada de selección de bacterias resistentes(Sommer and Dantas, 2011).Es decir que sin estos factores la resistencia estaría bajo control, pero estas actividades han acelerado y agravado este problema.

Según estudios de análisis de ADN de sedimentos de permafrost, esta muestra de gen tiene alrededor de 30,000 de años de antigüedad y se observó que contiene genes de resistencia hallando resistencia a beta-lactama, tetraciclina y glicopeptidos, sorprendentemente también se encontró resistencia a vancomicina(Sommer and Dantas, 2011).Esta evidencia apoyo fundamentalmente la teoría de que las bacterias del tipo streptomyces contienen genes de resistencia, ya que estas bacterias productoras de antibióticos tienen estos genes como un mecanismo de autoprotección.

Otra teoría hace referencia a los factores de contaminación que hay en el medio ambiente afectando gravemente a los microorganismos del suelo ya que estos residuos alteran gravemente la estructura genética de las bacterias provocando mutación entre los microorganismos, acelerando los procesos de selección natural.

Estudios revelan que se han encontrado elementos traza de antibióticos como tetraciclina y tilosina cambiando el entorno de los microorganismos, dando origen a las bacterias resistentes a antibióticos (ARBs)(Chander, 2005).

Citando algunos ejemplos tenemos: el uso excesivo de antibióticos en la agricultura, las emisiones de residuos tanto domésticos, como químicos y farmacéuticos, el uso de fungicidas y las emisiones de contaminantes ha provocado que los microorganismos muten generando estos genes de resistencia (Wright, 2007).

Los mecanismos de defensa más comunes encontrados en los microorganismos son:

- A. Por Inactivación enzimática: es el mecanismo donde las bacterias usan enzimas para la inactivación de antibioticos, por ejemplo las becta-lactamasas que inhiben a antibioticos beta-lactamicos (Walsf and Brion 2013).
- B. Por Modificación de la membrana celular: La membrana citoplasmática puede aumentar o disminuir su grado de permeabilidad dependiendo del tamaño de las moléculas y que al ser los antibióticos de mayor tamaño molecular; la

Membrana impide su paso ocasionando que el antibiótico no pueda ejercer su acción en la bacteria (Pidcock, 2006).

C. Por bombas de flujo: que actúa como un sistema de expulsión activa de antimicrobianos que utilizan muchas bacterias para la excreción de residuos tóxicos a través de enzimas transportadoras que encapsulan el antibiótico y lo expulsan fuera de la célula.

Este mecanismo se encuentra decodificados dentro del DNA en los genes de las bacterias. En donde el gen es definido como: la unidad informativa; en donde se encuentran codificados los mecanismos de resistencia (Cytryn, 2012).

Estas resistencia se encuentra dentro del ADN de las bacterias, en los genes (Un gen: es una unidad informativa), en donde en se encuentran codificados los mecanismos de resistencia a antibioticos (Cytryn, 2012).

7.3 Suelos:

Es un cuerpo natural que está compuesto de minerales y materiales orgánicos; diferenciado en horizontes de profundidad variable, que difiere de material morfológico, de composición fisicoquímica y de características biológicas (Yendi et al, 2013).

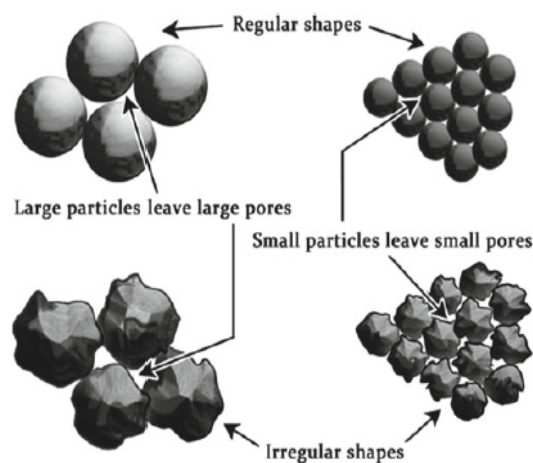


Fig. 6 diferentes tamaños de partícula

7.3.1 Clasificación del suelo de acuerdo al tamaño de partícula:

CUADRO 1. Clasificación del suelo.

Tipo de suelo	Tamaño de partícula	Características
Arena:	2 mm-0.02 mm	Visible para la vista, poca o ninguna capacidad para retener el agua y nutrientes
Limo:	0.02 mm- 0.002 mm	Son vistos a través de un microscopio, tiene baja capacidad para atraer agua nutrientes y otras partículas, es suave cuando esta mojado cambiando de textura polvorosa cuando está seca.
Arcilla	≤ 0.002 mm	Solo son vistos a través de un microscopio electrónico, tiene alta capacidad para retener agua, nutrientes y otras partículas, pegajosa cuando esta húmeda y tiende a formar terrones cuando está seca.

7.3.2 Propiedades físicas:

Incluyen color, textura, estructura, porosidad, densidad, consistencia, temperatura y aire. El suelo contiene humedad, materia orgánica, y condiciones redox, el suelo contiene dos tipos de partículas primarias y secundarias (Osman, 2013).

Partículas primarias: son partículas discretas individuales tales como: arena limo y arcilla, y las partículas secundarias son sus agregados de 2 o varios elementos primarios que se adhieren entre sí para formar una partícula secundaria

7.3.3 Propiedades químicas:

El suelo es una entidad química ya que contiene más de 100 elementos químicos que comprende entre: materiales sólidos (orgánicos e inorgánicos, líquidos (solubles e insolubles) y gases. Los electos químicos más destacados son, oxígeno (O), silicio (Si), aluminio (Al), hierro (Fe), calcio (Ca), magnesio (Mg), y potasio (K). También se encuentran elementos que sirven de nutrición para las plantas: fósforo (P), azufre (S), cinc (Zn), entre otros. (Osman, 2013).

El nitrógeno se produce en el suelo a través de la descomposición de materia orgánica es vital para la formación de aminoácidos proteínas y péptidos.

Los micronutrientes encontrados en suelo (Fe, Zn, B, y Ni) son obtenidos bajo la degradación de materia orgánica que varía de acuerdo al tipo de suelo (Yendi et al, 2013).

7.3.4 Propiedades biológicas del suelo:

En el suelo encontramos un sin número de microorganismos realizando una variedad de funciones para su crecimiento y reproducción, estos organismos comparten varias funciones como es la fotosíntesis; además producen materia orgánica al igual que la descomponen.

Los microorganismos del suelo llevan a cabo la fertilidad del suelo así como su producción de materia orgánica, actuando como promotores de crecimiento en las plantas.(Osman, 2013).

Los microorganismos del suelo son tan esenciales que aunque abarquen un 0.5% de la composición total, es suficiente para todos los procesos biológicos que se llevan a cabo en él.

Estas bacterias generalmente se hallan en el suelo a una profundidad de 0-15 cm, ya que esta zona cuenta con residuos orgánicos y nutrientes disponibles para el crecimiento de la biota en el suelo (Osman, 2013).

8. ANTECEDENTES DE LOS ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos han sido ampliamente utilizados durante 70 años desde su descubrimiento. En la clínicas como agentes contra enfermedades infecciosas provocadas por microorganismos tanto en personas como en los animales (veterinarias) y en los alimentos como prevención de enfermedades y evitar su transmisión por la vía alimentaria (Manrique, 2012).

En el año 1928, **Alexander Fleming**, un científico escocés (1881-1955), descubrió de manera fortuita la penicilina, observando cómo un moho que contaminaba una de sus placas de cultivo inhibía el crecimiento de ***Staphylococcus aureus***.

El descubrimiento de la penicilina, fue el primer compuesto natural con actividad antibacteriana, que marco el principio y fin de una era, este hecho sin precedentes abrió el paso a la era farmacéutica en la historia de la Medicina y en el tratamiento de las enfermedades infecciosas(Manrique, 2012).

La industria farmacéutica inició una carrera para obtener nuevas moléculas de antibióticos a partir de diferentes microorganismos, preferentemente del suelo, o derivados semi-sintéticos de los mismos, así empezó la era post-antibiótica.

8.1 Definición de antibiótico

Son un grupo de agentes con compuestos con la única función de inhibir y eliminar el crecimiento de bacterias patógenas y no patógenas, estos son aplicados en diferentes áreas de la medicina y de alimentos, dichas sustancias son obtenidas desde la naturaleza o de orígenes semi-sintéticos y sintético (Manrique, 2012).

8.2 Clasificación

8.2.1 Por el tipo de acción del antibiótico

En la industria farmacéutica se emplean 2 términos para dividir de forma más específica el tipo de antimicrobiano.

Empleando el término static que hace referencia a los bacteriostáticos: que se utilizan para los agentes que inhiben el crecimiento microbiano.

- D. El sufijo cida es usado para los agentes bactericidas que son capaces de matar a las bacterias (Walsf and Brion 2013).

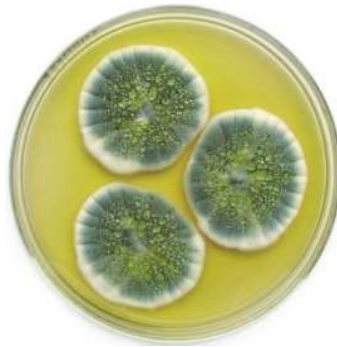


Fig.4 placa con cepa de Penicilium productora de penicilina

8.2.1 Por el origen de sus componentes

- 1) Naturales: producidos por el microorganismo en cuestión que puede ser hongo, bacterias, actinomicetos y streptomyces (bacterias encontradas en el suelo). ejemplos: estreptomycinina y la penicilina.
- 2) Semi-sintéticos: obtenido a partir de la producción microbiana y mezclado con agentes químicos para reforzarlos.
- 3) Sintéticos: elaborados a partir de mezclas químicas (como quinolones, beta-lactamasas etc.) o sustancias químicas artificiales (Cecilia, 2008).

8.2.2 Por los mecanismos de sus componentes

- **Inhiben la síntesis de la pared celular:** formando un enlace covalente entre el antibiótico y las enzimas que llevan a cabo la síntesis de peptidoglicano, como son: penicilina, cefalosporinas, carbapenems, monobactams, cicloserina, vancomicina, teicoplanina, bacitracina antifungicos: (clotrimazol, fluconazol, itraconazol)
- **Afectan la membrana celular:** (interfieren con la permeabilidad y ocasionan la pérdida de material intracelular) polimixina antifungicos (nistatina y anfotericina)
- **Inhiben la síntesis proteica:** inhiben subunidad ribosomal 50s cloramfenicol, macrolidos, azucres complejos, espiramicina, y virgianimicina.
- **Inhiben subunidad ribosomal 30s:** formando enlaces covalentes con la región ARNr 16s, por ejemplo: aminoglucosidos, estreptomicina, tetraciclinas.
- **Afectan el metabolismo de ácidos nucleicos:** inhiben RNA polimerasa: rifamicinas; inhiben la topoisomerasa: quinolonas.
- **Alteran el metabolismo energético:** inhibiendo la síntesis de ácido fólico por ejemplo: sulfonamidas y trimetoprima (Cecilia, 2008).

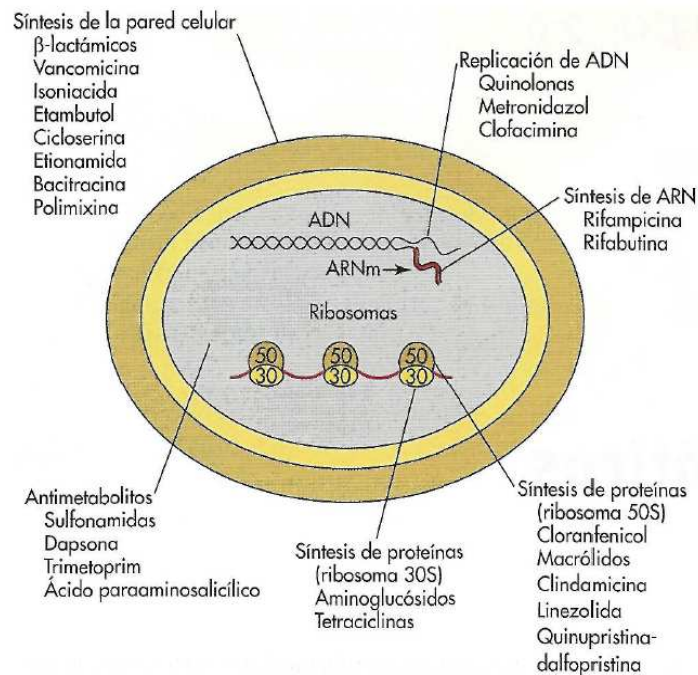


Fig. 5 muestra la clasificación de algunos antibióticos de acuerdo al mecanismo de ataque dentro de la célula.

9. ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA)

La naturaleza hereditaria de todo organismo viviente es definida por su genoma, el cual consiste en una secuencia larga de **ácido nucleico** que proporciona la información necesaria para construir el organismo (Canton 2009).

El **ácido desoxirribonucleico**, abreviado como **DNA**, es un ácido nucleico que contiene instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos y algunos virus, siendo responsable de su transmisión hereditaria (Del rosario et al, 2004).

Esta molécula es un polinucleótido, es decir, está formado por la unión de nucleótidos. Existen 4 nucleótidos diferentes: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) y Citosina (C). Cada nucleótido, a su vez, está formado por una base nitrogenada, una pentosa (azúcar) y un grupo orto-fosfórico, a través de este último componente se realizan las uniones entre nucleótidos (Del rosario et al, 2004). La unión del grupo fosfato tiene lugar en las posiciones 5' o 3' de la pentosa, lo cual hace que las cadenas estén orientadas (es decir posee dirección 5'Æ3').

El DNA consiste en dos cadenas que se enlazan una con otra a través de puentes de hidrogeno de manera complementarias y siempre se mantiene la siguiente regla las bases A (Adenina) se une con T (Timina), y C (Citosina) con G (guanina). Estas dos cadenas, se enrollan una sobre otra, formando la famosa doble hélice (Garza et al, 2009).

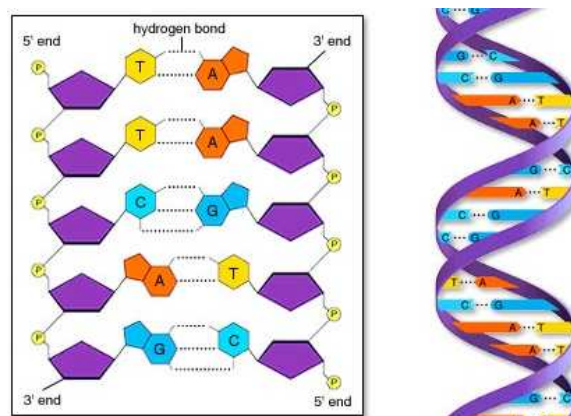


Fig. 6 organización y estructura de una molécula de ácido desoxirribonucleico.

9.1 Características fisicoquímicas del ácido desoxirribonucleico (DNA)

El DNA es una biomolécula de muy alto peso molecular larga y extremadamente delicada, siendo un ácido capaz de formar sales con iones cargados positivamente (cationes). Además de ser soluble en soluciones concentradas de sales, siendo insolubles en alcoholes (ya sea etanol o isopropanol).

La molécula de DNA es muy sensible a pH ácido (menor de 4,0), presentándose insoluble en pH 5,6 pero soluble a pH 8,0. Por lo tanto los procesos de extracción, purificación y almacenamiento del DNA deben mantener el pH óptimo y así brindar una alta concentración iónica (Rocha, 2002).

9.2 Replicación del DNA

El ADN posee la información necesaria para transmitir los caracteres de una especie de generación en generación y conseguir la supervivencia de la especie. Por lo tanto la molécula de DNA constituye la base química de la herencia. Las cadenas de DNA de cada especie difieren en longitud y en la secuencia de las bases nitrogenadas, de tal manera que esta secuencia contiene la información genética característica de cada especie. La información genética debe reproducirse exactamente cada vez que la célula se divide. (Mosquera, 2004).

9.3 Principales características de la replicación

Las características principales del proceso son: su carácter semi-conservador, la realización simultánea en ambas hebras, de forma secuencial y con carácter bidireccional.

9.3.1 Semi-conservador:

Es decir cada hebra sirve como molde para la síntesis de una nueva cadena, produciendo dos nuevas moléculas de DNA, cada una con una de las hebras viejas y una nueva hebra hija (Borge, 2001).

9.3.2 Bidireccional:

La separación de las hebras progenitoras que comienza en cada origen de replicación progresa en ambas direcciones. Los puntos de transición entre la doble hebra y las hebras sencillas se llaman horquillas de replicación y van alejándose entre sí.

9.3.3 Semi-discontinuo:

La nueva cadena tiene siempre lugar en el sentido 5`-3`, siendo el grupo 3`OH el punto por el cual el ADN es elongado. Esto es a través de las DNA polimerasas. Si las dos hebras son anti-paralelas, el proceso consiste en que una hebra sea sintetizada de forma continua y la otra hebra es sintetizada a través de pequeños fragmentos de ADN llamados fragmentos de okazaki (Borge, 2001).

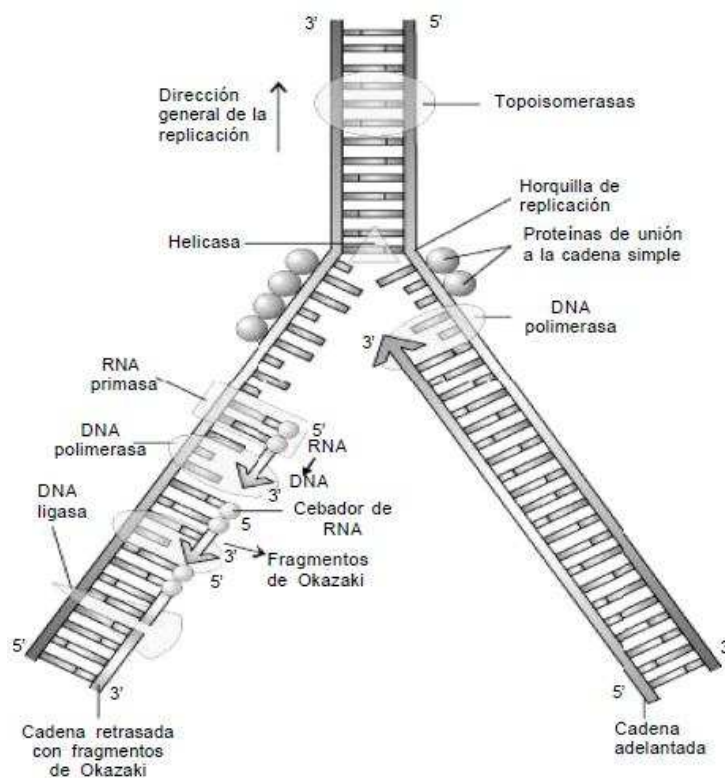


Fig. 7 proceso de replicación del DNA.

10. MECANISMOS DE INTERCAMBIO DE GENES.

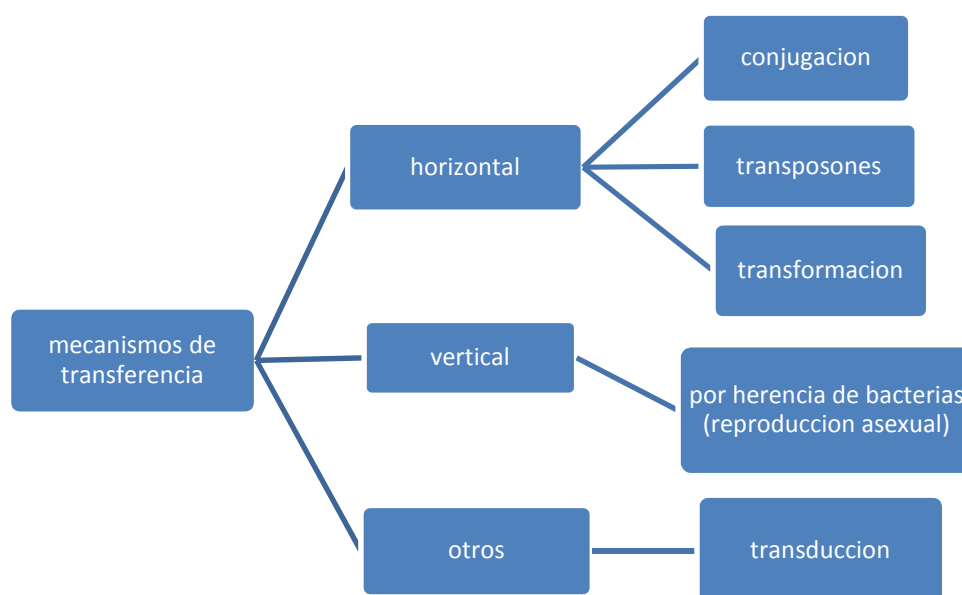
La transferencia de genes permite a las bacterias la acumulación constante de genes, logrando adaptar a los microorganismos a una gran cantidad de antibióticos. Los plásmidos en el medio ambiente son adquiridos por las bacterias mediante la transferencia horizontal de genes que intercambian entre sí.

Lograr una transferencia de gen exitosa (ARGs) depende de la proximidad que haya entre el donante (bacteria que contiene el gen). Y el receptor (microorganismo al que le será transferido dicho gen)(Cox and Wright, 2013). En el medio ambiente los microorganismos se encuentran formando comunidades bacterianas que propician la transmisión de los genes de resistencia, la transferencia más común entre las bacterias es la vertical que se da entre bacterias de la misma especie, siguiendo las horizontales como: transformación, transposones y conjugación dejando al último el mecanismo por transducción consiste en transferencia de los plásmidos y transposones (Wright and Perry, 2013).

Estos mecanismos de transferencia se dividen en 4 tipos descritos a continuación y son clasificados en tres tipos de transferencia.

10.1 Clasificación de procesos de intercambio genético

CUADRO 2. Clasificación de los mecanismos de transferencia de genes usados por las bacterias para la transmisión de la resistencia a antibióticos.



10.2 Transformación

La transformación es la absorción del ADN que penetran desde la pared, proveniente del medio externo. De forma natural podría ocurrir cuando las bacterias receptoras comparten su ecosistema con una población de bacterias donadoras que muere y cuyos cromosomas se fragmentan (Wright and Perry, 2013).

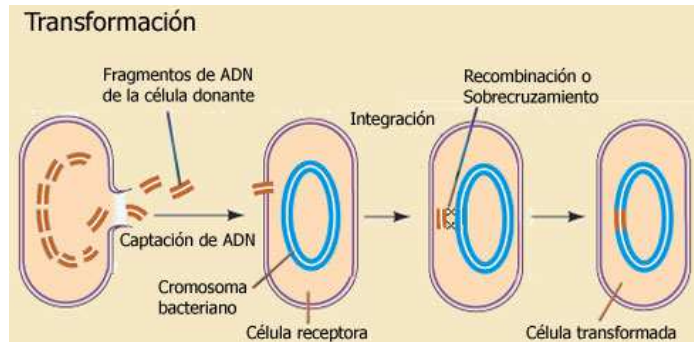


Fig. 8 proceso del mecanismo de transformación.

10.3 Conjugación:

Para conjugar tiene que existir contacto físico entre la bacteria donadora de ADN y la receptora. La capacidad para donar la proporciona un plásmido conjugativo que también se denomina factor de fertilidad o plásmido sexual.

La conjugación entre bacterias Gram negativas suele ocurrir a través de Pili sexuales codificados por el plásmido conjugativo, Entre éstos el mejor estudiado es el plásmido F de Escherichia coli. (Cox and Wright, 2013)

Por eso cuando los genes que proporcionan resistencia a los antibióticos están en los plásmidos conjugativos que se extienden muy rápidamente a través de diversas especies patógenas(Cox and Wright, 2013).

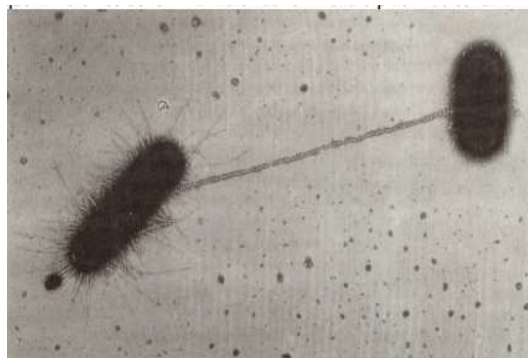


Fig. 9 mecanismos de conjugación a través de los pilis de una célula a otra.

10.4 Recombinación no homóloga o transposon:

Los transposones son fragmentos de ADN capaces de moverse desde unas moléculas de ADN a otras siempre que posean determinadas secuencias o dianas que permiten su integración, sin necesidad de que exista una homología de secuencias (Stalder, 2012).

Pueden encontrarse integrados en cualquier elemento genético replicativo o replicón, tanto en cromosomas como en plásmidos.

Todos los transposones poseen al menos la capacidad de provocar su transposición o salto hacia otro elemento genético porque poseen entre otros el gen que codifica una transposasa, enzima clave para duplicar la secuencia diana y permitir la integración del transposón (Petrova 2011)

A veces la transposición es replicativa y una copia del transposón se queda mientras otra se incluye en la diana. Otras veces no se replica sino que se libera de un replicón y se integra en otro. Algunos transposones incluyen genes de resistencia a antibióticos que se extienden así del cromosoma a los plásmidos o de un plásmido a otro lo que favorece enormemente su diseminación entre diversas especies de bacterias patógenas (Petrova 2011).

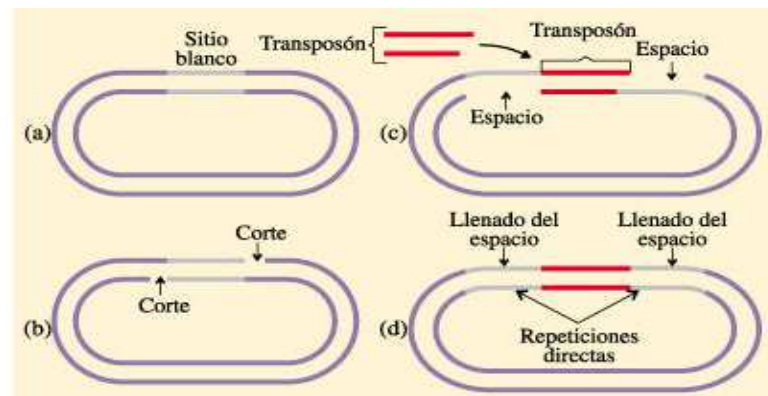


Fig. 10 mecanismos de transposon

10.5 Transducción

En la transducción son los virus bacteriófagos los que llevan un fragmento de ADN de la bacteria donadora hasta el citoplasma de la receptora. Este mecanismo es el más importante en el medio ambiente ya que es altamente usado por las bacterias en su entorno. (Ghosh, 2007)

Un estudio demostró que los bacteriófagos del suelo llevan codificado el gen 16s gen responsable de la transferencia horizontal y de la recombinación dentro de la comunidad celular. (Ghosh, 2007). Los bacteriófagos también contiene dentro de su estructura genes de resistencia a antibióticos (0.01% de los genes encontrados (Cytryn, 2012).

Los bacteriófagos son virus que se reproducen en el interior de las bacterias. Para infectarlas inyectan su ADN en el citoplasma; Después paralizan la replicación de la bacteria, cuyo ADN comienza a degradarse, replican el ADN del virus y traducen la información precisa para sintetizar nuevas cápsides que se ensamblan rodeando a las copias de ADN fágico.

A veces, durante estos ciclos líticos se introduce por error en una cápside de bacteriófago, ADN de la bacteria infectada. Estas partículas pueden iniciar la infección de otra bacteria y le inyectan de forma automática el ADN que portan (Kozhevin et al 2013).

Como en estos casos no es inyectado el genoma completo del virus, la bacteria no muere y puede recombinar el fragmento adquirido. Cualquier gen de la bacteria donadora tiene igual probabilidad de ser transducido y posteriormente recombinado.

Independientemente del método que utilicen los microorganismos para la propagación de los genes de resistencia a antibióticos (ARGs) (Kozhevin et al 2013). Tenemos que evitar que los genes lleguen a las clínicas y que infesten a los microorganismos patógenos para asegurar el funcionamiento de los antibióticos y así poder preservar la salud (Kozhevin et al 2013).

Al igual que prevenir que los genes lleguen a ser depositados en los alimentos ya que es otro vínculo importante que no puede dejarse pasar sin precedentes, mantener una frontera entre las bacterias patógenas y no patógenas debe ser esencial para no afectar las clínicas (Piddock 2006)

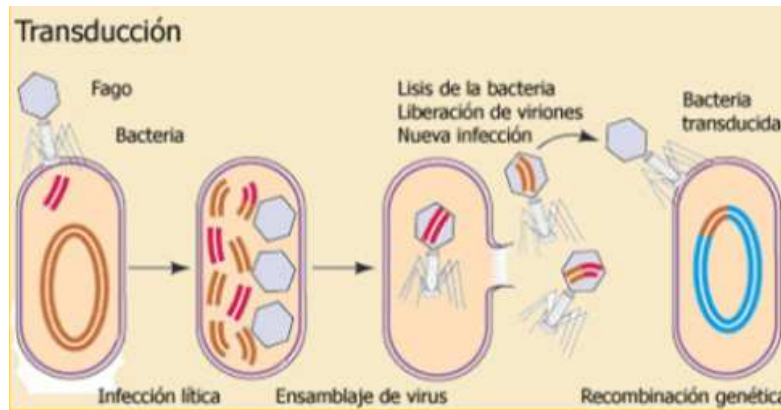


Fig. 11 mecanismos de transducción.

11.METODOLOGIA

La metodología fue basada del artículo (Walsh and Brion 2013) con algunas modificaciones en la técnica.

11.1 Obtención de las muestras y su clasificación.

Las muestras de suelo fueron colectadas de acuerdo a 2 criterios de evaluación. El primero fue debido al origen de la toma de muestra, siendo la siguiente.

1. Suelo urbano de Tuxtla Gutiérrez = 16 muestras.
2. Suelo agrícola plataforma ITTG = 17 muestras.
3. Suelo fértil plataforma ITTG = 17 muestras.

El segundo criterio se baso en el tipo de pH que presentaban las muestras y se clasificaron de acuerdo al siguiente cuadro N°3.

CUADRO. 3 clasificaciones de las muestras de suelo por el tipo de pH

Muy ácido (Menor de 5)	Ácido (Mayor de 5)	Neutro (Entre 7)	Alcalino (Entre 8)	Muy alcalino (mayor de 8)	total
4 muestras x triplicado	3 muestras por triplicado y una por duplicado	3 muestras por triplicado + 1 muestra.	3 muestras por triplicado	4 muestras por duplicado.	
Total = 12	11 muestras	10 muestras	9 muestras	8 muestras	50 muestras

Por último las muestras fueron ajustadas a un CRA del 40% a través de la aplicación de la siguiente formula.

$$\frac{H_2O \text{ g}}{\text{g de suelo}} = \frac{\text{peso drenado} - \text{peso suelo seco (105}^\circ\text{C)} - \text{peso blanco húmedo}}{\text{peso de suelo seco}}$$

Almacenándose en bolsas de plástico bajo una temperatura de -70°C.

Al momento del análisis, las muestras, se dejaron en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente.

La activación de las muestras se realizo con la adición de pequeñas porciones de sulfato de amonio, sacarosa y agua destilada mezclando para la activación del suelo. Incubando en un lapso no mayor de 7 días.

Para el análisis del resistoma de suelo se necesita de un medio de cultivo capaz de brindar los nutrientes necesarios para el crecimiento de bacterias de suelo.

Esto se realizo mediante la evaluación de un medio de cultivo con macronutrientes esenciales para la obtención del crecimiento microbiano de las muestras de suelo.

La preparación del medio PY consistió en la mezcla de peptona 5 gr, con 3 gr de extracto de levadura y 0.735 gr de cloruro de calcio hidratado en 1 lt de agua destilada.

En el cual se suspendieron 1.9 gr de suelo incubado a 22 ° C por 4 días a 100 rpm, al término de este periodo se realizo una segunda incubación ahora con la introducción de antibioticos, en el medio de cultivo, tomando alícuotas a una concentración de 20 mg/ml inoculando por cada muestra de suelo, usando un total de 25 antibioticos con diferentes mecanismos de acción mostradas en el siguiente cuadro N° 4.

CUADRO 4: Clasificación de los 25 antibioticos usados para este proyecto respecto al mecanismo de acción.

Mecanismo de acción	Antibioticos	Tetraciclinas
Beta-lactamicos	Aminoglucosidos	23. Tetraciclinas
1. Penicilina	13. Amikacina	Sulfonamidas
1. Dicloxacina	14. Estreptomicina	24. Trimetoprima sulfametoxazol
2. Cefotaxima	15. Kanamicina	Macrolidos
3. Cefalotina	16. Gentamicina	25. Lincomicina
4. Benzatina bencilpenicilina	17. Clindamicina	
5. Ampicilina	18. Ácido fenilboronico	
6. Ceftazidima	Quinolones	
7. Ceftriaxoz	19. Levofloxacina	
8. Fosfomicina		
9. Cefuroxima	20. Ciprofloxacina	
Glicopeptidos	21. Ácido nalidixico	
10. Vancomicina	Cloranfenicoles	
11. Bacitracina	22. Clorafenicol	

Siendo incubadas a 22°C por un periodo de 4 días a 100 rpm. Al término de ese periodo se prosiguió con la cosecha de las muestras, depositando 1 ml de la muestra de la incubación 2 en tubos eppendorf estériles, centrifugando posteriormente a 13,000 rpm en un tiempo de 3 minutos A temperatura ambiente. Decantando el sobrenadante.

Al tener todas las muestras cosechadas se siguió con la conservación de las muestras en tubos eppendorf con glicerol estériles, depositando 0.5 ml de la muestra, y se almaceno a -70°C.

12. Resultados.

Al poner en práctica la metodología propuesta para la extracción de DNA partir de resistoma suelo, se aplicaron diferentes antibioticos en las muestra de suelo dando como resultados; la primera parte de esta estandarización metodológica a descrita con en el anexo VI.

En donde podemos detallar que si hubo crecimiento microbiano, por ello para poder dar un mejor detalle y con mayor claridad sobre la composición de los microorganismos qué conforman dichas muestras, se opto por plantear dentro de la misma metodología los siguientes pasos para la determinación e identificación de las poblaciones microbianas aunado a estos resultados.

En donde nos propusimos la culminación de la práctica, en la observación y eficiencia de la metodología para la propagación de microorganismos resistentes del suelo en diferentes antibioticos y en consecuencia con este proyecto, poder identificar a las bacterias aplicando en un futuro la extracción de DNA y PCR, a partir de estas muestras.



Fig. 12 procedimiento de la pre incubación de las muestras de suelo.



Fig. 13 incubación de las muestras a 25°C por 7 días en un ambiente fresco



Fig. 14 procedimientos de la incubación 2 de la técnica del resistoma.



Fig. 15 Depositar 0.95 gr de suelo en tubos falcón con 7.5 ml de medio de cultivo.



Fig. 16 Tomar 1 ml y depositarlo en los matraces correspondientes.



Fig. 17. incubación de los matraces a 22°C por 100 rpm por 7 días.

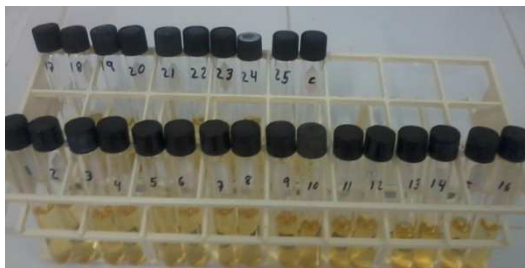


Fig. 18 tubos con medio de cultivo.



Fig. 19 tomar alícuotas de los antibióticos depositándolos en los tubos.



Fig. 20 Fig. 20 Tomar 1 alícuota de la incubación 1.



Fig. 21 adicionar con en el medio de cultivo con antibiótico.

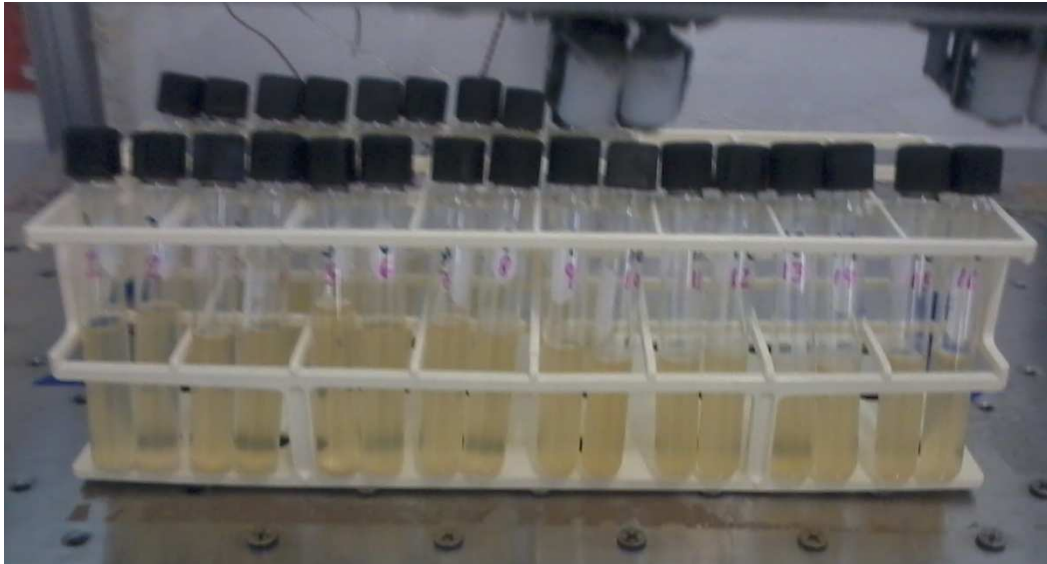


Fig. 21 segunda incubación ahora con antibióticos.

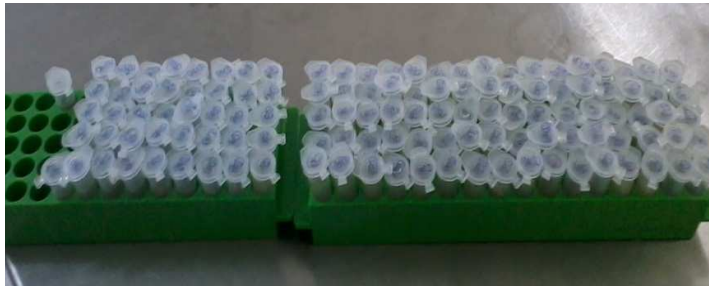


Fig. 22 Conserva y Cosecha de la incubación 2 en tubos eppendorf.



Fig. 23 Los tubos fueron almacenados a -70°C . Para su conservación.

13. DISCUSIÓN

1. Bajo las condiciones en que se desarrolló el experimento, la técnica del resistòma de suelo se realizó de forma satisfactoria, siguiendo el diseño experimental del resistòma para el análisis de bacterias resistentes a antibiòticos.
2. El proceso de muestreo del suelo se realizó con las más estrictas normas de calidad siendo almacenadas a -70°C mientras se procedía a la preparación de los materiales y reactivos necesarios, para llevar a cabo el diseño experimental del resistoma de suelo.
3. La incubación de las bacterias se realizó mediante la metodología del resistòma incubándolas a las condiciones mínimas para su obtención.
4. La evaluación del medio de cultivo, cumplió con los requisitos de micro y macronutrientes para bacterias del suelo observándose crecimiento en todas las muestras de suelo.
5. Al obtener los microorganismos de suelo después de la incubación 1 se siguió con delimitar la población bacteriana a través de la aplicación de antibiòticos en el medio de cultivo a una concentración de 20mg/ml para la obtención de cepas resistentes.

14. CONCLUSIÓN.

Bajo las condiciones en que se desarrolló el experimento se concluye lo siguiente.

1. La evaluación del medio de cultivo resulto ser factible para llevar a cabo la incubación de las bacterias del suelo obteniendo un crecimiento óptimo.
2. Las cepas resistentes se obtuvieron a través de la adición de antibioticos a una concentración de 20mg/ml (concentración en donde los microorganismos presentan un bajo o nulo crecimiento).Observándose la resistencia.
3. De forma general la estandarización de la metodología del resistoma se llevo de manera satisfactoria alcanzando todos los objetivos planteados al inicio de la investigación, no obstante se seguirá trabajando para la identificación de estas bacterias a través del análisis metagenomico del DNA.

15.REFERENCIAS

Canton R. (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanism in the clinical setting. *Clinical Microbiology and infection*. Vol. 15

Borge j. M. (2001). replicacion del ADN. open course ware, XXIV, 2-5.

Cecilia D. T. (2008). MECANISMO DE ACCION Y RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS. universidad del chile, II, 7.

Chander Y., Kumar K., Goyal S.M., and Gupta S.C. (2005). Antibacterial activity of soil. *Journal of Environmental Quality* Vol. 34 1952-1957.

Cox G. and D. Wright, G. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, VIII, 1-2.

Cytryn E. (2012). the soil resistome: the anthropogenic, the native, and the unknown. *elsevier*, VII, 1-4.

Czekalski N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., Burgmann, H., (2012). Increased levels of multiresistance stant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. *Frontiers in Microbiology* 3, 106.

Dalkmann P., Broszat, M., Siebe, C., Willaschek, E., Sakinc, T., Huebner, J., Amelung, W., Grohmann, E., Siemens, J., 2012. Accumulation of pharmaceuticals, Enterococcus, and resistance genes in soils irrigated with wastewater for zero to 100 years in central Mexico. *PLoS One* 7, e45397.

Del Rosario Rodicio, M., y del Carmen Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(4), 238-245.

Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., y Martínez-Romero, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud pública de México*, 51, s439-s446.

Ghosh S. L. (2007). The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil. *ISME Journal*, IX, 191-203.

Kozhevin P.A. Vinogradova, K.A. and Bulgakova V.G. (2013). The Soil Antibiotic Resistome Department of Soil Science, Moscow State University, Moscow, Russia *sci* 68, 3-10.

Kemp B.M., Monroe, C., Smith, D.G., 2006. Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts. *J. Archaeol. Sci.* 33, 1680-1689.

Manrique, I. D. (2012). la resistencia bacteriana a los antibioticos siete decadas despues de fleming. *academia de farmacia*, II, 16-30.

Melano R, Corso A, Petroni A, Centron D, Orman B, Pereyra A, Moreno N, Galas M. (2013). Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum betalactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. Vol. 52: pag 36-42.

Mosquera, V. R. (2004). MOLECULAR BIOLOGY AND THE DNA. Facultad de Ciencias Agropecuarias, vol. II(1), 56-58.

Osman K. T. (2013). *Soils Principles, Properties and Management (Vol. I)*. New york: Springer.

Petrova M. G. (2011). a nove integron-containing antibiotic and chromate resistance transposon isolate from a permafrost bacterium. *microbiolo*, XX, 337-345.

Piddock L. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps. not just for resistance, *XV*, 629-636.

Sommer M. O., & Dantas, G. (2011). Antibiotics and the resistant microbiome. *elservier*, XII, 1-4.

Stalder T. B. (2012). integron involvement in environmetal spread of antibiotic resistance. *front microbiology*, LXXVIII, 3.

Rocha Salavarieta Pedro J. (2002) theory and practice for the extraction and purification of the oil palm DNA, Vol. 23 pag 1-7.

Walsh f., and Brion, D. (2013). the culturable soil antibiotic resistome. A community of multi-drug resistant bacteria. plos one, IV, 1-3.

Wiedenbeck, J., and Cohan, F. M. (2011). Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. FEMS Microbiol. Rev. 35, 957–976.

Wright G.D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. Nat Rev Microbiol 2007, 5:175-186.

Wright G. D. and Perry A. J. (2013). The antibiotic resistance “mobilome”: searching for the link between environment and clinic. frontiers in microbiology, XXIV, 2-4.

Yendi E. N. N., Selene G. A., Nina M. C., Rojas V. A., Suárez-Arriaga M. C. Valenzuela E. C., Jiménez B. N., Verhulst B. N. Dendooven G. L. (2013). Relative impacts of tillage, residue management and crop-rotation on soil bacterial communities in a semi-arid agro-ecosystem vol. LXV, 85-86.

16. ANEXOS

I. PROCEDIMIENTO DEL RESISTOMA DE SUELO.

Capacidad de Retención de Agua (CRA)

1. Pesar 25 g de suelo.
2. colocarlo en un embudo con papel filtro whatman taparlo.
3. agregar 25 ml de agua destilada
4. tapar el embudo con papel aluminio para evitar la evaporación y pesar después de 24 horas.

$$\frac{H_2O \text{ g}}{\text{g de suelo}} = \frac{\text{peso drenado} - \text{peso suelo seco (105}^\circ\text{C)} - \text{peso blanco húmedo}}{\text{peso de suelo seco}}$$

Acondicionando las muestras del suelo a un 40% de su CRA.

Incubación 1

1. Colocar 15 ml de medio PY en tubos falcón.
2. Pesar 1.9 gr de suelo (previamente activado)
3. Depositarlo en el tubo falcón con 15 ml de medio PY.
4. Agitar vigorosamente
5. Alicuotar 500 µl de la suspensión.
6. Incubar a 22°C a 120 rpm por 4 días.

Incubación 2

1. Alicuotar 200 µl de la muestra de suelo en un tubo estéril con 1.8 ml de medio PY conteniendo 20µg/ml de cada antibiótico incubar a 22°C por 4 días a 120 rpm.

Cosechar

1. En un tubo eppendorf Estéril colocar 1 ml de la incubación 2 centrifugar a 13,000 rpm y decantar. (repetir este procedimiento).

Conservar

1. Depositar 1 ml de solución salina al 85% y centrifugar a las mismas condiciones de 13,000 rpm a 3 minutos y decantar
2. Conservar a -20°C.

3. En un tubo estéril adicionar un volumen equitativo de glicerol y del medio de cultivo de la incubación 2 esta es una conservación aproximadamente Del 50%.
4. Conservar a -20°C.

II. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE DNA.

III. Técnica 1 según protocolo de(Kemp B.M. et al, 2011)

1. Al paquete celular añadir 2 ml de EDTA a 0.5 M a pH 8 en un tubo de 15 ml.
2. Luego añadir 3 mg de proteinasa e incubar a 65°C por 3 hrs.
3. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo de 15 ml y agregar 2 ml de cloroformo-alcohol-isoamílico y agitar por 5min a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 1228 rpm por 10 min. Y transferir la fase acuosa a un nuevo tubo de 15 ml, y añadir acetato de amonio a la mitad del volumen de este mismo volumen añadir isopropanol absoluto.
5. Almacenar por la noche e invertir la solución al otro día centrifugar por 30 min a 1228 rpm para sedimentar el ADN y dejar secar.
6. Lavar el pellet con 1 ml de etanol al 80% agitándolo en un vortex.
7. Centrifugar todos los tubos por 30 min a 1228 rpm, para sedimentar el ADN decantar el sedimento y dejarlo secar por 15 min.
8. El sedimento libre de H₂O y rehidratar con 300 µl la solución purificadora de DNA.
9. Enjuagar la columna con 3 ml de isopropanol al 80%, eliminar la columna por incubación de 3 min y centrifugar el fluido a 10,000 rpm por 30 segundos. en tubos epp. De 1.5 ml, este paso se repitió con otros, repetir este procedimiento con otras muestras.

I. Técnica 2según protocolo de (Kemp B.M. et al, 2011)

1. Añadir al pellet 300 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico mezclado durante 5 min en un agitador y centrifugar a 1228 rpm por 10 min.
2. Transferir la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y añadir 300 µl de alcohol isoamílico fenol cloroformo, mezclar durante 5 min y centrifugar a 1228 rpm por 10 min.

3. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo y añadir 300 µl de alcohol-isoamilico-cloroformo mezclar por 5 y centrifugar a 1228 rpm a 10 min
4. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo cuidando el pellet.

IV. Técnica 3 según protocolo de(Kemp B.M. et al, 2011)

1. A 100 µl de estándar de ADN sintetizado.
2. Añadir 2 ml de ADN libre de H₂O destilada.
3. Agregar 1 ml de acetato de amonio 5 M y 3 ml de isopropanol absoluto a temperatura ambiente.
4. Invertir la solución 2-3 min y almacenar toda la noche a temperatura ambiente.
5. Centrifugar los tubos por 30 min a 1228 rpm para sedimentar el ADN.
6. Transferir la fase acuosa y dejar secar el sedimento por 15 min.
7. Lavar el sedimento con 1 ml de etanol al 80% agitando en un vortex (asegurándose que el sedimento este flotando para garantizar un lavado total del ADN).
8. Centrifugar todos los tubos a 1228 rpm por 30 min, para sedimentar el ADN, separar la solución acuosa. Dejando secar el sedimento al aire libre por 15 min. Y rehidratar el sedimento con 100 µl de agua destilada libre de ADN. o agua estéril.

De las tres técnicas de extracción de DNA presentadas anteriormente se prosiguió a estandarizar 1 técnica para la obtención del DNA de bacterias provenientes del suelo, siendo este el protocolo a seguir:

V. Técnica para la extracción de DNA en muestras de suelo.

- A. Eliminación de materia orgánica.
 1. Adicionar al pellet 2 ml de pirofosfato de sodio al 0.15 M y agitar en un vortex hasta resuspender.
 2. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos
 3. Repetir esto continuamente hasta que el sobrenadante sea totalmente transparente.
- B. Eliminación del exceso de pirofosfato.

4. Adicionar 2 ml de buffer de fosfatos pH 8 y agitar en vortex hasta resuspender.
5. Centrifugar y repetir el lavado por al menos 4 veces.

C. Lisis de las células del suelo.

1. Añadir a todas las muestras de suelo 1 ml de buffer para lisozima y 80 μ l de lisozima 10 mg/ml e incubar 1 hora a 37°C.
2. Adicionar 1 ml de SDS al 10% y 0.5 gr de arena estéril y agitar en un vortex durante 15 min.
3. Centrifugar y transferir la fase acuosa a un nuevo tubo.

D. Eliminación de proteínas y purificación del DNA.

1. Agregar 300 μ l de EDTA 0.5 M PH 8 y 120 μ l de acetato de potasio 5 M pH 5
2. Incubar 30 minutos a 4°C.
3. Centrifugar a 13,000 rpm a 4°C por 10 min. Transferir el sobrenadante (que contiene el DNA) a un nuevo tubo.
4. Hacer la extracción con 400 μ l de la solución cloroformo-alcohol-isoamilico 24:1 agitar en vortex a la máxima velocidad.
5. Centrifugar a 13,000 rpm a 10 min a 25°C y transferir la fase acuosa a un nuevo tubo.
6. Precipitar el DNA de la fase acuosa con cloroformo agregando un volumen de PEG al 13% y agitar en vortex.
7. Incubar a -20°C por 12 horas.
8. Centrifugar a 13,000 rpm a 4°C por 10 min y eliminar el sobrenadante por decantación cuidando la pastilla de DNA.
9. Lavar la pastilla con 500 μ l de etanol al 70% frio. Centrifugar a 13,000 rpm a 4°C por 10 minutos, eliminar el sobrenadante por decantación cuidando la pastilla de DNA.
10. Con el uso de una microcentrifuga dar un "spin" para bajar el etanol de las paredes del tubo.

Dejar secar la pastilla (aproximadamente por 10 minutos y resuspender en 50 μ l de agua estéril.