

---

# **INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

**INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

**PRESENTA:**

**Edgar Fabian Ruiz Nucamendi**

Con formato: Punto de tabulación: 6.91 cm, Izquierda

**NOMBRE DEL PROYECTO:**

**“Caracterización molecular de las comunidades bacterianas presentes en un sistema de vermicomposteo con residuos orgánicos de cabra y conejo.”**

**PERIODO DE REALIZACIÓN:**

**AGOSTO- DICIEMBRE 2016**

## RESUMEN

En los últimos años se ha despertado el interés en muchas partes del mundo, incluyendo México, sobre la utilización de composta o vermicomposta como una opción para disminuir el uso de fertilizantes químicos y aprovechar los nutrimentos de residuos orgánicos. Por lo tanto, la utilización de residuos orgánicos estabilizados tal como la vermicomposta representa actualmente, una alternativa para proporcionar nutrimentos al suelo y por ende incrementan los rendimientos en los cultivos y así como mejorar la producción de microorganismos con ciertas ventajas económicas así como ambientales. El presente trabajo se llevó a cabo en la localidad de Tuxtla Gutierrez Chiapas, con el objetivo de establecer técnicas de extracción de ADN metagenómico y amplificación del gen 16s rRNA para identificación de las comunidades bacterianas presentes en el sistema de vermicomposta con residuos orgánicos de cabra y conejo con potencial biotecnológico y usos agrícolas. Donde empleamos el diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones de las cuales se realizaron las extracciones de AND de vermicomposta y lixiviado mediante los métodos de Valenzuela-Encinas, Hoffman and Winston y lisis enzimática.

Los resultados obtenidos indicaron que el empleo del método Valenzuela-Encinas et al., (2009) permitió obtener concentraciones y calidad mas alta en comparación con los métodos reportados por Griffiths et al. (2000) y Hoffman and Winston (1987).

## INDICE

|   |     |
|---|-----|
| RESUMEN .....   | ii  |
| INDICE .....  | iii |
| INDICE DE FIGURAS .....   | v   |
| INDICE DE CUADROS .....   | vi  |
| 1. - INTRODUCCIÓN .....   | 1   |
| 2. - REVISIÓN DE LITERATURA .....                                   | 4   |
| 2.1 Vermicompostaje .....   | 4   |
| 2.1.1 Definición .....  | 4   |
| 2.1.1.1 Composta .....  | 4   |
| 2.1.1.2 Vermicomposta .....   | 4   |
| 2.1.2 Proceso de obtención de la vermicomposta .....                | 5   |
| 2.1.2.1 Control de temperatura .....                                | 5   |
| 2.1.2.2 Aireación .....   | 7   |
| 2.1.2.3 Humedad .....   | 7   |
| 2.1.2 Función de las lombrices .....                                | 7   |
| 2.1.3 Relación carbono / Nitrogeno .....                            | 9   |
| 2.1.4 Uso de vermicomposta y derivados para control biologico ..... | 10  |
| 2.1.5 Propiedades químicas .....                                    | 11  |
| 2.1.6 Materia Orgánica .....  | 11  |
| 2.1.7 Micronutrientes .....   | 13  |
| 2.1.8 Importancia del nitrógeno en el suelo .....                   | 14  |
| 2.1.9 Fijación biológica del nitrógeno .....                        | 15  |
| 2.1.10 Extracción de ADN .....                                      | 17  |
| 2.1.10.1 Lisis celular .....  | 18  |
| 2.1.10.2 Separación de proteínas .....                              | 18  |
| 2.1.10.3 Precipitación de AND .....                                 | 19  |
| 2.1.11 16S rRNA .....   | 19  |
| 3. – JUSTIFICACIÓN .....  | 22  |
| 4. – OBJETIVOS .....  | 23  |
| 4.1 Generales .....   | 23  |
| 4.2 Particulares .....  | 23  |
| 5.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....                                | 23  |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5. – DESARROLLO</b> .....                    | <b>24</b> |
| <b>5.1 Nombre y Ubicación</b> .....             | <b>24</b> |
| <b>5.2 Área de localización</b> .....           | <b>24</b> |
| <b>6. – METODOLOGÍA</b> .....                   | <b>24</b> |
| <b>6.1 Material biológico</b> .....             | <b>24</b> |
| <b>6.2 diseño experimental</b> .....            | <b>25</b> |
| <b>6.3 Extracción de AND Metagenómico</b> ..... | <b>26</b> |
| <b>7. - ACTIVIDADES REALIZADAS</b> .....        | <b>31</b> |
| <b>8. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....        | <b>32</b> |
| <b>9. - CONCLUSION</b> .....                    | <b>35</b> |
| <b>10. – COMPETENCIAS DESARROLLADAS</b> .....   | <b>36</b> |
| <b>11. – ANEXOS</b> .....                       | <b>37</b> |
| <b>12. – BIBLIOGRAFÍA</b> .....                 | <b>46</b> |

## INDICE DE FIGURAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1.</b> Procesos de humificación .....  | <b>12</b> |
| <b>Figura 2.</b> Microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre y simbióticos.....                 | <b>16</b> |
| <b>Figura 3.</b> Ubicación del ITTG.....   | <b>24</b> |
| <b>Figura 4.</b> Diagrama de flujo del diseño experimental.....  | <b>25</b> |
| <b>Figura 5.</b> Diagrama de flujo para el análisis de comunidades microbianas en muestras de suelo..... | <b>26</b> |
| <b>Figura 6.</b> Geles de electroforesis con ADN de vermicomposta para el día 30.....                    | <b>32</b> |
| <b>Figura 7.</b> Geles de electroforesis con ADN de lixiviado para el día 30.....                        | <b>32</b> |

## INDICE DE CUADROS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Cuadro 1.</b> Elementos, concentraciones y proporciones que debe reunir el humus.....   | <b>8</b>  |
| <b>Cuadro 2.</b> Datos de Nanodrop y geles obtenidos mediante los métodos de extracción de ADN de vermicomposta empleados en esta investigación..... | <b>33</b> |
| <b>Cuadro 3.</b> Datos de Nanodrop y geles obtenidos mediante los métodos de extracción de ADN de lixiviados empleados en esta investigación.....    | <b>34</b> |

## 1. - INTRODUCCIÓN

Se considera a la contaminación ambiental como el cambio perjudicial en las características físico-químicas y biológicas que pueden afectar nocivamente a los ritmos de vida en colectividades, humana y animal.

Uno de los problemas que enfrentan los productores, las granjas agropecuarias, es el incremento de la materia orgánica producida por los animales, lo cual puede llegar a hacer un problema ambiental. Normalmente, debido al desconocimiento, a la falta de un espacio adecuado, o de tiempo, las prácticas habituales con estos residuos son: el enterramiento, el abandono del material a la intemperie hasta su pudrición y la reunión de estos, en sitios alejados de las poblaciones. De alguna manera, este problema debe abordarse y buscar una alternativa, por tal motivo en este trabajo se plantea una solución buscando el uso adecuado, por el contrario adoptarlo y mediante la biotransformación utilizarlo como abono, en plantas de ornato, cultivos agrícolas que a su vez sirvan como fuente de rastrojo para la misma descomposición fecal.

Existen tecnologías para la transformación y la obtención de productos útiles a partir de los desechos animales, como son: obtención de biogás, fertilizantes a partir del vermicomposteo, lixiviados y composteo natural.

El vermicompostaje proporciona la posibilidad de transformar de una manera segura los residuos orgánicos en insumos para la producción agrícola. Es por todo lo anterior que la relevancia de esta investigación se evoca al estudio global de los microorganismos que se encuentran antes y después de agregarles las lombrices para poder estudiar de mejor manera los organismos patógenos que se encuentran en el vermicompost y lixiviado con ayuda de métodos de extracción y herramientas bioinformáticas.

La acción combinada de lombrices y microorganismos modifica significativamente las características y composición de los desechos orgánicos. La biodegradación y estabilización de la materia orgánica se lleva a cabo en condiciones mesófilas y aeróbicas mantenidas por la acción de las lombrices. Los desechos orgánicos sólidos son biológicamente convertidos en un material más seguro y estabilizado denominado

Vermicomposta a través del proceso. El humus de lombriz se puede utilizar como nutriente y acondicionador de suelos en la agricultura. Ya que el vermicompostaje es un proceso que implica la acción conjunta de lombrices de tierra y microorganismos. Los microorganismos son responsables para la descomposición de la materia orgánica, mientras que las lombrices de tierra son conductores cruciales del proceso, ya que airean, condicionan y fragmentan el sustrato, por lo tanto modifican drásticamente la actividad microbiana (Chen et al., 2015).

Las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo durante el proceso aeróbico son exotérmicas y elevan la temperatura de la composta hasta cerca de 70°C, con lo cual se eliminan todos los agentes patógenos que puedan estar presentes en la masa inicial. La descomposición de la materia orgánica en un vermicompostaje típico es el proceso que se lleva a cabo por una comunidad microbiana compleja cuyos cambios en la estructura dependen de la temperatura, pH, aireación, contenido de agua, el tipo y la cantidad de sólidos orgánicos (Partanen et al., 2010).

Se han demostrado que Actinomicetos, Bacillos, Clostridium y Lactobacillus se encuentran entre las principales órdenes bacterianas identificadas en los procesos de compostaje (Whittle et al., 2009). Por ejemplo los Lactobacillos se han asociado con la etapa mesófila inicial en proceso del compostaje de residuos orgánicos, que a menudo tiene un bajo pH (Hultman et al., 2010). Por otro lado, Bacillos, Clostridium y Actinomicetos han demostrado constituir una parte sustancial de la comunidad en las etapas termófilas de compostaje de los residuos orgánicos domésticos (Steger et al., 2007), mezcla de excretas de ganado y residuos de plantas (Gou et al., 2007).

Los desechos orgánicos son a menudo vermicompostados antes de ser aplicados al suelo. Las lombrices de suelo afectan directamente la estructura de la comunidad microbiana. Por lo cual el producto resultante es rica en nutrientes, especialmente nitrógeno inorgánico y fósforo (Aira et al., 2011; Arthur et al., 2012;). Durante el vermicompostaje se aplica agua para garantizar una óptima actividad. Para el cual se permite que el agua se filtre de los depósitos. Los residuos recolectados, a menudo, llamado 'lixiviado de lombrices', el cual contienen microorganismos. El lixiviado de lombrices se utiliza a menudo por su efecto en cultivos (Fritz et al., 2012).



Estos lixiviados podrían considerarse como alternativas potenciales a los productos químicos, como fungicidas o fertilizantes, ya que son más seguros para el medio ambiente y la salud humana (Siddiqui et al., 2009).

Sin embargo, los efectos beneficiosos del lixiviado de lombrices sobre el desarrollo de las plantas no siempre se han demostrado (Koné et al., 2010). Se ha informado que los patógenos y los compuestos fitotóxicos pueden estar presentes en este lixiviado. Los bioensayos han demostrado que el lixiviado de lombrices inhibe la germinación de semillas y el crecimiento de plantas (Carballo et al., 2009; Xu et al., 2012).

Sin embargo, según nuestro conocimiento, no hay muchos estudios en los cuales se hayan estudiado la composición de la comunidad bacteriana de los lixiviados, ya que estas comunidades bacterianas son responsables del beneficio o efectos fitotóxicos de los lixiviados.

Existe una fuerte evidencia de que la aplicación de lixiviados de lombrices, produce beneficios cuantificables. Sin embargo, estos dependen de la calidad de los materiales utilizados. Por lo que los lixiviados de baja calidad podrían tener efectos negativos sobre las plantas. La fitotoxicidad se describe como una intoxicación de la planta por sustancias presentes en el medio de crecimiento. Y es uno de los criterios más importantes para evaluar la calidad del abono para fines agrícolas. La fitotoxicidad también puede asociarse con las condiciones en las que se produce el lixiviado tales como la aireación, cantidad de compost, agua y temperatura.

## 2. - REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Vermicompostaje

#### 2.1.1 Definición

##### 2.1.1.1 Composta

El compostaje es un proceso controlado de descomposición de la materia orgánica con el que se obtiene un producto con excelentes propiedades como fertilizante y regenerador de suelos: la composta. Este proceso se realiza principalmente con los residuos vegetales de la cocina, del jardín y de cosechas.

En el compostaje intervienen millones de microorganismos, hongos y numerosos invertebrados que descomponen los residuos orgánicos convirtiéndolos en humus. Estos organismos viven en presencia del aire (organismos aerobios), por lo que en el compostaje no hay putrefacción y, por tanto, tampoco malos olores (De Santos y Urquiaga, 2013). El producto final se usa para fertilizar y enriquecer la tierra de los cultivos. Las compostas tienen la ventaja sobre otros materiales orgánicos crudos de que ya están estabilizadas, los elementos ya están mineralizados y disponibles por las plantas (Organización Tierramor, 2002).

##### 2.1.1.2 Vermicomposta

El vermicompostaje es el proceso biotecnológico por el cual, haciendo uso de una o varias especies de lombrices( *Eisenia foetida* principalmente), se logra la conversión de residuos orgánicos provenientes de diversas fuentes (animal, vegetal, industrial, doméstica biosólidos) en un producto rico en nutrientes fácilmente asimilable por las plantas( Kaushik & Garg, 2004 ; Garg et al ., 2006 a ; Garg et al., 2006 ; Nagavallema et al., 2006; Chauhan et al ., 2010). Difiere del composteo tradicional debido a que es un proceso mesofílico (los microorganismos y las lombrices son activos entre 10 y 32 °C, se lleva a cabo en menor tiempo debido a la actividad enzimática del tracto digestivo de las lombrices, se reduce hasta en un 60 %el volumen de los residuos composteados, y se promueve la proliferación de microorganismos biológicamente activos para el desarrollo de las plantas (Gandhi et al., 1997; Nagavallema et al., 2006).

Además del tratamiento de residuos orgánicos, la producción de vermicomposta y derivados, entre los que destacan los lixiviados y los téis de vermicomposta, se ha aplicado en la reducción de microorganismos patógenos en biosólidos y biofertilizantes (Eastman et al., 2001; Gutiérrez et al., 2008), el tratamiento de residuos industriales peligrosos como los metales pesados (Jadia & Fulekar, 2008; Li et al., 2010)

Si bien el uso de lixiviado se ha generalizado como biofertilizante de aplicación foliar (García et al., 2008; Gutiérrez et al., 2010; oliva et al., 2010; Singh et al., 2010), su aprovechamiento puede extenderse como bioprotector que sustituya el uso de plaguicidas sintéticos que, además de causar un impacto negativo en la calidad del cultivo, ponen en riesgo la salud del protector y del consumidor.

### **2.1.2 Proceso de obtención de la vermicomposta**

En el proceso de vermicompostaje el principio más importante es el hecho de que se trata de un proceso biológico (fermentación aerobia) realizado por microorganismos, y por lo tanto, tiene todas las ventajas y limitaciones de este tipo de procesos. Según esto, los factores que afectan a los microorganismos son los que requieren mayor control a lo largo del proceso, entre estos factores están: la aireación, el contenido de humedad, temperatura, pH, los factores nutricionales y la relación C/N (Domínguez *et al.*, 2010).

#### **2.1.2.1 Control de la temperatura**

El compostaje es esencialmente la aplicación de condiciones controladas (aireación, humedad y volteos) para mejorar un proceso de descomposición natural. Durante el proceso de compostaje la temperatura varía dependiendo de la actividad metabólica de los microorganismos. De acuerdo a este parámetro, el proceso de vermicompostaje se puede dividir en cuatro etapas: mesófila, termófila, enfriamiento y maduración.

**Fase inicial o mesófila:** Es un periodo de corta duración, donde la temperatura se eleva hasta los 40°C, se consumen los azúcares y otros compuestos simples, fácilmente degradables predominan los microorganismos mesófilos (hongos y bacterias).

**Fase termófila:** Esta fase puede durar varias semanas o meses, predominan los hongos termófilos y actinomicetos, sube la temperatura en el rango de 60-80°C, las bacterias que forman esporas preponderan y los hongos mueren. Se consume la hemicelulosa y celulosa. A medida que la temperatura desciende, la materia orgánica es recolonizada por los hongos termófilos y se alcanza la fase con mayor tasa de degradación. El pH de la pila sube entre 8 y 9. Se liberan iones como los de potasio, magnesio y calcio.

**Fase de enfriamiento:** La temperatura desciende a 40°C y los microorganismos mesófilos se reactivan, las bacterias y los hongos consumen la lignina. Aparecen otros microorganismos e invertebrados.

**Fase de maduración:** Esta última etapa es fundamental para obtener una composta de buena calidad; la temperatura desciende de 20-25°C y los microorganismos mesófilos se reactivan. Las bacterias y los hongos consumen la lignina. Aparecen otros microorganismos e invertebrados, El pH se ubica entre 7 y 8, aumenta en la capacidad de intercambio catiónico (C.I.C) y presencia de microorganismos indicadores con efectos sobre la germinación y crecimiento vegetal.

En esta etapa debe controlarse la temperatura, debido a que por una parte las temperaturas bajas suponen una lenta transformación de residuos, prolongándose los tiempos de retención, y sin embargo, las temperaturas elevadas determinan la destrucción de la mayoría de los microorganismos (pasteurización), fenómeno que solo debe permitirse al final del compostaje, para asegurar la eliminación de patógenos (Xelhuantzi *et al.*, 2012).

### **2.1.2.2 Aireación**

El proceso de vermicompostaje es un proceso aerobio por lo que se necesita la presencia de oxígeno para el desarrollo adecuado de los microorganismos. La aireación tiene un doble objetivo, aportar por una parte el oxígeno suficiente a los microorganismos y permitir al máximo la evacuación del dióxido de carbono producido (SAGARPA, 2012).

### **2.1.2.3 Humedad**

La humedad es un factor muy relacionado con la aireación. Los microorganismos necesitan agua como vehículo para transportar los nutrimentos y elementos energéticos a través de la membrana celular, la humedad óptima se puede situar alrededor del 55% aunque varía dependiendo el estado físico y tamaño de las partículas, así como del sistema ampliado para realizar el compostaje (SAGARPA, 2012).

Si la humedad disminuye demasiado, decrece la actividad microbiana con lo cual el producto obtenido será biológicamente inestable. Si la humedad es demasiada alta el agua saturará los poros e interferirá la distribución del aire a través de la composta. En procesos en los cuales los principales componentes sean sustratos tales como aserrín, astillas de maderas, pajas y hojas secas se necesitan una mayor humedad mientras en minerales como los residuos de alimentación, etc., la humedad necesaria es mucho menor.

### **2.1.2 Funciones de las lombrices**

Las lombrices a través de sus tubos digestivos y con la acción combinada de microorganismos transforman la materia orgánica en vermicomposta, material con una mejor estructura y mayor contenido de nutrimentos, con respecto a la composta obtenida sin la intervención de la lombriz (Fundación Terra, 2003)

En el cultivo de lombrices, los adultos procesan aproximadamente 1 g diario de abono, equivalente a su propio peso.

Gómez et al. (2012). En este artículo señalan a la especie de lombriz de tierra con su microbiota intestinal asociada como un fuerte determinante del proceso que configura la estructura de las comunidades microbianas en el corto plazo. Sin embargo, esto debe compararse con el hecho de que se necesitan más conocimientos para evaluar si los cambios en la composición de la microbiota en respuesta a las especies de lombrices de tierra se acompañan de un cambio en la diversidad y función en la comunidad microbiana.

Para aplicar un humus en la agricultura, Uribe (2011) y Bollo (2005), sugieren que debe reunir las características descritas en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Elementos, concentraciones y proporciones que debe reunir el humus.

| Elementos                 | Unidades                 |
|---------------------------|--------------------------|
| Materia orgánica          | 30 a 50%                 |
| Humedad máxima            | 40%                      |
| Nitrógeno (N) Fosforo (P) | 1.5 a 3%<br>0.5 a        |
| Potasio (K)               | 0.5 a 1.5%               |
| Magnesio (Mg)             | 0.20 a 0.50 %            |
| Cadmio (Cd)               | 10 mg kg <sup>-1</sup>   |
| Cobre (Cu)                | 450 mgkg <sup>-1</sup>   |
| Níquel (Ni)               | 120 mgkg <sup>-1</sup>   |
| Plomo (Pb)                | 300 mgkg <sup>-1</sup>   |
| Zinc (Zn)                 | 1.100 mgkg <sup>-1</sup> |
| Mercurio                  | 7 mgkg <sup>-1</sup>     |
| Cromo                     | 400 mgkg <sup>-1</sup>   |
| pH                        | 6.8-7.2                  |
| Carbono orgánico          | 8.7-38.8                 |
| Relación C/N              | 9:13                     |
| CIC (meq/100 g de humus)  | 150-300                  |

Importancia de la buena relación C/N en un vermicompostaje

El tiempo de transformación de la materia orgánica, está sujeto al contenido de C y N que contenga la muestra a tratar; esta relación caracteriza los diversos materiales orgánicos biodegradables. Es sabido que para que ello ocurra se requiere que la materia orgánica (MO) generada posea una relación de 30 (eventualmente 25) a 40 partes de carbono (C) por cada una de nitrógeno (N).

En términos generales, los microorganismos absorben 30 partes de C por cada parte de N. El carbono se utiliza como fuente de energía siendo 10 partes incorporadas al protoplasma celular y 20 partes eliminadas como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Como para la incorporación es necesaria la relación de 10:1, para asimilar 17.3 kg de carbono hace falta 1.73 kg de Nitrógeno. Si existe exceso de C en relación al N (relación C/N alta), el carbono se consume o elimina en cuanto que el nitrógeno va siendo reciclado, pues los microorganismos que mueren cederán el nitrógeno de esqueletos (Díaz, 2002).

### 2.1.3 Relación Carbono/Nitrógeno

El ~~C~~Carbono y el ~~N~~Nitrógeno son los elementos más importantes requeridos para la descomposición microbiana ya que estos forman parte fundamental de las proteínas, carbohidratos y lípidos que constituyen los microorganismos. En forma práctica, la relación carbono/nitrógeno permite conocer la velocidad de descomposición y determinar el tiempo de compostaje, siempre y cuando las condiciones de humedad, aireación y temperatura sean las óptimas. Para obtener una composta o vermicompostaje de buena calidad es importante que exista una relación equilibrada entre ambos elementos. Teóricamente una relación carbono/nitrógeno de 25-35 es la adecuada, pero esta varía en función de las materias primas que conforman el compost. Si la relación es mayor a 35 no existe suficiente nitrógeno para el crecimiento microbiano por lo cual disminuirá la actividad biológica y por ende se retrasará el proceso.

En cambio sí es menor a 30 el nitrógeno se encontrara en exceso por lo que

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Con formato: Fuente: Sin Negrita

puede perderse como amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), lo que traerá como consecuencia olor desagradable. Es importante realizar una mezcla adecuada de los distintos residuos con diferentes relaciones carbono nitrógeno para obtener un sustrato equilibrado. En general los residuos animales como gusanos, purines, residuos de mataderos, y los materiales verdes y húmedos como cortes de pasto, residuos de frutas y verduras poseen una baja relación carbono nitrógeno; en cambio los materiales leñosos y secos como hojas secas, aserrín, virutas de madera, papel y otros tienen una alta relación carbono nitrógeno (O'Ryan y Riffo, 2007).

#### **2.1.4 Uso de vermicomposta y derivados para control biológico**

Existen diversos reportes sobre el uso de compostas obtenidos a partir de una diversidad de sustratos para reducir la incidencia de organismos fitopatógenos y la propagación de las enfermedades que ocasionan (Ling et al., 2010). El control biológico, aplicando vermicompostas y derivados, se debe principalmente a la presencia de microorganismos antagónicos a las especies patógenas para los cultivos, aunque estudios recientes indican que la producción de ciertas sustancias biocidas por las lombrices, como enzimas extracelulares y de estos microorganismos (Karaca, 2011).

Debido a la gran variedad de sustratos que son utilizables para la elaboración de compostas y vermicomposta, es difícil homogenizar la ecología microbiana que las integra. Según la composición y concentraciones de cada uno de los sustratos será el tipo de comunidades que se desarrollarán, predominarán o dejarán de expresarse (Leveau & Bouix, 2000).

Recientemente se han utilizado técnicas de composteo y vermicomposteo para tratar residuos agroindustriales, químicos, domésticos, de la industria de extracción y de lodos activados (Kaushik y Garg, 2003; 2004; Fredericckson et al., 2007; Sangwan et al., 2008).

Naveen et al. (2016). La cuantificación, la evaluación de la calidad, el tratamiento y la gestión de los lixiviados se ha convertido en un serio problema en todo el mundo. El análisis microbiano mostró que las comunidades bacterianas se correlacionan con factores específicos relevantes para los entornos redox, lo que indica un



gradiente en la naturaleza y la abundancia de la diversidad biótica con un cambio en el ambiente de lixiviado. Este estudio ayudo a comprender el potencial de contaminación del lixiviado de rellenos sanitarios y establece vínculos entre las comunidades microbianas y los parámetros físico-químicos para una gestión eficaz de los lixiviados de rellenos sanitarios.

### 2.1.5 Propiedades Químicas ( pH )

El pH tiene mucha importancia en los suelos ya que influye en la aprovechabilidad de los nutrimentos mayores y menores. En los suelos ácidos hay generalmente buenas cantidades de elementos menores disponibles, con la posible excepción del molibdeno y la poca disponibilidad del fosforo y bases de cambio.

La acidez del suelos está determinada por los iones hidrogeno (H+) que se encuentran en la solución del suelo y se denomina acidez activa. Mientras mayor cantidad de iones hidrogeno se encuentran en la solución del suelo, mayor será la acidez. El hidrogeno y el aluminio retenidos sobre la arcilla y sobre el humus del suelo, son los iones que permanecen en su estado intercambiable, suele designarse con el nombre de acides en reserva o potencial. Tanto la acidez activa como la potencial deben tenerse en cuenta al considerar la acidez total del suelo.

Cuando se determina el valor del pH, la concentración del ion H+ en solución es la que determina la acidez del suelo y si existe H+ en solución, debe estar en equilibrio con H+ intercambiable y con el hidrógeno no intercambiable.(Cepeda, 1991; CHARRY, 1991; Rodríguez, Humberto, 2002)

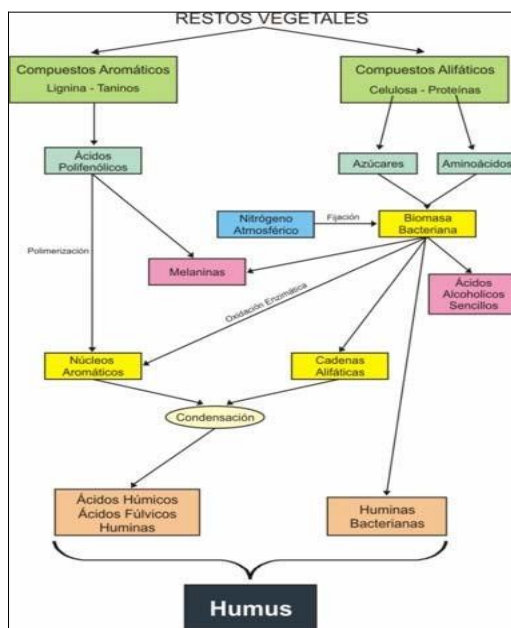
### 2.1.6 Materia orgánica

La materia orgánica es el elemento que, aunque representa tan solo el 5% de la composición del suelo, ejerce una gran influencia en las propiedades físicas y químicas del éste.

La materia orgánica en el suelo es un material complejo que sufre continuos procesos de descomposición y síntesis bajo la acción de distintos grupos de microorganismos así como de diversos representantes de la microfauna edáfica (ácaros, insectos, lombrices, etc.); también intervienen fuerzas físicas como los

cambio de temperatura, de humedad y procesos químicos como la oxidación y la hidrólisis. Este material está constituido fundamentalmente por compuestos aromáticos (lignina y taninos) y compuestos alifáticos (celulosa y proteínas) y es el encargado de generar las sustancias húmicas sufriendo degradación y posterior polimerización y condensación. Todo este complejo proceso es el que se conoce como humificación (Figura 1).

Los compuestos aromáticos son degradados hasta la obtención de ácidos polifenólicos sencillos derivados del fenilpropano producido por la ruptura de la lignina; y los compuestos alifáticos son degradados hasta la obtención de azúcares (carbohidratos) en el caso de la celulosa y aminoácidos en el caso de las proteínas.



**FIGURA 1** Proceso de Humificación

La materia orgánica es la principal fuente de nitrógeno, fósforo, azufre y algunos elementos menores. Tiene un efecto positivo sobre las propiedades físicas del suelo aumentando la capacidad amortiguadora y mejorando la capacidad de intercambio catiónico. La materia orgánica del suelo se calcula indirectamente

determinando el carbono orgánico (*Fassbender, 1975; L.M.Thompson, 2002; sociedad colombiana, 2003*).

### **2.1.7 Micronutrientes**

Estos nutrientes se requieren solo en cantidades pequeñas y muy limitadas. No obstante la deficiencia de uno o más de estos nutrientes puede tener influencia sobre el rendimiento y desarrollo de los cultivos.

Las plantas pueden absorber los nutrientes a través de las raíces, los tallos y las hojas. Sin embargo, la mayor parte de los nutrientes es captada por las raíces. Los nutrientes entran a la planta solo en forma de soluciones. La absorción más intensa de nutrientes se realiza a través de los pelos absorbentes. Las raíces viejas han perdido la habilidad para absorber los nutrientes y sirven para transportar los elementos hacia la parte alta de la planta (*Rodríguez, 2002*).

Al penetrar en las capas del suelo, los finísimos pelos absorbentes entran en íntimo contacto con las partículas minerales y con el agua del suelo. En el agua se disuelven los nutrientes.

Los elementos requeridos por la planta entran por el intercambio que se realiza entre los pelos absorbentes, la solución y los minerales alrededor de ellos. Para compensar los elementos absorbidos, las raíces pequeñas exudan otros (*Rodríguez, 2002*).

La intensidad de absorción de los nutrientes es afectada por los siguientes factores:

- Presencia de suficiente aire fresco en los espacios del suelo. Esta es muy importante para el desarrollo y actividad de los pelos absorbentes. Una labranza adecuada puede renovar el aire del suelo.
- La humedad del suelo, que lleva los nutrientes en la solución haciéndolos disponibles a la planta.
- La densidad y la distribución del sistema radicular. Que determina las cantidades de nutrientes que pueden ser absorbidos.

### 2.1.8 Importancia del nitrógeno en el suelo

El nitrógeno (N) es un macronutriente limitante en la producción agrícola mundial aplicado en grandes cantidades como fertilizante (Reed et al., 2011). La eficiencia en el uso de este nutriente por las plantas depende de las características fisicoquímicas del suelo (pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, tipo de partículas minerales); factores climáticos (temperatura, precipitaciones, evaporación); prácticas agronómicas (labranza, manejo de residuos, rotación de cultivo, aplicaciones de fertilizantes y manejo de plagas) y tipo de cultivo.

El N en el suelo está sujeto a la volatilización, inmovilización, desnitrificación y lixiviación. Amonio ( $(\text{NH}_4^+)_4$ ) y el amoníaco producto de fuentes nitrogenadas como la urea, se pierden por volatilización cuando dejan la superficie del suelo. La inmovilización de nitrógeno se da en relaciones C:N altas, lo que incrementa la incorporación de N en la biomasa microbiana. La labranza influye en las pérdidas por inmovilización, por la influencia que tiene sobre el contacto entre el suelo y los residuos y la velocidad de descomposición de estos (Malhi et al., 2001).

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

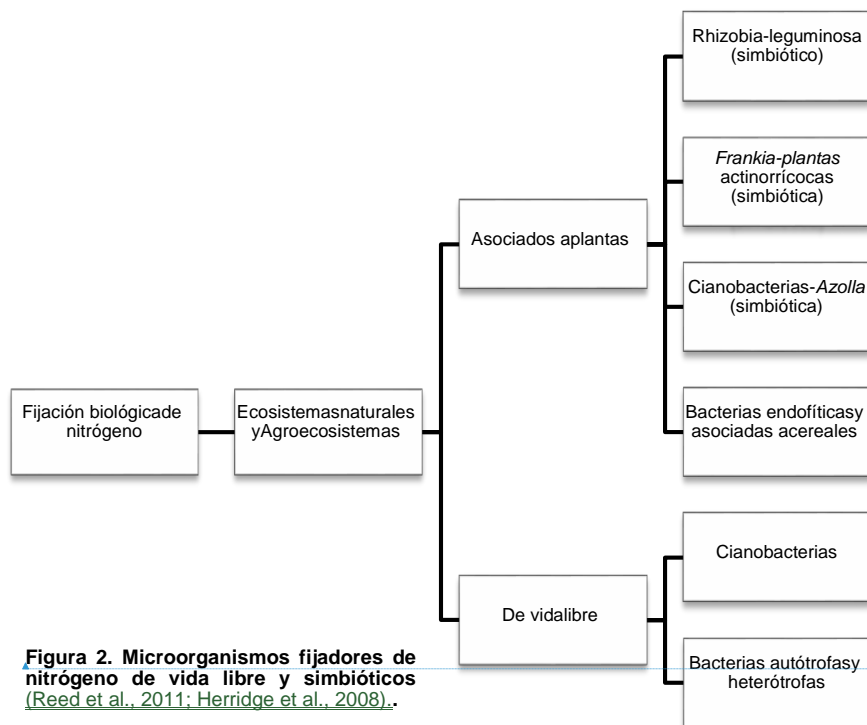
El N en el suelo sufre una serie de transformaciones químicas que requieren de una comunidad bacteriana diversa que posea los genes funcionales responsables de las transformaciones de este elemento, por ejemplo: nifH (fijación de  $\text{N}_2$ ), amoA (oxidación del amonio), nirS y nirK (reducción del nitrato) y nosZ (reducción del óxido nitroso) (Wallenstein y Vitgalys, 2005). Este macronutriente se ha evaluado en las diversas etapas del ciclo, como son la nitrificación (Okano et al., 2004), fijación de nitrógeno (Bürgmann et al., 2003) y desnitrificación (Henderson et al., 2010; Dandie et al., 2007) por ser clave en la productividad de un agroecosistema.

### 2.1.9 Fijación biológica de nitrógeno

La fijación de nitrógeno es un proceso en el que el ( $N_2$ ) es reducido a ( $NH_4^{+9}$ ), la forma de nitrógeno usado por los organismos para la síntesis de biomoléculas como las proteínas y ácidos nucleicos. El proceso industrial Haber-Bosch realiza esta transformación, con un catalizador metálico (Fe), presiones elevadas ( $5.06 \times 10^7$  Pa) y altas temperaturas (600-800 K). Sin embargo, la fijación biológica del nitrógeno se realiza a temperatura ambiente y presión atmosférica (Reed et al., 2011; Cheng, 2008). En la naturaleza este proceso es llevado a cabo exclusivamente por microorganismos del dominio Archaea y Bacteria llamados diazótrofos por medio de un complejo enzimático denominado nitrogenasa (Reed et al., 2011; Cheng, 2008). Los microorganismos diazótrofos pueden ser autótrofos, heterótrofos, quimiolitótrofos, foroheterótrofos y metanogénicos. Se pueden encontrar asociados a plantas, tal es el caso la simbiosis rhizobia-leguminosas, Frankia-plantas actinorrícicas, Anabaena-Azolla o de vida libre como Azotobacter, Clostridium, Azospirillum, ya sea en un ecosistema natural o en un agroecosistema (Fig 2.1) (Reed et al., 2011; Herridge et al., 2008).

Con formato: Fuente: 12 pto, Español (España), Subíndice

Con formato: Fuente: 12 pto, Español (España), Superíndice

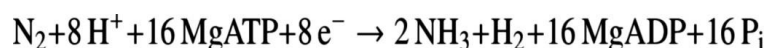


**Figura 2. Microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre y simbióticos** (Reed et al., 2011; Herridge et al., 2008).

Con formato: Fuente: 10 pto

~~Fig 2. (Reed et al., 2011; Herridge et al., 2008).~~

El complejo enzimático nitrogenasa se caracteriza por ser sensible a oxígeno, requiere un catalizador metálico (hierro, vanadio o molibdeno) y requiere cantidades elevadas de energía en forma de ATP. El complejo enzimático nitrogenasa se compone de dos subunidades llamadas dinitrogenasareductasa (Fe-proteína o componente II) y la dinitrogenasa (Molibdo-Fierro proteína o componente I). La primera está codificada en los genes nifH y la segunda en los genes nifD y nifK. Sin embargo, existen nitrogenasas alternativas, en las que el molibdeno es remplazado por vanadio (codificada en los genes vnfHDK) o por hierro (genes anfhDK). La más abundante y ampliamente estudiada es la nitrogenasa dependiente de molibdeno. La reacción catalizada por esta enzima es la siguiente (Seefeldt et al., 2009):



Allardice et al.<sup>7</sup> (2015). Determinaron el papel de las concentraciones variables de vermicomposta de estiércol de pollo en la producción de biomasa y nitrógeno en la nutrición de la leguminosa, *L. angustifolius*. En el cual el número de nematodos y la diversidad creció con el aumento de las concentraciones de vermicomposta.

Concluyen que las concentraciones de vermicomposta son una consideración importante para la disponibilidad de nutrientes de sustrato, abundancia bacteriana y para la fijación de nitrógeno.

Con formato: Fuente: Cursiva

### 2.1.10 Extracción de ADN

En la actualidad, el estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológico-evolutivos se aborda mediante marcadores moleculares, segmentos de ADN con o sin función conocida que proporcionan información sobre la variación alélica y permiten distinguir individuos. Estos marcadores se obtienen con técnicas como la PCR (por las siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction) y secuenciación, que hacen posible analizar la variación en la molécula del ADN con un detalle sin precedentes.

Los datos moleculares han permitido estudiar con mayor precisión los patrones de diversidad genética y su distribución; el comportamiento; la selección natural; las interacciones biológicas; la composición, funcionamiento y dinámica de comunidades microbianas; las relaciones filogenéticas, entre otros. La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende, en gran medida, de la extracción de ADN íntegro y puro (Hudson 2008).

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El ADN está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal. Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al

ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción.

Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Pero, en presencia de etanol, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como  $\text{Na}^+$  que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN. Por otro lado, la carga neta negativa del ADN le permite unirse a moléculas y matrices inorgánicas cargadas positivamente, (Alejo et al., 2010).

#### **2.1.10.1 Lisis celular**

Durante el proceso de lisis las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen. Se utilizan soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN. Muchas soluciones de lisis contienen también EDTA, que forma un complejo con los iones de  $\text{Mg}^{2+}$  e impide el funcionamiento de las DNAsas (Sambrook et al. 1989). Los componentes celulares no solubles como el material fibroso y proteínas que permanecen en solución se separan del ADN por centrifugación. Tanto la homogeneización como la lisis celular son similares en los protocolos tradicionales y comerciales.

#### **2.1.10.2 Separación de proteínas**

En esta etapa se separa el ADN de las proteínas y lípidos mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación. Se utiliza la fuerte tendencia hidrofílica de los grupos fosfato para separarlos en medios acuosos, mientras que las proteínas y los lípidos se separan en solventes orgánicos (Sambrook et al., 2001). La fase acuosa y la orgánica se separan por centrifugación lo que permite aislar al ADN. Los solventes que se usan frecuentemente son el fenol, el cloroformo y el alcohol isoamílico. Estos reactivos contaminan fácilmente el ADN, por lo que se debe evitar acarrearlos en el proceso de purificación (Alejo et al., 2010).



### **2.1.10.3 Precipitación de ADN**

Después de que son eliminados los lípidos y las proteínas, se recupera el ADN. Para ello, se adiciona etanol y soluciones con altas concentraciones de iones de sodio o amonio que se unen a los grupos fosfato, esta mezcla reduce las fuerzas repulsivas entre las cadenas y permite que el ADN se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble. Un paso de centrifugación permite que el ADN permanezca en el fondo del tubo mientras que el etanol es desechado. Los restos de etanol se eliminan con un lavado con etanol al 70% y el remanente se elimina por evaporación.

Una vez que se ha eliminado el etanol, el paso siguiente es hidratar el ADN para mantenerlo en solución para permitir la redisolución completa del ADN y evitar una hidrólisis ácida.

### **2.1.11 16S rRNA**

Song et al. (2015). Reportaron un estudio relacionado con la composición de las comunidades bacterianas, durante los procesos de descomposición de desechos líquidos de rellenos sanitarios, mediante el estudio del 16S rRNA y una pirosecuenciación. Como era de esperar, sus abundancias variaron en las fases de descomposición. La abundancia de Firmicutes fue de 21.3%. La abundancia de Bacteroidetes representó el 11.5% del total bacteriano.

Köchling et al. (2015). Reportaron el análisis de las comunidades microbianas en el lixiviado producido por tres celdas de rellenos sanitarios. Utilizando la pirosecuenciación 454 de alto rendimiento del gen 16S rRNA, se describe la estructura de las comunidades de lixiviados y se presentan sus características de composición. Los miembros del Firmicutes fueron dominantes en todas las muestras, representando hasta el 62% de las secuencias bacterianas. Se incluyeron Bacteroidetes, Proteobacteria, y Spirochaetes, que junto con Firmicutes consistió el 90% de las secuencias. Los datos ilustran una comunidad microbiana que degrada la materia orgánica en el lixiviado crudo. Los géneros encontrados encajan bien en las vías clásicas de los procesos de digestión anaerobia.

Valenzuela et al., (2015). El ácido ribonucleico ribosomal 16S (ARNr 16S), originalmente propuesto por Pace et al. (1986), fue presentado como una buena opción para la clasificación de bacterias. La idea fue rápidamente adoptada por la comunidad científica y la secuencia del ARNr 16S se ha utilizado para conformar bases de datos especializadas. Lo anterior ha permitido que las secuencias del ARNr 16S sean utilizadas como una herramienta importante en la reconstrucción de relaciones filogenéticas.

Baoyi et al., (2015). Este estudio tuvo como objetivo comparar las estructuras y composiciones microbianas en procesos de compostaje y vermicompostaje. Se aplicó PCR de alto rendimiento para analizar el gen 16S rRNA de bacterias obtenidas de bio-estabilización de lodos y estiércol de ganado. Los resultados demostraron que el proceso de lombricompostaje presentó unidades taxonómicas más altas y más diversidad bacteriana que el compostaje. La comunidad bacteriana durante el compostaje difirió significativamente de la de vermicomposta. Estas dos desempeñaron diferentes papeles en el cambio de la diversidad y composición de las comunidades microbianas.

Chen et al., (2015). El análisis de las comunidades microbianas del vermicomposteo por pirosecuenciación de alto rendimiento mostró una estructura comunitaria bacteriana más compleja en el sustrato tratado por las lombrices que en el grupo control. En comparación con el grupo control, aumentó la abundancia relativa de microorganismos de degradación de lignocelulosa. Encontraron que las lombrices de tierra modificaron la estructura de las comunidades microbianas durante el proceso de vermicompostaje, activaron el crecimiento de microorganismos de degradación y desencadenaron la descomposición de la lignocelulosa.

Romero et al. (2014). La comunidad bacteriana en el lixiviado de lombrices derivadas de vermicompostaje de estiércol de vaca se estudió mediante la pirosecuenciación del gen 16S rRNA. El lixiviado de lombrices frescas fue rico en Mollicutes, particularmente el género *Acholeplasma* que contiene especies patógenas.

Los cambios en el contenido de amonio, nitrato y carbono inorgánico del lixiviado de lombrices cuando se almacenaron se correlacionaron con cambios en la estructura de la comunidad bacteriana. Se encontró que el almacenamiento del lixiviado de lombrices podría ser necesario antes de que pueda aplicarse a los cultivos ya que se encontraron grandes proporciones de patógenos potencialmente vegetales en el lixiviado fresco.

Zhang et al. (2014). En este estudio la secuenciación metagenómica mostró que las comunidades alimentadas con lixiviado tenían mayores genes de motilidad celular, incluyendo la abundancia de genes relacionados con la resistencia a los metales, la resistencia a los antibióticos.

Huang et al. (2012). Después de 60 días de vermicompostaje, se encontraron valores significativamente menores de actividad microbiana y fúngicas en los productos de vermicompostaje con lombrices de tierra que en el control (sin lombrices). La electroforesis de gel en gradiente mostró que para el vermicompostaje mejoró la diversidad bacteriana y las comunidades de hongos. Sin embargo, por sus estructuras, los resultados de la secuenciación revelaron que en comparación con el control en el que predominaban los Firmicutes bacterianos, en la vermicomposta, se encontraron dominantes los Bacteroidetes y Actinomycetes bacterianos y los Sordariomycetes fúngicos.

Liu et al. (2011). Con el fin de obtener una visión de la diversidad procariota y la comunidad en el sedimento de lixiviado, se llevó a cabo un enfoque filogenético molecular basado en el ADN de clones del 16S rRNA, procedentes del sedimento de lixiviado de un vertedero envejecido. El análisis filogenético de la biblioteca bacteriana reveló una variedad de microorganismos que degradan y biotransformar contaminantes, incluyendo 18 tipos distintos. Una fracción sustancial de clones bacterianos mostró bajos niveles de similitud con cualquier secuencia previamente documentada y por lo tanto, podría ser taxonómicamente nueva.

Este estudio es el primero en informar sobre la composición de los conjuntos microbianos y las características filogenéticas de las poblaciones procariotas existentes en el sedimento de lixiviado.

### 3. – JUSTIFICACIÓN

Recientemente, se ha intensificado el aprovechamiento de estos residuos, mediante la elaboración de vermicomposta utilizando estiércol de ovino con el fin de obtener un producto rico en materia orgánica estable y de esta manera aprovechar su aporte nutricional tanto del sólido como de los lixiviados que se generan durante el proceso.

La aplicación al suelo de la vermicomposta es una alternativa para disminuir el uso de fertilizantes químicos que afectan la calidad del suelo y demeritan su poder nutricional, además de que conllevan una reducción de costo monetario para el productor.

Es verdad que dependiendo de los residuos vegetales así como de las etapa de descomposición y madurez dependerá la composición de la composta y vermicomposta, no obstante, las evaluaciones en laboratorio facilitarán la comprensión del la gran ventaja que tiene utilizar residuos orgánicos en la vermicomposta, de cara a conocer la aplicación óptima y máximo aprovechamiento de los nutrimentos. Por lo tanto nos permitira realizar mejores aplicaciones en campo y entender de mejor forma la aplicación.

## 4. - OBJETIVOS

### 4.1 Generales

Establecimiento de las técnicas de extracción de AND metagenómico y amplificación del gen 16s rRNA para identificación de las comunidades bacterianas presentes en el sistema de vermicomposta con residuos orgánicos de cabra y conejo.

### 4.2 Particulares

- Establecimiento y evaluación de diferentes métodos para la extracción ADN de sistema de vermicomposteo con residuos orgánicos de cabra y conejo.
- Identificación molecularmente las de comunidades microbianas influenciadas por la vermicomposta

Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm, Interlineado: sencillo, Punto de tabulación: No en 6.3 cm

Con formato: Fuente: 12 pto

Con formato: Normal, Sin viñetas ni numeración

Con formato: Fuente: 12 pto

Con formato: Normal, Sin viñetas ni numeración

## 5. - PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Este proyecto tiene como finalidad identificar las comunidades bacterianas presentes en un sistema de vermicomposteo y lixiviado con residuos orgánicos de cabra y conejo adicionado con lombriz (*Eisenia foetida*). Estos residuos organicos son una consideración importante para la disponibilidad de nutrientes de sustrato, abundancia bacteriana y para la fijación de nitrógeno.

La utilización de estos residuos organicos como fuente principal para la utilización de un sistema de vermicomposta es una forma preventiva para evitar la acumulación de eces fecales de este modo se evitaria accidentes y daños al medio ambiente

## 6. - Desarrollo

### 6.1 Nombre y ubicación

El experimento fue llevado a cabo en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG); ubicado en carretera panamericana kilómetro 1080, Colonia Terán, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México; (ver figura 3).



Figura 3 Ubicación del ITTG

### 6.2 Área de realización

Las actividades se realizaron en los espacios destinados a investigación que comprende la especialidad de biotecnología vegetal y en el laboratorio de Biología Molecular de la División de Posgrado e Investigación del ITTG.

## 7. Metodología

### 7.1 Material biológico

La unidad experimental estuvo formada por un recipiente de PVC de 40 cm de largo x 30 cm de ancho x 20 cm de profundidad, en la cual se dispusieron 10 lombrices, el sustrato se componía de 40% bagazo de caña y 30% heces secas de (cabra y conejo) y 30% de suelo, los tratamientos fueron humectados: por agua potable.

## 7.2. Diseño experimental

El diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones

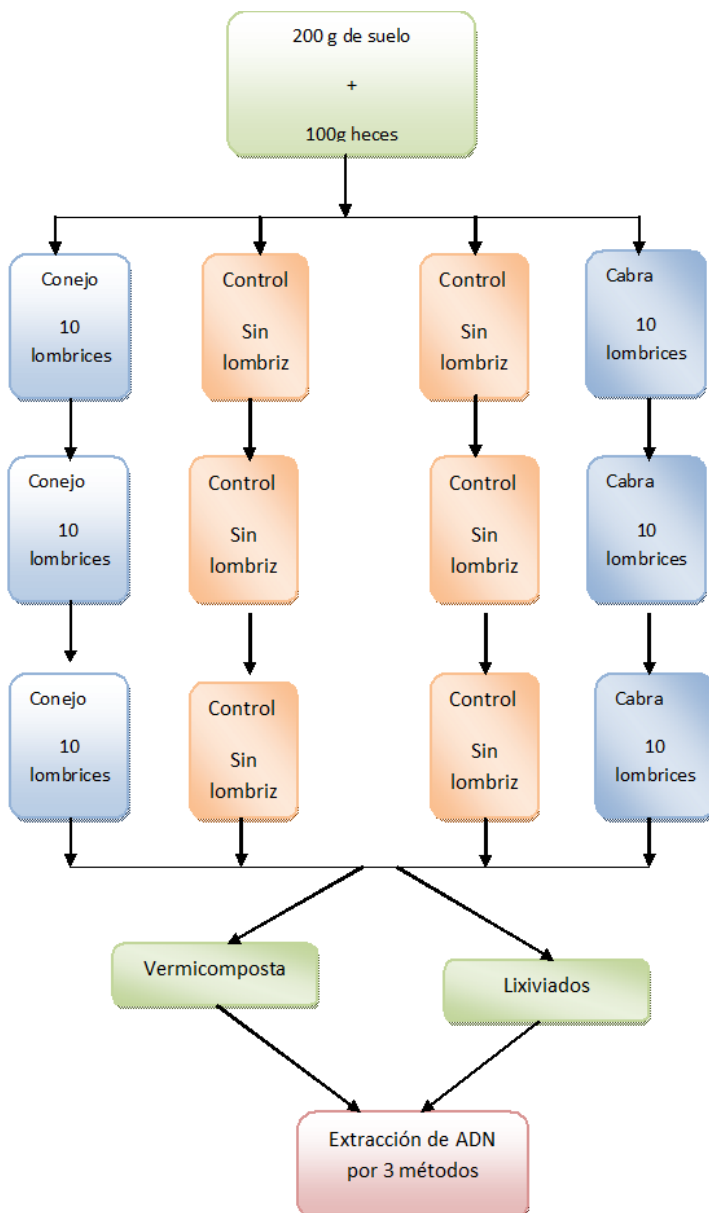
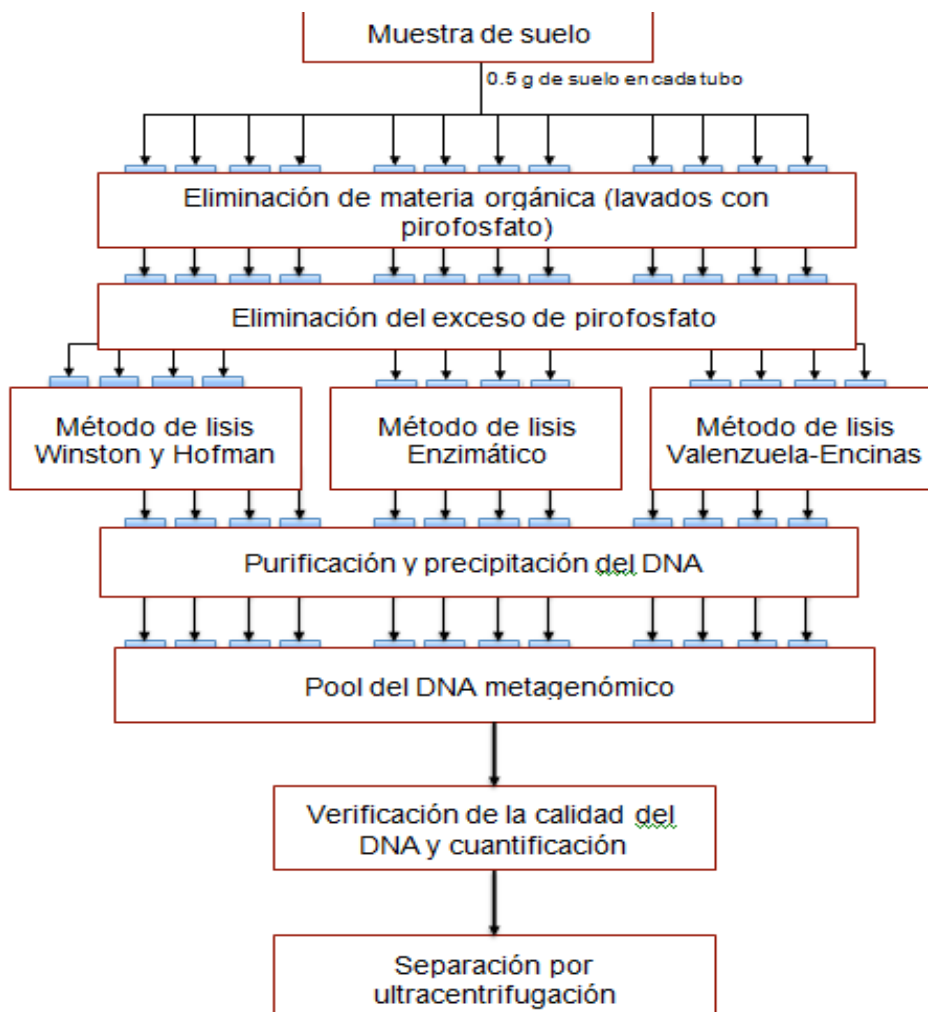


Figura 4 Diagrama de flujo del diseño experimental

### 7.3. Extracción de DNA metagenómico



**Figura 5.** Diagrama de flujo para el análisis de comunidades microbianas en muestras de suelo



Métodos modificados para extracción de DNA metagenómico de vermicompostas y lixiviado con eces fecales de cabra y conejo

**Comentado [VR1]:** Fabian, buenos días, recomiendo adicionar en toda la metodología relacionada con la extracción que se integran sus adecuaciones, por ejemplo, variación del número de lavados, tipos de muestra, volúmenes, etc

1. Pesar 0.5 g de vermicomposta en un tubo Falcon® de 15 ml.
- 1.1 Centrifugar 360 ml de lixiviado para cada muestra hasta alcanzar los 0.5 g de muestra

#### *A. Eliminación de la materia orgánica.*

2. Adicionar 10 ml de pirofosfato 0.15 M al tubo y agitar en vortex hasta resuspender perfectamente. **(ANEXO 3)**
3. Centrifugar a: 4000 rpm por 10 minutos

Eliminar sobrenadante. Repetir los pasos 2 y 3 hasta que el sobrenadante sea transparente.

Nota: Si en el primer lavado el sobrenadante no es negro, tu pirofosfato está mal preparado.

#### *B. Eliminación del exceso de pirofosfato.*

4. Adicionar 10 ml de buffer de fosfatos pH 8 y agitar en vortex hasta resuspender. **(ANEXO 3)**
5. Centrifugar (ver indicaciones en paso 3) y eliminar el sobrenadante. Repetir el lavado 4 veces.

Nota: En caso que el sobrenadante esté turbio repetir este paso hasta eliminar la turbidez y obtener un sobrenadante claro.

#### *C. Lisis de las células del suelo.*

##### *C.1. Método modificado de Valenzuela-Encinas et al. (2008).*

1. Agregar 500 µl de solución lisis I resuspender en vortex y agregar 500 µl

de solución lisis II y un volumen de arena estéril en cada una de las muestras lavadas.

2. Agitar los tubos en vortex a la velocidad máxima durante 15 min. Utilizar cinta "canela" para sujetar los tubos.
3. Incubar las muestras 20-30 min a -70°C. Usar hielo seco (asegurarse cubrir muy bien todos los tubos), o bien, incubar en el Revco.

Nota: Precalentar a 70°C el agua en termobañopara el pasosiguiente.

4. Introducir las muestras al termobañopara a 70°C durante 20-30 min. Para que el choque térmico sea eficiente se deben pasar del hielo seco al baño ¡inmediatamente!.
5. Centrifugar (ver indicaciones del paso 3 sección A) y pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf® nuevo de 1.5 ml

#### *C.2. Método de lisis enzimática.*

1. Al suelo lavado adicionar 1 ml de buffer para lisozima y 80 µl de lisozima 10 mg/ml. Incubar 1 h a 37°C.
2. Adicionar 1 ml de SDS 10% y 0.5 g de arena estéril. Agitar en vortex durante 15 min.
3. Centrifugar (ver indicaciones del paso 3 sección A) y transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf® nuevo de 1.5 ml.

#### *C.3. Método modificado de Hoffman y Winston (1987).*

1. Agregar 700 µl de solución lisis de Winston, un volumen de arena estéril y resuspender el suelo agitando en vortex.
2. Agitar los tubos en vortex a la velocidad máxima durante 15 min. Utilizar cinta "canela" para sujetar los tubos.

#### *D. Eliminación de proteínas y purificación del DNA*

1. Agregar 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.
2. Incubar 30 min a 4°C.
3. Centrifugar a 13,000 rpm a 4°C por 10 min. Transferir sobrenadante (que contiene el DNA) a un tubo nuevo.
4. Hacer extracción con 400 µl de la solución cloroformo:alcohol-isoamílico 24:1, agitar en vortex a la máxima velocidad.
5. Centrifugar 13,000 rpm 10 min a T° ambiente. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.

Nota: La fase acuosa es la capa superior. Por ningún motivo pasar la fase orgánica o las proteínas, se puede usar micropipeta de 200 µL para mejor control. Si te llegas a traer fase orgánica, regresar y volver a centrifugar.

1. Repetir los pasos 4 y 5.
2. Precipitar el DNA de la fase acuosa de la segunda extracción con cloroformo agregando un volumen PEG al 13 % y agitar en vortex.
3. Incubar a -20°C toda la noche.
4. Centrifugar a 13,000 rpm a 4°C por 10 min, eliminar sobrenadante por decantación  
¡cuidado de no eliminar la pastilla de DNA!
5. Lavar la pastilla con 500 µl de etanol 70% frío. Centrifugar a 13,000 rpm a 4°C por 10 minutos, eliminar sobrenadante por decantación ¡cuidado de no eliminar la pastilla de DNA!

6. Dar un "spin" en la microcentrífuga para bajar el etanol de las paredes del tubo y con una micropipeta de 200  $\mu$ l quitar el exceso de etanol.
7. Dejar secar la pastilla (aprox. 10 min) y resuspender en 50  $\mu$ l de agua estéril.

#### *E. Confirmación de la calidad del DNA*

1. Verificar la calidad del DNA mediante electroforesis con 3  $\mu$ l de muestra y 1  $\mu$ l de buffer de carga en un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1x.
2. Leer la absorbancia a 260 y 280 nm. Una relación  $A_{260}/A_{280} > 1.8$  se considera aceptable.

#### *F. Pool y cuantificación de ácidos nucleicos en el Nanoespectrofluorómetro*

1. Completadas las extracciones de DNA por los tres métodos y a partir de 6 g se suelo (4 extracciones de 0.5 g por tres métodos), mezclar el volumen de todas las extracciones en un tubo eppendorf.
2. Hacer una dilución 1:200 en buffer TE 1x (1  $\mu$ l de DNA + 20  $\mu$ l TE 10 $\times$  + 179  $\mu$ l de agua estéril), mezclar perfectamente en vortex.
3. En una placa de Elisa libre de ácido nucleicos mezclar 2  $\mu$ l de PicoGreen® 1x y 2  $\mu$ l de la dilución del DNA.

Nota: El Pico Green es foto sensible, protegerlo siempre de la luz. Mantener la placa de Elisa con las mezclas en hielo, 4  $\mu$ l se evaporarán rápidamente.

4. Leer en el Nanoespectrofluorómetro utilizando el método para PicoGreen® microgotas de 1-2  $\mu$ l por duplicado.

~~8~~

~~9~~

~~10~~

~~11~~

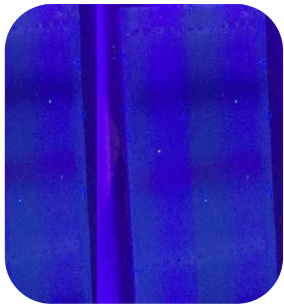
12 **Actividades realizadas**

Se realizó la preparación de pirofosfato de sodio a 0.15 M y buffer de fosfato los cuales fueron esterilizados para su uso. Posteriormente se peso 0.5 g de vermicomposta del día 30 de los diferentes tratamientos (control conejo sin lombriz, control cabra sin lombriz, cabra con lombriz, conejo con lombriz, lixiviado conejo y lixiviado cabra ) que se encuentran en invernadero el cual se colocó en tubos falcón de 15 mL a partir de tener nuestras muestras de vermicomposta y lixiviado en los tubos se inicio con los lavados de pirofosfato de sodio el cual su primordial función es eliminar toda la materia orgánica de las muestras una vez que nuestro sobrenadante de nuestros tubos son traslucidos se inicio con los lavados de buffer de fosfato el cual nos permitió quitar el exceso de pirofosfato, este proceso se llevo a cabo con todos los tratamientos posteriormente se realizo la extracción del ADN metagenómico de las muestras de suelo mediante tres métodos ; lisis enzimática, Valenzuela-Encina y Wiston y Hosman. En seguida se verificó la calidad de ADN mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y en caso de no contar con una buena calidad de ADN, las extracciones se repitieron hasta lograr este objetivo a demás de cuantificar y determinar la calidad de las muestras en el Nanodrop.

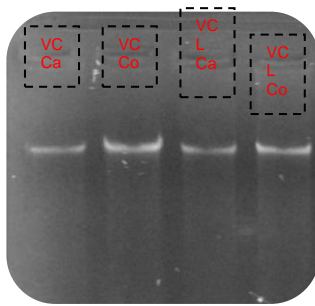
### 139. Resultados y discusión

Los métodos de extracción de DNA empleados en esta investigación combinan tres tipos de lisis celular: i) Químico, ii) Físico y iii) enzimático.

Metodología I



Metodología II



Metodología III

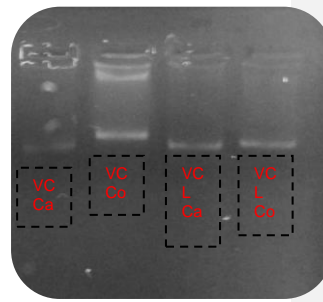
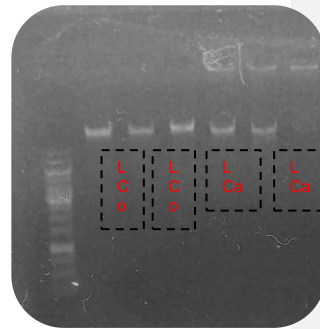
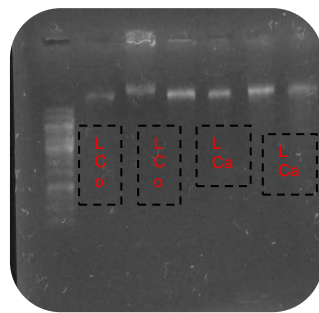
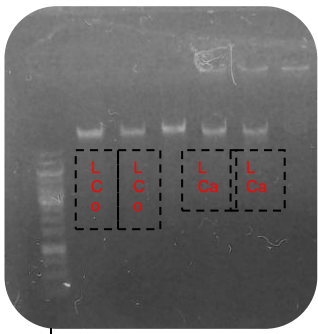


Figura 6. Geles de electroforesis con DNA de vermicomposta para el día 30



Metodología I

Metodología II

Metodología III

Figura 7. Geles de electroforesis con DNA de lixiviado para el día 30.

La calidad que se puede observar en los geles varía mucho en los métodos ya que podemos atribuirle que se deben a los reactivos utilizados y la manipulación, además que se puede observar algunas muestras como VC Ca que el bandeo se observa barrido lo cual puede ser por falta de lavados con pirofosfato y buffer de

fosfato, que la muestra esten contenga proteina o este contaminada, a lo que se sugiere hacer una purificacion para poder descartar cualquier error y tener DNA íntegro de alto peso molecular.

**Cuadro 2.** Concentración y calidad de AND en vermicomposta empleados en esta investigación

| Método             | Muestra    | mg / $\mu$ L | Gel de ADN | Detección del gen 16 S |
|--------------------|------------|--------------|------------|------------------------|
| Wiston y Hoffman   | VC Ca 1B   | 0.9          | -          |                        |
|                    | VC Ca 2 A  | 1.5          | -          |                        |
|                    | VC Ca 3 A  | 0.5          | -          |                        |
|                    | VC Co 1 B  | 2.4          | -          |                        |
|                    | VC Co 2 A  | 0.3          | -          |                        |
|                    | VC Co 3 A  | 1.2          | -          |                        |
|                    | VCL Ca 1B  | 1.3          | -          |                        |
|                    | VCL Ca 2 A | 2.5          | -          |                        |
|                    | VCL Ca 3 A | 0.8          | -          |                        |
|                    | VCL Co 1B  | 6.8          | -          |                        |
|                    | VCL Co 1 A | 4.5          | -          |                        |
| VCL Co 1 A         | 0.3        | -            |            |                        |
| Lisis Enzimatico   | VC Ca 2B   | 53.9         | +          |                        |
|                    | VC Ca 1C   | 88.7         | +          |                        |
|                    | VC Ca 2C   | 50.1         | +          |                        |
|                    | VC Co 2B   | 14.3         | +          |                        |
|                    | VC Co 1 C  | 42.8         | +          |                        |
|                    | VC Co 2 C  | 28.5         | +          |                        |
|                    | VCL Ca 2B  | 33           | +          |                        |
|                    | VCL Ca 1 C | 51.7         | +          |                        |
|                    | VCL Ca 2 C | 49.7         | +          |                        |
|                    | VCL Co 2 B | 38           | +          |                        |
|                    | VCL Co 1 C | 82           | +          |                        |
| VCL Co 2 C         | 87.4       | +            |            |                        |
| Valenzuela –Encina | VC Ca 3 B  | 178.7        | +          |                        |
|                    | VC Ca 3 C  | 204.3        | +          |                        |
|                    | VC Ca 4 C  | 401.7        | +          |                        |
|                    | VC Co 3 B  | 177.2        | +          |                        |
|                    | VC Co 3 C  | 253.2        | +          |                        |
|                    | VC Co 4 C  | 316.6        | +          |                        |
|                    | VCL Ca 3 B | 376.8        | +          |                        |
|                    | VCL Ca 3 C | 223.3        | +          |                        |
|                    | VCL Ca 4 C | 236.6        | +          |                        |
|                    | VCL Co 3 B | 456.4        | +          |                        |
|                    | VCL Co 3 C | 202.8        | +          |                        |
| VCL Co 4 C         | 228.8      | +            |            |                        |

\*(-): ausencia de ADN (+) presencia de ADN

\*(-): ausencia de amplicón (+) presencia de amplicón

**Cuadro 3.** Concentración y calidad de AND en Lixiviado empleados en esta investigación

| Método              | Muestra  | mg / $\mu$ L | Gel de ADN | Detección del gen 16 S |
|---------------------|----------|--------------|------------|------------------------|
| Wiston y Hoffman    | L Co 1 A | 69.9         | +          |                        |
|                     | L Co 2 A | 106.2        | +          |                        |
|                     | L Co 3 A | 84.1         | +          |                        |
|                     | L Ca 1 A | 47.3         | +          |                        |
|                     | L Ca 2 A | 53           | +          |                        |
|                     | L Ca 3 A | 100          | +          |                        |
| Lisis Enzimático    | L Co 1 C | 124.3        | +          |                        |
|                     | L Co 2 C | 104.1        | +          |                        |
|                     | L Co 3 C | 87.9         | +          |                        |
|                     | L Ca 1 C | 136          | +          |                        |
|                     | L Ca 2 C | 128.6        | +          |                        |
| Valenzuela - Encina | L Co 3 C | 90.8         | +          |                        |
|                     | L Co 1 B | 423.4        | +          |                        |
|                     | L Co 2 B | 475.9        | +          |                        |
|                     | L Co 3 B | 412.9        | +          |                        |
|                     | L Ca 1 B | 416.5        | +          |                        |
|                     | L Ca 2 B | 418          | +          |                        |
|                     | L Ca 3 B | 377          | +          |                        |

Se realizó la extracción de DNA y la cuantificación de todas las muestras, dando un total de 48 extracciones; de las pertenecientes a lixiviados y de vermicomposta se obtuvo DNA íntegro de alto peso molecular con el método de Valenzuela - Encinas. Por lo cual se atribuye que el choque térmico tiene una mayor eficacia para romper la membrana y así poder obtener el DNA, en cuanto a las muestras de lixiviados al contener menor material orgánico se puede extraer más DNA por la acción de las lombrices sobre el residuo no sólo modifica su biomasa microbiana, sino también la estructura y la biodiversidad de la comunidad microbiana presente inicialmente en el residuo, la cual cambia y evoluciona de una forma diferente si la comparamos con los cambios que ocurren en la microbiota del residuo orgánico cuando este mismo se degrada mesofilicamente sin lombrices (Sen&Chandra, 2009).



Al comparar los resultados de ambas extracciones (vermicomposta y lixiviado) se puede observar que en las extracciones hechas por el método de Hoffman y Winston (1987) los resultados obtenidos de lixiviado fueron benéficos y en vermicomposta los resultados obtenidos fueron negativos ya que no obtuvimos presencia de AND en los geles de agarosa y en la cuantificación con el Nanodrop se obtuvieron concentraciones muy pequeñas. Esto se lo podemos atribuir a que las muestras de vermicomposta además de la gran cantidad de materia orgánica presentaba restos de paja, lo cual al momento de homogeneizar no pudimos reducir lo suficiente; en cambio, las muestras de lixiviado presentaban un tamaño de partícula mucho menor, totalmente homogéneo y no contenía paja.

#### **14.10. Conclusión**

En base a todos los datos obtenidos en los geles y en el nanodrop es que el método Valenzuela-Encinas et al. (2009) es con el que se obtienen mejores rendimientos de extracción en comparación con los métodos reportados por Griffiths et al. (2000) y Hoffman and Winston (1987). Con base a los datos obtenidos, podemos confirmar que obtenemos mejor calidad y mayor concentración de AND, realizando la extracción de lixiviado, a diferencia de lo que podemos obtener mediante la extracción de la vermicomposta

Además con los resultados obtenidos en esta investigación se puede incrementar el tiempo y el área de interés, ya que por la concentración y calidad del ADN obtenido, se puede realizar las reacciones de PCR y la construcción de librerías metagenómicas tal y como fue reportado por Peña-Ocaña (2016), quienes identificaron las comunidades de bacterias y hongos presentes en un suelo agrícola del estado de Chiapas enmendado con fosfato y fosfito.

### **15.11. Competencia desarrolladas**

- Conocimientos generales de la carrera: Física, Matemáticas, Biología, Microbiología, Bioquímica, Química Inorgánica, Orgánica, Analítica e Instrumental, etc.
- Conocimiento y habilidades en el manejo de equipo, instrumental de laboratorio, manipulación de compuestos y reactivos químicos.
- Manifestación del compromiso con los valores y principios éticos.
- Preocupación por el medio ambiente.
- Aplicación de estrategias de aprendizaje cooperativo y colaborativo.
- Capacidad para manejar la crítica y autocrítica de manera constructiva.
- Capacidad de organización y planificación.
- Actitud proactiva y entusiasmo.
- Habilidad para trabajar en forma autónoma.
- Habilidades en el manejo de Tecnologías.
- Manejo de software para procesamiento de datos y elaboración de documentos.
- Comprensión y análisis de textos técnico-científicos en otro idioma (inglés).
- Capacidad para elaborar y desarrollar proyectos de investigación.
- Habilidades de gestión de información: búsqueda, recopilación, selección, clasificación, análisis, síntesis y presentación de información confiable y pertinente proveniente de fuentes diversas.
- Habilidad de aplicar los conocimientos teóricos metodológicos en la práctica.

## 1612 Anexos

### Apéndice 1: Preparación de materiales y equipos

1. Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min el siguiente material:
  - a. Tubos eppendorf de 1.5 ml
  - b. Microtubos con rosca de 2 ml ó tubos falcon de 15 ml (¡reusar!)
  - c. Puntas amarillas de 200 µl, y puntas azules de 1000 µl
  - d. Arena de mar (previamente tratada con ácido sulfúrico concentrado para eliminar la materia orgánica).
2. Precalear el termobañó a 70 °C.

### Apéndice 2: Soluciones para extracción de DNA y de uso frecuente en biología molecular

#### 1. *Solución de pirofosfato de sodio 0.15 M (para 250 ml)*

Pesar 16.72 g de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  y adicionar en 200 ml de agua destilada hasta disolver, aforar a 250 ml.

Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

#### 2. *Solución buffer de fosfato de sodio 0.15 M pH 8 (para 250 ml)*

Pesar 5.17 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y disolver en 200 ml de agua destilada, después ajustar el pH a 8 y aforar a 250 ml.

Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente. Esta solución tiene una caducidad de 2 semanas aproximadamente.

3. *EDTA 0.5 M pH 8 (para preparar 1000 ml)*

Pesar 186.1 de EDTA $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O sal disódica y adicionar a 800 ml de agua destilada. Agitar vigorosamente con una barra magnética. Ajustar a pH 8 con NaOH (aproximadamente 20 g de perlas de **NaOH** <!). El EDTA no se disuelve hasta que no está a pH 8. Aforar a 1 l con agua destilada.

Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

4. *Tris-HCl 1 M (para preparar 1000 ml)*

Disolver 121.1 g de Trizma Base en 800 ml de agua destilada. Ajusta al pH deseado adicionando HCl concentrado <!).

| pH  | HCl   |
|-----|-------|
| 7.4 | 70 ml |
| 7.6 | 60 ml |
| 8.0 | 42 ml |

Esperar a que la solución se enfríe a T° ambiente antes de hacer el ajuste final del pH. Aforar a 1 l. Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

5. *Lisis I (NaCl 0.15M; EDTA 0.1 M) pH 8 (para preparar 250 ml)*

Pesar 2.19 g de NaCl y agregar 50 ml de EDTA 0.5 M pH 8. Aforar a 250 ml. Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

6. *Lisis II (NaCl 0.1 M; Tris-HCl 0.5 M pH 8; 12 % SDS) pH 8 ( para preparar 250 ml)*

Medir 125 ml de Tris-HCl 1M pH 8 y pesar 1.46 g de NaCl y disolver.

Pesar 30 g de **SDS** <!) y disolver en la solución anterior, ajustar a pH 8 y aforar a 250 ml

Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

7. *Solución de lisis de Winston y Hoffman*

10 mM Tris-Cl pH8, 2% (v/v) Tritón X-100, 1% (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 1 mM

EDTA pH 8.0.

Esterilizar por filtración con una membrana de 0.22 µm. Almacenar a temperatura ambiente.

*8. Buffer para Lisozima EDTA 0.25 M pH 8 (para preparar 200 ml)*

Medir 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8 y llevar a un volume de 200 ml.

Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

*9. Lisozima 10 mg/ml (para preparar 10 ml)*

Pesar 100 mg de Lisozima y disolver en Tris-Cl 10 mM pH 8.

Esterilizar por filtración con una membrana de 0.22 µm. Almacenar a 4°C, aunque de preferencia preparar al momento. Asegurarse que la solución de Tris tenga pH 8 o la lisozima no funcionará eficientemente.

*10. Solución de acetato de potasio 5 M (para preparar 100 ml)*

Pesar 29.4 g de Acetato de potasio y disolver en 60 ml de agua destilada.

Adicionar

11.5 ml de ácido acético glacial (<!-->), y aforar a 100 ml con agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

Con formato: Fuente: Sin Negrita

*11. Solución PEG (Polietilenglicol) 13 % (P/V) en NaCl 1.6 M (para preparar 250 ml)*

Adicionar 23.4 g de NaCl y disolver en 200 ml de H<sub>2</sub>O destilada y después agregar

32.5 g de PEG y aforar a 250 ml con agua destilada.

Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

*12. Cloroformo:alcohol-isoamílico24:1 (para 100 ml)*

Adicionar a 96 ml de cloroformo a 4 ml de alcohol isoamílico. Almacenar a temperatura ambiente.

13. *Solución buffer TAE 50* □ (*Tris-Acetato-EDTA*) (*para preparar 1000 ml*)

Pesar 242 g de Tris-Base y disolver en 600 ml de agua desionizada.

Adicionar 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8 y 57.1 ml de **ácido acético glacial** (<!>). Aforar a 1 l con agua desionizada.

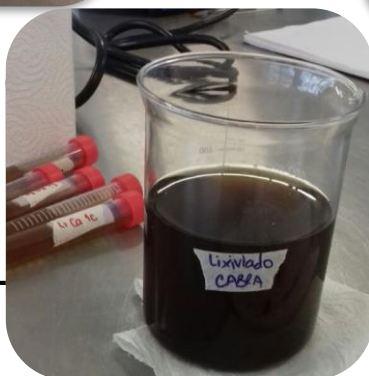
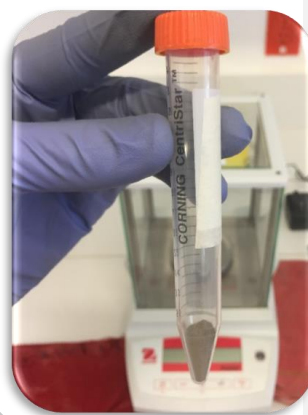
Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

14. *Buffer TE* □ 10 (*Tris 100 mM pH 8, 100 mM EDTA pH 8*) (*para preparar*

*50 ml*) Medir 5 ml de Tris 1 M pH 8 y 10 ml de EDTA 0.5 M pH 8. Aforar a 50 ml con agua desionizada.

Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

**Anexo 2.** Vermicomposta y lixiviado



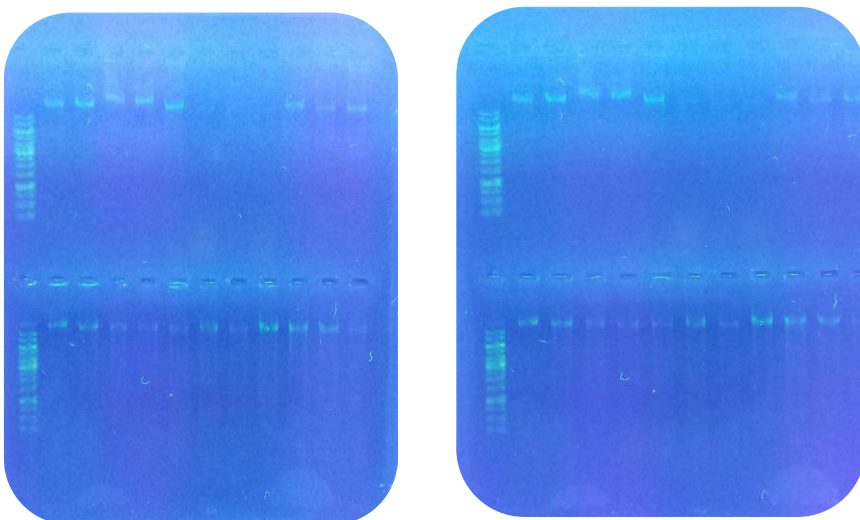
**Anexo 3 .** Tabla de lavados con pirofosfato de sodio y buffer de fosfato

| <b>Muestras</b> | <b>pirofosfato</b> | <b>buffer</b> |
|-----------------|--------------------|---------------|
| VC LCo 1A       | 14                 | 8             |
| VC LCo 1B       | 14                 | 8             |
| VC LCo 1C       | 14                 | 8             |
| VC LCo 2A       | 14                 | 8             |
| VC LCo 2B       | 14                 | 8             |
| VC LCo 2C       | 14                 | 8             |
| VC LCo 3A       | 14                 | 8             |
| VC LCo 3B       | 14                 | 8             |
| VC LCo 3C       | 14                 | 8             |
| VC Co 1A        | 14                 | 8             |
| VC Co 1B        | 14                 | 8             |
| VC Co 1C        | 14                 | 8             |
| VC Co 2A        | 14                 | 8             |
| VC Co 2B        | 14                 | 8             |
| VC Co 2C        | 14                 | 8             |
| VC Co 3A        | 14                 | 8             |
| VC Co 3B        | 14                 | 8             |
| VC Co 3C        | 14                 | 8             |
| VC LCa 1A       | 15                 | 8             |
| VC LCa 1B       | 15                 | 8             |
| VC LCa 1C       | 15                 | 8             |
| VC LCa 2A       | 15                 | 8             |
| VC LCa 2B       | 15                 | 8             |
| VC LCa 2C       | 15                 | 8             |
| VC LCa 3A       | 15                 | 8             |
| VC LCa 3B       | 15                 | 8             |
| VC LCa 3C       | 15                 | 8             |
| VC Ca 1A        | 13                 | 7             |
| VC Ca 1B        | 13                 | 7             |
| VC Ca 1C        | 13                 | 7             |
| VC Ca 2A        | 13                 | 7             |
| VC Ca 2B        | 13                 | 7             |
| VC Ca 2C        | 13                 | 7             |

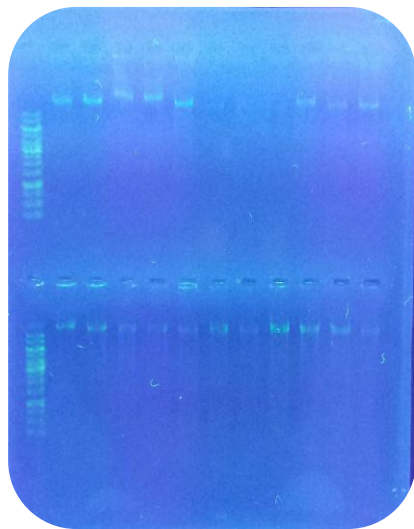


|           |    |   |
|-----------|----|---|
| VC Ca 3A  | 13 | 7 |
| VC Ca 3B  | 13 | 7 |
| VC Ca 3C  | 13 | 7 |
| VC LCa 4C | 15 | 8 |
| VC LCo 4C | 13 | 8 |
| VC Ca 4C  | 15 | 8 |
| VC Co 4C  | 14 | 8 |
| LCo 1C    | 9  | 5 |
| LCo 2C    | 9  | 5 |
| LCo 3C    | 9  | 5 |
| L Ca 1A   | 10 | 6 |
| L Ca 2A   | 10 | 6 |
| L Ca 3A   | 10 | 6 |
| L Ca 1B   | 10 | 6 |
| L Ca 2B   | 10 | 6 |
| L Ca 3B   | 10 | 6 |
| L Ca 1C   | 10 | 6 |
| L Ca 2C   | 10 | 6 |
| L Ca 3C   | 10 | 6 |
| L Co 1B   | 10 | 6 |
| LCo 2B    | 10 | 6 |
| L Co 3B   | 10 | 6 |

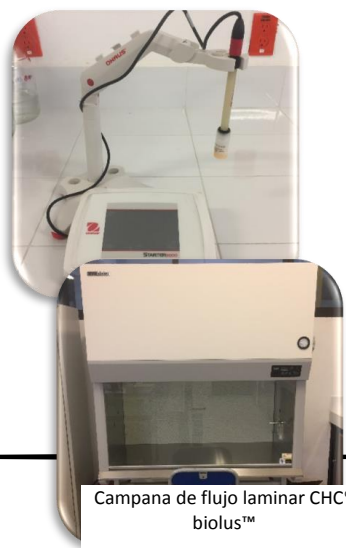
**Anexo 4** triplicado de AND por metodo de lisis enzimatico y Valenzuela-Encinas de vermicomposta de cabra y conejo.



**Anexo 5.** Triplicado de AND por metodo de lisis enzimatico, Valenzuela-Encinas y Hoffman y Winston de lixiviado de cabra y conejo.



**Anexo 6. Equipos**

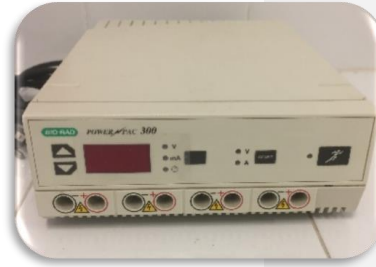




Centrífuga eppendorf® modelo 5810 R



Transiluminador UV 2000 Bio-Rad®



Fuente de alimentación PowerPac™ Bio-Rad®

### 17.13 Bibliografía

**Comentado [VR2]:** Recomiendo homogenizar el formato de las referencias.

- Arancon N., Edwards C., Dick R., Dick L (2007). Vermicompost tea production and plant growth impacts: Biocycle.
- Cáceres, A. et al (1991). Pharmacological properties of *M. oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacology*.
- Cepeda D. Juan Manuel (1991). Química de suelos Ed. Trillas. México.
- CHARRY, Jairo (1991) Los suelos su clasificación, acidez, salinidad, y fertilidad. Palmira: Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Chauhan A., Kumar S., Singh A., Gupta M (2010). vermicomposting of vegetable wastes with cowdung using three earthworm species *Eisania foetida*, *Eudrilus eugeniae* and *Perionyx excavatus*. *Nature and Science*.
- Eastman B., Kane P., Edwards C., Trytek L., Gunadi B., Stermer A., Mobley J (2001). The effectiveness of vermiculture in human pathogen reduction for USEPA biosolids stabilization. *Compost Science Utilization*.
- Fassbender Hans W (1975). Química de suelos con énfasis en suelo de América Latina. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. ICA. Costa Rica.
- Frederickson J., Howell G., Hobson A (2007). Effect of pre-composting and vermicomposting on compost characteristics. *Europ Jour Soil Biol*.
- Gandhi M., Sangwan V., Kapoor K., Dilbaghi N (1997). Composting of household wastes with and without earthworms. *Environ & Ecol*.
- García R., Dendooven L., Gutierrez F (2008). Vermicomposting leachate (worm tea) as liquid fertilizer for maize (*Zea mays L.*) forage production *Asain Jour Plant Sci*.

- Garg P., Gupta A., Satya S (2006a). Vermicomposting of different types of waste using *Eisenia foetida*: A comparative study. *Biores Teach*.
- Garg V., Kaushik P., Dilbaghi N (2006b). Vermiconservation of wastewater sludge from textile mil mixed with anaerobically digested bioags plant slurry employing *Eisenia foetid*. *Ecotox Environ saf*.
- Gutiérrez F., García R., Rincón R., Abud M., Oliva M., Guillen M., Dendooven L (2008). Formulation of a liquid fertilizer for sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using vermicompost leachate. *Biores Tech*.
- Hofman CS, Winston F (1987). A ten-minute DNA preparation from yeas tefficientlyreleasesautonomous plasmids fortransformation of *Escherichiacoli*. *Gene*.
- Jadia C., Fulekar M (2008). Phytoremediation: The application of vermicompost to remove zinc, cadmium, copper, nickel and lead by sunflower plant. *Environ Engin Manag Jour*.
- Karaca A (2011). *Soil biology: Biology of Earthworms*. Springer. Berlin Germany. 1ª edition
- Kaushik P., Garg V (2004). Dynamics ofbiological and chemical parameters during vermicomposting of soil textile mil sludge mixed with cow dung and agricultural residues. *Biores Teach*.
- Leveau J., Bouxin M (2000). *Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial*. Acribia, S. A. Zaragoza , España, 1ª edición.
- Li L., Xu Z., Wu J., Tian G (2010). Bioaccumulation of heavy metals in the earthworm *Eiseniafoetida* in relation to bioavailable metal concentrations in pig manure. *Biores Tech*.

- Ling N., Xue C., Huang Q., Yang X., Xu Y., Shen Q (2010). Development of a mode of application of bioorganic fertilizer for improving the biocontrol efficacy to fusarium wilt. *BioControl*.
- Nagavallemma K., Wani S., Lacroix S., Padmaja V., Vineela C., Rao B., Sahrawat K (2006). Vermicomposting recycling wastes into valuable organic fertilizer. *SAT eJournal*.
- Oliva M., Rodríguez L., Mendoza P., Ruiz B., Álvarez J., Dendooven L., Gutiérrez F (2010). Optimization of worm-bed leachate for culturing of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) inoculated with *Glomus fasciculatum* and *Pseudomonas Fluorencens*. *Elect Jour Biotech*.
- Rodríguez. Humberto Y Rodríguez, José (2002) *Métodos de análisis de suelo y plantas de interpretación: criterios de interpretación*, 1ª Ed, Trillas, México.
- Sangwan P., Kaushik C., Garg V (2008). Feasibility of utilization of horse dung spiked filter cake in vermicomposters using exotic earthworm *Eisenia foetida*. *Biores Tech*.
- Sambrook J., Rusell DW (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, eds).
- Singh R., Gupta R., Patil R., Sharma R., Asrey R., Kumar A., Jangra K (2010). Sequential foliar application of vermicompost leachates improves marketable fruit yeild and quality strawberry.
- Sociedad colombiana de la ciencia del suelo (2003) *Manejo Integral de la fertilidad del suelo*.
- Suárez, M., Entenza., J.M. & Doerries, C. Expression of a plant-derived peptide harboring water-cleaning and antimicrobial activities. *Biotechnol. Bioeng*.

- Trujillo Y (2010). Evaluación de lixiviados de vermicomposta en la nutrición y sanidad de café orgánico. Tesis de M en C en IBQ ITTG-Tuxtla Gutiérrez.
- Valenzuela-Encinas C., Neria-González I., Alcántara-Hernández RJ., Enríquez-Aragón JA., Estrada-Alvarado I., Hernández-Rodríguez C., Dendooven L., Marsch R (2009) Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles*.
- Zehr, J. P., Mellon, M. T., and Zani, S., New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes, *Appl. Environ. Microbiol.*
- Bollo, E. T (2005). [En línea] Humus de lombriz y su aplicación. (<http://www.lombricultura.cl/>)
- Díaz, E (2002). Lombricultura una alternativa de producción. Guía de Lombricultura. Agencia de Desarrollo Económico y Comercio Exterior Municipio Capital de La Rioja. Para emprendedores y productores del agro. La Rioja- Abril del 2002.
- Domínguez, J., Lazcano, C. y Gómez-Brandón, M (2010). Influencia del vermicompost en el crecimiento de las plantas. Aportes para la elaboración de un concepto objetivo. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, Número Especial 2.
- Fundación Terra (2003). Perspectiva Ambiental 29 Compostaje. Edición electrónica. [En Línea]. <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd30/pa29e.pdf>.
- O’Ryan., H. J. y Riffo, P. M. O (2007). Manual el Compostaje y su Utilización en agricultura. Fundación para la Innovación Agraria-Universidad de las Américas. Santiago, Chile.
- Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2012). Subdirección de desarrollo rural. Dirección general de apoyos para el desarrollo rural (<http://sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Elaboraci%C3%B3n%20Composta.pdf>).

- Uribe, S., Kristal, J., Uribe, M (2011). Evaluación de lixiviados de composta y vermicomposta de residuos agropecuarios como mecanismo de fertilización y control de enfermedades en cultivos tropicales. Universidad Politécnica del Centro Tabasco.
- Xelhuanzi, C. J., Salazar, G. G., Domínguez, A. G.; Arias, C. L. E.,Chávez, D. A. A., Galindo, B. A. J (2012). Manual para la elaboración de abonos orgánicos a partir de Técnicas como la composta y lombricomposta. SAGARPA. INIFAP Campo experimental Centro-Altos de Jalisco. Junio. Folleto técnico Núm. 2.