

INFORME TÉCNICO

DE RESIDENCIA PROFESIONAL

CARRERA

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA

JOSÉ EDUARDO CAMAS REGALADO

NUMERO DE CONTROL: **12270789**

NOMBRE DEL PROYECTO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS
COMUNIDADES BACTERIANAS PRESENTES EN UN
SISTEMA DE VERMICOMPOSTEO CON RESIDUOS
ORGÁNICOS DE GANADO VACUNO Y PORCINO.

PERIODO DE REALIZACIÓN

AGOSTO – DICIEMBRE 2016

Resumen

En México las actividades agropecuarias tienen una gran importancia en el medio rural como fuente de ingresos y proveedor de alimentos. Al año 2008 se reporta que se generaron 26'726'780 ton de residuos agropecuarios a nivel nacional, de los cuales Chiapas aporta 1'730'116 ton.

Una de las alternativas para el aprovechamiento de los residuos orgánicos es el empleo de técnicas de vermicomposteo, a través de la acción conjunta de lombrices de tierra (*Eisenia foetida*) y microorganismos. Actualmente se hace uso de la biología molecular para la caracterización de las comunidades bacterianas, mediante el empleo de protocolos ya establecidos para la extracción, cuantificación y caracterización de muestras orgánicas.

Este proyecto tiene como objetivo el establecimiento de las técnicas de extracción de DNA metagenómico y amplificación del gen 16S rRNA para la identificación de las comunidades bacterianas presentes en el sistema de vermicomposteo con residuos orgánicos de ganado vacuno y porcino.

Para su desarrollo se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 3 repeticiones, utilizando muestras de vermicomposta pura, vermicomposta con lombrices y lixiviado de vermicomposta. El aislamiento del ADN se realizó empleando un protocolo tradicional que consta de 3 técnicas de extracción (Valenzuela-Encinas, Lisis enzimática y Hoffman & Winston).

Los resultados obtenidos indican que la concentración y calidad del ADN obtenido puede emplearse para la realización de las reacciones de PCR y la construcción de librerías metagenómicas que ayudan a caracterizar las comunidades bacterianas.

Índice General

		Página
	Índice de cuadros	iv
	Índice de figuras	v
1	Introducción	1
2	Marco teórico	3
2.1	Residuos	3
2.1.1	Residuos solidos	3
2.1.3	Residuos composteables	3
2.1.4	Residuos orgánicos	3
2.2	Residuos ganaderos	4
2.2.1	Composición	4
2.2.2	Alternativas para el uso de residuos ganaderos	5
2.3	Compostaje	6
2.3.1	Principios básicos	6
2.3.1.1	Digestión aerobia	6
2.3.2	Factores que influyen en el proceso de composteo	7
2.3.2.1	Temperatura	7
2.3.2.2	Aireación	8
2.3.2.3	Uso de siembras o inoculación	8
2.3.2.4	pH	8
2.3.2.5	Condiciones climáticas	8
2.4	Vermicomposteo	9
2.4.1	Materias primas utilizadas en el vermicomposteo	10
2.4.1.1	Lombrices de tierra	10
2.4.1.1.1	<i>Eisenia foetida</i>	10
2.4.2	Productos de vermicomposta	11
2.4.2.1	Vermicomposta	11
2.4.2.2	Té de vermicomposta	12
2.4.3	Características de la vermicomposta	12
2.4.4	Composición de la vermicomposta	14
2.4.4.1	Relación C:N en vermicomposta	15

2.4.5	Factores que afectan la función de las lombrices y el vermicomposteo	15
2.4.6	Importancia del vermicomposteo	16
2.5	Función de los organismos en el suelo	17
2.5.1	Microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPR)	17
2.5.2	Identificación de la comunidad bacteriana	18
2.6	El material genético	18
2.6.1	Estructura del ADN	19
2.7	Protocolos de extracción de ADN	20
2.7.1	Protocolos comerciales	20
2.7.2	Protocolos tradicionales	21
2.7.2.1	Homogeneización del tejido	21
2.7.2.2	Lisis celular	21
2.7.2.3	Separación de proteínas y lípidos	22
2.7.2.4	Precipitación del ADN	22
2.7.2.5	Redisolución del ADN	22
2.8	Cuantificación del ADN	23
2.9	Comprobación de la integridad del ADN por electroforesis	23
2.10	Almacenamiento del ADN	24
3	Planteamiento del problema	25
4	Justificación	25
5	Objetivos	25
5.1	General	25
5.2	Específicos	25
6	Metodología	26
6.1	Ubicación	26
6.2	Diseño experimental	26
6.3	Materiales	27
6.4	Caracterización fisicoquímica	27
6.4.1	Conductividad eléctrica	27
6.4.2	pH	28
6.5	Extracción de ADN metagenómico	27

6.5.1	Preparación de las muestras	27
6.5.2	Eliminación de la materia orgánica	29
6.5.3	Eliminación del exceso de pirofosfato	30
6.5.4	Lisis celular	30
6.5.4.1	Método modificado de Valenzuela-Encinas	31
6.5.4.2	Método de lisis enzimática	30
6.5.4.3	Método modificado de Hoffman y Winston	30
6.5.5	Eliminación de proteínas y purificación del ADN	30
6.5.6	Confirmación de la calidad del ADN	32
6.5.7	“Pool” y cuantificación de ácidos nucleicos en el nanoespectrofluorómetro	32
7	Resultados y discusión	33
7.1	Resultados de la caracterización fisicoquímica	33
7.1.1	pH	33
7.1.2	Conductividad eléctrica	34
7.2	ADN metagenómico extraído de la vermicomposta	35
7.3	ADN metagenómico extraído del lixiviado	37
8	Competencias desarrolladas	39
9	Conclusión	40
10	Bibliografía	41
	ANEXO 1	45
	ANEXO 2	47

Índice de cuadros

Numero	Contenido	Página
2.1	Residuos ganaderos, composición y generación	4
2.2	Características químicas y físicas de la Norma Oficial Mexicana NMX-FF-109-SCFI-2007, para humus de lombriz	14
2.3	Factores que afectan la función de las lombrices y el vermicomposteo, y valores para su desarrollo	16
6.1	Descripción de los tratamientos empleados en el proyecto	26
7.1	Concentración y calidad de las extracciones de ADN de las muestras de vermicomposta por 3 diferentes métodos	35
7.2	Concentración y calidad de las extracciones de ADN de las muestras de lixiviado por 3 diferentes métodos	37

Índice de figuras

Numero	Contenido	Página
2.1	Alternativas disponibles para el tratamiento de residuos agrícolas	5
2.2	Composición y organización de los genes en los cromosomas	19
2.3	Estructura del ADN	20
2.4	Gel de agarosa para visualizar la integridad del ADN	24
6.1	Instalaciones del Polo Tecnológico Nacional de Pruebas Analíticas en Biocombustibles	26
6.2	Vista frontal panorámica del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez	26
6.3	Muestra de vermicomposta en descongelación	28
6.4	Muestra de vermicomposta en proceso de secado al aire libre	28
6.5	Muestra macerada de vermicomposta	28
6.6	Muestra de vermicomposta pesada	29
6.7	Información de las etiquetas en tubos de vermicomposta	29
6.8	Recipientes con lixiviado	29
6.9	Preparación de tubos con muestra de lixiviado	29
6.10	Información de las etiquetas en tubos de lixiviado	29
6.11	Eliminación de la materia orgánica	30
6.12	Lavados con pirofosfato de sodio	30
7.1	Comparación de los valores de pH obtenidos para las muestras de vermicomposta	33
7.2	Comparación de los valores de pH obtenidos para las muestras de lixiviado	33
7.3	Comparación de los valores de CE obtenidos para las muestras de vermicomposta	34
7.4	Comparación de los valores de CE obtenidos para las muestras de lixiviado	34
7.5	Resultados de electroforesis (a)	36
7.6	Resultados de electroforesis (b)	36
7.7	Resultados de electroforesis (c)	36
7.8	Resultados de electroforesis (d)	38
7.9	Resultados de electroforesis (e)	38

1. Introducción

En México las actividades agropecuarias tienen una gran importancia en el medio rural como fuente de ingresos y proveedor de alimentos. El sector agropecuario desarrolla sus actividades en gran parte de las localidades rurales y aprovecha los recursos naturales, constituyéndose en uno de los principales medios de empleo para la población que reside en el medio rural (SAGARPA, 2012).

El sector pecuario aporta dos quintas partes del valor agroalimentario nacional a través de la producción de siete bienes: carne en canal, ganado en pie, miel y cera de abeja, leche, huevo y lana de oveja (SIAP, 2013). Según datos obtenidos por INEGI (2010) Chiapas ocupa el tercer lugar nacional de productores de ganado bovino con 108, 032 ton, aportando 6.2% del porcentaje de producción nacional.

En Chiapas la frontera agropecuaria está conformada por 7.5 millones de hectáreas, 1.4 millones de ellas son de uso agrícola, (18.8 %), 3.1 millones dedicadas a la ganadería, lo que representa el 41.4 % del total, 2.5 millones al desarrollo forestal (33.6 %) y el resto se dedica a otros usos no determinados. Además, el 37% de la población económicamente activa se encuentra trabajando en el campo, esto es alrededor de 650,000 personas. Del total de la superficie pecuaria, el 87 % está destinada a la producción de leche y carne, y el inventario de la ganadería chiapaneca se estima en 3'082'813 cabezas de ganado bovino, 271'000 cabezas de ganado ovino, 1'351'113 cabezas de ganadería porcina, 2'224'250 aves (traspatio), y 95 millones de pollos (avicultura comercial-granjas) (Alvarez Simán, 2010).

La problemática actual en el sector agropecuario es el manejo de los residuos orgánicos, RAP (2011) reporta que en el año 2008 se generaron 26'726'780 ton de residuos agropecuarios a nivel nacional, de los cuales Chiapas aporta 1'730'116 ton. Estos residuos afectan gravemente al medio ambiente ya que provocan la generación de gases de efecto invernadero, eutrofización de cuerpos de agua y sobrecarga de nutrientes en suelos de cultivo (Pinos-Rodríguez et al., 2012).

Una de las alternativas para el aprovechamiento de los residuos orgánicos es el empleo de técnicas de composteo, las cuales ayudan a reducir el impacto ambiental que generan al descomponerse en condiciones ambientales. El vermicomposteo un

proceso de biooxidación, degradación y estabilización de la materia orgánica, a través de la acción conjunta de lombrices de tierra (*Eisenia foetida*) y microorganismos (Dominguez, 2004).

Los microorganismos juegan un papel importantísimo en la agregación de los suelos, sobre todo, en lo que se refiere a la secreción de sustancias agregantes, la nutrición de las plantas (principalmente en el metabolismo del nitrógeno y por la solubilización de elementos minerales), la actividad de los grupos bacterianos mineralizadores (amonificadores), secreción de sustancias activadoras del crecimiento como las hormonas y la salud de las plantas (Sana, 2011).

Actualmente se hace uso de la biología molecular para la caracterización de las comunidades bacterianas, mediante el empleo de protocolos ya establecidos para la extracción, cuantificación y caracterización de muestras orgánicas. Sin embargo, existen pocos reportes científicos relacionados con la aplicación de técnicas moleculares para la caracterización de las comunidades microbianas presentes en este tipo de muestras ambientales. Por lo tanto en este proyecto de investigación se establecieron las técnicas de extracción de DNA metagenómico y amplificación del gen 16S rRNA para la identificación de las comunidades bacterianas presentes en el sistema de vermicomposteo con residuos orgánicos de ganado vacuno y porcino.

2. Marco teórico

2.1. Residuos

Los residuos se definen en la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) como aquellos materiales o productos cuyo propietario o poseedor desecha y que se encuentran en estado sólido o semisólido, líquido o gaseoso y que se contienen en recipientes o depósitos (SEGOB, 2003).

De acuerdo al reglamento para la prevención y gestión integral de los residuos en el municipio de Tuxtla Gutiérrez (Chiapas, 2005) los residuos se clasifican de la siguiente manera: residuos sólidos (Rs), residuos sólidos urbanos (RSU), residuos hospitalarios (Rh), residuos no compatibles (Rnc), residuos composteables (Rc), residuos orgánicos (Ro), residuos inorgánicos (Ri), residuos potencialmente reciclables (Rpr), residuos no aprovechables (Rna) y los residuos de Manejo especial. (RME).

2.1.1. Residuos sólidos (Rs)

Es cualquier material generado en los procesos de extracción, beneficio, transformación, producción, consumo, utilización, control o tratamiento, cuyo estado no permita usarlo nuevamente en el proceso que lo generó.

2.1.2. Residuos composteables (Rc)

Son aquellos que pueden ser metabolizados por medios biológicos y cuya lista descriptiva, aunque no limitativa, es la siguiente: restos de comida, restos de jardinería, hojas y ramas, madera y frutas y verduras no aptas para consumo humano, susceptibles de ser utilizados como insumo en la producción de composta.

2.1.3. Residuos orgánicos (Ro)

Todo residuo sólido biodegradable, de inmediata descomposición, proveniente de la preparación y consumo de alimentos, de la poda de árboles y áreas verdes, estiércol, entre otros.

2.2. Residuos ganaderos

Los residuos orgánicos ganaderos pueden definirse como aquellos materiales inutilizables, sólidos o líquidos, que resultan de las prácticas ganaderas (cría extensiva o intensiva) (López López & Boluda Hernández, 2008).

2.2.1. Composición

La composición físico-química de los estiércoles y más concretamente, su valoración agronómica medida a través de su riqueza en nutrientes varía en función de numerosos parámetros como son: tipo de ganadería, tipo de alimentación del ganado, edad de los animales, manejo de la granja, etc. (Cuadros, 2007; Sánchez Romero, 2008)

En el cuadro siguiente se muestra la composición del estiércol de algunos animales normalmente ocupados para actividades ganaderas:

Cuadro 2.1. Residuos ganaderos, composición y generación. Tomado de (Cuadros, 2007)

Animal	residuo	Cantidad Kg/día	M. Seca %	M. Mineral %	N total Kg/ton	P ₂ O ₅ Kg/ton	K ₂ O Kg/ton	pH
Vaca	Orina	15	7	3	7	0.05	15	-
	Sólido	30	17	3.5	4	2.3	2	-
	Purín fresco	45	14	3.3	4.5	2	6	6.7
	Purín Líquido	55	10	2.8	3.5	1.6	5	6.9
	Estiércol	-	22	5	4.6	3	6	7.9
Cerdo	Orina	6.7	4	-	4	0.05	13	-
	Heces	3.3	23	-	5	4.5	4.8	-
	Purines	-	5	1.6	4.5	8	9.5	-

2.2.2. Alternativas para el uso de residuos ganaderos

Los residuos ganaderos, adecuadamente manipulados, pueden ser una fuente de agua, nutrientes y materia orgánica para los cultivos. Los principales componentes que pueden tener repercusiones negativas en la aplicación agrícola de los residuos ganaderos son la salinidad, presencia de cobre y cinc y patógenos (Cuadros, 2007).

Las opciones que ofrecen más ventajas desde el punto de vista ambiental para el tratamiento de los residuos agrícolas son las que permiten la recuperación o el reciclaje de los recursos contenidos en ellos. Operaciones de eliminación sin recuperación de energía o el depósito en vertederos suponen una pérdida de recursos naturales y contribuyen, además, a la contaminación ambiental, por lo que se les consideran prácticas no aceptables. De acuerdo con esto, los tratamientos de los residuos agrícolas se clasifican actualmente en función de las operaciones previas de tratamiento, los procesos de transformación aplicados, y el producto final obtenido (López López & Boluda Hernández, 2008) (figura 2.1).

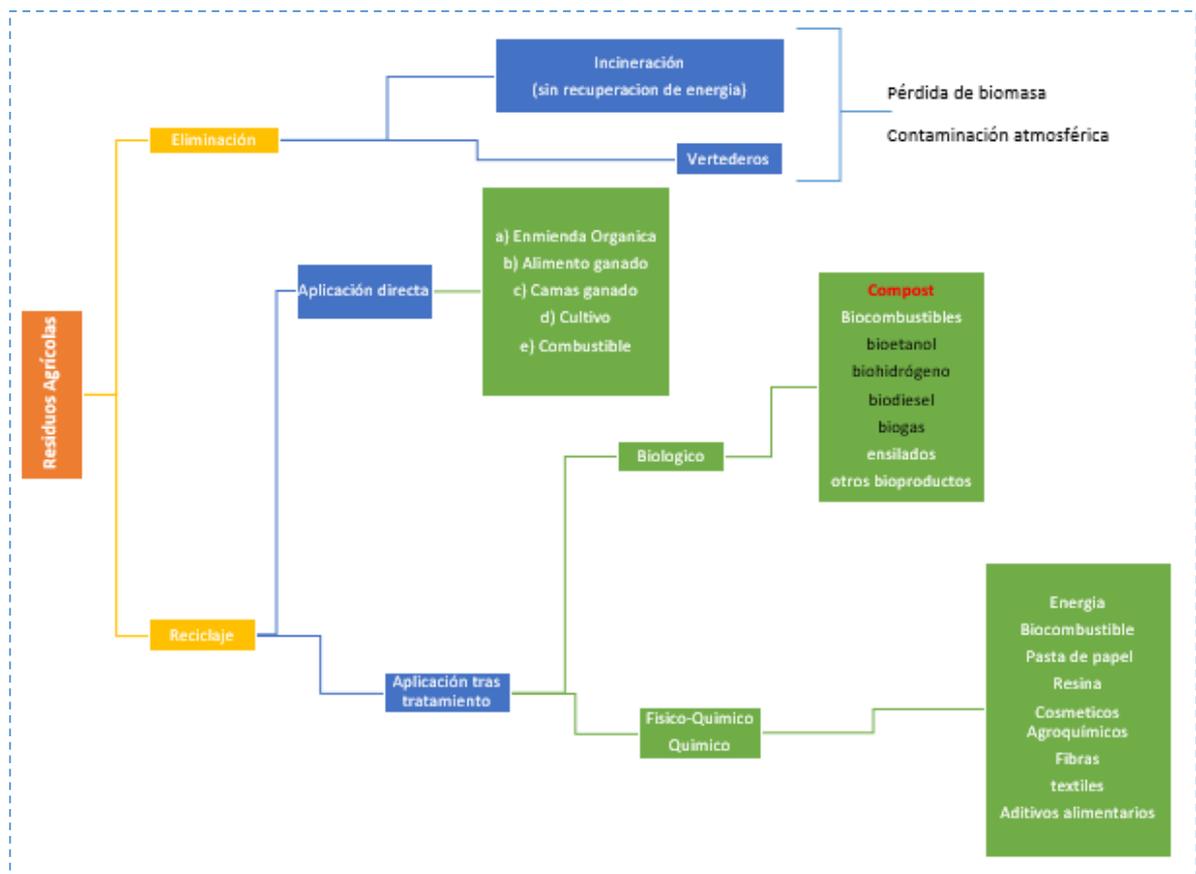


Figura 2.1 Alternativas disponibles para el tratamiento de residuos agrícolas. Fuente (López López & Boluda Hernández, 2008)

El compostaje es una técnica que se utiliza para transformar los residuos sólidos orgánicos en abonos orgánicos (composta y vermicomposta, respectivamente) cuyas características físicas, químicas y biológicas inciden directamente en el mejoramiento del suelo y en el crecimiento de las plantas; sin embargo, durante el proceso, se liberan desechos que agreden al ambiente (Acosta-Durán, Solís-Pérez, Villegas-Torres, & Cardoso-Vigueros, 2013).

2.3. Compostaje

El proceso de compostaje o composteo de los residuos sólidos consiste en la descomposición o fermentación natural de la porción orgánica de los residuos, es decir por la acción biológica de los microorganismos presentes, dando origen a un producto denominado composta. Esta es un producto orgánico estabilizado, cuyas propiedades la hacen particularmente útil como mejorador de la estructura y textura de los suelos y en menor grado como fertilizante vegetal.

La aplicación de este proceso para el tratamiento de los residuos orgánicos ha sido muy utilizado en el mundo. Se aplica principalmente a residuos fácilmente degradables, como el estiércol y residuos vegetales; además se aplica a la fracción orgánica de los residuos de origen urbano. Sus aplicaciones pueden ser tanto a escala doméstica como en el ámbito industrial a mediano y largo plazo.

2.3.1. Principios Básicos

En el composteo, la transformación de la materia orgánica se efectúa por la actividad de diversos microorganismos, tales como actinomicetos, bacterias y hongos, siendo las bacterias las que desempeñan el papel principal.

2.3.1.1. Digestión aerobia

En esta variante biotecnológica, predomina la acción de los microorganismos cuyo metabolismo necesita de oxígeno libre para su subsistencia y desarrollo. Se favorece una mayor oxigenación si la masa de residuos se revuelve en forma manual o por medios mecánicos, obteniéndose como productos principales, materiales orgánicos estabilizados, bióxido de carbono y agua, conforme a la siguiente ecuación:

Materia orgánica + Microorganismos + O₂

→ Composta + H₂O + CO₂ + productos finales oxigenados

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.

2.3.2. Factores que influyen en el proceso de composteo

2.3.2.1. Temperatura

Una considerable cantidad de calor se genera en la fermentación aeróbica de los residuos y es retenida por una propiedad aislante, consecuentemente hay un aumento apreciable de la temperatura en la masa orgánica. Generalmente, en las primeras 24 horas de digestión se alcanzan temperaturas entre 45 y 50°C. Esta temperatura representa el límite superior para los organismos mesófilos y una temperatura de 60 a 70°C, se obtiene después de dos a cinco días. La declinación final de la temperatura es lenta e indica que el material ha sido digerido. Una caída de la temperatura antes de la estabilización de la materia orgánica puede reflejar que empieza la evolución hacia una digestión anaerobia.

Las temperaturas altas son necesarias para la destrucción de los organismos patógenos y las semillas de diversas plantas, con lo cual se obtiene una composta de mejor calidad. La temperatura óptima para la digestión aeróbica varía entre 50 a 70%, siendo probablemente los 60°C, la temperatura más satisfactoria. No es conveniente sobrepasar los 70°C por un período prolongado, debido a que se reduce el número de organismos termófilos que activamente actúan en el proceso de descomposición. Humedad. Es uno de los factores más importantes en el proceso de digestión, ya que si ésta es muy baja, los microorganismos no se desarrollan, y si es excesiva, el agua desplaza el aire al llenar los intersticios, presentándose circunstancias propicias para el desarrollo de condiciones anaerobias. Las investigaciones científicas han concluido que el rango de humedad más favorable es de 40 a 55% para lograr condiciones aeróbicas. Sin embargo, si los materiales a digerir contienen una cantidad importante de paja y materiales fibrosos resistentes, el contenido de humedad puede ser mayor, llegando a soportar hasta un 70 a 75% sin afectar el proceso de descomposición aeróbica.

2.3.2.2. Aireación

La aireación es básica para la descomposición termofílica de los residuos, con el propósito de lograr una rápida transformación sin malos olores. Se han desarrollado varias técnicas para airear los residuos en transformación, pero parece que el método más eficaz para el método de pilas, es el volteo periódico del material. En este proceso de volteo debe tenerse especial cuidado de que las capas exteriores pasen a ocupar el interior de la unidad siguiente, y para ello se utilizan equipos mecanizados. La frecuencia de la aireación o número total de vueltas de la pila de basura en transformación, depende principalmente del contenido de humedad y del tipo de material.

2.3.2.3. Uso de siembras o inoculación

Ha sido ampliamente discutida la necesidad de usar inóculos o siembras, que contengan cepas bacterianas cultivadas en laboratorio para la descomposición de la materia orgánica y la fijación del nitrógeno. Se han empleado diversos inoculantes como son enzimas, hormonas, factores de activación, biocatalíticos, etc. Sin embargo, la mayor parte de los estudios coinciden que no son necesarios.

2.3.2.4. pH

Los estudios y experiencias indican que este factor no tiene gran influencia en el proceso. El pH inicial de materiales digeribles (basura, estiércol, etc.), varía normalmente de 5 a 7, a menos que contengan sustancias alcalinas en exceso.

2.3.2.5. Condiciones climáticas

Las condiciones climáticas influyen en el proceso de composteo son: la temperatura, el viento y la lluvia, fundamentalmente cuando se realiza a la intemperie.

El viento fuerte tiene doble efecto sobre el proceso; baja la temperatura y aumenta la evaporación, y consecuentemente el secado del material, en especial en el frente de la pila que azota el viento.

La lluvia no tiene un efecto importante en el proceso siempre y cuando las pilas o camellones sean redondeados para permitir que el agua escurra por la superficie y el terreno tenga un drenaje apropiado. Si las lluvias son muy densas acompañadas de fuertes vientos logran penetrar de 30 a 40 cm en el material, pero este efecto adverso

se vence por medio de las vueltas sucesivas. Sin embargo no se considera conveniente efectuar el volteo en un momento de lluvia por que el material se humedecerá demasiado, y afectará la aireación (SEDESOL, 2001).

2.4. Vermicomposteo

El vermicomposteo 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, domestica, biosólidos) en un producto orgánico rico en nutrientes y fácilmente asimilable por las plantas (Contreras Blancas, 2012; Chauhan, Kumar, Singh, & Gupta, 2010; P. Garg, Gupta, & Satya, 2006; V. K. Garg, Kaushik, & Dilbaghi, 2006; Kaushik & Garg, 2004; Nagavallemma et al., 2004).

Se define también como un proceso de biooxidación, degradación y estabilización de la materia orgánica, a través de la acción conjunta de algunas lombrices de tierra y microorganismos, mediante el que se obtiene un material final estabilizado, homogéneo, rico en nutrientes y de granulometría fina (Dominguez, 2004).

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 (Contreras Blancas, 2012; Ghandi, Sangwan, Kapoor, & Dilbaghi, 1997; Nagavallemma et al., 2004).

Es una actividad de baja inversión, mínimo riesgo, fácil administración, y alta rentabilidad por los beneficios múltiples que se obtienen (Fernández, Llobregat, Bastidas, & Sien, 2009; Guerrero, 2013; NMX-FF-109-SCFI-2007). Esta técnica tan versátil ofrece una alternativa para el manejo de desechos que se vuelven contaminantes tales como la fibra de coco, pulpa de café, hojarasca, los desperdicios de los restaurantes, de cocinas económicas, así como el excremento del ganado en establos o granjas (Serrano & Borri, 2007).

2.4.1. Materias primas utilizadas en el vermicomposteo

En términos generales, existen tres clases principales de residuos orgánicos apropiados para el proceso de vermicomposteo: residuos de origen animal, residuos de plantas, y residuos urbanos. Entre los diferentes materiales que se han utilizado como sustrato para el desarrollo de lombrices *Eisenia fetida* se destacan los estiércoles de vaca, patos, caballos, cerdos, de aves de corral, conejo y borregos, también se han utilizado residuos de plantas (pastos composteados, recortes municipales, malezas de ríos, de especies vegetales, café molido) y residuos municipales (biosólidos, y sobrantes de restaurantes y supermercados) (Alejandro, 2010; Gunadi & Edwards, 2003).

2.4.1.1. Lombrices de tierra

Las lombrices de tierra son invertebrados y hay cerca de 3600 tipos de lombrices de tierra en el mundo, se dividen principalmente en dos tipos: las excavadoras; y las no excavadoras. Las excavadoras *Pertima elongata* y *Pertima asiatica* viven profundamente en el suelo. Por otro lado, las no excavadoras *Eisenia fetida* y *Eudrilus eugeniae* viven en la capa superior de la superficie del suelo. Las excavadoras son pálidas, de 20 a 30 cm de largo y viven durante 15 años. Las no excavadoras son de color rojo o morado y miden de 10 a 15 cm de largo, pero su vida útil es de sólo 28 meses.

Las lombrices no excavadoras comen 10% de suelo y 90% de residuos orgánicos; estas convierten los residuos orgánicos en vermicomposta más rápido que las lombrices excavadoras. Pueden tolerar temperaturas que varían de 0 a 40 °C, pero la capacidad de regeneración es más efectiva de 25 a 30 °C y con un 40-45% de nivel de humedad en la pila. El tipo de las lombrices de tierra excavadoras llega a la superficie del suelo sólo por la noche. Estas hacen agujeros en el suelo hasta una profundidad de 3,5 m y producen 5,6 kg de yeso al ingerir 90% de tierra y 10% de residuos orgánicos (Nagavallemma et al., 2004).

2.4.1.1.1. *Eisenia foetida*

Se ha usado a la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) por ser extremadamente productiva; vive en grandes densidades; se produce en cautiverio; es muy voraz y acepta todo tipo de desechos orgánicos; respira a través de la piel; cada día come el

equivalente al peso de su cuerpo y el alimento lo desecha en forma de humus mediante 182 conductos. Es muy rustica, debido a que adapta con facilidad a la mayoría de ambientes, siempre y cuando se controlen los factores de pH, humedad y temperatura (Díaz, Cova, Castro, García, & Perea, 2008; García Pérez, 2006; Guerrero, 2013; Pérez Losada, Bloch, Breinholt, Pfenninger, & Dominguez, 2011).

2.4.2. Productos de vermicomposta

2.4.2.1. Vermicomposta

La vermicomposta es un producto de la biodegradación y estabilización de materiales orgánicos por la interacción de lombrices y microorganismos. Es un material parecido a la turba, con alta porosidad, aireación, drenaje, capacidad de almacenamiento de agua y actividad microbiológica, lo cual lo hace un excelente mejorador de suelos. La adición de vermicompost de diferentes fuentes como estiércol de vaca, estiércol de cerdo, desperdicios de alimentos, etc., incrementa la tasa de germinación, el crecimiento y el rendimiento de muchos cultivos de alto valor económico. La vermicomposta contiene reguladores de crecimiento vegetal tales como ácidos húmicos y auxinas, giberelinas y citocininas, los cuales son responsables del incremento en el crecimiento de las plantas y el rendimiento de muchos cultivos (Arancon, Edwards, Dick, & Dick, 2007; Atiyeh, Lee, Edwards, Arancon, & Metzger, 2002). Esos reguladores de crecimiento de las plantas son producidos por la acción de microbios como hongos, bacterias, actinomicetos y lombrices y enriquecen la microbiota del suelo y sirven como bioplaguicida (Domínguez, Gómez-Brandón, & Lazcano, 2010a). El vermicompost proporciona una gran superficie con micrositios para la actividad microbiana y para la retención de nutrientes. Como resultado, muchos nutrientes como nitratos, fosfatos, calcio y potasio intercambiables, están más disponibles para las plantas. Además, la aplicación de vermicompost también suprime el crecimiento de muchos hongos como *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Verticillium*, como resultado, muchas enfermedades de plantas son eliminadas cuando el vermicompost es aplicado en una gran cantidad en el suelo. Algunas veces el vermicompost también controla la población de nemátodos parásitos de plantas (Arancon et al., 2007). Por lo tanto el vermicompost exhibe similares efectos sobre el crecimiento y rendimiento de plantas como el mostrado por

fertilizantes inorgánicos aplicados al suelo o reguladores del crecimiento de plantas y hormonas (Mendoza Hernández, 2010).

2.4.2.2. Té de vermicomposta

La vermicomposta líquido, llamado también té, es un extracto en agua que contiene altos niveles de microorganismos benéficos y nutrientes solubles. En los últimos años ha llamado la atención de productores e investigadores debido a que varios experimentos han indicado que la aplicación de extractos de vermicompost mejoran la sanidad de la planta, el rendimiento y la calidad nutritiva. Los extractos de compost además, pueden suministrar biomasa microbiana y materia orgánica en partículas pequeñas, ácidos orgánicos, reguladores de crecimiento y nutrientes minerales tanto a la planta como al suelo (Arancon et al., 2007; Fayed, 2010; Pane, Celano, Villecco, & Zaccardelli, 2012).

La vermicomposta tanto sólido como líquido contiene sustancias de composición química compleja, auxinas, ácidos húmicos y fúlvicos, órgano-minerales, de alto peso molecular, muy estables, de color negro a café oscuro, con propiedades coloidales e hidrofílicas, que se forman durante el proceso de transformación de la materia orgánica, los cuales estimulan el crecimiento de la planta (NMX-FF-109-SCFI-2007).

La vermicomposta líquida es una alternativa sustentable en la producción de abonos orgánicos, y es efectivo a reducidas concentraciones en las primeras etapas del crecimiento y desarrollo de los cultivos. Se tiene conocimiento de sus beneficios, manifestando sus potencialidades como bioestimulante vegetal en numerosos cultivos, ya que satisface las necesidades nutricionales y es capaz de aportar sustancias de alta actividad biológica inocuas al ambiente (Arteaga et al., 2006).

2.4.3. Características de la vermicomposta

La vermicomposta, en términos generales posee las siguientes características: material de color oscuro con un agradable olor a mantillo de bosque, su gran bioestabilidad evita su fermentación o putrefacción, contiene una elevada carga enzimática y bacteriana que incrementa la solubilidad de los elementos nutritivos, liberándolos en forma paulatina, y facilita su asimilación por las raíces e impide que éstos sean lixiviados con el agua de riego manteniéndolos disponibles por más tiempo en el suelo.

y favorece la germinación de las semillas y el desarrollo de las plantas. Incrementa la superficie activa de las partículas minerales favoreciendo la CIC de los suelos. Favorece e incrementa la actividad biótica del suelo. Su acción antibiótica aumenta la resistencia de las plantas en contra de plagas, enfermedades y organismos patógenos. Se puede utilizar sin inconvenientes en estado natural y se encuentra libre de nematodos. Los ácidos húmicos y fúlvicos que contiene regeneran las características químicas del suelo y, al igual que cierto tipo de hormonas de crecimiento, favorecen el desarrollo de las especies vegetales. Posee un pH neutro. Mejora las características estructurales del terreno, desliga suelos arcillosos y agrega suelos arenosos. Durante el transplante previene enfermedades y evita el choque por heridas o cambios bruscos de temperatura y humedad. Amortigua el efecto de los compuestos químicos aplicados al suelo. Aumenta la retención hídrica de los suelos (4 – 27%) disminuyendo el consumo de agua por los cultivos (Alejandro, 2010; Atiyeh et al., 2002; Canellas, Olivares, Okorokova-Facanha, & Facanha, 2002; Pereira & Zezzi-Arruda, 2003).

Su elevada capacidad de intercambio catiónico (CIC) se debe a la presencia de grupos carbonilos e hidroxilos fenólicos y alcohólicos, entre otros, en su estructura (Alejandro, 2010; Pereira & Zezzi-Arruda, 2004).

La vermicomposta se caracteriza por estar conformada por materiales finamente divididos con gran porosidad, aireación, drenaje y capacidad de retención de humedad. Además presentan una gran área superficial, la cual le permite adsorber y retener fuertemente los elementos nutritivos, los cuales se encuentran en formas que son fácilmente asimilables para las plantas tales como los nitratos, el fósforo intercambiable, potasio, calcio y magnesio solubles. En consecuencia, las vermicompostas pueden tener un gran potencial en las industrias hortícolas y agrícolas como sustrato para el crecimiento de la planta (Alejandro, 2010; Atiyeh, Arancon, Edwards, & Metzger, 2000c; Atiyeh et al., 2000a).

Adicionalmente, las vermicompostas, comparadas con sus materiales originales, tienen reducidas cantidades de sales solubles, mayor CIC, y un creciente contenido de ácidos húmicos totales. También contienen sustancias biológicamente activas tales como reguladores de crecimiento vegetal, que estimulan el crecimiento de las plantas e impiden la proliferación de organismos patógenos (Alejandro, 2010; Atiyeh et al.,

2000c). Por lo tanto, sus propiedades fisicoquímicas y biológicas parecen ser de mejor calidad para el crecimiento de las plantas que las propiedades de los materiales que dan origen a la vermicomposta (Alejandro, 2010; Atiyeh, Domínguez, Subler, & Edwards, 2000b; Gajalakshmi, Ramasamy, & Abbasi, 2001).

Por lo anteriormente señalado, hoy en día se reconoce por diversos autores que el empleo de la vermicomposta en las actividades hortícolas produce en las plantas mejoras significativas en su aspecto, sanidad y rendimiento (Alejandro, 2010; Castillo, Quarín, & Iglesias, 2000).

El principal atributo de un compost para ser usado con seguridad en el suelo, es su alta estabilidad o madurez, lo cual implica entre otras cosas, un estable contenido de materia orgánica y la ausencia de compuestos fitotóxicos y patógenos de animales (Salazar Sosa, Fortis Hernández, Vázquez Alarcón, & Vázquez Vázquez, 2003).

2.4.4. Composición de la vermicomposta

México cuenta actualmente con una norma que determina las características físicas y químicas recomendables para el vermicompost o humus de lombriz, la cual establece los indicadores y sus valores utilizados en la estabilidad del material biodegradado (Cuadro 2.2), el cual debe presentar una coloración café oscuro, sin olor desagradable, suave y seco, con agregados que conforman el producto. Las características anteriores ayudan a aumentar la capacidad de retención de humedad y la porosidad, lo que facilita la aireación, drenaje del suelo y los medios de crecimiento. Además, la norma establece un pH de 5.5 a 8.5, sin embargo, lo mejor es un pH neutro o cercano a 7, y 20 a 40% (NMX-FF-109-SCFI-2007).

Cuadro 2.2. Características químicas y físicas de la Norma Oficial Mexicana NMX-FF-109-SCFI-2007, para humus de lombriz

Característica	Valor
Nitrógeno Total	De 1 a 4 % (base seca)
Materia orgánica	De 20% a 50% (base seca)
Relación C/N	≤20
Humedad	De 20 a 40% (sobre materia húmeda)
pH	De 5.5 a 8.54
Conductividad eléctrica	≤4 dS m ⁻¹
Capacidad de intercambio catiónico	>40 cmol kg ⁻¹
Densidad aparente sobre materia seca	0.40 a 0.90 g mL ⁻¹
Materiales adicionados	Ausente

2.4.4.1. Relación C:N en vermicomposta

En el vermicomposteo se desarrollan eventos físicos, químicos y biológicos que provocan cambios en el material orgánico en cierto periodo de tiempo. Uno de estos cambios es la relación carbono nitrógeno (C/N), la cual generalmente se reduce con el tiempo. La relación C/N es un factor muy importante en el proceso de mineralización de un abono orgánico, ya que los contenidos de C y N son esenciales para la vida y la reproducción de los microorganismos. Los microorganismos necesitan C como fuente de energía y, junto con el N, para la síntesis de proteínas y estructuras celulares. Si la relación C/N excede 25, entonces los microorganismos degradarán la materia orgánica si hay suficiente N disponible para ellos en el medio, causando una inmovilización temporal de ese N. Cuando la relación C/N es baja, por ejemplo menor que 20, la materia orgánica es degradada fácilmente, el N es temporalmente inmovilizado dentro de los microorganismos, pero al morir estos el N se libera al medio. Cuando la relación C/N se encuentra entre 20 y 25 ambos procesos, mineralización e inmovilización estarán ocurriendo aunque en general terminarán liberando N al llegar a un equilibrio determina. Resultado de esto, generalmente durante el vermicomposteo, la materia orgánica y el carbono se reducen debido a la descomposición de la materia orgánica. Mientras que el N generalmente se reduce debido a la pérdida por volatilización de NH_3 , pHs altos o a la absorción de N por las lombrices (Guerrero, 2013).

2.4.5. Factores que afectan la función de las lombrices y el vermicomposteo

En el cuadro 2.3 se resumen los factores que tienen incidencia directa sobre el proceso, también se muestran los valores correspondientes para cada uno de ellos.

Cuadro 2.3 Factores que afectan la función de las lombrices y el vermicomposteo, y valores para su desarrollo. Tomado de (Dominguez & Edwards, 2010b).

Factores de proceso	Valores
Relación de contenido C:N	25:1 a 30:1
Tamaño inicial de partícula	10.20 mm (valores más altos que reducen la velocidad de proceso).
Contenido de humedad	80%- 85% (límites 60% - 90%)
Oxígeno	Las lombrices mantienen condiciones aerobias
Temperatura	15°C-25°C (límites 4 °C-30°C)
pH	>5 y <9
Contenido de amonio	Más bajo: <0.5mg g-1
Contenido de sales	Más bajo: <0.5%
Tamaño de hilera	Cualquier largo y ancho de 50 cm de alto (valores más altos que reducen la velocidad del proceso o lo detienen)
Tamaño de reactor	40 m largo x 2.4 m ancho x 1 m profundidad. Los contenidos se añaden en capas delgadas de 5-10 cm
Patógenos humanos	Muertos después de 70 días de vermicomposteo
Tiempo transcurrido	De 4 a 12 meses en la cama a 30-60 días de continuo sistema de reactor

2.4.6. Importancia del vermicomposteo

Aunque los microorganismos son altamente responsables de la biodegradación de la materia orgánica, las lombrices afectan las tasas de descomposición directamente al alimentarse y digerir la materia orgánica y microorganismos o indirectamente al afectar la represión o estimulación de los microorganismos implicados en el proceso. Por ello, el vermicomposteo implica la biooxidación y estabilización de materiales orgánicos a través de la interacción entre lombrices y microorganismos. Si bien los microorganismos son directamente responsables de la degradación bioquímica de la materia orgánica, las lombrices juegan un papel muy importante en los procesos de fragmentación y acondicionamiento del sustrato, incrementando el área para el crecimiento de los microorganismos y alterando su actividad biológica. Las poblaciones altas de lombrices en el sistema de vermicomposteo resultan en una rápida transformación de la materia orgánica fresca (Aira & Dominguez, 2010; Pandit, Ahmad, & Maheshwari, 2012; Villareal Romero et al., 2010).

2.5. Función de los organismos en el suelo

La mayoría de los organismos del suelo utilizan la materia orgánica o la mineral como fuente de nutrientes y energía. Muchos están especializados en romper la materia orgánica de plantas y animales, dando sustancias simples, inorgánicas, que pueden ser devueltas a la atmósfera o arrastradas con las aguas de drenaje o ser incorporadas al stock de reserva mineral o al complejo arcillo-húmico. Otros organismos establecen relaciones simbióticas con otros organismos vivos, como *Rhizobium*, cianobacterias, micorrizas, etc. Para una buena gestión de los suelos es preciso conocer el hábitat y las costumbres alimentarias de los organismos que lo pueblan para favorecer el desarrollo de los organismos benéficos y reducir la actividad de los dañinos (Sana, 2011).

2.5.1. Microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPR)

En la rizosfera existen gran número de microorganismos que establecen relaciones de simbiosis con las plantas. Estos microorganismos intervienen en el ciclo de algunos elementos minerales como el fósforo, el nitrógeno, el carbono, el hierro, etc y favorecen la nutrición de las plantas. A cambio se aprovechan de los exudados de las raíces en forma de ácidos orgánicos, mucílagos, aminoácidos o azúcares. Los PGPR favorecen el crecimiento de las plantas por diferentes mecanismos: síntesis de fitohormonas (fundamentalmente el ácido indolacético), promocionan el crecimiento de la raíz y la proliferación de los pelos radicales, inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos y producen sustancias quelantes del hierro (sideróforos) que aumentan su absorción por parte de las plantas. Además intervienen en la fijación del nitrógeno (bacterias fijadoras de nitrógeno) y aumentan la absorción de agua y nutrientes y la absorción del fósforo (micorrizas). A estos dos últimos grupos vamos a dedicar un apartado especial por su gran importancia en la vida de las plantas y en el desarrollo de una agricultura más sostenible. Los mecanismos por los que las PGPR controlan los microorganismos patógenos son: la competencia por el nicho ecológico o sustrato, síntesis de compuestos químicos inhibitorios como los sideróforos, los antibióticos y las enzimas líticas destoxificadoras e inducción de resistencia en la planta (Sana, 2011).

2.5.2. Identificación de la comunidad bacteriana

Actualmente existen herramientas moleculares que permiten realizar la ingeniería genética molecular o tecnología del ADN recombinante (Bolívar Zapata, 2004). Con ella es posible el aislamiento, la modificación y la caracterización del ADN de cualquier organismo. Esta tecnología es fundamental para comprender un número importante de procesos biológicos, y para el estudio de la diversidad biológica (Torsvik & Øvreås, 2002).

2.6. El material genético

En las células de todo organismo vivo tenemos dos grandes tipos de macromoléculas biológicas en las que reside la información genética y funcional, mediante la cual la célula viva lleva a cabo sus funciones. El primer tipo de macromoléculas informacionales son los ácidos nucleicos: el DNA y el RNA; el otro tipo de macromolécula informacional son las proteínas.

Hoy sabemos que el ácido desoxirribonucleico (el DNA), es la molécula biológica en la que reside la información genética en todos los seres vivos y que esta molécula se encuentra formando parte de los cromosomas, que a su vez son estructuras que se localizan en el núcleo de las células de animales y vegetales.

Derivado de los primeros trabajos reportados por Mendel (1959) y de Morgan (1910), hoy se conoce que en todos los seres vivos los genes son segmentos de la molécula de DNA presente en cada cromosoma y que los genes están organizados de una manera lineal en los cromosomas, análogamente al arreglo de los segmentos de una cinta que codifica para canciones en un casete musical, donde cada gene corresponde a un segmento de la cinta del DNA que codifica para una “canción biológica”, en este caso, una proteína específica (figura 2.2). Asimismo, se determinó que los genes son responsables de las características físicas de los individuos y que se transmiten, como parte de los cromosomas, de padres a hijos, conforme a reglas predecibles (Mendel, 1959; Morgan, 1910; Morgan, Sturtevant, Muller, & Bridges, 1915).

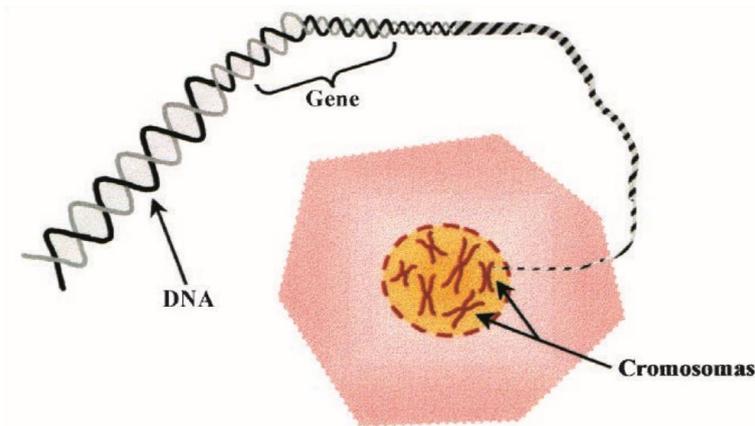


Figura 2.2. Composición y organización de los genes en los cromosomas. Tomado de (Bolívar Zapata, 2004)

Los cromosomas son estructuras celulares que se encuentran localizados en el núcleo de las células y están formados por proteínas y ácido desoxirribonucleico (DNA). La información genética reside en el DNA y los genes son segmentos específicos de esta cinta genética llamada DNA. Es importante recalcar que cada ser vivo tiene un número específico y diferente de cromosomas, con relación a los demás organismos vivos.

2.6.1. Estructura del DNA

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 (Figura 2.3). 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 Na^+ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite. Por otro lado, la carga neta negativa del ADN le permite unirse a moléculas y matrices inorgánicas cargadas positivamente (Cornejo Romero et al., 2014).

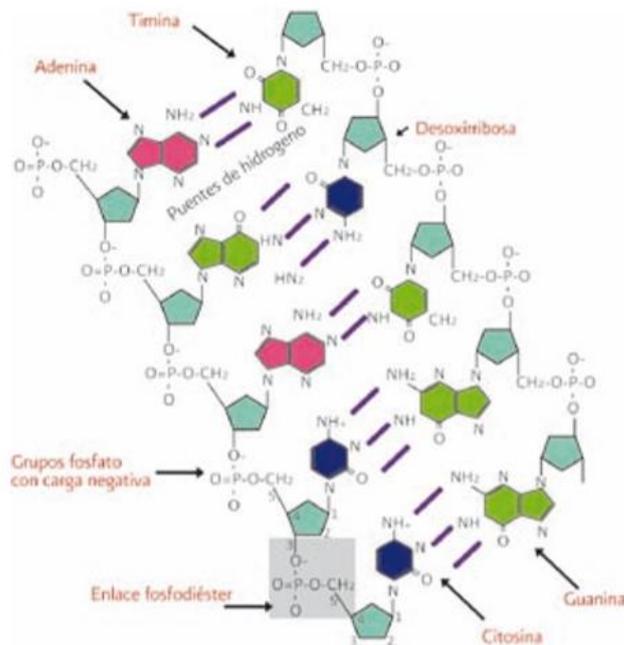


Figura 2.3. Estructura del ADN.

En la estructura helicoidal del ADN, las cadenas se unen por puentes de hidrógeno dos entre adenina y timina, tres entre guanina y citosina. El enlace fosfodiéster que une a cada nucleótido, se forma entre el fosfato (H_3PO_4) que se encuentra en el carbono 5 y el grupo hidróxilo ($-OH$) del carbono 3 de la desoxirribosa. Los grupos fosfato son la parte hidrofílica del ADN y tienen carga negativa. Tomado de (Cornejo Romero, Serrato Díaz, Rendón Aguilar, & Rocha Munive, 2014).

2.7. Protocolos de extracción de ADN

A lo largo del tiempo se han diseñado distintos protocolos con la finalidad de obtener una cantidad y calidad de ADN adecuados, así como garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el tratamiento posterior de la molécula. Los métodos tradicionales, desarrollados en los años 50, utilizan solventes orgánicos para separar a las proteínas del ADN y, una vez suspendido en la fase acuosa, aislarlo por precipitación con etanol. Estos métodos requieren preparar soluciones y la extracción puede tomar desde unas horas hasta varios días por los numerosos pasos que deben realizarse.

2.7.1. Protocolos comerciales

A partir de los años 90 se introdujeron al mercado combos o kits de extracción que utilizan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente capaces de retener

varios microgramos de ADN y separarlos del resto de las biomoléculas, permitiendo obtener un extracto libre de inhibidores. Los combos se venden en presentación de membranas de sílice o perlas magnéticas, las primeras están formadas por una resina y las segundas consisten de un centro de hierro recubierto por resina (Guinn 1966, Dundass et al. 2008). La membrana está insertada dentro de un microtubo de polipropileno y las microesferas se encuentran suspendidas en una solución amortiguadora. Durante la extracción, el ADN cargado negativamente se adsorbe o une a la matriz selectiva de manera reversible y se mantiene unido a ésta durante la remoción de lípidos, proteínas y metabolitos secundarios, posteriormente la molécula se libera de la matriz.

2.7.2. Protocolos tradicionales

En general, los protocolos tradicionales consisten de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN.

2.7.2.1. Homogeneización del tejido

La homogeneización consiste en romper las uniones entre las células para facilitar la interacción con las soluciones de lisis que ayudan a liberar el material genético, puede ser mecánica (con la ayuda de nitrógeno líquido y pistilos u homogeneizadores) y química (agentes químicos).

2.7.2.2. 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 Mg^{2+} e impide el funcionamiento de las DNAsas. 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. Las particularidades del resto de las etapas se explican, a continuación, independientemente para cada uno de los protocolos.

2.7.2.3. Separación de proteínas y lípidos

En esta etapa se separa el ADN de las proteínas y lípidos mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación (Figura 2.1A). 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. 1989). 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 (Stulnig y Amberger 1994). Estos reactivos contaminan fácilmente el ADN, por lo que se debe evitar acarrearlos en el proceso de purificación.

2.7.2.4. Precipitación del 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.

2.7.2.5. Redisolución del ADN

Una vez que se ha eliminado el etanol, el paso siguiente es hidratar el ADN para mantenerlo en solución. En el caso de emplear agua, el pH debe ser de 7 para permitir la redisolución completa del ADN y evitar una hidrólisis ácida. Cuando se utiliza una solución amortiguadora, es preferible utilizar una solución de Tris-HCl a 10mM y EDTA a 0.1M a un pH de 8.0 (low TE) para almacenar el material. Cuando se está disolviendo el ADN es importante evitar el pipeteo y la agitación agresiva pues se pueden fragmentar moléculas de alto peso molecular. Una opción que evita la fragmentación consiste en incubar a 55 °C el ADN, 1 a 2 horas con agitación suave.

2.8. Cuantificación del DNA

Una vez obtenido el material genético, es importante determinar el rendimiento mediante espectrofotometría. La ley de Beer-Lambert indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Cuando la longitud de la celda en que se disuelve el ADN, es de 1 cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica (DO). En el caso de ADN genómico o de doble cadena, una densidad óptica equivale a 50 ug/ml (Leninger 1975). Se debe considerar el factor de dilución para obtener la concentración en nanogramos/microlitro (ng/ul). En el caso de algunos equipos como el espectrofotómetro Nanodrop, no es necesario diluir la muestra y el equipo nos proporciona directamente la concentración en ng/ul. Para estimar la pureza del ADN se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol.

2.9. Comprobación de la integridad del ADN por electroforesis

Además de conocer la cantidad y calidad del ADN por espectrofotometría, es importante conocer si el ADN obtenido está integro. La integridad del ADN se puede observar mediante electroforesis en gel de agarosa. Si el ADN está integro, se debe observar una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó la mezcla de ADN. Si está fragmentado, se observará una banda de más de un cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de la muestra (Figura 2.4).

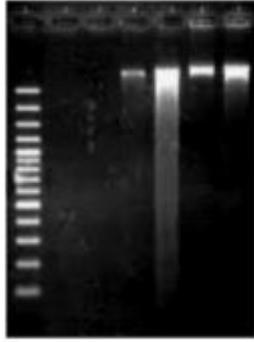


Figura 2.4. Gel de agarosa para visualizar la integridad del ADN.

Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 y 3 vacíos, carril 4 y 7 muestras con poca fragmentación, carril 5 muestra fragmentada, carril 6 muestra íntegra.

2.10. Almacenamiento del ADN

Una vez que el ADN ha sido purificado, cuantificado y analizado mediante electroforesis, una parte de la muestra se puede almacenar a 4 °C para los análisis inmediatos y el material restante a -20 °C o -80 °C, para una preservación por varios meses. En este último caso es conveniente que el ADN se conserve en soluciones con baja concentración de sales (low TE) para inhibir la acción de DNAsas contaminantes.

3. Planteamiento del problema

Las actividades agropecuarias y la mala gestión de los residuos orgánicos tienen un impacto significativo en prácticamente todas las esferas del medio ambiente (incluidos el cambio climático y el aire, el suelo, el agua y la biodiversidad). El impacto del sector agropecuario en el medio ambiente es hoy en día profundo y de largo alcance y continúa creciendo y transformándose velozmente ya que la demanda mundial de insumos alimenticios (carne, leche, etc.) está experimentando un rápido aumento a consecuencia del crecimiento demográfico y la urbanización y es necesario la implementación de nuevas alternativas biotecnológicas como el empleo de insumos orgánicos de una manera sustentable.

4. Justificación

No se conocen los métodos de extracción de DNA metagenómico que permitan la identificación de las comunidades microbianas presentes antes y después del vermicompostaje que puedan tener potencial como bacterias promotoras del crecimiento vegetal y que permitan el incremento de los nutrimentos del suelo.

5. Objetivos

5.1. General

Establecer las técnicas de extracción de DNA metagenómico y amplificación del gen 16S rRNA para la identificación de las comunidades bacterianas presentes en el sistema de vermicomposteo con residuos orgánicos de ganado vacuno y porcino.

5.2. Específicos

- Evaluar diferentes métodos para la extracción de DNA metagenómico de residuos orgánicos de procesos de vermicompostaje.
- Comparar los métodos de extracción e identificar con cuál de ellos se obtienen mejores resultados.

6. Metodología

6.1. Ubicación

El proyecto se realizó en su totalidad en los espacios destinados a investigación que comprende la línea de biotecnología vegetal en el laboratorio de Biología Molecular del Polo Tecnológico Nacional de Pruebas Analíticas en Biocombustibles (figura 6.1) del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (figura 6.2), ubicado en carretera panamericana kilómetro 1080, Terán, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.



Figura 6.1 Instalaciones del Polo Tecnológico Nacional de Pruebas Analíticas en Biocombustibles (toma aérea).



Figura 6.2 Vista frontal panorámica del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

6.2. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 3 repeticiones. Las características de cada uno de los tratamientos se describen en el cuadro 6.1:

Cuadro 6.1 Descripción de los tratamientos empleados en el proyecto

Tratamiento	Descripción
Vaca control	Este tratamiento contiene 200 g de suelo y 100 g de heces de ganado vacuno.
Vaca + lombriz	Este tratamiento contiene 200 g de suelo, 100 g de heces de ganado vacuno y 10 lombrices (<i>Eisenia foetida</i>).
Cerdo control	Este tratamiento contiene 200 g de suelo y 100 g de heces de ganado porcino.
Cerdo + lombriz	Este tratamiento contiene 200 g de suelo, 100 g de heces de ganado porcino y 10 lombrices (<i>Eisenia foetida</i>).

6.3. Materiales

Para la realización de este proyecto se utilizaron los siguientes materiales: tubos eppendorf® de 1.5 mL, tubos Falcon® de 15 mL, micropipetas Transferpette® (0,5-10 µL, 20-200 µL y 100-1000 µL), Puntas de plástico (10 µL, 200 µL y 1000 µL), frascos Pyrex® (0.5 L, 1 L y 2 L), vasos de precipitado Kimax® (0.5 L, 1 L y 2 L), morteros, accesorios de electroforesis y arena (previamente tratada con ácido sulfúrico concentrado para eliminar la materia orgánica).

Las soluciones empleadas fueron las siguientes: pirofosfato de sodio 0.15 M, buffer de fosfato de sodio 0.15 M, EDTA 0.5 M, Tris-HCl 1 M, Lisis I, Lisis II, lisis de Winston y Hoffman, Buffer para Lisozima, Lisozima, acetato de potasio 5 M, PEG 13 %, cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1), buffer TAE 50 ×, Buffer TE × 10 (ver anexo 1 para preparación).

Los equipos utilizados fueron: Autoclave, Balanza OHAUS® Pioneer™ de precisión, Potenciómetro OHAUS® Starter5000™, Centrífuga HERMLE® modelo Z326K, Centrífuga eppendorf® modelo 5810 R, Campana de flujo laminar CHC® biolus™, Vortex Genie® SI™ modelo G650, Micro centrifuga SIGMA-ALDRICH® modelo SD, NanoDrop One ThermoScientific®, Fuente de alimentación PowerPac™ Bio-Rad® y Transiluminador UV 2000 Bio-Rad® (ver anexo 2 para imágenes de equipos).

6.4. Caracterización fisicoquímica

6.4.1. Conductividad eléctrica

La determinación de la conductividad eléctrica (CE) se utiliza normalmente para indicar la concentración total de componentes ionizados en las soluciones. Las sales solubles en el suelo determinan la presencia en solución de una serie de combinaciones de los cationes: calcio, magnesio, sodio, potasio; y de los aniones: carbonatos, bicarbonatos, cloruros, sulfatos, etc. El valor de la conductividad está relacionado con la suma de los cationes (o aniones) y en general tienen correlación con los sólidos totales disueltos.

Para determinar la CE de las muestras se pesaron 10 g de vermicomposta, luego se adicionaron 25 ml de agua destilada y se agitó por 5 mn. Se leyó directamente con la ayuda de un conductímetro. Para las muestras de lixiviado las lecturas de CE se realizaron directamente.

6.4.2. pH

Para determinar el pH de las muestras de vermicomposta se pesaron 10 g de cada una de ellas, se les agregó 10 mL de agua destilada respectivamente y se agitaron para después dejarlas reposar durante 10 minutos. El pH se midió directamente con un potenciómetro. Para las muestras de lixiviado las lecturas de pH se realizaron directamente a las muestras.

6.5. Extracción de ADN metagenómico

La extracción de ADN metagenómico de este proyecto se basó en un protocolo de extracción tradicional, el cual consta de las siguientes etapas:

6.5.1. Preparación de las muestras

Las muestras obtenidas de vermicomposta fueron descongeladas en el laboratorio (figura 6.3), después expuestas al sol para secarse (figura 6.4) y posteriormente se colocó cada una de ellas en mortero para ser maceradas de manera individual (figura 6.5).



Figura 6.3 Muestras de vermicomposta en descongelación.



Figura 6.4 Muestras de vermicomposta en proceso de secado al aire libre.



Figura 6.5 Muestra macerada de vermicomposta.

Se pesaron 0.5 g de cada una de las muestras de vermicomposta seca y macerada, cada una de ellas en tubos Falcon® de 15 mL de capacidad (figura 6.6) y se etiquetaron de acuerdo a las características de cada una de las muestras (figura 6.7).



Figura 6.6 muestra de vermicomposta pesada.

Vc			
L			
Va - Vaca	1	A - Valenzuela	
Ce - Cerdo	2	B - Lisis	
	3	C - Hoffman	
Tipo	Repetición	Método	

Figura 6.7 información de las etiquetas en tubos de vermicomposta

Para la preparación de las muestras de lixiviado se añadió 14 mL del lixiviado procedente de la vermicomposta de ganado vacuno y porcino (figura 6.8) en tubos Falcon® de 15 mL y se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos a 25 °C para formar una pastilla (figura 6.9a). Después, se agregó un volumen adicional de 12 mL y un ciclo de centrifugación más a las mismas condiciones hasta que la pastilla formada fuera similar a la de las muestras con vermicomposta (figura 6.9b) y por último los tubos fueron etiquetados de acuerdo a las características de cada una de las muestras (figura 6.10).



Figura 6.8 Recipientes con lixiviado. El recipiente con tapa azul contiene el lixiviado de vaca y el de tapa roja el de cerdo.

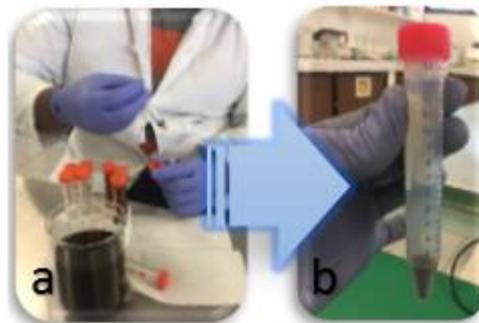


Figura 6.9. Preparación de tubos con muestras de lixiviado. a) Llenado; b) Volumen final.

L			
Va - Vaca	1	A - Valenzuela	
Ce - Cerdo	2	B - Lisis	
	3	C - Hoffman	
Tipo	Repetición	Método	

Figura 6.10 Información de las etiquetas en tubos de lixiviado.

6.5.2. Eliminación de la materia orgánica.

Para la eliminación de la materia orgánica se adicionaron 10 mL de pirofosfato de sodio (0.15 M) a cada uno de los tubos y se agitaron en vortex hasta resuspender la muestra perfectamente (figura 6.11a). Luego se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos a 25 °C y después se eliminó el sobrenadante de cada uno de ellas por decantación. Este procedimiento se repitió hasta que el sobrenadante fue transparente (figura 6.11b).

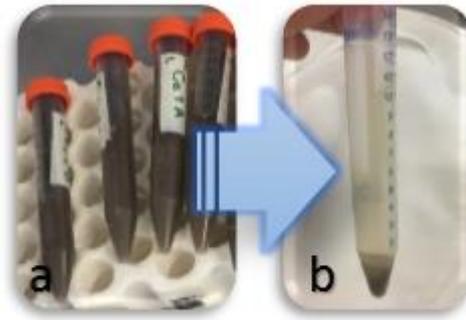


Figura 6.11 Eliminación de la materia orgánica.
a) primer lavado de pirofosfato de sodio; b)
ultimo lavado con pirofosfato de sodio.

6.5.3. Eliminación del exceso de pirofosfato.

Para eliminar el exceso de pirofosfato se adicionaron 10 mL de buffer de fosfatos (pH 8) a cada tubo y se agitaron en vortex hasta resuspender (figura 6.12a). Nuevamente se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos y después se eliminó el sobrenadante de cada uno de ellos por decantación.

Este procedimiento se repitió $\frac{n}{2} + 1$ (donde “n” es el total de lavados hechos con pirofosfato de sodio a cada uno de los tubos) y en algunos casos hasta que el sobrenadante no presentara turbidez (figura 6.12b).

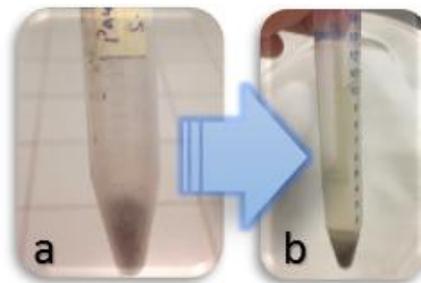


Figura 6.12. Lavados con pirofosfato de sodio.
a) muestra con turbidez; b) muestra lista.

6.5.4. Lisis celular

Para la realización de la lisis celular se emplearon 3 diferentes técnicas modificadas propuestas por distintos autores: Valenzuela-Encinas et al. (2008), Sambrook and Russell (2001) y Hoffman and Winston (1987).

6.5.4.1. Método modificado de Valenzuela-Encinas

Esta metodología constó de agregar 500 µL de solución de lisis I a las muestras y resuspenderlas con ayuda del vortex, después se le agregó 500 µL de solución de lisis II y un volumen de arena estéril en cada una de ellas y se colocaron en el vortex a velocidad máxima por 15 mn.

Las muestras se incubaron dentro de un vaso termico con nitrógeno líquido en su interior por 30 mn y posteriormente se introdujeron al termobañó a 70°C durante 30 mn (para que el choque térmico fuera eficiente se pasaron del termo al termobañó inmediatamente). Luego se centrifugaron a 4000 rpm por 10 mn a 25 °C y se pasó 1 mL del sobrenadante de los tubos Falcon® a tubos eppendorf® nuevos de 1.5 mL.

6.5.4.2. Método de lisis enzimática

En este método a la muestra lavada se le adicionó 1 mL de buffer para lisozima y 80 µL de lisozima (10 mg/mL), se incubó por 1 h a 37°C y después de la incubación se agregó 1 mL de SDS al 10%, 0.5 g de arena estéril y se agitó en vortex durante 15 min. Los tubos fueron centrifugados a 4000 rpm por 10 min a 25 °C y se pasó 1 mL del sobrenadante de los tubos Falcon® a tubos eppendorf® nuevos de 1.5 mL.

6.5.4.3. Método modificado de Hoffman y Winston

Siguiendo esta metodología se agregó 700 µL de solución de lisis de Winston, un volumen de arena estéril y se resuspendió la muestra agitando en vortex durante 15 min. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a 25 °C y se pasó 1 mL del sobrenadante de los tubos Falcon® a tubos eppendorf® nuevos de 1.5 mL.

6.5.5. Eliminación de proteínas y purificación del ADN

Del volumen total de cada uno de los tubos eppendorf® se agregó 1/5 (200 µL) de EDTA (0.5 M, pH 8) y del volumen final, se le adicionó 1/10 (120 µL) de acetato de potasio (5 M, pH 5) y se dejó en incubación por 30 min a 4°C.

Después del tiempo de incubación las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 10 min a 4°C y el sobrenadante (que contiene el ADN) de cada una de las muestras fue transferido a tubos nuevos respectivamente. Para separar el ADN del sobrenadante se agregó 400 µl de la solución cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1) a cada uno de ellos,

se agitaron en vortex a la máxima velocidad y se centrifugaron a 13000 rpm 10 min a 25°C; después se transfirió la fase acuosa de cada uno a tubos nuevos (esta parte se repitió dos veces para evitar llevarse componentes de la fase orgánica o proteínas).

Para precipitar el ADN de la fase acuosa de la segunda extracción con cloroformo:alcohol-isoamílico se agregaron 400 µL de PEG al 13 %, se agitó en vortex y se dejó incubando a -20°C por toda la noche; al día siguiente se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a 4°C y se eliminó cuidadosamente el sobrenadante por decantación (procurando no eliminar la pastilla de DNA). La pastilla fue lavada con 500 µL de etanol al 70% frío, se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a 4°C y del mismo modo el sobrenadante fue eliminado cuidadosamente por decantación. Por último, las muestras se dejaron al aire libre para evaporar los residuos de etanol y para secar la pastilla, para posteriormente poder resuspender el ADN en 50 µL de agua estéril.

6.5.6. Confirmación de la calidad del ADN

Se verificó la calidad del ADN mediante una electroforesis, añadiendo 3 µL de muestra y 2 µL de SYBR Green en un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1×.

6.5.7. “Pool” y cuantificación de ácidos nucleicos en el Nanoespectrofluorómetro

Una vez completadas las extracciones de ADN por los tres métodos a partir de 5 g de muestra, se mezcló el volumen de todas las extracciones en un tubo eppendorf®. Posteriormente se hizo una dilución del DNA en TE 1x (1:200) y se mezcló perfectamente en vortex.

En una placa de Elisa libre de ácido nucleicos se mezclaron 2 µl de PicoGreen® 1× y 2 µl de la dilución del DNA y se leyó en el Nanoespectrofluorómetro.

7. Resultados y discusión

7.1. Resultados de la caracterización fisicoquímica

7.1.1. pH

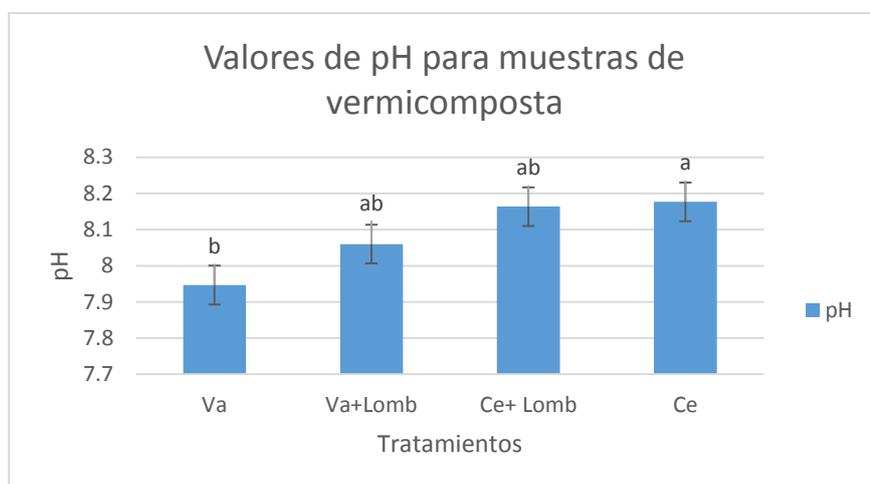


Figura 7.1 Comparación de los valores de pH obtenidos para las muestras de vermicomposta. Para el análisis estadístico se utilizó el método LSD con un 95% de confiabilidad, las letras iguales significan que no hay diferencia estadística significativa. Con una diferencia mínima significativa (dms) de 0.013.

En la figura 7.1 se observan los resultados de las mediciones de pH hechas a las muestras de vermicomposta, se observa que entre las muestras control de vaca y cerdo existe diferencia estadística significativa a comparación de las demás. Se observa que las lombrices en las muestras de vaca ayudaron a aumentar el pH y en el caso de las muestras de cerdo lo disminuyeron, por lo que se piensa que las lombrices ayudan a estabilizar el pH de la vermicomposta.

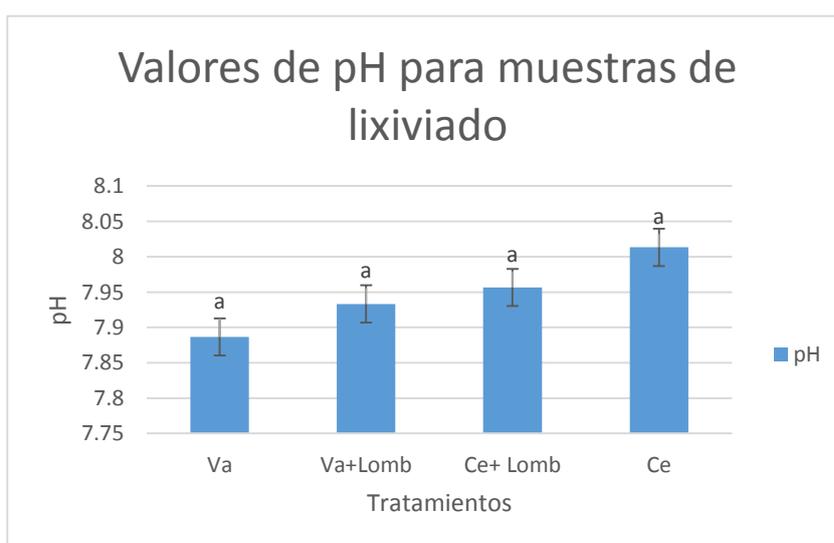


Figura 7.2 Comparación de los valores de pH obtenidos para las muestras de lixiviado. Para el análisis estadístico se utilizó el método LSD con un 95% de confiabilidad, las letras iguales significan que no hay diferencia estadística significativa. Con una dms de 0.05.

En la figura 7.2 se observan los resultados de las mediciones de pH hechas a las muestras de lixiviado, se observa que entre todas las muestras no existe diferencia estadística significativa.

7.1.2. Conductividad eléctrica

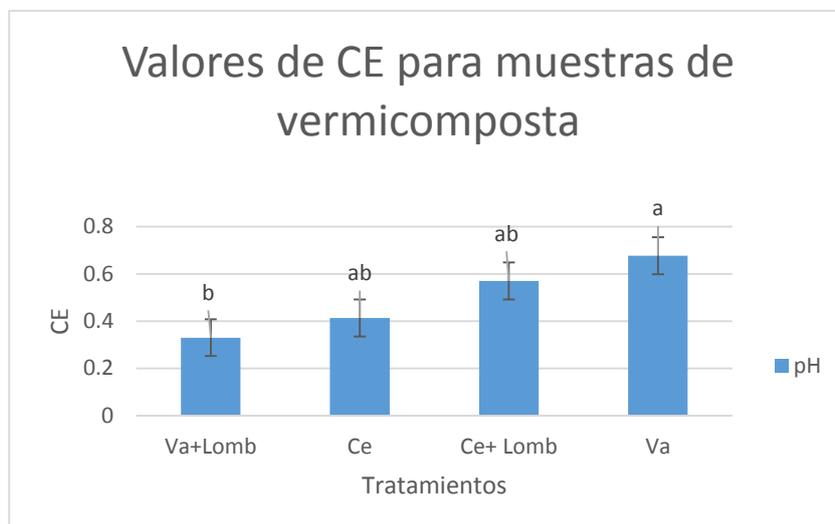


Figura 7.3 Comparación de los valores de CE obtenidos para las muestras de vermicomposta. Para el análisis estadístico se utilizó el método LSD con un 95% de confiabilidad, las letras iguales significan que no hay diferencia estadística significativa. Con una dms de -0.015.

En la figura 7.3 se observan los resultados de las mediciones de CE hechas a las muestras de vermicomposta, se observa que entre las muestras vaca control y vaca más lombriz existe diferencia estadística significativa a comparación de las muestras de cerdo (control y cerdo más lombriz). Se observa que las lombrices en las muestras de vaca disminuyeron el contenido de sales y en el caso de las muestras de cerdo la aumentaron.

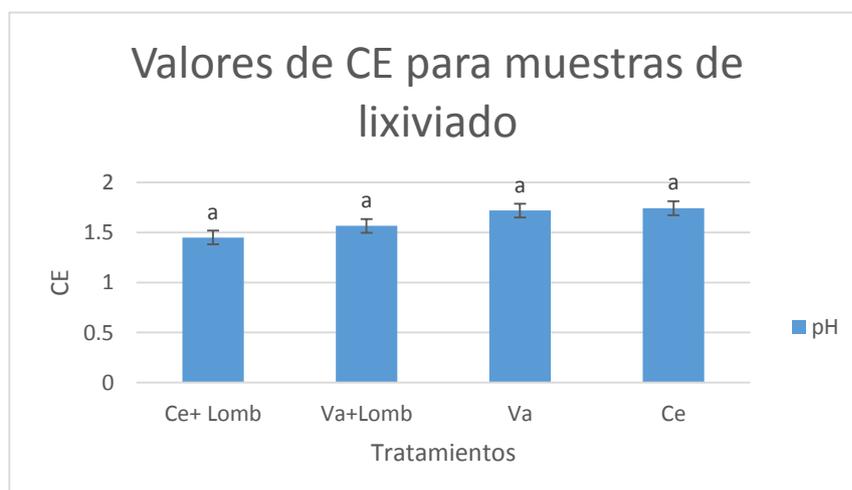


Figura 7.4 Comparación de los valores de CE obtenidos para las muestras de lixiviado. Para el análisis estadístico se utilizó el método LSD con un 95% de confiabilidad, las letras iguales significan que no hay diferencia estadística significativa. Con una dms de -0.29.

En la figura 7.4 se observan los resultados de las mediciones de CE hechas a las muestras de lixiviado, se observa que entre todas las muestras no existe diferencia estadística significativa.

7.2. ADN metagenómico extraído de la vermicomposta

Cuadro 7.1 Concentración y calidad de las extracciones de ADN de las muestras de vermicomposta por 3 diferentes métodos. Las muestras en color rojo indican que son el control.

Método	Muestra	No. (rel)	Presencia en gel de agarosa al 0.8%	Cuantificación en NanoDrop		
				$\left[\frac{ng}{\mu l}\right]$	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Valenzuela – Encinas	Vc Va 1A	1	+	270	1.32	0.33
	Vc Va 2A	2	+	204.6	1.23	0.27
	Vc Va 3A	3	+	554.4	1.12	0.37
	Vc L Va 1A	4	+	101.7	1.34	0.23
	Vc L Va 2A	5	+	156.7	1.34	0.25
	Vc L Va 3A	6	+	560.9	1.27	0.52
	Vc Ce 1A	7	+	191.7	1.55	0.28
	Vc Ce 2A	8	+	349.8	1.49	0.42
	Vc Ce 3A	9	+	237.5	1.44	0.33
	Vc L Ce 1A	10	+	253.2	1.37	0.30
	Vc L Ce 2A	11	+	228.9	1.30	0.31
	Vc L Ce 3A	12	+	421.9	1.14	0.35
Lisis Enzimática	Vc Va 1B	13	+	36.2	1.35	0.31
	Vc Va 2B	14	+	69.2	1.34	0.38
	Vc Va 3B	15	+	76.1	1.42	0.25
	Vc L Va 1B	16	+	55.9	1.32	0.32
	Vc L Va 2B	17	+	29.7	1.45	0.18
	Vc L Va 3B	18	+	44.7	1.47	0.16
	Vc Ce 1B	19	+	36.2	1.41	0.26
	Vc Ce 2B	20	+	41.4	1.50	0.20
	Vc Ce 3B	21	+	31.1	1.45	0.22
	Vc L Ce 1B	22	+	24.5	1.48	0.17
	Vc L Ce 2B	23	+	16.3	1.47	0.16
	Vc L Ce 3B	24	+	27.1	1.40	0.28
Hoffman y Winston	Vc Va 1C	1	x	1.4	5.76	0.04
	Vc Va 2C	2	x	0.8	- 1.89	0.03
	Vc Va 3C	3	x	1.5	1.97	0.06
	Vc L Va 1C	4	x	- 4.5	0.70	- 0.10
	Vc L Va 2C	5	x	- 2.1	0.92	5.30
	Vc L Va 3C	6	x	1.6	4.39	0.06
	Vc Ce 1C	7	x	0.4	- 0.65	0
	Vc Ce 2C	8	x	0	- 0.03	0
	Vc Ce 3C	9	x	1.1	1.20	0.06
	Vc L Ce 1C	10	x	0.6	- 13.65	0.04
	Vc L Ce 2C	11	x	2	1.33	0.10
	Vc L Ce 3C	12	x	1.1	1.67	0.09
	Vc Va 4C	1	x	1.7	0.86	0.21
	Vc L Va 4C	2	x	10	1.28	0.14
	Vc Ce 4C	3	x	1.1	0.98	0.42
	Vc L Ce 4C	4	x	0.6	6.19	0.10

En el cuadro 7.1 se observan los resultados obtenidos de las extracciones de muestras de vermicomposta, empleando 3 diferentes métodos. Los resultados indican que el método menos efectivo para las muestras fue el de Hoffman y Winston (1987), ya que la mayoría de los valores obtenidos en la cuantificación al NanoDrop fueron muy bajos y no hubo fluorescencia alguna al momento de correr las mismas muestras en electroforesis.

Los otros dos métodos (Lisis enzimática y Valenzuela-Encinas) arrojaron resultados favorables para esta investigación; dentro de los mismos cabe destacar que el mejor de ambos fue el propuesto por Valenzuela-Encinas, ya que los valores obtenidos de la cuantificación en NanoDrop fueron los más altos comparado con los resultados de los otros métodos.

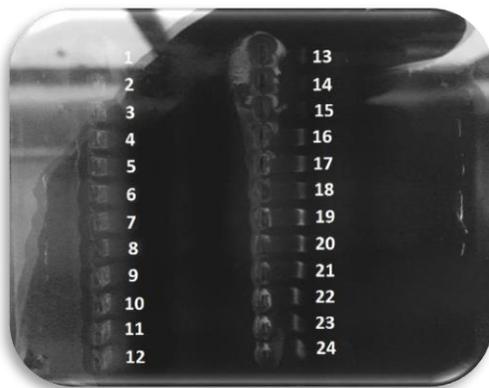


Figura 7.5 Resultados de electroforesis (a). Los carriles del 1-12 son muestras extraídas por el método de Hoffman y Winston, los carriles 13-24 son por el método de Lisis enzimática. En ambas los primeros 6 carriles corresponden a las muestras de vaca (1-3 control y 4-6 vermicomposta más lombriz) y los siguientes 6 a muestras de cerdo (1-3 control y 4-6 vermicomposta más lombriz)



Figura 7.6 Resultados de electroforesis (b). Los carriles de la imagen son muestras extraídas por el método de Valenzuela-Encinas, los primeros 6 carriles corresponden a las muestras de vaca (1-3 control y 4-6 vermicomposta más lombriz) y los siguientes 6 a muestras de cerdo (1-3 control y 4-6 vermicomposta más lombriz)



Figura 7.7 Resultados de electroforesis (c). Repetición de muestras (control y vermicomposta más lombriz) de vaca y cerdo por el método de Hoffman y Winston. Los primeros dos carriles son muestras de vaca y los segundos de cerdo.

En las figuras 7.5, 7.6 y 7.7 se muestran los resultados obtenidos de la electroforesis, en donde la presencia de fluorescencia indica que la extracción se llevó a cabo de manera exitosa. En este caso las únicas que presentaron tal fluorescencia fueron las muestras extraídas por los métodos de lisis enzimática y por Valenzuela-Encinas.

7.3. ADN metagenómico extraído del lixiviado

Cuadro 7.2 Concentración y calidad de las extracciones de ADN de las muestras de lixiviado por 3 diferentes métodos.

Método	Muestra	No. (gel)	Presencia en gel de agarosa al 0.8%	Cuantificación en NanoDrop		
				$\left[\frac{ng}{\mu l}\right]$	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Valenzuela – Encinas	L Va 1A	1	+	137.7	1.57	0.66
	L Va 2A	2	+	244.4	1.44	0.34
	L Va 3A	3	+	218.3	1.52	0.35
	L Ce 1A	10	+	226.5	1.40	0.37
	L Ce 2A	11	+	235.5	1.40	0.35
	L Ce 3A	12	+	329.8	1.42	0.32
Lisis Enzimática	L Va 1B	4	+	104	1.75	0.09
	L Va 2B	5	+	159	1.59	0.12
	L Va 3B	6	+	215.3	1.59	0.16
	L Ce 1B	13	+	32.1	1.44	0.17
	L Ce 2B	14	+	30.8	1.46	0.19
	L Ce 3B	15	+	41.3	1.52	0.20
Hoffman y Winston	L Va 1C	7	+	31.4	1.25	0.37
	L Va 2C	8	+	50.1	1.39	0.19
	L Va 3C	9	+	18.8	1.31	0.29
	L Ce 1C	16	+	60.3	1.37	0.16
	L Ce 2C	17	+	77.5	1.43	0.40
	L Ce 3C	18	+	73	1.32	0.40

En el cuadro 7.2 se observó que los resultados obtenidos de las extracciones de muestras de lixiviado, empleando de igual manera 3 diferentes métodos de extracción. Todos los métodos arrojaron resultados favorables, haciendo una comparación se observa que el método con valores más bajos fue el de Hoffman y Winston (1987). Los otros dos métodos (Lisis enzimática y Valenzuela-Encinas) arrojaron buenas concentraciones de DNA; dentro de los mismos cabe destacar que el mejor de ambos fue el propuesto por Valenzuela-Encinas, ya que los valores obtenidos de la cuantificación en NanoDrop fueron los más altos comparado con los resultados de los otros dos métodos.

Al comparar los resultados de ambas extracciones (vermicomposta y lixiviado) se puede observar que en una de las extracciones hechas por el método de Hoffman y Winston (1987) los resultados fueron benéficos (lixiviado) y en otra no (vermicomposta). Esto puede deberse a que en las muestras de vermicomposta la materia orgánica presentaba restos de paja y al momento de homogeneizar no podía

ser reducida; en cambio, las muestras de lixiviado presentaban un tamaño de partícula mucho menor y totalmente homogéneo.

Los resultados obtenidos indicaron que la concentración y calidad del ADN obtenido puede emplearse para la realización de 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.



Figura 7.8 Resultados de electroforesis (d). Las muestras en cada uno de los carriles son de lixiviado de ganado vacuno, con 3 repeticiones por método de extracción en el siguiente orden: Valenzuela-Encinas, Lisis enzimática y Hoffman & Winston.



Figura 7.9 Resultados de electroforesis (e). Las muestras en cada uno de los carriles son de lixiviado de ganado porcino, con 3 repeticiones por método de extracción en el siguiente orden: Valenzuela-Encinas, Lisis enzimática y Hoffman & Winston.

En la figura 7.4 y 7.5 se muestran los resultados obtenidos de la electroforesis de las muestras de lixiviado, en donde la presencia de fluorescencia en cada uno de los carriles indica que la extracción se llevó a cabo de manera exitosa en todas las muestras.

8. Competencias desarrolladas

Adaptabilidad: Capacidad para permanecer eficaz dentro de un medio cambiante, así como a la hora de enfrentarse con nuevas tareas, retos y personas.

Análisis de problemas: Eficacia para identificar un problema y los datos pertinentes al respecto, reconocer la información relevante y las posibles causas del mismo.

Capacidad crítica: Habilidad para la evaluación de datos y líneas de acción para conseguir tomar decisiones lógicas de forma imparcial y razonada.

Creatividad: Capacidad para proponer soluciones imaginativas y originales. Innovación e identificación de alternativas contrapuestas a los métodos y enfoques tradicionales.

Comunicación verbal: Capacidad para expresarse claramente y de forma convincente con el fin de que la otra persona asuma nuestros argumentos como propios.

Energía: Capacidad para crear y mantener un nivel de actividad adecuado. Muestra el control, la resistencia y la capacidad de trabajo

Liderazgo: Utilización de los rasgos y métodos interpersonales para guiar a individuos o grupos hacia la consecución de un objetivo.

Trabajo en equipo: Disposición para participar como miembro integrado en un grupo (dos o más personas) para obtener un beneficio como resultado de la tarea a realizar, independientemente de los intereses personales

Tenacidad: Capacidad para perseverar en un asunto o problema hasta que quede resuelto o hasta comprobar que el objetivo no es alcanzable de forma razonable.

Sociabilidad: Capacidad para mezclarse fácilmente con otras personas. Abierto y participativo.

9. Conclusión

De acuerdo a los resultados obtenidos de las extracciones hechas y a la comparación de los mismos, podemos concluir que el método que permitió obtener la concentración más alta (560.9 ng/μl) en las muestras de vermicomposta fue el método modificado de Valenzuela-Encinas, comparado con los métodos modificados de Hoffman & Winston y lisis enzimática donde se encontraron valores de 76.1 y 1.6 ng/μl respectivamente. De igual manera en las muestras de lixiviado el método con el que se obtuvo la concentración más alta (329.8 ng/μl) fue el modificado de Valenzuela-Encinas, por lo que de manera general en cuestión de concentración este método es el más recomendado.

Al comparar los valores de la calidad del DNA (en una relación de absorbancias de 260/280 nm) de las muestras obtenidas, se obtuvo que el método de lisis enzimática fue el que proporcionó valores más estables y cercanos al valor óptimo de pureza del ADN ($1.8 A \frac{260}{280}$) en todas las muestras de vermicomposta y de lixiviado.

10. Bibliografía

- Acosta-Durán, C. M., Solís-Pérez, O., Villegas-Torres, O. G., & Cardoso-Vigueros, L. (2013). Precomposteo de residuos orgánicos y su efecto en la dinámica poblacional de *Eisenia foetida*. *Agronomía Costarricense*, 37(1), 127-139.
- Aira, M., & Domínguez, J. (2010). Las lombrices de tierra y los microorganismos: desentrañando la caja negra del vermicompostaje. *Acta zoológica mexicana*, 26(spe2), 385-395.
- Alejandro, M. R. (2010). Origen, importancia y aplicación de vermicomposta para el desarrollo de especies hortícolas y ornamentales: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Alvarez Simán, F. (2010). El sector pecuario en Chiapas, motor del desarrollo. *Universidad Autónoma de Chiapas*.
- Arancon, Q. N., Edwards, C. A., Dick, R., & Dick, L. (2007). Vermicomposting tea production and plant growth impacts. *BioCycle*, 51-52.
- Arteaga, M., Garcés, N., Guridi, F., Pino, J. A., López, A., Menéndez, J. L., & Cartaya, O. (2006). Evaluación de las aplicaciones foliares de humus líquido en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) var. Amalia en condiciones de producción. *Cultivos Tropicales*, 3, 95-101.
- Atiyeh, R. M., Arancon, N., Edwards, C. A., & Metzger, J. D. (2000c). Influence of earthworm-processed pig manure on the growth and yield of greenhouse tomatoes. *Biores Tech*, 75, 175-180.
- Atiyeh, R. M., Domínguez, J., Subler, S., & Edwards, C. A. (2000b). Changes in biochemical properties of cow manure during processing by earthworms (*Eisenia andrei*, Bouché) and the effects on seedling growth. *Pedobiología*, 44, 709-724.
- Atiyeh, R. M., Lee, S., Edwards, C. A., Arancon, N. Q., & Metzger, J. D. (2002). The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Biores Tech*, 84, 7-14.
- Atiyeh, R. M., Subler, S., Edwards, C. A., Bachman, G., Metzger, J. D., & Shuster, W. (2000a). Effects of vermicomposts and composts on plant growth in horticultural container media and soil. *Pedobiología*, 44, 579-590.
- Bolívar Zapata, F. G. (2004). *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna* (Vol. 1). México: El Colegio Nacional.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Okorokova-Facanha, A. L., & Facanha, A. R. (2002). Humic Acids Isolated from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity in Maize Roots. *Plant Physiology*, 130(4), 1951-1957.
- Castillo, A. E., Quarín, S. H., & Iglesias, M. C. (2000). Caracterización química y física de compost de lombrices elaborados a partir de residuos orgánicos puros y combinados. *Agric. Téc. (Chile)*, 60(1), 74-79.
- Contreras Blancas, E. (2012). *Formulación de un biofungicida obtenido del lixiviado de vermicomposta para combatir antracnosis en frutos de *Carica papaya* L.* (Maestría en ciencias en ingeniería bioquímica), Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- Cornejo Romero, A., Serrato Díaz, A., Rendón Aguilar, B., & Rocha Munive, M. G. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Renovables.
- Cuadros, S. (2007). Residuos agrícolas, forestales y lodos. España: Escuela de Organización Industrial.
- Chauhan, A., Kumar, S., Singh, A., & Gupta, M. (2010). Vermicomposting of vegetable wastes with cowdung using three earthworm species *Eisenia foetida*, *Eudrilus eugeniae* and *Perionyx excavatus*. *Nature and Science*, 8(1), 33-43.

- Chiapas. (2005). Reglamento para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos en el Municipio de Tuxtla Gutierrez. from Periodico Oficial del Estado
- Díaz, D., Cova, L. J., Castro, A., García, E. D., & Perea, F. (2008). Dinámica del crecimiento y producción de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida* Sav.) en cuatro sustratos a base de estiércol bovino. *Agricultura Andina*, 15, 39-55.
- Dominguez, J. (2004). State-of-the-art and new perspective on vermicomposting research *Earthworm ecology*: Boca Raton: CRC Press. p.
- Dominguez, J., & Edwards, C. (2010b). Relationships between Composting and Vermicomposting *Vermiculture Technology* (pp. 11-25): CRC Press.
- Domínguez, J., Gómez-Brandón, M., & Lazcano, C. (2010a). Propiedades bioplaguicidas del vermicompost. *Acta zoológica mexicana*, 26, 373-383.
- Fayed, T. A. (2010). Effect of compost tea and some antioxidant applications on leaf chemical constituents, yield and fruit quality of pomegranate. *World Journal of Agricultural Sciences*, 6(4), 402-411.
- Fernández, C., Llobregat, M. J., Bastidas, H., & Sien, B. (2009). Influencia de la *Eisenia foetida* y de Sustratos Orgánicos como Agentes Bioestimulantes en la Biodegradación de un Suelo Contaminado con Petróleo Pesado. *Información tecnológica*, 20, 19-30.
- Gajalakshmi, S., Ramasamy, E. V., & Abbasi, S. A. (2001). Potential of two epigeic and two anecic earthworm species in vermicomposting of water hyacinth. *Bioresource Technology*, 76, 177-181.
- García Pérez, R. E. (2006). La lombriz de tierra como una biotecnología en agricultura. *Universidad Autónoma de Chapingo*, 1, 178.
- Garg, P., Gupta, A., & Satya, S. (2006). Vermicomposting of different types of waste using *Eisenia foetida*: A comparative study. *Bioresource Technology*, 97(3), 391-395. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.009>
- Garg, V. K., Kaushik, P., & Dilbaghi, N. (2006). Vermiconversion of wastewater sludge from textile mill mixed with anaerobically digested biogas plant slurry employing *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(3), 412-419. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.002>
- Ghandi, M., Sangwan, V., Kapoor, K., & Dilbaghi, N. (1997). Composting of household wastes with and without earthworms. *Environ & Ecol*, 15(2), 432-434.
- Guerrero, J. E. (2013). *Caracterización física, química, biológica y valoración agronómica del vermicomposteo de Eisenia foetida obtenido del contenido ruminal de bovino*. (Maestro en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable), Instituto Politecnico Nacional, Michoacán.
- Gunadi, B., & Edwards, C. A. (2003). The effects of multiple applications of different organic wastes on the growth, fecundity and survival of *Eisenia fetida* (Savigny) (Lumbricidae). *Pedobiologia*, 47.
- Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57, 267-272.
- INEGI. (2010). Ganadería. Retrieved from Cuéntame de México website: <http://cuentame.inegi.org.mx/economia/primarias/gana/default.aspx?tema=E>
- Kaushik, P., & Garg, V. (2004). Dynamics of biological and chemical parameters during vermicomposting of solid textile mill sludge mixed with cow dung and agricultural residues. *Biores Tech*, 94, 203-209.
- López López, M. J., & Boluda Hernández, R. (2008). *Residuos orgánicos y agricultura intensiva* (Vol. III): Mundi-Prensa.
- Mendel, G. (1959). *English translation of Mendel's experiments in plant hybridization* (C. P. i. Genetics Ed.). NJ, USA: Prentice-Hall.
- Mendoza Hernández, D. J. (2010). *Vermicompost y compost de residuos hortícolas como componentes de sustratos para la producción de planta ornamental y aromática*.

- Caracterización de los materiales y respuesta vegetal*. . Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Morgan, T. (1910). Sex-limited inheritance in *Drosophila*. *Science*, 32, 120-122.
- Morgan, T., Sturtevant, L., Muller, H., & Bridges, C. (1915). The mechanism of Mendelian Heredity. *H. Holt & Co., New York*.
- Nagavallema, K., Wani, S., Lacroix, S., Padmaja, V., Vineela, C., Rao, B., & Sahrawat, K. (2004). Vermicomposting: recycling wastes into valuable organic fertilizer. *SAT eJournal*, 2(1), 1-16.
- NMX-FF-109-SCFI-2007. *Humus de lombriz (lombricomposta), especificaciones y métodos de prueba*.
- Pandit, N. P., Ahmad, N., & Maheshwari, S. K. (2012). Vermicomposting Biotechnology: An Eco-Loving Approach for Recycling of Solid Organic Wastes into Valuable Biofertilizers. *J Biofertil Biopesticidi*, 3, 1-8.
- Pane, C., Celano, G., Vilecco, D., & Zaccardelli, M. (2012). Control of *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Pyrenochaeta lycopersici* on tomato with whey compost-tea applications. *Crop Protection*, 38, 80-86. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.03.012>
- Peña-Ocaña. (2016). Influencia de la fertilización con fosfato y fosfito sobre el microbioma de un suelo agrícola del estado de Chiapas. *Tesis de Maestría*.
- Pereira, M. G., & Zezzi-Arruda, M. A. (2003). Vermicompost as a Natural Adsorbent Material: Characterization and Potentialities for Cadmium Adsorption. *J. Braz. Chem. Soc*, 14(1), 3947.
- Pereira, M. G., & Zezzi-Arruda, M. A. (2004). Preconcentration of Cd(II) and Pb(II) Using Humic Substances and Flow Systems Coupled to Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Microchimica Acta*, 215-222.
- Pérez Losada, M., Bloch, R., Breinholt, W. J., Pfenninger, M., & Dominguez, J. (2011). Taxonomic assessment of Lumbricidae (Oligochaeta) earthworm genera using DNA barcodes. *European Journal Soil Biology*(48), 41-47.
- Pinos-Rodríguez, J. M., García-López, J. C., Peña-Avelino, L. Y., Rendón-Huerta, J. A., González-González, C., & Tristán-Patiño, F. (2012). Impactos y regulaciones ambientales del estiércol generado por los sistemas ganaderos de algunos países de América. *Agrociencia*, 46, 359-370.
- RAP. (2011). *Diagnóstico del manejo de los residuos de actividades agropecuarias en México*. <http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/132.248.52.100/431/A6.pdf?sequence=6>
- SAGARPA. (2012). México: El sector agropecuario ante el desafío del cambio climático. 1.
- Salazar Sosa, E., Fortis Hernández, M., Vázquez Alarcón, A., & Vázquez Vázquez, C. (2003). Abonos Orgánicos y plasticultura. *Facultad de Agricultura y Zootenia de la UJED, Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo A. C., COCyTED*.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sana, A. V. (2011). Microorganismos del suelo y biofertilización. *Environmenr LIFE Programme*.
- Sánchez Romero, Á. (2008). Elaboración, Caracterización y comparación de abonos orgánicos a base de quinaza y bovinaza. Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander.
- SEDESOL. (2001). Manual Técnico-Administrativo para el Servicio de Limpia Municipal.
- LEY GENERAL PARA LA PREVENCIÓN Y GESTIÓN INTEGRAL DE LOS RESIDUOS, Diario Oficial de la Nación (2003).
- Serrano, V., & Borri, T. (2007). Perspectiva ambiental, lombrices trabajando. *Fundación TIERRA*, 39.
- SIAP. (2013). Estructura de la ganadería en México.

- Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3), 240-245. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00324-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7)
- Valenzuela-Encinas, C., Neria-González, I., Alcántara-Hernández, R. J., Enríquez-Aragón, J. A., Estrada-Alvarado, I., Hernández-Rodríguez, C., . . . Marsch, R. (2008). Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles*, 12(2), 247-254. doi: 10.1007/s00792-007-0121-y
- Villareal Romero, M., Parra Terraza, S., Sánchez Peña, P., Hernandez Verdugo, S., Osuna-Enciso, T., & Basilio Heredia, J. (2010). Cobertura vegetal, vermicompost y actividad microbiana del suelo en la producción de tomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(2), 217-231.

ANEXO 1 SOLUCIONES

En este apartado se muestra el procedimiento para la preparación de los reactivos utilizados en el proyecto:

- a) 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/pulg² por 15 min y almacenar a temperatura ambiente.

- b) Solución buffer de fosfato de sodio 0.15 M pH 8 (para 250 mL).

Pesar 5.17 g de NaH_2PO_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/pulg² por 15 min y almacenar a temperatura ambiente. Esta solución tiene una caducidad de 2 semanas aproximadamente.

- c) EDTA 0.5 M pH 8 (para preparar 1000 mL)

Pesar 186.1 g de EDTA-2 H_2O sal disódica y adicionar a 800 mL de agua destilada. Agitar vigorosamente con una barra magnética y ajustar a pH 8 con 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/pulg² por 15 min y almacenar a temperatura ambiente.

- d) Tris-HCl 1 M (para preparar 1000 mL)

Disolver 121.1 g de Trizma Base en 800 mL de agua destilada. Ajustar a pH 8 (esperar a que la solución se enfríe a temperatura ambiente antes de hacer el ajuste final del pH), Aforar a 1 L y esterilizar por calor húmedo a 15 lb/pulg² por 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

- e) 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/pulg² por 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

- f) 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, 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/pulg² por 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

- g) 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 y almacenar a temperatura ambiente.

- h) 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/pulg² por 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

- i) 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.

j) 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.

k) 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 H₂O destilada y después agregar 32.5 g de PEG y aforar a 250 mL con agua destilada. Esterilizar por calor húmedo a 15 lb/pulg² por 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

l) Cloroformo:alcohol-isoamílico 24:1 (para 100 mL)

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

m) 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/pulg² por 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

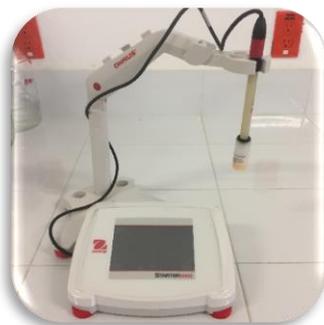
n) Buffer TE × 10 (Tris 100 mM pH 8, 100 mM EDTA pH 8) (para preparar 50 mL)

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/pulg² por 15 min y almacenar a temperatura ambiente.

ANEXO 2 EQUIPOS



Balanza OHAUS® Pioneer™
de precisión



Potenciómetro OHAUS®
Starter5000™



Centrífuga HERMLE® modelo
Z326K



Centrífuga eppendorf® modelo 5810 R



Campana de flujo laminar CHC®
biolus™



Vortex Genie® SI™ modelo G650



Micro centrifuga SIGMA-ALDRICH®
modelo SD



Transiluminador UV 2000 Bio-
Rad®



Fuente de alimentación PowerPac™ Bio-
Rad®



NanoDrop One
ThermoScientific®