



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

**INGENIERÍA BIOQUÍMICA**  
**INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA**  
**PROFESIONAL**

**PROYECTO**

**EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE  
DNA METAGENÓMICO DE LA RIZÓSFERA DE *Moringa oleífera*.**

**PRESENTA:**

**EVELIN RAMÍREZ JIMÉNEZ**

**ASESOR:**

**DR. VÍCTOR MANUEL RUÍZ VALDIVIEZO**

**TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS**

**DICIEMBRE 2016**

## RESUMEN

El presente informe técnico de residencia profesional forma parte del proyecto “Estudio del perfil metabólico de hojas de *Moringa oleífera* fertilizadas con vermicomposta”, en el cual se estudió a nivel invernadero las comunidades microbianas de la rizósfera de *Moringa oleífera* de diferentes tipos de suelo (nativos y agrícolas) provenientes del municipio de la Concordia en el estado de Chiapas, México, con el objetivo de evaluar el efecto de la vermicomposta en éstos y sobre el metaboloma del cultivo orgánico de *Moringa oleífera*, ya que se ha reportado que este material orgánico mejora la calidad del suelo en cuanto a sus características físicoquímicas; a su vez, estas propiedades favorecen el crecimiento de microorganismos capaces de mejorar la fertilidad del suelo, mismos que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas. El estudio del suelo rizosférico es de importancia ya que existe una cantidad significativa de microorganismos no-cultivables (95-99%) por lo que muchas especies bacterianas aún son desconocidas para el hombre. La planta con la que tuvo interacción el suelo colectado fue *Moringa oleífera*, ya que es una fuente y fácilmente disponible de nutrientes esenciales y nutraceuticos, y con características favorables en cuanto a condiciones de crecimiento para el desarrollo del experimento. Para el estudio de las comunidades microbianas se obtuvo DNA metagenómico de muestras de suelo de los días 0, 45 y 90 mediante tres métodos de extracción: Valenzuela-Encinas *et al.* (2008), Lisis enzimática (Griffiths *et al.*, 2000) y Hoffman y Winston (1987). Se evaluó la calidad del DNA extraído por electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó la concentración por nanoespectrofotometría mediante Nanodrop One. Los resultados indicaron que el método de Valenzuela-Encinas permitió obtener un mejor rendimiento en la extracción de DNA seguido del método de Lisis enzimática y Hoffman y Winston, sin embargo, la pureza de lo obtenido es muy baja, la concentración de DNA efectivamente aumentó a través del tiempo pero ya que el desarrollo de la planta mantiene interacción con la rizósfera, se deduce que la tasa de fertilización de vermicomposta no fue la adecuada para el crecimiento de la planta y por lo tanto para el aumento de la comunidad microbiana.

# CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
-------------------------	----

ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
------------------------	----

## CAPÍTULO 1

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes .....	4
2.1 Rizósfera.....	4
2.1.1 Diversidad biológica.....	5
2.1.1.1 Microorganismos rizosféricos promotores de crecimiento.....	6
2.1.1.2 Estructura de las comunidades microbianas de la rizósfera a través del tiempo .....	7
2.1.2 Insumos orgánicos .....	8
2.1.2.1 Efecto de los insumos orgánicos sobre las comunidades microbianas del suelo .....	9
2.1.2.2 Vermicomposta y su efecto en plantas y suelo rizosférico.....	10
2.2 <i>Moringa oleífera</i> .....	11
2.2.1 Condiciones de cultivo.....	11
2.2.1.1 Características del suelo para <i>M. oleífera</i> .....	11
2.2.1.2 Siembra.....	12
2.3 DNA metagenómico .....	12
2.3.1 DNA.....	12
2.3.2 Metagenómica de suelos.....	14
2.3.3 Métodos de extracción de DNA .....	16
2.3.4 Factores que afectan los procesos de extracción de DNA del suelo.....	17
2.3.5 Cuantificación y calidad de ácidos nucleicos .....	18
2.3.5.1 Nanoespectrofotometría .....	18
3. Problemas a resolver.....	20

4. Justificación.....	21
5. Objetivos .....	23

## **CAPÍTULO 2**

6. Metodología .....	24
6.1 Sitio de muestreo .....	24
6.2 Localización del área de estudio.....	25
6.3 Caracterización del suelo .....	25
6.3.1 Humedad.....	26
6.3.2 Capacidad de retención de agua .....	27
6.3.3 Textura .....	27
6.3.4 Conductividad eléctrica.....	28
6.3.5 pH.....	28
6.3.6 Carbón orgánico .....	28
6.3.7 Nitrógeno total .....	29
6.4 Establecimiento del experimento .....	30
6.4.1 Recolección de las muestras .....	30
6.4.2 Eliminación de materia orgánica.....	33
6.4.3 Eliminación de exceso de pirofosfato.....	34
6.5 Obtención de DNA metagenómico .....	35
6.5.1 Método modificado de Valenzuela-encinas <i>et al.</i> (2008).....	35
6.5.2 Método de lisis enzimática (Griffiths et al. 2000) .....	35
6.5.3 Método modificado de Hoffman y Winston (1987) .....	36
6.6 Eliminación de proteínas y purificación del DNA.....	36
6.7 Confirmación de la calidad del DNA .....	37
6.8 Pool y cuantificación de DNA extraído en nanospectrofluorómetro.....	37

### **CAPÍTULO 3**

7. Resultados y discusión.....	39
7.1 Caracterización fisicoquímica de suelos y vermicomposta .....	39
7.2 Extracción y cuantificación de DNA metagenómico .....	42
8. Conclusiones.....	51
9. Competencias desarrolladas .....	52
10. Bibliografía .....	53

### **ANEXOS**

Anexo 1: Soluciones para extracción y purificación de DNA.....	59
--	----

# ÍNDICE DE FIGURAS

## CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Visión general de las interacciones planta-microorganismo que se producen en la rizósfera y en otras áreas del suelo .....	4
Figura 1.2. DNA y sus bloques de construcción .....	12
Figura 1.3. Pares de bases complementarias en la doble hélice del DNA .....	14
Figura 1.4. Esquema general del enfoque metagenómica.....	15

## CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Sitio de colecta suelo nativo Rancho “La Escondida” .....	24
Figura 2.2. Sitio de colecta suelo agrícola Rancho “La Majada” .....	24
Figura 2.3. Representación gráfica de la profundidad de la zona de toma de muestra .	25
Figura 2.4. Unidad experimental.....	30
Figura 2.5. Representación del Diseño de Parcelas Divididas con Bloques Completos Aleatorizados (DBCA) .....	31
Figura 2.6. Obtención de muestra de suelo rizosférico en plantas de <i>Moringa oleífera</i>	32
Figura 2.7. Diagrama de flujo para el análisis de comunidades microbianas en muestras de suelo .....	33
Figura 2.8. Disminución de la materia orgánica mediante n° número de lavados .....	34
Figura 2.9. Muestras de suelo después del lavado con buffer de fosfatos.....	34
Figura 2.10. Nanodrop One.....	38

## CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Pirámide de textura adaptada de Saxton y Rawls por Manzano Gómez (2015) .....	42
Figura 3.2. Geles de electroforesis con DNA de suelo rizosférico para el día 0 de muestreo .....	43

Figura 3.3. Geles de electroforesis con DNA de suelo rizosférico para el día 45 de muestreo .....	44
Figura 3.4. Geles de electroforesis con DNA de suelo rizosférico para el día 90 de muestreo .....	45
Figura 3.5. Ejemplo de muestras en gel de agarosa con background .....	46
Figura 3.6. Rendimiento de extracción de DNA para diferentes días de muestreo en dos tipos de suelo diferentes .....	48

# ÍNDICE DE TABLAS

## CAPÍTULO 2

Tabla 2.1. Parámetros evaluados en muestras de suelo y vermicomposta .....	26
Tabla 2.2. Ejemplo de la elaboración de un pool de DNA metagenómico para futuros análisis .....	38

## CAPÍTULO 3

Tabla 3.1. Caracterización de muestras de suelo y vermicomposta .....	41
Tabla 3.2. Evaluación de los rendimientos de extracción de DNA empleando tres metodologías de extracción .....	47

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

La agricultura orgánica es una pequeña rama de la actividad económica que está adquiriendo creciente importancia en el sector agrícola de algunos países, independientemente de su nivel de desarrollo. Por ejemplo, en varios países desarrollados ha llegado a representar una parte significativa del sistema alimentario, el 20% por ejemplo, en Estados Unidos, Francia, Japón y Singapur. Algunos países en desarrollo tienen pequeños mercados orgánicos internos y unos cuantos han empezado a aprovechar las lucrativas oportunidades de exportación que ofrece la agricultura orgánica, en México con especial atención a la producción del café (FAO, 2010).

En el sistema de agricultura orgánica son fundamentales las prácticas de enriquecimiento de los suelos, ya que se mejora la salud del agroecosistema, y en particular la biodiversidad, los ciclos biológicos, y la actividad biológica de los mismos (SAG, 2007). Una alternativa que los beneficia es el uso de insumos orgánicos, que presentan parte del N en formas orgánicas, que paulatinamente van mineralizándose y pasando a disposición de las plantas. En este mismo sentido, se indica que la fertilización orgánica sustituye en gran medida el uso de fertilizantes minerales mejorando su estructura, propiciando sistemas más estables (Ramos *et al.*, 2014). Los insumos orgánicos influyen favorablemente sobre las características físicas del suelo (Trinidad Santos, 2010). Dentro de la producción de estos insumos están los lodos residuales, las compostas y las vermicompostas, éstas contienen una elevada carga enzimática y bacteriana que incrementa la solubilidad de los elementos nutritivos, y facilita su asimilación por las raíces; favorece la germinación de las semillas y el desarrollo de las plantas. También se ha demostrado que puede incrementar la superficie activa de las partículas minerales favoreciendo la capacidad de intercambio catiónico de los suelos (Sosa Torres, 2012), lo que resulta en un incremento de la actividad biológica.

Los microorganismos influyen en muchas propiedades del suelo y también ejercen efectos directos en el crecimiento de las plantas, repercutiendo en el mejoramiento de la estructura del suelo por la actividad que ejercen los productos de la descomposición sobre las partículas del suelo.

La biodiversidad de microorganismos dentro de éste es importante para el mantenimiento de los nutrientes del mismo, debido a que estos están involucrados en muchas funciones vitales como ciclos cruciales de C, N, P, formación de suelo, la eliminación de toxinas, y así sucesivamente. Los microorganismos del suelo que se encuentran en la zona de la raíz impactan en su crecimiento y desarrollo, pero el potencial para aprovechar esta gran cantidad de beneficios hay un obstáculo producido por la abundancia y diversidad de los factores que influyen en las características de las plantas deseables (Hernández León *et al.*, 2010).

El conocimiento de la estructura microbiana y funciones (que participan en los principales ciclos de nutrientes) que ocasiona la vermicomposta es importante para predecir su impacto sobre la fertilidad del suelo (Vivas *et al.*, 2009). Hasta la fecha, la diversidad estructural y funcional de las comunidades microbianas han sido estudiados por métodos convencionales en Microbiología, por ello es necesario el empleo de técnicas de Biología Molecular que permitan estudiar la diversidad microbiana sin cultivo.

Para el estudio de la comunidad microbiana, se han adoptado técnicas independientes del cultivo. Estas técnicas emplean métodos basados en la biología molecular, en el que el DNA del suelo extraído se somete a amplificación por PCR. Estos métodos proporcionan una visión única de la diversidad, la composición y estructura de la comunidad microbiana, es decir, riqueza y uniformidad de especies. Cabe mencionar, que cuando una planta se estudia conjuntamente con su microbioma en ciertos lapsos de tiempo las interacciones se pueden observar entre ella y los microorganismos que ayudan en su desarrollo. En los agroecosistemas, los microorganismos que habitan los suelos son elementos importantes en el funcionamiento de los mismos. Muchos microorganismos en los diferentes ecosistemas no pueden cultivarse, y se calcula que representan el

mayor porcentaje de los organismos presentes (Cordero *et al.*, 2012). Este hecho representa una gran limitación en el estudio de la diversidad biológica de la rizósfera.

La necesidad de identificación de la comunidad microbiana del suelo depende principalmente de la extracción directa de ADN a partir del suelo, un entorno de múltiples facetas, que es un grupo importante de la diversidad genética microbiana. Los procedimientos de extracción de ADN del suelo por lo general sufren de dos problemas principales, a saber, ruptura inadecuado de las células y la contaminación con sustancias húmicas (Faria *et. al* 2014). Por lo tanto, se requiere un método mejorado para la extracción de ADN de suelo que permita ruptura eficaz de células microbianas y disminuir simultáneamente la contaminación de los materiales orgánicos de una manera fácil y rentable.

El suelo es un factor importante que define el contenido de nutrientes y los rendimientos de las cosechas. Dania *et al.* (2014) mostraron que cuando se aplican fertilizantes exclusiva o en combinación con otros resultan diferentes composiciones de nutrientes en diferentes partes de la planta.

Ante el panorama de una agricultura orgánica sostenible para poder aumentar y mejorar la producción de alimentos se han propuesto algunas plantas con características altamente nutritivas, entre ellas se encuentra la Moringa (*Moringa oleífera*), que se originó en las estribaciones del Himalaya en noroeste de la India y se cultiva en todo el trópico (Dania *et al.*, 2014); ésta planta tiene un gran potencial para su cultivo en México así como en muchas partes de América tropical por su combinación singular de propiedades (Esquivel Cote *et al.*, 2013). *M. oleífera* puede crecer en regiones tropicales o subtropicales en el mundo a una temperatura aproximada de 25-35°C; requiere suelo arenoso o arcilloso. (Gopalakrishnan *et al.*, 2016). Por lo tanto el establecimiento de diferentes métodos de extracción de DNA metagenómico de suelo rizosférico permitirá la identificación molecular de los microorganismos asociados a la rizósfera del cultivo de *Moringa oleífera* con potencial como promotores de crecimiento o biofertilizantes.

## **2. ANTECEDENTES**

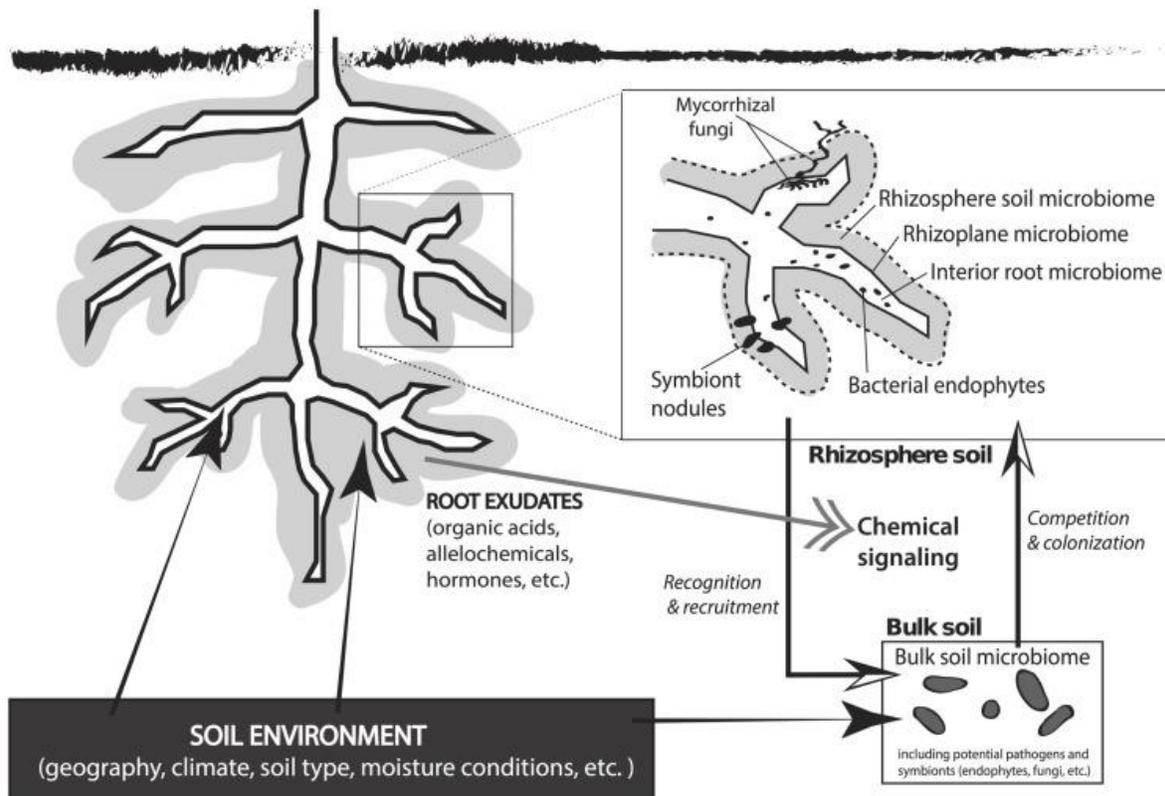
### **2.1 RIZÓSFERA**

El suelo es considerado un espacio heterogéneo y complejo definido por sus propiedades físicas, químicas y biológicas, que bajo condiciones naturales tiende a desarrollar un equilibrio dinámico entre sus diferentes atributos, lo que genera las condiciones adecuadas para una diversidad de organismos transformadores y descomponedores de sustratos (Reyes & Valery, 2007). El suelo es un recurso viviente y dinámico que condiciona la producción de alimentos.

Existe una amplia gama de interrelaciones entre especies de microorganismos en los ecosistemas, tales como sinérgicas, antagónicas, de competencia física y bioquímica, moduladas por múltiples y complejos factores bióticos y abióticos.

La rizósfera está definida como el volumen de suelo adyacente a las raíces de la planta que forma un microhábitat densamente poblado. La rizósfera es química, física y biológicamente compleja, diversa y en ella ocurren interacciones dinámicas entre las raíces de la planta, y la (micro) biota y condiciones fisicoquímicas del suelo. En la rizósfera, las bacterias llevan a cabo actividades tal como la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, promotor del crecimiento vegetal, es decir, los microorganismos actúan como biocontroladores. Estas interrelaciones entre microorganismos inciden en la interacción suelo-planta-microorganismos-ambiente y repercuten, de forma directa, en el crecimiento y en el desarrollo de las especies vegetales (Cano, 2011). Hiperdensidad e hiperdiversidad son los dos aspectos fundamentales que caracterizan a las comunidades microbianas del suelo. La rizósfera es un nicho ecológico único que da forma a la estructura de la comunidad microbiana a través de las interacciones de las especies de plantas, exudados de las raíces, las propiedades del suelo, y muchos otros factores. Las sustancias orgánicas liberadas de raíces pueden apoyar a una alta biomasa microbiana y mayor actividad metabólica, por lo tanto,

el conjunto de las comunidades microbianas son más activas y distintas en la rizósfera en comparación con otras áreas del suelo (Li *et al.*, 2014) (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Visión general de las interacciones planta-microorganismo que se producen en la rizósfera y en otras áreas del suelo (Coats & Rumpfo, 2014).

### 2.1.1 Diversidad biológica

Los microorganismos son responsables de una parte importante de los ciclos biogeoquímicos, y por lo tanto, influyen significativamente en la vida terrestre. Sin embargo, nuestro conocimiento de la vida microbiana, y el papel que ésta juega en el ambiente, es todavía poco entendido.

En la rizósfera, las bacterias son los microorganismos más abundantes y con mayor actividad de éstos (Vital López *et al.*, 2015). La diversidad de los microorganismos asociados a la rizósfera de diferentes especies vegetales en los suelos, en México se ha estudiado poco y se ha abordado de manera

convencional, con técnicas microbiológicas limitadas debido al elevado porcentaje de microorganismos no cultivables (95-99%) (Cordero *et al.*, 2012).

Todas las plantas mantienen una interacción directa con los microbios del suelo en la rizósfera, que es el compartimento del suelo que rodea la raíz en el que los exudados de raíces de las plantas influyen directamente en la estructura y función de la comunidad microbiana del suelo. La cantidad de microorganismos en un gramo de suelo puede variar entre  $10^7$  y  $10^9$  células, mientras que algunas estimaciones indican la posibilidad de que haya al menos  $10^4$  especies microbianas distintas por gramo de suelo (García de Salamone, 2011). La densidad y diversidad de microorganismos son susceptibles a variar dependiendo de la especie vegetal, edad y estado nutricional de la planta, de las características físico químicas del suelo, de su manejo y de las condiciones ambientales (Marschner *et al.*, 2005).

#### **2.1.1.1 Microorganismos rizosféricos promotores de crecimiento**

Los microorganismos del suelo son fundamentales para los procesos terrestres, jugando un papel importante en varios ciclos biogeoquímicos, contribuyendo a nutrición de las plantas y la salud del suelo (Mocali *et al.*, 2010).

La fertilidad de un suelo está basada en su capacidad para suministrar los nutrientes necesarios para el desarrollo de las plantas; en ello juega un papel importante la comunidad microbiana que participa activamente en la captación de nutrientes y en la mineralización de la materia orgánica.

Las bacterias asociadas con la rizósfera de las plantas son capaces de generar varios mecanismos por los cuales afectan positivamente su crecimiento y desarrollo, sin embargo, estas capacidades no han sido estudiadas ampliamente; estas bacterias son capaces de estimular el desarrollo de las plantas de manera directa e indirecta especialmente con las raíces de las plantas. Se ha sugerido que las bacterias fijadoras de nitrógeno son el grupo de microorganismos más importantes presentes en la rizósfera del suelo, debido a que esta clase de

bacterias pueden establecer relaciones muy específicas con las plantas y de esta manera evitar la competencia con toda la microflora presente en el suelo; asimismo, son conocidos como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, conocido por sus siglas en inglés PGPR (“*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*”), fue propuesto para describir a las bacterias que habitan la rizósfera de las plantas y que pueden tener un efecto positivo sobre los cultivos (Kloepper & Schroth, 1978) y pueden ser empleados como biofertilizantes en cultivos. Teniendo en cuenta las características de este tipo de bacterias, se han realizado investigaciones para identificar y utilizar aquellas que actúen como biofertilizantes benéficos para las plantas. Los efectos directos de las PGPR son: la síntesis de fitohormonas, producción de sideróforos, solubilización de minerales y la fijación del nitrógeno atmosférico entre otros (Hernández Rodríguez *et al.*, 2006).

#### **2.1.1.2 Estructura de las comunidades microbianas de la rizósfera a través del tiempo**

La densidad y diversidad de microorganismos son susceptibles a variar dependiendo de la especie vegetal, edad y estado nutricional de la planta, de las características físico químicas del suelo, de su manejo y de las condiciones ambientales al paso del tiempo (Adeboye *et al.*, 2006). Ramos y Zúñiga (2008) reportaron que la actividad microbiana depende en gran manera de la temperatura y el pH que haya en el suelo; y que mejora significativamente con el incremento de la humedad. Además, muchas de las relaciones que establecen los microorganismos del suelo pudieran beneficiar a la planta cuando ocurren en la zona próxima a sus raíces (rizósfera). Se estima que los exudados rizosféricos pueden llegar a contener entre 10 y 44% del carbono asimilado y otra serie de compuestos, influyendo selectivamente en el crecimiento de microorganismos que colonizan la rizosfera al alterar la química de los agregados del suelo y, simultáneamente, las poblaciones microbianas rizosféricas cambian la composición generalmente aumentando su densidad poblacional y cantidad de

exudados de raíz a través de su efecto sobre la nutrición de las plantas (Reyes & Valery, 2007). Se ha encontrado que las densidades bacterianas y fúngicas presentes en esta zona de directo intercambio con la planta pueden llegar a ser entre 10 y 50 veces más grandes que en el suelo no rizosférico (Reyes *et al.*, 2006)

Además, el suelo afecta la composición de la comunidad microbiana basada en la influencia textural en los microhábitats adyacentes a las raíces de las plantas donde en las comunidades de suelos de textura gruesa (franco arenosa) son claramente diferentes de los que se desarrollan en suelos de textura fina (limo arcilla arenoso). Por lo tanto, la influencia de diferentes plantas y su desarrollo está mediada por el suelo, además de la adaptabilidad relativa de los grupos microbianos a las alteraciones en los microhábitats, lo que hace que estas interacciones complejas en la descripción de las comunidades microbianas del suelo presentes en las comunidades vegetales, tales como áreas ocupadas por malas hierbas a diversas densidades.

En términos microbianos, la diversidad estructural describe el número de diferentes tipos (especies) y su abundancia relativa en una comunidad dada en un hábitat dado. La diversidad funcional se refiere a la aparición y distribución de rasgos fisiológicos y metabólicos entre los miembros de la comunidad y puede clasificarse en diferentes grupos funcionales (Kremer, 2014).

### **2.1.2 Insumos orgánicos**

De acuerdo a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), los insumos orgánicos son todos aquellos residuos de origen animal y vegetal de los que las plantas obtienen importantes cantidades de nutrimentos; el suelo, con la descomposición de estos abonos, se ve enriquecido con carbono orgánico y mejora sus características físicas, químicas y biológicas (Trinidad Santos, 2010). Por las características en su composición son formadores de humus y enriquecen al suelo con este componente, modificando

algunas de las propiedades y características del suelo como su pH, cargas variables, capacidad de intercambio iónico, disponibilidad de fósforo, calcio, magnesio y potasio, y desde luego la población microbiana, haciéndolo más propio para el desarrollo y rendimiento de los cultivos.

#### **2.1.2.1 Efectos de los insumos orgánicos sobre las comunidades microbianas del suelo.**

Aunque los insumos orgánicos constituyen un pequeño porcentaje del peso de la mayoría de los suelos (generalmente del 1% al 6%), la cantidad y el tipo de materia orgánica influyen en casi todas las propiedades que contribuyen a la calidad del suelo. La cantidad y calidad de esta materia puede cambiar las propiedades del suelo, mientras la estructura y disponibilidad de los nutrientes puede mejorar, consecuentemente, las diversas funciones de la materia orgánica pueden agruparse por su efecto en las propiedades físicas, químicas o nutricionales y biológicas. Se presenta una estimulación en el crecimiento de las raíces de la planta; un suelo con alto contenido de materia orgánica de distinto origen tenderá a tener una comunidad más diversa de organismos y de este modo brinda un medioambiente biológico más adecuado para el crecimiento de las plantas que un suelo con menor cantidad de materia orgánica.

En el proceso de compostaje acontece la transformación microbiana de la materia orgánica bajo condiciones controladas: en los primeros días ocurre un ligero incremento de la temperatura que va de 20 a 45°C, producto de la descomposición de azúcares (fase mesofílica), que puede alcanzar posteriormente temperaturas de 55 a 70°C (fase termofílica) durante la degradación de la celulosa, en la que ocurre la disminución de la población microbiana (Artavia *et al.*, 2010).

### **2.1.2.2 Vermicomposta y su efecto en plantas y suelo rizosférico**

El vermicompostaje es una técnica de biotecnología que involucra la biooxidación y estabilización del material orgánico por la acción de lombrices que aerean, acondicionan y fragmentan el sustrato y por microorganismos que degradan bioquímicamente la materia orgánica.

De acuerdo a lo reportado por (Pereira *et al.*, 2013) las ventajas del uso de vermicomposta comprenden:

- (i) Fácil adquisición
- (ii) Bajos costos
- (iii) Ventajas estructurales, químicas y biológicas responsables de la capacidad de adsorción, así como la degradación de contaminantes
- (iv) Biocontrol

La vermicomposta contiene una elevada carga enzimática y bacteriana que incrementa la solubilidad de los elementos nutritivos, y facilita su asimilación por las raíces; favorece la germinación de las semillas y el desarrollo de las plantas. Incrementa la superficie activa de las partículas minerales favoreciendo la capacidad de intercambio catiónico de los suelos (Sosa Torres, 2012), lo que resulta en un incremento de la actividad biológica.

Se ha demostrado que la adición de la vermicomposta a los suelos y sustratos de cultivo incrementa considerablemente el crecimiento y la productividad de una gran cantidad de cultivos (Gutiérrez Miceli *et al.*, 2007); los ácidos húmicos y fúlvicos que contiene regeneran las características químicas del suelo, y al igual que algunas hormonas de crecimiento, favorecen el desarrollo de las especies vegetales.

## **2.2 *Moringa oleífera***

*Moringa oleífera* L. es un miembro de la familia *Moringaceae*, que incluye 13 especies de árboles., originaria de la India y Pakistán, que crece de forma natural en la altura moderada. En la actualidad, las plantas de moringa son ampliamente cultivadas en el Medio Oriente, África y Asia meridional como un cultivo de usos múltiple (Nouman *et al.*, 2016). La planta posee la característica de crecer en regiones tropicales o subtropicales en el mundo a una temperatura aproximada de 25-35°C; requiere suelo arenoso o arcilloso con un pH ligeramente alcalino ligeramente ácido a una precipitación y neto de 250 a 3000 mm (Gopalakrishnan *et al.*, 2016)

### **2.2.1 Condiciones de cultivo**

La moringa requiere de suelos francos-francos arcillosos. No tolera los arcillosos o vertisoles ni los de mal drenaje. La planta se adapta a suelos duros o pesados y también a suelos pobres franco arenosos. El terreno donde se planta debe poseer buen drenaje, ya que esta planta no soporta el encharcamiento. Tolerar terrenos ácidos, con pH hasta de 6.5. Es resistente a largos períodos de sequía y crece bien en condiciones áridas y semiáridas (Padilla *et. al*, 2012).

#### **2.2.1.1 Características del suelo para *M. oleífera***

La planta de *M. oleífera* puede crecer en todo tipo de suelos duros o pesados, suelos con poca capacidad de retención de humedad y hasta en aquellos que presentan poca actividad biológica, tolera suelos arcillosos, pero no

encarhamientos prolongados; puede crecer en suelos ácidos y alcalinos (Interiano Santos, 2015).

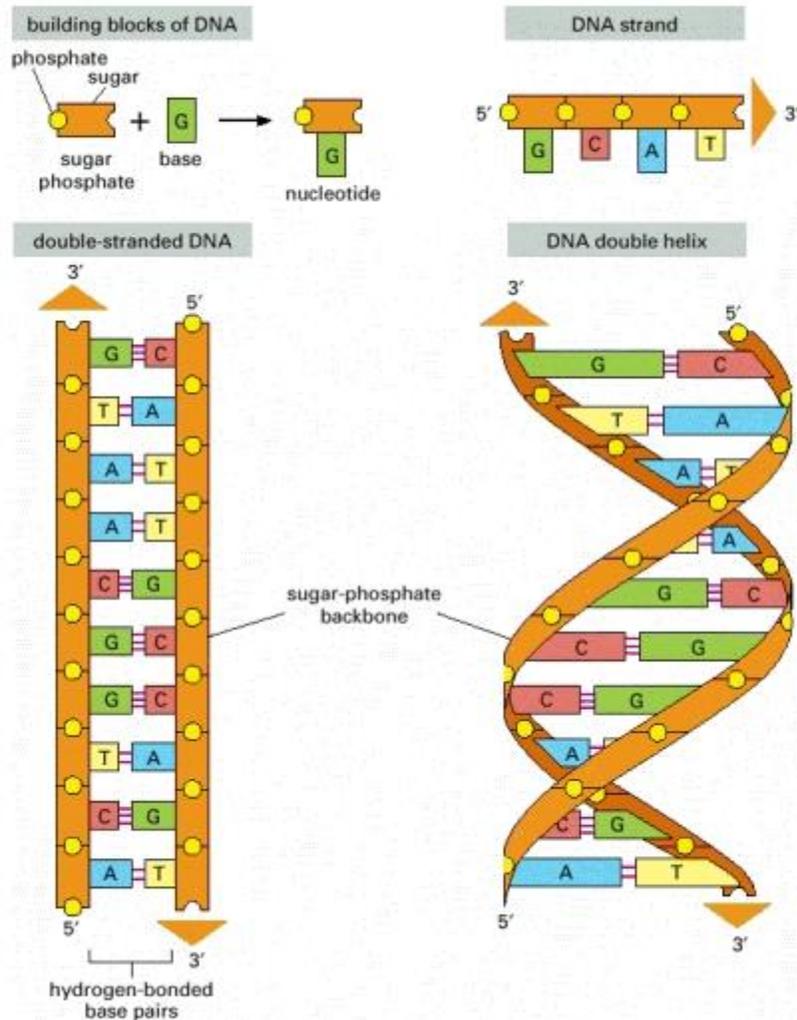
#### **2.2.1.2 Siembra**

Para la siembra debe de existir una buena preparación tanto del suelo como del tiempo en que el que ésta se efectuará. Por lo que es preferible comenzar al final de la época de seca y culminar en época de lluvia, se recomienda que el terreno quede “suelto” pero no muy polvoso para evitar que la semilla quede muy profunda o sea lavada por la lluvia (Interiano Santos, 2015).

### **2.3 DNA METAGENÓMICO**

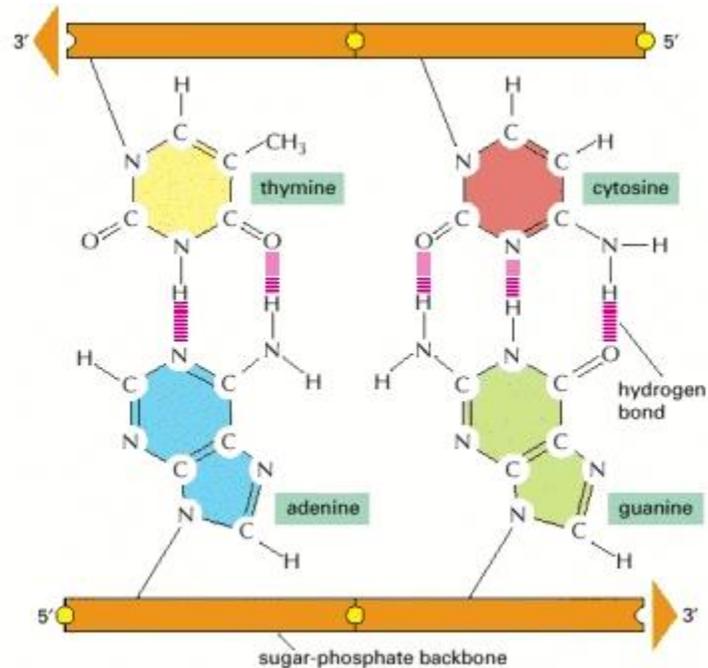
#### **2.3.1 DNA**

Una molécula de ADN está constituida por dos cadenas de polinucleotídicas unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar de 5 carbonos (desoxirribosa) que están unidos a un grupo fosfato (de ahí el nombre de ácido desoxirribonucleico) y una base nitrogenada, que puede ser Adenina(A), Guanina (G), Timina (T) o Citosina (C). (Fig. 1.2)



**Fig. 1.2.** DNA y sus bloques de construcción (Albert *et al.*, 2002): Una molécula de ADN está compuesta de dos cadenas de ADN unidas entre sí por enlaces de hidrógeno entre las bases emparejadas. Las puntas de flecha en los extremos de las cadenas de ADN indican las polaridades de las dos cadenas, que se ejecutan antiparalelas entre sí en la molécula de ADN.

La unión de los nucleótidos se da covalentemente entre el grupo fosfato y el azocar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrogeno y mantienen estable la estructura helicoidal (Cornejo Romero *et. al* 2014) (Figura 1.3).

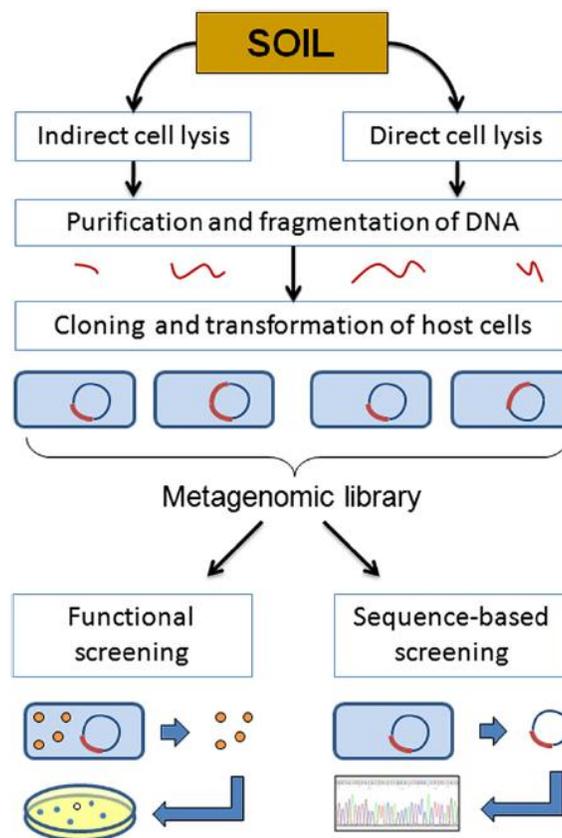


**Figura 1.3** Pares de bases complementarias en la doble hélice del DNA (Alberts *et al.*, 2002): Como se indica, dos enlaces de hidrógeno se forman entre A y T, mientras que tres se forman entre G y C. Las bases pueden emparejarse de esta manera sólo si las dos cadenas de polinucleótidos que las contienen son antiparalelas entre sí.

### 2.3.2 Metagenómica de suelos

La metagenómica es una ciencia que surge como una rama de las ciencias genómicas, la cual se refiere al estudio del metagenoma de un nicho en particular (Hernández León *et al.*, 2010). A mediados de los años 80 los microbiólogos comenzaron a cambiar los conceptos de la microbiología clásica y a aceptar la idea de la existencia de una vasta vida de microorganismos no cultivables (99,8% no es cultivable) proponiendo la necesidad de disponer de técnicas no tradicionales para entender el mundo microbiano (Bonilla Rosso *et al.*, 2008). El metagenoma se puede definir como el análisis funcional y de secuencias de los genomas microbianos de una muestra ambiental, basándose ya sea en expresión

o secuenciación. En particular, se ha propuesto que entre 80-90% de los microorganismos que habitan el suelo son desconocidos. Esto se debe a que el suelo es un ambiente heterogéneo y no comprendemos completamente su biogeoquímica o complejidad espacial, ni cómo las propiedades del suelo y los procesos como el ciclo del carbono interactúan con la vida microbiana. Dada la enorme utilidad e importancia de los microorganismos del suelo para todos los sistemas biológicos, se necesitan métodos para acceder a la basta cantidad de información dentro de todo el ADN microbiano aislado de una muestra de suelo (Fig. 1.4).



**Figura 1.4** Esquema general del enfoque metagenómica: DNA del suelo se recupera mediante la lisis directa o indirecta de las células de las partículas del suelo. El DNA recuperado se purifica, fragmenta y se liga en el vector de clonación linealizado que se introduce en una célula huésped bacteriano adecuado. La biblioteca puede ser examinada para funciones o secuencias específicas (Mocali & Benedetti, 2010).

### 2.3.3 Métodos de extracción de DNA

Como se ha descrito anteriormente, se estima que sólo un pequeño porcentaje de las bacterias son cultivables. Por lo tanto, se han desarrollado métodos para poder aislar y amplificar el material genético de bacterias no cultivables en diferentes ambientes. Una de las técnicas más usadas desde hace algunas décadas es la amplificación de los genes ribosomales que codifican para la subunidad 16S (ADNr 16S). La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula; ya que ésta tiene una carga neta negativa gracias a los grupos fosfato que son polares, lo que se puede aprovechar para una extracción eficiente.

En la actualidad, se utilizan tres tipos de lisis celular (o ruptura de membrana) solos o en combinación: alteraciones físicas, químicas y enzimáticas. En general, estos protocolos consisten de cinco etapas principales (Cornejo Romero *et al.*, 2014):

- Homogenización del tejido: La homogeneización, mecánica o química, consiste en romper las uniones entre las células para facilitar la interacción con las soluciones de lisis que ayudan a liberar el material genético.
- 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 DNA.
- Separación de proteínas y lípidos: En esta etapa se separa el ADN de las proteínas y lípidos mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación. Se utiliza la fuerte tendencia hidrofílica de los grupos fosfato para

separarlos en medios acuosos, mientras que las proteínas y los lípidos se separan en solventes orgánicos (Sambrook *et al.* 1989).

- Precipitación del DNA: 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.
- Redisolución del DNA: 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.

#### **2.3.4 Factores que afectan los procesos de extracción de DNA del suelo**

Los métodos actuales proporcionan una visión única de la riqueza, composición y estructura de la comunidad microbiana, es decir, la riqueza de especies y la uniformidad de las especies. Los resultados se basan no sólo en los procedimientos de extracción de DNA, sino también en los factores que influyen en la amplificación de la PCR. Sin embargo, estos métodos independientes de la cultura deben abordar problemas como la ruptura incompleta de las células y la presencia de sustancias orgánicas del suelo, ya que la fase crítica para las muestras es la separación del DNA de los ácidos húmicos, cuya presencia inhibe la actividad de la ADN polimerasa en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) e interfiere con los protocolos de hibridación (Luo *et al.*, 2003).

Las diferencias en las estructuras de las paredes celulares y en el comportamiento de adherencia de los microorganismos junto con las características físicas, químicas y biológicas del suelo afectan la extracción del

ADN y su fragmentación durante el tratamiento de la muestra (Maarit Niemi *et al.*, 2001).

### **2.3.5 Cuantificación y calidad de ácidos nucleicos**

La importancia del proceso de obtención y purificación del material genético es recobrar el producto máximo de DNA de alto peso molecular libre de proteínas, fenoles e inhibidores de las enzimas de restricción y de la Taq polimerasa. El DNA de alta calidad es un prerrequisito para su uso en técnicas de Biología Molecular como PCR y secuenciación (Rada & Taboada, 2002). La calidad del DNA extraído puede analizarse de dos formas, una observando la integridad de éste mediante electroforesis en gel de agarosa, un método estándar para separar y purificar fragmentos de DNA cuando no se requiere un alto poder de resolución. La otra forma de comprobar la eficiencia del método de extracción a utilizar es la cuantificación de DNA por espectrofotometría.

#### **2.3.5.1 Nanoespectrofotometría**

La espectrofotometría es una técnica analítica cuantitativa para determinar concentraciones de material genético requiriendo un volumen de muestra de 1 a 2  $\mu l$ , permitiendo hacer mediciones en un rango muy amplio de concentraciones sin hacer diluciones. Esta característica lo hace idóneo para determinar la concentración y pureza de los ácidos nucleicos. La concentración de ácidos nucleicos se proporciona en la unidad seleccionada ( $ng/\mu l$ ,  $\mu g/\mu l$ ,  $\mu g/ml$ ). Los cálculos se basan en una variación de la ecuación de la ley de Beer que utiliza el

valor de la absorbancia de ácidos nucleicos corregido. Los resultados proporcionan dos relaciones como indicadores de pureza en la muestra:

- Índice de pureza A260/280: Una relación de absorbancia de  $\sim 1.8$  es generalmente aceptado como "puro" en cuando DNA.
- Índice de pureza A260/230: Para el DNA y RNA un índice de pureza entre 1.8 y 2.2 es generalmente aceptado como "puro"

### 3. PROBLEMAS A RESOLVER

- I. En México, es común que los suelos presenten desbalance o restricciones como déficit o toxicidad de sus elementos, acidez o alcalinidad, salinidad, agua, lo que desencadena que el crecimiento y desarrollo de las plantas no ocurra de forma adecuada.
- II. La aplicación de fertilizantes amoniacales, tales como nitrato de amonio, fosfato de amonio; y amídicos como la urea, inducen una acidificación en el proceso de nitrificación. En consecuencia del uso indiscriminado de fertilizantes químicos ocurren efectos negativos en el intercambio catiónico entre el suelo y la planta, ejerciendo un impacto considerable en el cambio de las comunidades bacterianas, ya que están estrechamente involucrados en la mayoría de los procesos que ocurren en el suelo (Domínguez Mendoza *et al.*, 2014); además de influir en el crecimiento y desarrollo de la planta, son muy importantes para la resistencia a enfermedades y tolerancia al estrés abiótico.
- III. Los microorganismos del suelo que se encuentran en la zona de las raíces afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas, pero el potencial para aprovechar estos beneficios se ve obstaculizado por la abundancia y diversidad de los factores que influyen en los rasgos deseables de las plantas. Reportes por Pake *et al.* (2015) describen un alto nivel de reproducibilidad del microbioma del suelo en la alteración del tiempo de floración de la planta y las funciones del suelo cuando se asocian dentro y entre los huéspedes de la planta.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La diversidad de los microorganismos asociados a la rizósfera de diferentes especies vegetales en los suelos es de mucha importancia, hay que recordar que son responsables de una parte significativa de los ciclos biogeoquímicos. En México se ha estudiado poco y se ha abordado de manera convencional, con técnicas microbiológicas limitadas debido al elevado porcentaje de microorganismos no-cultivables (95-99%).

A su vez, dada la necesidad de resolver la problemática para mejorar el panorama de una agricultura orgánica sostenible y así aumentar y mejorar la producción de alimentos se han propuesto algunas plantas con características altamente nutritivas, las cuales se desarrollen bien aplicando insumos orgánicos como la vermicomposta, que contiene una elevada carga enzimática y bacteriana que incrementa la solubilidad de los elementos nutritivos, incrementando la fertilidad, estructura y capacidad de retención de agua, contenido de materia orgánica, estabilización de pH y temperatura en el suelo, reduciendo la cantidad de fertilizantes químicos usados en la agricultura, que proporciona nitrógeno, fósforo y potasio a la planta, y por lo tanto, incrementa el rendimiento en los cultivos.

Con la intención de brindar a la población nuevos productos con alto valor nutricional se ha planteado el uso de *Moringa oleífera*, ya que es una fuente y fácilmente disponible de nutrientes esenciales y nutraceuticos, y tiene el potencial de erradicar la desnutrición, a menudo es considerada como alimento de hambre importante debido a su alta resistencia a la sequía y las condiciones áridas debido a sus raíces tuberosas y una planta de rapido crecimiento. Casi todas y cada una de las partes del árbol de *Moringa* es útil para medicinales, preparaciones de alimentos funcionales, nutraceuticos, purificación de agua y producción de biodiesel. Tradicionalmente, *M. oleífera* se usa en varias aplicaciones terapéuticas, incluyendo tumores abdominales, histeria (trastorno psicológico), escorbuto,

parálisis, vejiga helmíntica, problemas de próstata, úlceras y otras infecciones de la piel, así también para el tratamiento de la diabetes mellitus.

Su importancia no sólo radica en las bondades de sus partes, sino también su rápido crecimiento y desarrollo en suelos áridos y climas tropicales, es atractiva para el estudio de la forma en que una planta de rápido crecimiento se asocia con el microbioma de los suelos y la rizósfera a través del tiempo.

Para amenorar esta limitante, 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 que dificulten el tratamiento posterior de la molécula. Estos métodos proporcionan una gran aportación al conocimiento de la riqueza, composición y estructura de la comunidad microbiana.

La extracción de DNA del suelo es un desafío ya que debido a su complejidad es complicado obtener un material genético íntegro y de buena calidad, para lograrlo es de suma importancia emplear distintas metodologías de extracción que permitan obtener DNA del íntegro del suelo en estudio, por ello, se sugiere que los métodos de extracción directos (físicos, químicos y enzimáticos) aplicados individualmente o en combinación han demostrado ser los más eficaces.

## 5. OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Evaluar diferentes métodos para la extracción de DNA metagenómico del suelo rizosférico del cultivo orgánico de *Moringa oleífera*.

### **Objetivos específicos:**

- Caracterizar fisicoquímicamente diferentes tipos de suelos nativos y agrícolas
- Establecer métodos para extraer DNA metagenómico de suelos rizosféricos nativos y agrícolas.
- Evaluar la concentración y calidad del DNA metagenómico obtenido mediante nanoespectrofotometría.

## CAPÍTULO 2

### 6. METODOLOGÍA

#### 6.1 Sitio de muestreo

Las muestras de suelo nativo, agrícola y con vermicomposta fueron colectadas en el Rancho “La Escondida” ( $16^{\circ}01'55.0''\text{N}$ ,  $92^{\circ}50'53.8''\text{W}$ ) (Figura 2.1) y el Rancho “La Majada” ( $16^{\circ}02'41.4''\text{N}$ ,  $92^{\circ}48'50.2''\text{W}$ ) (Figura 2.2); ubicados en la localidad de Benito Juárez, Municipio de la Concordia en el estado de Chiapas, México; y en la Finca Orgánica “Luanda” ( $16^{\circ}45'36.7''\text{N}$ ,  $93^{\circ}22'32.1''\text{W}$ ) ubicada en el municipio de Ocozocuatla, Chiapas, México; las cuales se recolectaron en el mes de Noviembre de 2014.



**Figura 2.1** Sitio de colecta suelo nativo  
Rancho “La Escondida”.



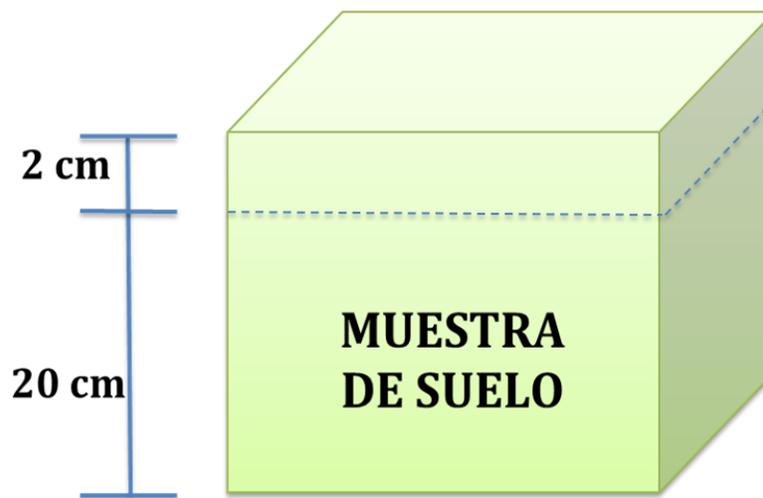
**Figura 2.2** Sitio de colecta suelo agrícola  
Rancho “La Majada”.

## 6.2 Localización del área de estudio

Los análisis para la caracterización del suelo, extracción y cuantificación del DNA obtenido, se llevaron a cabo en el Laboratorio No. 4 de Biología Molecular; laboratorio ubicado en el Polo Tecnológico Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas Analíticas en Biocombustible; la consulta bibliográfica se realizó en el Laboratorio de Bioinformática del edificio Z, ambos laboratorios ubicados en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

## 6.3 Caracterización del suelo

En cada sitio de muestreo se delimitó un área de 100 m<sup>2</sup>. Las muestras de suelo corresponden a la capa superficial (Figura 2.3) y estas posteriormente fueron trasladadas a un invernadero para su caracterización siguiendo la metodología reportada por Ruíz-Valdiviezo *et al.* (2010) (Tabla 2.1).



**Figura 2.3.** Representación gráfica de la profundidad de la zona de toma de muestra (Manzano Gómez, 2015)

**Tabla 2.1** Parámetros evaluados en muestras de suelo y vermicomposta.

Parámetro	Suelo Nativo	Suelo Agrícola	Vermicomposta
pH	✓	✓	✓
Capacidad de Retención de Agua (CRA)	✓	✓	✓
Humedad	✓	✓	✓
Textura	✓	✓	✓
Conductividad Electrolítica (CE)	✓	✓	✓
Carbono Orgánico	✓	✓	✓
Nitrógeno Total	✓	✓	✓
C/N	✓	✓	✓

Como primer paso, las muestras se extendieron sobre una superficie plana y se secaron al sol, cada tres días el suelo fue mezclado para garantizar que las capas inferiores estuvieran libres del exceso de agua. Posteriormente, con la ayuda de un tamiz se eliminó la mayor cantidad posible de residuos de plantas, piedras y restos de insectos.

### 6.3.1 Humedad

Se pesó 15 g de suelo tamizado y se introdujeron a un horno a 105°C por un lapso de 24 horas. Al finalizar el tiempo, la muestra se retiró del horno y se pesó para obtener el contenido de humedad empleando el siguiente cálculo.

$$\text{Humedad} = \frac{\text{peso suelo} - \text{peso suelo anhidro (105°C)}}{\text{kg peso suelo anhidro (105°C)}}$$

### 6.3.2 Capacidad de retención de agua

Primero se tamizaron y se pesaron 25 g de suelo, posteriormente se colocaron en un embudo de plástico cubierto con papel filtro Whatman® #42 de baja porosidad. Se agregó agua destilada hasta saturar el embudo junto con la muestra y éste se tapó para evitar la evaporación. Después de 24 horas la muestra de suelo se pesó y se realizó el cálculo correspondiente.

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

### 6.3.3 Textura

Se pesaron 50 g de suelo seco tamizado y se colocaron en un vaso con 200 ml de agua destilada y 10 ml de hexametáfosfato de sodio (50g/ml). Se agitó durante 10 minutos y la mezcla se transfirió a una probeta y se aforó a 1 L empleando agua destilada. Se tapó la boca de la probeta con una película plástica y esta se homogeneizó 10 veces. La primera lectura se tomó a los 40 segundos empleando un hidrómetro de Bouyoucos y la temperatura con un termómetro de mercurio. Se dejó reposar la muestra en la probeta y 2 horas más tarde se tomó la segunda lectura. Se emplearon las siguientes ecuaciones para la determinación de % de Limos, Arcillas y Arena para poder clasificar la textura de las muestras de suelo (Saxton & Rawls, 2006)

$$\%Limos + \%Arcillas = \frac{(1^{er}Lectura + (T1 - 20) * 0.36)}{\text{Peso suelo seco}} \times 100$$

$$\%Arcillas = \frac{(2^{a}Lectura + (T2 - 20) * 0.36)}{Peso\ suelo\ seco} \times 100$$

$$\%Arena = 100 - (\%Limos + \%Arcillas)$$

#### **6.3.4 Conductividad eléctrica**

Se emplearon frascos de vidrio de 900 ml para almacenar 200 g de suelo seco tamizado al que se adicionó agua destilada hasta formar una pasta. La muestra se almacenó en un refrigerador durante un periodo de 24 horas. La muestra se centrifugó y el sobrenadante se transfirió a tubos limpios para medir la conductividad eléctrica empleando un conductímetro.

#### **6.3.5 pH**

Se mezcló 25 ml de agua destilada con 10 g de suelo seco tamizado y se resuspendió durante 1 min. La lectura de pH y temperatura se realizó inmediatamente.

#### **6.3.6 Carbón orgánico**

Se determinó el contenido de carbono orgánico empleando un equipo automático llamado TOC-V (Total Organic Carbon) en el que 0.025 g de glucosa

se pesaron y tomaron como estándar junto con 0.2 g de muestra de suelo. La muestra de suelo y azúcar se secaron previamente a 105°C.

$$g \text{ Glucosa}(0.025) \times 0.4 = gC - \text{glucosa}$$

$$\text{Factor} \left( \frac{gC}{\text{área}} \right) s = \frac{gC}{TOC(\text{área})}$$

$$\left( \frac{gC}{kgss} \right) = \frac{TOC(\text{área}) * \left( \text{Factor} \left( \frac{gC}{\text{área}} \right) \right) * 100}{\text{peso suelo (g)}}$$

### 6.3.7 Nitrógeno total

Muestras de suelo seco tamizado fueron enviadas al Colegio de la Frontera Sur para la determinación de nitrógeno total empleando el método Kjeldahl. La determinación de Nitrógeno Total involucró los siguientes pasos:

1. Digestión de la muestra en la conversión de nitrógeno a  $NH_4^+$
2. Determinación de  $NH_4^+$  en el digestado.

La digestión de la muestra se realizó por calentamiento en una solución de ácido sulfúrico concentrado, sulfato de potasio y catalizadores como el cobre y selenio para la oxidación de la materia orgánica y conversión del nitrógeno orgánico en  $NH_4^+$ . El amonio en el digestado se determinó mediante titulación empleando una solución de hidróxido de sodio (NOM-021-SEMARNAT-2000).

$$\%N_{total} = (V_m - V_b) \times N \times 14/p \times 10$$

Donde:

$V_m$  = Volumen de ácido sulfúrico empleado en titular la muestra.

$V_b$  = Volumen de ácido sulfúrico empleado en titular el blanco

$N$  = Normalidad del ácido sulfúrico

14 = Peso equivalente del nitrógeno

10 = Factor de conversión a %

= Peso de la muestra de suelo en g.

## 6.4 Establecimiento del experimento

### 6.4.1 Recolección de las muestras

Muestras de suelo caracterizados anteriormente (9 Kg) se emplearon para empacar unidades experimentales que consistieron en tubos PVC de 15 cm de diámetro x 60 cm de altura (Figura 2.4).

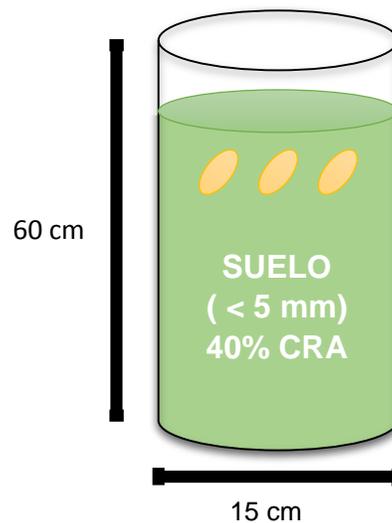


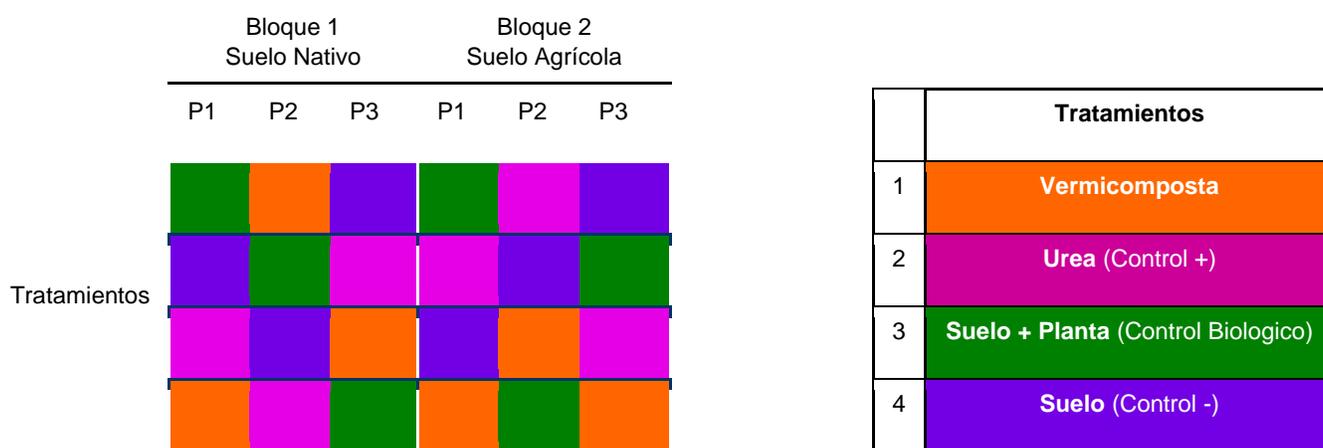
Figura 2.4 Unidad experimental

Se sembraron 3 semillas de *Moringa oleífera*, las cuales fueron donadas por la empresa “Alimentos Orgánicos La Escondida SPR de RL”. Posterior a la germinación se realizó un aclaramiento y se dejó una planta en cada unidad experimental, se ajustó la capacidad de retención de agua (CRA) a un 40% y el periodo de riego se estableció cada 4 días.

Las unidades experimentales fueron distribuidas empleando un Diseño de Parcelas Divididas con Bloques Completo Aleatorizados (DBCA) (Figura 2.5) en el Invernadero del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (16°45'26.0"N 93°10'24.5"W) para evaluar el efecto de los siguientes tratamientos:

1. Vermicomposta
2. Urea
3. Control (Suelo)
4. Control biológico (suelo + planta)

Cada tratamiento se realizó por triplicado y se obtuvieron un total de 48 unidades experimentales.



**Figura 2.5** Representación del Diseño de Parcelas Divididas con Bloques Completos Aleatorizados (DBCA)

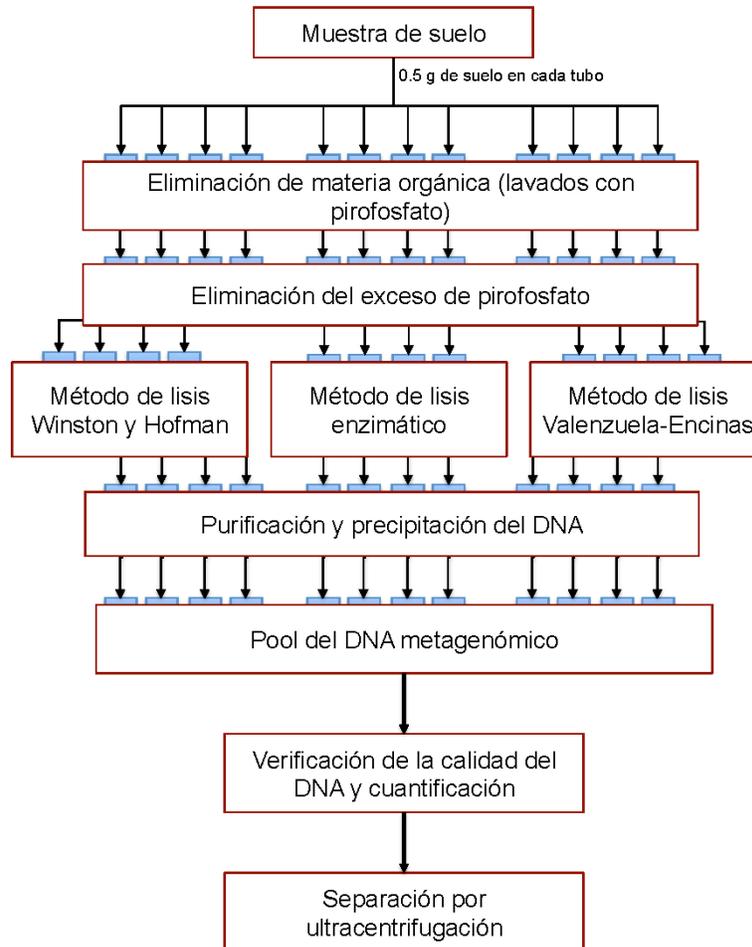
La variable de respuesta evaluada a los 0, 45 y 90 días fue el DNA metagenómico de la rizósfera.

Cada planta contenida en los tubos de PVC se retiró de forma precavida para no fracturar a la planta y obtener el suelo rizosférico, es decir, el suelo que se desprendía fácilmente no fue contemplado para el muestreo, el suelo fuertemente adherido a las raíces fue recolectado para la extracción de DNA (Figura 2.6).



**Figura 2.6** Obtención de muestra de suelo rizosférico en plantas de *Moringa oleífera*.

Debido a que los estudios metagenómicos son sensibles a los métodos de extracción de DNA y al tamaño de muestra, se implementó el siguiente protocolo para la extracción de DNA metagenómico de la rizósfera de *Moringa oleífera* (Figura 2.7). El protocolo seguido es por muestra de suelo.

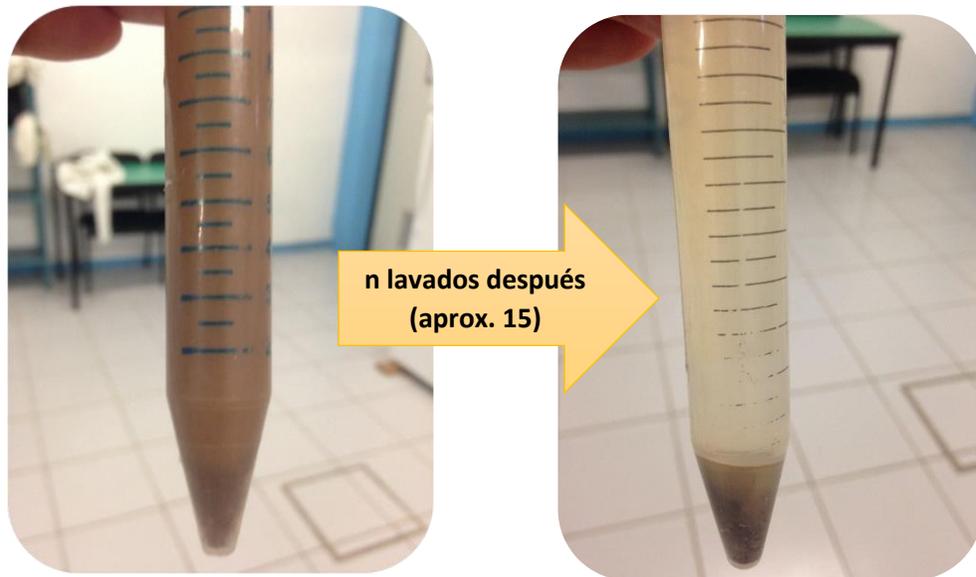


**Figura 2.7** Diagrama de flujo para el análisis de comunidades microbianas en muestras de suelo.

#### 6.4.2 Eliminación de la materia orgánica

Se adicionaron 11 ml pirofosfato 0.15 M y se agitó en vortex VTX Scientific® hasta resuspender el suelo. Posteriormente la muestra se centrifugó a 4000 rpm x 10 min, empleando un equipo de la marca Hermle® modelo Z 326 K, rotor Hermle® 221.12 y el sobrenadante fue eliminado. El proceso de eliminación de la materia orgánica se repitió 15 veces aproximadamente hasta obtener un sobrenadante de color claro (Figura 2.7).

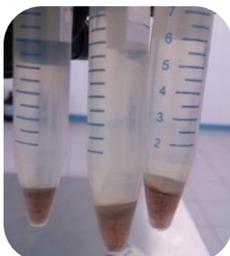
Las muestras fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 24 horas para dar continuidad a los pasos siguientes.



**Figura 2.8** Disminución de la materia orgánica mediante n° número de lavados.

### 6.4.3 Eliminación del exceso de pirofosfato

Una vez eliminado el contenido de materia orgánica del suelo, las muestras se lavaron para eliminar el exceso de pirofosfato, 11 ml de buffer de fosfatos pH 8 se adicionaron y se resuspendió en vortex VTX Scientific® para obtener una mezcla homogénea. Enseguida se procedió a centrifugar la muestra a 4000 rpm x 10 min, se utilizó una centrífuga Hermle® modelo Z 326 K, rotor Hermle® 221.12, para realizar los lavados en el que se desecharon los sobrenadantes. El procedimiento anterior se repitió 11 veces aproximadamente hasta obtener un sobrenadante transparente (Figura 2.8).



**Figura 2.9** Muestras de suelo después del lavado con buffer de fosfatos.

## **6.5 Obtención de DNA metagenómico**

Se emplearon tres métodos de extracción por triplicado para la obtención de DNA metagenómico de la rizósfera.

### **6.5.1 Método modificado de Valenzuela-Encinas *et al.* (2008) (Metodología I)**

A una muestra de suelo lavado anteriormente se adicionaron 500 µl de solución lisis I y se resuspendió en vórtex VTX Scientific® a velocidad máxima, posteriormente se agregó 500 µl de solución lisis II y un volumen de arena estéril (considerando que el volumen por adicionar debe ser el mismo que el suelo a utilizar, se ocupó 0.5 g de arena estéril). El tubo se agitó nuevamente en vórtex a velocidad máxima durante 15 min. Posteriormente se incubó 30 min en nitrógeno líquido; inmediatamente transcurrido el tiempo, fue introducido en termobañó a 70°C precalentado anteriormente para que un choque térmico eficiente. Finalmente se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos en un equipo Hermle® con un rotor Hermle® 220.87, y el sobrenadante se depositó en un tubo eppendorf® nuevo de 1.5 ml.

### **6.5.2 Método modificado de Lisis enzimática (Griffiths *et al.*, 2000) (Metodología II)**

A una muestra de suelo lavado previamente se adicionaron 500 µl de buffer para lisozima, se agitó en vórtex VTX Scientific® a velocidad máxima para resuspender; enseguida, se adicionó 80 µl de lisozima 10 mg/ml y se procedió a su incubación a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, a la muestra se agregó 1 ml de SDS 10% y 0.5 g de arena estéril. La muestra se agitó en vórtex durante 15 minutos y se centrifugó a 4000 rpm x 10 minutos en el mismo equipo empleado

con anterioridad. El sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo nuevo eppendorf® de 1.5 ml.

### **6.5.3 Método de Hoffman y Winston (1987) (Método III).**

A una muestra de suelo lavado previamente se adicionaron 700 µl de la solución lisis de Winston y un volumen de arena estéril (considerando que el volumen por adicionar debe ser el mismo que el suelo a utilizar, se ocupó 0.5 g de arena estéril), se resuspendió en vórtex VTX Scientific® a velocidad máxima durante 15 minutos. Al finalizar, la muestra se centrifugó a 13,000 rpm x 10 minutos en el equipo utilizado anteriormente; el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf® nuevo de 1.5 ml.

## **6.6 Eliminación de proteínas y purificación de DNA**

Al tubo con sobrenadante previamente tratado con algún método de extracción se le adicionó 200 µl de EDTA 0.5M pH 8 y 120 µl de acetato de potasio 5 M pH5; después se llevó a incubación por 30 min a 4°C. Transcurrido el tiempo la muestra se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a 4°C, el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf® de 1.5 ml, al cual se le adicionó 400 µl de solución cloroformo: alcohol.isoamílico 24:1, y se agitó en vórtex a máxima velocidad para después centrifugar la muestra a 13,000 rpm por 10 minutos a 4° C; después la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo eppendorf® de 1.5 ml, el proceso de adición de la solución cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 se realizó tres veces para la fase acuosa, evitando la transferencia de la fase orgánica o proteínas.

El DNA se precipitó adicionando a la fase acuosa 800 µl de PEG al 13% y se agitó en vórtex a máxima velocidad; la muestra se incubó toda la noche a -20°C. Posterior a la incubación se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a 4°C, el sobrenadante se eliminó por decantación con precaución.

La pastilla de DNA contenida en el tubo se lavó con 500 µl de etanol frío al 70%, centrifugando a 13000 rpm por 10 min a 4°C, se decantó nuevamente el sobrenadante y el exceso de etanol contenido en las paredes del tubo se eliminó con un spin en la microcentrífuga.

Terminado el lavado, la muestra se dejó secar por 15 min y se resuspendió en 40 µl de agua estéril marca PISA®.

## **6.7 Confirmación de la calidad del DNA**

Se verificó la calidad del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X con 3 µl de muestra y 1 µl de buffer de carga. Las condiciones para correr las muestras fueron a 90 V y 400mA durante 30 min. Se tomó una alícuota con 3 µl de muestra y 1 µl de buffer de carga en un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X. Las muestras se corrieron a 90 V durante 25 minutos.

## **6.8 Pool y cuantificación de DNA extraído en Nanoespectrofluorometro**

Completadas las extracciones de DNA por los tres métodos y a partir de 5 g de suelo (4 extracciones de 0.5 g por tres métodos), se mezcló el volumen de todas las extracciones en un tubo eppendorf. Se diluyó 1:200 en buffer TE 1x (1 µl de DNA + 20 µl TE 10x + 179 µl de agua estéril), mezclar perfectamente en vortex.

El DNA se cuantificó en un Nanodrop One (Thermo Scientific, Wilmington, DE 19810, USA) (Figura 2.10) con una alícuota de 2 µl, por triplicado, utilizando como blanco 2 µl de agua estéril marca PISA®. Se leyó la absorbancia a 260 y 280 nm. Considerando aceptable una relación  $A_{260}/A_{280} > 1.8$ .

Para futuros análisis de las muestras de DNA se realizó un pool para cada día de muestreo y para cada tratamiento (Tabla 2.10). Posteriormente, se cuantificaron en un Nanodrop One utilizado anteriormente.



**Figura 2.10** Nanodrop One (Thermo Scientific, Wilmington, DE 19810, USA)

**Tabla 2.2-** Ejemplo de la elaboración de un pool de DNA metagenómico para futuros análisis.

Día	Tratamiento	Tipo de Suelo	Replica	Método de Extracción	Pool
			1	(Valenzuela-Encinas <i>et al.</i> , 2009)	1
			2		
			3		
0	Vermicomposta	Suelo virgen	1	(Griffiths <i>et al.</i> , 2000)	
			2		
			3		
			1	(Hoffman and Winston, 1987)	
			2		
			3		

## CAPÍTULO 3

### 7. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 7.1 Caracterización fisicoquímica de suelos y vermicomposta

Los resultados obtenidos de las pruebas realizadas a las muestras de suelo y vermicomposta que contenían las unidades experimentales se presentan en la Tabla 3.1; los cuales corresponden al Rancho “La Escondida”, Rancho “La Majada” y Finca Orgánica Luanda. Cabe destacar que estas características pueden variar en cada tipo de suelo, por lo tanto las propiedades que manifieste repercutirá sobre la actividad biológica ya que los microorganismos son sensibles a los cambios de calidad del suelo (Jaurixje *et al.*, 2013). Los suelos analizados se clasificaron como Franco Arcillo Arenosos con base en la pirámide adaptada de textura Saxton y Rawls (Fig. 3.1). De acuerdo al tamaño de las partículas, se clasifican en arcilla (partículas menores de 0.002 mm), limo (0.002-0.05 mm), arena (0.05-2 mm) y grava (partículas mayores a 2 mm).

De acuerdo a la Tabla 3.1, se observa que el pH del suelo nativo (SN) es de 6.77, correspondiendo a un suelo neutro en el que existirán mínimos efectos tóxicos, mientras que el pH del suelo agrícola (SA) es de 5.45 siendo un suelo ácido, *M. oleífera* tolera terrenos ácidos (Padilla *et al.*, 2012), sin embargo, los suelos ácidos están asociados con un número de efectos tóxicos provocados por aluminio, exceso de cobre y manganeso, además de presentar deficiencias de molibdeno y otras condiciones restringentes para las plantas (FAO, 2014), propiciando una actividad bacteriana escasa. Li (2012) menciona que el uso de fertilizantes químicos para el aumento de la productividad de los cultivos puede ser uno de los factores que influyen en la disminución del pH en suelos agrícolas. La acidificación de los suelos corresponde a un proceso dinámico en el que se

engloban diversos factores naturales (edáficos, climáticos y biológicos) así como antropogénicos (relacionados a la actividad del ser humano) (Campillo R. & Sadzawka R., 2006). La aplicación de fertilizantes amoniacales (nitrato de amonio, fosfatos de amonio) y amídicos (urea), induce una acidificación en el proceso de nitrificación del amonio.

La materia orgánica mejora la estructura del suelo, reduce la erosión del mismo, tiene un efecto regulador en la temperatura del suelo y le ayuda a almacenar más humedad, mejorando significativamente de esta manera su fertilidad (IFA & FAO, 2002); esto se refleja claramente en los valores obtenidos de humedad, ya que el suelo nativo tiene un 5.99% y el suelo agrícola 1.18%; mientras que la conductividad electrolítica fue de 4.31 dS m<sup>-1</sup> y 3.69 dS m<sup>-1</sup>, respectivamente, dicha propiedad va a depender de los cambios que sufran la textura, humedad y salinidad del suelo (Machado Siqueira, 2009).

Los valores de carbono orgánico y nitrógeno total, dan a conocer la relación C/N la cual resulta de dividir el contenido de C (%C total) sobre el contenido de N total (%N total) (IFA & FAO, 2002), lo obtenido es un indicador de la fertilidad y productividad de un suelo, además de los cambios cualitativos en la materia orgánica del mismo. Ostrowska y Porebska (2015) comentan que la relación C / N en los suelos arables, que era muy inferior a 10, podría indicar una entrada de N demasiado alta, principalmente por la utilización de fertilizantes, este cambio puede afectar la unión con la biomasa biológica en la materia orgánica del suelo, especialmente con deficiencia de carbono, que puede causar la lixiviación de nitrógeno al suelo y aguas superficiales.

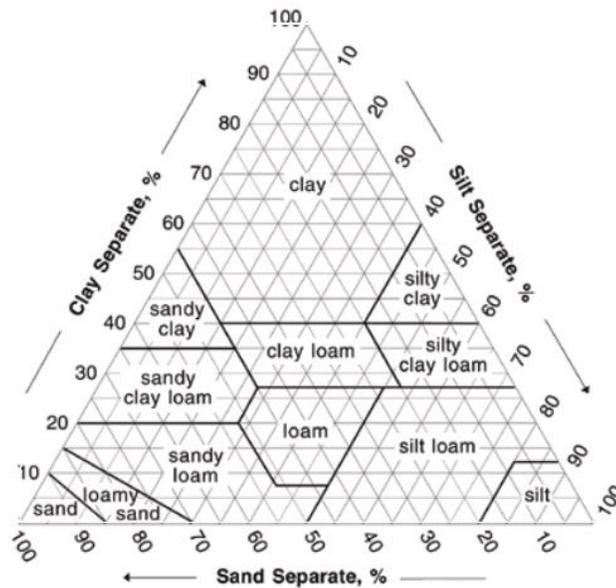
En productos obtenidos por la fermentación biológica de la materia orgánica, como es la vermicomposta, existirá gran cantidad de microorganismos capaces de mejorar la fertilidad del suelo (Aalok *et al.*, 2008), ya que necesitan carbono como fuente de energía, y nitrógeno para la síntesis de proteínas y estructuras celulares; si la relación C/N es menor que 20, la materia orgánica es degradada fácilmente y el nitrógeno es temporalmente inmovilizado dentro de los microorganismos, al morir éstos, es liberado al medio (Eulloque Guerrero, 2013).

**Tabla 3.1** Caracterización de muestras de suelo y vermicomposta.

	pH	CRA (g g <sup>-1</sup> suelo)	Humedad %	CE (dS m <sup>-1</sup> )	C <sub>orgánico</sub> (g kg <sup>-1</sup> suelo)	N <sub>total</sub> (g kg <sup>-1</sup> suelo)	C/N	Textura
SN	6.77 ± 0.12	0.41 ± 0.01	5.99 ± 0.30	4.31 ± 0.79	9.65 ± 1.45	1.77 ± 0.01	5.5	Franco arcillo arenoso
SA	5.45 ± 0.14	0.42 ± 0.04	1.18 ± 0.01	3.69 ± 0.75	14.12 ± 3.38	1.49 ± 0.03	9.5	Franco arcillo arenoso
*V	7.41	0.92	49.25	8.00	233	11.8	19.7	-

SN - suelo nativo; SA - suelo agrícola; V – vermicomposta; CRA – capacidad de retención de agua; CE – conductividad electrolítica.

\*Gutiérrez-Miceli *et al.*, (2007).



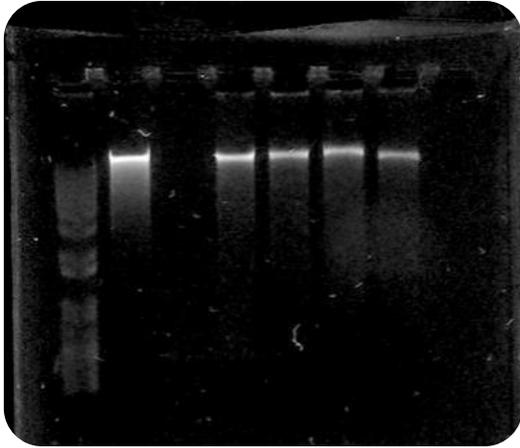
**Figura 3.1** Pirámide de textura adaptada de Saxton y Rawls por Manzano Gómez (2015).

Dadas las características del suelo obtenidas, Bautista *et al.* (2004) mencionan que el término “calidad del suelo” es acotado al reconocer los beneficios de éstas, como es promover la productividad del sistema sin perder sus propiedades físicas, químicas y biológicas (productividad biológica sostenible); atenuar contaminantes ambientales y patógenos y favorecer la salud de las plantas.

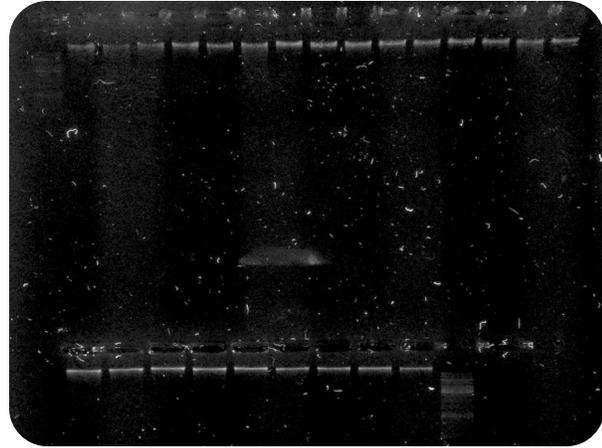
## 7.2 Extracción y cuantificación de DNA metagenómico

La evaluación del DNA extraído en electroforesis de gel de agarosa de los días 0, 45 y 90 demostró que los métodos utilizados empleados en el proyecto son eficientes para obtener DNA de muestras de suelo rizosférico como se observa en las Figuras 3.2, 3.3 y 3.4. Robe *et al.* (2003) mencionan que el empleo de técnicas como sonicación y choque térmico aumenta la eficacia de la extracción de DNA recomendando que la muestra se encuentre seca antes de realizar los

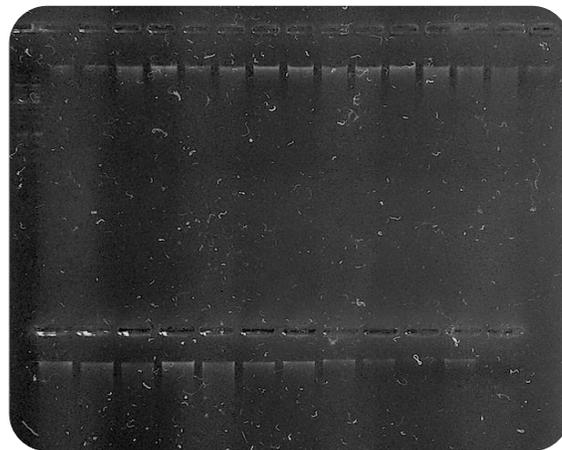
procedimientos antes mencionados; comprobando que la selección de los métodos a realizar (directos) proporciona un porcentaje mayor de recuperación de DNA a comparación de los métodos indirectos.



Metodología I  
(Valenzuela-Encinas)

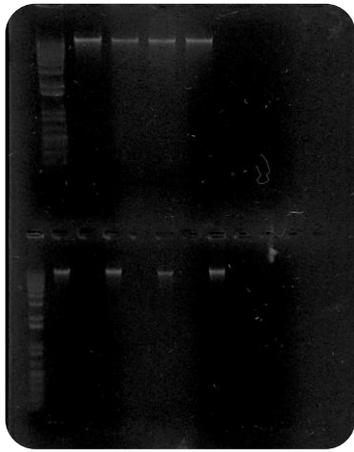


Metodología II  
(Lisis enzimática)

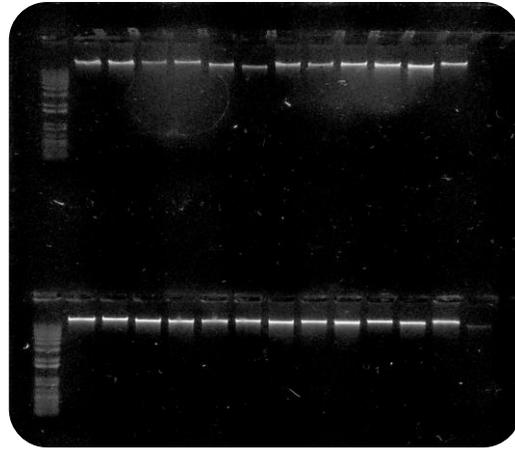


Metodología II  
(Hoffman y Winston)

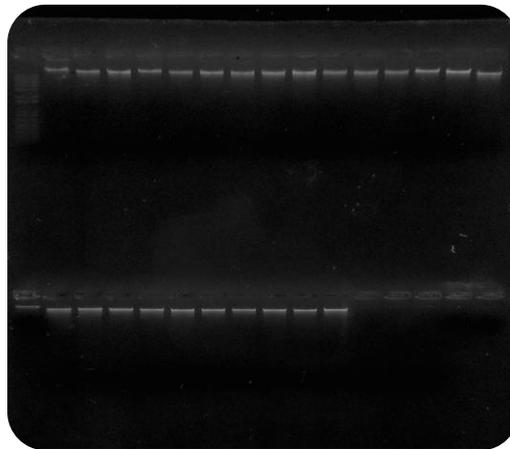
**Figura 3.2** Geles de electroforesis con DNA de suelo rizosférico para el día 0 de muestra.



Metodología I  
(Valenzuela-Encinas)

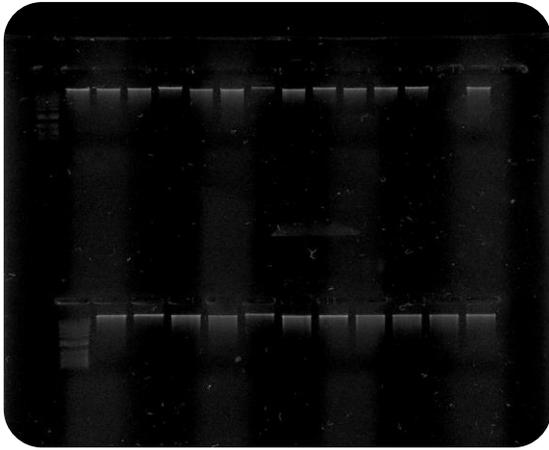


Metodología II  
(Lisis enzimática)

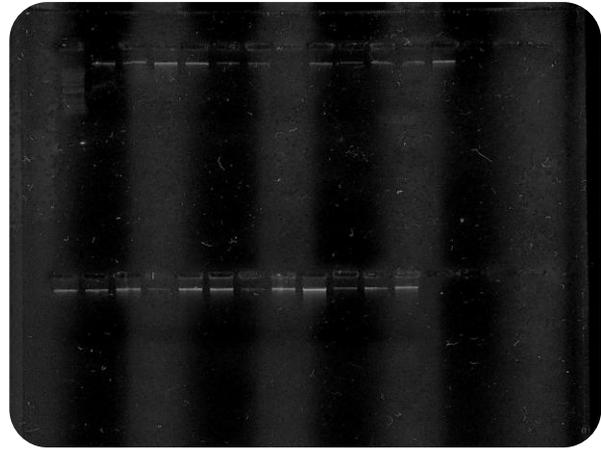


Metodología III  
(Hoffman y Winston)

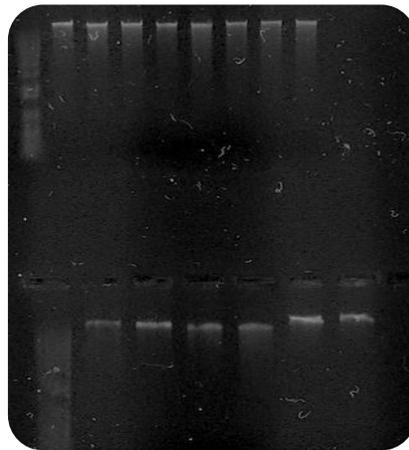
**Figura 3.3** Geles de electroforesis con DNA de suelo rizosférico para el día 45 de muestreo.



Metodología I  
(Valenzuela-Encinas)



Metodología II  
(Lisis enzimática)



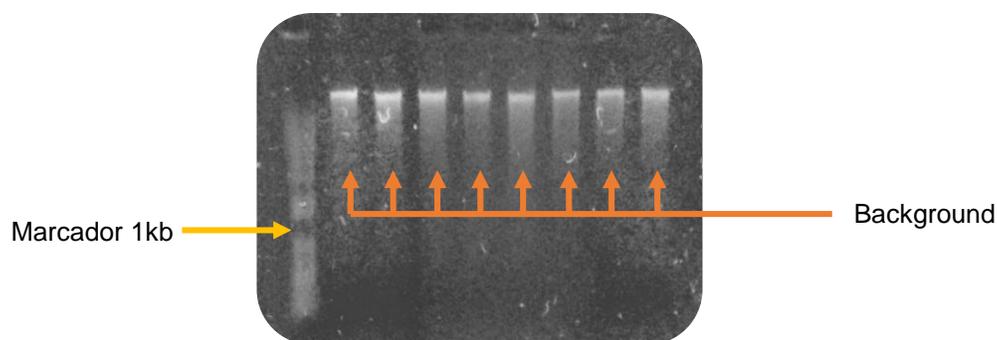
Metodología III  
(Hoffman y Winston)

**Figura 3.4** Geles de electroforesis con DNA de suelo rizosférico para el día 90 de muestreo.

La intensidad de las bandas en los geles varió dependiendo del método de extracción que se utilizó. Esto se puede originar por distintos factores que van desde la textura del suelo, así como los reactivos a utilizar en cada método de extracción.

De igual forma, hay que tomar en cuenta la estructura de las membranas celulares de las bacterias contenidas en el suelo, que varía dependiendo su grupo

taxonómico y algunas son más fáciles de romper que otras; el entorno del suelo complica aún más la extracción al requerir la separación de los ácidos nucleicos de sustancias que interfieren con análisis de ADN, tales como sustancias húmicas presentes en ellos (Maarit Niemi *et al.*, 2001); estas sustancias pueden originar lo que es conocido como “Background” (Figura 3.5) que es la presencia de impurezas de la muestra o DNA fragmentado; si está fragmentado, se observará una banda de más de un cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de la muestra (Cornejo Romero *et al.*, 2014). El ADN fragmentado dificulta la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular y afecta la reproducibilidad de las técnicas. La contaminación por ácidos húmicos y fúlvicos en muestras de DNA se identifica también ya que forman un precipitado color café durante el proceso de purificación. Por lo tanto, para obtener una mejor calidad del DNA que sea visible durante el proceso de extracción y su comprobación por electroforesis, se deben realizar un número de lavados con pirofosfato y buffer de fosfatos, de los cuales se realizaron aproximadamente 14 y 7 a cada muestra, respectivamente. Así también es recomendable realizar más lavados en la etapa de purificación con etanol frío al 70% como lo indica la metodología sólo en caso de ser necesario.



**Figura 3.5** Ejemplo de muestras en gel de agarosa con background. Carril 1: marcador 1Kb, Carril 2-7: DNA extraído de muestras de suelo del día 90 empleando metodología 3

El rendimiento de las extracciones se registró en  $ng/\mu l$ . En la Tabla 3.2 se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación mediante un Nanodrop One.

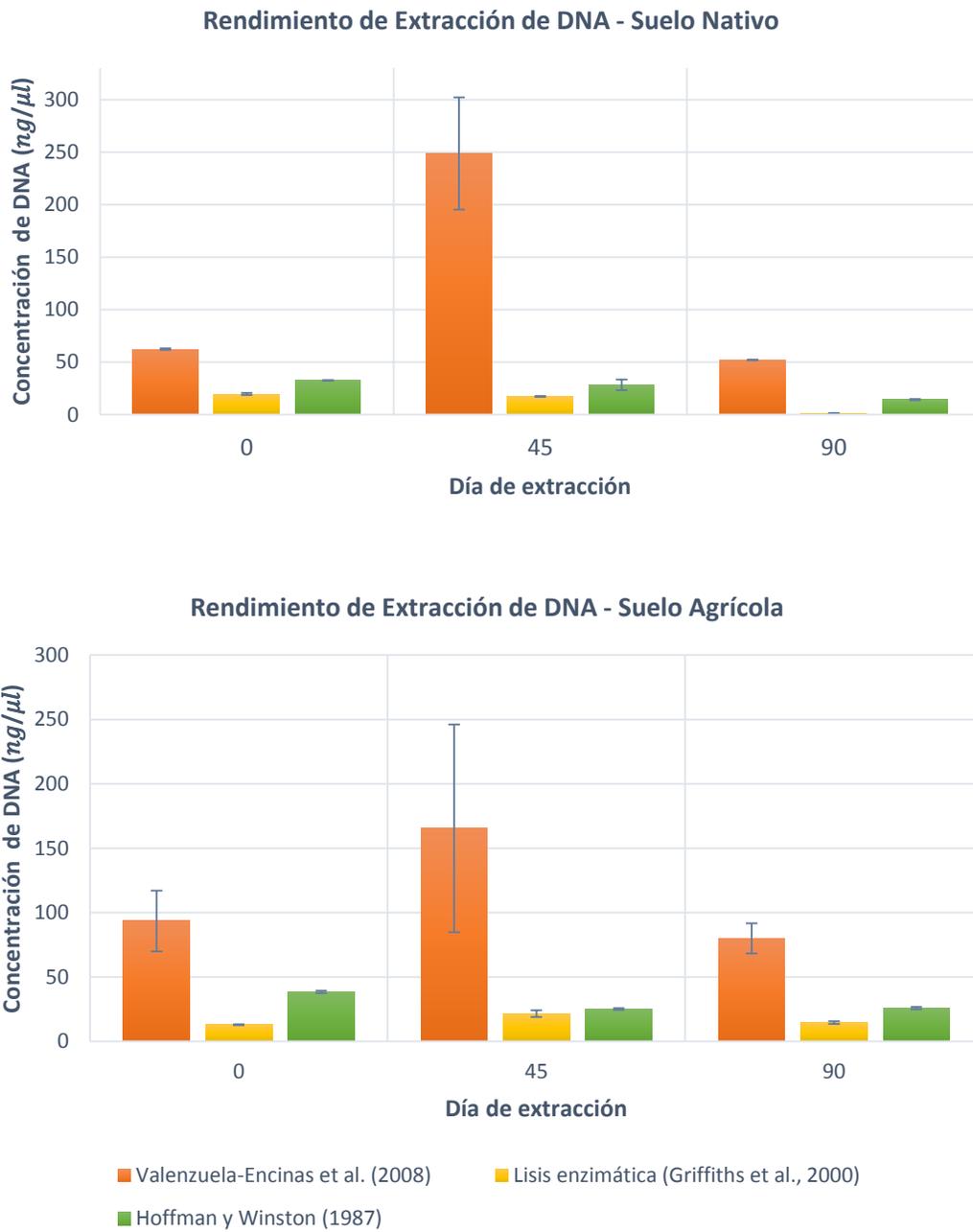
**Tabla 3.2** Evaluación de los rendimientos de extracción de DNA empleando tres metodologías de extracción.

Método de extracción	Tipo de suelo	Cantidad (ng/μl)			$A_{260/280}$			$A_{260/230}$		
		Día 0	Día 45	Día 90	Día 0	Día 45	Día 90	Día 0	Día 45	Día 90
I	Nativo	62.37 ± 0.67 <sup>a</sup>	248.80 ± 53.41 <sup>a</sup>	52.20 ± 0.27 <sup>a</sup>	1.52 ± 0.01	1.27 ± 0.02	1.53 ± 0.01	0.53 ± 0.01	0.75 ± 0.02	0.43 ± 0.01
	Agrícola	93.57 ± 23.57 <sup>a</sup>	165.50 ± 80.69 <sup>a</sup>	80.03 ± 11.73 <sup>a</sup>	1.48 ± 0.07	1.42 ± 0.03	1.45 ± 0.00	0.35 ± 0.04	0.62 ± 0.04	0.38 ± 0.03
II	Nativo	19.67 ± 1.07 <sup>b</sup>	17.233 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.90 ± 0.6 <sup>b</sup>	1.82 ± 0.05	3.20 ± 0.19	-	0.36 ± 0.01	3.20 ± 0.00	0.01 ± 0.01
	Agrícola	13.00 ± 0.36 <sup>b</sup>	21.67 ± 2.55 <sup>b</sup>	14.70 ± 1.05 <sup>b</sup>	2.05 ± 0.04	2.41 ± 0.23	3.21 ± 0.19	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.01
III	Nativo	32.63 ± 0.21 <sup>b</sup>	28.37 ± 5.16 <sup>b</sup>	14.30 ± 0.53 <sup>b</sup>	2.04 ± 0.01	1.79 ± 0.07	2.86 ± 0.06	0.40 ± 0.01	1.79 ± 0.02	0.74 ± 0.01
	Agrícola	38.37 ± 0.95 <sup>b</sup>	25.20 ± 0.62 <sup>b</sup>	25.93 ± 0.92 <sup>b</sup>	1.92 ± 0.02	1.93 ± 0.00	1.85 ± 0.03	0.51 ± 0.00	0.41 ± 0.01	0.31 ± 0.01

I – Valenzuela-Encinas *et al.* (2008).

II – Griffiths *et al.* (2000).

III – Hoffman and Winston (1987).



**Figura 3.6** Rendimiento de extracción de DNA para diferentes días de muestreo en dos tipos de suelo diferentes.

Como se observa en las gráficas, evidentemente el método de Valenzuela-Encinas *et al.* (2008) es el que refleja un mejor rendimiento de DNA obtenido a comparación de los otros dos métodos, cabe destacar que los químicos más utilizados para este fin y que pueden observarse en el Anexo 1: el SDS (dodecil sulfato de sodio), que disuelve más fácilmente el material hidrófobo de las membranas celulares (Robe *et al.*, 2003), sin embargo, los métodos ocupados no utilizan las mismas cantidades de éstos compuestos para llevar a cabo la lisis, lo que puede afectar en la cantidad obtenida de DNA; también el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) que aumenta la resistencia de los tampones de extracción y lisis dando como resultado rendimientos mayores, pero menor pureza de ácidos nucleicos aislados, ya que en las muestras puede encontrarse material genético de otros microorganismos. Así también, al realizar este método físico, la estructura del suelo se destruye teniendo el mayor acceso de la comunidad microbiana, incluyendo las bacterias profundas dentro de los microagregados del suelo, éstos microorganismos son sometidos a fuerzas de tensión y expansión capaces de crear rompimiento, lo que hace que el DNA esté más disponible para futuros procesos de la extracción y purificación.

Para evaluar la calidad de DNA se utilizaron los valores de las absorción de las muestras por nanoespectrofotometría con las relaciones 260/230 y 260/280, como indicadores de la presencia o ausencia de ácido húmico, los polisacáridos o impurezas de proteínas (Thakuria *et al.*, 2008). Una relación 260/230 mayor a 2 indica que las muestras de suelo están libre de impurezas de ácidos húmicos y fúlvicos, mientras que la relación 260/280 mayor a 1.7 indica que las muestras están libres de contaminantes como proteínas (Manzano Gómez, 2015).

En la Tabla 3.2 se aprecia que en las muestras tratadas con los métodos II y III, la relación 260/280 fue mayor a 1.7, indicando que esas muestras no están contaminadas por compuestos mencionados anteriormente; respecto al método I, la relación obtenida refleja lo contrario a lo esperado, los valores son menores a 1.7, confirmando la desventaja de utilizar éste método físico. Evidentemente para la

relación 260/230, todas las muestras a excepción de una presenta contaminación posiblemente por la falta de lavados iniciales a las muestras de suelo o por una purificación del DNA extraído poco eficiente.

## 8. CONCLUSIONES

Se comprobó mediante la concentración de DNA obtenido, que la población microbiana aumentó conforme transcurrió el tiempo del experimento, el método de extracción más eficiente en cuanto a cantidad fue el método modificado de Valenzuela-Encinas, al extraer un promedio aproximado de 117 ng/ $\mu$ l, valor más alto en comparación con los otros dos métodos empleados; Los métodos de extracción de DNA metagenómico presentaron diferentes dificultades que permitieron obtener DNA de buena calidad, la cuantificación por espectrofotometría confirmó el nivel de pureza que resulta de cada método a utilizar por ello una alternativa conveniente es realizar más lavados de pirofosfato y buffer de fosfatos a las muestras de suelo para una mejor eliminación de materia orgánica y así obtener un DNA íntegro y sin impurezas en el caso del método modificado de Valenzuela-Encinas (relación 260/280=1.7), de tal forma que la pérdida de material genético sea mínima para futuros análisis como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciamiento de las mismas.

Sin embargo, dados los resultados presentados en el proyecto al cual se contribuyó, es probable que la aplicación de vermicomposta a una tasa de fertilización de 150 kg N/ha no haya sido la adecuada, ya que esta condición no tuvo un efecto significativo en las variables de crecimiento de la planta de *Moringa oleífera*, recordemos que la actividad biológica y el aumento de las comunidades microbianas dependen también de las condiciones de crecimiento de la planta.

La obtención de resultados confiables es importante ya que permitirá la construcción de librerías metagenómicas de las comunidades microbianas involucradas en diferentes procesos bioquímicos en el suelo y sobre todo de la planta.

## 9. COMPETENCIAS DESARROLLADAS

- **Capacidad de comunicación:** Habilidad de transmitir ideas y opiniones hacia el asesor.
- **Trabajo en equipo:** Interés, predisposición y capacidad para trabajar con otros y perseguir metas comunes en el laboratorio
- **Compromiso con el laboratorio:** Capacidad y voluntad de implicarse en prioridades y necesidades del grupo de trabajo y de las instalaciones.
- **Capacidad de adaptación:** Habilidad de trabajar eficientemente en diferentes situaciones con distintas personas.
- **Capacidad de planificación y organización:** Priorización de tareas y actividades en el laboratorio de manera que se puedan lograr los resultados esperados de acuerdo al cronograma de actividades.
- **Iniciativa:** Habilidades que permiten actuar de manera eficaz ante imprevistos y problemas buscando una solución rápida; evitando problemas futuros.
- **Creatividad:** Idealización de alternativas para realizar el trabajo, en dado caso de falta de material o problemáticas en el laboratorio.
- **Uso solvente de los recursos de información:** Capacidad para encontrar, relacionar y estructurar información proveniente de diversas plataformas electrónicas y de integrar ideas y conocimientos.
- **Automotivación:** Importancia en la satisfacción personal, necesidad de alcanzar los objetivos establecidos con éxito y mejorar académica y profesionalmente.
- **Tolerancia al estrés:** Dominio del carácter ante acumulación de tareas o responsabilidades, de tal forma que se realicen bien las actividades.
- **Independencia:** Decisiones basadas en las propias convicciones.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Artavia, S., Uribe, L., Sabo, F., Arauz, L. F., & Castro, L. (2010). Efecto de la aplicación de abonos orgánicos en la supresión de *Pythium myriotylum* en plantas de Tiquisque (*Xanthosoma sagittifolium*). *Agronomía Costarricense*, 34(1), 17-29.
- Abedoye, M. K., Iwuafor, E. N., & Agbenin, J. O. (2006). The effects of crop rotation and nitrogen fertilization on soil chemical and microbial properties in a Guinea Savanna Alfisol of Nigeria. *Plant and soil*, 97-107.
- Alberts , B., Johnson , A., & Lewis , J. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26821/>
- Bautista Cruz, A., Etchevers Barra, J., del Castillo, R. F., & Gutiérrez, C. (2004). La calidad del suelo y sus indicadores. *Ecosistemas*, 90-97.
- Bonilla Rosso, G., Souza, V., & Eguiarte, L. E. (2008). Metagenómica, Genómica y Ecología Molecular: La nueva Ecología en el Bicentenario de Darwin. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 11(1), 41-51.
- Campillo R., R., & Sadzawka R., A. (2006). La acidificación de los suelos. Origen y mecanismos involucrados. *Manejo de los recursos naturales en el sistema de incentivos para la recuperación de suelos degradados de la Araucanía. Serie Actas*, 44-60.
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *U.D.C.A Act. & Div. Científica*, 14(2), 15-31.
- Coats, V. C., & Rumpho, M. E. (2014). The rhizosphere microbiota of plant invaders: an overview of recent advances in the microbiomics of invasive plants. *Frontiers on Microbiology*, 5.
- Cordero Ramírez, J., López Rivera, R., Calderón Vázquez, C., Figueroa López, A., Martínez Álvarez, J., Leyva Madrigal, K. Y., . . . Maldonado Mendoza, I. E. (2012). Microorganismos asociados a la rizosfera de jitomate en un agroecosistema del valle de Guasave, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 712-730.
- Cornejo Romero, A., Serrato Díaz , A., Rendón Aguilar, B., & Rocha Minuve, M. G. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos*. Distrito Federal, México: SEMARNAT.
- Dania, S. O., Akpansubi, P., & Eghagara, O. O. (2014). Comparative Effects of Different Fertilizer Sources on the Growth and Nutrient Content of Moringa (*Moringa oleifera*) Seedling in a Greenhouse Trial. *Advances in Agriculture*, 1-6.

- Domínguez Mendoza, C. A., Bello López, J. M., Navarro Noya, Y. E., de León Lorenzana, A. S., Delgado Balbuena, L., Gómez Acata, S., . . . Dendooven, L. (2014). Bacterial community structure in fumigated soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 73, 122-129.
- Esquivel Cote, R., Gavilanes Ruiz, M., Cruz Ortega, R., & Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC Desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Revista Fitotécnica Mexicana*, 36(3), 251 - 258.
- Eulloque Guerrero, J. (2013). *Caracterización física, química, biológica y valoración agronómica del vermicompost de Eisenia foetida obtenido del contenido ruminal de bovino*. Michoacán, México: Instituto Politécnico Nacional.
- FAO. (2010). *La Agricultura Orgánica*. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/meeting/X0075s.htm>
- FAO. (2014). *Portal de Suelos de la FAO*. Obtenido de Suelos Ácidos: <http://www.fao.org/soils-portal/manejo-del-suelo/manejo-de-suelos-problematicos/suelos-acidos/es/>
- Faria , F., Neelam, P., & Smita , R. (2014). An Improved Method for Soil DNA Extraction to Study. *the Microbial Assortment within Rhizospheric Region*.
- García de Salamone, I. E. (2011). Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. *Revista Argentina de Microbiología*, 43, 1-3.
- Gopalakrishnan, L., Doriy, K., & Devarai Santhosh , K. (2016). Moringa oleifera: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness*, 5, 49-56.
- Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G., & Bailey, M. J. (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community Composition. *Applied and environmental microbiology*, 5488-5491.
- Gutiérrez Miceli, F., Santiago Borraz, J., Montes Molina, J. A., Náfate, C. C., Abud Archila, M., Oliva Llaven, M. Á., . . . Dendooven, L. (2007). Vermicompost as a soil supplement to improve growth, yield and fruit quality of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Bioresource Technology*, 98, 2781–2786.
- Hernández León, R., Velázquez Sepúlveda, I., Orozco Mosqueda, M. C., & Santoyo, G. (2010). Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 79, 133-139.
- Hernández Rodríguez, A., Heydrich Pérez, M., Velázquez del Valle, M. G., & Hernández Lauzardo, A. N. (2006). Perspectivas del Empleo de Rizobacterias Como Agentes de Control Biológico en Cultivos de Importancia Económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 42-49.

- Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 267-272.
- IFA, & FAO. (2002). *Los fertilizantes y su uso*. Roma: FAO. Obtenido de Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes.
- Interiano Santos, E. C. (2015). *Determinación del crecimiento y el perfil proteómico de hojas de Moringa oleifera cultivada con vermicomposta y roca fosfórica*. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Jaurixje, M., Torres, D., Mendoza, B., Henriquez, M., & Contreras, J. (2013). Propiedades físicas y químicas del suelo y su relación con la actividad biológica bajo diferentes manejos en la zona de Quíbor, estado Lara. *Bioagro*, 25(1), 47-56.
- Kloepper, J. W., & Schroth, M. N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *In Proc. of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. G Clarey (ed). *Station de pathologievegetale et phyto-bacteriologie*, 879-882.
- Kremer, R. J. (2014). Environmental Implications of Herbicide Resistance: Soil Biology and Ecology. *BioOne*, 415-426.
- Kumar Sain, R., Sivanesan, I., & Keum, Y.-S. (2016). Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. *Biotech*, 6, 203-2015.
- Li, X., Rui, J., Xion, J., Li, J., He, Z., Zhou, J., . . . Mackie, R. I. (2014). Functional Potential of Soil Microbial Communities in the Maize Rhizosphere. 9(11).
- Luo, H., Qi, H., Xue, K., & Zhang, H. (2003). A preliminary application of PCR-DGGE to study microbial diversity in soil. *Acta Ecológica Sinica*, 23, 1570-1573.
- Maarit Niemi, R., Heiskanen, I., Wallenius, K., & Lindström, K. (2001). Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *Journal of Microbiological Methods*, 155-165.
- Machado Siqueira, G. (2009). Medida de la conductividad eléctrica aparente del suelo por inducción electromagnética y variabilidad espacial de las propiedades físicas y químicas del suelo. Santiago de Compostela, España: Universidad de Santiago de Compostela.
- Manzano Gómez, L., A. (2015). Estudio del perfil metabolómico de hojas de *Moringa oleifera* fertilizadas con vermicomposta. *Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez*.
- Marschner, P., Crowley, D., & Yang, C. H. (2005). Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and soil*, 261, 199-208.
- Mocali, S., & Benedetti, A. (2010). Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology*, 161, 497-505.

- Nouman, W., Anwar, F., Gull, T., Newton, A., Rosa, E., & Domínguez Perles, R. (2016). Profiling of polyphenolics, nutrients and antioxidant potential of germplasm's leaves from seven cultivars of *Moringa oleifera* Lam. *Industrial Crops and Products*, 83, 166–176.
- Ostrowska, A., & Porebska, G. (2014). Assessment of the C/N ratio as an indicator of the decomposability of organic matter in forest soils. *Ecological Indicators*, 49, 109-104.
- Padayachee, B., & Baijnath, H. (2012). An overview of the medicinal importance of Moringaceae. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(48), 5831-5839.
- Padilla, C., Fraga, N., & Suárez, M. (2012). Efecto del tiempo de remojo de las semillas de moringa (*Moringa oleífera*) en el comportamiento de la germinación y en indicadores del crecimiento de la planta. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 46(4), 419-421.
- Panke Buisse, K., Poole, A. C., Goodrich, J. K., & Ley, R. E. (2015). Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. *The ISME Journal*, 9, 980–989.
- Pereira, M., Cardoso de Souza Neta, L., Ferreira Montes, M. P., Nascimento Souza, A., Carvalho Matos, T., de Lima Sanchdev, R., . . . Flores, A. V. (2013). An Overview of the Environmental Applicability of Vermicompost: From Wastewater Treatment to the Development of Sensitive Analytical Methods. *Scientific World Journal*, 14.
- Perspectivas del Empleo de Rizobacterias Como Agentes de Control Biológico en Cultivos de Importancia Económica. (2006). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 42-49.
- Rada T., A., & Taboada L., G. (2002). Métodos de obtención y purificación de ADN humano para su aplicación en Genética Molecular. *BIOFARBO*, 6, 63-68.
- Ramos Agüero, D., & Terry Alfonso, E. (2014). Generalidades de los abonos orgánicos: Importancia del Bocashi como alternativa nutricional para suelos y plantas. *Cultivos Tropicales*, 35(4), 52.59.
- Ramos, E., & Zúñiga, D. (2008). Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel laboratorio. *Ecología Aplicada*, 123-130.
- Reyes, I., & Valery, A. (2007). Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. *Bioagro*, 19(3), 117-126.
- Reyes, I., & Valery, A. (2007). Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. *Bioagro*, 117-126.
- Robe, P., Nalin, R., Capellano, C., Vogel, T. M., & Simonet, P. (2003). Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology*, 183-190.

- Robe, P., Reanud, N., Capellano, C., Moguel, T. M., & Simonet, P. (2003). Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology*, 39, 183–190.
- Ruíz Valdiviezo, V. M., Luna Guido, M., Galzy, A., Gutiérrez Miceli, F. A., & Dendooven, L. (2010). Greenhouse gas emissions and C and N mineralization in soils of Chiapas (México) amended with leaves of *Jatropha curcas* L. *Applied Soil Ecology*, 46, 17–25.
- SAG. (2007). *Agricultura orgánica nacional: Bases técnicas y situación actual*. Chile: Gobierno de Chile, obtenido de: [http://www.sag.cl/sites/default/files/agricultura\\_org.\\_nacional\\_bases\\_tecnicas\\_y\\_situacion\\_actual\\_2013.pdf](http://www.sag.cl/sites/default/files/agricultura_org._nacional_bases_tecnicas_y_situacion_actual_2013.pdf)
- Saini, R. K., Shetty, N. P., Prakash, M., & Giridhar, P. (2014). Effect of dehydration methods on retention of carotenoids, tocopherols, ascorbic acid and antioxidant activity, in *Moringa oleifera* leaves and preparation of a RTE product. *J Food Sci Technol*, 51(9), 2176–2182.
- Sambrook J., Rusell DW. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saxton, K. E., & Rawls, W. J. (2006). Soil Water Characteristic Estimates by Texture and Organic Matter for Hydrologic Solutions. *Soil Science Society of America Journal*, 1569-1578.
- Sosa Torres, V. (2012). *Efecto de la adición de vermicomposta en la mineralización de carbono y biomasa microbiana en un suelo agrícola*. Michoacán: Instituto Politécnico Nacional.
- Thakuria, D., Schimidt, O., Mac Siúrtáin, M., Egan, D., & Doohan, F. M. (2008). Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 1390-1403.
- Coats, V., Rumpho, M. (2014). The rhizosphere microbiota of plant invaders: an overview of recent advances in the microbiomics of invasive plants. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Trinidad Santos, A. (2010). Abonos orgánicos. *Sistema de Agronegocios Agrícolas: SAGARPA*.
- Valenzuela-Encinas C., Neria-González I., Alcántara-Hernández R. J., Enríquez-Aragón J. A., Estrada-Alvarado I., Hernández-Rodríguez C., Dendooven L., Marsch R. (2009). Phylogenetic analysis of the archeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles*, 12, 247-254.
- Vital López, L., Cruz Hernández, M., & Fernández Dávi, S. (2015). Diversidad bacteriana en raíces de maíz híbrido convencional y genéticamente modificado. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 84, 233-243.

Vivas, A., Moreno, B., García Rodríguez, S., & Benitez, E. (2009). Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresource Technology*, 1319–1326.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### Soluciones para extracción y purificación de DNA

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

Pesar 16.72 g de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  y adicionar en 200 ml de agua destilada hasta disolver, aforar a 250 ml. Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

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

Pesar 5.17 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y disolver en 200 ml de agua destilada, después ajustar el pH a 8 y aforar a 250 ml. Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente. Esta solución tiene una caducidad de 2 semanas aproximadamente.

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

Pesar 186.1 de  $\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  sal disódica y adicionar a 800 ml de agua destilada. Agitar vigorosamente con una barra magnética. Ajustar a pH 8 con NaOH (aproximadamente 20 g de perlas de NaOH <!). El EDTA no se disuelve hasta que está a pH 8. Aforar a 1 L. con agua destilada. Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

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

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

pH	HCl
7.4	70 ml
7.6	60 ml
8	42 ml

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

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

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

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

Medir 125 ml de Tris-HCl 1M pH 8 y pesar 1.46 g de NaCl y disolver. Pesar 30 g de SDS y disolver en la solución anterior, ajustar a pH 8 y aforar a 250 ml. Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

**7. Solución de lisis de Winston y Hoffman**

10 mM Tris-Cl pH8, 2% (v/v) Tritón X-100, 1% (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0. Esterilizar por filtración con una membrana de 0.22 µm. Almacenar a temperatura ambiente.

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

Medir 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8 y llevar a un volume de 200 ml. Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

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

Pesar 100 mg de Lisozima y disolver en Tris-Cl 10 mM pH 8. Esterilizar por filtración con una membrana de 0.22 µm. Almacenar a 4°C, aunque de preferencia preparar al momento. Asegurarse que la solución de Tris tenga pH 8 o la lisozima no funcionará eficientemente.

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

Pesar 29.4 g de Acetato de potasio y disolver en 60 ml de agua destilada. Adicionar 11.5 ml de ácido acético glacial, y aforar a 100 ml con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

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

Adicionar 23.4 g de NaCl y disolver en 200 ml de H<sub>2</sub>O destilada y después agregar 32.5 g de PEG y aforar a 250 ml con agua destilada. Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

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

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

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

Pesar 242 g de Tris-Base y disolver en 600 ml de agua desionizada. Adicionar 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8 y 57.1 ml de ácido acético glacial. Aforar a 1 l con agua desionizada. Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

**14. Buffer TE × 10 (Tris 100 mM pH 8, 100 mM EDTA pH 8) (para preparar 50 ml)**

Medir 5 ml de Tris 1 M pH 8 y 10 ml de EDTA 0.5 M pH 8. Aforar a 50 ml con agua desionizada. Esterilizar por calor húmedo a 15 lb, 115°C, 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.