

SUBSECRETARIA DE EDUCACION SUPERIOR

DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR
TECNOLÓGICA



SEP

TRABAJO PROFESIONAL
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO BIOQUÍMICO

QUE PRESENTA:

María de los Ángeles Coutiño Coutiño

CON EL TEMA:

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DE
UN SUELO DEL EXLAGO DE TEXCOCO”**

MEDIANTE:

OPCIÓN I

(TESIS PROFESIONAL)

DIRECTORES:

**Dr. Luc Dendooven
M. en C. Erick Ruiz Romero**

ASESOR:

Dra. Teresa del Rosario Ayora Talavera

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

AGOSTO, 2011

El presente trabajo se llevó a cabo en el en el laboratorio de ecología molecular de suelos, del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme esta oportunidad en mi vida y alcanzar un logro más en esta.

A mis padres, por apoyarme siempre en todos mis proyectos, y que sin ellos no habría podido alcanzar esta meta.

Al Dr. Federico Gutiérrez Miceli, por confiar en mí y recomendarme para este trabajo.

A la Dra. Teresa Del Rosario Ayora Talavera por apoyarme y ayudarme en la realización de este trabajo.

A mi querido amigo Erick Ruiz Romero, que gracias a su ayuda incondicional, apoyo y comprensión pude culminar este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio Victor Ruiz y Katia Berenice Sánchez por ser grandes amigos y ayudarme en todo momento.

A mis grandes amigos, Arisbet Santis, Nilda Gabriela, Génesis Ventura, Néstor De la Cruz y Daniel Díaz por estar conmigo toda la carrera y apoyarme en todo momento.

Y al Dr. Luc Dendooven, por aceptarme en su grupo de trabajo y apoyarme.

1.- RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar microorganismos presentes de un suelo salino-alcálico del exlago de Texcoco. El suelo tenía pH de 10.4 y una conductividad eléctrica (CE) de 67.9 dSm^{-1} , siendo así, un suelo salino-alcálico. Se diseñaron y buscaron medios de cultivo para microorganismos halófilos. Teniendo los aislados se realizó la extracción del DNA genómico de las cepas y la amplificación del fragmento ribosomal 16S rRNA por medio de la técnica de PCR. El análisis de las secuencias reveló la presencia de dos especies dentro de la familia *Bacillaceae* los cuales fueron los género *Bacillus* y *Alkalibacillus*. Dentro del género *Bacillus* se encontraron las especies: *B. saliphilus*, *B. clarkii*, *B. haloalkaliphilus*, *B. agaradhaerens*, *B. aurantiacus*, *B. arseniciselenatis*, *B. halodurans*, *B. subtilis*, *B. axarquiensis*, *B.licheniformis*. Y dentro del género *Alkalibacillus* las especies encontradas fueron: *A. silvisoli* y *A. filiformis*.

ÍNDICE

1.- RESUMEN	i
2.- INTRODUCCIÓN	1
3.- MARCO TEÓRICO	2
3.1.- Suelo	2
3.2.- Generalidades del suelo	2
3.3.- Componentes del suelo	2
3.3.1.- Compuestos minerales	2
3.3.2.- Líquidos	3
3.3.3.- Gases	4
3.3.4.- Materia orgánica	4
3.3.5.- Componente biológicos o biótico	5
3.4.- Inicio de la clasificación bacteriana	5
3.5.- 16S rRNA	7
3.6.- Organismos extremófilos	10
3.7.- Halófilos extremos	10
3.8.- Alcalófilos	11
3.9.- Extremoenzimas	12
3.10.- Suelo del exlago de Texcoco	13
3.11.- Comunidades de Texcoco	14
4.- JUSTIFICACIÓN	16
5.- HIPÓTESIS	17
6.- OBJETIVOS.....	17
6.1.- Objetivo General	17
6.2.- Objetivos Específicos	17
7.- MATERIALES Y MÉTODOS	18
7.1.- Sitio de muestreo	18
7.2.- Tamizado de los suelos	18
7.3.- Caracterización fisicoquímica del suelo	19
7.3.1.- pH	19

7.3.2.- Humedad	19
7.3.3.- Textura	19
7.3.4.- Conductividad eléctrica	20
7.3.5.- Capacidad de retención de agua	20
7.3.6.- Nitrógeno total	20
7.3.7.- Carbono orgánico	21
7.3.8.- Carbono inorgánico	21
7.3.9.- Carbono total	22
7.4.- Incubación del suelo.....	22
7.5.- Siembra de microorganismos	22
7.6.- Morfología colonial.....	23
7.6.1.- Tamaño	23
7.6.2.- Color	23
7.6.3.- Forma	23
7.6.4.- Bordes	23
7.6.5.- Elevación	23
7.6.6.- Superficie	23
7.6.7.- Aspecto	23
7.6.8.- Luz reflejada	23
7.6.9.- Luz transmitida	24
7.6.10.- Producción de pigmento	24
7.6.11.- Consistencia	24
7.6.12.- Otras	24
7.7.- Tinción Gram	24
7.8.- Extracción de DNA	25
7.8.1.- Análisis de DNA genómico por electroforesis	25
7.9.- Amplificación del gen 16S rRNA	26
7.9.1.- Selección de oligonucleótidos para la PCR	26
7.9.2.- Condiciones del termociclador	26
7.10.- Protocolo de purificación	27

7.11.- Secuenciación del DNA	27
7.12.- Análisis de las secuencias y construcción de árboles filogenéticos	28
7.13.- Asignación taxonómica	28
7.14.- Conservación de las cepas.....	28
8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
8.1.- Caracterización fisicoquímica	30
8.1.1.- pH	30
8.1.2.- Conductividad eléctrica	30
8.1.3.- Humedad	30
8.1.4.- Capacidad de retención de agua	31
8.1.5.- Carbono orgánico.....	31
8.1.6.- Carbono inorgánico	31
8.1.7.- Nitrógeno	31
8.2.- Medios de cultivo	32
8.3.- Tinción Gram	33
8.4.- Aislamiento de DNA genómico	34
8.5.- Amplificación del 16S rRNA por PCR	35
8.6.- Asignación taxonómica	36
8.7.- Dendograma de las cepas	38
9.- CONCLUSIONES	40
10.- BIBLIOGRAFÍA	41
11.- ANEXOS	45
11.1.- Diagrama de textura	45
11.2.- Medios de cultivo	46
11.2.1- Medio de cultivo A	46
11.2.2- Medio de cultivo B	46
11.2.3- Medio de cultivo C	47
10.3.- Buffer de lisis	47
10.4.- Reactivos para PCR	48
10.5.- Soluciones para la tinción Gram	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Fragmento ribosomal 16S rRNA.....	9
Figura 2.- Árbol filogenético de la vida	10
Figura 3.- Ubicación geográfica del exlago de Texcoco	14
Figura 4.- Clasificación de filotipos de arqueas	15
Figura 5.- Comparación de la composición bacteriana en los tres suelos.....	15
Figura 6.- Etapas de la metodología	18
Figura 7.- Diluciones	22
Figura 8.- Siembra por estría cruzada	23
Figura 9.- Programa para amplificación por PCR	27
Figura 10.- Cepas aisladas en el medio A y C	33
Figura 11.- Bacilos cortos Gram-positivos	34
Figura 12.- Electroforesis de DNA	35
Figura 13.- Productos de amplificación del 16S rRNA	36
Figura 14.- Árbol filogenético de los aislados	39
Figura 15.- Diagrama de textura	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Caracterización fisicoquímica del suelo	19
Cuadro 2.- Iniciadores empleados	26
Cuadro 3.- Caracterización del suelo	32
Cuadro 4.- Morfología microscópica y tinción Gram	34
Cuadro 5.- Asignación taxonómica	37
Cuadro 6.- Medio de cultivo A	46
Cuadro 7.- Antibióticos	46
Cuadro 8.- Medio de cultivo B	46
Cuadro 9.- Medio de cultivo C	47
Cuadro 10.- Buffer de lisis	47
Cuadro 11.- PCR	48
Cuadro 12.- Solución A	48
Cuadro 13.- Solución B	48
Cuadro 14.- Solución C	48
Cuadro 15.- Solución D	49

2.- INTRODUCCIÓN

Hoy en día, es conocido que los ambientes que hasta hace poco eran considerados inhabitables por el hombre están colonizados por determinados organismos capaces de adaptarse a esos nichos ecológicos llamados ambientes extremos; estos organismos son llamados extremófilos (de Felipe y Pozuelo, 2007). Dentro de los extremófilos hay microorganismos que viven y se reproducen en ambientes de elevada temperatura, como las fuentes termales. Otros, por el contrario, se desarrollan en ambientes fríos, próximos al punto de congelación del agua (psicrófilos). Existen otros que toleran valores extremos de pH, tanto bajos (acidófilos) como elevados (alcalófilos). Y también los que sobreviven en ambientes de gran salinidad (halófilos).

Las enzimas extracelulares que permiten desarrollar a los organismos extremófilos en estas circunstancias extremas, revisten particular importancia, ya que por sus características particulares podrían ser de interés para el desarrollo de nuevos productos comerciales. Por ejemplo han sido estudiados las amilasas, pululanasa, celulasas, proteinasas y xilanasas procedentes de hipertermófilos y termófilos extremos (Horikoshi, 1999).

Nuestra zona de estudio el suelo del exlago de Texcoco, es un suelo salino-alkalino, con extremos que van de pH 8.3 a 10.5 y conductividad eléctrica (CE) en extracto saturado de 22 a 150 dS m⁻¹, porcentaje de sodio intercambiable 76 a 98% y la relación de adsorción de sodio de 103 hasta 1718 milímetros (Dendooven *et al.*, 2010).

Un estudio previo en el exlago de Texcoco (Valenzuela *et al.*, 2007; Valenzuela *et al.*, 2009), se identificaron arqueas y bacterias mediante el análisis de las secuencias del 16S rRNA amplificadas a partir de DNA metagenómico extraído directamente de un suelo salino-alkalino del exlago de Texcoco. Algunas secuencias no pudieron ser identificadas por no estar relacionadas con ninguna de las reportadas.

3.- MARCO TEÓRICO

3.1.- Suelo

Se le llama suelo al material exterior poco compacto de la corteza terrestre. La fracción mineral de este se origina de la desintegración y descomposición (intemperización) de las rocas a través de cientos de años, debido a que el agua de lluvia penetra entre las rocas y, al congelarse se rompen formando piedras más pequeñas. Las raíces de las plantas continúan desmenuzando las rocas aún más y los microorganismos ayudan a formar el suelo produciendo humus (Alexander, 1994).

3.2- Generalidades del suelo

El suelo es esencial para la vida, como lo es el aire y el agua, y cuando es utilizado de manera prudente, puede ser considerado como un recurso renovable. Es un elemento de enlace entre los factores bióticos y abióticos y se le considera un hábitat para el desarrollo de las plantas. Es un sistema heterogéneo en el cual los minerales, la materia orgánica, el aire y el agua se interrelacionan y son afectados por la acción de factores climáticos, microorganismos, plantas y animales e incluso por el hombre. Desde el punto de vista funcional el suelo es considerado como la capa del planeta que provee el sustrato que hace posible la vida vegetal y animal. Es en este sistema donde los cultivos crecen para alimentar al mundo pero también es en suelo en donde los microorganismos funcionan como agentes biogeoquímicos.

Gracias al soporte que constituye el suelo es posible la producción de los recursos naturales, por lo cual es necesario comprender las características físicas y químicas para propiciar la productividad y el equilibrio ambiental (sustentabilidad).

3.3- Componentes del suelo

Los componentes del suelo se pueden dividir en compuestos minerales, líquidos, gases, materia orgánica y el componente biológico o biótico.

3.3.1) Compuestos minerales: este conjunto de componentes representa lo que podría denominarse el esqueleto mineral del suelo y entre estos componentes sólidos del suelo destacan:

- Silicatos, tanto residuales o no completamente meteorizados, (micas, feldespatos, y fundamentalmente cuarzo). Como productos no plenamente formados, singularmente los minerales de arcilla (caolinita, illita, etc.).
- Óxidos e hidróxidos de hierro (hematites, limonita, goetita) y de aluminio (gibbsite, bohemita), liberados por el mismo procedimiento que las arcillas.
- Clastos y granos poli minerales como materiales residuales de la alteración mecánica y química incompleta de la roca originaria.
- Otros diversos compuestos minerales cuya presencia o ausencia y abundancia condicionan el tipo de suelo y su evolución.
 - Carbonatos (*calcita, dolomita*).
 - Sulfatos (*aljez*).
 - Cloruros y nitratos.

3.3.2) Líquidos, esta fracción está formada por una disolución acuosa de las sales y los iones más comunes como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , NO_3^- , así como por una amplia serie de sustancias orgánicas. La importancia de esta fase líquida en el suelo estriba en que éste es el vehículo de las sustancias químicas en el seno del sistema.

El agua en el suelo puede estar relacionada en tres formas diferentes con el esqueleto sólido:

- La primera, está constituida por una película muy delgada, en la que la fuerza dominante que une el agua a la partícula sólida es de carácter molecular, y tan sólida que esta agua solamente puede eliminarse del suelo en hornos de alta temperatura. Esta parte del agua no es aprovechable por el sistema radicular de las plantas.
- La segunda es retenida entre las partículas por las fuerzas capilares, las cuales, en función de la textura pueden ser mayores que la fuerza de la gravedad. Esta porción del agua no percola, pero puede ser utilizada por las plantas.
- Finalmente, el agua que excede al agua capilar, que en ocasiones puede llenar todos los espacios intersticiales en las capas superiores del suelo, con el tiempo percola y va a alimentar los acuíferos más profundos. Cuando todos los espacios intersticiales están llenos de agua, el suelo se dice saturado.

3.3.3) Gases, principalmente dióxido de carbono, oxígeno y nitrógeno. Estos gases ocupan los espacios, sin agua, entre las partículas de tierra; sin embargo, suelen encontrarse pequeñas cantidades de ellos, principalmente dióxido de carbono disuelto en agua. La cantidad de gases en el suelo están tanto relacionadas con la cantidad de humedad.

3.3.4) La materia orgánica se encuentra sobre todo en la capa superior del suelo, que es la más fértil. Es propensa a la erosión y necesita ser protegida por una cubierta vegetal que sea fuente permanente de materia orgánica. La vida vegetal y la fertilidad del suelo son procesos que se propician mutuamente, y la materia orgánica es el puente entre ambos. Pero ésta es también alimento de las bacterias, hongos, pequeños insectos y otros organismos que viven en el suelo y convierten el estiércol y los tejidos muertos en nutrientes y en las increíbles sustancias descritas, que al alimentarse descomponen la materia orgánica. Ésta debe ser repuesta constantemente si no, desaparece lentamente del suelo. Cuando los microorganismos y otros organismos vivos en el suelo descomponen la materia orgánica, producen energía para ellos mismos y liberan minerales y CO_2 en el proceso. Por cada kilogramo de materia orgánica que es descompuesta, se libera a la atmósfera 1.5 kilogramos de CO_2 . La materia orgánica del suelo se mide en porcentaje. Uno por ciento significa que por cada kilogramo de suelo, 10 gramos son materia orgánica. Según la profundidad del suelo, puede equivaler a una relación de entre 20 y 80 toneladas por hectárea. La cantidad de materia orgánica necesaria para asegurar la fertilidad del suelo varía mucho según haya sido su proceso de formación, qué otros componentes posee, las condiciones climáticas locales. En general, un 5% de materia orgánica en el suelo es, en la mayoría de los casos, un mínimo adecuado de suelo saludable, aunque para algunos suelos las mejores condiciones para el cultivo se consiguen cuando el contenido de materia orgánica supera el 30%. Según una amplia gama de estudios, los suelos agrícolas en Europa y Estados Unidos han perdido, en promedio, de 1 a 2% de materia orgánica en los 20 a 50 centímetros superiores. Este dato puede ser una subestimación ya que casi siempre el punto de comparación es el nivel de principios del siglo XX, cuando muchos suelos ya estaban sometidos a procesos de industrialización y por tanto podrían haber perdido, ya entonces, importantes cantidades de materia orgánica.

Algunos suelos del Medio Oeste agrícola de Estados Unidos, que en los años 50s solían contener un 20% de carbono, en la actualidad, llegan apenas a 1 o 2% (Paustian, 2010).

3.2.5) Componente biológico o biótico, está constituido principalmente por una microbiota diversa y variable de bacterias, algas, virus, habitantes de la rizósfera y micofauna; las variaciones en las condiciones climáticas pueden favorecer a algunos tipos fisiológicos y las interacciones entre las especies microbianas ejercen importantes efectos sobre los miembros de la población.

3.4.- Inicio de la clasificación bacteriana

La clasificación procarionte es una joven y dinámica clasificación entre los organismos vivientes. Los procariontes ni siquiera se sabía que existían hasta hace unos siglos, debido a su pequeño tamaño y el hecho que no se pueden ver a simple vista. Además el desarrollo de un sistema de clasificación basado en características morfológicas como el de los eucariontes superiores, ha sido difícil, debido a la simplicidad de los procariontes (Rosello-Mora y Amann, 2001). La mayoría de los microscopistas del siglo XVII y XVIII, describen las primeras observaciones de microorganismos pero no realizan una clasificación. Inicialmente los procariontes son tratados como una simple especie la cual puede desarrollar diferentes formas (pleomorfismo). Las tentativas más tempranas de crear una clasificación bacteriana estaban únicamente basadas en observaciones morfológicas. A finales del siglo XVIII, Otto Müller fue el primero en intentar un arreglo sistemático de los microorganismos (Logan, 1994). Él creó dos formas de géneros, *Mona* y *Vibrio*, en que diferenció y clasificó dos tipos de bacterias: puntiformes y alargados.

A principios del siglo XIX, Christian Ehrenberg extendió la nomenclatura de Müller y agregó bacterias helicoidales. Subsecuentemente, idearon una clasificación simple aunque todavía basada en la morfología microscópica. Ellos asumieron la constancia de las formas, a la vez que todavía eran sostenidas las teorías de la generación espontánea y pleomorfismo.

En 1870, Ferdinand Cohn todavía apoyaba la idea de que las formas bacterianas eran constantes, independientemente de las condiciones ambientales, pero él ya reconoció la existencia de una amplia diversidad de bacterias. Reconoció las semejanzas entre las cianobacterias (*schizophyceae*, “alga de fisión”) y bacterias (*schizomycetes*, “hongo de fisión”) y los combinó como *schizophytae* (“plantas de fusión”) (Schlegel, 1999). Finalmente

agrupó las bacterias en seis formas de géneros, apreciando las fisiologías, los productos finales y la patogénesis de organismos similares en forma.

Robert Koch en 1876, demostró la verdad de la teoría germinal de las enfermedades, anteriormente postulada por Luis Pasteur, con sus estudios sobre *Bacillus anthracis* (Logan, 1994) y más tarde llegó a la conclusión de que existían diferentes morfologías de bacterias patógenas, lo cual debían considerarse que pertenecen a distintas especies.

Uno de los pasos más importantes en el desarrollo de la microbiología fue la habilidad de aislar organismos en colonias puras. En 1872, Cohns trabajó con Joseph Shroeter cultivando colonias puras de bacterias cromogénicas y en 1878 Joseph Lister obtiene colonias puras de leche fermentada (ácida) por medio de dilución. En 1881, Koch publicó la técnica de cultivar en medio sólido de gelatina, que fue sustituido posteriormente por el agar, y éste fue el principio de lo que se le llamó “la edad de oro de la microbiología médica” (Schlegel, 1999), que se enfocó en el aislamiento de microorganismos, en los que los investigadores eran capaces de recuperar la información directa de los organismos.

La cantidad de bacterias que fueron descritas al final del siglo XIX y al principio de las primeras dos décadas del siglo XX fue impresionante. Lemman y Neuman publicaron en 1896 el libro “Atlas y diseño de bacterias” en donde varios géneros fueron descritos (*Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Actinomycetes*). Winogradsky y Beijerinck publicaron varios nombres nuevos de géneros, que describen la ecología, la fisiología y bioquímica de los organismos (Schlegel, 1999).

Se incrementó el número de bacterias aisladas y los taxonomistas bacterianos sugerían una mejor metodología de clasificación para estos. A finales de los 50s, la taxonomía numérica fue desarrollada en paralelo al inicio de la era de las computadoras como parte de un análisis multivariado. Su objetivo era elaborar un conjunto de métodos coherentes para la clasificación de organismos. Gran parte del desarrollo de la taxonomía numérica en bacteriología, vino del problema de la manipulación en las largas tablas de datos sobre fisiología, bioquímica y otras propiedades de las cepas. Por lo tanto, había la necesidad de un método de análisis taxonómico, con el objetivo de la clasificación individual de las cepas bacterianas en grupos homogéneos, convencionalmente especies y el arreglo de las especies en los géneros y en grupos más altos (Sneath, 1989). El periodo de la taxonomía numérica

coincidió con el auge de la quimiotaxonomía y la aplicación de técnicas modernas de análisis bioquímicos, como electroforesis y cromatografía, los cuales son métodos de separación.

Durante la década de los 60s, incremento el conocimiento de las propiedades del DNA y el desarrollo de la biología molecular apoyando la idea de que las bacterias pueden ser clasificadas mejor en comparación de sus genomas. Inicialmente la base de la composición de DNAs (mol% G+C) fue usada. Las bacterias cuyo mol% de G+C diferían en valores, obviamente no eran de la misma especie. Además, valores individuales obtenidos por el análisis de bases de DNA permite sólo comparaciones muy superficiales y era necesario un método más preciso. Así, la técnica de hibridación de DNA fue desarrollada (Brenner *et al.*, 1969). Una gran ventaja práctica de este método es que a menudo definimos los grupos de cepas que solo limitan los rasgos fenotípicos (Krieg, 1988).

3.5.- 16S rRNA

Al final de la década de los 70s, se obtuvo un notable avance en determinar las relaciones de diversidad bacteriana, mediante la catalogación del RNA ribosomal (Stackebrandt *et al.*, 1985) y la hibridación DNA-RNA (De Ley y De Smedt., 1975), y a mediados de los 80s, el análisis de la secuenciación completa del rDNA, demostró ser un marcador molecular útil para el análisis filogenético (Ludwig y Schleifer, 1994).

Entre las tres moléculas de rDNA, el rDNA 16S es la más estudiada (Maidak *et al.*, 1997). Proviene de la secuencia del DNA codificante para el 16S rRNA (16S rDNA). La conclusión de estos estudios son basados en la hipótesis que los genes del rRNA son altamente conservados, porque es una molécula que tiene un papel importante en el ribosoma para la síntesis de proteínas. El rDNA es una molécula con carácter universal, es constantes y tiene una limitada función, la cual, se estableció en una temprana fase de la evolución, y esta molécula, no es afectada por cambios en el medio ambiente de los organismos. Por lo tanto, y porque son grandes moléculas que contienen la información genética, ellos son escogidos como la base molecular para la reconstrucción de la filogenia al menos en los procariones (Woese, 1992). Además, la transferencia lateral de los genes, no ha ocurrido entre los genes de rDNA, y la evolución ha sido similar entre las secuencias de rDNA (Goodfellow, 1997). Si esto ocurre, las variaciones de la estructura del rDNA primario en los procariones tendrá un efecto en la distancia evolutiva entre los organismos.

Los tres genes de rRNA el 23S, 16S y 5S son clasificadas por ultracentrifugación. Ellas tienen cambios en las longitudes de las cadenas de 3300, 1650 y 120 nucleótidos, respectivamente.

Recientemente, la secuenciación completa de la molécula de rDNA no era una rutina factible. En vez de eso, la secuencia era directamente analizada como la hibridación de DNA-RNA para obtener un catálogo de nucleótidos (Stackebrandt *et al.*, 1985). Inicialmente la secuencia del 5S rRNA era usada para inferencias filogenéticas. Sin embargo, la información obtenida no era suficiente, de ahí que el empleo del 16S rRNA, proporciona mayor información. La molécula del 23S rRNA tiene mayor información que la de la 16S rRNA, y en muchos casos tiene una mayor resolución en la reconstrucción filogenética (Ludwig *et al.*, 1998). Sin embargo debido a su longitud, su secuencia no ha sido tan popular en las bases de datos como el 16S rRNA, porque ésta es una molécula de menor tamaño.

El 16S rRNA es ampliamente utilizado en taxonomía microbiana. Consecuentemente, las secuencias son accesibles en bases de datos (alrededor de 18,000 secuencias en 1999). La reconstrucción filogenética con estos datos, proporcionan una básica evaluación y reconstrucción en la sistemática actual bacteriana acompañada por la enmendación, reclasificación y el cambio de nombre en la taxonomía bacteriana. También es aceptado aplicar un “enfoque polifásico” para las nuevas descripciones de especies bacterianas en taxas altas. La congruencia del 16S rRNA en la construcción de árboles filogenéticos, como el 23S rRNA, así como la subunidad de elongación de la ATPasa para la RNA polimerasa, ha dado resultados muy parecidos en la topología de árboles filogenéticos (Ludwig *et al.*, 1999).

Una importante característica de la molécula del 16S rRNA está en el uso de estándares universales, parámetros para inferencias filogenéticas, lo cual es una facilidad relativa en el alineamiento de secuencias (Embley y Stackebrandt, 1997). El alineamiento es el primer paso crítico en el análisis de secuencias filogenéticas. Dando la posición a un ancestro común que tienen que ser fiable en la comparación filogenética. Este marcador molecular (Figura 3) presenta una serie de ventajas: (1) está presente en todos los organismos y tiene la misma función en todos ellos; (2) debido a restricciones estructurales. Diferentes regiones de la molécula presentan distinto grado de variabilidad en su secuencia, lo que permite realizar comparaciones con diferente nivel de resolución; (3) su transmisión es principalmente

vertical, ya que se considera que no está sujeto a transferencia genética horizontal entre microorganismos; (4) la longitud de su secuencia tiene un tamaño adecuado como para proporcionar suficiente información, con un bajo costo, y (5) el análisis de la secuencia nos permite realizar reconstrucciones filogenéticas de los microorganismos (Nogales, 2005).

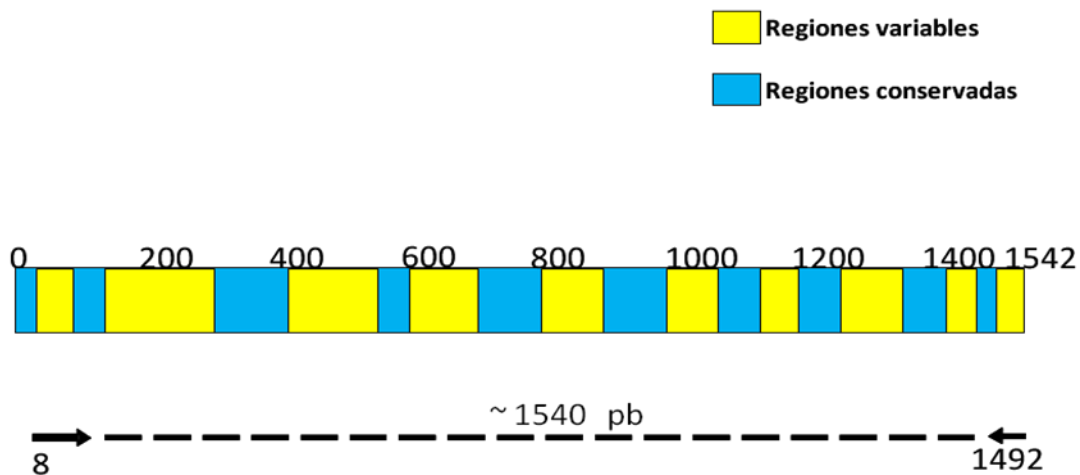


Figura 1.- Fragmento ribosomal 16S rRNA, en el cual se pueden apreciar las regiones variables y las regiones conservadas.

La era de la secuenciación del 16S rRNA trajo nueva información, como para el reconocimiento definitivo de Arqueobacteria o Arquea como un linaje independiente celular (Woese, 1994).

En los árboles filogenéticos, los organismos representan los puntos terminales en un árbol genealógico y es importante señalar que debido a la ausencia de un registro fósil útil, no hay una escala de tiempo que pueda precisarse.

El árbol filogenético de la vida se ha construido a partir de la comparación de las secuencias del 16S y 18S rRNA. En la figura 2 se observan los tres dominios de los seres vivos: Bacteria, Arquea y Eucaria (Brock, 2003).

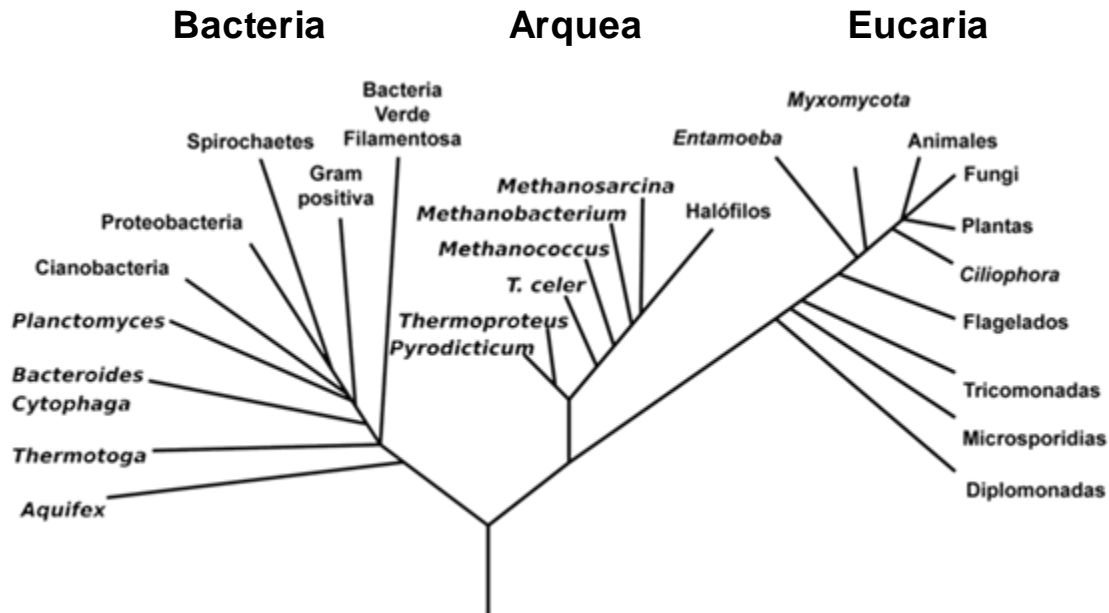


Figura 1.- Árbol filogenético de la vida adaptado de Carl Woese (1994).

3.6.- Organismos extremófilos

Muchos microorganismos viven en ambientes inaccesibles para el ser humano y para la mayoría de los seres vivos. A estos microorganismos, por lo general procariontes, se les llama extremófilos (De Felipe y Pozuelo, 2007). No sólo toleran estas situaciones límite, sino que incluso su multiplicación requiere la presencia de condiciones extremas como pH y temperaturas elevadas.

La investigación sobre los extremófilos ha obligado a redibujar el árbol evolutivo de la vida (Figura 4). Hasta hace poco, la idea aceptada agrupaba a los seres vivos en dos dominios básicos del mundo de la vida: “procarionte” cuya célula carece de un núcleo celular diferenciado, es decir, el DNA se encuentra disperso en el citoplasma y “eucarionte” cuyas células son bastante más complejas y con núcleo celular bien definido (Horikoshi, 1999).

3.7.- Halófilos extremos

Frecuentemente, estos microorganismos reciben la denominación de halobacterias a consecuencia del género clásico *Halobacterium* que fue el primero en ser descrito y todavía sigue siendo el más estudiado.

Las bacterias halófilas son quimioorganótrofas y la mayoría aerobias estrictas. Utilizan aminoácidos o ácidos orgánicos como fuente de carbono y energía. Algunas formas crecen en anaerobiosis, a expensas de fermentar azúcares o por respiración anaerobia unida a la reducción de nitrato o fumarato. Bajo condiciones de baja aireación, *Halobacterium salinarium* y otros halófilos extremos sintetizan e insertan en sus membranas una proteína denominada bacteriorrodopsina y se incorporan en sus membranas, llamada así por su similitud estructural y funcional con el pigmento visual rodopsina. En condiciones de alta aireación ocurre un cambio gradual de color desde naranja hasta rojo púrpura, a medida que aumenta la bacteriorrodopsina, insertada en la membrana citoplasmática (de Felipe y Pozuelo, 2007).

Las ramas filogenéticas del dominio Bacteria contienen también representantes, de halófilos y halófilos tolerantes que viven en ambientes hipersalinos. Estos halófilos son fisiológicamente muy diversos, incluyendo heterótrofos anaeróbicos, organismos fermentativos, sulfato reductores, cianobacterias, así como las bacterias anoxigénicas fotosintéticas de los géneros *Halochromatium* y *Halorhodospira* (Oren, 2002).

Para entender las estrategias desarrolladas para sobrevivir en condiciones tan extremas, es importante el estudio detallado de estos microorganismos exóticos. Se han publicado monografías sobre halófilos por Gunde-Cimerman *et al.* (2005), Oren (2002) y Ventosa (2004) entre otros.

3.8.- Alcalófilos

La mayoría de los microorganismos alcalófilos conocidos como *Halomonas*, *Alkalimonas* y *Bacillus*, han sido aislados de lagos permanentemente alcalinos en los que los altos pHs son consecuencia más bien de procesos geológico-geoquímicos, que de procesos biológicos. Este tipo de lagos se encuentran en todos los continentes; Magadi en el Este de África, Mono en California, Wadi Natrum en Egipto y diversos lagos alcalinos en China y el Tibet. Muchos de estos lagos se caracterizan también por tener altas concentraciones salinas unidas a las condiciones alcalinas. Así, parte de los miembros de la familia Halobacteriales, halófilos por excelencia, son también alcalífilos obligados (Oren, 2002).

Los alcalófilos se encuentran en los tres dominios de la vida: Arquea, Bacteria y Eucaria. De modo similar a los acidófilos, los alcalófilos separan el pH extremo circundante fuera de las células, manteniendo su pH intracelular cercano a la neutralidad.

Los alcalófilos aerobios constituyen dos grupos fisiológicos: alcalófilos y haloalcalófilos. Los primeros tienen poco o ningún requerimiento de sal en el medio de crecimiento. Tales organismos se encuentran en suelos, sedimentos marinos y aguas residuales con alto contenido de calcio (Tiago, 2004).

La mayoría de los haloalcalófilos están confinados a lagos alcalinos hipersalinos y desiertos, de pH alcalino. La mayoría de los microorganismos aislados de estos lugares pertenecen al dominio Arquea, aunque también algunos tipos de *Bacillus* han sido reconocidos (Grant y Jones, 2000).

El cultivo de alcalófilos y haloalcalófilos ha sido llevado a cabo por Duckworth *et al.* (1996), que aislaron cientos de cepas de éstos microorganismos en un amplio número de lagos Rift Valley en el Este de África. Los análisis filogenéticos revelaron la existencia de proteobacterias del tipo *Pseudomonas*, un alto número de cepas Gram-positivas y un número considerable de haloarqueas.

Algunas se han publicado como nuevos tipos, incluyendo *Halomonas megadiensis* (llamada originalmente *H. magadii*) (Duckworth *et al.*, 2000), *Cellulomonas bogoriensis* (Jones *et al.*, 2005), *Alkalimonas delamerensis* (Ma *et al.*, 2004). Otros aerobios heterótrofos de los lagos africanos alcalinos incluyen *Alcalimnicola halodurans* (Yakimov *et al.*, 2001) y *Bacillus bogoriensis* (Vargas *et al.*, 2005).

3.9.- Extremoenzimas

Las enzimas extracelulares que permiten desenvolverse a los extremófilos en estas circunstancias extremas revisten particular importancia, ya que podrían ser de interés para el desarrollo de nuevos productos comerciales. Los microorganismos extremófilos son una fuente única de enzimas con propiedades biotecnológicas interesantes, con aplicación en una amplia gama de procesos industriales. Por ejemplo las amilasas, pululanasas, celulasas, proteinasas y xilanasas procedentes de hipertermófilos y termófilos extremos han sido estudiados.

El creciente interés por los extremófilos ha dado lugar a la creación de la Sociedad Internacional de Extremófilos, con simposios bianuales que han tenido lugar en Hamburgo (2000), Nápoles (2002), Maryland (2004), Australia (2005) Slovenia (2004) y la última reunión internacional especial sobre extremófilos fue en Ponta Delgado en las Azores (2010).

3.10.- Suelo del exlago de Texcoco

La zona del exlago de Texcoco se encuentra al noroeste de la ciudad de México y tiene una extensión aproximada de 5000 hectáreas (Figura 3) que en su mayor parte se encuentra erosionada y otra parte está ocupada por un lago. La altitud es de 2240 m sobre el nivel del mar, con una temperatura anual media de 16°C y una precipitación media de 705 mm. La zona se caracteriza por un manto freático superficial de 15-80 cm, aguas subterráneas altamente salinas con predominancia de NaCl y Na₂CO₃. Los suelos del antiguo lago de Texcoco se formaron por procesos de erosión hídrica y erupciones volcánicas, acumulándose depósitos aluviales lacustres e intercalados con materiales volcánicos. La textura del suelo es limoso a arcilloso, la estructura es granular en la superficie y prismática en el subsuelo y el contenido de materia orgánica oscila entre 20 y 50 g Kg⁻¹ de suelo seco. La tasa rápida de evaporación, aproximadamente 2000 mm por año, incrementa la salinidad de la solución del suelo (Dendooven *et al.*, 2010). Cantidades excesivas de sales tienen efectos adversos sobre las propiedades físicas y químicas de los suelos y sobre procesos microbiológicos de los mismos, afectan la mineralización del carbono y del nitrógeno, y la actividad enzimática (Pathak y Rao, 1998).

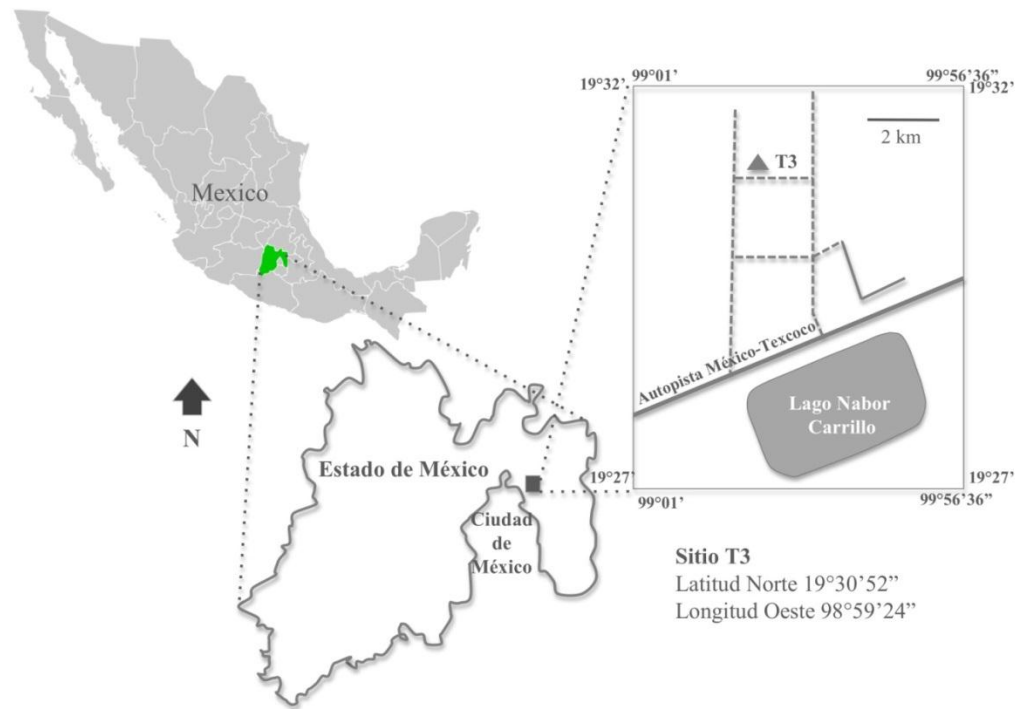


Figura 3.- Ubicación geográfica del exlago de Texcoco.

3.11.- Comunidades de Texcoco

En el 2008 Valenzuela *et al* realizó un estudio sobre la comunidad de arqueas del exlago de Texcoco (Figura 4). Se realizó la extracción de DNA de las comunidades de arqueas directamente del suelo y se amplificó el gen 16S rRNA por medio de la técnica de PCR. Los productos de PCR fueron utilizados para la construcción de bibliotecas genómicas de genes. La librería ribosomal mostro diversidad de arqueas que incluyeron los géneros *Natronococcus* sp., *Natronolimnobius* sp., *Natronobacterium* sp., *Natrinema* sp., *Natronomonas* sp., *Halovivax* sp., “*Halalkalicoccus jeotgali*” y nuevos clados dentro de la familia *Halobacteriaceae*. Cuatro clonas no pudieron ser identificadas. Por lo tanto, se encontró una diversidad baja en arqueas en este suelo pero también especies aun sin caracterizar y clasificar.

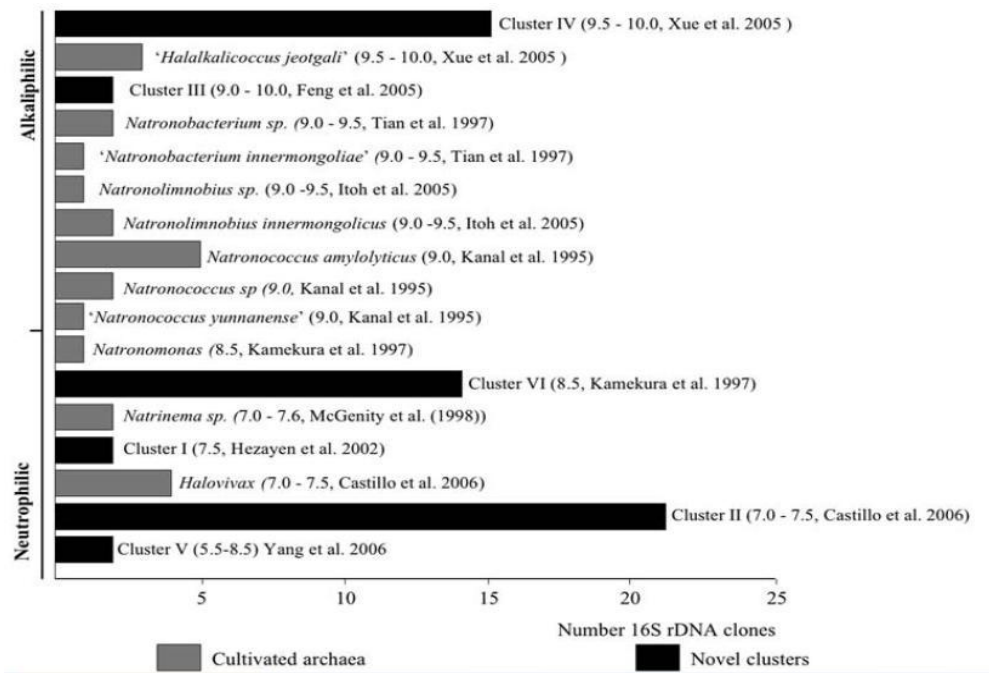


Figura 4.- Clasificación de filotipos de arqueas en el exlago de Texcoco. Se puede apreciar en color negro, que existen grupos que aún no han sido identificados (Valenzuela *et al.*, 2008).

Para el 2009, Valenzuela *et al.*, realizo el mismo procedimiento pero ahora en tres tipos de suelos: 1) CE 1.7 dS m⁻¹ y pH 7.8 (bajo); 2) CE 56 dS m⁻¹ y pH 10.11 (medio); 3) CE 159 dS m⁻¹ y pH 10 (alto), utilizando oligonucleótidos universales para bacterias y se analizaron 463 clonas de la secuencia 16S rRNA. La librería proporciona la identificación del filo Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Chloroflexi mostrando variedad en las comunidades bacterianas. Y también se demostró que existen comunidades bacterianas sin caracterizar y clasificar.

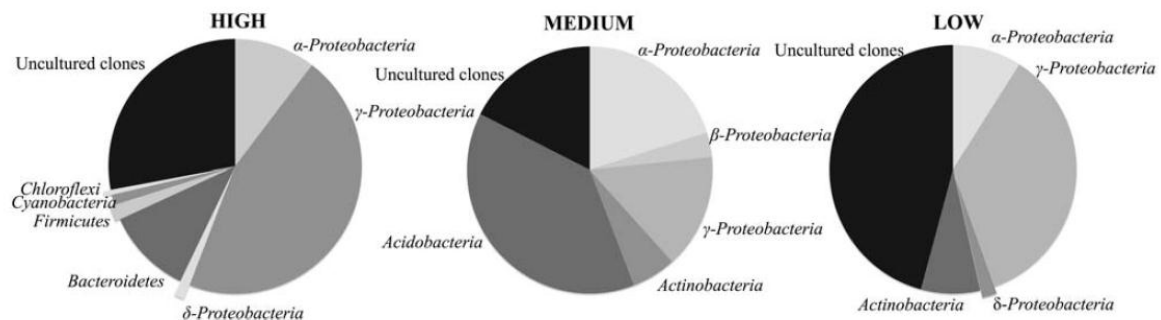


Figura 5.- Comparación de la composición bacteriana en los tres suelos, revelados por la librería del 16S rRNA.

Los sectores indican un porcentaje relativo calculado del total.

4.- JUSTIFICACIÓN

La biotecnología industrial está continuamente buscando microorganismos y enzimas novedosos. La diversidad de microorganismos y los procesos que realizan son absolutamente inmensos. Las enzimas habituales como las que se encuentran presentes en los organismos superiores o las presentes en bacterias como la *Escherichia coli* tienen ciertas limitaciones, sin embargo las enzimas de microorganismos extremófilos (extremoenzimas), comienzan a operar justo en el punto donde las habituales dejan de funcionar.

Existen numerosos procesos industriales en los cuales ya se está utilizando las extremoenzimas, como en la producción de edulcorantes, papel, síntesis de detergentes, elaboración de alimentos como pan y vino, tratamiento de residuos, extracción de petróleo, obtención de biochips para la identificación de personas y el diagnóstico de enfermedades.

Como las principales limitaciones de las enzimas son el precio y disponibilidad, el encontrar los microorganismos que posean enzimas útiles, son el punto clave para la viabilidad económica de nuevos bioprocesos y bioproductos. Su cultivo e aislamiento es el primer paso el descubrimiento de extremófilos novedosos.

5.- HIPÓTESIS

En el suelo del exlago de Texcoco se encuentran microorganismos extremófilos que no han sido identificados y pueden ser aislados para su estudio.

6.- OBJETIVOS

6.1.- Objetivo general

Aislar y caracterizar microorganismos haloalcalófilos del suelo del exlago de Texcoco.

6.2.- Objetivos específicos

1. Selección y establecimiento de medios de cultivos para las comunidades microbianas del suelo del exlago de Texcoco.
2. Aislar microorganismos haloalcalófilos del suelo del exlago de Texcoco.
3. Identificar a los microorganismos aislados mediante por el análisis bioinformático de su secuencia del 16S rRNA.

7.- MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología experimental se dividió en seis pasos (Figura 6):

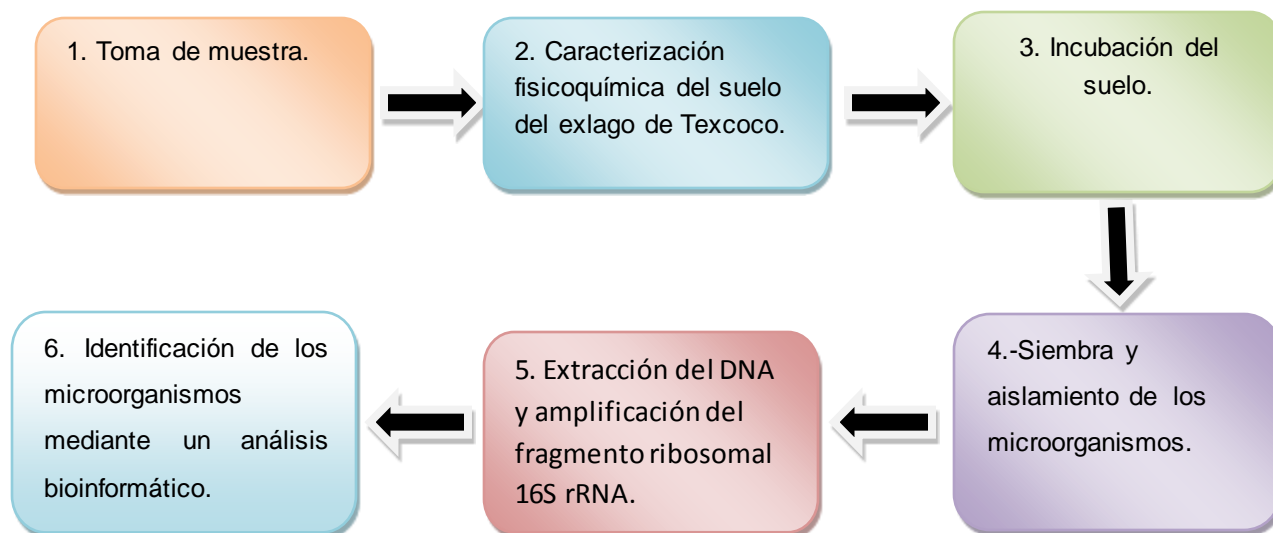


Figura 6.- Etapas de la metodología

7.1.- Sitio de muestreo

Se recolectó 30 kg de suelo en 3 sitios diferentes del suelo del exlago de Texcoco, a una profundidad de 15 a 20 cm. La profundidad es importante porque a esta profundidad el suelo está más homogéneo que la parte superior, ya que al recibir los rayos de sol de forma más directa, el suelo tiene mayor deshidratación, formándose así costras de sal, provocando que la concentración salina y por lo tanto el pH varíe.

7.2.- Tamizado de los suelos

Los suelos se tamizan con una malla de 5 mm y posteriormente se seca a la sombra. Una vez secas las muestras se guardan en bolsas de polipropileno etiquetándolas con el nombre de suelo al que pertenecían y se congelaron a -20°C hasta los análisis correspondientes.

7.3.- Caracterización fisicoquímica del suelo

La caracterización fisicoquímica del suelo se realizó para confirmar que el suelo del exlago de Texcoco es un suelo de condiciones extremas.

Cuadro 1. Caracterización fisicoquímica del suelo.

Propiedad	Método
pH	Potenciometro
Humedad	Método Gravimétrico
Textura	Densímetro de Bouyoucos
Conductividad Eléctrica (CE)	Conductímetro
Capacidad de Retención de Agua (CRA)	Método Gravimétrico
N _{tot} (g N kg ⁻¹ ss)	Método Kjeldahl
C _{org} (g C kg ⁻¹ ss)	Equipo TOC (Carbono Orgánico Total)
C _{inorg} (g C kg ⁻¹ ss)	Captación en NaOH

7.3.1.- pH

Pesar 10 g de suelo tamizado dentro de un frasco, agregar 25 ml de agua destilada (relación 1:2.5) y revolver durante un minuto. Tomar la lectura de pH y temperatura directamente con un potenciómetro.

7.3.2.- Humedad

Pesar 15 g de suelo tamizado, y poner a secar en horno a 105°C durante 24 h. Pesar después de las 24 h.

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

7.3.3.- Textura

Pesar 50 g de suelo y agregar 10 ml del dispersante hexametáfosfato de sodio (concentración 50 g/l). Agitar por 10 minutos en una batidora. Colocarlo en una probeta de 1 L y aforarlo con H₂O destilada. Agitar 1 minuto para homogenizar (aproximadamente 10

veces). Tomar la primera lectura después de los 40 seg con el hidrómetro y la temperatura con el termómetro. Dejar reposar 2 h y tomar la segunda lectura y la temperatura.

Fórmulas:

$$\% \text{ limos} + \% \text{ Arcillas} = \frac{(1_{\text{era}} \text{ lectura} + (T1 - 20) 0.36)}{\text{Peso del suelo}} \times 100$$

$$\% \text{ Arcillas} = \frac{(2_{\text{da}} \text{ lectura} + (T2 - 20) 0.36)}{\text{Peso del suelo}} \times 100$$

$$\% \text{ Arena} = 100 - (\% \text{ limos} + \% \text{ Arcillas})$$

7.3.4.- Conductividad eléctrica (CE)

Pesar 200 g de suelo y agregar agua hasta que se forme una pasta en su punto de saturación (aproximadamente su mismo peso en volumen de agua), tapar la muestra con papel aluminio y guardar en refrigeración por 24 h, centrifugar la muestra y con el sobrenadante obtenido determinar la CE con ayuda de un conductímetro.

7.3.5.- Capacidad de Retención de Agua (CRA)

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

$$\frac{\text{H}_2\text{O g}}{\text{g de suelo}} = \frac{\text{peso drenado} - \text{peso suelo seco (105}^\circ\text{C)} - \text{peso blanco húmedo}}{\text{peso de suelo seco}}$$

7.3.6.- Nitrógeno total (g N kg⁻¹ ss)

Pesar 2 g de suelo y colocarlo en un tubo Kjeldahl. Paralelamente colocar blancos (solo reactivos). Agregar a cada tubo 1 g de sulfato de potasio en polvo, 0.3 g de sulfato de cobre y 10 mL de H₂SO₄. Colocar los tubos en el digestor. Mantenerlo durante 3 días digestando (aproximadamente 8 h día⁻¹). Terminando la digestión, el contenido se coloca en un matraz de 500 ml, se agrega H₂O destilada hasta tener un volumen de 200 ml, se agrega 35

ml de mezcla de NaOH 50 % v/v y tiosulfato 5 % v/v, se destila y se titula con HCl 0.01 N. Colocar en otro matraz 10 mL de ácido bórico como indicador, en este matraz es donde se capta el destilado. Se colecta 150 ml del destilado y se titula el destilado con HCl 0.01 N.

$$\text{g N kg}^{-1}\text{ss} = \frac{(\text{mL del HCl gastado} - \text{mL blanco}) \times N_{\text{HCL}} \times 14 \times 1000000}{\text{mg ss}}$$

7.3.7.- Carbono orgánico (g C kg⁻¹ ss)

Determinar por medio del equipo TOC-V (Analizador del Carbono Orgánico Total), pesar 0.025 g de glucosa como estándar y 0.2 g de cada suelo.

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

$$\text{Factor} \left(\frac{\text{g C}}{\text{area}} \right)_{\text{s}} = \frac{(\text{g C})}{\text{TOC}(\text{area})}$$

$$\text{g C/Kg ss} = \frac{(\text{TOC}(\text{area})) \times (\text{Factor}(\text{gC/area})) \times (1000)}{\text{peso suelo (g)}}$$

7.3.8.- Carbono inorgánico (g C kg⁻¹ ss)

Pesar 2g de suelo seco y colocarlo en un frasco. Colocar 20 ml de NaOH 1N en un frasco más pequeño que el del suelo. Ambos frascos (el del suelo y el del NaOH) se introducen en un frasco grande (de aproximadamente 1 litro) y se tapa. La tapa del frasco debe tener una cepta. Los frascos en su interior no se tapan. A través de la cepta, inyectar 5ml de HCl 1N, el cual se tapa y etiqueta. Luego de 24 h, se destapa el frasco grande e inmediatamente sacar el frasco de NaOH 1N el cual se etiqueta. Del frasco de NaOH se toma una alícuota de 5ml, se coloco en un matraz, luego se agregar 45 ml de agua destilada. Agregar una gota de fenofaleina y titular con HCl 2N y antes de que virare a incoloro, se continua titulado con HCl 0.1 N. Cuando desaparezca el color, agregar una gota de anaranjado de metilo y titular nuevamente con ácido clorhídrico 0.1 N.

$$\text{Normalidad real} = \frac{10\text{mL} \times 0.025\text{N de Na}_2\text{CO}_3}{\text{volumen gastado de HCl} 0.1\text{N}}$$

$$\text{mg C inorgánico Kg}^{-1}\text{ss} = (\text{mL HCl muestra} - \text{mL HCl blanco}) \times N_{\text{HCl}} \times (20/5) \times 12.011 \times 500$$

$$\text{g C inorgánico} = \frac{(\text{mL HCl muestra} - \text{mL HCl blanco}) * N_{\text{HCl}} * (20/5) * 12.011 * 500}{1000}$$

7.3.9.- Carbono total (g C kg⁻¹ ss)

Es la suma del carbono orgánico y el inorgánico.

7.4.- Incubación de suelo

Pesar 25 g de suelo en matraces de 250 ml y colocar en incubadoras a 37°C y 120 rpm durante 56 días, después se adiciona 25 ml del medio correspondiente y por cada día transcurrido se agregar 1 ml del medio de cultivo (descrito en anexos), esto es con el fin de que la evaporación del medio de cultivo no deje seca la muestra de suelo. Tomar muestras a los 7, 14, 21 y 56 días.

7.5.- Siembra de microorganismos en medios salinos-alcálinos

Hacer diluciones decimales (Figura 5) en serie hasta 10⁻⁶ y con cada dilución se sembró por medio de varilla acodada en el medio de cultivo A, B y C (ver anexos).

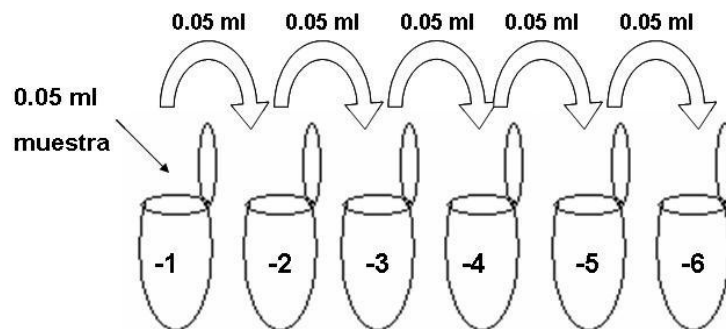


Figura 7.- Diluciones

Después, para continuar con el aislamiento de los microorganismos, se realizar dos resiembras por el método de estría cruzada en cada medio correspondiente (Figura 8).

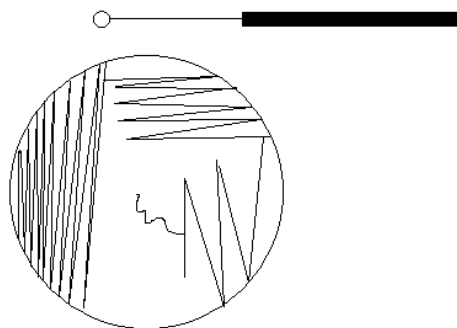


Figura 8.- Siembra por estría cruzada en los medios de cultivo

7.6.- Morfología colonial

Una colonia microbiana está constituida por individuos de la misma especie provenientes de una célula o de un grupo de ellas en un medio sólido. Por definición un buen aislamiento en placa es aquel que nos da colonias aisladas, con una distancia que permita distinguir y describir la morfología colonial. Para describir la morfología colonial de las cepas aisladas, se analizaron las siguientes características:

7.6.1.- Tamaño. Se describe en milímetros y puede variar desde colonias extremadamente pequeñas que miden apenas una fracción de milímetro hasta aquellas que llegan a medir 10 mm o más. Algunas especies bacterianas pueden extenderse en toda la superficie de la caja.

7.6.2.- Color. Las colonias pueden tener variados colores, debido a pigmentos propios o absorción de algunas sustancias del medio.

7.6.3.- Forma. Pueden ser puntiforme, circulares o irregulares. Las colonias puntiformes son tan pequeñas que no se puede distinguir el resto de sus características.

7.6.4.- Bordes. Pueden ser enteros o mostrar irregularidades como lóbulos, filamentos, proyecciones como dientes de sierra o enrollados.

7.6.5.- Elevación. La colonia puede ser plana o elevada, esta última a su vez puede ser convexa, pulvinada, embonada, crateriforme o umbilicada.

7.6.6.- Superficie. Puede ser lisa, rugosa o granular.

7.6.7.- Aspecto. Puede ser húmedo o seco.

7.6.8.- Luz reflejada. Puede ser brillante o mate.

7.6.9.- Luz transmitida. Puede ser transparente, translúcida u opaca.

7.6.10.- Producción de pigmento. Algunas bacterias producen pigmento soluble en agua, que puede difundir.

7.6.11.- Consistencia. Dura o suave, esta última puede ser butirosa, mucóide o frías. Esta característica se determina tocando la colonia con el asa y por lo tanto debe ser la última en describirse.

7.6.12.- Otras. En ciertos medios de cultivo el crecimiento bacteriano ocasiona cambios visibles alrededor de la colonia, como hemólisis en gelosa de sangre, acidificación que se manifiesta con un indicador de pH incorporado al medio de cultivo y otros efectos similares.

7.7.- Tinción de Gram

En este tipo de tinción, las bacterias se dividen en dos grupos: las Gram-positivas que retienen el violeta de genciana o cristal violeta y las Gram-negativas que se decoloran con alcohol-acetona y se tiñen con el colorante de contraste (safranina). La afinidad tintorial seguramente se debe a numerosas diferencias en la estructura y composición química de muchos componentes celulares entre los que destacan la pared celular. Las bacterias Gram-positivas tienen una pared compuesta principalmente de una capa de peptidoglicana relativamente gruesa (20-80 nm). En cambio, las Gram-negativas tienen una capa de peptidoglicana delgada (5-10 nm) además de una membrana externa constituida de fosfolípidos y lipopolisacáridos. Durante la tinción de Gram, ambos grupos de bacterias se tiñen con el colorante primario (cristal violeta) y forman un complejo con el mordente (yodo). El complejo colorante-mordente, es atrapado dentro de la célula Gram-positiva por la deshidratación y la porosidad reducida de la pared celular causada durante la etapa del lavado diferencial con alcohol-acetona. En cambio, en las Gram-negativas, la capa delgada de peptidoglicana no impide la extracción del complejo colorante-mordente en la decoloración. El colorante secundario o de contraste tiñe fácilmente a las células decoloradas. El procedimiento es el siguiente: Hacer el frotis de cada bacteria y fijarlos con calor. Cubrir los frotis con cristal violeta y dejarlo actuar durante un minuto. Escurrir el colorante y lavar un chorro suave de agua. Cubrir los frotis con solución de lugol y dejarlo actuar durante un

minuto. Escurrir el reactivo y lavar con un chorro suave de agua. Colocar el frotis en forma vertical y usando un fondo blanco, decolorar añadiendo gota a gota el alcohol-acetona durante 5 a 15 segundos. El momento exacto para terminar la decoloración con agua es cuando dejan de fluir “hilos de colorante” por el frotis. Éste es el paso crítico de la tinción. Lavar inmediatamente con un chorro suave de agua. Cubrir los frotis con safranina y dejarla actuar durante un minuto. Escurrir el colorante y lavar con un chorro suave de agua. Dejar secar al aire. Observar al microscopio con el objetivo de inmersión.

7.8- Extracción de DNA

En un tubo para microcentrífuga colocar 1 ml de TE 50/20 (Tris-HCl 50 mM - EDTA 20 mM) y colocar una asada de crecimiento en medio sólido. Resuspender agitando en una agitadora orbital (Vortex); centrifugar 5 minutos a 1000 rpm y descartar el sobrenadante. Agregar 180 µl de buffer de lisis (ver anexos) y resuspender agitando en Vortex. Incubar a 37°C durante 1 h. Agregar 25 µl de proteinasa K y 10 µl de SDS al 20 %. Incubar a 56°C durante 1 h. Agregar 20 µl de NaCl 5 M y 500 µl de TE 10/1 (Tris-HCl 10 mM - EDTA 1 mM). Mezclar bien agitando cuidadosamente por inversión. Agregar 500 µl de fenol. Agitar cuidadosamente por inversión por 30 min. Centrifugar por 5 min. Pasar la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo y estéril. Agregar 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), agitar cuidadosamente por 30 min. Centrifugar 5 min. Pasar la fase acuosa a un tubo nuevo y estéril. Agregar 1 ml de éter saturado con agua, agitar cuidadosamente por inversión por 3 a 5 min. Dejar reposar para que se separen las fases y descartar la fase etérea. Repetir el lavado con éter otras dos veces. Eliminar el éter residual calentando en un termoblock a 65°C por 15 minutos. Agregar 500 µl de isopropanol. Agitar cuidadosamente por inversión hasta que precipite el DNA (adquiere el aspecto de algodón en agua). Centrifugar 1 min. Eliminar el sobrenadante y agregar 1 ml de etanol al 70 % para eliminar el exceso de sales. Centrifugar 10 min, descartar el sobrenadante, dejar secar a 65 °C por 10 min y finalmente, resuspender cuidadosamente la pastilla en 50 µl de agua destilada estéril o TE (1/10).

7.8.1.- Análisis de DNA genómico por electroforesis en gel

El DNA que se aisló a partir de cultivos en fase estacionaria se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con el marcador del DNA de Lambda cortado con Sty I.

Se colocaron 2 µl de muestra de DNA y se combinaron con 3 µl de naranja G (buffer de carga). El gel se coloca en una cámara electroforética con TAE 1X. Las muestras se corren a 120 volts durante 20 minutos esto es con la finalidad de exista la migración del DNA y ver si fue exitosa la extracción. Después se coloca en una solución de bromuro de etidio para posteriormente ver el revelado en un transiluminador con lámpara ultra violeta.

7.9.- Amplificación del gen 16S rRNA por la técnica de PCR

Las regiones del DNA que codifican el 16S rRNA fueron amplificadas por PCR en un volumen total de 25 µl contenían: 1 µl DNA genómico (50 ng), 1.25 µl de los oligonucleótidos (200 µl) , 0.5 µl de dNTPs (60 mM), 0.125 µl de Taq polimerasa, 2.5 µl del buffer de la polimerasa; 1.5 µl de 25 mM MgCl₂, 7.5 µl de BSA al 1%, 1.5 µl de DMSO al 1% y 9.125 de H₂O estéril.

7.9.1.- Selección de oligonucleótidos para la PCR

La amplificación por PCR se realizó con oligonucleótidos diseñados para amplificar el 16S rRNA de bacterias como se muestra a continuación:

Cuadro 2.- Iniciadores empleados para la amplificación del gen 16S rRNA para bacterias.

Primer	Secuencia	Referencia
27 F	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	Rusznyák <i>et al.</i> , 2008
1492 R	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	Rusznyák <i>et al.</i> , 2008

7.9.2.- Condiciones del termociclador

Las muestras se colocaron en un termociclador para las reacciones de incubación que fueron las siguientes: Un calentamiento inicial a 94°C por 4 min; 35 ciclos de calentamiento a 94°C por 1 min para desnaturizar, 1 min a 57°C para alineamiento y 2 min a 72°C para la polimerización; y un paso final para terminar todas las cadenas a 72°C por 10 min. Finalmente se mantiene la reacción a 4°C hasta que se compruebe la reacción de amplificación.

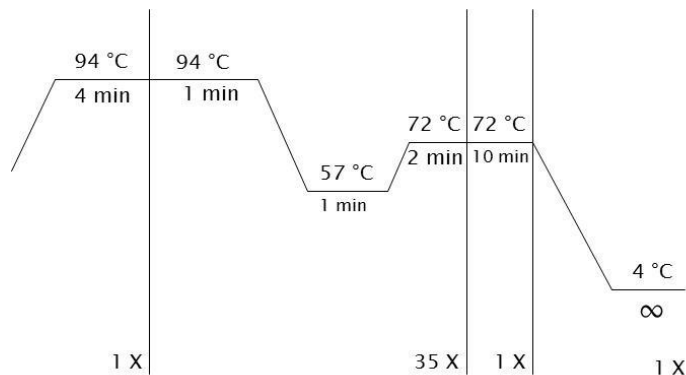


Figura 9.- Programa para amplificación por PCR

Las muestras se corren en un gel de agarosa al 1% para observar los productos de la PCR, se tiñe con bromuro de etidio por 10 minutos y se observan las bandas en el transiluminador con radiación ultravioleta. El tamaño de los fragmentos de PCR es de aproximadamente de 1500 pb.

7.10.- Protocolo de purificación por el Kit Zymoclean™ Gel DNA

Colocar el producto de tres reacciones de PCR en un gel de agarosa al 1%, correr el gel a 120 volts durante 20 minutos y cortar la banda del fragmento esperado. Transferir la banda de gel cortada a un tubo de 1.5 ml para microcentrífuga y agregar tres veces el volumen de “DNA binding”, incubar a 50°C por 5 min hasta que el gel se disuelva completamente, después, transferirlo a una columna Zymo-Spin™ Colum y centrifugar a 10 000 rpm por 15 s y tirar el sobrenadante. Adicionar 200 µl del Buffer de lavado a la columna, centrifugar por 20 s a 10,000 rpm (realizar por duplicado). Adicionar 11 µl de agua estéril a la columna, transferirla a otro tubo de 1.5 ml y centrifugar durante cuatro minutos a 13,000 rpm para recolectar el producto purificado.

7.11.- Secuenciación del DNA

Los productos de PCR amplificados y purificados, se enviaron a Macrogen Inc. en Seoul, Korea donde se utilizaron un secuenciador ABI Prism 5000 para su secuenciación.

7.12.- Análisis de secuencias y construcción de árboles filogenéticos

Los amplicones del rDNA 16S de las cepas aisladas se compararon por medio del programa BLAST con la base de datos de secuencias ribosomales (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome). Se recuperó de la base de datos un grupo de secuencias que dieron un valor significativo de similitud a las secuencias de las cepas. Se comparó las secuencias de interés con aquellas obtenidas de la minería de datos por medio de un alineamiento múltiple, usando el programa Clustal X (<http://www.clustal.org>). La construcción de los árboles filogenéticos se realizó con el índice de sustitución nucleotídica Tajima Nei realizando 1000 aleatorizaciones tipo “bootstrap” por medio del programa phylip 3.68 para su posterior visualización en el programa MEGA v4.1 (<http://www.megasoftware.net/>).

7.13.- Asignación taxonómica

La similitud entre las secuencias fue calculada a partir de las secuencias pareadas como se describe a continuación:

$$\text{Similitud} = \frac{(\text{No. nucleótidos}_{\text{totales}}) - (\text{No. nucleótidos}_{\text{variables}})}{(\text{No. nucleótidos}_{\text{totales}})} \times 100$$

La asignación taxonómica para establecer el nivel de especie debe guardar una similitud mayor al 97.5%, mientras que para la identificación a nivel de género se requiere del 95% con la mejor secuencia relacionada y con una similitud menor a este valor, se coloca en un nivel arriba del género (Rossello-Mora y Amman, 2001).

7.14.- Conservación de las cepas

Un tubo de 25 ml que contenía 5 ml del medio de cultivo se inoculó con una asada de las cepas. Se incubó a 37°C y 80 rpm durante dos días, con esto, se tornó turbio el fondo del medio de cultivo lo cual es muestra de crecimiento bacteriano y se centrifugó todo el volumen a 8,800 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se descartó y la pastilla celular se lavó dos veces con glicerol estéril al 20% y centrifugó en las mismas condiciones. La pastilla se resuspendió en 2.5 ml de la solución de glicerol, la resuspensión se distribuyó en partes

iguales (0.8 ml) y se colocó en tres tubos a criogénesis. La muestra se colocó inmediatamente en un recipiente de hielo seco con acetona, para congelar la muestra. La muestra se guardó a -20 °C durante dos días y posteriormente a -70 °C.

8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1.- Caracterización fisicoquímica

La textura de los suelos se define en función a la composición de arena, limo y arcillas, estando estos en diferentes proporciones. Cuando en el suelo no predomina ninguna de estas, se le denomina suelo franco. El suelo de Texcoco es considerado como un suelo franco, ya que posee 35% de arena, 31% de limo y 34% de arcilla y se puede ver en el diagrama para la determinación de textura (ver anexos).

8.1.1.- pH

El pH fue de 10.4, lo que lo clasifica como un suelo altamente alcalino, provocando que pocas especies de plantas y animales puedan vivir en ese ambiente afectando la disponibilidad de nutrientes como el fósforo, potasio, azufre, calcio, magnesio, hierro, boro y molibdeno.

8.1.2.- Conductividad eléctrica

La CE es utilizada para mediciones de salinidad. El suelo del exlago de Texcoco posee una CE elevada de 67.90 dSm^{-1} . En este medio ambiente se han determinado $\text{CE} > 100 \text{ dSm}^{-1}$ (Dendooven *et al.*, 2010), pero en el tiempo de recolección de muestra fue en épocas de lluvias, lo que provoca lavado del suelo y la CE disminuya. Aun así, este suelo es considerado extremadamente salino.

La salinidad afecta a los cultivos y por ende la producción, por lo que el conocimiento de los tratamientos para mejorar la fertilidad del suelo, el tipo de cultivos que se pueden implementar en esas zonas es fundamental para la actividad económica.

8.1.3.- Humedad

El contenido de humedad de los suelos depende de la cantidad de agua que contienen y esto se debe a la precipitación pluvial, la textura, la capacidad de retención de agua (CRA) y el drenaje. El suelo de Texcoco presentó una humedad de 260.74 g kg^{-1} ss siendo esta una humedad muy alta. Si comparamos la humedad obtenida con la reportada (Beltrán-Hernández *et al.*, 1999; Luna-Guido *et al.*, 2000), la cual fue de alrededor de 100 g kg^{-1} ss, esta última es mucho menor a la encontrada, pero recalando que el muestro fue realizado en temporadas de lluvia.

8.1.4.- Capacidad de retención de agua (CRA)

La CRA del suelo de Texcoco fue alta, teniendo 93.6% de su peso en agua, esto se debe a la baja permeabilidad del suelo (al no presentar lixiviación hacia estratos profundos del subsuelo) por lo que la evaporación va concentrando la solución de sales en el suelo.

8.1.5.- Carbono orgánico

La materia orgánica tiene como principal componente el carbono, acompañado de numerosos elementos que se encuentran en menor proporción. Por lo cual, es el carbono orgánico lo que se determina para así poder calcular posteriormente la materia orgánica. Ésta última varía con el tipo de material vegetal y su estado de descomposición. El contenido de carbono orgánico del suelo de Texcoco fue de 2.9 % siendo este un porcentaje bajo si lo comparamos con la cantidad de materia orgánica de un suelo agrícola que es de alrededor de 4 al 5% en los casos más favorables (Paustian, 2000).

8.1.6.- Carbono inorgánico

El contenido de carbono inorgánico del suelo de Texcoco fue de 3.48 g kg⁻¹ ss.

8.1.7.-Nitrógeno

El nitrógeno que se encuentra en el suelo se denomina orgánico e inorgánico, la mayor parte de éste elemento es parte integrante de materiales orgánicos complejos del suelo. Las formas inorgánicas del nitrógeno del suelo incluyen, NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻, N₂O, NO y nitrógeno elemental. Desde el punto de vista de la fertilidad del suelo, los más importantes son: NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻, en cambio el N₂O y el NO son las formas del nitrógeno que se pierde en el proceso de desnitrificación. Las formas orgánicas del nitrógeno en el suelo se encuentran en forma de aminoácidos, proteínas, amino azúcares y otras formas complejas que se producen en la reacción del amonio con la lignina y de la polimerización de quinonas y compuestos nitrogenados, así como de la condensación de azúcares y aminas (Beltrán-Hernández *et al.*, 1999; Luna-Guido *et al.*, 2000).

En el contenido de nitrógeno total (Kjeldahl) del suelo de Texcoco fue de 1.21 g N kg⁻¹ ss, el contenido de este es importante ya que el nitrógeno es necesario para la descomposición de la materia orgánica por los microorganismos heterótrofos del suelo y si el material orgánico que se descompone tiene poco nitrógeno en relación al carbono presente (paja de trigo, tallos de cereales), los microorganismos utilizan el amonio o nitratos presentes en el suelo. Este

nitrógeno permite el rápido crecimiento de los microorganismos que proporcionan material con carbono al suelo (Bremner, 1995).

Cuadro 3.- Caracterización del suelo.

Caracterización	Suelo de Texcoco
Textura	Franco
pH	10.40
CE (dSm ⁻¹)	67.90
Humedad (g kg ⁻¹ ss)	260.74
CRA (g kg ⁻¹ ss)	93.6%
Carbono orgánico (g kg ⁻¹ ss)	29.89
Carbono inorgánico (g kg ⁻¹ ss)	3.48
Carbono total (g kg ⁻¹ ss)	33.37
Nitrógeno total (g kg ⁻¹ ss)	1.21

7.2.-Medios de cultivo

Para poder aislar microorganismos de un suelo del exlago de Texcoco, se probaron tres medios de cultivo (medio A, medio B, medio C; ver Anexos). Se realizó la resiembra en cajas petri por dilución en serie por medio de varilla acodada y las colonias se volvieron a resembrar en los mismos medios por medio de la técnica de estría cruzada en dos ocasiones. Para finalmente, resembrar en forma masiva para poseer suficiente biomasa para las demás determinaciones.

En la Figura 10 se puede apreciar el crecimiento de las cepas que solo ocurrió en los medios A y C.

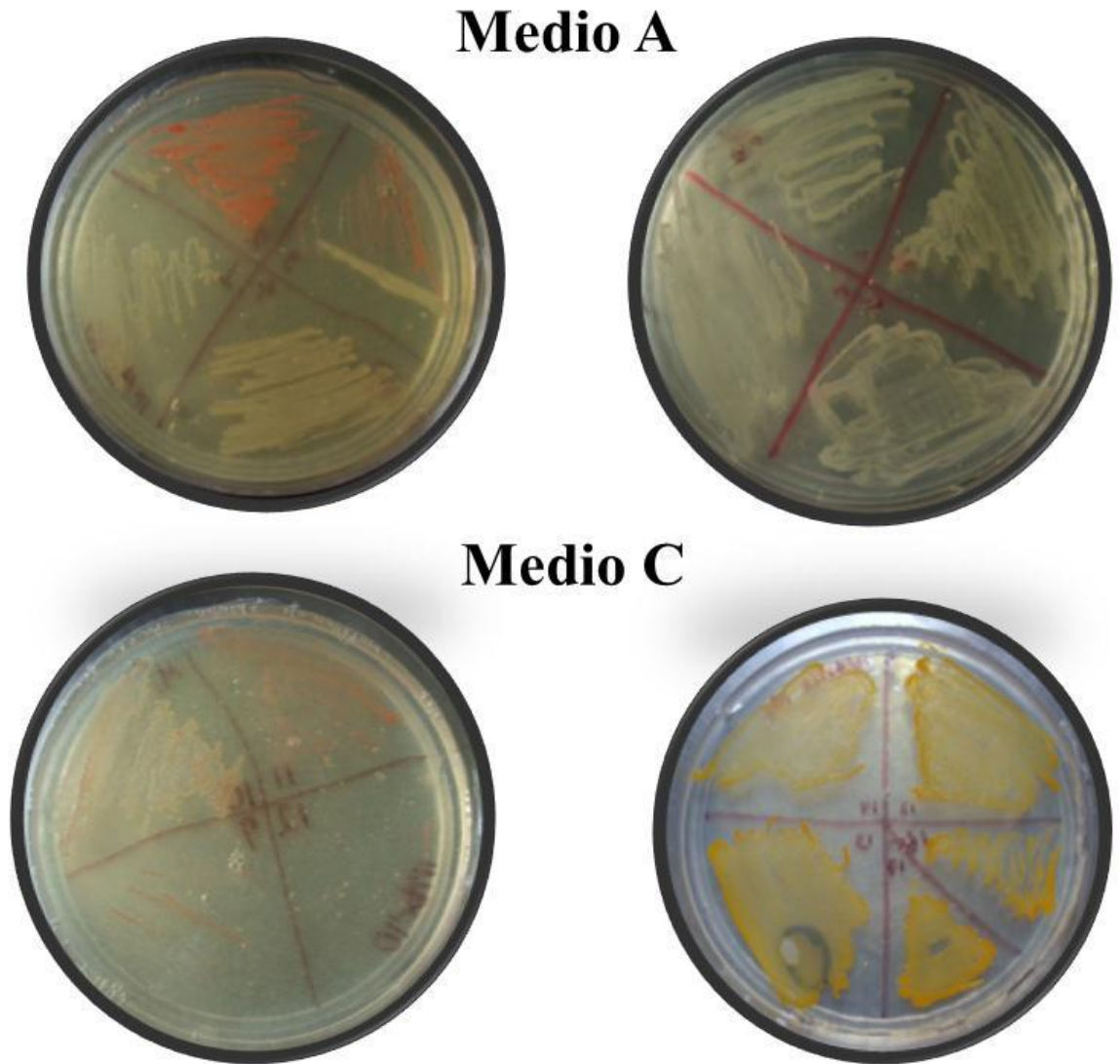


Figura 10.- Cepas aisladas en el medio A y C.

8.3.- Tinción de Gram

La tinción de Gram se realizó para observar el tipo de morfología microscópica (Figuras 10 y 11) que poseían los aislados y el grosor del peptidoglucano que poseen en la membrana celular. Todos los aislados mostraron ser bacilos cortos Gram-positivos (cuadro 4).

Cuadro 4.- Morfología microscópica y tinción Gram.

Cepa	Forma	Agrupación	Gram
1c	Bacilos	Bacilos cortos aislados	+
2c	Bacilos	Bacilos cortos aislados	+
3c	Bacilos	Bacilos cortos aislados	+
4c	Bacilos	Bacilos cortos aislados	+
5c	Bacilos	Bacilos cortos aislados	+
6c	Bacilos	Bacilos cortos aislados	+
8c	Bacilos	Bacilos cortos aislados	+
10c	Bacilos	Bacilos cortos aislados	+
11c	Bacilos	Bacilos cortos aislados	+
12c	Bacilos	Bacilos cortos aislados	+
13c	Bacilos	Bacilos cortos aislados	+
14c	Bacilos	Bacilos cortos aislados	+

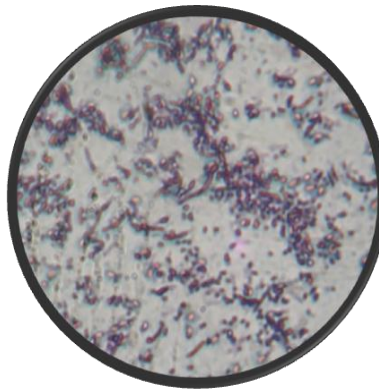


Figura 11.- Bacilos cortos Gram-positivos

8.4.- Aislamiento de DNA genómico

Con el objeto de identificar taxonómicamente los microorganismos alcalófilos, se utilizaron cuatro medios de cultivo. En los medios en que hubo crecimiento se realizó la extracción del DNA genómico previamente descrito.

El DNA que se aisló a partir de cultivos en fase estacionaria, se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con el marcador del DNA de Lambda cortado con Sty I. Se colocaron 2 µl de muestra de DNA y se combinaron con 3 µl de naranja G (buffer de

carga). El gel se coloca en una cámara electroforética con TAE 1X. Las muestras se corren a 120 volts durante 20 minutos esto es con la finalidad de exista la migración del DNA y ver si fue exitosa la extracción. Después se coloca en una solución de bromuro de etidio para posteriormente ver el revelado en un transiluminador con lámpara ultra violeta (Figura 12).

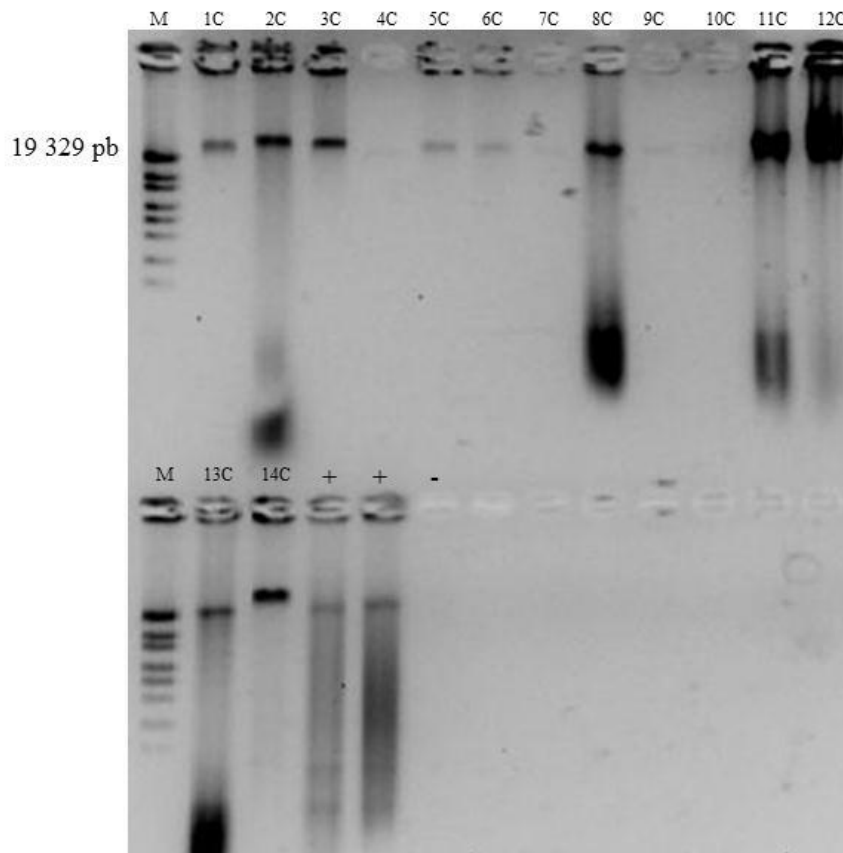


Figura 12.- Electroforesis del DNA de las cepas aisladas de suelos del exlago de Texcoco. M: marcador de peso molecular, Lambda cortado con Sty I; +: positivo; -: negativo.

8.5.- Amplificación del 16S rRNA por PCR

El DNA genómico aislado se utilizó como molde para amplificar el gen 16S rRNA con los oligos 27 F y 1492 R (previamente descritos). Los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 1%. La figura 13, muestra los productos amplificados obtenidos. El fragmento del gen 16S rRNA que se amplificó, se coloca en un gel de agarosa al 1% y se corren a 120 volts durante 20 minutos. Se coloca un marcador de peso molecular, el cual nos pueda mostrar fragmentos de 1500 pb. Se colocaron 2 µl de muestra y se combinaron

con 3 µl de naranja G (buffer de carga). El gel se coloca en una cámara electroforética con TAE 1X. Las muestras se corren a esto es con la finalidad de exista la migración del DNA y ver si fue exitosa la extracción. Después se coloca en una solución de bromuro de etidio para posteriormente ver el revelado en un transiluminador con lámpara ultra violeta.

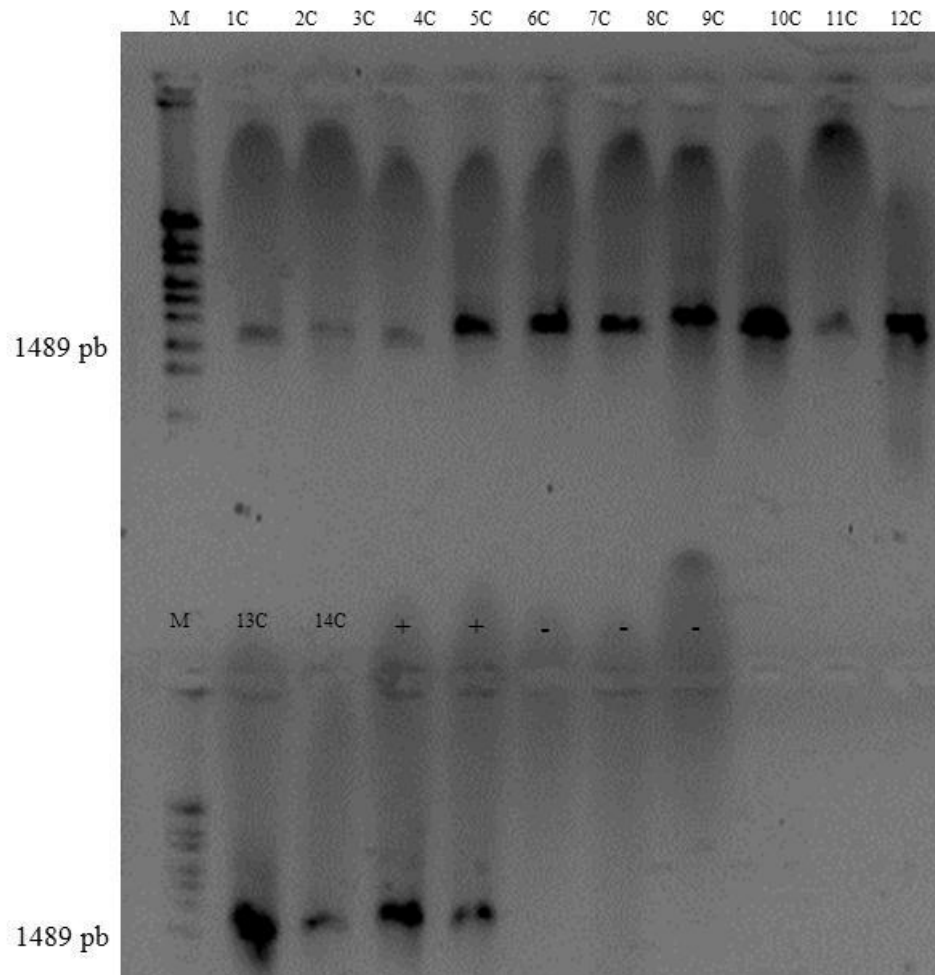


Figura 13.- Productos de amplificación del 16S rRNA por PCR de los aislados. M: marcador de peso molecular, Lambda cortado con Sty I; +: positivo; -: negativo.

8.6.- Asignación taxonómica en base a la similitud de nucleótidos

Con el propósito de llevar a cabo la asignación taxonómica de los aislados, los amplicones se mandaron a secuenciar y las secuencias obtenidas se analizaron por homología con el BLAST. Posteriormente las secuencias de mayor porcentaje de similitud en homología

a la secuencia de interés se analizaron para llevar a cabo el alineamiento múltiple con el programa CLUSTAL X. Las secuencias de nucleótidos se editaron con el programa SEAVIEW con el propósito de que todas las secuencias en comparación tuvieran el mismo número de pb. Se realizó la asignación taxonómica en base a la fórmula propuesta por Rossello-Mora y Amman en el 2001.

Cuadro 5.- Asignación taxonómica.

Cepa	Nucleótidos variables	Nucleótidos totales	% de similitud	Cepa más emparentada
1C	01	1349	99.90	<i>Bacillus subtilis</i>
2C	01	1312	99.90	<i>Bacillus subtilis</i>
3C	26	1403	98.14	<i>Bacillus subtilis</i>
4C	26	1403	98.14	<i>Bacillus saliphilus</i>
5C	04	1354	99.70	<i>Bacillus subtilis</i>
6C	31	1326	97.66	<i>Bacillus saliphilus</i>
7C	-	-	-	-
8C	01	1349	99.90	<i>Alkalibacillus filiformis</i>
9C	-	-	-	-
10C	05	1345	99.62	<i>Bacillus agaradhaerens</i>
11C	03	1328	99.77	<i>Bacillus subtilis</i>
12C	30	1374	97.81	<i>Bacillus saliphilus</i>
13C	90	1350	93.33	<i>Bacillus aurantiacus</i>
14C	90	1350	93.33	<i>Bacillus aurantiacus</i>

Las cepas 7C y 9C, no pudieron ser asignadas taxonómicamente, ya que los electroferogramas recibidos, no fueron claros y por eso no pueden ser utilizados para este tipo de análisis.

Las cepas 13C y 14C resultaron con porcentaje menor al 95%, lo cual indica que son de la familia *Bacillaceae*, pero no pertenecen al género *Bacillus*, porque la asignación taxonómica para establecer el nivel de especie debe guardar una similitud mayor al 97.5%, mientras que para la identificación a nivel de género se requiere del 95% con la mejor secuencia relacionada y con una similitud menor a este valor, se coloca en un nivel arriba del género (Rossello-Mora y Amman, 2001), lo cual sería interesante proponer un nuevo género.

8.7.- Dendrograma de las cepas

En la Figura 14 se muestra el árbol filogenético con todas las secuencias 16S rRNA del GenBank de la familia *Bacillaceae* de organismos reportados, se muestran los números de acceso en el paréntesis. Se analizaron con el índice de sustitución nucleotídica Tajima Nei y se agruparon con el método de Neighbor Joining. Está basado en valores 1000 réplicas de Bootstrap. Solo se muestran los porcentajes mayores al 50 % en los puntos de ramificación. Se utilizó como grupo externo *Alicyclobacillus herbarius* que pertenece a la familia *Alicyclobacillaceae*.

Como se puede apreciar las cepas 13C y 14C, muestran una ramificación aparte de las secuencias reportadas, confirmando con la asignación taxonómica.

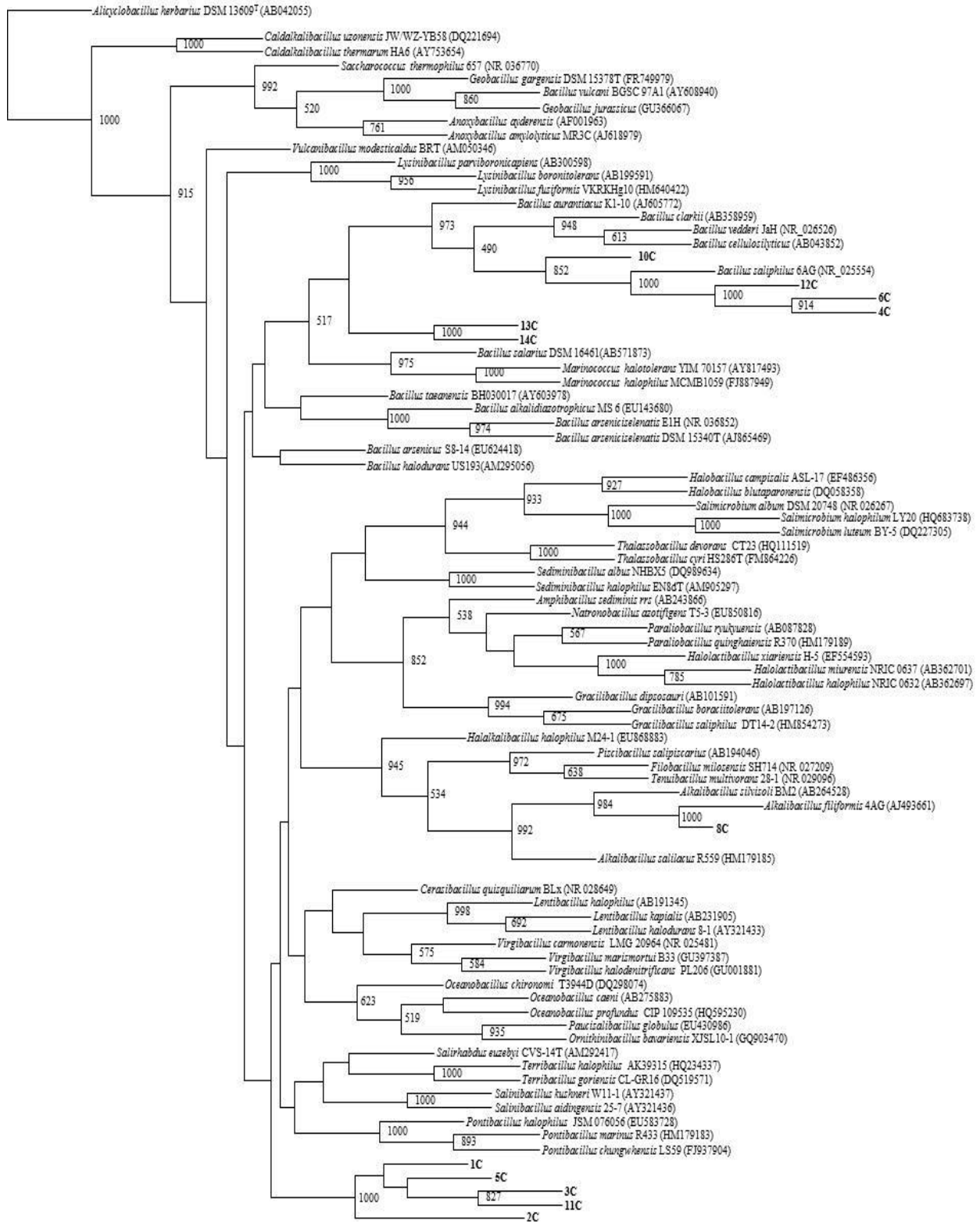


Figura 14.- Árbol filogenético de los aislados

9.- CONCLUSIONES

- El suelo del exlago de Texcoco es considerado un suelo franco (composición bastante homogénea de arcillas, limo y arena), salino ($CE\ 67.9\ dSm^{-1}$) y alcalino (pH 10.4)
- Todos los aislados pertenecen a la familia *Bacillaceae*.
- A través de un análisis filogenético y de similitud, se identificaron los géneros *Bacillus* y *Alkalibacillus*.
- Los microorganismos identificados son considerados como microorganismos salinos-alcalinos, por el tipo de medio ambiente donde se aislaron y los tipos de medio de cultivo utilizados.

10.- BIBLIOGRAFÍA

Alexander, M. (1994) Introducción a la Microbiología del suelo. Libros y Editoriales S.A., México D.F.

Altschul SF., Madden TL., Schaffer AA., Zhang, J., Zhang Z, Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res.* **25**, 3389–3402.

Beltrán-Hernández, R. I., Coss-Muñoz, E., Luna-Guido, M. L., Mercado-García, F., Siebe, C., & Dendooven L. (1999) Carbon and nitrogen dynamics in alkaline saline soil of the former Lake Texcoco (Mexico) as affected by application of sewage sludge. *Eur. J. Soil Sci.* **50**, 601-608.

Brenner, D. J., Fanning, G. R., Rake, A. V. & Johnson, K. E. (1969) Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite. *Anal. Biochem.* **28**, 447-459.

Brock. T. D., Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2003) Biología de los microorganismos. Edit. Prentice Hall. 10ª edición.

De Felipe M. R. & Pozuelo M. J. (2007) Microorganismos extremófilos y el origen de la vida. *Schironia* **6**, 36-46.

De Ley, J. & De Smedt, J. (1975) Improvements of the membrane filter method for DNA-rRNA hybridization. *Antonie van Leeuwenhoek.* **41**, 287-307.

Dendooven, L., Alcántara-Hernández, R. J., Valenzuela-Encinas, C., Luna-Guido, M., Perez-Guevara, F. & Marsch, R. (2010). Dynamics of carbon and nitrogen in an ‘extreme’ alkaline saline soil: A review. *Soil Biol Biochem* **42**, 865-877.

Embley, T.M. & Stackebrandt, E. (1997) Species in practice: exploring uncultured prokaryote diversity in natural samples. In: Species: The Units of Biodiversity. 61-81.

Giovannoni S. J., Tripp H. J., Givan S., Podar M., Vergin K. L., Baptista D., Bibbs L., Eads J., Richardson T.H., Noordewier M., Rappe M.S., Short J. M., Carrington J.C., & Mathur E. J. (2005) Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science* **309**, 1242-1245.

- Goodfellow, M., Manfio, G. P. & Chun, J. (1997)** Towards a practical species concept for cultivable bacteria. In: *Species: the Units of Biodiversity*. 25-59.
- Horikoshi, K. (1999)** Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol.* **63**, 735–750.
- Jones B .E., William D., Grant., Duckworth A. W., & Owenson G. G. (1998)** Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles* 2: 191-200.
- Jones, B. E., Grant, W. D., Duckworth, A. W., Schumann, P., Weiss, N. & Stackebrandt, E. (2005)** *Cellulomonas bogoriensis* sp. nov., an alkaliphilic cellulomonad. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1711-1714.
- Krieg, N.R. (1988)** Bacterial classification: an overview. *Can. J. Microbiol.* **34**; 536-540.
- Logan, N. A. (1994)** Blackwell Scientific Publications, London.
- Ludwig, W. (1999)** The role of rRNA as a phylogenetic marker in the context of genomics. *USFCC Newsl.* **29**, 2-6.
- Ludwig W. & Schleifer K.H. (1994)** Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 155-173.
- Luna-Guido, M. L., Beltrán-Hernández, R. I., Solís-Ceballos, N. A., Hernández-Chávez, N., Mercado-García, F., Catt, J.Á., Olalde-Portugal, V., Dendooven, L. (2000)** Chemical and biological characteristics of alkaline saline soils from the former Lake Texcoco as affected by artificial drainage. *Biol. Fert. Soils.* **32**,102–108.
- Ma, Y., Xue, Y., Grant, W. D., Collins, N. C., Duckworth, A. W., Van, Steenberg, R. P. & Jones B. E. (2004)** *Alkalimonas amylolytica* gen. nov. sp. nov. and *Alkalimonas delamerensis* gen. Nov. Sp. Nov., novel alkaliphilic bacteria from soda lakes in China and East Africa. *Extremophiles* **8**,193-200.
- Maidak, B. L., Olsen, G. J., Larsen, N., Overbeek, R., McCaughey, M. J. & Woese, C. R. (1997)** The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* **25**, 109-110.
- Nogales (2005)** La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas.* **14**, 41-51.
- Oren A. (2002)** Halophilic Microorganisms and their Environments. Kluwer Scientific Publishers, Dordrecht.

- Roh, S. W., Nam, Y. D., Chang, H. W., Sung, Y., Kim, K. H., Oh, H. M. & Bae, J. W. (2007)** *Halalkalicoccus jeotgali* sp. nov., a halophilic archaeon from shrimp jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 2296–2298
- Rosello-Mora & Amann R. (2001)** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol* **25**, 39-67.
- Rusznayák, A., Vladár, P., Molnár, P., Reskóné, M. N., Kiss, G., Márialigeti, K. & Borsodi, A. K. (2008)** Cultivable bacterial composition and BIOLOG catabolic diversity of biofilm communities developed on *Phragmites australis*. *Aquatic Botany* **88**, 211–218.
- Schlegel, H. G. (1999)** Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, Halle. Vol. 28 Schlegel, H.G. (1999) Geschichte der Mikrobiologie. Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, Halle. Germany.
- Sneath, P. H. A. (1989)** Numerical taxonomy. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. **4**, 2303-2305.
- Stackebrandt E., Koch C., Gvozdiak O., and Schumann P. (1995) Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus Cohn* 1872 gen. emend. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:682-692.
- Stackebrandt, E., Ludwig, W. & Fox, G. E. (1985)** 16S ribosomal RNA oligonucleotide cataloging. *Methods Microbiol.* **18**, 75-107.
- Tamura K., Nei M. (1993)** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 512–526.
- Tiago, I., Cheng, A. P. & Verissimo, A. (2004)** Bacterial diversity in a nonsaline alkaline environment: heterotrophic aerobic populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **5**, 41-57.
- Valenzuela-Encinas, C., Neria-González, I., Alcántara-Hernández, R. J., Enríquez-Aragón, A., Estrada-Alvarado, I., Hernández-Rodríguez, C., Dendooven, L., & Marsch, R. (2007)** Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles* **12**, 247-254.
- Valenzuela-Encinas, C., Neria-González, I., Alcántara-Hernández, R. J., Estrada-Alvarado, I., Zavala-Díaz de la Serna, F. J., Dendooven, L., & Marsch, R. (2009)** Changes

in the bacterial populations of the highly alkaline saline soil of the former lake Texcoco (Mexico) following flooding. *Extremophiles* **13**, 609-621.

Vargas, V. A., Delgado O.D., Hatti, Kaul, R. & Mattiasson, B. (2005) *Bacillus bogoriensis* sp. nov., a novel alkaliphilic, halotolerant bacterium isolated from Kenian soda lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 899-902.

Ventosa A. (2004) Halophilic Microorganisms. *Springer-Verlag*.

Ventosa A., Nieto J.J. and Oren A. (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 62:504–544.

Woese, C. R. (1992) Prokaryote systematics: the evolution of a science. *In: The Prokaryotes*. 3-18. Springer-Verlag, Berlin.

Xue, Y., Fan H., Ventosa A., Grant, W. D., Jones B. E., Cowan D. A., & Ma, Y. (2005) *Halalkalicoccus tibetensis* gen. nov., sp. nov., representing a novel genus of haloalkaliphilic archaea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 2501–2505

Yakimov, M. M., Giuliano, L., Chernikova, T. N., Gentile, G., Abrahan, W. R., Lundsorf, H., Timmis, K. N. & Golyshin, P. N. (2001) *Alcalilimnicola halodurans* gen. nov. sp. nov., an alkaliphilic moderately halophilic and extremely halotolerant bacterium, isolated from sediments of soda- depositing Lake Natron, East African Rift Valley. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 2133-2143.

11.- ANEXOS

11.1.- Diagrama de textura

Diagrama para la determinación de la textura de un suelo a partir del análisis mecánico. A: Arcillosa, L: Limosa, F: Franca, Ar: Arenosa.

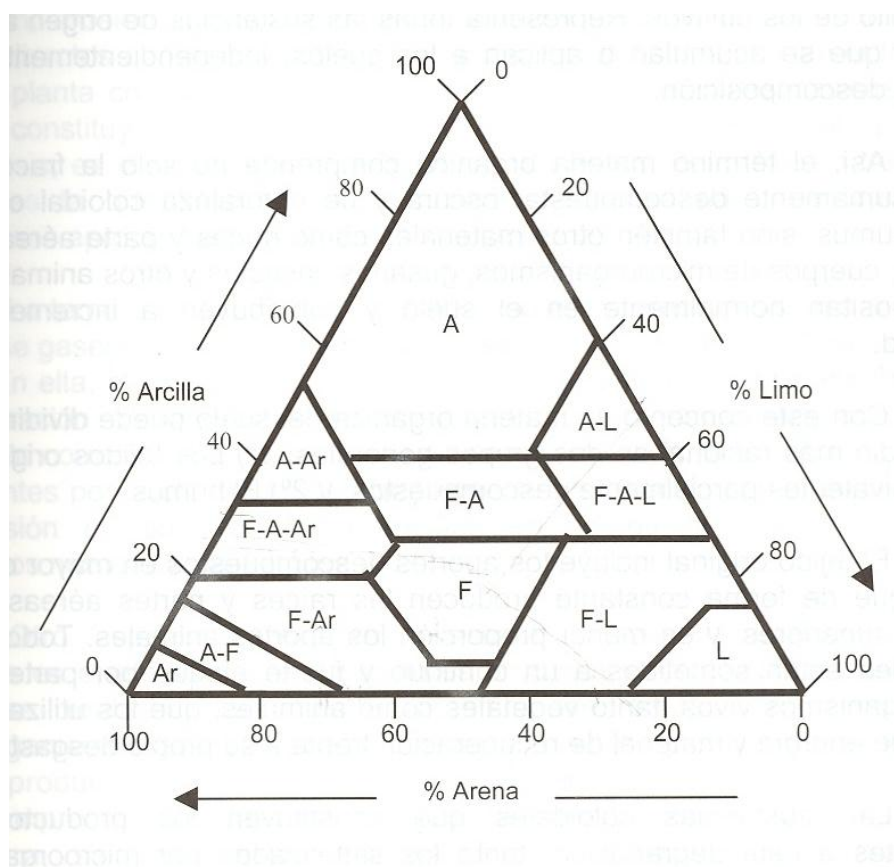


Figura 15.- Diagrama de textura

11.2.- Medios de cultivos

10.2.1.- Medio de cultivo A

El medio de cultivo A fue previamente descrito por Xue *et al.* (2005) en el cual aislaron a la arquea *Halalkalicoccus tibetensis*. Y se le adicionó antibióticos como lo reportado por Roh *et al.* (2007), con el objetivo de solamente obtener arqueas.

Cuadro 6.- Medio de cultivo A.

Componentes	g/l
Extracto de levadura	10
Casaminoácidos	7.5
Citrato trisódico	3
CaSO ₄ 2H ₂ O	0.17
MgSO ₄ 7H ₂ O	1
KCl	10
NH ₄ Cl	1
LiCl	0.1
Na ₂ CO ₃	10
NaCl	200
Agar	20

Cuadro 7.- Antibióticos.

Componentes	g/l
Penicilina	0.1
Eritromicina	0.1
Ciclohexamina	0.1

10.2.2.- Medio de cultivo B

El medio de cultivo B fue previamente descrito por Roh *et al.* (2007) en el cual aislaron a la arquea *Halalkalicoccus jeotgali*.

Cuadro 8.- Medio de cultivo B.

Componentes	g/l
Extracto de levadura	5
Casaminoácidos	5
Tris	12
MgSO ₄ 7H ₂ O	20
KCl	2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.2
NaCl	200
Agar	20

10.2.3.- Medio de cultivo C

El medio de cultivo C es un medio de cultivo muy rico realizado por Difco™ que se llama caldo marino (Marine both) el cual posee los siguientes componentes:

Cuadro 9.- Medio de cultivo C.

Componentes	g/l
Extracto de levadura	1
Peptona	5
Citrato férrico	0.1
Cloruro de magnesio	5.9
Sulfato de magnesio	3.24
Cloruro de calcio	1.8
Cloruro de potasio	0.55
Bicarbonato de sodio	0.16
Bromuro de potasio	34.0
Ácido bórico	22.0
Silicato de sodio	4.0
Fluoruro de sodio	2.4
Nitrato de amonio	1.6
Fosfato disódico	8.0
NaCl	200
Agar	20

10.3.- Buffer de lisis para la extracción de DNA

Cuadro 10.- Buffer de lisis.

Reactivo	cantidad
Tris HCl 100 mM	200 µl
EDTA 100 mM	20 µl
Triton x-100	12 µl
Lisozima	20 mg
H ₂ O	768 µl
Total	1 ml

10.4.- Reactivos para PCR

Cuadro 11.- PCR.

Reactivos	1 x (µl)
H ₂ O	9.125
BSA	7.5
DMSO	1.5
10X PCR Buffer	2.5
50 mM MgCl	1.5
Primer Mix	1.25
60 mM dNTP	0.5
Taq polimerasa	1.125
Muestra de DNA	1
Total	25

10.5.- Preparación de soluciones para la tinción de Gram

Cuadro 12.- Solución A (cristal violeta).

Componentes	
Cristal violeta	10 g
Oxalato de amonio	4 g
Alcohol etílico	100 ml
Agua destilada	400 ml

Cuadro 13.- Solución B (lugol).

Componentes	
Yodo	1 g
Yodo de K	2 g
Alcohol etílico	25 ml
Agua destilada	400 ml

Cuadro 14.- Solución C (lugol).

Componentes	
Solución de yodo	5 ml
Alcohol absoluto	95 ml

Cuadro 15.- Solución D.

Componentes	
Solución de yodo	5 ml
Alcohol absoluto	95 ml
Safranina	2.6 g
Etanol	10 ml
Agua destilada	90 ml