

TRABAJO PROFESIONAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

QUE PRESENTA:

MANUEL DE JESÚS ZAVALA DE LA CRUZ

CON EL TEMA:

**“ESTABLECIMIENTO DE MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA
METAGENÓMICO DE SUELOS PROVENIENTES DE DIFERENTES
ECOSISTEMAS DEL ESTADO CHIAPAS”**

MEDIANTE

OPCIÓN I

TESIS PROFESIONAL

DIRECTOR DE TESIS:

DR. VÍCTOR MANUEL RUÍZ VALDIVIEZO

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos Y Pavón"

DIRECCIÓN
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas 16 de enero del 2015

OFICIO NUM. DEP-CT-294-2015

C. MANUEL DE JESÚS ZAVALA DE LA CRUZ
PASANTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.
P R E S E N T E.

Habiendo recibido la comunicación de su trabajo profesional por parte de los CC. DR. VICTOR MANUEL RUIZ VALDIVIEZO ,DR. REINER RINCON ROSALES, Y DRA. PATRICIA GUADALUPE SANCHEZ ITURBE, En el sentido que se encuentra satisfactorio el contenido del mismo como prueba escrita, **AUTORIZO** a Usted a que se proceda a la impresión del mencionado Trabajo denominado:

" ESTABLECIMIENTO DE MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA METAGENOMICO DE SUELOS PROVENIENTES DE DIFERENTES ECOSISTEMAS DEL ESTADO DE CHIAPAS"


Registrado mediante la opción:
I (TESIS PROFESIONAL)

ATENTAMENTE
"CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON SENTIDO HUMANO"



ING. JUAN JOSÉ ARREOLA ORDAZ
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE LA DIVISION DE
ESTUDIOS PROFESIONALES

C.c.p.- Departamento de Servicios Escolares
C.c.p.- Expediente
I'JLMN/I'JJAO/I'eeam

Vo. Bo.

M. en C. JOSÉ LUIS MÉNDEZ NAVARRO
DIRECTOR



Secretaría de Educ. Pública
Instituto Tecnológico
de Tuxtla Gutiérrez,
Div. de Estudios Profesionales



DEDICATORIAS

A MIS PADRES FUENTE DE APOYO CONSTANTE E INCONDICIONAL EN TODA MI VIDA Y DURANTE MIS AÑOS DE CARRERA PROFESIONAL YA QUE NO HAY MEJOR HERENCIA QUE HABER RECIBIDO DE ELLOS QUE ES UNA EDUCACION PROFESIONAL.

A MIS QUERIDOS HERMANOS SUSANA VERENICE, JANET JAZMIN, JUAN DE DIOS Y JESUS ANTONIO, GRACIAS POR CREER EN MI CUANDO LAS SITUACIONES PARECIA QUE CAMINABAN LENTAS Y EL CUAL POR FIN EH LOGRADO UNO DE MIS OBJETIVOS Y MAS QUE NADA AL CARIÑO DE HERMANDAD Y A LOS CONOCIMIENTOS QUE DE PEQUEÑO ME HAN INCULCADO.

A MIS COMPAÑERO DE CARRERA QUIENES DURANTE 5 AÑOS FUERON DE GRAN APOYO Y A MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO 4 DE BIOLOGIA MOLECULAR RUBEN, ERICA, MARIO, LETY, MARTIN POR SU AMISTAD Y CONSEJOS.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Chiapas (COCYTECH), por la beca otorgada que me permitió terminar con éxito la realización de mi tesis.

A mi director de tesis de proyectos, Dr. Víctor Manuel Ruíz Valdiviezo, por su enseñanza, experiencia, orientación y los conocimientos impartidos, durante este proyecto y que gracias a su esfuerzo y apoyo de todos ellos se logró acabar la elaboración de este proyecto, y culminación de mis estudios profesionales.

Al Dr. Reiner Rincón Rosales por su enseñanza durante mi pasadía en la carrera y sobre todo por los consejos que con su profesionalismo y experiencia compartió y que sin duda ayudaron en mi formación profesional.

A la Dra. Patricia Sánchez Iturbe por su valiosa aportación y sugerencias durante la revisión de la tesis, ayudando al enriquecimiento y mejoramiento del contenido de la misma.

ÍNDICE

INDICE DE TABLA	i
INDICE DE FIGURA	ii
RESUMEN	iii
I. INTRODUCCION	1
II. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA	4
III. MARCO TEORICO	5
3.1 El suelo como hábitat para los microorganismos	5
3.2 Demografía de Chiapas	6
3.2.1 Edafología de Chiapas	7
3.2.2 Vegetación y tipos de ecosistemas en Chiapas	8
3.3 La importancia del estudio de la ecología molecular de suelos	12
3.4 Metagenómica	13
3.4.1 Metagenómica de diversos ambientes	14
3.4.2 Metagenómica de suelos	14
3.4.3 Estudios sobre la diversidad metagenómica en diversos ambientes en México	15
3.5 Extracción de ADN metagenómico	17
3.6 Electroforesis de ADN en gel de agarosa	21
IV. JUSTIFICACIÓN	22
V. OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo General	23
5.2 Objetivos específicos	23
VI. METODOLOGÍA	24

6.1 Descripción de las áreas de estudio	24
6.2 Muestreo de suelos	25
6.3 Caracterización fisicoquímica de suelos	27
6.4 Protocolo de extracción de ADN metagenómico en suelos	28
6.4.1 Método de extracción de DNA metagenómico en suelo con solución de Hoffman-Winston.	30
6.4.2 Método de extracción de ADN metagenómico en suelo con solución de Lisis Enzimática	32
6.5 Comprobación y cuantificación de la extracción de ADN metagenómico mediante: Electroforesis en gel de agarosa y uso de equipo para cuantificar “Nanodrop 3300”.	34
VII. RESULTADOS	35
7.1. Caracterización fisicoquímica de suelos	35
7.2 Extracción de DNA metagenómico	36
7.3 Cuantificación de DNA	38
VIII. DISCUSION	40
7.1. Caracterización fisicoquímica de suelos	40
7.2 Extracción de DNA metagenómico	43
7.3 Cuantificación de DNA	45
IX. CONCLUSION	48
X. BIBLIOGRAFIA	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estado de Chiapas, México	6
Figura 2. Edafología del Estado de Chiapas.	8
Figura 3. Visión general de las rutas en que se emplea el análisis de DNA metagenómico de comunidades microbianas (Simón & Daniel, 2011).	13
Figura 4. Extracción de DNA metagenómico de suelos y aplicaciones (Hirsch, 2010).	15
Figura 5. Protocolo general de análisis del metagenoma de una muestra de suelo.	18
Figura 6. Mapa del estado de Chiapas donde se muestran algunos sitios experimentales. A) Tonalá y B) Volcán Chichonal, Pichucalco (Imágenes tomadas de Google Maps, 2015).	25
Figura 7. Punto representativo de un área de muestreo.	26
Figura 8. Mezclado de una mismo punto de muestro.	27
Figura 9. Electroforesis de gel de agarosa de la extracción de DNA metagenómico de suelos.	36
Figura 10. Electroforesis de gel de agarosa de la extracción de DNA metagenómico de suelos de diferentes ambientes	37

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales tipos de vegetación y ecosistemas en Chiapas	9
Cuadro 2. Localización, clima, y características de los sitios experimentales de diferentes ecosistemas del estado de Chiapas*.	24
Cuadro 3. Parámetros determinados en suelos y el tipo de método empleado.	28
Cuadro 4. Características fisicoquímicas de suelos y sedimentos empleados para la extracción de DNA metagenómico	35
Cuadro 5. Concentración de DNA metagenómico ($\mu\text{g/mL}$) en diferentes suelos y sedimentos del estado de Chiapas.	38
Cuadro 6. Comparación de la cantidad de DNA metagenómico aislado por protocolos optimizados en diferentes suelo.	46

RESUMEN

La identificación de las comunidades microbianas del suelo depende principalmente del método de extracción de DNA metagenómico, ya que para seleccionar un método de extracción es necesario considerar la ruptura inadecuada de las células y la contaminación con sustancias húmicas. En el presente estudio, dos diferentes protocolos para la extracción de DNA metagenómico en diferentes tipos de suelos fueron establecidos. El primer protocolo consiste en una extracción directa del DNA mediante la ruptura de las células por método de lisis celular usando lisozima, seguida de lisis química mediante el uso de detergentes y otros compuestos que ayudan a la precipitación y obtención del DNA. El segundo protocolo consiste en la extracción indirecta del DNA mediante lisis química y lisis mecánica. El DNA obtenido con el primer método presentó una concentración en un rango de 6.2 a 61.2 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la concentración del DNA metagenómico del segundo protocolo fue en el rango de 13.02 a 141.61 $\mu\text{g/mL}$ para los suelos forestales, los salinos, los volcánicos y del agroecosistema (nativo). La eficacia de los métodos se vio analizada mediante la visualización de los patrones de bandas y del que propiamente se cuantificó la concentración de DNA metagenómico que se recuperó entre ambos métodos. Por lo que finalmente se puede sugerir que los protocolos optimizados de bajo costo y fácil elaboración son una herramienta indispensable y aplicable para poder acceder al estudio e investigación de cualquier nicho ecológico para el análisis del metagenoma de la comunidad microbiano.

I. INTRODUCCIÓN

En el estado de Chiapas hay grandes variedades de ecosistemas y agroecosistemas los cuales cuentan con una gran diversidad de fauna y flora, y ello conlleva al hábitat de grandes diferencias de comunidades microbianas que desempeñan un papel funcional en el desarrollo de estos, recientemente se han realizados estudios para identificar y analizar microorganismo que se hayan presente dentro de estos ecosistemas, mediante estudios de Biología Molecular y análisis genómicos ambientales, tales como la metagenómica.

En Chiapas se cuenta con el 30 % de agua a nivel nacional y con grandes extensiones de hectáreas forestales, selvas entre otros tipos de ecosistemas, lo que conlleva no solo en términos de biodiversidad y diversidad biológica sino que normalmente hacemos referencia a la variedad de especies de animales y plantas que se observan a simple vista. No obstante, la biodiversidad del estado se debe englobar en una mayor complejidad el cual debe abarcar toda la variedad de las especies vivientes, incluidos a todos los individuos de todos los reinos y a los ecosistemas en los que habitan e interactúan (Cruz et al., 2013). Mediante el estudio y análisis de DNA metagenómica, se ha contemplado contemplar parte del genoma que está presente en los diversos ecosistemas y en el que actualmente representa una herramienta energética para evaluar la diversidad de las comunidades microbianas, para obtener acceso a un sin número de especies nuevas, genes o moléculas nuevas que son pertinentes para uso futuro de la biotecnología y con aplicaciones agrícolas. Por lo que además de entender la ecología de los microorganismos es un desafío para la

Biología, debido a la gran cantidad de interacciones con factores bióticos y abióticos (Cruz et al., 2013).

Se han observado que los resultados de la mayoría de los microorganismos en la tierra u otros sistemas y ecosistemas son difíciles de cultivar en el laboratorio. Una estimación considerada es del 99% sin embargo la metagenómica explota el hecho de que mientras unos microorganismos son cultivables y otros no los son, todos ellos tienden a basarse en que su DNA en particular posee o conlleva una información genética. (Hernández- León et al., 2010).

Por otro lado, se destaca que los metagenomas de ambientes extremos también han sido utilizados como fuentes de biocatálisis. El empleo de secuenciación masiva de nueva generación del gen 16S rRNA y genes funcionales han permitido la construcción de librerías metagenómicas encontrando un número mayor de secuencias derivadas de ambientes extremos, tal como suelos salinos alcalinos, sedimentos volcánicos y el agua de los ambientes marinos. Los análisis de estos conjuntos de datos abrieron una ventana en la enorme diversidad taxonómica y funcional de comunidad microbianas en medios ambientales (Simon y Daniel, 2011). Es por ello que la metagenómica también se lleva a cabo la utilización de marcadores moleculares aplicada al estudio de comunidades microbianas se ha impuesto rápidamente debido a la gran cantidad de información que proporcionan y a la relativa facilidad metodológica que implican los análisis de estos compuestos, especialmente tras el gran desarrollo tecnológico que ha experimentado la biología molecular durante los últimos años. Utilizando estos marcadores no sólo se puede determinar la composición de las comunidades microbianas sino que también se puede cuantificar la abundancia de microorganismos específicos (Kirk et al., 2004).

En conjunto con métodos no cultivables, 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). De esta manera, miles de secuencias de ADNr 16S de diversos microorganismos, cultivables y no cultivables, son reportadas a las bases de datos como el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y el Ribosomal Database Project (RDP), cuya información crece continuamente (Hernández- León et al., 2010).

Sin despreciar la importancia de los métodos cultivables, los métodos moleculares no cultivables, son indispensables en el estudio de la función de los microorganismos en el suelo. Mediante métodos moleculares no cultivables se pueden analizar genes funcionales clave en procesos importantes en suelo tales como la desnitrificación, nitrificación, fijación de nitrógeno, oxidación de metano (Nogales, 2005). Por lo tanto en este proyecto se propuso caracterizar las propiedades fisicoquímicas de diferentes ecosistemas y agroecosistemas especialmente en suelos con la finalidad de establecer métodos moleculares tal como la extracción de DNA metagenómico en los diferentes ambientes lo que es una excelente oportunidad para lograr un mayor entendimiento de los aspectos evolutivos y biológicos de los microorganismos, así como de sus aspectos ecológicos.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los retos más importantes de la Biología Molecular es determinar el papel funcional de los diferentes microorganismos que constituyen las comunidades microbianas en un ambiente específico. Sin embargo, existen pocas herramientas moleculares para analizar la estructura y funcionalidad microbiana por lo que el establecimiento de las condiciones de métodos para la extracción del DNA metagenómico son indispensables, de tal manera que se puede emplear en futuras amplificaciones con técnica de PCR (Metagenómica), lo cual sin duda contribuirá a un mejor conocimiento del funcionamiento de las comunidades microbianas del suelo o de todo un ecosistema.

Es conocido que hay poca información relacionada con las microbiota en los ecosistemas, lo que nos brinda la oportunidad de realizar este tipo de estudios en Chiapas ya sea en agroecosistemas y por la importancia bioquímica y biotecnológica que tienen este tipo de información, donde se pueda asegurar y mantener al margen la complejidad con que cuenta la biodiversidad microbiana y la interacción en el aspecto biótico y abiótico tanto ecológico y biogeoquímicos.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 El suelo como hábitat para los microorganismos

Se denomina suelo a la parte más externa de la corteza terrestre, resultante de la meteorización de las rocas subyacentes y con unas características claramente diferenciadas de las mismas. Podemos considerar el suelo como un sistema de interacción entre tres fases bien definidas: una fase sólida, constituida por materia mineral y orgánica, una fase líquida, y una fase gaseosa o atmósfera del suelo (Nogales, 2005).

La porción inorgánica es muy importante por su influencia en la disponibilidad de nutrientes, aireación, retención de agua, etc. La materia orgánica procede de la actividad de los distintos organismos vivos del suelo y su composición en cantidad es variable, principalmente en función del tipo de cubierta vegetal. El resto del volumen del suelo está prácticamente constituido por espacios porosos, que a su vez están ocupados por agua y los gases que constituyen la atmósfera edáfica. La porosidad (cantidad y tamaño de los poros) depende de la textura, determinada por la cantidad de arena, limo y arcilla, la estructura y el contenido en materia orgánica (Nogales, 2005).

Todos estos factores determinan a su vez el movimiento y capacidad de retención de agua del suelo y la composición gaseosa de su atmósfera. Este sistema complejo que constituye el suelo, característicamente heterogéneo espacial y temporalmente, alberga una gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas. El suelo es un ambiente muy apropiado para el desarrollo de los microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos, protozoos) como procariotas (bacterias y arqueas) en el cual también encontramos virus y bacteriófagos (Nogales, 2005).

Es tal que los suelos son el sustrato de una amplia variedad de plantas, animales y microorganismos. Todos ellos contribuyen a crear un medio que resulta esencial para la producción primaria de los ecosistemas terrestres. Aunque todas las funciones del suelo son importantes, para la producción de biomasa es probablemente la más crucial, tanto en términos de actividades forestales y agrícolas, como para sustentar la biodiversidad.

3.2 Demografía de Chiapas

El estado de Chiapas se encuentra al sureste de la República Mexicana, cuenta con una extensión territorial de 73 670 km. Limita al norte con el estado de Tabasco; al este y sureste con la república de Guatemala; al sur y suroeste con el Océano Pacífico y al oeste con los estados de Veracruz y Oaxaca.



Figura 1. Estado de Chiapas, México.

Fuente: <https://www.google.com.mx/maps>, 2015

Chiapas cuenta con una variedad de relieves en su territorio; destaca el Volcán Tacaná en la zona de mayor altitud del estado. El estado se encuentra dividido en tres provincias y 10 subprovincias fisiográficas: a) Llanura Costera del Golfo Sur, con la subprovincia Llanura y pantanos Tabasqueños que cubre la parte norte del estado; b) Sierras de Chiapas y Guatemala, con las subprovincias y una discontinuidad fisiográfica con más de 60 % del territorio estatal, ubicadas al centro-norte, las Sierras del Norte de Chiapas, en la parte nororiental Sierra Lacandona y Sierras Bajas del Petén, Altos de Chiapas en la parte central y la Depresión Central de Chiapas al sur-centro y; c) Cordillera Centroamericana, que se extiende por toda la línea de costa en las discontinuidades Llanura Costera de Chiapas y Guatemala, la Llanura del Istmo; las subprovincias Sierras del Sur de Chiapas y los Volcanes de Centroamérica (Cruz et al., 2013).

En Chiapas se presentan climas cálidos, semicálidos y templados. Los climas cálidos se distribuyen en terrenos cuya altitud va del nivel del mar a los 1 000 m, abarca cerca de 74% de la superficie de la entidad; la temperatura media anual es mayor a 18°C y se dividen en cálido-subhúmedo con lluvias en verano, cálido-húmedo con abundantes lluvias en verano, y cálido-húmedo con lluvias todo el año.

3.2.1 Edafología de Chiapas

La amplia variabilidad de los suelos existentes en Chiapas es el resultado de la interacción de factores ambientales tales como tipo de roca, precipitación, temperatura, el tipo de vegetación y la acción de los microorganismos (hongos, bacterias, etcétera). Según Ramos (2009), existen 15 unidades de suelos en el estado, de las que predominan seis: Litosoles (que se presentan en 19.89 % del territorio), Rendzinas (en 16.92 %), Acrisoles (en 15.86 %), Luvisoles (en 12.12 %), Regosoles (en 10.48 %) y Cambisoles (en 8.45 %), con los que

se cubre 83.72 % de la superficie del estado; el resto (16.28 %) está representado por Feozem, Gleysols, Vertisols, Fluvisols, Solonchack, Andosols, Arenosols, Planosols, Nitisols, cuerpos de agua y zonas urbanas (FAO-ISRIC, 1999; INEGI, 2000, citado por Ramos (2009).

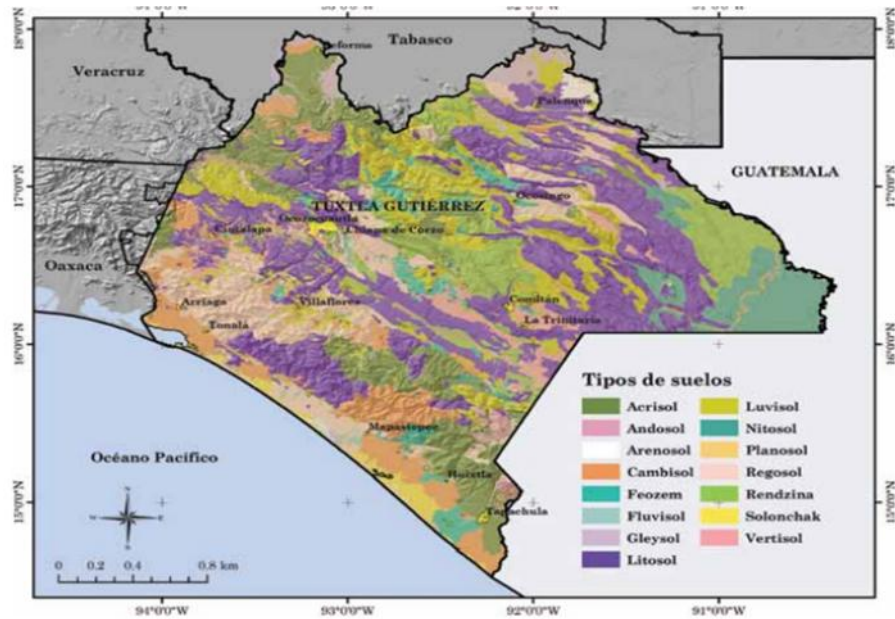


Figura 2. Edafología del Estado de Chiapas.

Fuente: La biodiversidad de Chiapas. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

3.2.2 Vegetación y tipos de ecosistemas en Chiapas

El estado cuenta con una gran diversidad de flora desde frondosos bosques hasta abundancia flora selvática con ello que el estado tiene de una riqueza en cuanto a diferentes tipos de ecosistemas a continuación presentamos de forma generalizada alguno de los tipo de vegetación y ecosistemas con que se cuenta en Chiapas (Cuadro 1) (Cruz et al., 2013).

Cuadro 1. Principales tipos de vegetación y ecosistemas en Chiapas.

A. Formaciones óptimas	B. Formaciones estacionales	C. Formaciones arboladas de áreas inundables	D. Formaciones no arboladas
1. Bosque tropical lluvioso	5. Bosque estacional perennifolio	10. Sabana	14. Matorral perennifolio de neblina
2. Bosque lluvioso de montaña baja	6. Bosque de pino-encino-liquidámbar	11. Canacoital	15. Tular
3. Bosque lluvioso de montaña	7. Selva baja caducifolia	12. Palmar	16. Popal
4. Bosque perennifolio de neblina	8. Bosque de pino-encino	13. Manglar	17. Matorral de dunas costeras
	9. Selva baja espinosa caducifolia		

Fuente: La biodiversidad de Chiapas. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

3.2.2.1 Bosques

Los bosques de pino se encuentran en suelos poco profundos y a lo largo de algunos filos y crestas expuestos a los vientos. El dosel permanece siempre verde y el sotobosque, compuesto de arbustos y hierbas anuales, se seca en los meses menos húmedos. Se ubica en la Sierra Madre de Chiapas en la vertiente exterior hacia el océano Pacífico en altitudes que van de 300 a 1500 msnm; en los Altos de Chiapas, en los municipios de Zinacantán, Huixtla, Chanal y, de forma marginal, en Jitotol, Las Margaritas, Altamirano, Ocosingo (Ramos, 2009).

3.2.2.2 Manglar

El Manglar es una formación leñosa densa frecuentemente arbustiva o arborescente de hasta 20 m de altura. Los manglares son importantes por las funciones ecológicas que desempeñan, así como de servir de hábitat para muchos organismos, entre los cuales

destacan las comunidades de crustáceos, moluscos, anélidos, peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, que existen dentro de estos ecosistemas (Tovilla, 1998).

Los manglares se ubican en casi toda la línea de la costa del estado, desde el sistema lagunar Mar Muerto en el municipio de Arriaga hasta el municipio de Suchiate cerca de la frontera con la República de Guatemala, y presenta una mayor proporción en el sistema lagunar Chantuto-Panzacola que comprende los municipios de Mapastepec, Acapetahua y Villa Comaltitlán (Ramos, 2009).

3.2.2.3 Pastizal

Los Pastizales son áreas con presencia de pastos inducidos, que surgen cuando es eliminada la vegetación original y cultivada y que se han introducido intencionalmente en una región y para su establecimiento y conservación se realizan algunas labores de manejo en espacios con baja densidad de árboles y arbustos. Son comunidades donde el papel preponderante corresponde a la familia *Poaceae* y el pasto puede alcanzar alturas de hasta 60 cm. Se presenta en grandes extensiones en la costa de Chiapas, piedemonte de la Sierra Madre de Chiapas al sur, en la Llanura costera del Golfo al norte, en la subregión Cañadas en la Selva Lacandona al oriente y, muy particularmente, en los municipios de Marqués de Comillas y Benemérito de Las Américas y en la Depresión Central en la parte centro-oriente, entre los 0 y 1000 msnm y de manera marginal en casi todo el estado (Ramos, 2009).

3.2.2.4 Praderas

La pradera de montaña la conforman comunidades de pocos centímetros de altura, con aspecto cespitoso (pradera de montaña), amacollado (zacatonal) o arrosado, localizado arriba de los 3500 msnm, después del límite altitudinal de la vegetación arbórea y cerca de

las nieves perpetuas. Su distribución está restringida a una pequeña parte en las laderas del volcán Tacaná. El suelo deriva de rocas volcánicas, frecuentemente de arenas (cenizas), es de textura generalmente ligera, reacción algo ácida, contenido elevado de materia orgánica y humedad (INEGI, 1984).

3.2.2.6 Selva

El estrato superior es mayor de 30 m y los árboles pueden llegar a medir hasta 50 m de altura. El siguiente estrato se encuentra entre los 5 y 20 m. Este tipo de vegetación se distribuye en terrenos con altitudes de entre 0 y 1000 msnm y, en algunas partes, hasta los 1500 msnm. Se encuentra mejor representada en la parte centro y noreste de la Selva Lacandona y en pequeños fragmentos en la vertiente del Pacífico en la región del Soconusco. Se encuentra distribuida principalmente en la Selva Lacandona, vertiente costera de la Sierra Madre de Chiapas y el norte del estado (Miranda, 1998).

3.3 La importancia del estudio de la ecología molecular de suelos

Los estudios contemporáneos de Ecología Molecular se han esforzado en entender las funciones metabólicas de los diferentes componentes biológicos presentes en el ambiente y en conocer la diversidad biológica mediante el uso y aplicación de técnicas moleculares basadas en la amplificación de diversas regiones del ADN y ARN (Souza et al., 2007). Cuando se desea analizar a una especie o grupo biológico, es importante conocer el contexto ambiental y biológico en el que se encuentra. El contexto biológico se refiere a las especies con las que coexiste y en muchos casos de las que depende.

En el caso de organismos macroscópicos es relativamente sencilla la caracterización y el conteo de las diferentes especies presentes en ella, pero en el caso de microorganismos esta caracterización se complica y es por ello que en los últimos años se han desarrollado diferentes estrategias, principalmente moleculares, para identificar las especies o grupos de microorganismos que constituyen la comunidad. Por lo que el suelo es uno de los ambientes más complicados y desafiantes para los microbiólogos. De hecho, aunque contiene la diversidad microbiana más grande en el planeta, la mayor parte de estos microbios no son todavía caracterizados y representan un depósito inexplorado enorme de diversidad genética y metabólica (Mocali y Benedetti, 2010). Por lo que el estudio de la comunidad microbiana en suelos se emplea técnicas de cultivo independientes. Estas técnicas emplear métodos de Biología Molecular, basado en que el ácido nucleico extraído del suelo se somete a amplificación por PCR. Estos métodos proporcionan una visión única de la riqueza, la composición y la estructura de la comunidad microbiana, que es decir, la riqueza de especies.

3.4 Metagenómica

La metagenómica representa el estudio de las comunidades microbianas, definida como el análisis funcional y de secuencias de los genomas microbianos colectivos contenidos en una muestra ambiental y es en ello que la metagenómica ha revolucionado a la microbiología abriéndose camino en cuanto a las técnicas y métodos independientes de cultivos microbianos en ecosistemas complicados. La metagenómica contempla los resultados de extracciones de DNA metagenómico para su empleo en PCR y la construcción de bibliotecas de DNA y el cual han resultado ser una herramienta de suma importancia (Simón y Daniel, 2011). Hasta ahora, la mayor parte del metagenómica a sacado provecho de hábitats y ambientes, como suelos y ambientes marinos.

En por ello que la metagenómica estudia el total del DNA que podemos encontrar en un nicho específico. Para acceder a este metagenoma se han desarrollado diferentes metodologías y vías para su análisis. Al estudiar el metagenoma de un ambiente en particular, es muy probable que este consista en gran parte de bacterias u otros organismos no cultivables; sólo se conoce una pequeña proporción de éstos, los cuales se pueden reproducir en condiciones de laboratorio (Hirsch et al., 2010).

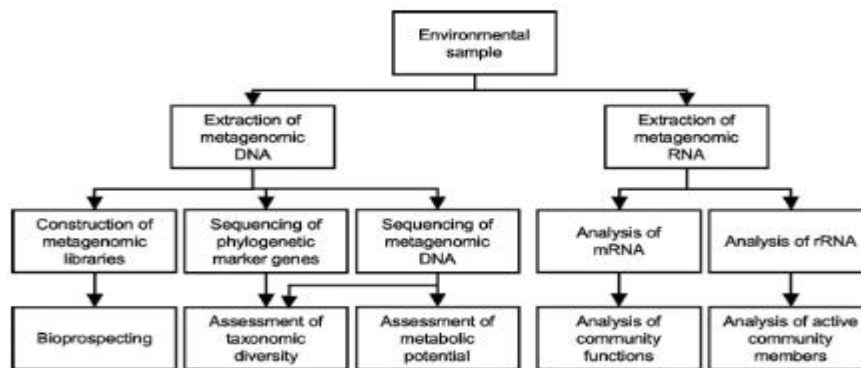


Figura 3. Visión general de las rutas en que se emplea el análisis de DNA metagenómico de comunidades microbianas (Simón & Daniel, 2011).

3.4.1 Metagenómica de diversos ambientes

El conocimiento del metagenoma de un ambiente en particular que puede permitir conocer diversos aspectos de la vida microbiana que allí se está generando, genes que se expresan bajo esas condiciones ambientales, o quizás, las diferentes interacciones ecológicas de ese nicho particular. Persiguiendo estos objetivos se ha investigado el metagenoma de ambientes muy diversos. Por ejemplo, Venter et al. (2004) secuenciaron más de un billón de pares de bases de ADN sargazo de mar. Los autores reportaron el descubrimiento de alrededor de 1800 especies genómicas; 1,2 millones de nuevos genes y más de 700 genes nuevos tipo *rodopsina*.

3.4.2 Metagenómica de suelos

El suelo es probablemente uno de los ambientes más complejos por su diversidad y variedad microbiológica (Daniel, 2005). Sin embargo es tan complejo que representa uno de los ambientes más complicados para entender la vida microbiana que ahí yacen, a lo largo de los años se han implementado diversas técnicas que emplean métodos moleculares como cuantificaciones en tiempo reales en PCR, obteniendo grandes informaciones de la abundancia de la comunidad microbiana (Rajendhran et al., 2011). Por lo que entender la ecología de los microorganismos es otro desafío para la Biología, debido a la gran cantidad de interacciones con factores bióticos y abióticos. Es también una excelente oportunidad para lograr un mayor entendimiento de los aspectos evolutivos y biológicos de los microorganismos, así como de sus aspectos ecológicos. Desde el punto de vista de la Biotecnología, este ambiente es visto como una gran reserva de enzimas, antibióticos y otros productos naturales por descubrir.

Los métodos de aislamiento del ADN para los suelos y los sedimentos se basan tanto en la recuperación de las células bacterianas y la lisis posterior o en la lisis directa de las células de la muestra seguida de la purificación de ADN. Con las herramientas que provee la metagenómica se pretende acelerar el descubrimiento de nuevos compuestos con diversas actividades. En la Figura 4 se muestran los procesos que se emplean a partir la aplicación de extracción de DNA metagenómico de suelos.

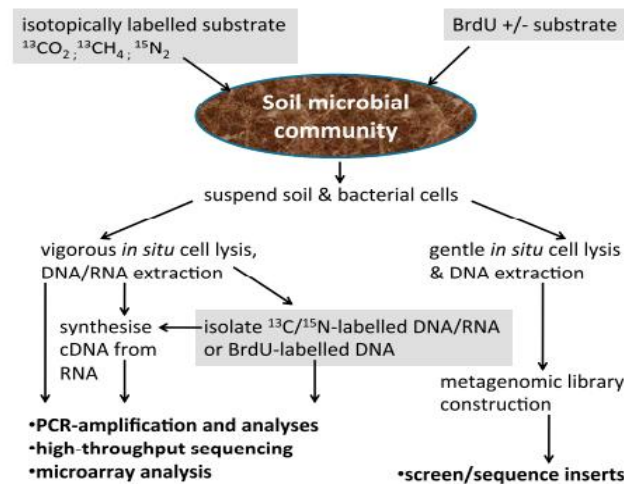


Figura 4. Extracción de DNA metagenómico de suelos y aplicaciones (Hirsch et al., 2010).

3.4.3 Estudios sobre la diversidad metagenómica en diversos ambientes en México

La filogenia de las poblaciones de procariotas en diez muestras de aguas tomadas de la cuenca de cuatro ciénagas y dos valles vecinos en chihuahua, así como de tres muestras de sedimentos húmedos, se determinó mediante las caracterización de los organismos cultivados y mediante la amplificación por PCRs y secuenciación de los genes 16S ARNs del ADN total (Souza et al., 2006).

En otro trabajo se analizó la diversidad bacteriana asociada a un biofilm corrosivo en una tubería de acero del Golfo de México. Varias bacterias aerobias y heterótrofas fueron aisladas e identificadas por el análisis de 16S ARNs. El ADN metagenómico fue extraído, se realizó un análisis de electroforesis en un gel con gradiente de desnaturalización de los genes ribosomales y se construyó una biblioteca de éstos. Encontrándose una limitada diversidad bacteriana y la mayoría de las especies fueron asignadas a la clase Proteobacteria (López, 2006).

En el grupo de trabajo del Dr. Luc Dendooven en el CINVESTAV se han publicado diferentes trabajos (Bello-López et al., 2014) relacionados con estudios de metagenómica convencional y funcional en diferentes agroecosistemas y ecosistemas terrestres y acuáticos. En conjunto con el profesor investigador el Dr. Víctor Ruiz-Valdiviezo se emplearan técnicas moleculares para el estudio de comunidades microbianas en el estado de Chiapas, lo que brindara información de suma importancia para el desarrollo de la Biotecnología y los agroecosistemas.

3.5 Extracción de ADN metagenómico

El suelo, las plantas y el agua albergan una cantidad infinita de microorganismos, realizar un aislamiento de todos estos microbios es imposible, ya que las técnicas de cultivo de microorganismos llevado a cabo en los laboratorios, solo logra obtener el 1% de todos los tipos de microorganismos presentes (Hirsh et al., 2010). Por lo que a partir de este hallazgo se optó por desarrollar protocolos que permitieran la extracción de DNA de cualquier ecosistema sea (suelo, agua, plantas o animales), utilizando a la metagenómica, quien está definida como el área encargada de estudiar un conjunto de genomas dentro de un determinado entorno.

En la extracción de los ácidos nucleicos, éstos se separan de cualquier otro compuesto proveniente de las células o del ambiente del cual se tomaron las muestras (p. ej. en muestras de suelos debemos considerar la alta concentración de ácidos húmicos, que son materia orgánica parcialmente degradada que no es soluble en agua a pH bajo y tiene un poder quelante muy alto, por lo que interfieren con la amplificación del ADN (Souza et al., 2007).

Los ácidos desoxirribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN) son polímeros de nucleótidos formados por un azúcar de cinco carbonos (desoxirribosa en el ADN y ribosa en el ARN), una base nitrogenada (que puede ser adenina, timina, citosina, guanina o uracilo) y una molécula de fosfato. El ADN es la macromolécula que contiene la información genética de las células procariontes, eucariontes y de los adenovirus. El ARN está involucrado en la síntesis de proteínas y constituye el material genético de los retrovirus (Madigan et al., 2000).

Inicialmente en la extracción de DNA es necesario llevar a cabo una lisis para liberar al ADN del interior celular, para lo cual se utilizan los buffers de extracción que contienen, 1) detergentes, como sodio dodecil sulfato de sodio (SDS) a una concentración final del 1% o Tritón X al 0.5%; 2) una molécula quelante (p. ej. EDTA, etilendiamino tetra acético, 50mM), que tiene cuatro grupos carboxilo y dos grupos amino, cuya forma completamente desprotonizada puede unirse a cualquier complejo metálico en solución, quitando a los cationes de la solución para desestabilizar la membrana celular e inhibir a las ADNasas; 3) sales (p.ej. cloruro de sodio, NaCl 20mM), que forman una capa iónica suave que recubre al ADN protegiéndolo y ayudando a evitar su degradación; 4) Tris-HCl 20mM con pH entre 7.5 y 8.2 para mantener el pH de la solución estable; 5) proteinasa K o lisozima (concentración final 0.05 mg/ml) para degradar proteínas o enzimas (Souza et al., 2007).

En la siguiente figura 5 se describe de manera general el proceso de análisis del metagenoma de una muestra ambiental.

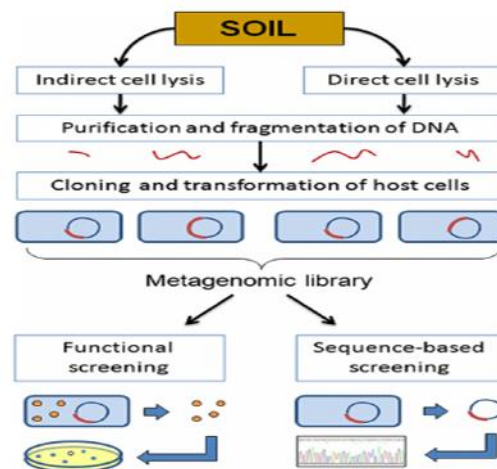


Figura 5. Protocolo general de análisis del metagenoma de una muestra de suelo. En un primer paso se aísla el suelo que se desea estudiar y se extrae el DNA metagenómico para luego realizar la construcción de librería Metagenómica.

Fuente: Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology (Mocali & Benedetti, 2010).

Durante este paso con buffer de extracción es común someter la muestra a tres o cuatro ciclos de incubación a temperaturas entre los 50 °C y 70 °C alternados con agitación de la muestra (manual, con vórtex o en homogenizadores celulares utilizando micro esferas) e incubación a 4 °C. La temperatura de incubación no puede ser mayor a los 80 °C, ya que a esta temperatura se comienza a degradar el ADN. Estas incubaciones facilitan la ruptura de lípidos en la membrana celular, permitiendo la liberación del ADN de la estructura celular. Posteriormente, resulta necesario tratar las muestras con dos extracciones de fenol para eliminar las proteínas (como nucleasas); para ello se agrega de fenol el mismo volumen de la muestra, se mezcla bien (vórtex), se centrifuga a 10,000 rpm (tres minutos), recuperando el sobrenadante con cuidado de no acarrear las proteínas que quedan en la interface (Souza et al., 2007).

Después de la extracción con fenol, es común llevar a cabo otra extracción con cloroformo para acabar de limpiar la muestra de cualquier residuo lipídico. Una vez más, hay que agregar igual volumen de cloroformo que el de la muestra, mezclar bien (vórtex) y centrifugar para recuperar el sobrenadante. Una vez concluido este paso, se lleva a cabo la precipitación del ADN con etanol absoluto y con una sal a concentración alta (Souza et al., 2007).

Por otra parte, el alcohol en la solución de precipitación se utiliza para remover la concentración residual de sales y promover la precipitación del ácido nucleico. Cuando se trata de muestras con baja concentración de ácidos nucleicos, comúnmente se utiliza un volumen de muestra de isopropanol, en lugar de dos volúmenes de muestra cuando se trabaja con etanol. La precipitación del ADN es casi inmediata en presencia de la sal y el alcohol, sin embargo se recomienda incubar la muestra durante 20 minutos a -80 °C o durante 45 minutos a -20 °C. Posteriormente, se centrifuga la muestra (15 minutos a 10,000

rpm), se remueve la fase acuosa y se lava la pastilla de ADN con etanol al 70% para eliminar todas las sales que permanezcan en la solución. Las muestras se vuelven a centrifugar (un minuto a 10,000 rpm), se elimina el etanol y se deja secar el ADN (15 minutos a 37 °C ó a 30 minutos a temperatura ambiente) hasta que no haya más trazas de alcohol, (Souza et al., 2007).

Los protocolos de extracción del DNA se dividen en dos tipos directas o indirectas, y va dependiendo de la finalidad de estudio que se quiera realizar. La diferencia de cada protocolo radica de lo se vaya a realizar, es decir extraer el DNA directamente de la muestra ya sea suelo, agua animales o plantas, permitiendo una evaluación total de todos los microorganismos presentes en cualquier entorno, abarcando tanto microorganismos cultivables como no cultivables mientras que la otra técnica se extrae el DNA solamente de microorganismos cultivables por la opción de realizar una incubación en un medio de cultivo nutritivo donde la muestra será depositada y a partir de ahí realizar la recolección de microorganismos para la extracción metagenómica del DNA conlleva a recaer que solo ciertos microorganismo puede llegar a ser aislados y del cual solo es específico del que se requiere investigar (Delmont et al., 2011).

3.6 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La electroforesis es el estudio del movimiento de moléculas cargadas en un campo eléctrico, y se emplea particularmente para la caracterización y análisis de polímeros biológicos cargados. En esta electroforesis el medio de soporte utilizado es la agarosa, producto extraído de algas marinas, y que forma una matriz gelatinosa al polimerizar sus monómeros de galactopiranososa en una solución amortiguadora altamente iónica. Los ácidos nucleicos se pueden separar en función de su peso molecular y de su conformación (circular, circular hendida, lineal, superenrollada, mono/bicatenario), así como de la concentración de la agarosa. La separación efectiva de los fragmentos de ADN dependen entonces tanto de la masa como de la carga de los distintos fragmentos en realidad es una relación carga-masa (Yáñez, 2007).

IV. JUSTIFICACIÓN

Una de las técnicas más importantes y cruciales en el análisis metagenómico es el proceso de extracción del ADN metagenómico debido a que es una herramienta importante en el área de ecología molecular, la cual permite explicar los cambios en la estructura y función de las comunidades microbianas en diferentes ecosistemas (suelo, aire y agua), a través del tiempo y conocer las perturbaciones que sufren este tipo de ambientes por las actividades antropogénicas. Sin embargo este tipo de investigaciones son pocas en el estado de Chiapas, por lo que en este estudio se establecen distintas técnicas para evaluar y analizar DNA metagenómico en suelos provenientes de diferentes ecosistemas y agroecosistemas de tal manera que un futuro se obtendrá información de gran importancia relacionada con la identificación de los microorganismos presentes y sus funciones en diferentes ciclos biogeoquímicos en los ecosistemas en el estado de Chiapas, México. El cual cuenta con una gran riqueza natural y biodiversidad de ecosistemas y agroecosistemas.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Establecer 2 métodos diferentes de extracción de DNA metagenómica de suelos provenientes de diferentes ecosistemas del Chiapas.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar las características fisicoquímicas de suelos en diversos ecosistemas en el estado de Chiapas.
- Establecimiento de diferentes métodos de extracción de DNA metagenómica en suelos caracterizados del estado de Chiapas.
- Evaluar y comparar la calidad del DNA metagenómica de los suelos de los diferentes ecosistemas de Chiapas para su empleo en la realización de PCRs.

VI. METODOLOGÍA

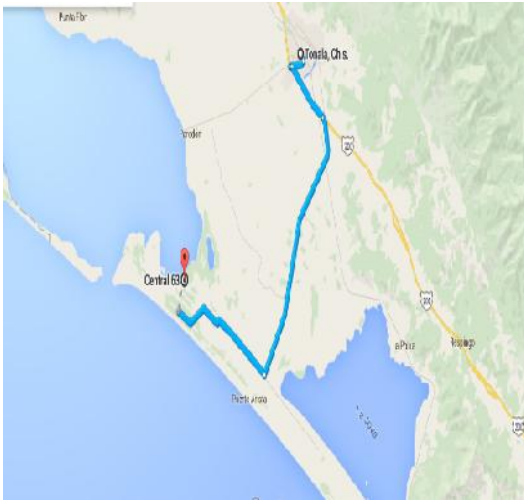
6.1 Descripción de las áreas de estudio

Para la realización de este trabajo se llevaron a cabo muestreos de diferentes sitios experimentales que se indican en el cuadro 2, los cuales fueron seleccionados considerando que sean sitios representativos de un ecosistema y contrastantes con otros como son 1) la zona de manglares ubicada cerca de la costa del municipio de Tonalá, 2) el volcán Chichonal como un ecosistema de un suelo extremo ubicado en colindancia con el municipio de Pichucalco, 3) un ecosistema forestales, ubicados en el municipio de Huixtán este por contener una amplia zona de bosques con grandes cantidades de materia orgánica y 4) un suelo de un agroecosistemas ubicado en el municipio de la concordia.

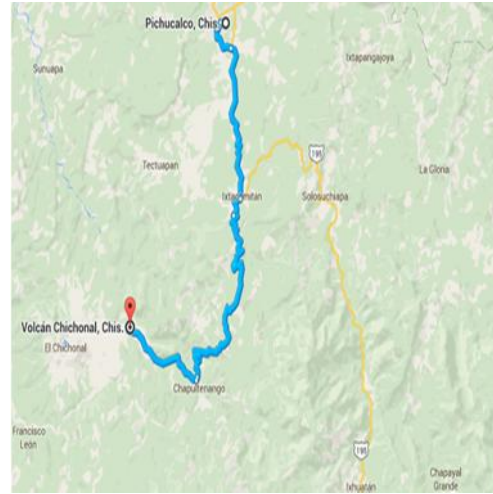
Cuadro 2. Localización, clima, y características de los sitios experimentales de diferentes ecosistemas del estado de Chiapas*.

Sitio Experimental	Coordenadas Geográficas	Tipo de suelo predominante	clima	Tipo de vegetación	Uso del Suelo	Temperatura y precipitación anual	Altitud (m)
Concordia	16° 01' 55'' N 92° 50' 54'' O	Leptosol	Cálido subhúmedo	Bosque, selva, pastizal inducido y sabana.	Agricultura, pastizal cultivado, y zona urbana	14 – 26°C / 1 000 – 4 000 mm.	2600
Huixtan	16° 40' 30'' N 92° 29' 00'' O	Luvisol	Templado húmedo	Bosque y pastizal inducido	Agricultura y zona urbana.	14 – 22°C / 1200 – 2000 mm.	2700
Tonalá	15° 57' 30'' N 93° 49' 05'' O	Leptosol	Cálido subhúmedo	Selva, manglar, pastizal inducido, y sabana.	Agricultura, Pecuario.	14 – 30°C / 1200 – 3500 mm.	2500
Pichucalco	17° 19' 00'' N 93° 00' 00'' O	Luvisol	Cálido húmedo	Selva, pastizal inducido, tular y área sin vegetación	Agricultura, pastizal cultivado, y zona urbana	20 – 28°C / 2500-4500 mm.	1300

*Fuente: *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, Chiapas (INEGI).*



A)



B)

Figura 6. Mapa del estado de Chiapas donde se muestran algunos sitios experimentales. A) Tonalá y B) Volcán Chichónal, Pichucalco (Imágenes tomadas de Google Maps, 2015).

6.2 Muestreo de suelos

La técnica de muestreo empleada para la realización de este protocolo es de muestreo simple el cual se explica brevemente, dicha técnica consiste en la obtención de una muestra compuesta (mezclas de varias submuestras), se asegura la representatividad de las muestra en una misma área por cada punto de muestreo. Los pasos para realizar este tipo de muestreo fueron los siguientes:

6.2.1 Número de submuestra

Cada muestreo se constituyó por un número de submuestra según el siguiente criterio tomándose de 3 a 6 submuestra por cuadro o parcela.

6.2.2 Selección de los puntos de extracción de cada submuestra

Se debe elegir algún patrón de recorrido dentro de cada área homogénea, antes de efectuar la extracción de las submuestra, como se observa en la Figura 7.

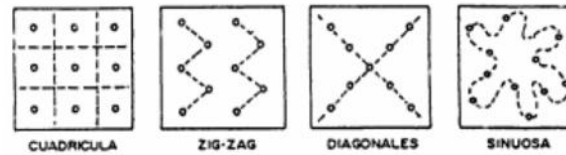


Figura 7. Punto representativo de un área de muestreo.

La toma de muestra se realizó en forma diagonal formando un área cuadrada de alrededor de 1 metro² y tomándose el muestreo en forma diagonal obteniéndose 3 puntos de extracciones, cabe destacar que en algunas zonas se tomaron solo 2 puntos de extracción debido a las condiciones del área de muestreo.

6.2.3 Profundidad de muestreo

Se consideró la profundidad en la que hay mayor desarrollo de raíces o césped, como orientación por lo que se tomó en consideración las siguientes medidas:

- Césped, invernáculo, viveros y suelo marítimo de 0 a 15 cm.
- Pradera, cultivos tradicionales: capa arable 0 - 20 cm.
- Frutales, forestales: 0 – 20.

6.2.4 Extracción de las submuestra

Se comenzó por la eliminación de la cobertura vegetal u hojarasca en cada punto elegido y, con una pala limpia (libre de óxido y/o agroquímicos), se realizó un corte en el suelo en

forma de V, arrojando la primera palada a un costado. En la segunda palada se saca la profundidad de muestreo (10- 15 cm).

6.2.5 Cuarteo y obtención de la muestra compuesta

Una vez que se fue obtenida la última submuestra, se juntaron y colocaron dentro de una bolsa de plástico limpio (figura 8), obteniéndose un peso final de 0.5 a 1 kg de muestra de suelo, cada una de las muestras fueron almacenadas y transportadas dentro de una hielera a una temperatura de -2 a 4 °C.

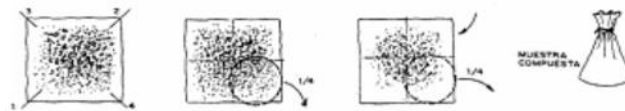


Figura 8. Mezclado de una mismo punto de muestro.

6.3 Caracterización fisicoquímica de suelos

La caracterización fisicoquímica y el procedimiento experimental en el establecimiento de métodos para la obtención de DNA metagenómico, fueron realizados en el Laboratorio de Biología Molecular, del Polo Tecnológico Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas Analíticas en Biocombustibles del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG).

Para la preparación de las muestras los suelos fueron secados al aire libre y se extendieron sobre una superficie plana y puestos al sol mezclándolo continuamente, el tiempo de exposición dependió del tipo de suelo hasta obtener un suelo seco el cual fue tamizado

para eliminar cualquier tipo de basura como ramas, hojas o piedras. Los parámetros que se determinaron en la caracterización fisicoquímica de los suelos se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro. 3 Parámetros determinados en suelos y el tipo de método empleado.

Determinación	Método
Humedad	Método Gravimétrico
pH	Potenciómetro (Thomas, 1996).
Conductividad Eléctrica (CE)	Conductímetro (Rhoades et al., 1989).
Capacidad de Retención de Agua (CRA)	Método Gravimétrico (Gee y Bauder, 1986).
Textura	Densímetro de Bouyoucos

La caracterización fisicoquímica fue propuesta por Ruiz-Valdiviezo et al. (2010). El pH se realizó mediante una saturación de suelo con agua estéril libre de sales en una relación (1:2.5) y se midió con un potenciómetro. La conductividad eléctrica se realizó mediante una solución saturada de suelo con agua y pasado de las 24 horas se midió la conductividad eléctrica. La capacidad de retención de agua se realizó saturando la muestra con agua estéril libre de sales colocada en embudo y luego de 24 horas se realizó la medición por método gravimétrico Sin embargo también se hicieron para este proyecto las determinaciones del contenido de Nitrógeno totales y Carbono Orgánico en cada tipo de suelo.

6.4 Protocolo de extracción de ADN metagenómico en suelos

Estos métodos se caracterizan en que las soluciones requeridas son elaboradas en el laboratorio y pueden ser modificadas según requerimientos particulares. La extracción de DNA por estos métodos combina procesos químicos, físicos y mecánicos e incluye básicamente tres pasos (Souza et al., 2007):

- Lisis celular
- Eliminación de proteínas
- Precipitación y limpieza del DNA

Los métodos de extracción de DNA presentan algunas ventajas y desventajas respecto a otros métodos: son económicos, no se manejan compuestos químicos tóxicos o contaminantes al ambiente y se obtienen grandes cantidades de DNA; pero por otro lado, la pureza del DNA no es absoluta ya que pueden obtenerse células incompletas y la absorción del DNA (Souza et al., 2007).

Metodología Propuestas para Extracción de DNA metagenómico

- a) Método de Hoffman-Winston (1987).
- b) Método de Lisis enzimática (Bello-López, 2014).

Para la aplicación de ambos protocolos se requirió de una serie de precauciones para no contaminar las muestras con ácidos nucleicos extraños u algún otro contaminante. La portación de guantes y cubre bocas para protección personal así como evitar contaminar las muestras y uso total de materiales y soluciones estériles. Es necesario trabajar en condiciones estériles y limpiar las áreas de trabajo con disolventes.

6.4.1 Método de extracción de DNA metagenómico en suelo con solución de Hoffman-Winston.

6.4.1.1 Preparación de la muestra

Para poder pesar las muestras almacenadas a -2 °C se dejaron con anterioridad a temperatura ambiente del cual se pesó 0.5 gramos de muestra de suelo en tubos Falcon® de 15 ml.

6.4.1.1.1.-Eliminación de materia orgánica

Para la eliminación de materia orgánica o ácidos húmicos, se realizaron lavados con pirofosfatos 0.15 M, se adicionaron 15 ml de pirofosfato de sodio al tubo y se agitaron en vortex durante 10 minutos para luego ser llevado a centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos a 25 °C. Los lavados se repitieron hasta obtener un sobrenadante transparente.

6.4.1.1.2.- Eliminación del exceso de pirofosfato de sodio

Para eliminar el exceso de pirofosfato de sodio, se adicionaron 15 ml de buffer de fosfato sodio a pH 8 y agitaron en vortex hasta resuspenderlos y luego se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos a 25 °C y se eliminó el sobrenadante, este paso se realizó varias veces hasta considerar la eliminación del exceso de pirofosfato mediante la visualización del líquido viéndose transparente.

6.4.1.2.- Método de Extracción de Hoffman-Winston.

A las muestras se le agregó 700 µl de solución lisis de Winston, un volumen de arena estéril y se llevó a resuspender en vortex a velocidad máxima durante 15 minutos y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 25 °C.

6.4.1.3.- Eliminación de Proteína y Purificación de DNA Metagenómico

6.4.1.3.1.- Se transfirió la fase acuosa del paso anterior a un Eppendorf® nuevo de 1.5 ml, y del cual se agregaron 200 µl de EDTA a 0.5 M a pH 8 y un volumen de 200 µl de acetato de potasio a 5 M pH y se incubó durante 30 minutos a 4 °C. Pasado el tiempo de incubación, el tubo se centrifugó a 13000 rpm, 10 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 ml.

6.4.1.3.2.- Para la eliminación de exceso de proteínas, se realizaron lavados añadiendo 400 µl de solución de Cloroformo:Alcohol-Isoamilico 24:1 y agitando en vortex durante unos 15 segundos y centrifugando a 13 000 rpm durante 10 minutos a 25 °C, luego se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf®, en este paso se debe transferir la capa superior evitando absorber la fase orgánica, en caso de haber absorbido la fase orgánica devolver el contenido al tubo Eppendorf® anterior y repetir la centrifugación.

6.4.1.3.3.- Repetir dos lavados más de solución Cloroformo: Alcohol-Isoamilico 24:1.

6.4.1.3.4.- A la fase acuosa recuperada se le agregaron un volumen 1:1 de solución PEG al 13%, para precipitar el DNA metagenómico y se agitó en vortex y se dejaron incubar durante 48 horas a -20 °C.

6.4.1.4.- Purificación y obtención del DNA metagenómico

Se descongeló la muestra a una temperatura de 4 °C y centrifugó a 13 000 rpm a 4°C durante 10 min., se decantó el sobrenadante teniendo mucho cuidado de no eliminar la pastilla de DNA., y se realizó un lavado con etanol al 70%. Se Centrifugo 13000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se eliminó el exceso de etanol y después se dejó secar la pastilla durante 15 minutos, por último se resuspendió la muestra de DNA metagenómico con 40 µl de agua inyectable estéril.

6.4.2 Método de extracción de ADN metagenómico en suelo con solución de Lisis Enzimática

6.4.2.1. Preparación de la muestra

6.4.2.1.1.- Para poder pesar las muestras almacenadas a -2 °C se dejaron con anterioridad a temperatura ambiente del cual se pesaron 0.5 gramos de muestra de suelo en tubos Falcon® de 15 ml.

6.4.2.1.2 Eliminación de materia orgánica

Para la eliminación de materia orgánica o ácidos húmicos, se realizaron lavados con pirofosfatos de sodio 0.15 M, se adicionaron 15 ml de pirofosfato al tubo y se agitó en vortex durante 10 minutos para luego ser llevado a centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos a 25 °C. Los lavados se repitieron hasta obtenerse un sobrenadante transparente.

6.4.2.1.3 Eliminación del exceso de pirofosfato

Para eliminar el exceso de pirofosfatos se adicionaron 15 ml de buffer de fosfato de sodio a pH 8 y agitaron en vortex hasta resuspender y luego se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos a 25 °C y se eliminó el sobrenadante, este paso se realizó varias veces hasta considerar la eliminación del exceso de pirofosfato mediante la visualización del líquido viéndose este transparente.

6.4.2.2. Lisis Enzimática

Al suelo lavado se le agregaron 1000 μ l de buffer para lisozima y 80 μ l de lisozima e incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después se adicionaron 1000 μ l de SDS al 10% y 0.1 g de arena estéril, agitándolo en vortex durante 15 minutos y se centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 minutos a 25 °C, después transfirió la fase acuosa a un Eppendorf® nuevo de 1.5 ml.

6.4.2.3. Eliminación de Proteína y Purificación de DNA Metagenómico.

3.1 Se transfirió la fase acuosa del paso anterior a un Eppendorf® nuevo de 1.5 ml, y se agregaron 200 μ l de EDTA a 0.5 M a pH 8 y un volumen de 200 μ l de acetato de potasio a 5 M pH y se incubó durante 30 minutos a 4 °C. Pasado el tiempo de incubación se centrifugo a 13000 rpm, 10 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de Eppendorf de 1.5 ml.

6.4.2.3.2 Para la eliminación de exceso de proteínas, se realizaron lavados añadiendo 400 μ l de solución de Cloroformo:Alcohol-Isoamilico 24:1 y agitando en vortex durante unos 15 segundos y centrifugando a 13 000 rpm durante 10 minutos a 25 °C, luego se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf®, en este paso se debe transferir la capa superior evitando absorber la fase orgánica, en caso de haber absorbido la fase orgánica devolver el contenido al tubo Eppendorf anterior y repetir la centrifugación.

6.4.2.3.3 Repetir dos lavados más de solución Cloroformo: Alcohol-Isoamilico 24:1.

6.4.2.3.4 A la fase acuosa recuperada se le agregaron un volumen 1:1 de solución PEG al 13%, para precipitar el DNA metagenómico y se agito en vortex y se dejaron incubar durante 48 horas a -20 °C.

6.4.2.4. Purificación y obtención de DNA metagenómico

Se descongeló la muestra a una temperatura de 4 °C y se centrifugaron a 13000 rpm a 4°C durante 10 min., se decantó el sobrenadante teniendo mucho cuidado, de no eliminar la pastilla de DNA y se realizó un lavado con etanol al 70%. Se Centrifugo a 13000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se eliminó el exceso de etanol y se dejó secar la pastilla durante 15 minutos, por último se resuspendió la muestra de DNA metagenómico con 40 µl de agua inyectable estéril.

6.5 Comprobación y cuantificación de la extracción de DNA metagenómico mediante: Electroforesis en gel de agarosa y uso de equipo para cuantificar “Nanodrop 3300”.

Para la Verificación de la calidad de DNA metagenómico, se realizó mediante electroforesis en placa de gel de agarosa al 0.8 %, colocándose una relación 6:2 µl de muestra (DNA metagenómico) y Syber Green o buffer de carga. La electroforesis se realizó a 80 volts durante 35 minutos, empleándose una solución amortiguadora de TAE 1X; una vez terminado se llevó a visualizar a un transluminador UV y se documentaron los resultados mediante un fotodocumentador de imágenes.

Luego de la verificación y confirmación de DNA mediante electroforesis, la cuantificación del DNA extraído y su calidad se realizó preparando previamente una solución de 200 µL de TE 1X con picoGreen (1:200), mezclando una alícuota de muestra con solución previamente preparada, posteriormente se lee y cuantifica respectivamente en el equipo “nanodrop 3300” de la marca thermoScientific y la visualización de los datos computarizados se analizaron en un equipo de cómputo de la marca “Fujitsu Siemens lifebook”.

VII. RESULTADOS

7.1. Caracterización fisicoquímica de suelos

Las características fisicoquímicas de los diferentes suelos se presentan en la cuadro 4. El contenido de humedad se encontró en el rango de 4 a 37%, el pH se encontró en un rango de entre 4.5 a 6.8. Con respecto al contenido de carbono orgánico el suelo salino del sitio de muestreo de Tonalá contiene mayor proporción y el que presentó bajo contenido fue el tipo de suelo forestal del sitio de muestreo Huixtán, mientras que el contenido de nitrógeno lo presentó en mayor cantidad el suelo nativo del sitio de muestreo de la concordia, en cuanto a la textura del suelo el tipo franco arenoso se presentó en 3 sitios de muestreo, para los tipos de suelos como el nativo, el salino y el volcánico, así mismo la única diferencia de textura la presentó el sitio de muestreo Huixtán con el tipo de textura franco arcilloso.

Cuadro 4. Características fisicoquímicas de suelos y sedimentos empleados para la extracción de DNA metagenómico.

Sitio de muestreo	Muestras de ecosistema	Humedad (%)	pH	CE (dSm ⁻¹)	CRA (gH ₂ O/kg suelo seco)	C Orgánico (TOC) (g C/ kg suelo seco)	N total (g N/kg suelo seco)	Tipo Textura
Concordia	Agroecosistema (Nativo)	5.99	6.77	0.431	0.41	9.65	1.77	Franco Arcillo Arenoso
Huixtan	Forestal	4.95	4.87	ND	0.741	5.05	0.22	Franco Arcilloso
Tonalá	Manglar	37.69	6.22	2.3	0.8946	77.20	0.48	Franco Arenoso
Pichucalco	volcánico	ND	4.2	ND	ND	31.3	0.70	Franco arenoso

CE= Conductividad Eléctrica; ND = No determinado

7.2 Extracción de DNA metagenómico

Se extrajo DNA metagenómico en diferente sitios de muestreo del estado de Chiapas, y mediante una electroforesis de DNA en gel de agarosa al 0.8 % se verificó la eficiencia de los métodos propuestos y la presencia de DNA metagenómico (Figura 9). Es importante destacar que para el análisis de la comunidad microbiana del suelo, es esencial diseñar protocolos que permitan obtener DNA metagenómico de alta calidad y un rendimiento apropiado para su posterior amplificación y secuenciación mediante diferentes plataformas de análisis de secuencias.

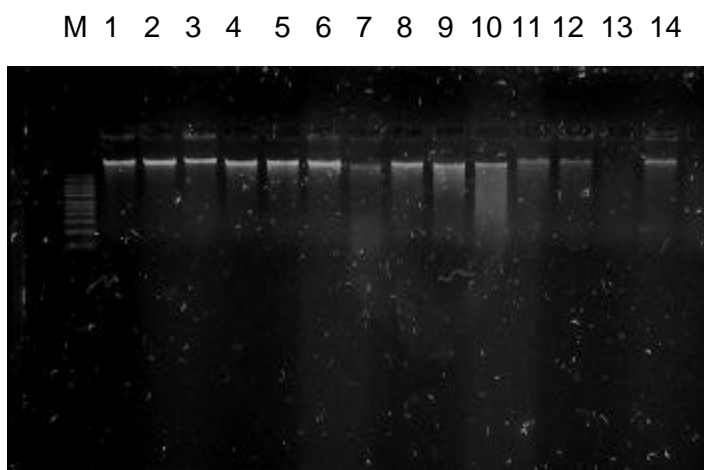


Figura 9. Electroforesis de gel de agarosa de la extracción de DNA metagenómico de suelos.(M) marcador 1 Kb plus, (1) suelo nativo #1 método de Lisis enzimática, (2) suelo nativo #1 método de Hoffman-Winston, (3) suelo forestal #1 método lisis enzimática, (4) suelo forestal #1 método de Hoffman-Winston (5) suelo forestal #2 método lisis enzimática (6) suelo forestal #2 método Hoffman-Winston, (7) suelo #1 salino método Lisis enzimática, (8) suelo salino #1 método Hoffman-Winston, (9) suelo #2 salino método Lisis enzimática, (10) suelo salino #2 método Hoffman-Winston, (11) suelo volcánico #1 método lisis enzimática, (12) suelo volcánico #1 método Hoffman-Winston, (13) suelo volcánico #2 método lisis Hoffman-Winston, (14) suelo volcánico #2 método lisis enzimática.

De los métodos de extracción establecidos, el método enzimático (en los carriles 1, 3, 5, 7, 9, 11,14) fue el que permitió visualizar bandas de DNA metagenómico con una mayor intensidad, sin embargo se puede indicar que en el carril 7 el DNA se observa con intensidad

tenue, mientras que con el método Hoffman-Winston (1987), (carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12) se visualizaron bandas de DNA metagenómico con mucha menor intensidad. Así mismo el DNA metagenómico del sedimento volcánico presentó una baja intensidad de banda hasta el punto no se veía ninguna banda (carril 13) comparado con el DNA extraído de las otras muestras ambientales.

Para comprobar que ambos métodos propuestos son eficientes se realizaron nuevamente todas extracciones que continuación se presenta en la siguiente figura 10.

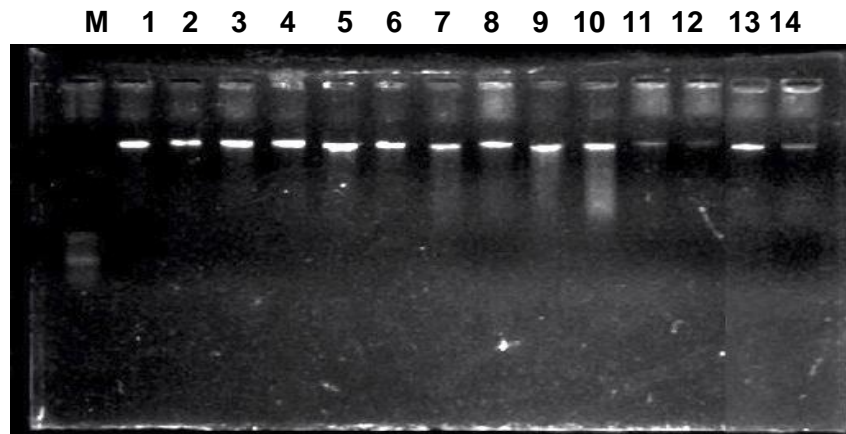


Figura 10. Electroforesis de gel de agarosa de la extracción de DNA metagenómico de suelos.(M) marcador 1 Kb plus, (1) suelo nativo #1 método de Lisis enzimática, (2) suelo nativo #1 método de Hoffman-Winston, (3) suelo forestal #1 método lisis enzimática, (4) suelo forestal #1 método de Hoffman-Winston (5) suelo forestal #2 método lisis enzimática (6) suelo forestal #2 método Hoffman-Winston, (7) suelo #1 salino método Lisis enzimática, (8) suelo salino #1 método Hoffman-Winston, (9) suelo #2 salino método Lisis enzimática, (10) suelo salino #2 método Hoffman-Winston, (11) suelo volcánico #1 método lisis enzimática, (12) suelo volcánico #1 método Hoffman-Winston, (13) suelo volcánico #2 método lisis Hoffman-Winston, (14) suelo volcánico #2 método lisis enzimática.

En la figura anterior es posible comprobar que ambos métodos propuestos tuvieron una eficiencia en extraer DNA metagenómico y se ve reflejado en las bandas de mayor y menor intensidad. Por lo que se implementó el último paso que es la cuantificación (concentración) del producto crudo obtenido de DNA metagenómico en todas las muestras.

7.3 Cuantificación de DNA

El DNA metagenómico se cuantifico para conocer la concentración, que se obtuvo de cada una de las muestras y estas se analizaron con el equipo “nanodrop 3300”, como se muestra en el cuadro 5.

Cuadro 5. Concentración de DNA metagenómico ($\mu\text{g/mL}$) en diferentes suelos y sedimentos del estado de Chiapas.

Muestra	Método de extracción	Concentración de DNA ($\mu\text{g/mL}$)
Suelo Nativo 1	Lisis enzimática	6.20
Suelo Nativo 1	Hoffman-Winston	141.61
Suelo Forestal 1	Lisis enzimática	58.91
Suelo Forestal1	Hoffman-Winston	63.72
Suelo Forestal 2	Lisis enzimática	12.73
Suelo Forestal 2	Hoffman-Winston	35.51
Suelo Manglar 1	Lisis enzimática	3.60
Suelo Manglar 1	Hoffman-Winston	14.32
Suelo Manglar 2	Lisis enzimática	36.34
Suelo Manglar 2	Hoffman-Winston	77.81
Suelo Volcánico 1	Lisis enzimática	24.63
Suelo Volcánico 1	Hoffman-Winston	13.02
Suelo Volcánico 2	Lisis enzimática	61.20
Suelo Volcánico 2	Hoffman-Winston	51.32

En el cuadro anterior se presentan las cuantificaciones de DNA para ambos métodos se indica que para una misma muestra se emplearon ambos métodos y que dichos resultados se comparan individualmente de cada punto de los diferentes suelos.

Se encontró que el método de Hoffman-Winston (1987) obtuvo más concentraciones en las mayorías de la muestras de las diferentes ecosistemas (cuadro 5) y que en cuestión con el método de lisis enzimática se mantiene un bajo perfil de concentraciones. Por lo tanto vemos que sin ninguna duda ambos métodos presentan una eficiencia diferente pero que proporcionan resultados en cuanto a la lectura del análisis de concentraciones de producto de DNA metagenómico en los diferentes suelos de distintos ecosistemas y del agroecosistema.

VIII. DISCUSIÓN

Para establecer los protocolos de extracción de DNA metagenómico se utilizaron dos métodos diferentes para aislar el DNA de la comunidad microbiana (metagenoma). El método de lisis enzimática reportado por Bello-López (2014) y el método de Hoffman-Winston (1987) se emplearon en 14 diferentes muestras de suelos; provenientes de 3 distintos ecosistemas incluyendo un agroecosistema.

Los suelos que se trabajaron en este proyecto se consideran de gran interés debido a que aportan una vasta información de la microbiota que se encuentran en estos. Por tanto la diversidad microbiana en suelo ha demostrado ser un repositorio de microorganismo, nuevos genes y vía metabólicas y su producción, por lo que la incapacidad de emplear técnicas de cultivos a nivel laboratorio nos limita en el entendimiento de los nicho ecológicos e importantes enzimas u otros biomoléculas (Hernández- León et al., 2010).

8.1 Características fisicoquímicas de suelos

Las propiedades fisicoquímicas juegan un papel importante en los procesos biogeoquímicos del suelo, los cuales pueden ser estudiados y analizados por que influyen en gran parte en la microbiótica de la ecología microbiana (Simon et al., 2013).

El sedimento volcánico (Chichón) tuvo un pH con un valor de 4.2 por lo que esta se considera una muestra ácida. Este valor se encuentra dentro del rango reportado en años recientes por Cuoco et al. (2013) para el mismo sitio experimental quienes encontraron valores de pH en el rango de 2.6 a 4.3.

En el caso de suelos de manglares se obtuvo un pH de 6.2, lo que indica una tendencia ligeramente ácida; este valor es similar a lo reportado en otros estudios en manglares del país en los que se reportan rangos de pH que oscilan entre 5.0 y 6.5 (Moreno et al., 2012). En el caso para suelos marinos la salinidad y la temperatura van de la mano ya que en la zona costera, en las lagunas litorales y en las áreas donde los ríos desembocan en el mar formando los esteros, la salinidad se presenta baja descendiendo desde la boca hasta su interior. Lo que presenta una variación estacional notable ya que disminuyen en la época de lluvias y aumenta en la de sequía he aquí haciendo un hincapié no solamente en esta propiedad fisicoquímica (Cifuentes et al., 2011), sino también para la conductividad eléctrica, en la cual se obtuvo un valor de 2.3 dSm^{-1} . Según la NOM-021-RECNAT-2000, determina que este suelo puede considerarse ligeramente salino. Ya que este valor es aproximadamente 1.7 veces menor al reportado en suelos de manglares del estado de Tabasco donde los valores de la conductividad eléctrica (CE) son mayores a 4 dSm^{-1} (Moreno et al., 2002).

El suelo forestal tuvo un pH de 4.87 por lo que este podrá considerarse un suelo ácido. Este valor obtenido puede estar influenciado por la cantidad de agua y de sales que están disponibles, ya que estos suelos almacenan una gran cantidad de materia orgánica debido a la presencia de hojas y pastos, los cuales retienen demasiada humedad. Según la NOM-021-RECNAT-2000, los suelos con un 16% o más de materia orgánica en todo el perfil de suelo son denominados turbosos.

Un suelo agrícola es aquel que se considera suelo apto para siembra y cultivo con poca salinidad (NOM-021-RECNAT-2000), dicho esto en el suelo nativo del municipio de la concordia se encontró con un pH aproximado de 6.7 considerado neutro y con una conductividad eléctrica de 0.431 dSm^{-1} .

En lo que respecta a la cantidad de carbono orgánico y nitrógeno total, esta se determinó para comparar la disponibilidad de estos en diversos ecosistemas, incluido un ecosistema agrícola con valores ya reportados. El mayor contenido de carbono orgánico se observó en el suelo de manglar con un valor de 77.20 g C/ kg de suelo, mientras que su contenido de nitrógeno total fue de 0.48 g N/kg de suelo seco. Moreno et al., en 2002 reportaron que la disponibilidad de carbono orgánico en manglares del estado de Tabasco fue de 47.10 g C/ kg de suelo seco y que acumulación de carbono orgánico en suelos húmedos es primeramente resultado del balance de dos procesos: la fijación de carbono a través de la fotosíntesis y la pérdida por descomposición; los promedios de fotosíntesis son más altos que en otros ecosistemas y el promedio de descomposición es más lento debido a las condiciones anaeróbicas, por lo que la materia orgánica tiende a acumularse. Si bien el suelo al ser drenado y es expuesto a condiciones aeróbicas, este degrada la vegetación y se oxida durante el proceso por lo que se acelera la liberación de carbono (Moreno et al., 2002).

Si bien la degradación de hojas, raíces o material orgánico depende en gran parte de la situación del suelo cuando caen las hojas, si el manglar está inundado, la degradación es rápida debido a que disminuye el impedimento en la movilización de nutrientes para los microorganismo y acelera la degradación de materia orgánica y aumenta la disponibilidad de carbono orgánico (Orihuela et al., 2004). En el caso del carbono orgánico del sedimento volcánico, este fue de 31.3 g C/ kg de suelo, mientras que el contenido de nitrógeno total fue de 0.70 g N/ kg de suelo, los cuales son valores mayores en comparación con los contenidos de carbono y nitrógeno de suelos como el forestal y el agrícola, debido a que en este tipo de suelo predominan altas cantidades de sales (cloruros y sulfatos) lo cual impiden la disponibilidad de materia orgánica al degradarse por autólisis (proceso que se

inicia por la alta salinidad y elevadas temperaturas) y disminuye los niveles de carbono y nitrógeno (Armienta et al., 2014).

Sin embargo uno de los suelos que presentó bajos niveles de carbono orgánico fue precisamente el suelo agrícola (nativo) con un contenido de 9.65 g C/ kg de suelo, sin embargo, para el caso del contenido de nitrógeno total, este presentó el valor más alto y fue de 1.77 g N/kg de suelo. Tanto los valores de C como de N coinciden con lo reportado por Ruíz-Valdiviezo et al., en 2010 en suelos agrícolas de Cintalapa, Villaflores y Zapotillo con valores que oscilan entre 5.0 y 22.8 g C/kg de suelo y de igual forma coincide para el caso del N con valores de 0.5 a 1.9 g N/kg de suelo. Para el caso del ecosistema forestal este presentó un contenido de carbono orgánico de 5.05 g C/ kg de suelo, mientras que el del nitrógeno total fue 0.22 g N/kg de suelo.

8.2 Extracción de DNA metagenómico

En cuanto a los métodos de extracción de DNA metagenómico debe recordarse que los principales requisitos para cualquier protocolo que se utiliza para el estudio metagenómica son la extracción de ADN de alto peso molecular con lisis adecuada de microorganismos y DNA libre de inhibidores (Faria et al., 2014).

La calidad del DNA metagenómica depende de las cualidades del suelo: contenido celular, el valor de pH y el contenido de ácidos húmicos (Hirsch et al. 2010). Estas propiedades pueden influenciar también los rendimientos del DNA extraído por lo que las diferentes muestras podrán presentar o no variación notable o no en los rendimientos de DNA extraído y esta variación puede ser debida a las diferencias en las propiedades del suelo. Sagar et al. (2013), reportaron que la influencia de un alto contenido de ácidos húmicos por la alta

disponibilidad de materia orgánica puede interferir en la obtención de una buena calidad en el aislado de DNA metagenómico y en sus respectivos análisis.

En este trabajo se emplearon dos métodos de extracción optimizados para aislar una alta concentración de DNA. Uno de estos métodos se basa en el uso de la lisis enzimática en combinación con un buffer de extracción, método con el cual se obtuvo una mayor intensidad en las bandas (Fig. 9).

En el caso del método Hoffman-Winston (1987) solamente se empleó el buffer de extracción seguido de lisis mecánica. Este método en comparación con el enzimático presenta menor intensidades de bandas de DNA.

Sin embargo pese a haberse llevado una combinación de diversos procesos de lisis celular, mecánica y química, la eficiencia de los protocolos de extracción se ve afectada debido a las diferentes condiciones de suelos (Sharma et al., 2013) por lo que la pureza de DNA varía de igual forma. El término pureza del DNA metagenómico puede indicar que una electroforesis estará libre de contaminantes, es decir, siempre que no se aprecie ningún signo o mancha de impureza dentro de la placa de gel. En ambos métodos se observó la presencia de ácidos húmicos, en cual se observa en forma de barrido ubicado debajo de las banda de DNA metagenómico (Fig. 8 y 9).

Como resultado de lo anteriormente mencionado se sugiere que para mejorar la calidad del extracto de DNA metagenómico hay que reducir en su mayoría cualquier tipo de contaminante mediante el uso y empleo de buffer ácidos (cabe indicar que los ácidos húmicos son solubles en pH básico pero insolubles en ácido), el uso de Tris-HCl a pH de 7-8, ayuda a reducir los niveles de ácidos húmicos aunque no en su totalidad pero mejora en tanto la calidad como el rendimiento de DNA extraído (Xie et al., 2012).

8.3 Cuantificación de DNA metagenómico

Para discutir la eficiencia de los métodos establecidos debe cuantificarse el rendimiento total de DNA metagenómico extraído de las muestras de suelo espectrofotométricamente para obtener valores que varían con respecto al método empleado. El rendimiento de DNA obtenido con el método enzimático se haya en un rango de 6.2 a 61.2 µg/mL, mientras que con el método Hoffman-Winston (1987) se obtuvieron valores mucho mayores: 13.02 a 141.61 µg/mL. Islam et al. (2012) reportó que los métodos que utilizan lisis celular enzimática obtenían un alto de rendimiento de DNA metagenómico extraído en comparación a los métodos que utilizan lisis química y mecánica. Sin embargo en años recientes, los métodos en los que empleando solamente lisis química (buffer de extracción) seguido de una lisis mecánica han obtenido mejor rendimiento y un aislado con menor cantidad de contaminantes (ácidos húmicos) (Sagar et al., 2013), por tanto se confirma que el método de Hoffman-Winston que se empleó en este proyecto dio mejores resultados en las concentración total de productos de DNA obtenidos.

En el cuadro 6 se compara los resultados del aislado de DNA metagenómico de este proyecto de nuestro estado con otros protocolos de diferentes artículos y autores que ya se han implementado donde se asemejan en cuanto a eficiencia de los métodos con respecto a la cantidad total de DNA metagenomico que se obtuvo de uno de los suelos que se trabajó (suelo salino).

Cuadro 6. Comparación de la cantidad de DNA metagenómico aislado por protocolos optimizados en diferentes suelo.

Método	Tipo de suelo	Cantidad de DNA ($\mu\text{g/mL}$)
Faria et al., (2014)	Suelo rizosferico	0.73
Xie et al., (2012)	Suelo de praderas	12.67
Verma & Satyanarayana (2011)	Suelo alcalino	17.31
Sagar et al., 2013	Suelo y sedimento (industrial)	36.02
Metodos propuestos	Suelo salino	33.01

Enfocándose en cada una de las muestras la concentración total de DNA metagenómico presenta de la siguiente manera: el suelo nativo del agroecosistema de la Concordia presenta la mayor concentración: 73.91 $\mu\text{g/mL}$, seguido de la muestra forestales de Huixtán con 61.31 $\mu\text{g/mL}$, con respecto al suelo salino de manglar de la zona costera de Tonalá se obtuvo una concentración de 57.07 $\mu\text{g/mL}$ y finalmente la menor concentración de DNA se observó en el sedimento volcánico de Pichucalco con un valor de 56.36 $\mu\text{g/mL}$. Las altas concentraciones de DNA metagenómico en suelo nativo y en suelo forestal se debe a que predominan una alta cantidad de materia orgánica por la disposición de pastizales y bosques y una constante humedad (proveniente de ríos, arroyo o lagunas) .En suelo de manglar el rendimiento es notablemente inferior, lo cual puede deberse a la cantidad de agua y salinidad presente en el suelo, lo cual impide un buen aprovechamiento y poca aceleración en la descomposición del material orgánico (Moreno et al., 2002; Orihuela et al., 2004).

En base a los resultados obtenidos y según lo reportado por Islam et al., (2012) puede afirmarse que el DNA bacteriano y sus huellas digitales están relacionadas con las propiedades fisicoquímicas del suelo: la conductividad eléctrica, que entre más alta menor el pH y mayor es disponibilidad de sales, la cual degrada la materia orgánica o impiden el crecimiento de ciertos microorganismo, en tanto el contenido de carbono orgánico y nitrógeno total está ligada con la cantidad de materia orgánica hallada en el suelo y se enfoca en la degradación de esta y su relación con la actividades aeróbicas y anaeróbicas; por lo tanto estos factores son determinantes en la elección de los diferentes métodos de extracción de DNA metagenómico, por lo que estas propiedades afectan e intervienen en la calidad y rendimiento del DNA.

IX. CONCLUSIÓN

Los protocolos propuestos para estas investigaciones son de gran importancia en medida al desarrollo de técnicas para aislar DNA metagenómico de la diversidad microbiana y biodiversidad en suelos, proponiéndose como herramienta alternativa a la metagenómica, en suelos de diferentes ambientes ya sea extremo o inhóspito.

De los 2 protocolos establecidos se vio una efectividad de la extracción y aislado de DNA metagenómico, comprobándose que el método Hoffman-Winston permitió obtener una mayor concentración de DNA metagenómico (13.02 a 141.61 $\mu\text{g/mL}$) en comparación con la concentración de 6.2 a 61.2 $\mu\text{g/mL}$ obtenido con el método de enzimático.

La cantidad de DNA metagenómico de los diferentes suelos de ecosistemas puede verse influenciada tanto por el método utilizado y las complejidades de las características fisicoquímicas del suelo.

X. BIBLIOGRAFÍA

Ariefdjoha M., Savaiano, DA., Nakatsu CH., (2010) Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. *Nutr J.* 23:1-8.

Armienta M.A., De la cruz-Reyna S., Ramos S., Cenicero N., Cruz O., Aguayo A. y Arcega-Cabrera F. (2014). Hydrogeochemical surveillance at El Chichón volcano crater lake, Chiapas, Mexico. *ELSEVIER. Journal of Volcanology and Geothermal Research.* 285: 118-128.

Bello-Lopez J.M., Domínguez-Mendoza C., de Leon-Lorenzana A. Ruiz-Valdiviezo V.M., Dendooven L., (2014). Bacterial colonization of a fumigated alkaline saline soil. *Springer, Japan.* 18: 733-743.

Bremner J.M., (1996). Nitrogen-Total. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods Part 3.* Soil Science Society of America Inc., American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 1085–1122.

Carrigg C., Rice O., Kavanagh S., Collins G., O'Flaherty V., (2007) DNA Extraction Method Affects Microbial Community Profiles from Soils and Sediment. *Appl Microbiol Biotechnology.* 77: 955-964.

Cifuentes J.L., Torres M.P., Frias M., (2011). El océano y sus recursos II. Las ciencias del mar: oceanografía geológica y oceanografía química. http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/12/htm/sec_17.html

Cruz A., Camacho F., Nájera C.K. (2013). La biodiversidad en Chiapas: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)/Gobierno del Estado de Chiapas. Vol I y II. 13-435.

Cuoco E., De Francesco S., Y Tedesco .,(2013). Hydrogeochemical dynamics affecting steam-heated pools at El Chichon Crater (Chiapas – Mexico). *Geofluids*. 13: 331-343

Daniel R. (2005). The metagenomics of soil. *Nature Review Microbiology* 3: 470-478.

Delmont T.O., Roben P., Clark I., Vogel T.M., (2011). Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. *J Microbiol Methods*. Elsevier B.V 86: 397-400.

Delmont T.O., Patrick R. Clark I., Simonet P., Vogel T.M., (2011). Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. *Journal of Microbiological Methods*. ELSEVIER. 86: 397-400.

Faria F., Neelamn P., Smita- Rastogi V., (2014). An Improved Method for Soil DNA Extraction to Study. *Hindawi. Molecular Biology International*. Article 518960.

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. *Appl. Environ. Microbiol*. 66: 5488–5491.

Handelsman J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 669-685.

Harry, M., Gambier, B., Bourezgui, Y., Garnier-Sillam, E., (1999). Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples: Interference with humic substances. *Analisis*. 27: 439–442.

Hernández-León R, Velázquez-Sepúlveda I., Santoyo G., (2010). Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Journal of Experimental Botany*. 79: 133-139

Herrera, A., Cockell, C.S., (2007). Exploring microbial diversity in volcanic environments: a review of methods in DNA extraction. *J. Microbiol. Methods*. 70: 1–12.

Hirsch P. R, Mauchline T. H., Clark I. M, (2010). Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology & Biochemistry*, ELSEVIER, 42: 878-887.

Hofman CS, Winston F., (1987). A ten minutes DNA preparation from yeast efficiently release autonomous plasmid for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57: 267-272.

Inceoglu, O., Hoogwout, E.F., Hill, P., van Elsas, J.D., (2010). Effect of DNA extraction method on the apparent microbial diversity of soil. *Appl. Environ. Microbiol*. 76: 3378–3382.

Islam R., Sultana T., Melvin J., Jang-Cheon C., Tongmin S., (2012). Comparisons of direct extraction methods of microbial DNA from different paddy soils. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 19: 337-342.

INEGI., (1984). *Cartas de Edafología*. Escala 1:250 000, Chiapas, México.

Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H. y Trevors, J. T., (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Meth.* 58: 169-188.

Leite D., et.al., (2014) Comparison of DNA extraction protocols for microbial communities from soil treated with biochar. *Brazilian Journal of Microbiology.* 45: 175-183.

López M.A., Zavala-Díaz de la Serna F.J. Romero J.M. Hernández-Rodríguez C., (2006). Phylogenetic analysis of a biofilm Bacterial Population in a Water Pipeline in the Gulf of Mexico. *FEMS Microbiol. Ecol* 58: 145-154.

Madigan, M.T., Martinko J.M., Parker J., (2000). *Brock biology of microorganisms.* Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 991 pp.

Miranda, F., (1998). *La vegetación de Chiapas.* Tercera edición por el Gobierno de Chiapas-Conaculta. Tuxtla Gutierrez, Chiapas, México. 596.

Mocali S., Benedetti A., (2010). Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology.* ELSEVIER.. 1-9

Moreno E., Guerrero A., Gutiérrez M C., Ortiz C.A. y Palma D.J. (2002). Los manglares de Tabasco, una reserva natural de carbono. *Maderas y Bosques.* Instituto de Ecología, A.C. 8: 115-128.

Nakatsu C.H., (2007). Soil microbial community analysis using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Soil Sci Soc Am J.* 71: 562-571.

Nogales B., (2005). La microbiología del Suelo en la Era de la Biología Molecular: Descubriendo la Punta del Iceberg. Asociación Española de Ecología Terrestre. Ecosistemas 14: 41-51.

NOM-021-RECNAT-2000. NORMA Oficial Mexicana. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. DOF. dof.gob.mx.

Nunan N., Wu, K., Young I. M., Crawford J. W. y Ritz, K., (2003). Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-structure of soil. FEMS Microbiol. Ecol. 44: 203-215.

Orihuela B. E., Tovilla H.C., Álvarez L.T. Franciscu V. H., (2004). Flujo de materia en un manglar de la costa de Chiapas, México. Madera y Bosques. Instituto de Historia Natural y Ecología. Número especial 2: 45-61

Ramos, S., (2009). Suelos de Chiapas, conocimiento y problemática. La biodiversidad de Chiapas. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). ISBN Vol I: 978-607-7607-99-1.

Rashedul I., Sultan T., Joe M. M. y Tongmin Sa J. Ch., (2012). Comparisons of direct extraction methods of microbial DNA from different paddy soils. Saudi Journal of Biological Sciences. 19: 337-342.

Rhoades, J.D., Mantghi, N.A., Shause, P.J. y Alves, W., (1989). Estimating soil salinity

from saturate soilpaste electrical conductivity. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53: 428–433.

Rodrigo C.; Newton CM; Annet Milling., (2004). An Optimized Protocol for Simultaneous Extraction DNA and RNA from Soil. *Brazilian Journal of Microbiology.* 35: 230-234.

Rondon M., Goodman M., Handelsman J., (1999). The earth's bounty: assessing and accessing the soil microbial diversity. *Trends in Biotechnology.* 17: 403-409.

Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., et al. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2541-2547.

Roose-Amsaleg, C.L., Garnier-Sillam, E., Harry, M., (2001). Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Appl. Soil Ecol.* 18: 47–60.

Ruíz –Valdiviezo V.M., Luna-Guido M., Aurelie G., Miceli-Gutiérrez F.M., Dendoevn L., (2010). Greenhouse gas emissions and C and N mineralization in soils of Chiapas (México) amended with leaves of *Jatropha curcas* L. *ELSEVIER. Applied Soil Ecology.* 46: 17-25.

Rzedowski J., (1994). *Vegetación de México. Mapa: Distribución Geográfica de Climas en México de Acuerdo con la Clasificación Climática de Köppen.* Limusa. Noriega Editores. D.F. México.

Sagar K., Salm-Pradeep S., Kapil G., Bolin K.K., (2013) Assessment of five soil DNA extraction methods and rapid laboratory-developed method for quality soil DNA extraction for 16S rDNA-based amplification and library construction. *ELSEVIER. Journal of Microbiological Methods.* 97: 68-73.

Sandaa, R. A., Torsvik, V., Enger, O., Daae, F. L., Castberg, T. y Hahn, D., (1999). Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30: 237-251.

Sharma S., Sharma K.K., &Kudah R.C., (2013). An efficient and economical method for extraction of DNA amenable to biotechnological manipulations, from diverse soil and sediments. *Journal of Applied Microbiology.* University of Delhi. New Delhi, India. 116: 923-933.

Simon, C., Daniel R., (2011). *Metagenomic Analyses: Past and Future Trends.* *Applied and environmental microbiology*, 77: 1153–1161.

Simon M., Peralta N. y Costa J.L (2013). Relación entre la conductividad eléctrica aparente con propiedades del suelo y nutrientes. *AACS.* 31: 45-55

Souza V., Eguiarte L., Escalante A.E., Farmer J., Forney L., Rodríguez-Martínez J.M., (2006). An Endangered Oasis of Aquatic Microbial Biodiversity in the Chihuahuan Desert. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 6565-6570.

Souza V., Eguiarte L., Aguirre X., (2007). *Ecología Molecular.* Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. 16: 447-542.

Thomas, G.W., (1996). Soil pH and soil acidity. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods.* American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 475–490.

Tovilla H.C., (1998). Ecología de los bosques de manglar y algunos aspectos socioeconómicos de la zona costera de Barra de Tecoaapa, Guerrero, México. Facultad de Ciencias, UNAM. pp. 395.

Towën S., et.al., (2011). Improved protocol for the simultaneous extraction and columnbased separation of DNA and RNA from different soils. *Journal of Microbiological Methods*. 84: 406–412.

Venter J.C., K. Remington J.F., Heidelberg A.L., Halern D., Rusch J.A., Eisen D., Wu I., Paulsen K.E., Nelson W., Nelson D.E., Fouts S., Levy A.H., Knap M.W., Lomas K., Nealson O., White J., Peterson J., Hoffman R., Parsons H., Baden-Tilson C., y H.O. Smith., (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74.

Verma D., & Satyanarayana T., (2011). An Improvante protocol for DNA extraction from alkaline soil anda sediment samples for costructing Metagenome Libraries. Springer. *Appl Biochem Biotechnol* 165: 454-464.

Xie J.P., Wu L., Van Nostrand D., He Z.L., Zhou J.Z. Yu H., Xiong J., (2012). Improvements on environmental DNA extraction anda purification procedure for matagenomic analysis. Springer. *J Cnet South Univ*. 19: 3055-3063.