

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CICATA-IPN, UNIDAD ALTAMIRA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA
UNIDAD ALTAMIRA



**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE
MICROORGANISMOS EN LODOS ACTIVADOS”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
TECNOLOGÍA AVANZADA PRESENTA:**

EDNA BERENICE CARREÓN GONZÁLEZ

ASESORES:

DR. ABELARDO FLORES VELA

DR. ARTURO LÓPEZ MARURE

Octubre

2008



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Altamira, Tamps. el día 19 del mes Septiembre del año 2008, el (la) que suscribe Edna Berenice Carreón González alumno (a) del Programa de Maestría en Tecnología Avanzada con número de registro B051122, adscrito a Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Abelardo Flores Vela y cede los derechos del trabajo intitulado Aislamiento e Identificación de Microorganismos en Lodos Activados, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Km 14.5 Carretera Tampico-Puerto Industrial Altamira, Altamira Tamaulipas México C.P. 89600, Tels. 01-833 2600124 Fax. 2649301. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Edna Berenice Carreón González
Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Altamira siendo las 13:00 horas del día 19 del mes de Septiembre del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-IPN Altamira para examinar la tesis de titulada:

"Aislamiento e Identificación de Microorganismos en Lodos Activados"

Presentada por el alumno:

<u>Carreón</u> Apellido paterno	<u>González</u> Apellido materno	<u>Edna Berenice</u> Nombre(s)
Con registro:		
B	0	5
1	1	2
2	2	

aspirante de:

Maestría en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dr. Abelardo I. Flores Vela

Dr. Arturo López Marure

Dra. Gabriela García Cervantes

Dra. Esther Ramírez Meneses

Dr. Miguel Ángel Arronte García

Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Felipe de Jesús Carrillo Romo

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA
 APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA
 DEL I.P.N.
 UNIDAD ALTAMIRA

DEDICATORÍA

A mis Papá, por su apoyo en esta etapa de mi vida, a pesar de todos mis errores gracias por su amor incondicional.

Maestra Eudelia, mami gracias por respaldar mis decisiones en todo momento; por haber tratado de entenderme en este lapso de mi vida, fue un largo y difícil camino lleno de altibajos, espero un día ser tu orgullo hecho realidad.

Mi tropa morita (Angie y Martita); a su muy corta edad me han mostrado el amor más puro. Sin importar lo agotada y desilusionada que me sintiera sus sonrisas me trajeron luz a mi vida. Gracias a mi Hermanita por haberme dado estos dos angelitos, que hoy en día son mi razón de ser mejor.

Jorge Antonio (mi bebe), gracias por haber sido parte importante en esta etapa de mi vida, por tu apoyo y cariño. Fuiste el ser que me daba fuerzas de no abatirme ante tanta adversidad que se presentaba, siempre voy a amarte; aun con toda letra que pueda escribir no alcanzo a decirte todo lo que quisiera; simplemente gracias y muchas suerte en tu nueva vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada Unidad Altamira del Instituto Politécnico Nacional, por la oportunidad de cursar la maestría en Tecnología Avanzada. También a CONACYT por la beca brindada durante el ciclo agosto del 2005 a julio del 2007.

A los Doctores Abelardo Flores y Arturo López por su asesoría en este trabajo.

A la QBF. Amparo Buenrostro, de la Universidad del Noreste; gracias por haber tenido tanta paciencia y apoyarme...gracias.

A la Dra. Gabriela García muchas gracias por su apoyo y recomendaciones muy útiles en la revisión de esta tesis.

Un agradecimiento muy especial al Centro de Biotecnología Genómica de Reynosa, por haberme permitido la realización de este trabajo de tesis.

A la Dra. Patricia Larralde Corona por su asesoría y apoyo, gracias ya que sin sus consejos este trabajo de tesis no tendría razón de ser.

A mis nenas del Laboratorio de Biotecnología Industrial, gracias por haberme hecho sentir una más de ustedes, Amanda (Rapidito...muñequita) e Isabel (Limpia, limpia); gracias por su paciencia y amistad sincera, por enseñarme lo que se de este gran mundo del genoma, Socorro (coco), Yamilka (muy bien!!) y Chayul , gracias por su valiosa amistad y apoyo, las llevo en mi corazón cada día. Al Dr. José, por sus innumerables anécdotas y consejos para este proyecto; simplemente gracias por haberme dejado ser parte de sus vidas, nunca tendré las suficientes palabras para expresar mi agradecimiento.

A mi mamá de Reynosa: Tía Berna, gracias por haberme abierto no solo las puertas de su casa, sino las de su corazón, gracias por haberme hecho sentir como una hija y apoyarme en todo momento.

A mis amigos del CICATA-IPN: Eva (ñoopa), Alma (nenis), Fhany (chiquis), Tony (ni es cierto!!), Oscar (ñoopo), Bianka, Karina y Claudia; gracias por brindarme su amistad incondicional y por haber hecho mi paso por esta maestría algo súper emocionante.

Gracias compartimos tantas vivencias juntos; escribiría otra tesis de solo recordar lo que vivimos, los adoro y quiero mucho a todos, espero esta amistad que conjuntamos sea para la eternidad.

INDICE

Lista de figuras.....	I
Lista de tablas.....	III
ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	VIII
CAPITULO I	
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1.Tratamientos Biológicos.....	2
1.2.Biofiltros.....	2
1.3.Microorganismos.....	4
1.4.Caracterización molecular.....	5
1.5.Ventajas de la caracterización molecular.....	5
1.6.Enzimas de restricción	6
1.7.Electroforesis de ADN.....	8
1.8.Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	8
1.9.Secuenciación	14
CAPITULO II	
2.1. JUSTIFICACIÓN.....	16
2.2 HIPÓTESIS.....	17
2.3. OBJETIVO GENERAL.....	17
2.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
CAPITULO III	
MATERIALES Y METODOS.....	18
3.1. Aislamiento de microorganismos.....	19
3.2. Medio de aislamiento.....	20
3.3. Siembra de microorganismos.....	20

3.4. Purificación de microorganismos.....	21
3.5. Formación de Bancos de ADN genómico.....	21
3.6. Protocolo de obtención del paquete celular.....	21
3.7. Protocolo de extracción de ADN genómico.....	22
3.8. Electroforesis en gel de agarosa.....	23
3.9. PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa).....	25
3.10 Clonación.....	27
3.11. Extracción de ADN a partir de células por PCR directo.....	27
3.12. Purificación de ADN plasmídico.....	28
3.13. Secuenciación.....	29
3.14. Análisis bioinformático.....	30
3.15. Identificación microscópica.....	30

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1. Formación de bancos de ADN genómico.....	32
4.2. Amplificación de los segmentos ITS1-ITS4 (gen 5.8S, hongos y levaduras).....	33
4.3. Clonación.....	34
4.4. Purificación ADN plasmídico.....	39
4.5. Secuenciación.....	42
4.6. Identificación microscópica.....	44
4.7. Formación de Bancos de ADN genómico.....	48
4.8. Amplificación del gen 16S.....	48
4.9. Clonación.....	50
4.10. Purificación ADN plasmídico.....	52
4.11. Secuenciación.....	54
4.12. Identificación microscópica.....	55

CAPITULO V

CONCLUSIONES.....	57
RECOMENDACIONES.....	59

BIBLIOGRAFÍA.....	61
GLOSARIO.....	63
ANEXO 1.....	66
ANEXO 2.....	71
ANEXO 3.....	80

Lista de figuras

Figura 1. Cortes de las enzimas de restricción.....	7
Figura 2. Estructura de doble cadena de una porción de una molécula de DNA.....	10
Figura 3. Pasos Básicos de la PCR según Andy Vierstracte (1999).....	12
Figura 4. Termociclador Gene Amp. PCR System 9700 Perkin Elmer.....	13
Figura 5. Bio-Rad Power Pac 300.....	23
Figura 6. Fotodocumentador 1D Kodax Digital Science 3.0.2.....	24
Figura 7. Secuenciador semiautomático marca LICOR (CBG-IPN, Reynosa Tam.).....	29
Figura 8. Microscopio utilizado en la caracterización morfológica (Olympus BX-51).....	30
Figura 9. Aislamiento de ADN genómico. Se muestra el corrimiento electrofórico del DNA en un gel de agarosa al 1% teñido con SyberGold™.....	32
Figura 10. Se muestran los resultados de la amplificación de los segmentos de ITS's-5.8S donde M es marcador de 100 pares de bases.....	33
Figura 11. PCR de Tamizaje, muestras 2, 3, 5, 6 y 8. Las amplificaciones muestran las clonas positivas con el segmento ITS-5.8, donde M es el marcador de 100 pares de bases.....	35
Figura 12. PCR de Tamizaje, muestras 1, 9,10 y 13. Las amplificaciones muestran las clonas positivas con el segmento ITS-5.8, donde M es el marcador de 100 pares de bases. Las clonas de la muestra 1, no amplificaron.....	37
Figura 13. PCR de Tamizaje muestra 1. Las amplificaciones muestran las clonas positivas con el segmento ITS-5.8, donde M es el marcador de 100 pares de bases.....	38
Figura 14. Obtención de ADN plasmídico de las muestras 2, 3, 5, 6 y 8. Las clonas 8/2 y 8/3 no presentaron ADNp.....	39
Figura 15. Obtención de ADN plasmídico de las muestras 9, 10 y 13. Todas las muestras presentaron ADNp.....	40
Figura 16. Obtención de ADN plasmídico. Muestra 1. Todas las clonas presentaron ADNp.....	41
Figura 17. Imagen de secuencias obtenidas del secuenciador LICOR.....	42
Figura 18. Microfotografías. A) M3-AGAR-AGAR.-1.- Hongo Filamentoso, B) M3-AGAR-AGAR-2.- Hong Filamentoso, C) M3-AGAR-AGAR-3.- Hongo Filamentoso. Imágenes Muestra 3, crecidas en medio YEPD.....	44
Figura 19. Microfotografía. A) M3-PDA-1.- Levadura Filamentosa, B) M3-PDA-2.- Hongo Filamentoso, C) M3-PDA-3.- Levadura Filamentosa. Imágenes Muestra 3, crecidas en medio YEPD.....	45

Figura 20. Microfotografía. A) B) M3-V8-1.- Levadura Filamentosa, C) D) M3-V8-3.- Levadura Filamentosa. Imágenes Muestra 3, crecidas en medio YEPD.....	46
Figura 21. Microfotografía. A) M6-V8-1.-Levadura con formación de pseudohifas.; B) M6-V8-4.- Hongo Filamentoso. Imágenes Muestra 6, crecidas en medio YEPD.....	47
Figure 22. Aislamiento de DNA genómico. Se muestra el corrimiento electrofórico del ADN en un gel de agarosa al 1% teñido con SyberGold™ 10X.....	48
Figura 23. Se muestran los resultados de la amplificación de los segmentos 16S donde M es marcador de 1000 pares de bases.....	49
Figura 24. Amplificación de los segmentos 16S de la colonia 1, donde M es marcador de 1000 pares de bases.....	49
Figura 25. PCR de Tamizaje. Las amplificaciones muestran las clonas positivas con el segmento 16S. M marcador de 1000 pares de bases.....	50
Figura 26. PCR de Tamizaje. Las amplificaciones muestran las clonas positivas con el segmento 16S. M marcador de 1000 pares de bases.....	51
Figura 27. Extracción de ADN plasmídico de la clona 2/4, colonia 2.....	52
Figura 28. Extracción ADN plasmídico, colonia 1.....	53
Figure 29. Morfología colonia 1. Purificación medio TGY.....	55
Figure 30. Morfología colonia 2. Purificación en TGY.....	56

Lista de tablas

Tabla 1. Ventajas y Desventajas de los distintos tipos de biofiltros según Morgan (2003).....	3
Tabla 2. Parámetros de operación de los biofiltros.....	4
Tabla 3. Enzimas utilizadas en la tecnología del ADN recombinante.....	7
Tabla 4. Preparación medio <i>Thiobacillus</i>	17
Tabla 5. Condiciones de Reacción en la amplificación de segmentos ITS (gen 5.8S).....	25
Tabla 6. Temperaturas de reacción en la amplificación de segmentos ITS.....	25
Tabla 7. Condiciones de reacción en la amplificación del gen 16S.....	26
Tabla 8. Temperaturas de reacción en la amplificación del gen 16S.....	26
Tabla 9. Componentes Mix para Tamizar.....	29
Tabla 10. Extracciones de DNA cepas Aisladas de Lodos Activados.....	32
Tabla 11. Amplificación de los segmentos ITS's-5.8S de las cepas aisladas de lodos activados.....	33
Tabla 12. Muestras Ligadas.....	34
Tabla 13. Clonas positivas muestras 2, 3, 5, 6 y 8, con el segmento ITS-5.8S.....	36
Tabla 14. Clonas positivas muestras 9, 10 y 13, con el segmento ITS-5.8S.....	36
Tabla 15. Clonas positivas muestra 1, con el segmento ITS-5.8S.....	38
Tabla 16. Extracción de ADN plasmídico muestras 2, 3, 5, 6, 8.....	39
Tabla 17. Extracción DNA plasmídico, muestras 9,10 y 13.....	40
Tabla 18. Extracción DNA plasmídico, muestra	41
Tabla 19. Identificación por comparación en la base de datos de EBI de las secuencias ITS's-5.8S obtenidas de las cepas aisladas de los lodos activados de BASF y PEMEX Refinación.....	43
Tabla 20. Clonas Positivas colonia 2.....	50
Tabla 21. Clonas positivas colonia 1.....	51

Tabla 22. Extracción ADN plasmídico, colonia 2.....	52
Tabla 23. ADN plasmídico, colonia 1.....	53
Tabla 24. Identificación por comparación en la base de datos de NCBI de las secuencias obtenidas de las colonias 1 y 2. Aislamiento inoculo PEMEX Refinación.....	54

ABREVIATURAS

ITS	Espaciadores transcritos internos
COV	Compuestos Orgánicos Volátiles
h	Hora
s	Segundo
ppm	Partes por millón
ml	Mililitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
°C	Grados centígrados
dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfatados
Fig.	Figura
L	Litro
gr.	Gramo
YEPD	Medio de cultivo de extracto de levadura-peptona-dextrosa
PDA	Medio de cultivo de Agar-papa-dextrosa
TGY	Medio de cultivo de Triptona-glucosa-extracto de levadura
μl	Microlitros
EDTA	Ácido-etilen-diamino-tetra-acético
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
Taq	ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
LB	Medio de cultivo de Broth Miller
mM	Milimolar
μg	Microgramos
rpm	Revoluciones por minuto
V	Volumen
M	Marcador de peso molecular
pb	Pares de bases
ADNp	Ácido desoxirribonucleico plasmídico
TBE 1x	Solución amortiguadora de pH

RESUMEN

Desde que comenzó el desarrollo de la industria química, se calcula que se han producido y diseminado en el medio ambiente aproximadamente 1,000,000 nuevas sustancias químicas, dichas sustancias son a base de derivados del petróleo. Además, cada año esta cifra se ve incrementando, el conocimiento del impacto de estas sustancias sobre el medio ambiente y la salud humana es alarmante.

Debido a esto surge la necesidad de nuevas tecnologías para su tratamiento, hoy en día los tratamientos biológicos son la mejor herramienta ya que ofrecen ventajas que los fisicoquímicos no, dentro de los tratamientos biológicos se encuentra la biofiltración, esta biotecnología implica el uso de microorganismos capaces de degradar petróleo crudo; es por ello que es de vital importancia aislar cepas para los diferentes contaminantes. En la actualidad se emplean técnicas de biología molecular para lograr estos objetivos, aunque su uso no se encuentra ampliamente difundido en nuestro país por el grado de dificultad técnica y de equipamiento que dichas técnicas implican.

En el presente trabajo se realizó el aislamiento de bacterias capaces de degradar compuestos derivados del petróleo, las técnicas de caracterización molecular empleados fueron: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de los espaciadores transcritos internos ITS, los cuales son regiones no codificadoras y variables lo que permitió la identificación a nivel cepa, clonación y secuenciación; El aislamiento se efectuó de lodos activados colectados de las empresas Petróleos Mexicanos Refinación y BASF; ambas localizadas en la región sur de Tamaulipas, el análisis de las secuencias obtenidas por comparación de nucleótidos en la bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) dio como resultado dos bacterias pertenecientes al género *Microbacterium* o *Aureobacterium*, las cuales son capaces de degradar compuestos derivados del petróleo.

ABSTRACT

Since the beginning of the development of chemical industry, the experts have estimated, that it has been throw about 1,000,000 new substances to the environmental, those are derivatives of oil. Besides, each year the amount has been increased so the knowledge of their impact on the human health and the ambient are in fact alarms.

For that reason new technologies are being development to treatment derivatives of oil. Nowadays the biological treatments are being the best solution because they offers advantages that physicochemical do not have, inside the biological treatment the biofiltration is the best solution, this biotechnology needs microorganisms because those are capable to degrade the derivatives of oil, so that is the importance to isolated bacterium for those pollutants. Actually it has been used the molecular biological techniques to rise up the objectives, but in our country those techniques not are pretty used; the main reasons are the unknowledge about it and the equipment.

In the present work was done the isolated of bacterium capable to degrade the derivatives of oil, the molecular techniques were: PCR for the amplication of the ITS region, cloning and sequencing. For the isolated was analyzed sludge of two industries, the analysis of the obtained sequences was done by nucleotide comparison with the NCBI database and were obtained two bacteriums that below at genus of *Microbacterium* o *Aureobacterium*, which allowed the control of hydrocarbons.

INTRODUCCIÓN

El fenómeno de la contaminación es indudablemente uno de los mayores problemas al que se enfrenta actualmente el hombre como producto del crecimiento demográfico. La disminución de la calidad del aire, y agua son debido a varios factores que involucran procesos agrícolas, de transporte, producción de energía y procesos petroquímicos; en su mayoría los procesos generan descargas o emisiones contaminantes que afectan al medio ambiente teniendo efectos locales, regionales o globales.

El control de los contaminantes es esencial para la protección de la salud humana y existen diversos tratamientos físicos, químicos y biológicos los cuales son capaces de remover todo tipo de contaminantes, en el caso de los tratamientos biológicos estos son una excelente herramienta debido a que ofrecen ventajas que los métodos fisicoquímicos no han llegado a desempeñar como: bajos costos de operación, de capital y generación de subproductos no tóxicos. Dentro de los tratamientos biológicos la Biofiltración es sin duda alguna la biotecnología de tratamiento biológico más usada por sus atractivas características de funcionalidad. Los Biofiltros son sistemas vivos que emplean poblaciones microbianas para la degradación de los compuestos, esto hace necesario el aislamiento y caracterización de microorganismos capaces de degradar compuestos derivados del petróleo. En la actualidad se emplean técnicas de biología molecular para lograr estos objetivos, aunque su uso no se encuentra ampliamente difundido en nuestro país por el grado de dificultad técnico y de equipamiento que dichas técnicas implican. Es por ello que la aplicación molecular no ha sido explotada por las empresas petroquímicas de Tamaulipas, aún y dada la importancia de llevar a cabo el aislamiento e identificación de bacterias con alta eficiencia degradadora que puedan ser utilizadas en la operación de biofiltros hechos a medida para la industria petrolera de nuestro país.

Con esta visión, en el presente trabajo se aislaron microorganismos de lodos activados colectados de la empresa Petróleos Mexicanos Refinación (PEMEX), y mediante secuenciación de la región ITS1-2 fueron identificados como pertenecientes al género *Microbacterium* o *Aureobacterium*, las cuales son capaces de degradar compuestos derivados del petróleo. Dicha metodología también fue utilizada para la caracterización de microorganismos en lodos activados de la empresa BASF.

CAPITULO I:

MARCO TEORICO

MARCO TEÓRICO

1.1.Tratamientos Biológicos

Estas tecnologías se basan en la degradación o transformación de los contaminantes en productos menos dañinos empleando poblaciones microbianas. En términos generales la purificación biológica es un proceso en el cual los efluentes contaminados son tratados al entrar en contacto con un medio biológicamente activo. [1]

Hoy en día son los más empleados para la remoción de las corrientes contaminadas por derivados del petróleo y principalmente como alternativa técnica-económica, no obstante las experiencias en aplicaciones industriales son limitadas y sin embargo, tienen un futuro prometedor.

Dentro de los tratamientos biológicos de efluentes existen tres procesos eficaces de tratamiento: Biofiltros, Biolavadores y Filtros Percoladores, los cuales se diferencian principalmente en la forma de cómo los microorganismos son retenidos en el medio, la naturaleza del soporte y la forma en que trabajan sus principales variables de control. [2]

1.2.Biofiltros

Los biofiltros son sin duda alguna la biotecnología de tratamiento biológico más exitosa debido a la creciente demanda de procesos amigables con el medio ambiente por ello han sido utilizados cada vez más en diferentes tipos de contaminantes por mencionar algunos de la amplia gama: CS₂, H₂S, Tolueno, isopropanol hexano, entre otros, pero existe una interrogante ¿Son tan eficientes en términos de remoción como los tratamientos fisicoquímicos?

Para responder a esta pregunta se han comparado las eficiencias de remoción de los tratamientos fisicoquímicos vs biológicos, de acuerdo a literatura referente al tratamiento de compuestos volátiles [38]se sabe que el proceso fisicoquímico de alta eficiencia son los oxidantes químicos con > 99 % y los biofiltros con > 98 % , por ello los biofiltros son ampliamente utilizados en el tratamiento de compuestos derivados del petróleo, no únicamente tomando en cuenta que las diferencias son mínimas en las eficiencias de remoción si no también considerando como parte preponderante la economía.[2, 3]

El diseño de los biofiltros es muy variable ya que pueden ser sistemas cerrados o abiertos, de una o múltiples camas de soporte para los microorganismos, no pasando por alto los principales parámetros de operación esto se considera más a fondo en las tablas 1 y 2 respectivamente.

Tabla 1. Ventajas y Desventajas de los distintos tipos de biofiltros según Morgan (2003)

Tipo de Sistema	Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
Cama simple, sistema abierto	Diseño simple, mantenimiento e inversión bajos.	Funcionamiento variable, difícil de monitorear, control de proceso limitado, requerimiento de espacio	Usado para el control de olores y COV
Cama simple, sistema cerrado	Diseño simple, mantenimiento e inversión bajos, se incrementa el control del proceso	Requerimientos de espacio	Tratamiento de COV
Cama múltiple	Se reduce el espacio requerido, se incrementa la flexibilidad de operación del proceso, eficaz para el tratamiento de gases mixtos	Se incrementa la complejidad del diseño y la operación y su costo	Limitado para el uso a escala industrial
Sistema cama simple en serie	Alta flexibilidad en su funcionamiento y muy efectivo para el tratamiento de mezclas de gases	Mayores costos de inversión y mantenimiento	Tratamiento de mezclas de COV a nivel piloto
Sistema cama múltiple	Alta flexibilidad de tratamiento, automatizado y fácil de monitorear	Sistema Patentado	Tratamiento de compuestos de azufre reducidos y Benceno, Tolueno, EtilBenceno
Cama múltiple sistema Multietapas	Gran flexibilidad en la operación	Aún no probado a nivel piloto o escala industrial	Tratamiento de COV a nivel laboratorio

Tabla 2. Parámetros de operación de los biofiltros

Parámetros	Intervalos	Referencia
Flujo Aire	50-300,000 m ³ /h	Doble, 2006.
Tiempo de Retención (Gas)	30-60 s 25-60 s	Boyle, 2000; Doble, 2006
Concentración COV	50-2000 ppm 0-1000 ppm	Sarina et al., 1995. Doble 2006.
Humedad	30-70% 40-60% 40-70%	Boyle, 2000. Morgan, 2003. Richard, 2004.
Adición de H ₂ O	1.5-3 ml	Morgan, 2003; Sarina et al., 2003.
Temperatura	25-37 °C < 40 °C 5-40 °C	Boyle, 2000. Revah, 2003. Richard, 2004.

1.3. Microorganismos

Para que el proceso de biofiltración sea exitoso se recomienda emplear consorcios microbianos o cultivos puros especializados en el consumo del o los contaminantes para reducir los periodos de aclimatación. Los microorganismos predominantes en los biofiltros son heterótrofos debido a que son capaces de alimentarse de sustancias orgánicas, como son los compuestos derivados del petróleo, entre los organismos heterótrofos se encuentran predominantemente las bacterias. Los cultivos puros han sido ampliamente estudiados a nivel laboratorio pero poco usados en aplicaciones a gran escala. Sin embargo son empleados principalmente en la eliminación de compuestos de difícil degradación, como los compuestos cianuro-orgánicos como el nitrilo. [3]

Debido a la importancia de los métodos de biología molecular que fueron utilizados en el desarrollo de esta tesis, a continuación se describe la teoría más relevante concerniente a la metodología de identificación molecular por secuenciación de una región específica del ADN de un organismo; para mayor comprensión del ADN ver Anexo 1.

1.4. Caracterización molecular

La Biología Molecular es una ciencia cuyo objetivo fundamental es la comprensión de todos aquellos procesos celulares, que contribuyen a que la información genética se transmita eficientemente de unos seres a otros, y se exprese en los nuevos individuos. Este conocimiento ha permitido cruzar barreras naturales entre especies y colocar genes de cualquier organismo, en un organismo hospedador no relacionado, mediante el empleo de técnicas de ingeniería genética. [4]

La información genética que posee cada individuo constituye el genotipo y este puede referirse a la totalidad de su información genética o de una parte de ella. Debido al extraordinario avance de la biología molecular, es posible estudiar y caracterizar a nivel de especie y cepa, a los microorganismos desde su unidad molecular más básica, el ADN. [5, 6, 7]

En los últimos años, se han desarrollado múltiples aplicaciones tecnológicas de la Biología Molecular. Existen diferentes métodos moleculares en la identificación de variantes polimórficas en la secuencia del ADN de un organismo, utilizando metodologías moleculares acopladas a la amplificación “in vitro” de segmentos de ADN, tecnología conocida como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) [9, 10]

1.5. Ventajas de la caracterización molecular

- Alta sensibilidad. Gran capacidad de multiplicación del segmento de ADN, en el orden de 10^{6-9}
- Gran especificidad. La utilización de iniciadores que reconocen una secuencia única elegida, propia de cada microorganismo.
- Rapidez. Comparada con algunas técnicas tradicionales, es otra ventaja para destacar.
- La característica de detectar “presencia de ácidos nucleicos” en vez de “viabilidad de microorganismos” permite su realización en una gran variedad de muestras.

Como apartado especial dentro de la Biología Molecular es necesario explicar una de las sustancias más importantes y de participación decisiva en distintos procesos como son las **enzimas de restricción**, también conocidas como endonucleasas, son enzimas que cortan los enlaces fosfodiéster del material genético a partir de una secuencia que reconocen; existen varias que podemos destacar; en la tabla 3, se mencionan las principales enzimas y sus funciones.

1.6.Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son producidas por bacterias como método de defensa contra virus y degradan al ADN extraño. Estas moléculas son indispensables para la ingeniería genética, ya que producen fragmentos que se pueden unir entre sí fácilmente (con la ayuda de un “pegamento molecular”: la enzima ligasa). [18]

Las enzimas de restricción cortan dejando extremos cohesivos o romos. Los extremos **cohesivos** son generados cuando la enzima corta las dos hebras asimétricamente, dejando complementarios entre sí a los extremos de cada hebra de simple cadena. Por otro lado, los extremos **romos** son generados cuando la enzima corta las dos hebras por el mismo lugar, generando dos extremos doble cadena. [18, 19]

En el Anexo 2 se da una breve explicación de las enzimas de restricción y de la tecnología del ADN recombinante, así como las técnicas empleadas en esta tecnología.

En la figura 1 se ilustran los tipos de cortes de enzimas de restricción.

Tabla 3. Enzimas utilizadas en la tecnología del ADN recombinante. [17]

Enzima(s)	Funciones
Endonucleasa de Restricción Tipo II	Rompe ADN por secuencias específicas
ADN ligasa	Une dos fragmentos o moléculas
ADN polimerasa I (E. Coli)	Rellena los huecos de ADN dúplex mediante adición escalonada de nucleótidos en el extremo 3'
Transcriptasa inversa	Hace una copia de ADN a partir de una molécula de ARN
Polinucleótido quinasa	Añade un grupo fosfato al grupo OH del extremo 5' de un polinucleótido para marcarlo o para permitirle la ligación
Transferasa terminal	Añade colas homopoliméricas al grupo OH del extremo 3' del dúplex lineal
Exonucleasa III	Eliminar residuos nucleotídicos del extremo 3' de una hebra de ADN
Exonucleasa del bacteriófago λ	Elimina nucleótidos del extremo 5' de un dúplex para exponer los extremos 3' monohebra
Fosfatasa alcalina	Elimina fosfatos terminales de extremos 5' o 3', o de ambos

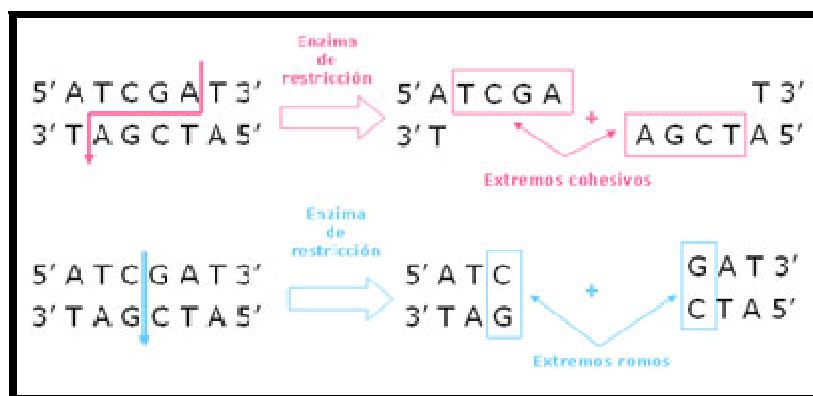


Figura 1. Cortes de las enzimas de restricción.

1.7. Electroforesis de ADN

Es un método que permite la separación de moléculas con base a su tamaño. Esta separación se realiza en un gel, que es una malla compleja de moléculas poliméricas. Los geles pueden ser de agarosa o poliacrilamida. La agarosa es conveniente para separar fragmentos de ácidos nucleicos en el rango desde unos pocos cientos, hasta aproximadamente 20,000 pares de bases. La poliacrilamida es preferible para la separación de fragmentos más pequeños de ácidos nucleicos.

El fundamento de esta separación está basado en que las moléculas de ácidos nucleicos están cargadas negativamente y al someterlas a un campo eléctrico migran hacia el polo positivo de este a través del gel, a velocidades que dependen de sus tamaños: una molécula pequeña puede seguir su camino a través del gel más fácilmente que una molécula grande. Las velocidades de migración de las moléculas de ácidos nucleicos, son inversamente proporcionales a los logaritmos de sus pesos moleculares [20]. La detección tras la migración se realiza fácilmente gracias al empleo de un colorante intercalante (se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos) que contiene el propio gel y este es visualizado al emitir luz visible cuando el gel se ilumina con luz ultravioleta. Un factor a tener en cuenta para valorar la migración de los ácidos nucleicos en un gel además de su tamaño es la configuración espacial que adopte la molécula.

1.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida por sus siglas en inglés como PCR, se dio a conocer en Abril de 1983, por Kary Mullis la cual consiste en la síntesis “in vitro” de secuencias específicas de ADN con la cual la insuficiente cantidad de ADN ya no es un problema en los procedimientos de Biología Molecular tampoco en los procedimientos de diagnóstico basados en el estudio de ADN.

La técnica se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariotas como en las procariontes por la ADN polimerasa. Esta enzima realiza la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5'→3' (Fig. 2) usando un molde de cadena sencilla,

pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región de doble cadena se usan los denominados iniciadores (cebadores o primers). Los cuales son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de ADN que se desea amplificar. [11, 12, 13]

Partiendo de este principio, la técnica de PCR se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1^a Desnaturalización

2^a Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras

3^a Extensión de la cadena

En la figura 2 se muestran las dos cadenas del ADN observándose las direcciones opuestas, los extremos asimétricos de las hebras de ADN se denominan extremo 5' («cinco prima») y extremo 3' («tres prima») respectivamente, además se muestran los nucleótidos dispuestos a lo largo de la cadena de la doble hélice, pueden presentarse en cualquier orden.

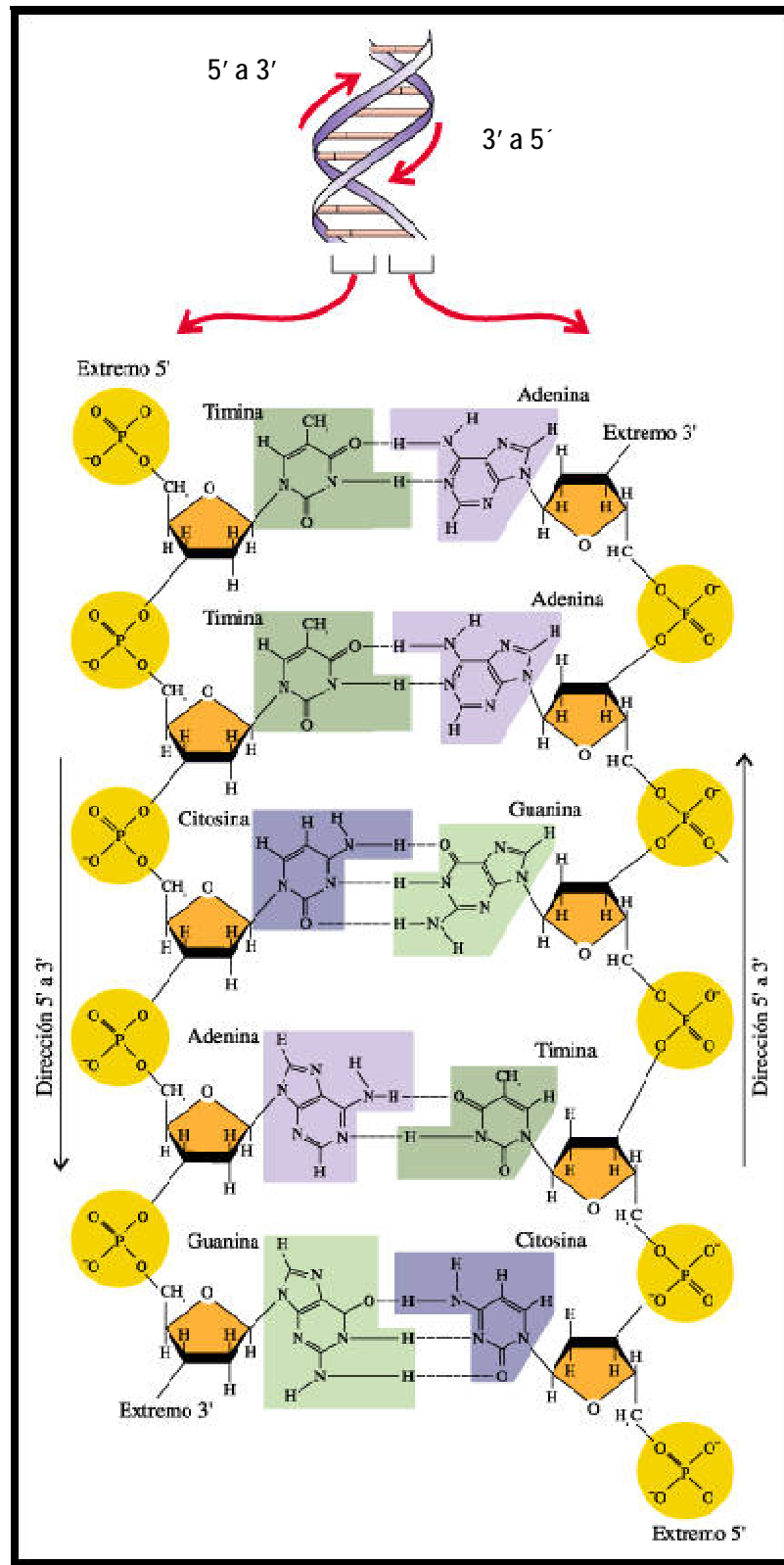


Figura 2. Estructura de doble cadena de una porción de una molécula de ADN

1.- Desnaturalización

En primer lugar, se desnaturaliza el ADN (se separan las dos hebras de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (93-97°C) de la muestra la forma más habitual.

2.- Hibridación

A continuación se producirá la hibridación del primer o iniciador, es decir, este se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde o ADN que se desea secuenciar. Para esto es necesario que la temperatura descienda; generalmente, a 55 °C, aunque se puede variar según sea el caso entre 45°C y 65°C. Estos primers actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada. [14, 15]

3.- Extensión de la cadena

En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5'→3' mediante la enzima ADN polimerasa. Esta última incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio (dNTPs) siguiendo la cadena molde. Todos estos pasos se pueden apreciar gráficamente en la Figura 3.

Una vez completados todos los ciclos, se finaliza con dos pasos, uno de extensión de la cadena a la temperatura óptima de la ADN polimerasa (la cual está encargada de construir nuevas cadenas de ADN), normalmente a 72°C, para finalizar enfriando la muestra a 4°C para su conservación. Este ciclo (desnaturalización-hibridación-extensión) se repetirá dependiendo de la cantidad de fragmentos amplificados que se desee. Generalmente son 30 ciclos, ya que un número mucho mayor de ciclos no implica un mayor rendimiento. [11, 14]

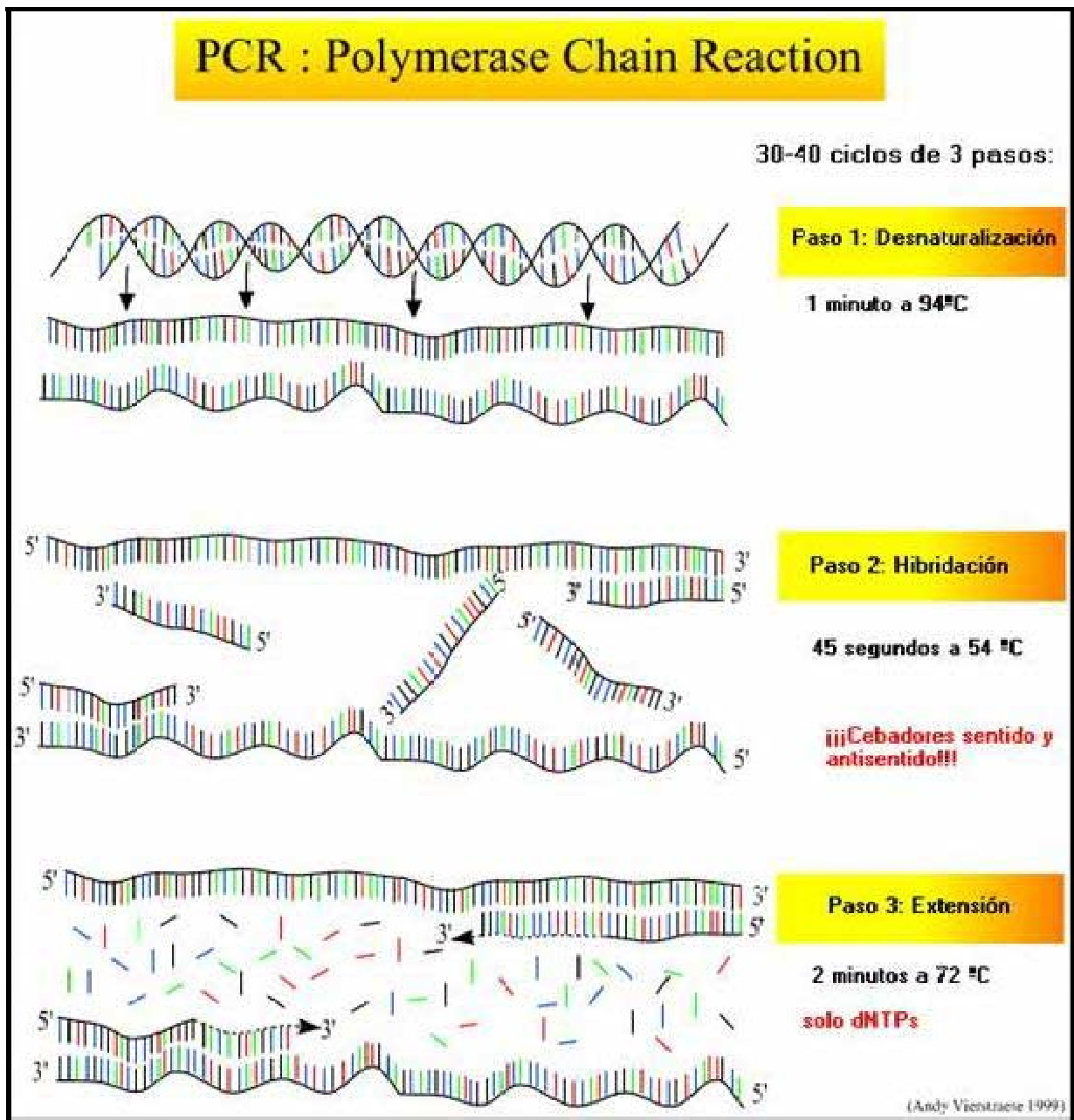


Figura 3. Pasos Básicos de la PCR según Andy Vierstraete (1999)

El proceso de PCR se lleva a cabo en un equipo llamado termociclador en la figura 4 se muestran sus principales componentes, este aparato realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta.



Figura 4. Termociclador Gene Amp. PCR System 9700 Perkin Elmer

Mediante la PCR, y utilizando los primers específicos a la zona del ADN de interés, se puede obtener una gran concentración del fragmento, que puede ser visualizada en un gel de agarosa o acrilamida. El fragmento puede ser posteriormente secuenciado, y su identidad es conocida por comparación con las bases de datos mundiales.

Componentes principales Termociclador.

1. Pantalla
2. Rejilla de muestras (capacidad 24 muestras)
3. Botón de encendido y apagado
4. Funciones: Selección o creación de programa

1.9.Secuenciación

El descubrimiento de las enzimas de restricción, la electroforesis en gel, y las técnicas de clonación de genes han sido grandes descubrimientos que han impulsado el avance de la biología molecular culminándolo con el diseño del protocolo para determinar la secuencia de nucleótidos exacta de una molécula de ADN específica.

El mapa más fino de la estructura de un gen o un cromosoma es la secuencia del par de nucleótidos, por lo tanto la forma más exacta para comparar dos cepas es comparando las secuencias de sus genomas. Sólo con la secuencia del ADN se puede llegar a la conclusión de que dos cepas son genéticamente idénticas, con todos los otros métodos se tiene solo un alto porcentaje de probable identidad. Obviamente, la secuencia del ADN técnicamente no es fácil de obtener y aun cuando fuera posible, el análisis y la interpretación de los resultados plantea un gran desafío. [8, 16]

CAPITULO II:

JUSTIFICACIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVOS GENERALES

Y ESPECÍFICOS

2.1. JUSTIFICACIÓN

Actualmente las empresas petroquímicas emplean procesos fisicoquímicos los cuales presentan altos consumos de energía y generación de contaminantes primarios y secundarios. En consecuencia los tratamientos biológicos han cobrado cada vez mayor interés, como una alternativa económica y técnicamente viable al mismo tiempo no genera subproductos tóxicos. En este sentido surge la necesidad de aislar microorganismos capaces de degradar derivados del petróleo, debido a que la contaminación causada por estos contaminantes ocasiona un deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente y genera una amenaza real a la salud pública, así como la extinción de gran cantidad de especies vegetales y animales. Además existe gran dificultad para resolver o contribuir a disminuir los problemas de contaminación por hidrocarburos.

2.2. HIPÓTESIS

Existen bacterias degradadoras de compuestos derivados del petróleo en lodos activados de PEMEX refinación, que sirven para el tratamiento de los mismos.

2.3. OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar bacterias con capacidad de degradación de derivados del petróleo.

2.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar microorganismos a partir de muestras de lodos activados de industrias de PEMEX Refinación y BASF.
- Caracterizar morfológicamente los aislamientos obtenidos
- Caracterizar molecularmente los aislamientos por secuenciación de su región ITS del ADN ribosomal.

CAPITULO III:

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y METÓDOS

La parte experimental se dividió en dos etapas:

1^a Aislamiento de cepas degradadoras de hidrocarburos empleando inóculos de PEMEX Refinación y BASF.

2^a Identificación de Microorganismos presentes partiendo de inóculos de las empresas BASF y PEMEX Refinación.

3.1. Aislamiento de microorganismos

A partir de los lodos activados (BASF) se inoculo al 5% en medio de cultivo *Thiobacillus*, se empleó este medio debido a sus características nutricionales entre las principales son: sales inorgánicas, azufre y fosforo entre otras; estos factores son necesarios para el crecimiento de bacterias capaces de degradar hidrocarburos. El medio se elaboró en un matraz de 1L, conteniendo 500 ml de medio *Thiobacillus* [22], los medios inoculados son aireados constantemente, las condiciones y reactivos se muestran en la tabla 4, ver anexo 3 para mayor comprensión de los aspectos microbiológicos del trabajo.

Los aislamientos se realizaron en las instalaciones de la Universidad del Noreste (UNE) con asesoramiento de la Q.B.P. María Amparo Rostro Segura, como primer etapa y posteriormente, un segundo aislamiento y caracterización molecular se desarrollo durante una estancia en el Centro de Biotecnología Genómica- IPN (Reynosa, Tamaulipas), en el Laboratorio de Biotecnología Industrial bajo la tutela de la Dra. Patria Larralde Corona.

Tabla 1. Preparación medio *Thiobacillus*

Soluciones	Componentes	Proporciones
	K ₂ HPO ₄	2.0 gr
	CaCl ₂	0.1 gr
	MgSO ₄	0.1 gr
Solución 1	FeSO ₄	0.05 gr
	MnSO ₄	0.05 gr
	H ₂ O destilada.	900.0 ml
	*Ajustar pH 7.8	
Solución 2	Na ₂ S ₂ O ₃	10.0gr
	H ₂ O destilada.	50.0 ml
Solución 3	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 gr
	H ₂ O destilada.	50.0 ml

3.2. Medio de aislamiento

El medio *Thiobacillus* fue inoculado con lodos activados de PEMEX Refinación (aireados y conservados), las condiciones y componentes del medio se enlistan en la tabla 4, anteriormente mencionada. Se prepararon 2 medios y se inocularon al 5%.

3.3. Siembra de microorganismos

La siembra de microorganismos fue en tres diferentes medios sólidos, YEPD (extracto de levadura; peptona; dextrosa y Agar), medio V8, y medio Agar-Agar. (Tres por cada lodo):

- Muestra 3 (lodos activados de PEMEX)
- Muestra 6 (lodos activados de BASF)

Las colonias obtenidas fueron resembradas en medio PDA (Agar papa dextrosa) y en medio YEPD. (Características de los medios empleados ver Anexo 3)

Las diferentes colonias que presentaron crecimiento en las muestras M3 y M6 se etiquetaron e incubaron a 29 °C, durante 2 a 3 días. Después de verificar su crecimiento satisfactorio, (es decir el crecimiento necesario para la realización de las técnicas moleculares) se realizó la purificación en matraces y tubos de ensayo tomando en cuenta su morfología, la purificación fue en medios líquidos YEPD, para realizar la extracción de ADN posteriormente. De la muestra M3 se obtuvieron 9 colonias diferentes, mientras que de la muestra M6 se aislaron 10 colonias diferentes.

3.4. Purificación de microorganismos (siembra de los cultivos puros)

Se utilizó un volumen de 15 ml de TGY (Triptona, glucosa y extracto de levadura), colocándolo en tubos falcón de 50 ml, se incubaron en un agitador orbital (equipo empleado en biología molecular, para la incubación de los microorganismos) a 32°C a 225 rpm, para posteriormente realizar la extracción de ADN genómico, así como para obtener la Morfología de cada colonia aislada.

3.5. Formación de Bancos de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico se empleó la técnica de precipitación por sales de proteínas. A continuación se describe la técnica empleada para extracción de ADN genómico.

3.6. Protocolo de obtención del paquete celular

1. Tomar 1 ml. de c/u de las muestras por duplicado
2. Centrifugar ,5 min. 1200rpm y tirar sobrenadante
3. Lavar con Agua MiliQ 1 ml.
4. Vortex
5. Centrifugar, 5 min. 1200 rpm.
6. Tirar sobrenadante
7. Conservar la pastilla (paquete celular) a -70°C para su uso posterior.

3.7. Protocolo de extracción de ADN genómico

1. El paquete celular obtenido se muele rápidamente en mortero o en el tubo eppendorf enfriado con nitrógeno líquido.
2. Se colocan aproximadamente 40 mg de la pastilla molida en tubos eppendorf estériles, agregándoles inmediatamente 500 µl de buffer de extracción (Temperatura Ambiente) (200 mM Tris HCl pH 8.5, 250 mM NaCl 25 mM EDTA, 0.5% SDS), y se homogeniza la muestra.
3. Se le añaden 500 µl de fenol-cloroformo (50/50)(4°C) y se mezclan en vortex a máxima velocidad durante 5 min posteriormente se centrifuga a 13000 rpm durante 30 min.
4. La fase acuosa se transfiere a otro tubo eppendorf, se adicionan 400 µl de cloroformo frio (-20°C), se mezclan durante 1 min en vortex y se centrifuga durante 5 min.
5. Se le adiciona 8 µl de RNAasa (10 mg/L) se incuba durante 30 min a 37 °C en block caliente.
6. Se le adicionan 500 µl de isopropanol frio (4°C) y se mezcla por inversión ligera y se incuba a 20°C durante 15 min. Finalmente se centrifuga durante 5 min.
7. El sobrenadante se desecha, se añaden 500 µl de etanol al 70% (20°C) se mezcla por inversión ligera, y se centrifuga durante 5 min.
8. El sobrenadante se desecha y la pastilla se seca en papel secante durante 30 min.
9. La pastilla se resuspende en 50 µ de Agua miliQ (ambiente) y se mantiene a 4°C.

El ADN se visualiza en un gel de agarosa por 1 h. El ADN obtenido se resuspende en 100 µl de TE 1X Solución buffer para proteger el ADN), y fue conservado a 4°C, para su empleo en las amplificaciones por PCR.

3.8. Electroforesis en gel de agarosa

El gel de agarosa se prepara al 1% en solución TBE 1X teñida con SyberGold™ 10X para la visualización de los ácidos nucleicos. El volumen de las muestras varía dependiendo de las necesidades de los protocolos, y éstas se colocan en los pozos del gel homogenizándolas previamente con 1 µl de buffer de carga que contiene los marcadores azul de bromo fenol y xilen-cianol (0.25% de azul de bromo fenol, 0.25% de xilen-cianol y 30% de glicerol); las muestras se corren en una cámara de electroforesis horizontal, (BIO-RAD). Se utiliza un transiluminador de luz ultravioleta, para la visualización del ADN y captando la imagen del gel en el programa Kodak digital Science™ 1D. (Figuras 5 y 6)

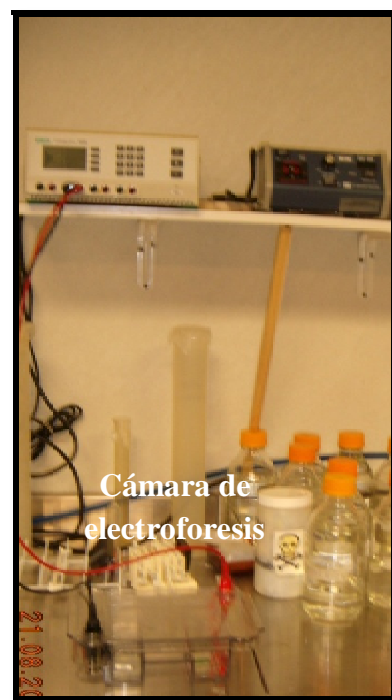


Figura 1. Bio-Rad Power Pac 300



Figura 2. Fotodocumentador 1D Kodax Digital Science 3.0.2

Componentes Fotodocumentador

1. Software
2. Transluminador de luz ultravioleta
3. Cámara Digital

3.9. PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa)

Las condiciones de reacción y temperatura de los segmentos de ITS1-ITS4 amplificados (gen 5.8S, hongos y levaduras) se muestran en la Tabla 5 y 6, respectivamente. En las tablas 7 y 8 se muestran las condiciones de reacción y temperaturas para segmentos 16S. (Bacterias)

Tabla 2. Condiciones de Reacción en la amplificación de segmentos ITS (gen 5.8S)

Componentes	1x	1x
ADNg	50ng	1.0 µl
Buffer	10x	2.5 µl
MgCl₂	50mM	0.75 µl
dNTPs	10mM	0.5 µl
Primer F	5µM	1.0 µl
Primer R	5mM	1.0 µl
Taq	5 u/5µl	0.5 µl
H₂O miliQ	---µl	17.75 µl
Vol. Final	25 µl	25 µl

Tabla 3. Temperaturas de reacción en la amplificación de segmentos ITS

Ciclo	Nº de Ciclos	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización	1	94	5:00
Alineamiento	35	94	0:30
		57	0:30
		72	1:00
Extensión	1	72	7:00

Tabla 4. Condiciones de reacción en la amplificación del gen 16S

Componentes	1x	1x
DNAg	50ng	2.0 µl
Buffer	10x	2.5 µl
MgCl₂	50mM	1.25 µl
dNTPs	10mM	0.5 µl
Primer F	5µM	0.25 µl
Primer R	5mM	0.25 µl
Taq	5 u/5µl	0.2 µl
H₂OmiQ	---µl	18.05 µl
Vol. Final	25 µl	25 µl

Tabla 5. Temperaturas de reacción en la amplificación del gen 16S

Ciclo	N° de Ciclos	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización	1	94	4:00
Alineamiento	30	94	0:30
		50	0:40
		68	0:30
Extensión	1	68	7:00

Los segmentos amplificados en el termociclador Gene Amp. PCR system 9700 Perkin Elmer, se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, con buffer TBE 1X (0.1 M Tris, 0.09M ácido bórico, 1mM EDTA) a 90 volts por 1 h. con marcador de 100pb.

3.10. Clonación

La enzima Taq polimerasa utilizada en la mezcla de PCR para la obtención del segmento ITS1-5.8S-ITS4, así como para la obtención del gen 16S, tiene actividad transferasa terminal independientemente del templado, lo cual permite la adición de desoxiadenosina monofosfato (poliA) en los extremos 3' de los productos de PCR, necesarios para la ligación de insertos en vectores plasmídicos. Para este fin se utilizó el estuche comercial pGEM®-T Easy Vector Systems de PROMEGA, (El cual consta de una solución buffer, ADN ligasa un vector) [21], siguiéndose las indicaciones de la casa comercial.

3.11. Extracción de ADN a partir de células por PCR directo

De las muestras que presentaron crecimiento se emplea el siguiente protocolo:

1. Seleccionar las colonias blancas, picar y resuspender individualmente en 20µl de H₂O miliQ esteril.
2. Pasar 5µl de esta suspensión en un tubo de PCR
3. A los 15µl restantes agregar 50µl de medio LB e incubar a 37°C
4. Los 5 µl se lisan las células en el termociclador mediante un ciclo con las siguientes temperaturas: 96°C/5 minutos, 50°C/1.5 minutos, 96°C/1.5 minutos, 45°C/1.5 minutos, 96°C/1 minuto y 40°C/1minuto.
5. Posteriormente, agregar a cada tubo 20 µl del mix preparado de acuerdo a la Tabla 9.
6. Amplificar las colonias en un programa de 30 ciclos con los siguientes pasos: 94°C/1 minuto, 60°C/1minuto y 72°C/1minuto.
7. Sacar los tubos del termociclador y visualizar los resultados en un gel de agarosa al 1.5% a 100 volts, 1 hora.

Tabla 6. Componentes Mix para Tamizar

Componentes	1x
Buffer 10X	2.50 μ l
MgCl ₂ 50mM	0.75 μ l
ITS1	1.00 μ l
ITS4	1.00 μ l
dNTPs	0.20 μ l
Taq 5U/ μ l	0.20 μ l
DNA lisado	5.00 μ l
Vol. final	25 μ l

Las clonas seleccionadas se siembran en medio LB (Broth Miller) con los antibióticos de selección Ampicilina (50 μ g/ml) con el objetivo de evitar crecimiento de contaminantes en el cultivo; dejándose incubar toda la noche a 37°C.

3.12.Purificación de ADN plasmídico

Las extracciones de ADN plasmídico se realizan utilizando el protocolo de Mini preparación [23], el cual consiste en colocar en un tubo eppendorf 1 ml de cultivo de células bacterianas. Posteriormente se centrifuga a 12,000 rpm, por espacio de 10 segundos para después descartar el sobrenadante, en seguida adicionar 100 μ l de solución I (50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl pH 8, 10 mM de EDTA pH 8), mezclar vigorosamente hasta resuspender la pastilla, y adicionar 200 μ l de solución II (0.2 N de NaOH preparar en fresco y 1 % de SDS), mezclando suavemente por inversión, en seguida se incuba el tubo en hielo por 10 minutos, hasta observar un lisado claro, después adicionar 150 μ l de solución III (KC₂H₃O₂) 5 M), mezclar suavemente, hasta observar un precipitado blanco. Centrifugar a 12,000 rpm por 5 minutos, y recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo, posteriormente agregar 1 μ l de RNAsa e incubar por 20 minutos a 37°C. Posteriormente adicionar 1 V de solución de cloroformo/octanol (24:1, aproximadamente 500 μ l) y finalmente mezclar en el vortex por 30 segundos y centrifugar a 12,000 rpm /5 minutos, se toma la fase acuosa y coloca en un tubo eppendorf nuevo (aproximadamente 500 μ l),

agregar 2 V de etanol al 100% (1 ml) e incubar 1 hora a -20°C , centrifugar a 12,000 rpm/ 10 minutos, eliminar el sobrenadante y lavar la pastilla con 500 μl de etanol al 70 %, secar y resuspender la pastilla en 12 μl de Agua miliQ estéril (500rpm/ 37°C). Finalmente correr electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 100 volts por 1 hora.

3.13.Secuenciación

Se realizó la secuenciación de las clonas transformadas y de las cuales se obtuvo el ADN plasmídico. Esta se determinó por secuenciación cíclica utilizando el estuche comercial [24], empleando un gel de acrilamida al 6.5% y el secuenciador semiautomático marca LICOR. (Fig.7)

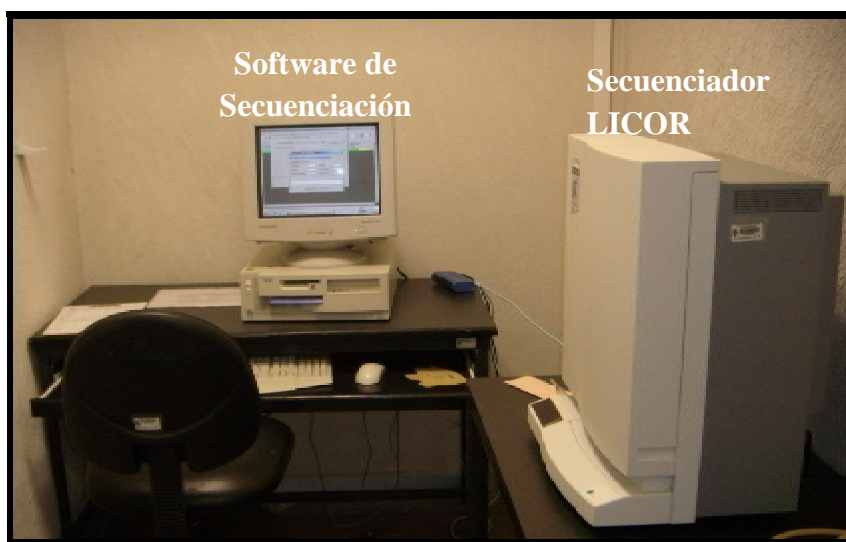


Figura 3. Secuenciador semiautomático marca LICOR (CBG-IPN, Reynosa Tam.)

3.14. Análisis bioinformático

Con el fin identificar las especies aisladas se realizó el alineamiento de la secuencia consenso con las secuencias disponibles en bases de datos del International Nucleotide Sequence Databases (INSD) que contiene los datos del DNA Data Bank of Japan (DDBJ), del EMBL Nucleotide Sequence Database (EMBL), y del GenBank®; se empleó el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [25], realizando la consulta a través de sitios web del National Center for Biotechnology Information Así como la base de datos del programa FASTA3, realizando la consulta a través de la web [26]

3.15. Identificación microscópica

Las cepas fueron cultivadas en medio líquido YEPD (Extracto de levadura; peptona; glucosa; agar), hongos y levaduras, y TGY (Extracto de levadura ; Triptona; glucosa), para bacterias (etapa 2). Se tomaron imágenes de las células con campo claro con el objetivo ocular 100X utilizando aceite de inmersión, en un microscopio Olympus BX-51 (Japón), y las imágenes fueron adquiridas con una cámara de video Hitachi KPD-50 adaptada al triocular del microscopio (Fig. 8)



Principales componentes

Microscopio Olympus BX-51

1. Oculares
2. Objetivos (4x, 10x, 40x y 100x aceite)
3. Cámara Hitachi KPD-50

Figura 4. Microscopio utilizado en la caracterización morfológica (Olympus BX-51)

CAPITULO IV:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Formación de bancos de ADN genómico

Etapa 1

En la Figura 9, se muestra el ADN genómico obtenido por medio del protocolo del Kit comercial RNazol de Promega, además se puede observar el corrimiento electrofórico del ADN, el cual nos expresa la extracción positiva del mismo. En la tabla 10 se enlistan las muestras de las cuales se extrajo ADNg.

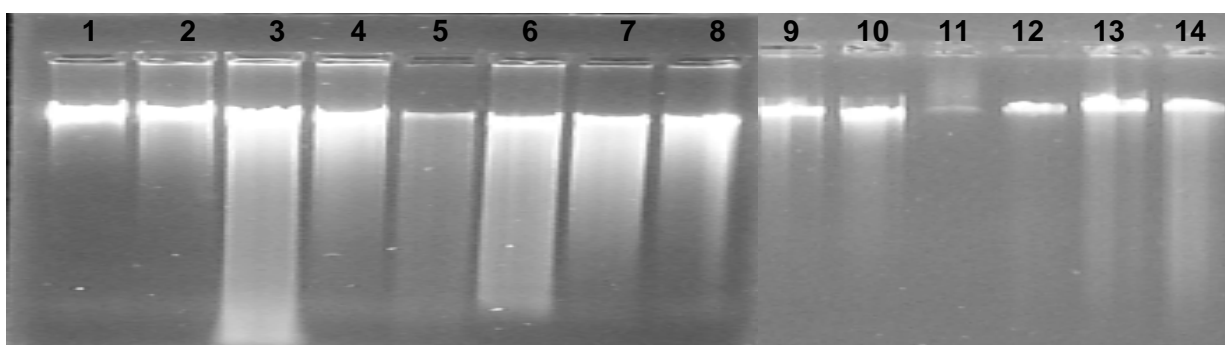


Figura 9. Aislamiento de ADN genómico. Se muestra el corrimiento electrofórico del DNA en un gel de agarosa al 1% teñido con SyberGold™

Tabla10. Extracciones de DNA cepas Aisladas de Lodos Activados

Núm. carril*	Muestra	Núm. carril*	Muestra	Núm. carril*	Muestra
1	M3-AGAR-AGAR-1	7	M3-AGAR-AGAR-2	13	M6-AGAR-AGAR-2
2	M3-PDA-1	8	M3-PDA-2	14	M6-V8-4
3	M6-V8-1	9	M3-PDA-3		
4	M3-AGAR-AGAR-3	10	M3-V8-3		
5	M6-PDA-3	11	M3-V8-1		
6	M3-V8-2	12	M6-PDA-2		

*Núm. Numero de carril en la figura 9. La clave está formada por el tipo de muestra, el medio y colonia diferente. M3: Muestras de PEMEX, M6: Muestras BASF.

4.2. Amplificación de los segmentos ITS1-ITS4 (gen 5.8S, hongos y levaduras).

En la figura 10, se muestran los segmentos ITS's amplificados y en la tabla 11 se enlistan las muestras correspondientes a cada carril. Así mismo en la figura 10, la flecha indica el corrimiento electrofórico del marcador señalando la banda de 500 pb.

Tabla 11. Amplificación de los segmentos ITS's-5.8S de las cepas aisladas de lodos activados.

Núm. de Carril	Muestra	Núm. de Carril	Muestra
M	MARCADOR	11	M6-PDA-3
1	M3-PDA-3	12	M3-V8-2
2	M3-V8-3	13	M3-AGAR-AGAR-2
3	M3-V8-1		
4	M6-PDA-2	14	M3-PDA-2
5	M6-AGAR-AGAR-2	15	M6-PDA-4
6	M6-V8-4	16	M6-V8-2
7	M3-AGAR-AGAR-1	17	M6-AGAR-AGAR-1
8	M3-PDA-1	18	M6-V8-3
9	M6-V8-1	M	MARCADOR
10	M3-AGAR-AGAR-3		

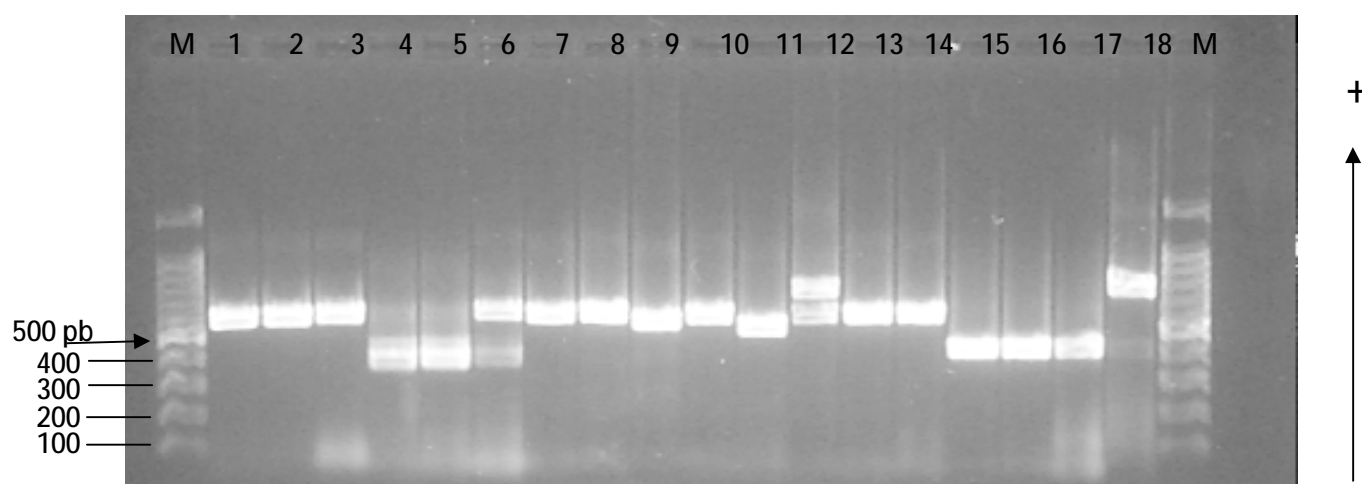


Figura 10. Se muestran los resultados de la amplificación de los segmentos de ITS's-5.8S donde M es marcador de 100 pares de bases.

4.3. Clonación

En la tabla 12 se exponen las muestras de las cuales se realizó la ligación, tomando como base para su selección, la amplificación del segmento de interés ITS es decir de acuerdo al número de pares de bases, así mismo su morfología con el fin de descartar cepas equivalentes.

Tabla 12. Muestras Ligadas

Núm. Muestra en PCR	Código Muestra
1	M3-PDA-3
2	M3-V8-3
3	M3-V8-1
5	M6-AGAR-AGAR-2
6	M6-V8-4
8	M3-V8-2
9	M6-V8-1
10	M3-AGAR-AGAR-3
13	M3-AGAR-AGAR-2

En la figura 11, se muestran las amplificaciones de las muestras 2, 3, 5, 6, 8, con el segmento de interés (gen 5.8S) las clonas positivas se enumeran en la tabla 13, seleccionando 3 como máximo por cada clona.

PCR de tamizaje

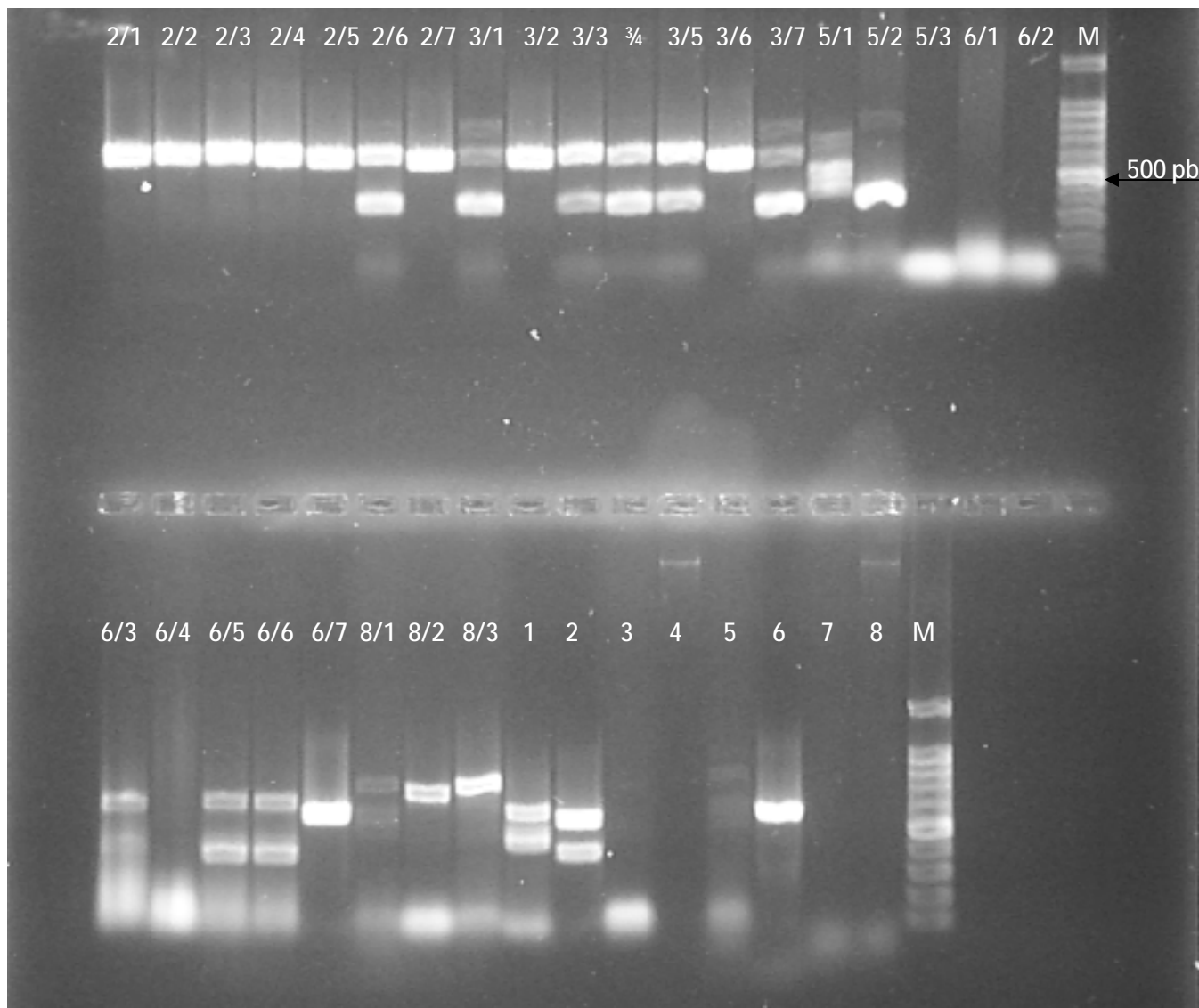


Figura 11. PCR de Tamizaje, muestras 2, 3, 5, 6 y 8. Las amplificaciones muestran las clonas positivas con el segmento ITS-5.8, donde M es el marcador de 100 pares de bases.

Las clonas que presentaron doble banda (2/6, 3/1 etc.) no se seleccionaron como positivas debido a una posible contaminación o mal corrimiento en las mismas, para corroborar se analizó su morfología para descartar contaminación del cultivo y así como su PCR, además cabe señalar que en algunas clonas se observa en el corrimiento un exceso, esto es debido a la carga del colorante.

Tabla 13. Clonas positivas muestras 2, 3, 5, 6 y 8, con el segmento ITS-5.8S.

Muestra	Clonas positivas
	2/1
M3-V8-3	2/2
	2/3
M3-V8-1	3/2
	3/4
M6-AGAR-AGAR-1	5/1
	5/2
M6-V8-4	6/7
M3-V8-2	8/2
	8/3

En la figura 12 se muestra la PCR de tamizaje de las muestras 1, 9, 10, 13, con el segmento de interés, las clonas positivas se enlistan en la tabla 14.

Tabla 14. Clonas positivas muestras 9, 10 y 13, con el segmento ITS-5.8S.

Muestra	Clonas positivas
	9/1
M6-V8-1	9/2
	9/3
	10/1
M3-AGAR-AGAR-3	10/5
	10/6
	13/1
M3-AGAR-AGAR-2	13/2
	13/7

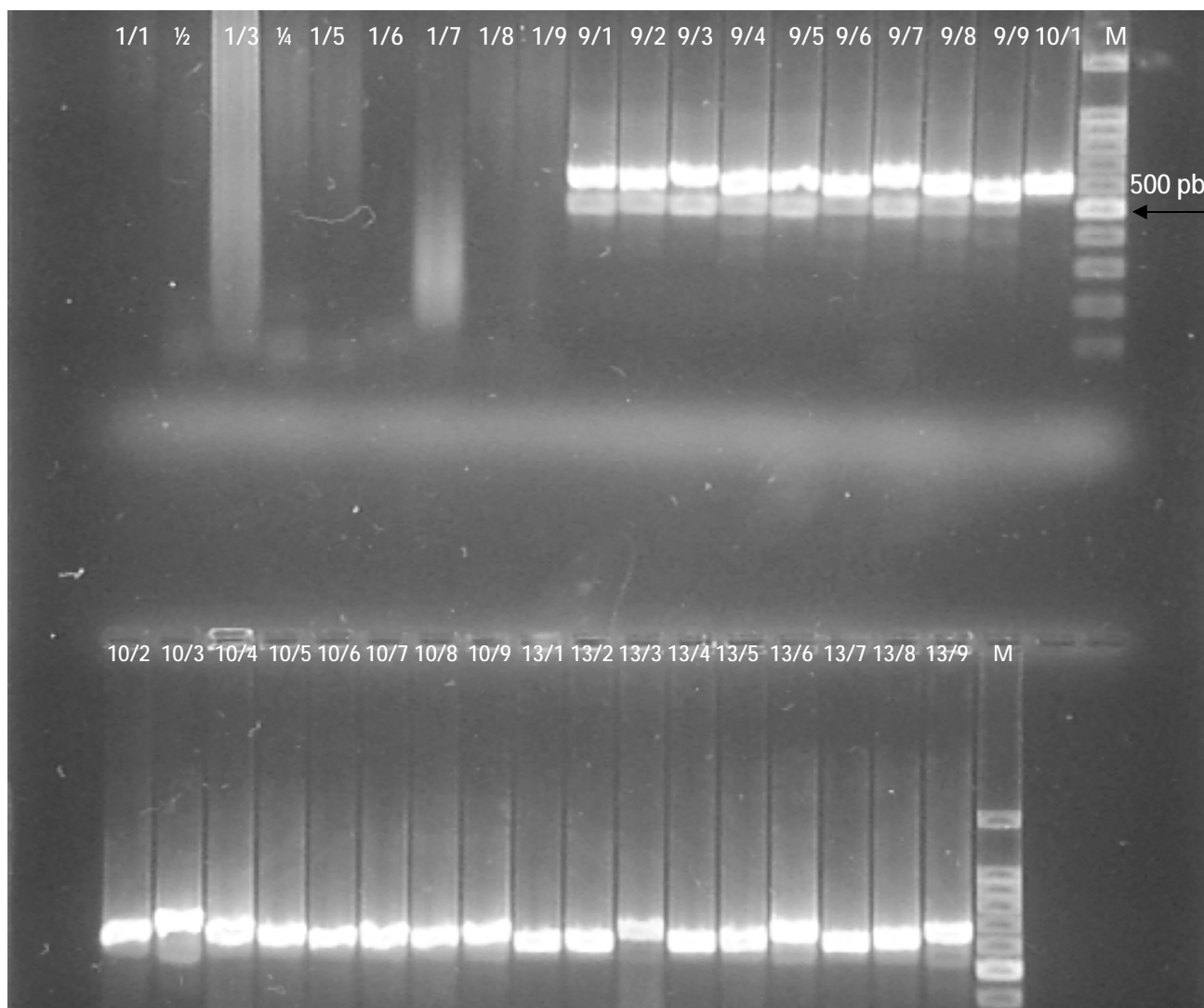


Figura 12. PCR de Tamizaje, muestras 1, 9,10 y 13. Las amplificaciones muestran las clonas positivas con el segmento ITS-5.8, donde M es el marcador de 100 pares de bases. Las clonas de la muestra 1, no amplificaron.

La muestra 1.- M3-PDA-3 no se enlista en la selección de clonas positivas debido a que no presento amplificación por error de carga del gel, posteriormente se realizó de nuevo su PCR de tamizado. Así mismo se analizó que la muestra 9 presento una doble banda en su corrimiento y para descartar una posible contaminación se examino su PCR y morfología

En la figura 13 se muestra la PCR de tamizaje de la muestra 1, y en la tabla 15 se enlistan las clonas positivas de la muestra mencionada con anterioridad.

Tabla 15. Clonas positivas muestra 1, con el segmento ITS-5.8S.

Muestra	Clonas positivas
	1/8
M3-PDA-3	1/10
	1/18

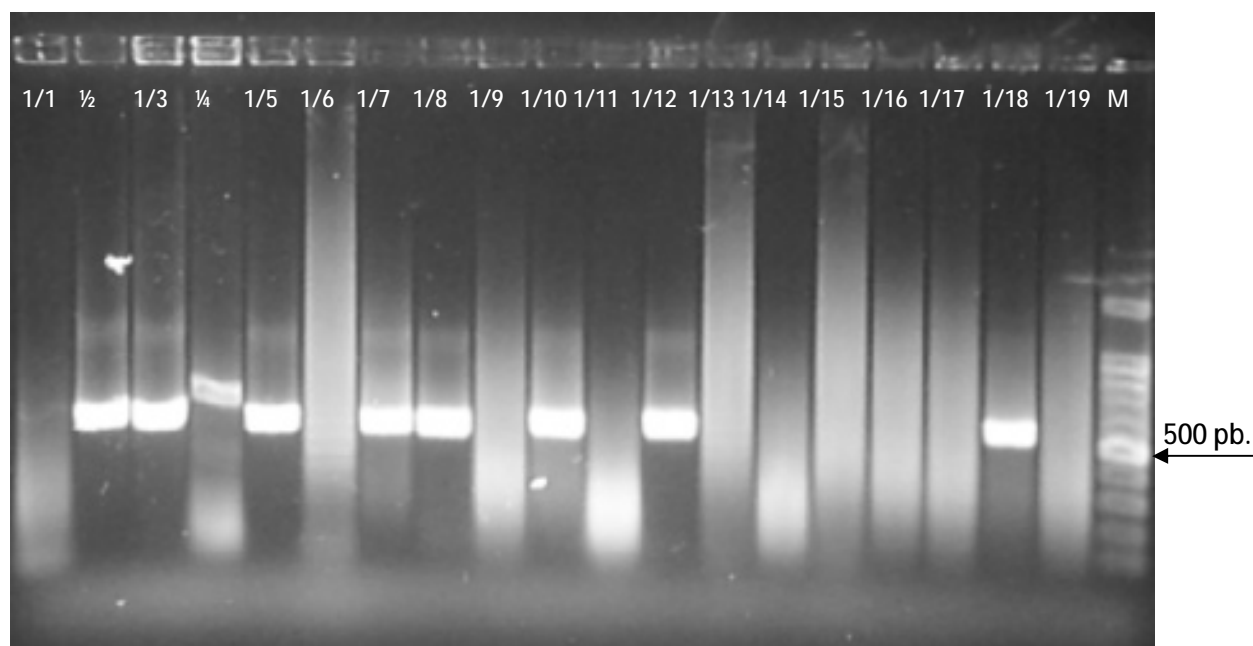


Figura 13. PCR de Tamizaje muestra 1. Las amplificaciones muestran las clonas positivas con el segmento ITS-5.8, donde M es el marcador de 100 pares de bases.

4.4. Purificación ADN plasmídico

En las figuras 14, 15 y 16, se muestra la amplificación del ADN plasmídico el cual contiene información útil, para purificar una secuencia específica. En las tablas 16, 17 y 18 se enumeran las clonas positivas de las cuales se extrajo y obtuvo ADN plasmídico.

Tabla 16. Extracción de ADN plasmídico muestras 2, 3, 5, 6, 8.

Muestra	Clonas positivas	Clonas de las cuales se obtuvo ADN plasmídico
	2/1	ü
M3-V8-3	2/2	ü
	2/3	ü
M3-V8-1	3/2	ü
	3/4	ü
M6-AGAR-AGAR-1	5/1	ü
	5/2	ü
M6-V8-4	6/7	ü
M3-V8-2	8/2	X
	8/3	X

ü .- Clonas que presentaron DNAp., X.- Clonas que no presentaron DNAp.

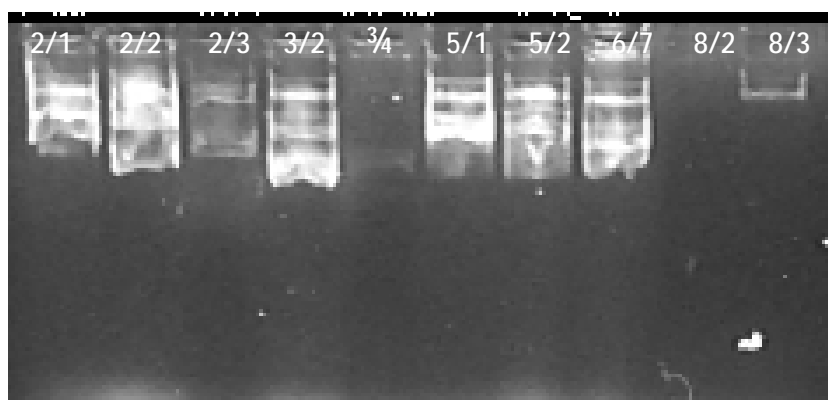


Figura 14. Obtención de ADN plasmídico de las muestras 2, 3, 5, 6 y 8. Las clonas 8/2 y 8/3 no presentaron ADNp.

Tabla 17. Extracción DNA plasmídico, muestras 9,10 y 13

Muestra	Clonas positivas	Clonas de las cuales se obtuvo DNA plasmídico
	9/1	ü
M6-V8-1	9/2	ü
	9/3	ü
	10/1	ü
M3-AGAR-AGAR-3	10/5	ü
	10/6	ü
	13/1	ü
M3-AGAR-AGAR-2	13/2	ü
	13/7	ü

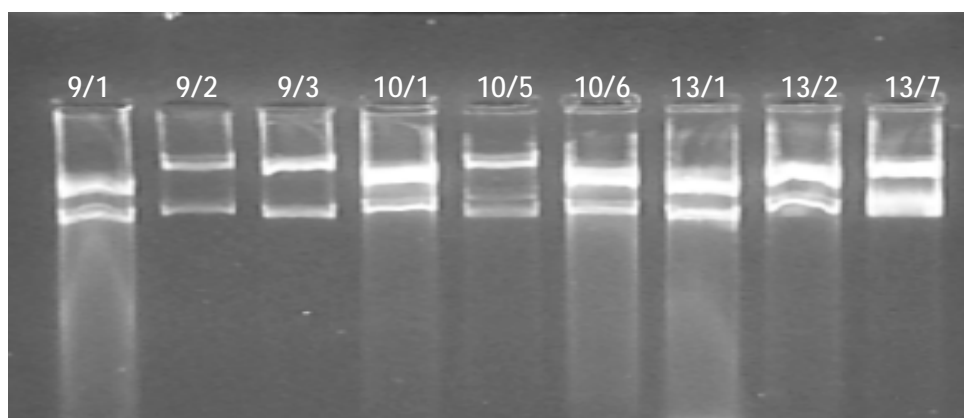


Figura 15. Obtención de ADN plasmídico de las muestras 9, 10 y 13. Todas las muestras presentaron ADNp.

Tabla 18. Extracción DNA plasmídico, muestra 1

Muestra	Clonas Positivas	Clonas de las cuales se obtuvo DNA plasmídico
	1/8	ü
M3-PDA-3	1/10	ü
	1/18	ü



Figura 16. Obtención de ADN plasmídico. Muestra 1. Todas las clonas presentaron ADNp.

Las figuras 6, 7 y 8 muestran la purificación del ADN plasmídico, analizado en una electroforesis de agarosa; en donde se puede detallar la configuración correspondiente al plásmido con predominio de la forma superenrollada y ausencia de ARN, así mismo en la muestra uno se observa una amplificación escasa debido, a la cantidad de muestra cargada.

4.5. Secuenciación

La figura 17 muestra la imagen de algunas secuencias obtenidas del secuenciador semiautomático LICOR; la secuencia es leída de abajo hacia arriba iniciando por la base A, continuando con la C, G, y T. Se obtuvo la secuencia de las siguientes muestras: M3-PDA-3, M3-V8-3, M3-V8-1, M3-AGAR-AGAR-3, M6-V8-1, M6-V8-4 y se identificaron en la base de datos EBI.

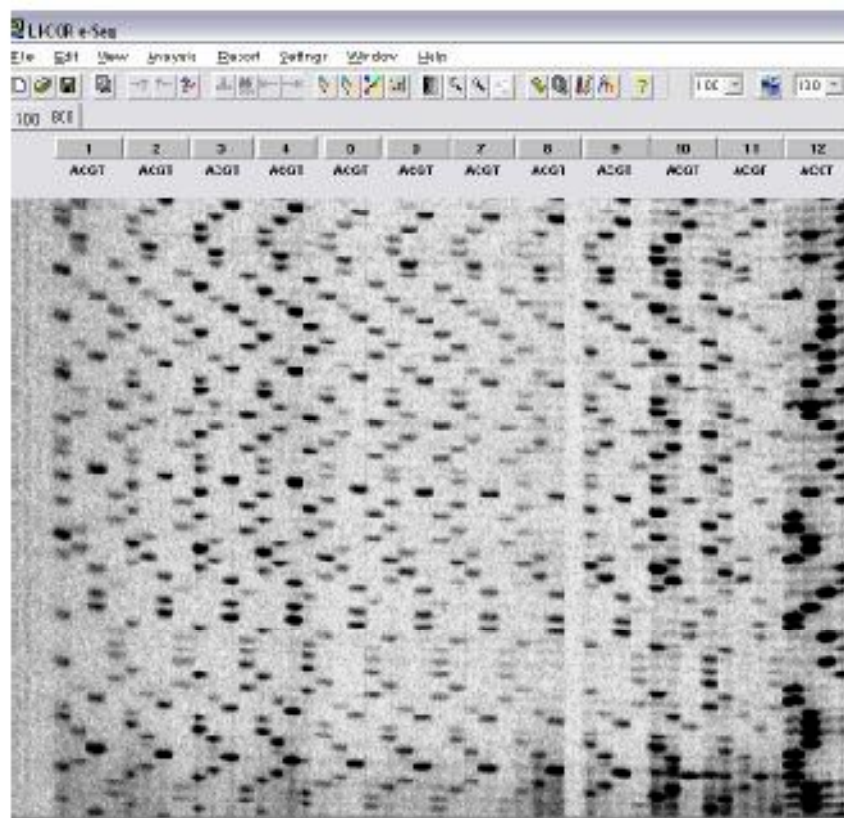


Figura 17. Imagen de secuencias obtenidas del secuenciador LICOR

En la tabla 19 se muestra el tamaño en pares de bases (p.b.) de las secuencias obtenidas en cada una de las cepas y su identificación por comparación de la secuencia de los ITS's-5.8S. Es importante considerar que las derivaciones en la comparación con la base de datos arrojan porcentajes de similitud con una o más secuencias confrontadas, tomándose para efectos de identificación el primer resultado de FASTA3.

La identificación de las secuencias indican que las cepas aisladas pertenecen a los géneros de: *Ascomycete*, *Acremonium*, *Gloeotinia temulenta*, *Leaf litter ascomycete*, *Phyllosticta owaniana*. Los aislamientos obtenidos fueron organismos eucariotas algunas de sus características son: *Ascomycete*, es la eucariota más extensa que comprende el 50 % de los hongos conocidos y aproximadamente el 80% de los hongos patógenos, abarcan desde los hongos miceliales hasta levaduras, se pueden encontrar en agua dulce y ambientes marinos y ascomicetos filamentosos como los aislados en este trabajo se encuentran en el comúnmente en el suelo [31, 32], *Acremonium*, es un hongo cosmopolita, muy frecuente en el suelo y en restos de vegetales en descomposición algunas de sus aplicaciones es el biocontrol de plaga [33], *Gloeotinia temulenta*, es un hongo de la clase de *Ascomycete* [34], *Leaf litter ascomycete* y *Phyllosticta owaniana* ambas pertenecen a la clase *Ascomycete*, *Leaf litter* es un hongo marino su importancia en los ecosistemas marinos ha sido completamente ignorada.[35]

Tabla 19. Identificación por comparación en la base de datos de EBI de las secuencias ITS's-5.8S obtenidas de las cepas aisladas de los lodos activados de BASF y PEMEX Refinación.

Muestra	Tamaño p.b.	Identificación	Núm. acceso	% Similitud
M3-PDA-3	492	<i>Leaf litter ascomycete</i>	EM_FUN:AF502870	89
M3-V8-3	539	<i>Ascomycete sp.</i>	EM_FUN:DQ124135	74
M3-V8-1	199	<i>Acremonium sp.</i>	EM_FUN:AJ557731	99
M6-V8-1	506	<i>Gloeotinia temulenta</i>	EM_FUN:DQ489301	99
M3-AGAR-AGAR-3	199	<i>Acremonium sp</i>	EM_FUN:AJ557731	99
M6-V8-4	618	<i>Phyllosticta owaniana</i>	EM_FUN:AF312011	67

4.6. Identificación microscópica

Las cepas fueron cultivadas en medio líquido YEPD (Extracto de levadura; peptona; glucosa; agar). Se tomaron imágenes de las células con campo claro con el objetivo ocular 100X, en un microscopio Olympus BX-51 (Japón), estas fueron adquiridas con una cámara de video Hitachi KPD-50 adaptada al triocular del microscopio, las imágenes corresponden a las cepas aisladas en la etapa 1.

A continuación se muestran las imágenes de cada una de las muestras de las cepas aisladas de inóculo de PEMEX Refinación. Posteriormente se ilustran cepas aisladas del inóculo de BASF. Ambas muestras fueron crecidas en medio YEPD.

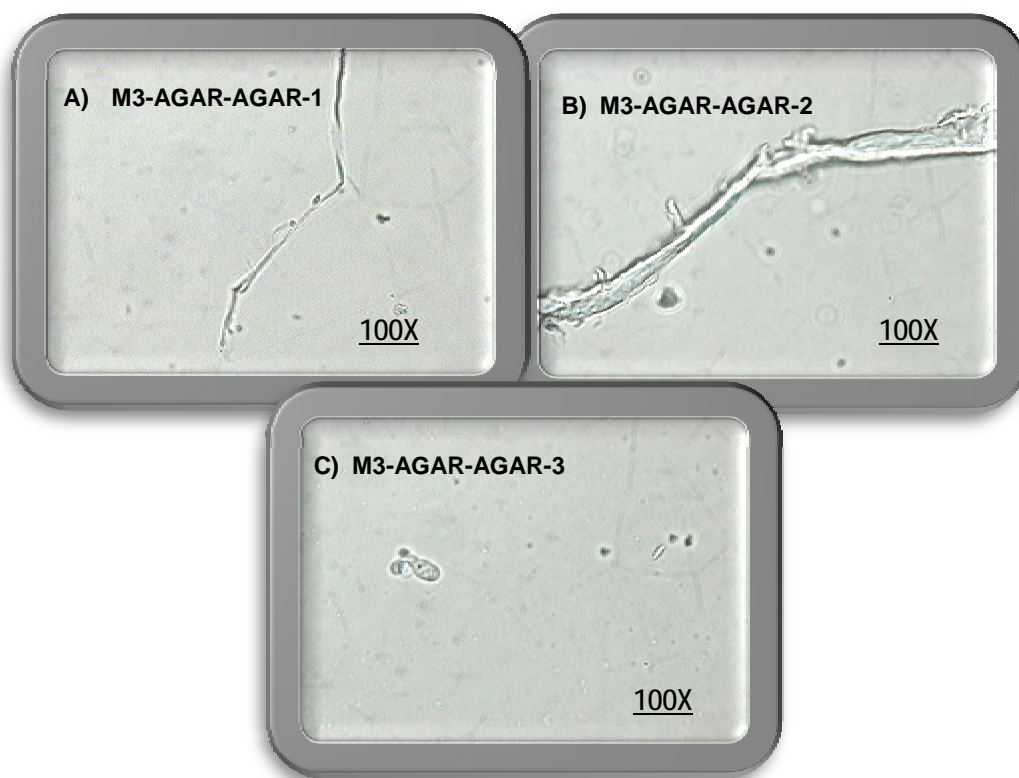


Figura 18. Microfotografías. A) M3-AGAR-AGAR.-1.- Hongo Filamentoso, B) M3-AGAR-AGAR-2.- Hong Filamentoso, C) M3-AGAR-AGAR-3.- Hongo Filamentoso. Imágenes Muestra 3, crecidas en medio YEPD.

En la figura 18 se muestran las microfotografías de las muestras inoculadas con lodos activados de PEMEX Refinación, donde se observa morfológicamente hongos filamentosos identificados molecularmente como *Acremonium sp.* Así mismo en la figura 19, se observan las imágenes de hongos y levaduras filamentosas de igual manera correspondientes a los inóculos de PEMEX sembrados en diferentes medios caracterizados molecularmente como *Leaf litter ascomycete*.

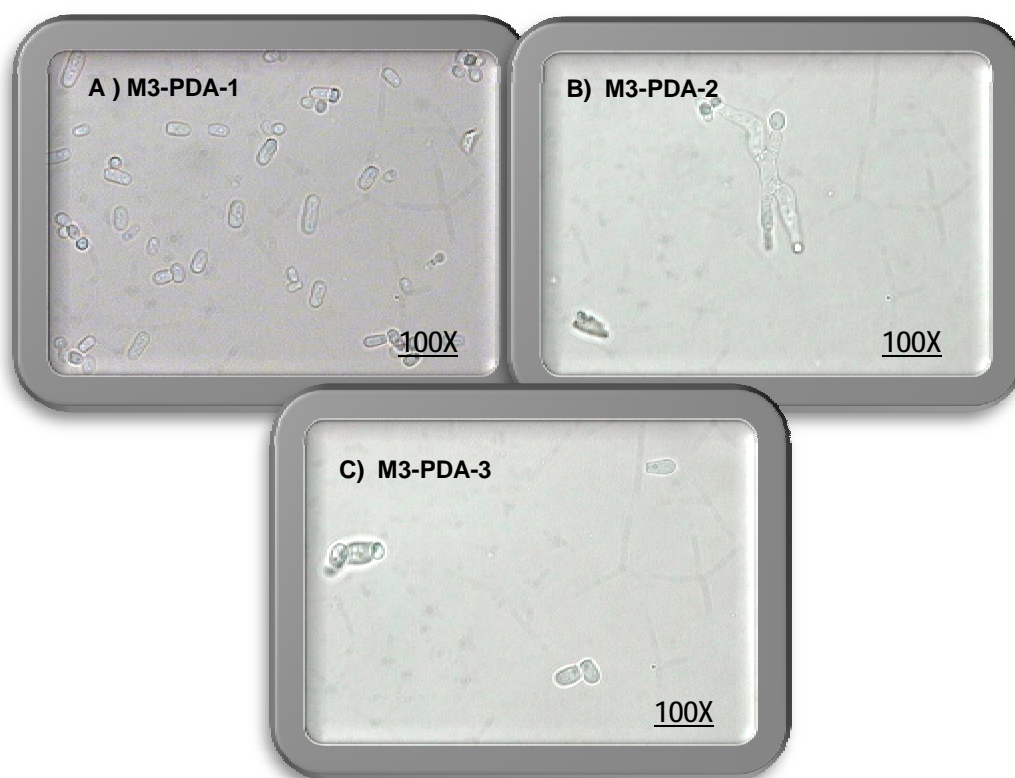


Figura 19. Microfotografía. A) M3-PDA-1.- Levadura Filamentosa, B) M3-PDA-2.- Hongo Filamentoso, C) M3-PDA-3.- Levadura Filamentosa. Imágenes Muestra 3, crecidas en medio YEPD

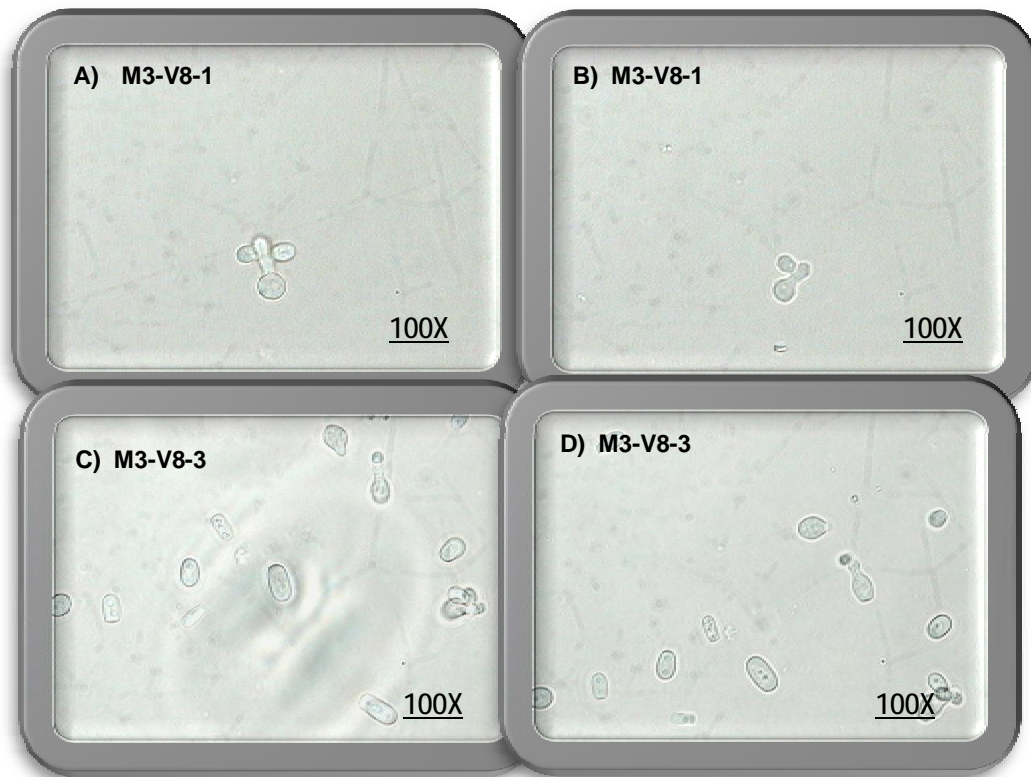


Figura 20. Microfotografía. A) B) M3-V8-1.- Levadura Filamentosa, C) D) M3-V8-3.- Levadura Filamentosa. Imágenes Muestra 3, crecidas en medio YEPD

En la figura 20, se ilustran las imágenes de las muestras correspondientes al inóculo de PEMEX Refinación, las cuales fueron identificadas molecularmente de acuerdo al orden de la microfotografía: A) B).- *Acremonium sp.*, C) D).- *Ascomycete sp.*

Así mismo en las muestras inoculadas con lodos activados de la empresa BASF, en diferentes medios los cuales (AGAR-AGAR, PDA) al ser identificados molecularmente se caracterizaron de igual manera que los inóculos de PEMEX Refinación (AGAR-AGAR, PDA) como: *Acremonium sp* y *Leaf litter ascomycete*, respectivamente.

Sin embargo en la figura 21, se muestran las imágenes de los inóculos de la empresa BASF, crecidas en medio V8, las cuales se identificaron molecularmente de la siguiente manera: A).- *Gloeotinia temulenta* , B).- *Phyllosticta owaniana*.

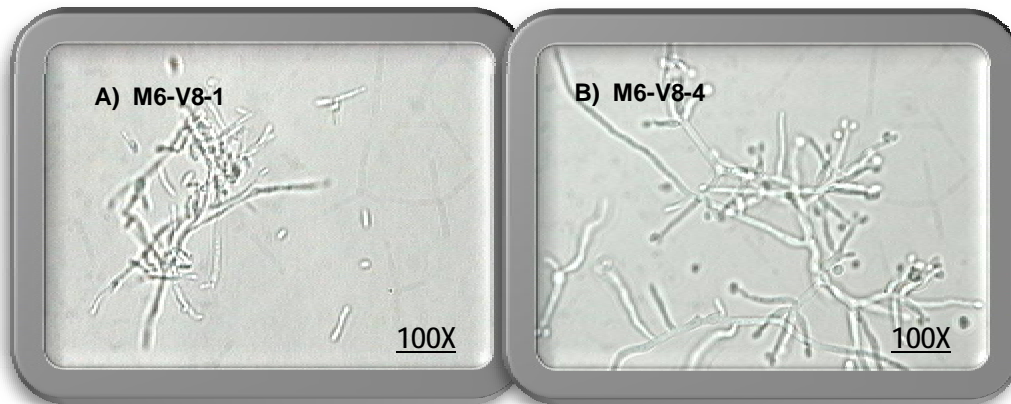


Figura 21. Microfotografía. A) M6-V8-1.-Levadura con formación de pseudohifas.; B) M6-V8-4.- Hongo Filamentoso. Imágenes Muestra 6, crecidas en medio YEPD

Se puede concluir la información útil obtenida para trabajos futuros de acuerdo a la morfología observada en las eucariotas aisladas de los lodos de BASF y PEMEX Refinación, en donde en su mayoría son hongos filamentosos, y de interés industrial en la producción de enzimas y están naturalmente adaptadas al crecimiento sobre superficies constituyendo biopelículas y como tales muestran características fisiológicas particulares derivadas por la expresión diferencial de sus genes, a diferencia de las biopelículas bacterianas, las formadas por hongos filamentosos no han recibido la misma atención de estudio, debido a que es un proceso complejo la formación de sus biopelículas; que se inicia con la adhesión de esporas a una superficie, la cual está influenciada por factores físicos, químicos y ambientales hablando morfológicamente este tipo de biopelícula forma una arquitectura interna de canales, los cuales permiten el flujo al interior de la misma, para un mejor entendimiento de las biopelículas de hongos filamentosos es necesario emplear técnicas moleculares y visualización microscópica las cuales contribuirán grandemente al desarrollo de procesos productivos basados en las ventajas morfológicas de las biopelícula de hongos de interés industrial.

4.7. Formación de Bancos de ADN genómico

Etapa 2

En la figura 22 se muestra el ADN genómico obtenido por medio del protocolo del Kit comercial RNazol de Promega. Se obtuvo ADNg de las dos diferentes colonias que fueron purificadas en medio liquido TGY.

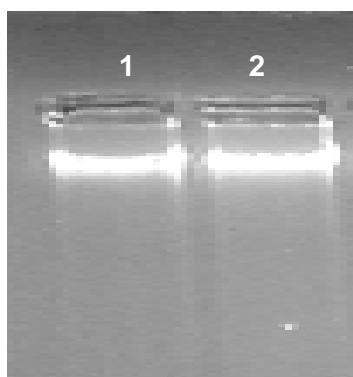


Figura 22. Aislamiento de DNA genómico. Se muestra el corrimiento electrofórico del ADN en un gel de agarosa al 1% teñido con SyberGold™ 10X.

4.8 Amplificación del gen 16S

En la figura 23, se muestran la amplificación del gen 16s, de las colonias 1 y 2. Cabe destacar que las bacterias amplifican en el rango de 1000-1600 pb. [36] este particular se observa en la amplificación de la colonia 2. La colonia 1 no presentó amplificación esto es debido a que no se tomó la cantidad necesaria de ADNg por lo tanto no se realizó la adherencia del gen en la reacción de PCR. Por lo tanto se realizó alternativamente una nueva PCR exclusivamente para la colonia 1, esta se muestra en la figura 24, misma en la cual se puede observar la amplificación de manera grata dentro de los rangos antes mencionados.

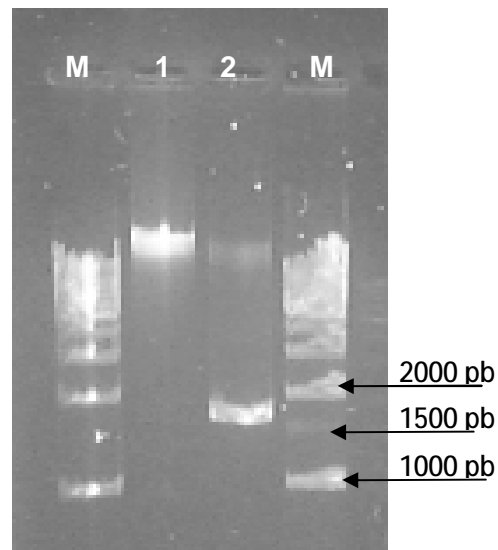


Figura 23. Se muestran los resultados de la amplificación de los segmentos 16S donde M es marcador de 1000 pares de bases.

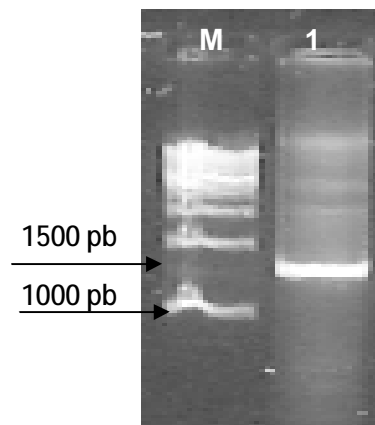


Figura 24. Amplificación de los segmentos 16S de la colonia 1, donde M es marcador de 1000 pares de bases.

4.9. Clonación

A continuación en la figura 25 y 26 se ilustran las clonas de las colonias 1 y 2 respectivamente, así mismo en las tablas 20 y 21 se muestran las clonas positivas de cada uno de las colonias.

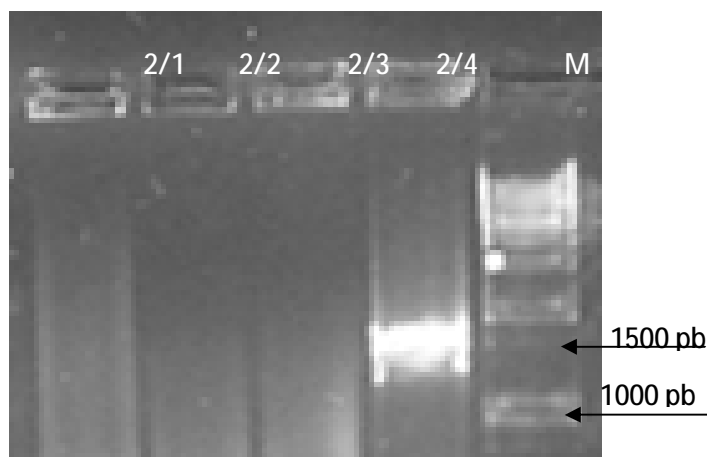


Figura 25. PCR de Tamizaje. Las amplificaciones muestran las clonas positivas con el segmento 16S. M marcador de 1000 pares de bases.

Tabla 20. Clonas Positivas colonia 2

Muestra	Clonas Positivas
Colonia 2	2/4

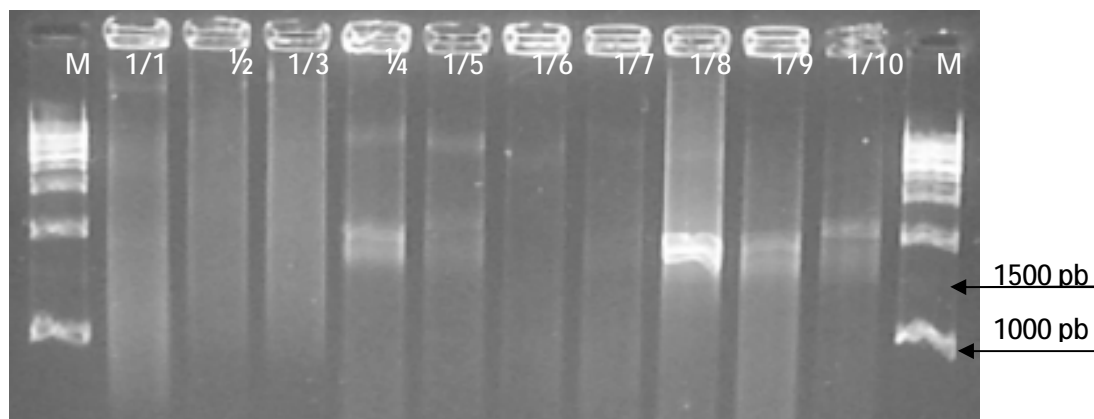


Figura 26. PCR de Tamizaje. Las amplificaciones muestran las clonas positivas con el segmento 16S. M marcador de 1000 pares de bases.

Tabla 21. Clonas positivas colonia 1.

Muestra	Clonas Positivas
	1/1
	1/4
Colonia 1	1/5
	1/7
	1/8
	1/9
	1/10

4.10. Purificación ADN plasmídico

En las figuras 27 y 28, se ilustran las amplificaciones del ADN plasmídico, el cual como ya se ha mencionado con anticipación contiene la información útil para obtener una secuencia específica. En las tablas 22 y 23 se enumeran las clonas de las cuales se obtuvo ADN plasmídico.



Figura 27. Extracción de ADN plasmídico de la clona 2/4, colonia 2

Tabla 22. Extracción ADN plasmídico, colonia 2

Muestra	Clonas Positivas	Clonas de las cuales se Obtuvo DNA plasmídico
Colonia 2	2/4	ü

ü Presencia de DNAp.

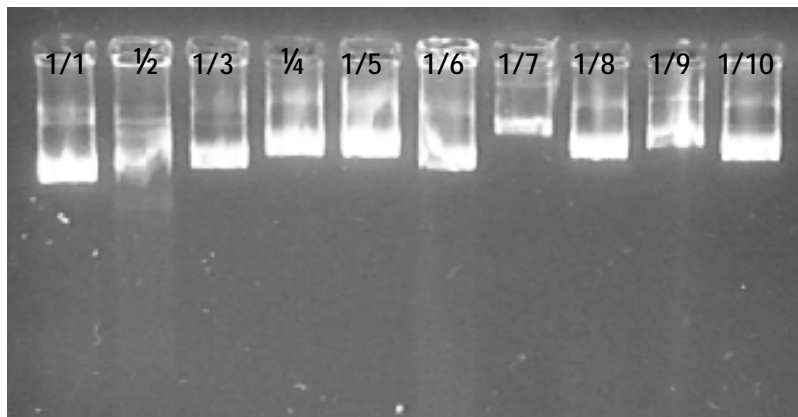


Figura 28. Extracción ADN plasmídico, colonia 1.

Tabla 23. ADN plasmídico, colonia 1

Muestra	Clonas Positivas	Clonas de las cuales se obtuvo DNA plasmídico
	1/1, 1/6	ü
Colonia 1	½, 1/7	ü
	1/3, 1/8	ü
	¼, 1/9	ü
	1/5, 1/10	ü

ü Presencia de DNAp.

4.11. Secuenciación

La secuenciación se realizó como anteriormente se especificó, en la etapa 1. Se obtuvo la secuencia correspondiente a la colonia 2, así como la secuencia de las clonas correspondientes de la colonia 1, se identificó en la base de datos del NCBI.

En la tabla 24 se muestra el tamaño en pares de bases (p.b.) de las secuencias obtenidas de las colonias 1 y 2 así como su identificación por comparación de la secuencia. Considerando que la comparación en la base de datos lanza porcentajes de similitud con una o más secuencias comparadas, por lo tanto para efectos de su identificación se tomó el primer resultado de BLAST.

Tabla 24. Identificación por comparación en la base de datos de NCBI de las secuencias obtenidas de las colonias 1 y 2. Aislamiento inóculo PEMEX Refinación.

Muestra	Tamaño pb	Identificación	Núm. acceso	% Similitud
Colonia 2	368	<i>Microbacterium imperiale</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	AF106599.1	93
Colonia 1	1016	<i>Microbacterium sp.</i> PLL-3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	EU127453.1	98

4.12. Identificación microscópica

Las colonias que presentaron crecimiento en medio solido Thiobacillus, fueron cultivadas en medio liquido TGY (Extracto de levadura; Triptona; glucosa) Se tomaron imágenes de las células con campo claro con el objetivo ocular 100X, en un microscopio Olimpos BX-51 (Japón), estas fueron adquiridas con una cámara de video Hitachi KPD-50 adaptada al triocular del microscopio.

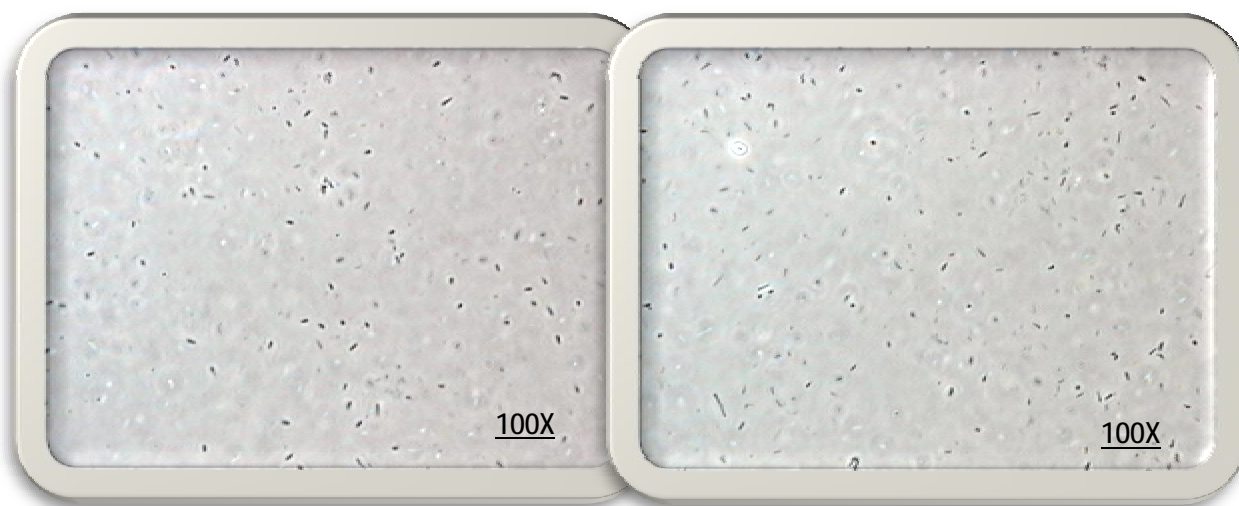


Figura 29. Morfología colonia 1. Purificación medio TGY

En la figura 29 se observan las microfotografías del aislamiento de la colonia 1, dicho aislamiento se realizo con inculo de PEMEX Refinación, donde se observa morfológicamente bacilos pequeños los cuales fueron molecularmente identificados como bacilos del genero *Microbacterium sp.*

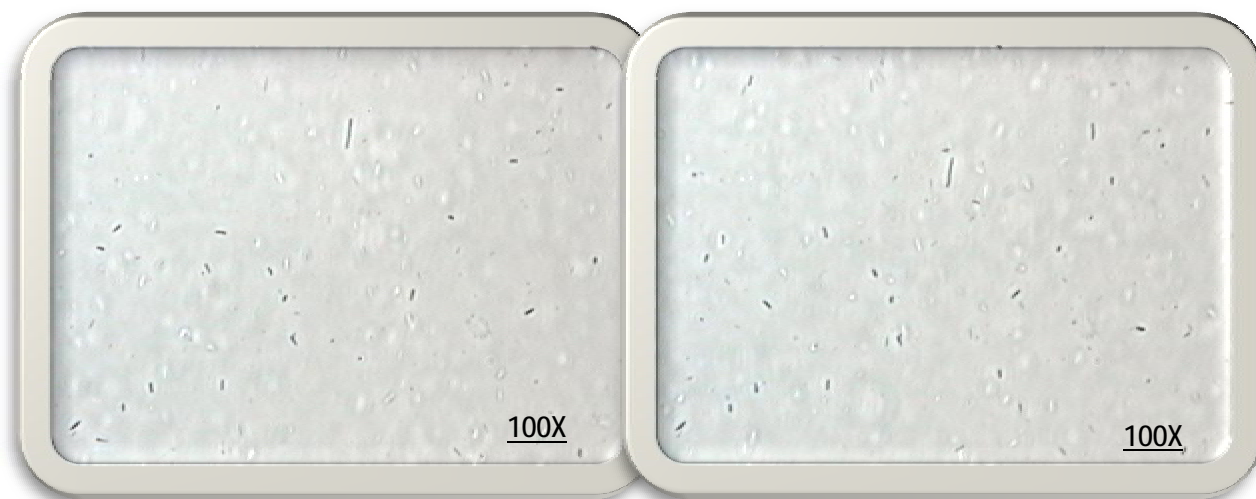


Figura 30. Morfología colonia 2. Purificación en TGY

En la figura 30 se observan las imágenes del aislamiento de la colonia 2, en la cual se distinguen de igual manera como en la figura anterior (fig. 29) gran cantidad de bacilos pequeños, los cuales fueron identificados molecularmente como bacterias del género *Microbacterium* imperiale. Estos resultados indican que se realizó el aislamiento de dos bacterias correspondientes al mismo género, *Microbacterium* o antes de reclasificarse se conocía como *Aureobacterium* hasta que se propuso la unión de los dos géneros en 1998 [27, 28]. Por lo tanto forman parte de un mismo género pero pertenecen a dos diferentes especies ambas bacterias son gram positivas y resistentes al calor [29].

Las especies *Microbacterium* han sido aisladas de una gran variedad de fuentes ambientales, incluyendo plantas, productos lácteos, suelo, lodos activados, humidificadores y en muestras de aire en hospitales [30]

CAPITULO V: CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Mediante la técnica de secuenciación, se pudieron obtener en la etapa uno poblaciones con ADNp característico de las eucariotas, lo que condujo al aislamiento de los géneros: *Ascomycete*, *Acremonium*, *Gloeotinia temulenta*, *Leaf litter ascomycete*, *Phyllosticta owaniana*, en donde podemos concluir de acuerdo a la información consultada que ninguna eucariota posee características de control de hidrocarburos, solo el género *Acremonium* tiene aplicación de biocontrol de plagas, además cabe señalar como nota importante que en esta etapa solo se aislaron Hongos debido a que se proporcionaron lodos de baja densidad por ende no existía vida bacteriana, por lo tanto se realizó una segunda etapa.

En la segunda etapa del trabajo, se obtuvieron dos colonias, correspondientes a procariotas de acuerdo a su morfología, por lo tanto se procedió al estudio molecular de la región 16S y con la ayuda de la técnica de secuenciación se analizó el aislamiento de dos bacterias perteneciente al género *Microbacterium*, dicho género posee características de bioconversión de compuestos derivados del petróleo teniendo como sobrenombre “bacterias del crudo”, sin embargo su potencial no ha sido aprovechado a nivel industrial, en el biotratamiento de este tipo de contaminantes, además debido a la exhaustiva búsqueda bibliográfica podemos concluir que son muy pocos los estudios reportados a nivel mundial para el género *Microbacterium*, en el área de biotratamiento de contaminantes, se han realizado estudios del género pero son enfocados como espécimen clínico, por lo que este trabajo es de vital relevancia y contribución biológica para este género y sobre todo para trabajos futuros en nuestra región, así mismo que cabe enfatizar que este trabajo es el único en la zona conurbada que emplea técnicas de caracterización molecular, esto es debido al grado de complejidad de las técnicas y desconocimiento de las mismas, lo cual es alarmante debido al alto potencial de estas.

RECOMENDACIONES

En este trabajo se realizó, el aislamiento de cepas degradadoras de hidrocarburos, el cual es de vital importancia ya que es la parte medular para trabajos futuros para el tratamiento de dichos compuestos.

Finalmente, para completar el trabajo Es necesario realizar cinéticas de reacción, para determinar la capacidad de degradación de las cepas, variando las concentraciones de los contaminantes, posteriormente la última etapa es desarrollar un biofiltro a nivel laboratorio para aplicarlo industrialmente en el tratamiento de efluentes contaminados además su comercialización, así mismo sería interesante llevar a cabo un estudio a profundidad de las biopelículas formadas por las eucariotas aisladas en este trabajo debido a la falta de estudios realizados en este tipo de biopelículas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Revah, M.S., Hernández, J.S., Martínez, S.A., Gutiérrez, A.V., 2003. Tratamiento biológico de compuestos orgánicos volátiles de fuentes fijas. INE-SEMARNAT, México D.F.
- [2] Thalasso, F. and Pineda, O.R., 2002. Biofiltración: tratamiento biológico de aire contaminado. Avance y Perspectiva 21, 325-327.
- [3] Santana O.A., 2004. Biofiltración de metanol por *Pichia methanolica*. Tesis de maestría. Universidad Metropolitana de México, México D.F.
- [4] Komberg A. 1960. Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. Science 131: 1503-1508.
- [5] Orberá T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Santiago de Cuba, Cuba Rev Iberoam Micol 21: 15-19.
- [6] Izquierdo M. 1993. Ingeniería Genética Ediciones Piramide.
- [7] Oliva A.A. 2007. Análisis de la diversidad genética de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* Aisladas de mostos de mezcal de la región de San Carlos, Tamaulipas. Tesis de Maestría, Reynosa Tamaulipas.
- [8] Estrada G. A., Cruz G A. Lappe P., Ulloa M., Garcia G. M., Gomez R. L. 2001. Isolation and identification of killer yeasts from Agave sap (aguamiel) and pulque. World Journal of Microbiology and Biotechnology 17: 557-560.
- [9] M. Leonardo Satz. La reacción en cadena de la polimerasa el método y sus aplicaciones. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, (INGEBI-CONICET)
- [10] Jaques M.; Jacob F. 1996. Biología Molecular décimo segunda edición, Editorial Ciencia y Desarrollo México D.F. pp 9-10
- [11] Prescott L., Harley J. P. 1999, Microbiología cuarta edición. Editorial MacGraw Hill Madrid España pp. 320-344(12)
- [12] Lisker R., Armendares S. 2000, Introducción a la Genética Humana, primera edición. Editorial El Manual Moderno México D.F.
- [13] www.bioq.unizar.com/servicios/ap/biomol

- [14] www.biologia.org
- [15] <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/identificacion/6.htm>
- [16] Fontúrbel R.F. 2003. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz (Bolivia). La Tecnología de DNA recombinante: principios y aplicaciones.
- [17] <http://www.personales.ulpgc.es/ecastro.dbbf/Descargas/Transparencias/DNA%20recombinante.pdf>
- [18] Chargaff E. 1951. Structure and function of nucleic acids as cell constituents. **Fed. Proc.** 10: 654-659.(20)
- [19] http://aportes.educ.ar/biologia/nucleo-teorico/influencia-de-las-tic/tecnologia-del-adn-recombinante/como_cortar_y_pegar_el_adn_tij.php
- [20] Schildkrant C., Doty P. 1961. The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA. *Journal Mol. Biol.*3: 595-617.
- [21] www.promega.com
- [22] Atkinson y Mavituna 1986. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*
- [23] Sambrook, J., Fritsch E., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Second edition, Col. Spring Harbor Laboratory Press, EEUU.
- [24] SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequencing
- [25] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- [26] <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>
- [27] Susanna K.P., Patrick C.Y., Ginson K.S. and Kwok-Yung Y. 2002. Catheter-related Microbacterium Bacteremia Identified by 16S rRNA Gene Sequencing. *Journal of clinical microbiology.* 40, 7: 2681-2685.
- [28] Takeuchi M. and Kazunori H. 1998. Union of the genera *Microbacterium* Orlan-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al. in a redefined genus *Microbacterium*. *International Journal of the Systematic Bacteriology.* 48, 739-747.
- [29] Funke G., Falsen E. and Barreau C. 1995. Primary Identification of *Microbacterium* spp. Encountered in Clinical Specimens as CDC Coryneform Group A-4 and A-5 Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology.* 33: 188-192.
- [30] Funke G., Haase G., Schnitzler N. and Reinert R. 1997. Endophthalmitis due to *Microbacterium* species: case report and review of *Microbacterium* infections. *Clinical Infections Diseases.* 24: 713-716.

- [31] Leonor C. 2003. Microbiología Agrícola. Capítulo 7.
- [32] Brial A. 2002. Reino de los Hongos. Revista Iberoamericana de Micología.
- [33] Rubini M.R., Ribeiro S.T., Pomella A.W., Maki C.S., Araújo W.L., Santos D.R. and Azevedo J. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches's Broom Disease. *International Journal of Biological Science*. 1: 24-33.
- [34] <http://nzfungi.landcareresearch.co.nz/html/data.asp?NAMEPKey=12853&ID>
- [35] Wang G., Li Q., Zhu P. 2008. Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with the Hawaiian Sponges *Suberites zeteki* and *Gelliodes fibrosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 93: 163-174.
- [36] Vasek O.M., Hebert E.M., Giori G., Raya R., Fusco A.J. 2001. Laboratorio de Bromatología-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura- UNNE. www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2001/8-Exactas/E-051.pdf.
- [37] Unidad didáctica de biología molecular. <http://www.arrakis.es/~ibrabida/biologia.html>
- [38] Doble, M., 2006. Biological Treatment of VOC's. *Chemical Engineering* 125, 35-41.
- [39] Velasco, M.R. 2000. La Biología Molecular y el ADN. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 1: 56-60.
- [40] Chang R. QUIMICA. 1992. Cuarta edición. McGraw . Hill. México.
- [41] http://www.terraily.com/reports/Building_Life_On_Earth_999.html. Dato del descubrimiento del ADN.
- [42] Berg J., Tymoczko J. and Stryer L. 2002. *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company.
- [43] Griffiths, J .F. A. *et al.* 2002. *Genética*, McGraw-Hill Interamericana.
- [44] Watson, J, D.; Baker, T. A.; Bell, S. P.; Gann, A.; Levine, M. et Losick, R. 2004. *Molecular Biology of the Gene*, Fifth edition, San Francisco: Benjamin Cummings.
- [45] Sanger F., Coulson A.R. 1975. *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*. *J Mol Biol*. 94(3):441-448.
- [46] http://www.danival.org/notasmicro/medioscult/ madre_medios.html.

GLOSARIO

Ácido nucleico. Macromolécula compuesta de ácido fosfórico, azúcar pentosa y bases Orgánicas; ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN).

ADN polimerasa. Enzimas encargadas de construir nuevas cadenas de ADN.

ADN recombinante. Nuevo ADN formado por la unión de fragmentos de ADN de procedencias diversas.

Agua MiliQ. Agua extremadamente pura y contiene una concentración muy baja de sales, de componentes orgánicos/pirógenos, oxígeno, sólidos suspendidos y bacterias.

Cepa. Es un grupo de aislamientos caracterizados de un microorganismo. Esencialmente esto se aplica a aislamientos del laboratorio, cultivos o selección, raza, variedad.

Desnaturalización. Capacidad de la doble hélice del ADN de separarse en sus dos cadenas componentes.

Desoxinucleótidos fosfatados: Son nucleótidos modificados que han perdido el grupo hidroxilo de la posición 3' de la desoxiribosa.

Electroforesis. Migración de partículas a través de una matriz obedeciendo a un campo eléctrico.

Electroforesis en geles de agarosa. Electroforesis que se lleva a cabo en un gel de agarosa y se emplea para separar moléculas de ADN de entre 100 y 50 kb en longitud. La migración del ADN en geles de agarosa depende de su tamaño y de la forma o arreglo de las moléculas.

Electroforesis en geles de poliacrilamida. Técnica mediante el cual fragmentos de ADN se movilizan y separan gracias a una corriente aplicada a través de un gel, el cual está compuesto por una pequeña molécula orgánica (acrilamida) con enlaces transversales que forman una criba molecular. Este tipo de electroforesis tiene una mejor resolución que la realizada en geles de agarosa.

Enzima de Restricción: Es una enzima que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en ese punto en concreto llamado sitio o diana de restricción o en un sitio no muy lejano a este, dependiendo de la enzima.

In vitro: Es una prueba o procedimiento que se lleva a cabo en condiciones de laboratorio: p. ej., al probar un antagonista en una caja petri contra un cultivo del patógeno.

Iniciador: Secuencia corta de nucleótidos que puede iniciar la síntesis de ADN a lo largo de un molde de ADN.

Inóculo: Un organismo introducido al medio ambiente, después de haber sido producido artificialmente en el laboratorio, para llevar a cabo alguna función especial: p.ej., control de la enfermedad, promoción del crecimiento de plantas, descomposición de paja, etc

Medio de cultivo: Material alimenticio donde crecen los microorganismos.

Nucleótido. Unidad de moléculas de ADN y ARN que contienen un fosfato, un azúcar y Una base orgánica.

Plásmido. Elemento genético extracromosómico que no es esencial para el crecimiento, es capaz de replicarse por sí mismo. Muy utilizados en Ingeniería Genética para insertar genes que interese clonar.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Método para la amplificación de una región de ADN mediante repetidos ciclos de síntesis de ADN in vitro.

RNAasa. Enzima empleada en biología molecular para la eliminación del ARN.

SyberGold™ Colorante usado para la visualización de los ácidos nucleicos.

ANEXO I:

ADN

(COMPOSICIÓN)

¿Qué es el ADN?

La Biología molecular es la ciencia que se ocupa del estudio de las bases moleculares de la vida; es decir, relaciona las estructuras de las biomoléculas con las funciones específicas que desempeñan en la célula y en el organismo. Por tanto su objetivo fundamental es la comprensión de todos aquellos procesos celulares que contribuyen a que la información genética se transmita eficientemente de unos seres a otros y se exprese en los nuevos individuos [39]. Para ello requiere de la secuenciación de los ácidos nucleicos, del diagnóstico molecular, de la producción de fragmentos de ácidos nucleicos a gran escala, entre otras, por consiguiente es necesario hacer una breve explicación del ácido desoxirribonucleico, antes de entrar a fondo a la disciplina que emplea la biología molecular para el estudio del ADN, conocida como tecnología de ADN recombinante.

Cronológicamente podemos citar algunos descubrimientos, que nos llevan de la mano a saber los orígenes del ADN hasta lo que sabemos hoy en día de esta macromolécula. Sabemos que en los años 20, el químico alemán Robert Feulgen, utilizando una tinción específica, descubrió que el ADN estaba situado en los cromosomas. A partir de este descubrimiento todo sucedió muy rápidamente. En 1944 Avery, McCleod y McCarty comprueban que el DNA es el portador de la información genética. En 1953 Watson y Crick revelan la estructura del DNA como una doble hélice complementaria que recuerda la estructura de una escalera de caracol. A partir de entonces y de manera exponencial, se suceden los descubrimientos (enzimas de restricción, polimerasas,...), con esta información hasta este momento entendemos sus orígenes, pero como está constituida la macromolécula del ADN, a continuación se explica brevemente su composición. [40]

Composición ADN

Los ácidos nucleicos son polímeros de alto peso molecular constituidos por unidades elementales denominadas }nucleótidos~, los cuales están formados por tres componentes:

Una molécula de azúcar: Desoxirribosa

Es un monosacárido de 5 átomos de carbono (una pentosa) derivado de la ribosa, que forma parte de la estructura de nucleótidos del ADN. Su fórmula es $C_5H_{10}O_4$.

Una de las principales diferencias entre el ADN y el ARN es el azúcar, pues en el ARN la 2-desoxirribosa del ADN es reemplazada por una pentosa alternativa, la ribosa.

Las moléculas de azúcar se unen entre sí a través de grupos fosfato, que forman enlaces fosfodiéster entre los átomos de carbono tercero (3', «tres prima») y quinto (5', «cinco prima») de dos anillos adyacentes de azúcar. [41]

Bases orgánicas nitrogenadas.

Las cuatro bases nitrogenadas mayoritarias que se encuentran en el ADN son la *adenina* (abreviado *A*), *citocina* (*C*), *guanina* (*G*) y *timina* (*T*). Cada una de estas cuatro bases está unida al armazón de azúcar-fosfato a través del azúcar para formar el nucleótido completo (base-azúcar-fosfato). Las bases son compuestos heterocíclicos y aromáticos con dos o más átomos de nitrógeno, y, dentro de las bases mayoritarias, se clasifican en dos grupos: las bases púricas o purinas (adenina y guanina), derivadas de la purina y formadas por dos anillos unidos entre sí, y las bases pirimidínicas o pirimidinas (citocina y timina), derivadas de la pirimidina y con un solo anillo. [42]

Ácido fosfórico

Su fórmula química es H_3PO_4 . Cada nucleótido puede contener uno (monofosfato: AMP), dos (difosfato: ADP) o tres (trifosfato: ATP) grupos de ácido fosfórico, aunque como monómeros constituyentes de los ácidos nucleicos sólo aparecen en forma de nucleótidos monofosfato.

En la figura 1 podemos observar los nucleótidos, que conforman la molécula del ADN.

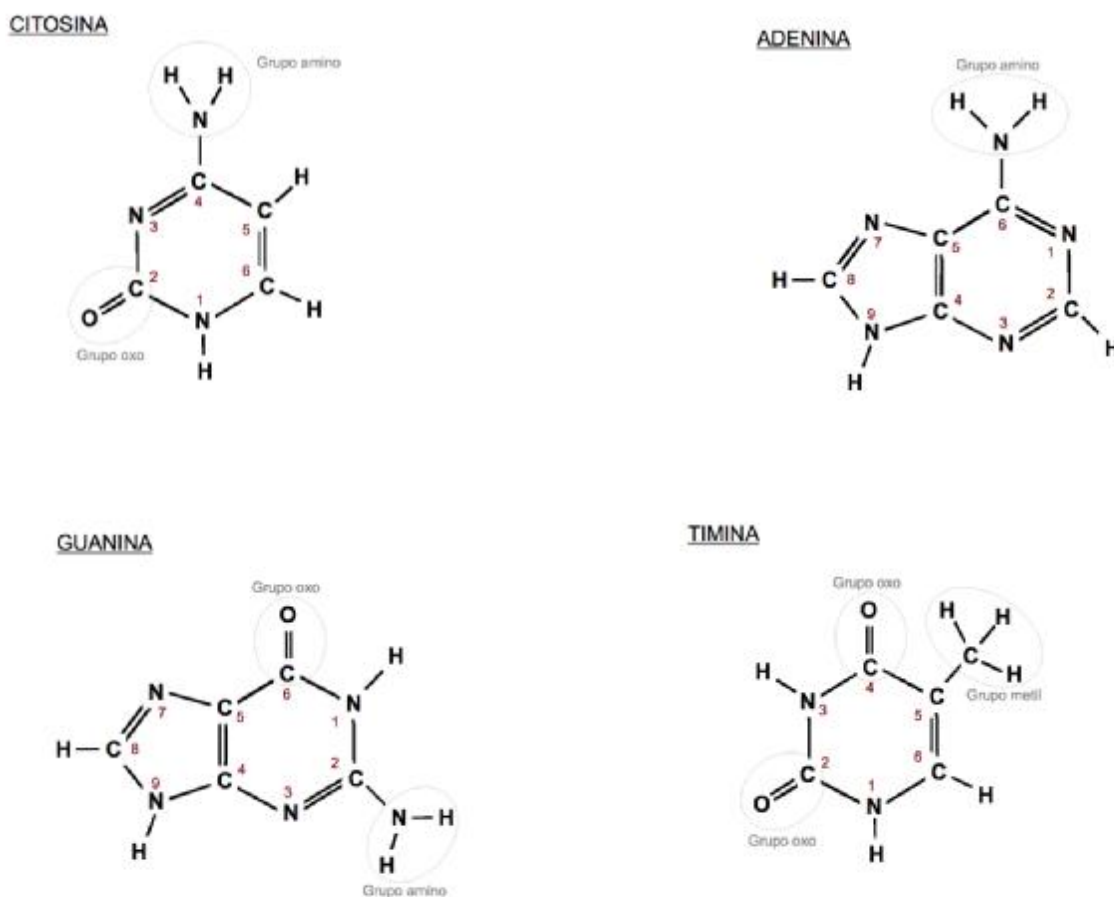


Figura 1. ADN nucleótidos

De acuerdo a la información anteriormente vista podemos decir que, los nucleótidos se unen formando cadenas cuyo esqueleto está formado por la unión entre un azúcar de un nucleótido y el fosfato del siguiente, quedando las bases nitrogenadas en la parte central, unidas cada una al C₁ del azúcar y se encuentran enrolladas a lo largo de un eje común, es decir en las dos hebras de la doble hélice y están dispuestas en direcciones opuestas, es

decir, mientras una tiene dirección 5' à 3' la otra tiene dirección 3' à 5', además estas bases son las que rinden especificidad al ácido nucleico, además el enlace presente en la unión de los nucleótidos, es covalente, es decir es una unión donde los pares de electrones son compartidos por dos átomos. En este tipo de enlace, cada electrón del par compartido es atraído por los núcleos involucrados en el enlace, lo cual hace que sea un enlace muy fuerte.

El conocimiento de la estructura del ADN, dio la pauta para nuevos descubrimientos que conducirían a lo que se llama Tecnología del ADN Recombinante, por lo tanto en el Anexo 2 se da una breve reseña de esta tecnología y de las técnicas empleadas en ella, para el estudio del ADN.

ANEXO II:

TECNOLOGÍA DEL ADN

RECOMBINANTE

Tecnología del ADN recombinante.

La tecnología del ADN recombinante, es la piedra angular de la ingeniería genética, ya que permite propagar grandes cantidades de un fragmento de ADN de interés, el cual se dice que ha sido clonado. Para ello, debe introducirse dicho fragmento en otro elemento de ADN, generalmente un plásmido, que posee en su secuencia los elementos necesarios para que la maquinaria celular de un hospedador, típicamente *Escherichia coli*, lo replique. De este modo, una vez transformada la cepa bacteriana, nuestro fragmento de ADN clonado se reproduce cada vez que aquélla se divide. Para clonar la secuencia de ADN de interés, se emplean enzimas como herramientas de corte y empalme del fragmento y del vector, el plásmido. Dichas enzimas corresponden a dos grupos: primero, unas enzimas de restricción, que poseen la capacidad de detectar secuencias específicas y de cortar de forma dirigida en ellas; y después, una ADN ligasa, que permite el enlace covalente entre extremos de ADN compatibles.[43]

Primeramente se explicara la función de las enzimas de restricción en esta tecnología, como ya se había mencionado con anticipación nos permite obtener fragmentos de ADN en cantidades ilimitadas, que llevará además el **gen o los genes** que se desee. Este ADN puede incorporarse a las células de otros organismos (vegetales, animales, bacterias...) en los que se podrá "expresar" la información de dichos genes. (De una manera muy simple podemos decir que "cortamos" un gen humano y se lo "pegamos" al ADN de una bacteria. Si por ejemplo es el gen que regula la fabricación de insulina, lo que haríamos al ponérselo a una bacteria es "obligar" a ésta a que fabrique la insulina. Por lo tanto en la tecnología del ADN recombinante podemos diferenciar cuatro etapas básicas [37]:

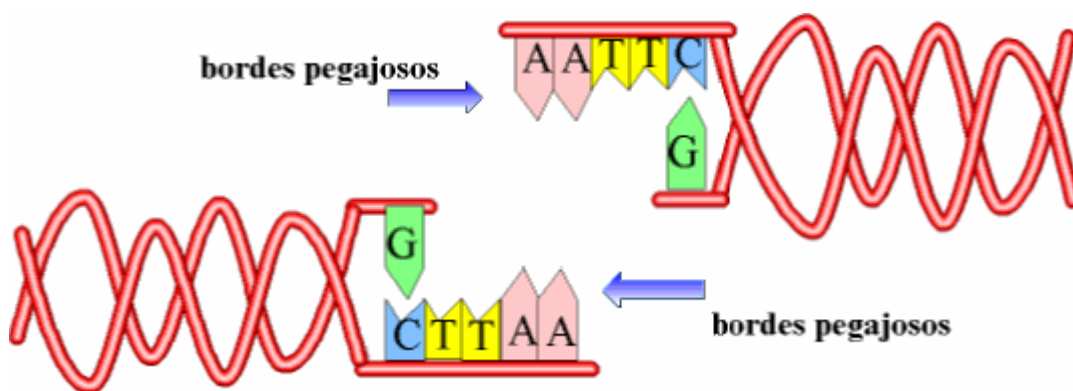
1. **Corte específico del ADN** en fragmentos pequeños y manejables mediante la utilización de un tipo de enzimas conocidas como **enzimas de restricción** que pueden considerarse como las "tijeras moleculares". Estas enzimas se aislaron en bacterias y se identifican con distintos nombres, siendo lo característico de ellas estos dos principios:

- Cada enzima de restricción **reconoce una secuencia específica** de nucleótidos y corta en ese punto **cada una** de las cadenas de ADN.
- Los extremos libres que quedan se llaman **extremos pegajosos**, porque pueden unirse a otros fragmentos de ADN que hayan sido cortados por la misma enzima de restricción.

En los siguientes esquemas puede verse como actúan estas enzimas.



En este esquema se indica el lugar en el que corta la enzima de restricción. Se aprecia la actuación en ambas hebras.



En este esquema se ve el resultado de la actuación de la enzima de restricción, se observa que ha quedado rota la molécula de ADN, quedando unos **bordes pegajosos** por donde puede unirse este ADN, con otro aunque sea de una especie diferente.

Los fragmentos obtenidos después de la actuación de las distintas enzimas de restricción, se pueden separar por tamaños, es decir, según el número de pares de nucleótidos que llevan, mediante la técnica de **electroforesis** y así estudiar los distintos trozos. Según donde se hallen las secuencias de reconocimiento, un gen determinado puede estar fragmentado en varios trozos, o bien un trozo puede contener varios genes.

En el proceso de la electroforesis se prepara una mezcla de fragmentos de ADN y se ponen en distintas soluciones. Los fragmentos se desplazan en relación inversa con su tamaño, los fragmentos más pequeños se mueven rápidamente, mientras que los grandes lo hacen muy lentamente. En la figura 1 se observa, el tipo de cámara empleada para la separación de la molécula de ADN, además de sus componentes.

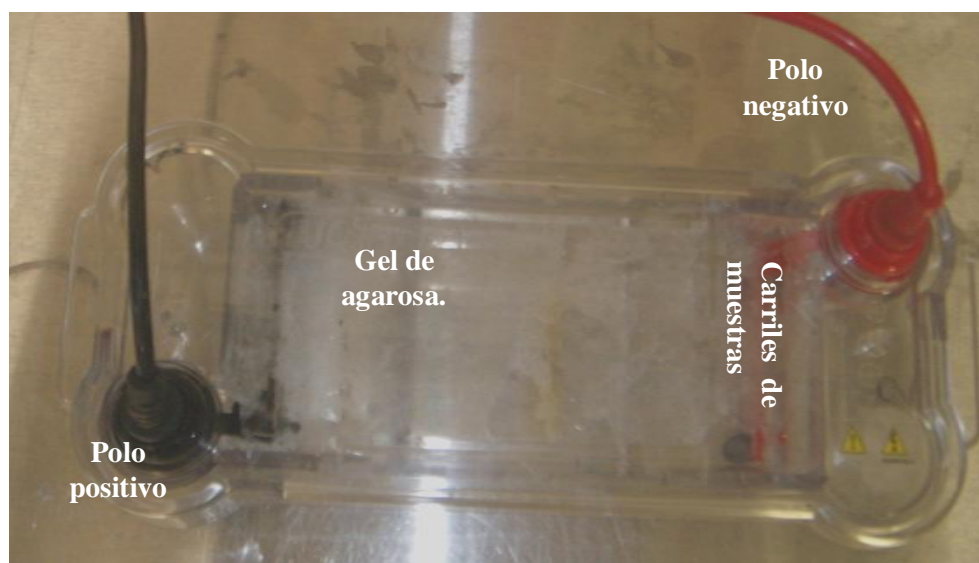


Figura 1. Cámara de Electroforesis

Posteriormente a la electroforesis, la migración de los fragmentos de ADN se observan por medio de un Fotodocumentador , el cual provee luz ultravioleta al gel, de esta manera se visualiza los fragmentos y se determina el tamaño del fragmento, el peso molecular de los ácidos nucleicos se mida en pares de bases. Después de la electroforesis se realiza la **PCR**, explicaremos brevemente esta técnica.

Esta Técnica permite duplicar un número ilimitado de veces un fragmento de ADN en un tubo de ensayo. Mediante esta técnica pueden generarse millones de moléculas idénticas, a partir de una molécula de ADN. Esto se puede conseguir en unas horas. La reacción es muy sencilla, necesita cantidades de ADN muy pequeñas y sólo se precisa un tubo de ensayo, algunos reactivos, una fuente de calor y unas pequeñas cadena de nucleótidos que actúan como iniciadores o primers selectivos para cada tipo de microorganismo.

La reacción es un proceso cíclico:

1. La molécula de ADN que va a copiarse se calienta para que se desnaturalice y se separe las dos hebras.
2. Cada una de las hebras es copiada por la ADN-polimerasa. (Se utiliza la ADN-polimerasa de una bacteria que vive en aguas termales, *Thermus aquaticus*, así la enzima puede trabajar a altas temperaturas).
3. Las cadenas recién formadas son separadas de nuevo por el calor y comienza otro nuevo ciclo de copias. Estos ciclos se repiten hasta que se obtiene el número de copias deseado.

Al termino del proceso de la PCR, ya se cuenta con una gran cantidad de ADN con el segmento de interés que deseamos secuenciar (es decir para llevar a cabo la identificación del microorganismos que estamos aislando), es una de las características de la PCR, reproducir con la ayuda de los primers la secuencia de interés; la siguiente técnica empleada en la tecnología del ADN recombinante es la **inserción de fragmentos de ADN, o ligación.**

La inserción se realiza en **vectores de clonado**, que son los agentes transportadores capaces de introducirlos en las células hospedadoras. Los vectores de clonación son pequeñas moléculas de ADN, que tienen capacidad para

autorreplicarse dentro de las células hospedadoras. Se utilizan con frecuencia dos tipos de vectores de clonación: **plásmidos** y **virus**.

- **Plásmidos.** Son moléculas de **ADN circular**, con un tamaño menor que el del cromosoma. Se replican con independencia del cromosoma bacteriano ya que tienen su propio **origen de replicación**.

En las siguientes figuras se explica el procedimiento de la inserción del fragmento de ADN a secuenciar, empleando plásmido como vector de clonación, debido a que fue el empleado en el desarrollo de este trabajo.

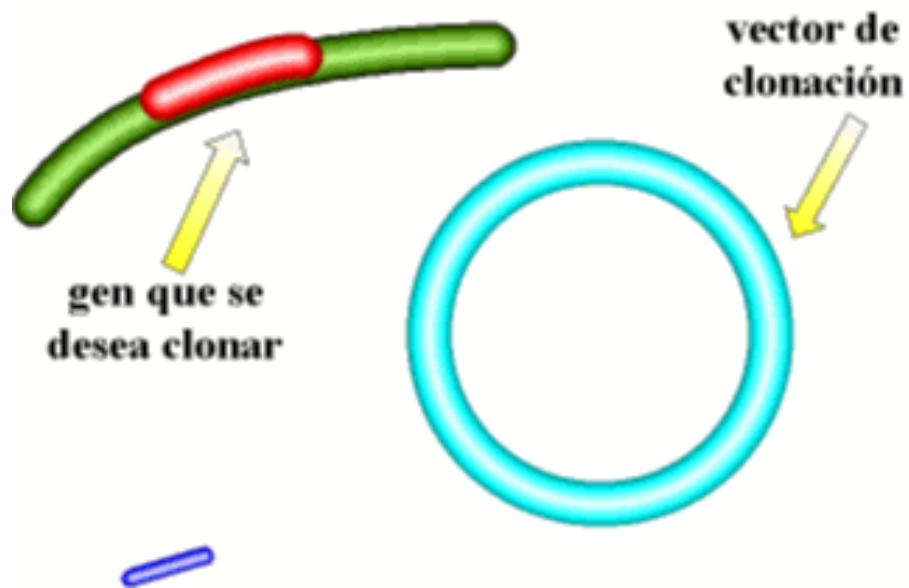


Figura a. Se puede ver como se realiza la inserción de un gen en un plásmido.

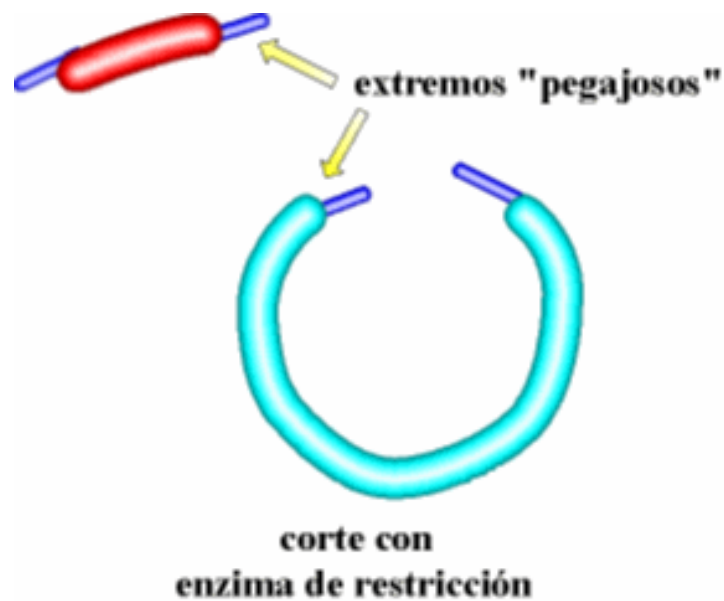


Figura b. Se observa como una enzima de restricción ha cortado el gen y el plásmido, quedando unos bordes cohesivos o pegajosos.

unión con ADN-ligasa

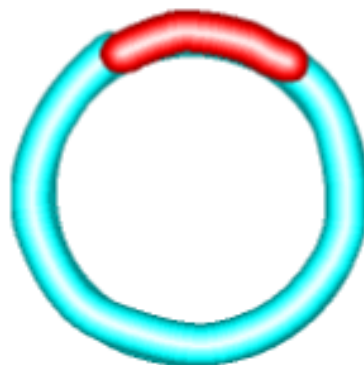


Figura c. Se observa la unión del ADN que contiene el gen que se desea clonar con el **vector de clonación**.

Esta unión se realiza por medio de otras enzimas, denominadas **ADN-ligasas**, que unen ambos trozos de ADN. El resultado es una molécula de ADN recombinante, ya que contiene fragmentos de ADN de distinta procedencia.

El siguiente paso será introducir el vector de clonación que contiene el gen que se quiere clonar en la célula hospedadora, para que ésta, al multiplicarse, origine un **clon celular**. A este proceso se le denomina **Transformación**.

- **Transformación.** Ocurre espontáneamente en ciertos tipos de bacterias y se consigue artificialmente sometiendo a la célula bacteriana a tratamientos físicos y químicos.

La célula capta moléculas de ADN que se encuentran en el medio externo, las introduce en su interior y las incorpora a su genoma.

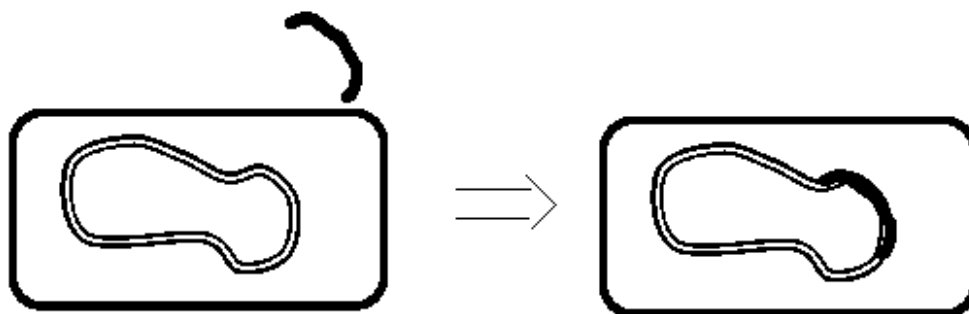


Figura d. Se observa como el vector clonado se introduce a la célula bacteria para reproducirse

Una vez que se ha conseguido la población de bacterias transformadas, el siguiente paso es poner a las bacterias en un medio de cultivo apropiado para que se multipliquen. A la vez que se reproducen las bacterias lo hace también el plásmido con el gen que interesa, el resultado es que se obtiene un **clon o clones** de células que llevan todas ese gen de interés.

Posteriormente de las clonas que se multipliquen se extrae su ADN plasmídico ya que es el que tiene la secuencia de interés por lo tanto el último paso es realizar una **Secuenciación**.

La secuenciación del ADN consiste en dilucidar el orden de los nucleótidos de un polímero de ADN de cualquier longitud, si bien suele dirigirse hacia la determinación de genomas completos, debido a que las técnicas actuales permiten realizar esta secuenciación a gran velocidad, lo cual ha sido de gran importancia para proyectos de secuenciación a gran escala como el Proyecto Genoma Humano. Otros proyectos relacionados, en ocasiones

fruto de la colaboración de científicos a escala mundial, han establecido la secuencia completa de ADN de muchos genomas de animales, plantas y microorganismos.

El método más empleado durante las últimas dos décadas ha sido el de Sanger, basado en la terminación de cadena a causa de la adición de unos nucleótidos especiales, los dideoxinucleótidos, a la mezcla de polimerización convencional. [44, 45]

ANEXO III:

MEDIOS DE CULTIVO

(PREPARACIÓN DE MEDIOS E INOCULACIÓN)

Medios de cultivo

El aislamiento implica la selección de medios de cultivo, adecuados para la inoculación de los microorganismos, que se pretenden estudiar, este es un punto de importancia muy relevante en cualquier trabajo de aislamiento, (en el presente trabajo se realizó la selección de un medio de cultivo para bacterias), por lo tanto es necesario hacer un paréntesis y explicar, los medios de cultivos en microbiología.

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el **Medio de Cultivo**. Hoy en día se conocen más de 10,000 medios de cultivo diferentes. [46]

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y Peptona a la que se añadirán otros ingredientes.

Tipos básicos de cultivos

Los medios de cultivos se dividen acorde a sus características en generales, selectivos o diferenciales.

Generales: Permiten el crecimiento de cualquier tipo de bacteria.

Selectivos: Sólo permiten crecer un cierto tipo, por ejemplo de un solo género.

Diferenciales: Permiten distinguir entre dos o más bacterias por características coloniales.

Preparación de medios

- Siempre deben prepararse los medios con agua destilada.
- Es necesario ajustar siempre el pH (debido a que las bacterias para su crecimiento necesitan un pH neutro).

- Todos los utensilios deben estar limpios.
- Todos los medios deben de esterilizarse.

Inoculación en medio *Thiobacillus*

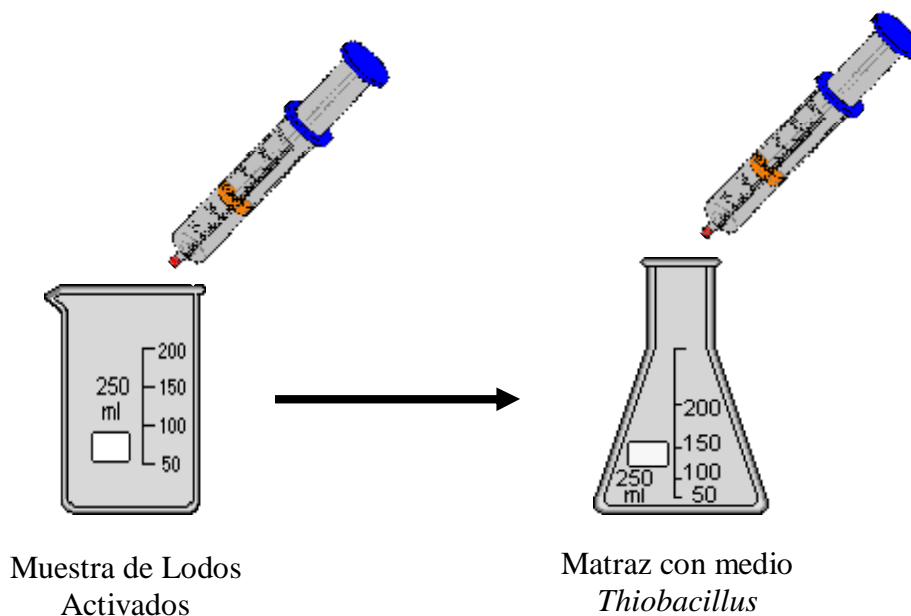
Cuando hablamos de inocular en medios de cultivo, se refiere a la acción de suspender un consorcio de microorganismos, en un medio específico con el fin de adaptarlo para su reproducción. A continuación se explica el procedimiento de la inoculación en medio *Thiobacillus*, empleando como inóculo lodos activados.

Procedimiento de Inoculación.

1. Elaborar medio de cultivo a emplear. (Medio *Thiobacillus*)
2. Esterilización del medio.
3. Enfriar a temperatura ambiente.
4. Realizar la inoculación.
5. Airear y Alimentar al microorganismo. (Se debe de airear los microorganismos con el fin de suministrarles oxígeno)

Siguiendo el orden del procedimiento de inoculación, después de enfriar el medio a temperatura ambiente, se procede a inocular el medio, al 5% en peso de los lodos activados, tomando como referencia el volumen del medio. Se mide el equivalente a 5% en peso de lodos activados, posteriormente se vierte por las paredes al medio *Thiobacillus*, con la ayuda de una jeringa o una probeta estéril, para evitar contaminación con otro tipo de microorganismos.

A continuación se explica de manera esquemática, el procedimiento de inoculación.



En las siguientes tablas se muestran los medios de cultivos empleados en el presente trabajo, señalando sus componentes.

Componentes Medio V-8

Componentes	
Jugo V-8	200 ml
CaCO₃	200 g/L
Agar	20 g/L

Componentes Medio YEPD

Componentes	
Glucosa	20 g/L
Extracto de levadura	15 g/L
Peptona	20 g/L
Agar	20 g/L (medio solido)
pH	4.5

Componentes Medio PDA

Componentes

Medio PDA	39 g/L
-----------	--------

Componentes Medio TGY

Componentes

Triptona	5 g/L
----------	-------

Glucosa	5 g/L
---------	-------

Extracto de Levadura	5 g/L
----------------------	-------

Componentes Medio Agar-Agar

Componentes

Agar	20 g/L
------	--------

Componentes Medio LB

Componentes

Medio LB	25 g/L
----------	--------

Medio LB solido	15 g/L de Agar
-----------------	----------------