



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
BACTERIAS HALOALCALÓFILAS
SULFOXIDANTES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

CLAUDIA ISELA GRANADA MORENO



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. SYLVIE LE BORGNE LE GALL
2011**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos de alumno
Granada
Moreno
Claudia Isela
57422205
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
300280351
2. Datos del tutor
Dra.
Sylvie
Le Borgne
Le Gall
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Sergio
Revah
Moiseev
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Juan Luis
Chávez
Pacheco
5. Datos del sinodal 3
Dra.
María del Carmen
Wacher
Rodarte
6. Datos del sinodal 4
Dra.
Patricia
Castilla
Hernández
7. Datos del trabajo escrito
Aislamiento y caracterización de bacterias haloalcalófilas sulfoxidantes
96 p
2011

Agradecimientos

Tanto tiempo transcurrido desde que comencé con esta tesis hasta ahora, me ha hecho acumular muchas experiencias, recuerdos y agradecimientos a las personas que a lo largo de este camino estuvieron a mi lado.

A mi padre que con su esfuerzo diario me motiva a seguir adelante.

A mi madre que siempre me cuida y apoya.

A mi hermano Esteban que con su gran ímpetu y bondad me inspira.

A mi hermana Ale que me hace darme cuenta de mis errores y me enseña a ser mejor persona con sus actos.

A mi hermana Caro por tenerme paciencia.

A mi demás familia, tíos (as), primos (as) y a mi abuelita Juana a la que recuerdo con mucho cariño.

A Juan Illescas por darme su amor y por apoyarme en este último paso que fue el más difícil, ayudándome a cerrar este ciclo y comenzar uno nuevo.

A Sylvie por recibirme en su grupo de trabajo, transmitirme pacientemente sus conocimientos, hacerme ver mis errores y alcances, y por confiar en mí.

Al Dr. Revah por su apoyo y confianza.

A mis sinodales por aportarme sus valiosas revisiones y ser tan comprensivos.

A mis compañeros de la UAM: Ana, Chua y Angélica. Y a mis amigos Ricardo, Mikael, Luis y Esperanza con los que compartí muchas horas de trabajo y muchísimas más de esparcimiento.

A mis viejos amigos Gely, Jon y Ángel a los cuales quiero, respeto y extraño.

A mis amigos biólogos Toño, Zenyese, Tania, Rocío, Miguel, Luis, Chepe, Cis y Romano que siempre estuvieron a mi lado durante este tiempo, ya sea aportándome valiosas ideas, bromas, consejos, críticas, fiestas, viajes, aprendizajes, etc...

*Esta tesis se la dedico a mis padres y
a mis hermanos, por que ellos son mi
inspiración y motivo.*

CONTENIDO

1	RESUMEN	10
2	INTRODUCCIÓN	11
3	ANTECEDENTES.....	13
3.1	Ciclo biogeoquímico del azufre	13
3.2	Problemática ambiental.....	17
3.3	Ácido sulfhídrico y sus características.....	18
3.4	Tratamiento de compuestos reducidos del azufre	19
3.5	Bacterias sulfoxidantes	19
3.6	Bacterias sulfoxidantes haloalcalófilas	20
3.7	Ambientes alcalino-sódicos	22
3.8	Técnicas moleculares	26
4	OBJETIVOS	31
4.1	Objetivo general.....	31
4.2	Objetivos específicos	31
5	MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1	Muestras	32
5.2	Medio y condiciones de cultivo	32
5.2.1	Preparación del medio líquido	32
5.2.2	Preparación del medio sólido.....	33
5.3	Aislamientos	33
5.3.1	Transferencia aséptica de aislados a medio líquido	33
5.3.2	Preservación de aislados en glicerol	34
5.4	Extracción de ADN _g	34
5.5	Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	34
5.6	Cuantificación de ADN por espectrofotometría	35
5.7	Amplificación del gen 16S ARNr por PCR.....	36
5.8	Purificación de fragmentos de PCR.....	36
5.9	Análisis de los espacios intergénicos ribosomales.....	37
5.10	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción	37
5.11	Clonación de productos obtenidos por la PCR	38
5.12	Secuenciación del gen 16S ARNr.....	40
6	RESULTADOS	41
6.1	Aislamientos	41
6.1.1	Morfología colonial de los aislados	41
6.2	Extracción de ADN _g	42
6.3	Obtención del gen 16S ARNr de los aislados	44

6.3.1	Amplificación por la PCR.....	44
6.3.2	Clonación de los productos de la PCR.....	45
6.4	Tipificación molecular por métodos de “huella dactilar del ADN”	53
6.4.1	Análisis de los espacios intergénicos ribosomales.....	53
6.4.2	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción	54
6.5	Análisis de las secuencias del gen 16S ARNr	57
6.5.1	Construcción de árbol filogenético	60
7	DISCUSIÓN	62
8	CONCLUSIONES	67
9	PERSPECTIVAS.....	68
10	BIBLIOGRAFÍA	69
11	ANEXOS	74
11.1	Protocolo de extracción de ADN	74
11.2	Protocolo de PCR para amplificar 16S bacteriano.....	75
11.3	Protocolo para purificación de fragmentos de PCR.....	77
11.4	PCR para amplificar la región intergénica 16S – 23S de bacterias (RISA)..	78
11.5	Protocolo de Clonación.....	79
11.6	Protocolo de transformación de células de E. coli tratadas con calcio	80
11.6.1	Selección de clones positivas.....	81
11.7	Protocolo para aislar plásmidos	82
11.8	Secuencias del gen 16S ARNr	84
11.8.1	2aa_3/2.....	84
11.8.2	3at_1a/2.....	85
11.8.3	3at_1b/1	86
11.8.4	4ap_org/1	87
11.8.5	4ap_org/2	89
11.8.6	5bp1_2/1	90
11.8.7	81_3(b)/1.....	91
11.8.8	31_2/2	93
11.8.9	6a3/3.....	94
11.8.10	1a2/2	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de compuestos azufrados.....	13
Tabla 2. Participación de los procariotas en reacciones del ciclo del azufre.....	15
Tabla 3. Comparación entre las características de los géneros <i>Thioalkalimicrobium</i> y <i>Thioalkalivibrio</i>	21
Tabla 4. Distribución mundial de lagos y desiertos alcalinos-sódicos.	23
Tabla 5. Composición del MMB.	32
Tabla 6. Elementos traza.	32
Tabla 7. Composición de las soluciones estériles.....	33
Tabla 8. Reactivos para preservar bacterias.	34
Tabla 9. Reactivos por reacción de digestión RFLP.	37
Tabla 10. Características de las enzimas de restricción usadas en el RFLP.....	38
Tabla 11. Reacción de digestión con <i>EcoRI</i>	39
Tabla 12. Morfología colonial de aislados de BSOHA.	42
Tabla 13. Cuantificación de ADN _g de aislados de BSOHA y su pureza.	43
Tabla 14. Cuantificación y pureza de los fragmentos del gen 16S ARNr purificados de aislados de BSOHA.	46
Tabla 15. Dilución de productos de la PCR a clonar.....	46
Tabla 16. Cuantificación y pureza de los plásmidos purificados.	49
Tabla 17. Cuantificación y pureza de fragmentos purificados de la re-amplificación del gen 16S en plásmidos.	52
Tabla 18. Análisis BLAST de secuencias del gen 16S ARNr.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biogeoquímico del azufre.	16
Figura 2. Modelo de cadena trófica en lagos alcalino-sódicos.....	24
Figura 3. Ciclos de PCR.	28
Figura 4. Mapa del vector de clonación pCR 2.1-TOPO.	38
Figura 5. Análisis de ADN _g de aislados de BSOHA.	42
Figura 6. Análisis de productos de PCR del gen 16S ARNr de aislados de BSOHA.	44
Figura 7. Análisis de la purificación de los fragmentos del gen 16S ARNr de aislados de BSOHA.....	45
Figura 8. Análisis de la digestión con <i>EcoRI</i> de los plásmidos aislados.....	48
Figura 9. Análisis de la amplificación del gen 16S ARNr en plásmidos purificados, con los oligos Bac8f y 1492r.	50
Figura 10. Análisis de la amplificación del gen 16S ARNr con los oligos M13F y M13R en plásmidos purificados.	51
Figura 11. Análisis de los fragmentos purificados correspondientes al gen 16S ARNr amplificado con el oligo Bac8f y 1492r.	52
Figura 12. Tipificación molecular correspondiente al análisis por RISA de aislados de BSOHA.....	53
Figura 13. Análisis por RFLP del gen 16S ARNr de aislados de BSOHA con la enzima <i>HhaI</i>	54
Figura 14. Análisis por RFLP del gen 16S ARNr de aislados de BSOHA con la enzimas <i>HpaII</i>	55
Figura 15. Análisis por RFLP del gen 16S ARNr de aislados de BSOHA con las enzimas <i>MspI</i> + <i>HinpII</i>	56
Figura 16. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S ARNr de aislados de BHASO.....	61

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN _g	Ácido desoxirribonucleico genómico
ARN _r	Ácido ribonucleico ribosomal
ARN _t	Ácido ribonucleico de transferencia
BLAST	Herramienta de alineamiento básico de búsqueda local
BrEt	Bromuro de etidio
BSO	Bacterias sulfoxidantes
BSOHA	Bacterias sulfoxidantes haloalcalófilas
CO ₂	Dióxido de carbono
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
FeS	Sulfuro de hierro
FeS ₂	Pirita
H ₂ S	Ácido sulfhídrico
MMB	Medio mineral base
msnm	Metros sobre el nivel del mar
OD	Densidad óptica
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Análisis de la longitud de los fragmentos de restricción
RISA	Análisis de los espacios intergénicos ribosomales
S ²⁻	Sulfuro
S ⁰	Azufre elemental
S ₂ O ₃ ²⁻	Tiosulfato
SO ₂	Dióxido de azufre
SO ₄ ²⁻	Sulfato
TBE	Tris/Borato/EDTA (Buffer)
VNTR	Número variable de repeticiones en tándem

1 RESUMEN

De sedimentos del ex Lago de Texcoco se había enriquecido un consorcio microbiano para el tratamiento de gases contaminados con ácido sulfhídrico en un biofiltro operando a pH >9. A partir de este consorcio, se obtuvieron nueve aislados de bacterias haloalcalófilas sulfoxidantes. De éstos se extrajo ADN genómico que sirvió para la amplificación del gen 16S ARNr por PCR y su tipificación molecular por análisis de espacios intergénicos ribosomales (RISA).

Posteriormente se clonó dicho gen en *Escherichia coli* y se seleccionaron diez clonas a las cuales se les re-amplificó y purificó el gen 16S ARNr para otra tipificación por polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y para secuenciación parcial de este gen. El análisis de las secuencias reveló que ocho de ellas tenían alto porcentaje de homología con *Halomonas*, mientras que dos fueron bacterias metilotróficas asociadas a hábitats alcalino-sódicos.

2 INTRODUCCIÓN

Todas las células requieren de una fuente de energía y de una fuente de carbono para su funcionamiento (Madigan *et al.* 2004).

La energía se puede obtener a partir de la luz (fototrofia) o a partir de compuestos orgánicos (quimiorganotrofia) e inorgánicos (quimiolitotrofia). La quimiolitotrofia, es decir la capacidad de captar la energía que está disponible en compuestos inorgánicos, se encuentra solo en procariotas y está ampliamente distribuida tanto entre especies de *Bacteria* como de *Archaea*. Los microorganismos que llevan a cabo este tipo de metabolismo se llaman microorganismos quimiolitotróficos. La capacidad de obtener energía de compuestos inorgánicos presenta sus ventajas ya que no existe competencia con los quimiorganótrofos. Muchos de los compuestos inorgánicos que son utilizados por los microorganismos quimiolitotróficos, como el ácido sulfhídrico (H₂S), son productos de desecho de quimiorganótrofos, bacterias y arqueas sulfato-reductoras por ejemplo. Se pueden decir que los quimiolitótrofos han desarrollado estrategias para explotar recursos que otros organismos no pueden utilizar.

Las células microbianas son heterotróficas si requieren de uno o más compuestos orgánicos como fuente de carbono, o bien son autotróficas si la fuente de carbono es el dióxido de carbono (CO₂). Muchos de los quimiolitótrofos son autótrofos. Los autótrofos se denominan también productores primarios debido a que pueden sintetizar materia orgánica a partir de CO₂. Esta materia orgánica es posteriormente utilizada como fuente de carbono por los organismos heterótrofos.

Algunas bacterias utilizan como fuente de energía compuestos de azufre inorgánicos reducidos; estas bacterias oxidan estos compuestos para “extraer” los electrones contenidos en ellos obteniendo energía y se denominan bacterias sulfoxidantes (BSO).

Las BSO son bacterias quimiolitótrofas que se distribuyen en varios hábitats asociados a interfaces de azufre-oxígeno en donde compiten exitosamente por la oxidación química del azufre por el oxígeno (Dahl *et al.* 2008). Las BSO son capaces de oxidar compuestos

tóxicos del azufre como el H_2S a compuestos no tóxicos y reutilizables como el azufre elemental (S^0) y el sulfato (SO_4^{2-}) (Dahl *et al.* 2008).

La importancia de las BSO a nivel biogeoquímico radica en su participación en el ciclo del azufre, en el cual son responsables de la oxidación de compuestos reducidos de azufre y la producción de compuestos oxidados, ayudando al “reciclaje” del azufre en la naturaleza, dado que este como muchos otros elementos es de vital importancia para el metabolismo de los demás seres vivos.

A nivel aplicado, la capacidad que estas bacterias tienen de oxidar el H_2S a S^0 , las hace útiles en el biotratamiento de efluentes gaseosos. El H_2S es un contaminante importante que se ha incrementado por la actividad antropogénica, proveniente o derivada del petróleo, gas natural y tratamiento de aguas residuales.

3 ANTECEDENTES

3.1 Ciclo biogeoquímico del azufre

El ciclo biogeoquímico del azufre juega un papel activo en la biosfera, hidrosfera, atmosfera y litosfera. Esto es principalmente debido a la gran abundancia y a las propiedades que tiene el azufre para alcanzar una amplia gama de estados de oxidación (+VI a -II) y de estar presente en forma iónica como SO_4^{2-} , elemental (S^0) y gaseosa (SO_2 y H_2S) (**Tabla 1**). La reducción de SO_4^{2-} mediada biológicamente en ambientes con bajas concentraciones de oxígeno es el proceso más dominante en el ciclo del azufre (sulfato-reducción). Los procesos en el ciclo del azufre tienen un fuerte impacto en el medio ambiente a pequeña escala (por ejemplo la degradación de materia orgánica en un acuífero contaminado) y gran escala (por ejemplo la influencia del ciclo del azufre en el contenido de oxígeno atmosférico en escalas de tiempo geológico) (Brüser *et al.* 2000). Entender el ciclo del azufre es una clave para entender algunos cambios en el medio ambiente.

Tabla 1. Tipos de compuestos azufrados (Tomado de: Lomans *et al.* 2002).

Compuestos	Formula química	Estado de oxidación
Ácido sulfhídrico	$\text{H}_2\text{S} / \text{HS}^-$	-2
Componentes azufrados orgánicos	Mercaptanos, carbonilos y metil sulfuros	-2
Sulfuros metálicos	FeS, FeS_2	-2
Azufre pirético	(S_2^{2-})	-1
Azufre elemental	S^0	0
Tiosulfato	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	+2
Tetrationato	$\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$	+2 ^{1/2}
Ditionito	$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$	+3
Dióxido de azufre	SO_2	+4
Sulfito	SO_3^{2-}	+4
Sulfato	SO_4^{2-}	+6
Polímeros de azufre		
Polisulfanos	$\text{H-S}_n\text{-H}$ (n= 1-35)	
Polisulfidos	S_n^{2-} (n=1-8)	
Polisulfanos orgánicos	$\text{R-S}_n\text{-R}$ (n= 1-35)	
Politionatos	$^-\text{O}_3\text{S-S}_n\text{-SO}_3^-$ (n= 1-22)	
Polisulfuros	S_x (>10 ⁵)	

En la litosfera el azufre oxidado se encuentra como yeso y otras sales de SO_4^{2-} , y el azufre reducido como sulfuro de hierro (FeS), pirita (FeS_2) y una gran cantidad de otros minerales que contienen azufre. Los sedimentos y rocas con minerales azufrados (CaSO_4 , FeS_2) constituyen una parte importante del reservorio de azufre en nuestro planeta. Las plantas y algas reducen SO_4^{2-} a sulfuro (S^{2-}) en un proceso de asimilación dirigida a la formación del azufre que contienen los aminoácidos cisteína y metionina (Oren 2008).

El azufre es abundante en todos los organismos, está presente en muchos compuestos orgánicos como: aminoácidos, (poli) péptidos, proteínas, cofactores de enzimas, antibióticos, lípidos o carbohidratos. En los diversos compuestos orgánicos, el azufre puede tener funciones catalíticas, estructurales o regulatorias. En contraste, el papel biológico de los compuestos inorgánicos del azufre es bastante restringido, o sirve como fuente para la asimilación e incorporación de los compuestos orgánicos del azufre antes mencionados, o como aceptor de electrones para el transporte desasimilativo. La oxidación y reducción de los compuestos azufrados en la que intervienen organismos, constituye el ciclo biológico del azufre y forma parte de la biogeoquímica; la reducción asimilativa de SO_4^{2-} es muy común en procariotas, plantas y hongos, mientras que la ruta desasimilativa está restringida a eubacterias y arqueas. En un hábitat natural estas rutas están usualmente interconectadas. Las bacterias reductoras y oxidantes de compuestos azufrados pueden formar una comunidad sintrófica (microorganismos que cooperan entre sí para degradar una sustancia que no pueden degradar por sí solos) a lo cual Baas-Beckin en 1925 llamo “*sulfuretum*” (Brüse *et al.* 2000). Debido a que el azufre presenta varios estados de oxidación, los cuales son transformados tanto químicamente como biológicamente, este ciclo se torna un tanto complejo.

El ciclo está compuesto de una fase óxica y una anóxica, en donde los componentes azufrados más importantes que intervienen en este ciclo son: S^0 , H_2S y SO_4^{2-} (**Figura 1** y **Tabla 1**). El ciclo del azufre se basa, en gran medida, en la participación de las transiciones de los diferentes estados de oxidación entre el SO_4^{2-} (la forma más oxidada) y el S^{2-} (el estado más reducido), por fases intermedias, como la oxidación del S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ y polisulfuros (Oren 2008); en las que intervienen diversos microorganismos procariotas (**Tabla 2**).

Tabla 2. Participación de los procariotas en reacciones del ciclo del azufre (Tomado de: Madigan *et al.* 2004).

Procesos clave y organismos procariotas en el ciclo del azufre		
Proceso	Reacción	Organismos
Aeróbico		
Oxidación de sulfuro/azufre	$(\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_4^{2-})$	Quimiolitótrofos del azufre (<i>Thiobacillus</i> , <i>Beggiatoa</i> , otros), bacterias fototróficas rojas y verdes, y algunos quimiolitótrofos
Anaeróbico		
Reducción de sulfato	$(\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S})$	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfobacter</i>
Reducción de azufre	$(\text{S}^0 \rightarrow \text{H}_2\text{S})$	<i>Desulfuromonas</i> , muchas <i>Archaea</i> hipertermófilas
Desproporción de azufre	$(\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S} + \text{SO}_4^{2-})$	<i>Desulfovibrio</i> y otros
Oxidación o reducción de compuestos orgánicos de azufre	$(\text{CH}_3\text{SH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S})$ $(\text{DMSO} \rightarrow \text{DMS})$	Muchos organismos pueden hacerlo
Desulfuración	(orgánica $-\text{S} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$)	Muchos organismos pueden hacerlo

En ambientes anaerobios la principal fuente de formación de S^{2-} es la reducción desasimilatoria de SO_4^{2-} en donde, este compuesto es utilizado como aceptor de electrones en la respiración anaerobia. El azufre reducido puede ser oxidado tanto química como biológicamente. Los sulfuros son inestables en presencia de oxígeno molecular, por lo tanto los procesos químicos son responsables de al menos una parte de la oxidación de compuestos reducidos del azufre en ambientes donde el sulfuro y el oxígeno están presentes simultáneamente. Sin embargo, los procesos biológicos compiten con éxito contra la oxidación abiótica del sulfuro. Una variedad de bacterias quimiolitótrofas sulfoxidantes pueden usar sulfuro y otros compuestos reducidos de azufre como fuente de energía y donador de electrones para la fijación autótrofa de CO_2 (Oren 2008).

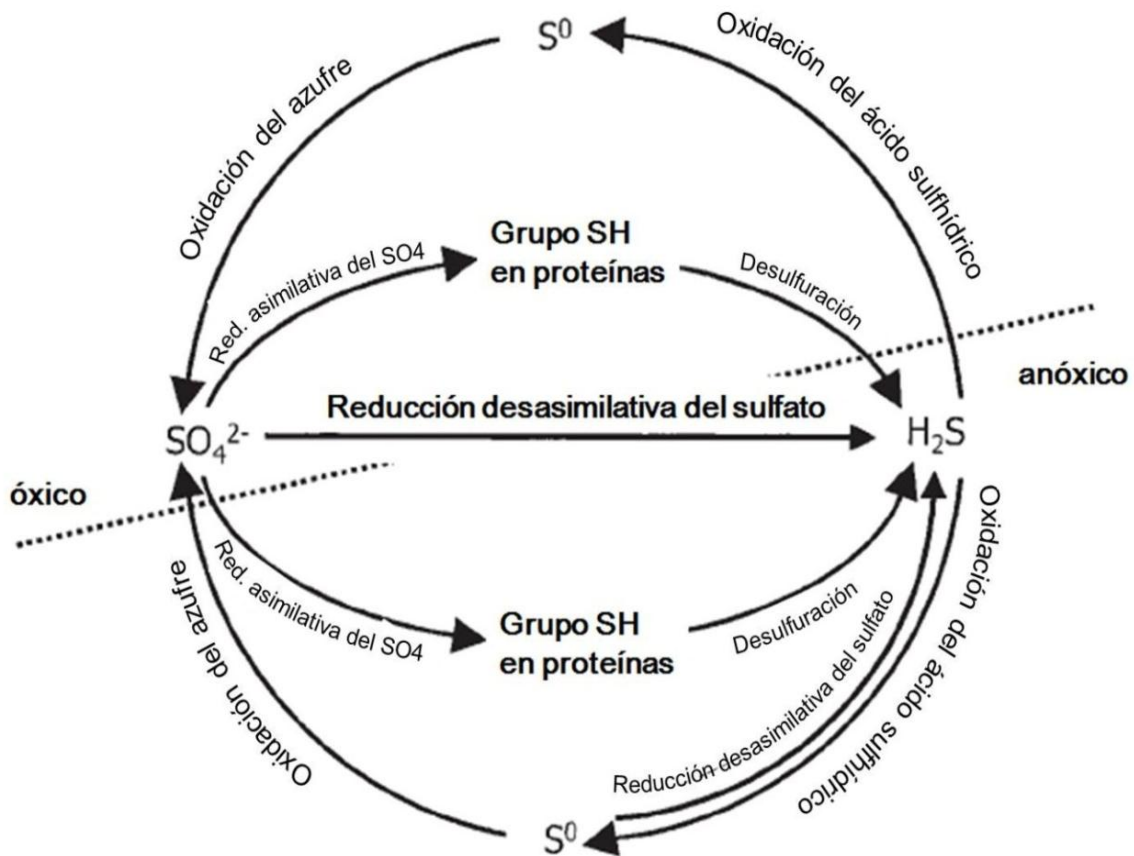


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del azufre (Tomado de: Lomans *et al.* 2002).

A veces todo un ecosistema se basa en la energía obtenida en este proceso, por ejemplo la macrofauna rica y diversa que se desarrolla alrededor de las ventilas hidrotermales, incluyendo a los gigantes gusanos tubulares, almejas grandes, y una gran cantidad de otros animales, los cuales obtiene energía directamente o indirectamente de las bacterias simbiotas que oxidan sulfuro de las aguas calientes que salen de la corteza terrestre con el oxígeno presente en el agua circundante. El sulfuro puede ser oxidado en condiciones anaeróbicas, como: cuando la luz penetra a las zonas donde el sulfuro está presente, las bacterias púrpura y verde fototróficas derivan sus electrones para la fijación fotosintética del CO_2 por la oxidación de sulfuro a SO_4^{2-} , a menudo con la acumulación transitoria de S^0 (Oren 2008).

3.2 Problemática ambiental

La contaminación del aire es más de lo que las palabras "contaminación atmosférica" pueden transmitir. Es esa constante sensación de ardor en los ojos, ese olor a ozono en un día caliente y brumoso, la asfixia de las partículas suspendidas en el aire, el humo de una instalación industrial descontrolada, el olor putrefacto en las plantas de tratamiento de aguas residuales o en un tiradero a cielo abierto. Todos estos son paisajes cotidianos en una gran ciudad como la de México.

Los compuestos reducidos del azufre constituyen contaminantes medioambientales muy importantes en el aire. Estos contaminantes son emitidos al aire de manera constante, tanto de forma natural, como antropogénica y representan un riesgo para la salud humana. Las emisiones gaseosas de instalaciones industriales, como industrias petroquímicas, fábricas de celulosa, mataderos, industrias de curtido de pieles, industrias de alimentos, industrias pesqueras, y plantas de tratamientos de efluentes líquidos y residuos sólidos generan un importante impacto en el ambiente. Los olores resultantes pueden abarcar grandes extensiones debido a que las concentraciones en las cuales se encuentra rebasan el umbral de detección olfativo humano que es extremadamente bajo (Oren 2008).

El contenido de compuestos azufrados, provenientes de la quema del carbón, en el aire es de aproximadamente de 1% a 5%. Durante la combustión, el azufre se convierte en el mayor contaminante atmosférico, el dióxido de azufre (SO_2). El SO_2 junto con el óxido nítrico (NO) son considerados como contaminantes primarios que generan lluvia ácida, aunque por ellos mismos no acidifican el agua de lluvia; esto pasa mucho después, cuando parte de la masa de estos componentes primarios se convierte en un periodo de horas o días en contaminantes secundarios, ácido sulfúrico (H_2SO_4) y ácido nítrico (HNO_3), siendo ambos muy solubles en agua y ácidos fuertes. En general la lluvia ácida precipita lejos de la fuente de los contaminantes primarios. Estos ácidos se producen durante el transporte de las masas de aire que contienen los contaminantes primarios (Baird 2001). Los equipos modernos pueden capturar la mayoría del SO_2 , pero muchas instalaciones carecen de buenos controles (Hansen 2010).

3.3 *Ácido sulfhídrico y sus características*

El H₂S es la forma más reducida del azufre, es inflamable y altamente soluble en agua a pH alcalino. Es un compuesto altamente volátil, puede hervir a una temperatura de 60.7°C. Es además altamente corrosivo. Su solubilidad en agua a 20°C es solamente de 0.40g/100g H₂O (0.12M) a una presión total (H₂S + H₂O) de 1.013 bar, la solubilidad disminuye al aumentar la temperatura (Steudel 2000). Tiene un olor desagradable, generalmente asociado al de “huevo podrido”, es irritante, afecta al sistema nervioso central y al sistema respiratorio. No solo es uno de los principales causantes de mal olor sino también tiene variados efectos sobre la salud humana, los cuales dependen de la concentración y del tiempo de exposición. A concentraciones mayores de 0.1 ppmv genera irritación en los ojos y en el sistema respiratorio, a concentraciones de 100 ppmv (límite de exposición en espacios de trabajo) se deja de percibir debido a fatiga olfativa, causando náuseas y mareos. A concentraciones de exposición mayores de 300 ppmv y en cuestión de minutos produce inconsciencia y paro respiratorio (Smet *et al.* 1998).

El H₂S puede ser emitido a la atmosfera de forma natural o antropogénicas (Steudel 2000). Las emisiones naturales provienen de la descomposición de la materia orgánica, es también vertido al medio ambiente en las exhalaciones volcánicas y salida de agua de las ventilas hidrotermales. Este gas está también presente en un cierto tipo de gas natural ("gas amargo") del cual este es recuperado y oxidado a S⁰ mediante un proceso de desulfuración. También se produce en grandes cantidades durante la desulfuración del petróleo crudo en las refinerías.

Es un componente frecuente de las aguas residuales y es emitido en grandes cantidades en las plantas de tratamiento de aguas negras y sistemas de drenaje. La generación de este contaminante está asociada con el incremento de materia orgánica o de su descomposición anaerobia, en operaciones de sacrificio de animales y procesado de subproductos, en plantas de tostado de grano y las fábricas de rayón.

3.4 Tratamiento de compuestos reducidos del azufre

Las tecnologías convencionales como la incineración o adsorción de estos compuestos resultan costosas y conllevan otros problemas de contaminación atmosférica, como la generación de grandes cantidades de CO₂ y óxidos de nitrógeno, entre otros. Por ello se han propuesto “tratamientos biológicos” para la eliminación de H₂S los cuales se basan en la capacidad de ciertas BSO para oxidar compuestos reducidos del azufre como el H₂S produciendo S⁰ o SO₄²⁻.

La biofiltración es una alternativa plausible para la eliminación de compuestos reducidos del azufre presentes en efluentes gaseosos, debido a que esta tienen un menor coste de operación, alto rendimiento de degradación para un amplio rango de contaminantes atmosféricos y sencillez tecnológica. La biofiltración consiste en hacer pasar aire contaminado a través de soportes porosos que contienen una población de microorganismos, de tal forma que el contaminante se absorbe en la película fluida formada entre el soporte y la fase acuosa, siendo en esta donde se produce la conversión del compuesto contaminante en otro más sencillo y sin capacidad de contaminación (Deviny *et al.* 1999).

3.5 Bacterias sulfoxidantes

Las BSO son capaces de oxidar H₂S, S⁰, tiosulfato (S₂O₃²⁻) y varios politionatos bajo condiciones alcalinas, neutrales y ácidas; ya sea en condiciones aerobias o anaerobias (Fredrich *et al.* 2001). Los electrones obtenidos en este proceso son acarreados al oxígeno o pasan a la cadena transportadora de electrones. En algunas bacterias y en condiciones anaerobias, el aceptor final de electrones puede ser el nitrato.

Los procariotas que oxidan compuestos reducidos del azufre son filogenéticamente diversos (Fredrich *et al.* 2001). En el dominio de las arqueas aerobia se da en miembros del orden de los *Sulfolobales*, en el dominio de las bacterias la sulfoxidación se da por litótrofos aerobios y fotótrofos anaerobios. En condiciones anaerobias se conocen especies de BSO como *Thiobacillus denitrificans*, *Wolinella succinogenes*, *Desulfovibrio sulfodismutans*, así como

representantes de los géneros: *Allochromatium*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodovulum*, *Thiocapsa* y representantes de las bacterias verdes y rojas del azufre (fotótrofas) *Chlorobium*, *Chlorobaculum*, *Chromatium*. En condiciones aerobias, existen representantes de los siguientes géneros: *Beggiota*, *Thioploca*, *Thiomargarita*, *Acidianus*, *Acidithiobacillus*, *Aquaspirillum*, *Aquifex*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Starkeya*, *Sulfolobus*, *Thermithiobacillus*, *Thiobacillus* y *Xanthobacter*. También se conocen especies de BSO litotróficas que crecen en total oscuridad, tal es el caso de *Thiocapsa roseopersicina*, *Allochromatium vinosum*, y bacterias púrpuras del azufre. La oxidación del H_2S a S^0 , también se ha reportado en bacterias fototróficas anaerobias como *Rhodobacter capsulatus*, *Pelodictyon luteolum* y algunos *Chlorobium*; las cuales necesitan de luz para llevar a cabo esta oxidación (Friedrich *et al.* 2005).

Dentro de las BSO están incluidas las especies neutrófilas y acidófilas, las cuales crecen a un pH de 2 a 8; pero hoy en día se sabe que también hay BSO que pueden crecer en pH alcalinos. Tanto las bacterias acidófilas como las alcalófilas se desarrollan en hábitats extremos. Como ejemplo de especies neutrófilas, se encuentra: *Thiobacillus thioparus* que es una BSO Gram-negativa que crece autotróficamente en compuestos orgánicos e inorgánicos de azufre, como S^0 , $S_2O_3^{2-}$, tetrionato, dimetil sulfuro (DMS), dimetil disulfuro (DMDS) y metil mercaptano (MM) a un pH 6 - 8 (Brenner *et al.* 2006). *Acidithiobacillus thiooxidans* también es una BSO Gram-negativa que crece en medios ácidos (pH 2 - 4) con S^0 , $S_2O_3^{2-}$ o tetratonatos (Brenner *et al.* 2006). Las BSO pertenecientes al grupo de alcalófilas, pueden crecer en un pH de 7.5 a 10.6, teniendo una máxima tasa de crecimiento y rendimiento en un pH de 9.5 a 10 (Sorokin *et al.* 2003).

3.6 Bacterias sulfoxidantes haloalcalófilas

Las bacterias sulfoxidantes haloalcalófilas (BSOHA) son quimiolitioautótrofos capaces de crecer en ambientes alcalinos (pH > 7.5) y salinos ($Na^+ > 0.2M$) (Sorokin & Kuenen 2005). Dentro de este tipo de bacterias se han obtenido más de 100 aislados de a partir de muestras de sedimentos de diferentes lagos alcalino-sódicos (Foti *et al.* 2006). Estos aislados se han agrupado principalmente en tres géneros de la subdivisión Gammaproteobacteria,

Thioalkalimicrobium, *Thioalkalivibrio* y *Thioalkalispira* (Sorokin *et al.* 2002), con más de 13 nuevas especies. Dentro de estos aislados el género más abundante es *Thioalkalivibrio*. Este ha sido encontrado en muestras provenientes de lagos alcalino sódicos, pero es especialmente dominante en lagos alcalino-sódicos hipersalinos de Kenia, Egipto, Siberia y California (Sorokin & Kunen 2005). La presencia de estos aislados de *Thioalkalivibrio* en diversas regiones del mundo atrae gran interés en la diversidad genética y biogeográfica de este género (Foti *et al.* 2006). Los géneros más representativos de BSOHA son *Thioalkalimicrobium* y *Thioalkalivibrio*. En la **Tabla 3** se muestran una comparación entre estos géneros:

Tabla 3. Comparación entre las características de los géneros *Thioalkalimicrobium* y *Thioalkalivibrio* (Adaptado de: Sorokin & Kunen 2005).

	<i>Thioalkalimicrobium</i>	<i>Thioalkalivibrio</i>
Diversidad	Baja (46 cepas)	Alta (96 cepas)
Tolerancia a sal	Baja (1.5M)	Alta (4.3 M)
Crecimiento	Rápido (0.33 h ⁻¹ a un pH 10)	Lento (0.20 h ⁻¹ a un pH 10)
Tolerancia de pH	7.5 – 10.65	7.5 – 10.65
pH optimo	9.5 – 10	10 – 10.2
Límite máximo de temperatura	39°C	50°C
Porcentaje de C+G en ADN	47.3 – 51.2	61.0 – 66.5
Morfología celular	Espira con 1-3 flagelos polares	Vibrio y espiras cortas con un solo flagelo polar, algunas cepas no son móviles o son de tipo cocoides
Morfología colonial	Color rosa, compactas	Color amarillo y compactas, a menudo con azufre
Concentraciones requeridas de CO ₂	Bajas	Altas

Se ha demostrado que estas bacterias extremófilas presentan un alto grado de diversidad genómica, así como una tendencia de endemismo, lo que indica que las barreras geográficas podrían desempeñar un papel importante en la diversificación de las poblaciones bacterianas, además de que en el género *Thioalkalivibrio* existen cepas altamente resistentes a la desecación e inanición (Foti *et al.* 2006). Este hecho remarca la importancia de este trabajo, ya que se cuenta con numerosas publicaciones de BSOHA dirigidas a bacterias presentes en otros países. México es un país megadiverso y no hay que descartar la posibilidad de encontrar nuevas especies o géneros de estas bacterias en un ambiente tan extremo como el del ex Lago de Texcoco.

3.7 Ambientes alcalino-sódicos

Los ambientes alcalinos pueden darse de manera transitoria, por procesos comerciales, o de forma natural. En el primer caso esta alcalinidad se da en microhábitats a través de la amonificación o la reducción de SO_4^{2-} por actividad biológica siendo esta una característica generalizada en ambientes heterogéneos como los suelos. Esta es probablemente una de las razones por la cual se encuentran microorganismos alcalófilos en ambientes que son considerados con pH neutral o incluso ácido. En el segundo caso, se trata de procesos como la fabricación del papel, cemento y en el curtido de pieles, todos estos generan condiciones alcalinas, debido a los químicos usados. Finalmente de forma natural existen ambientes alcalinos naturales, tales como los lagos y desiertos alcalino-sódicos en los que las condiciones de alcalinidad se dan y se mantienen, debido a las condiciones geológicas, geográficas y climáticas de dichos sitios, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo (**Tabla 4**) (Grant 2006).

Los lagos alcalino-sódicos representan un tipo especial de lagos salobres, los cuales contienen una fracción dominante de carbonato de sodio/bicarbonato de sodio entre las sales alcalinas solubles. Están localizados en áreas con un clima seco que facilita la acumulación de sales en las depresiones. La presencia de carbonato de sodio proporciona un único y estable hábitat alcalino, aunque el total del contenido de sal y de carbonato de sodio en estos lagos varía en un amplio rango, dependiendo de las condiciones locales. La alta capacidad de amortiguamiento del carbonato de sodio permite el mantenimiento de un pH alto a extremadamente alto (usualmente alrededor de 9.5 a 10.5) en el agua, el cual raramente puede ser encontrado en cualquier otro ecosistema natural. Por lo tanto, los lagos alcalino sódicos parecen ser uno de los pocos ecosistemas naturales en los cuales se dan las condiciones apropiadas para el desarrollo estable de microorganismos alcalófilos o haloalcalófilos, si las condiciones de salinidad lo permiten (Sorokin & Kuenen 2005).

A pesar de que los lagos alcalino-sódicos poseen condiciones aparentemente inhóspitas, estos ambientes son muy productivos debido a las altas temperaturas ambientales, alta intensidad de luz y suministro de CO_2 .

Tabla 4. Distribución mundial de lagos y desiertos alcalinos-sódicos (Tomado de: Grant 2006).

Continentes	País	Localización
África	Libia	Lago Fezzan
	Egipto	Wadi Natrun
	Etiopía	Lago Aranguadi, Lago Kilotes, Lago Shala, Lago Chilú, Lago Hertale, Lago Metahara
	Sudán	Lagos Dariba
	Kenia	Lago Bogoria, Lago Nakuru, Lago Elementeita, Lago Magadi, Lago Simbi, Lago cráter (Lago Sonachi), Lago Oloidien
	Tanzania	Lago Natron, Lago Eyasi, Lago Magad, Lago Manyara, Lago Balangida, Lago cráter Bosotu, Lago Kusare, Lago Tulusia, El Kekhooito, Lago Momela, Lago Lekandiro, Lago Reshitani, Lago Lgarya, Lago Ndotu
	Uganda	Lago Rukwa North, Lago Katwe, Lago Mahenga, Lago Kikorongo, Lago Nyamunuka
	Chad	Lago Munyanyange, Lago Murumuli, Lago Nunyampaka, Lago Bode, Lago Rombou, Lago Dijikare, Lago Monboio, Lago Yoan
América	Venezuela	Valle Langunilla
	Chile	Antofagasta
	Canadá	Lago Manitoba
	Estados Unidos	Valle Alcalino, Lago Alberto, Lago Leonor, Lago jabón, Gran lago alcalino-sódico, Lago Owens, Lago Bórax, Lago Mono, Lago Searles, Deep Springs, Rhodes Marsh, Lago Harney, Lago Summer, Valle Surprise, Lago Pyramid, Lago Walker, Unión de lagos del Pacífico (Río verde), Lagos alcalino-sódicos Ragtown
	México	Ex Lago de Texcoco
Asia	Rusia	Estepa Kulunda, Lagos Tanatar, Lago Karakul, Lago Chita, Lago Barnaul, Lago Slavgerod, Lago Baikal, Lago Khatyn
	Armenia	Lagos de la llanura de Araxes
	Turquía	Lago Van, Lago Salda
	India	Lago Looner, Lago Sambhar
	China	Varios "nors"; Sui-Yuan, Cha-Han-Nor y Na-Lin-Nor; Heilungkiang, Hailar y Tsitsihar; Kirin, Fu-U-Hsein y Taboos-Nor; Liao-Ning, Tao-Nan Hsein; Jehol, varios lagos alcalino-sódicos; Tibet, desiertos alcalinos; Chahar, Lang-Chai; Shansi, U-Tsu-Hsein; Shensi, Shen-Hsia-Hsein; Kansu, Ning-Hsia-Hsein, Qinghai Hu
Europa	Hungría	Lago Feher
		Pacena Slatina
Oceanía	Australia	Lago Corangamite, Lago Roca Roja, Lago Weroerap, Lago Chidnup

Un rasgo característico de la mayoría de los lagos alcalino-sódicos es la presencia de un permanente o estacional afloramiento colorido de microorganismos fototróficos; esto depende de la química del agua, los lagos pueden parecer verdes debido a las cianobacterias, pero también pueden tener áreas rojas o naranjas debido a otros organismos.

A diferencia de otros lagos, aquí la biomasa microbiana es dominada por procariotas, las cuales se encargan de la producción primaria (Grant 2006). Los lagos alcalinos sódicos son un ecosistema rico en bacterias y arqueobacterias tales como: cianobacterias, haloanaerobios, espiroquetas, “thermotogas”, arqueas halófilas y metanógenas, sulfoxidantes, sulfato-reductores, nitrificantes y metilotróficos; todas ellas participantes activas en los ciclos de carbono, nitrógeno y azufre, tanto en condiciones aerobias como anaerobias (Grant 2006). La interacción trófica de estos microorganismos puede ejemplificarse en la **Figura 2**, pero esto queda abierto a nuevos grupos que puedan emerger en el futuro.

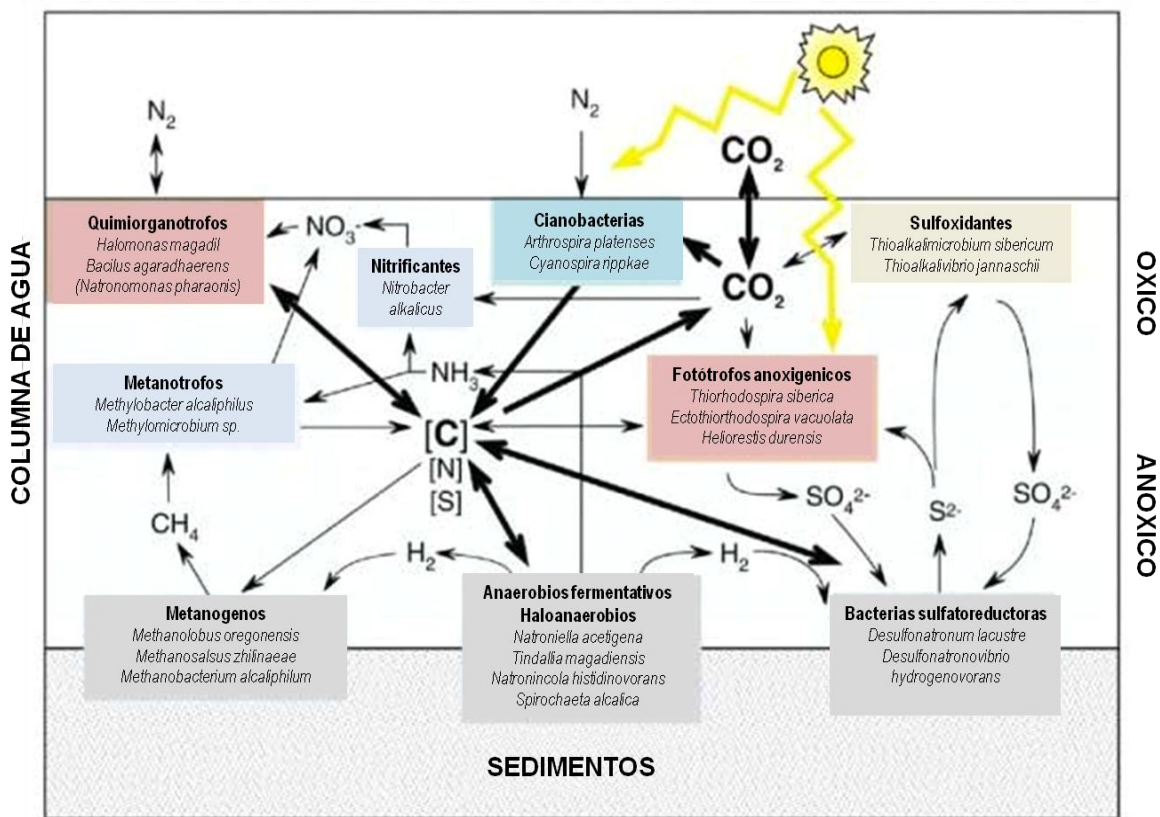


Figura 2. Modelo de cadena trófica en lagos alcalino-sódicos (Tomado de: Grant 2006).

Las investigaciones microbiológicas en los lagos alcalino-sódicos por técnicas tradicionales de cultivo y técnicas moleculares han revelado que a pesar de las condiciones doblemente extremas, las comunidades microbianas están totalmente estructuradas y funcionando (Sorokin & Kuenen 2005; Jones *et al.* 1998; Grand 2006). En la zona bentónica sobre la capa de sedimento anaerobio que suele ser color negro, la comunidad microbiana está densamente poblada por fotótrofos, los cuales producen activamente sulfuros. Las cianobacterias alcalófilas son responsables de generar altos niveles de producción primaria y fijación de nitrógeno. Las bacterias fototróficas anoxigénicas, también son abundantes, los principales grupos de anaerobios son bacterias fermentativas, acetogénicas, metanogénicas y sulfato-reductoras representadas por especies únicas haloalcalófilas (Sorokin & Kuenen 2005).

El ciclo microbiano del azufre parece ser uno de los más activos en los lagos alcalino-sódicos con fotótrofos anaerobios como las bacterias púrpuras del azufre y los alcalófilos sulfato-reductores; en la parte aerobia hay bacterias quimiolitótrofas capaces de oxidar o reducir componentes inorgánicos como el metano, hidrógeno, sulfuro y amonio producidos por los anaerobios haloalcalófilos durante la degradación de compuestos orgánicos (Sorokin & Kuenen 2005).

El ex Lago de Texcoco es un ejemplo de lago alcalino-sódico que está ubicado al noroeste de la ciudad de México en las coordenadas latitud norte 19°30' longitud oeste 98°53', a una altitud de 2250 msnm, con una temperatura promedio anual de 14°C y una extensión aproximada de 5,000 ha, de las cuales solo una pequeña parte es ocupada por el lago. En el agua son dominantes las sales NaCl y Na_2CO_3 . Los suelos también son alcalino-sódicos con un pH entre 8.5 y 10.5 y un drenaje natural pobre. Tiene una alta tasa de evaporación (aproximadamente 2,000 mm/año) y una precipitación pluvial baja (aproximadamente 700 mm/año), lo cual incrementa la concentración de sal (López-Valdez *et al.* 2010).

3.8 Técnicas moleculares

El término *Biología molecular* se aplica específicamente al estudio de la estructura y función del conjunto de macromoléculas que se encuentran en las células vivas (Madigan *et al.* 2004). Mediante técnicas de biología molecular se puede conocer la diversidad de los microorganismos, entre otras novedosas aplicaciones a diferentes disciplinas.

Dentro de las técnicas más utilizadas para la caracterización de bacterias aisladas, se encuentra la amplificación del gen de la subunidad ribosomal pequeña (16S ARNr), mediante la reacción en cadena de la polimerasa, PCR llamada así por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction* (Weisburg *et al.* 1991). Desde los años 70 se ha extendido el uso de este gene como una importante herramienta para establecer relaciones filogenéticas entre procariotas, siendo Carl Woese quien la introdujo, y quien propuso a esta molécula como cronómetro evolutivo, ya que es muy antigua y está presente en todos los procariotes, además de que su estructura y función han permanecido constantes a lo largo del tiempo (Woese *et al.* 1990).

Las técnicas moleculares son útiles para determinar las relaciones evolutivas entre microorganismos. Dichas técnicas se utilizan hoy en día de forma habitual para distinguir entre individuos. Este proceso se conoce con el nombre de huella dactilar del ADN (en inglés: *fingerprinting*). La huella dactilar del ADN es posible gracias tanto a la tecnología que permite la detección precisa y la amplificación de pequeñas cantidades de ADN, como el hecho de que algunos organismos poseen secuencias repetitivas de ADN que existen en el genoma en diferente número y posición. Para que sea útil con fines de identificación, una secuencia de ADN debe poder distinguirse entre grupos distintos dentro de una población de organismos (Madigan *et al.* 2004). Dentro de este tipo de secuencias repetitivas existen las llamadas: *número variable de repeticiones tándem* (VNTR, *Variable Number of Tandem Repeats*) las cuales no solo varían en cuanto a su secuencia, sino también en el número de repeticiones que se encuentran en el mismo sitio de un cromosoma determinado; algunas de estas VNTR ya han sido identificadas, inclusive en bacterias (Yazdankhah & Lindstedt 2008).

La electroforesis consiste en la migración de partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas biomoléculas importantes, como los aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos, poseen un grupo ionizable, y bajo la influencia de un campo eléctrico dichas partículas cargadas migran, ya sea al extremo del cátodo (+) o del ánodo (-), según sea la naturaleza de su carga neta (Wilson & Walker 2006).

La PCR es un método de síntesis de ácidos nucleicos *in vitro* mediante el cual un segmento particular de ADN puede ser replicado en forma específica, obteniendo así millones de copias de este segmento en un tiempo relativamente corto y además con una alta sensibilidad, ya que puede detectar cantidades muy bajas de ADN. Esta técnica requiere que se conozca la secuencia nucleotídica de las regiones que flanquean al gen deseado. Esto es necesario porque para que funcione la PCR es necesario disponer de oligonucleótidos *iniciadores* cortos o *primers*, complementarios de secuencias presentes en el gen o genes de interés (Madigan *et al.* 2004). El fragmento de ADN que se quiere amplificar, debe ser desnaturizado por calor, para que la doble cadena de ADN se separe y el fragmento pueda ser copiado, para ello se debe contar con los dos oligonucleótidos que van a hibridar con las hebras opuestas del fragmento a amplificar, para que así la ADN polimerasa alargue los *iniciadores* usando los fragmentos diana como moldes; después de un periodo de incubación adecuado, se somete nuevamente a calor, para volver a separar las cadenas, a medida que la temperatura va bajando, los *iniciadores* van a ir hibridando con las regiones complementarias del ADN, por lo que en cada ciclo aumenta exponencialmente la cantidad de ADN del fragmento a amplificar. Los ciclos de PCR consisten en las siguientes etapas:

1. Desnaturalización por calor del ADN bicatenario templado
2. Enfriamiento para permitir el acoplamiento de iniciadores específicos del ADN diana
3. Extensión de los *iniciadores* por una ADN polimerasa termoresistente

Los productos de la extensión de un iniciador, pueden servir de molde para el otro iniciador en el siguiente ciclo (**Figura 3**).

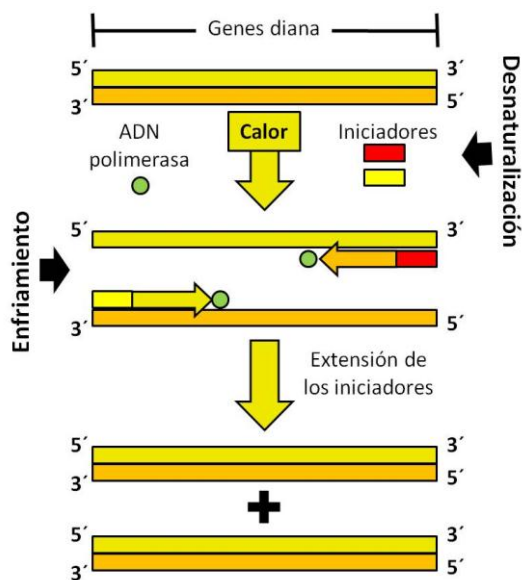


Figura 3. Ciclos de PCR.

La técnica molecular llamada RISA por sus siglas en inglés *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* o Análisis de los Espacios Intergénicos Ribosomales, pertenece al grupo de los llamados métodos “huella dactilar del ADN”, ya que es capaz de mostrar patrones de bandas representativos de estructuras genéticas correspondientes a microorganismos aislados o comunidades de microorganismos (Ranjard *et al.* 2000). Este método se basa en el polimorfismo existente en los espacios intergénicos entre las secuencias del gen ARNr de la subunidad pequeña del ribosoma procarionte (16S) y la subunidad grande del mismo (21S) (Ranjard *et al.* 2000). Esta región puede codificar ARNt y es útil para diferenciar entre cepas bacterianas y especies cercanas, debido a la heterogeneidad de las secuencias de los espacios intergénicos (Fisher & Triplett 1999).

El RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism analysis*) o Análisis de la Longitud de los Fragmentos de Restricción, es otro de los métodos de “huellas dactilares del ADN”. Se usa frecuentemente para caracterizar o diferenciar el genoma total o productos específicos de la PCR provenientes de aislados bacterianos. En general, este proceso implica extraer y purificar ADN genómico (ADN_g) de aislados bacterianos procedentes de un cultivo puro, y en algunos casos implica la amplificación por PCR de secuencias específicas. Esta técnica es a menudo usada en conjunto con la clonación, ya que dichas clonas son las que se someten al RFLP. En todos los casos, el ADN es cortado en pequeños

fragmentos por “enzimas de restricción”, que son endonucleasas que reconocen secuencias específicas de ADN, normalmente de 4-6 pb de longitud. Los fragmentos de ADN son usualmente separados por una electroforesis en gel y subsecuentemente visualizados con bromuro de etídio bajo luz UV. Las diferencias en un sitio son suficientes para diferenciar genomas o clonas (Newby *et al.* 2008).

Las enzimas de restricción o endonucleasas de restricción, hidrolizan el ADN, son altamente específicas, atacan solo ciertas secuencias, y son específicas para ADN bicatenario (Madigan *et al.* 2004). La mayoría de las enzimas realizan el corte en el esqueleto de fosfodiéster del ADN en una posición específica dentro del sitio de reconocimiento, resultando en un rompimiento del ADN. Estos sitios de reconocimiento y corte se denominan sitios de restricción (Kreuzer & Massey 2001). Existen enzimas de restricción tipo I, tipo II y tipo III; siendo las más utilizadas las primeras dos. Las de tipo I, cortan en un sitio cercano al sitio de restricción, a una distancia que varía aleatoriamente, y por ello no se suelen emplear para ADN recombinante. Las de tipo II reconocen secuencias específicas y cortan el ADN bicatenario dentro de estas secuencias. Estas exhiben una simetría binaria alrededor de un punto dado, a lo que se llama secuencia palíndroma (que tiene la misma secuencia si se lee de 5´ a 3´ o de 3´ a 5´), por ejemplo, la enzima *EcoRI* reconoce una secuencia de 6 bases y corta específicamente el sitio:



Los fragmentos de ADN a cada lado del sitio de corte se separan y, como el corte se hace escalonado, los extremos poseen secuencias complementarias de ADN. La complementariedad permite que los extremos cohesivos se unan por emparejamiento de bases. El corte de *EcoRI* produce siempre los mismos extremos cohesivos aunque las moléculas cortadas sean diferentes (Lewin 1994). Muchas enzimas de restricción están compuestas de dos subunidades polipeptídicas iguales, y cada subunidad reconoce y corta la secuencia de una de las bandas. Puesto que las secuencias reconocidas por estas enzimas son relativamente cortas, y palindrómicas, producen cortes en las dos bandas del ADN (Madigan *et al.* 2004). Mediante el análisis de los sitios de restricción en un gel de agarosa,

se pueden observar diferencias en la ubicación de los mismos, las cuales nos permiten tipificar cepas bacterianas por RFLP.

La transformación de células competentes permite la introducción de fragmentos de ADN foráneo, generalmente plásmidos, en la bacteria *Escherichia coli*. El tratamiento con iones de calcio permite obtener células competentes de *E. coli*, es decir, células más permeables capaces de captar ADN del medio. Solo un pequeño porcentaje de las células serán transformadas. Por lo tanto, las células deben ser sembradas en un medio selectivo para seleccionar las transformantes. Usualmente los plásmidos contienen un gen de resistencia a un antibiótico que permite esta selección. Existen varias cepas de *E. coli* utilizadas para la clonación, cada una con características particulares según los requerimientos.

Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de ADN. Esta absorción es una característica usada eficientemente para determinar su concentración. Cada una de las bases tiene su propio y único espectro de absorción y por lo tanto contribuye de manera diferente a la propiedad total de absorción de UV de una molécula de ADN. La determinación de la pureza del ADN se establece mediante la relación de las lecturas de las absorbancias a 260 y 280 nm. Es así como una unidad de densidad óptica (DO) a 260 nm equivale a 50 µg/mL de ADN de doble cadena, a 40 µg/mL de ARN y ADN de cadena simple y a 20µg de oligonucleótidos (Thiel *et al.* 2001). El rango de absorbancia de 260/280 nm es usado para medir la pureza del ADN. Cuando las mediciones de este rango son cercanas a 1.8 se consideran “aceptables” ya que significa que el ADN está “puro”. Si el rango es apreciablemente más bajo a lo esperado se puede suponer la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorben fuertemente cerca de 280 nm. El rango de 230/260 nm es un rango de medición secundaria que también indica la pureza del ADN. Para considerarse puro esta medición debe ser entre 0.3-0.6 si el rango es apreciablemente más bajo esto puede indicar la presencia de contaminantes co-purificados que absorben a 230 nm, como solventes o sales.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar bacterias haloalcalófilas sulfoxidantes a partir de consorcios utilizados para el biotratamiento de efluentes gaseosos los cuales fueron desarrollados en el laboratorio, provenientes de sedimentos alcalinos del ex Lago de Texcoco.

4.2 Objetivos específicos

- Aislar las bacterias de un consorcio en un medio halo alcalino.
- Realizar una caracterización de la morfología colonial de las BSOHA aisladas.
- Realizar una tipificación molecular de los aislados mediante RISA, y RFLP del gen ARNr 16S.
- Identificar molecularmente a las BSOHA, mediante secuenciación del gene ARNr 16S.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestras

Las muestras fueron obtenidas de un consorcio haloalcalófilo sulfoxidante desarrollado en el laboratorio a partir de muestras de suelos, sedimentos y aguas del ex Lago de Texcoco, el cual presenta las condiciones de pH y salinidad que requieren las BSOHA para su crecimiento.

5.2 Medio y condiciones de cultivo

5.2.1 Preparación del medio líquido

Debido a los requerimientos en cuanto a concentraciones de sales de estas bacterias haloalcalófilas se utilizó un medio mineral base (MMB) de pH 9 y concentración de NaCl de 80 mM (**Tabla 5**). Una vez preparado el MMB, este fue esterilizado en autoclave a 1 kg/cm², 120°C por 20 minutos; una vez estéril, se procedió a agregarle las soluciones estériles mencionadas en las **Tablas 6 y 7**, las cuales se prepararon previamente y se esterilizaron por filtración. Dentro de estas soluciones está incluido el Na₂S₂O₃ adicionado como única fuente de azufre para seleccionar las bacterias que puedan llevar a cabo la sulfoxidación.

Tabla 5. Composición del MMB.

Reactivo	Gramos por litro
Na ₂ CO ₃	20
NaHCO ₃	7
NaCl	4.7
K ₂ HPO ₄	1

Tabla 6. Elementos traza.

Reactivo	Miligramos por litro
EDTA	5
FeSO ₄ 7H ₂ O	2
ZnSO ₄ 7H ₂ O	100
MnCl ₂ 4H ₂ O	30
CoCl ₂ 6H ₂ O	200
NiCl ₂ 6H ₂ O	20
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	30
CuCl ₂ 2H ₂ O	10
H ₃ BO ₃	300

Tabla 7. Composición de las soluciones estériles.

Reactivo	Concentración	Volumen a agregar (ml por litro de MMB)
KNO ₃	1 M – 101 g/l	10
MgCl ₂ 6H ₂ O	1 M – 200 g/l	1
Na ₂ S ₂ O ₃ 5 H ₂ O	2 M – 496 g/l	20
Elementos traza	–	2

5.2.2 Preparación del medio sólido

A diferencia del medio líquido, anteriormente mencionado, al medio sólido se le adicionó agar noble, el cual se preparó por separado al 3% (p/v) y por otro lado el MMB, que por indicaciones del procedimiento se preparó al doble de concentración (2X). Posteriormente ambas soluciones (el MMB y el agar noble) se esterilizaron en autoclave a 1 kg/ cm², 120°C, por 20 minutos; una vez estériles se dejaron enfriar hasta alcanzar una temperatura aproximada de 50°C, cabe mencionar que las soluciones también son agregadas al doble de concentración (2X). Posteriormente se mezclaron ambas soluciones, quedando a una concentración final 1X y el medio obtenido se vació a cajas de Petri.

5.3 Aislamientos

A partir de una muestra de consorcio, se hicieron diluciones seriadas, las cuales fueron vertidas posteriormente en las cajas de Petri con medio sólido. Una vez inoculadas estas cajas se incubaron durante 7 días a 30°C. Crecidas las colonias, se seleccionaron aquellas que presentaron morfologías coloniales diferentes y que estuvieron suficientemente separadas de las demás, para posteriormente resembrarlas en una nueva caja de Petri; este procedimiento se repitió alrededor de 13 veces, hasta que se obtuvieran colonias puras.

5.3.1 Transferencia aseptica de aislados a medio líquido

A partir de las colonias puras en caja de Petri, se tomó una colonia de cada aislado, para transferirla a medio de cultivo líquido, en condiciones de asepsia. El volumen total del medio de cultivo fue de 2 mL por colonia, procurando tener una proporción de aire en los tubos de cultivo mayor a 5 con respecto al medio. Estos tubos se incubaron a 30°C, aproximadamente de 4 a 10 días, dependiendo de la cantidad de biomasa observada en cada

uno. Una vez observada suficiente cantidad de biomasa, se retransfirió en condiciones de asepsia 1 mL en 9 mL de medio, nuevamente se procuró que la proporción de aire fuera mayor a 5 en los matraces. Permanecieron 7 días a una temperatura de 30°C. A partir de este volumen se tomó la biomasa necesaria para la extracción de ADN_g y para la preservación de los aislados en glicerol.

5.3.2 Preservación de aislados en glicerol

En un criotubo de 2 mL previamente esterilizado en una autoclave, se mezclaron los reactivos indicados en la **Tabla 8**, estos también estaban estériles. Una vez agregados, se agitaron con un vórtex y se congelaron a -70°C en un ultracongelador.

Tabla 8. Reactivos para preservar bacterias.

Reactivo	Cantidad
Glicerol al 100%	300 µL
MMB (líquido)	300 µL
Cultivo	1.4 mL

5.4 Extracción de ADN_g

A partir de los cultivos puros, se extrajo ADN_g mediante el kit comercial “Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit” (Mo Bio Laboratories Inc. USA) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (ver anexos). Este kit hace una lisis celular mediante una combinación de calor, detergente y fuerza mecánica; en esta lisis el ADN liberado es anclado a una membrana de sílice para poder separarlo de todos los restos celulares y finalmente ser aislado y purificado. Se obtuvo un total de 50 µl de ADN_g el cual fue almacenado a -20°C. La cantidad y calidad de cada ADN_g extraído, se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría.

5.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El porcentaje de agarosa (p/v) en estos geles varió según el tamaño de los fragmentos visualizados y la separación deseada para estos. Para visualizar ADN_g se utilizó al 1%, para productos de PCR al 1.5%, para RISA y RFLP al 2%. La agarosa fue diluida con búfer

TBE al 0.5X (890 mM Tris, 890 mM Ácido bórico, 20 mM EDTA) y posteriormente fundida mediante calor. Cuando esta se enfrió un poco fue vertida en un molde de una cámara de electroforesis, en donde este gel de agarosa fue inmerso en TBE 0.5X. Cada carril en el gel se cargó con 5 μ L de H₂O libre de nucleasas + 2 μ L de Blue/Orange 6X loading Dye + 5 μ L de ADN total (estas cantidades pueden variar en función de la concentración de ADN de la muestra), también se incluyó un carril en donde se colocó un marcador de peso molecular, el cual varió en función del peso molecular esperado para los fragmentos a visualizar.

El voltaje utilizado para en la electroforesis también varió para cada tipo de ADN según la separación que se le dio. Para el gel de ADN_g se hizo pasar 80V durante 70 minutos en el gel, para RISA y RFLP se utilizó 90 V por 2 horas y para los demás geles se utilizó 80 V por 45 minutos.

Para revelar el gel utilizo bromuro de etídio (BrEt) (para la mayoría de los geles y SYBR Gold de Invitrogen® para el gel de ADN_g). En la tinción con BrEt este tenía una concentración de 0.5 μ g/ μ L en agua MilliQ, el gel de agarosa se colocó en esta solución por aproximadamente 20 minutos, después el gel se enjuagó en agua MilliQ por 10 minutos. La tinción con SYBR Gold fue utilizada sólo para cantidades de ADN muy bajas del orden de 25 pg para ADN de doble cadena y 1 ng para ARN. El colorante se integró en el gel de agarosa fundido, en una concentración de 1 μ L por cada 10mL de agarosa, se difuminó en el gel y se dejó solidificar para continuar con la electroforesis, este colorante es sensible a la luz por lo que se manejó en condiciones de oscuridad. Una vez teñidos los geles se observaron en un transiluminador bajo luz ultravioleta y se fotografiaron.

5.6 Cuantificación de ADN por espectrofotometría

Se utilizó el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) para determinar la concentración y pureza del ADN. Para ello se utilizó 1 μ L de H₂O MilliQ, la cual se colocaba directamente en el pedestal óptico, en donde al unirlo con el otro pedestal óptico se tenía que formar una columna, seguido de esto mediante el software ND-1000 3.7 de

Thermo Scientific, se seleccionó la medición de ADN doble cadena, seguido por la medición de esta gota de 1 µL la cual fungía como blanco; posteriormente se midieron las muestras utilizando de 1 a 2 µL, siempre y cuando se formará la columna, especificando en el software ND-1000 3.7 el nombre y origen de cada muestra.

5.7 Amplificación del gen 16S ARNr por PCR

Una vez extraído y purificado el ADN_g de cada aislado, se prosiguió a hacer una amplificación del gen 16S ARNr mediante la técnica de PCR. Para la amplificación se usaron los oligonucleótidos: Bac8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') estos oligos amplifican el gen completo del 16S ARNr de bacterias. Las condiciones de reacción para esta PCR se mencionan en el apartado de anexos, se utilizó la enzima Taq ADN polimerasa (5U/mL) con el búfer ThermoPol (New England Bio labs, NEB). Finalmente se verificó la amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa.

5.8 Purificación de fragmentos de PCR

Mediante el Kit UltraClean® PCR Clean-Up de MoBio Laboratorios, Inc. se limpiaron los productos de la PCR, siguiendo las indicaciones del fabricante (protocolo en anexos) para eliminar los oligonucleótidos utilizados, los dNTPS, y la ADN polimerasa después de la amplificación de la región ribosomal 16S. Este kit ancla los productos de la PCR para después de una serie de lavados y centrifugados, remover selectivamente todos los componentes diferentes al ADN, así este es recuperado de un filtro de sílice tras un lavado con H₂O grado biología molecular.

Para verificar la eficacia y rendimiento de la purificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa seguida de una medición por espectrofotometría.

5.9 Análisis de los espacios intergénicos ribosomales

Para el RISA, se llevó a cabo una amplificación por la PCR de esta región intergénica 16S-23S, utilizando los primers: B1055 (5'AATGGCTGTCGTCAGCTCGT 3') y 23SOR (5'TGCCAAGGCATCCACCGT 3'). La amplificación se llevó a cabo con la enzima HotStar Taq ADN polimerasa (5U/μl), las condiciones de reacción se pueden consultar en el protocolo detallado (anexos). Finalmente se verificó con una electroforesis en gel de agarosa.

5.10 Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción

Para poder hacer la reacción con cada enzima por separado, se prepararon cócteles de reacción con los reactivos mostrados en la **Tabla 9**, la cual contiene las cantidades individuales por reacción de 20 μL. Se ajustó dependiendo de la cantidad de producto obtenido de la PCR (a una concentración final de 25 ng por reacción), en los de mayor cantidad se agregaron 5 μL de ADN y 5 μL de Agua (*).

Tabla 9. Reactivos por reacción de digestión RFLP.

Reactivo	Cantidad en μL
Agua*	-
ADN*	5- 10
Buffer	2
Enzima	0.25

Una vez preparadas las reacciones, se incubaron a 37°C por 24 horas, posteriormente se analizó su contenido en un gel de agarosa. Las características de las enzimas utilizadas se presentan en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Características de las enzimas de restricción usadas en el RFLP.

Características	Enzima			
	<i>Hha</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I	<i>Hin</i> PII
Concentración	10 u/ µL	10 u/ µL	10 u/ µL	10 000 u/ mL
Sitio de corte	GCG▼C	C▼CGG	C▼CG G	G▼CG C
	C▲GCG	GGC▲C	G GC▲C	C GC▲G
Buffer	pH 7.9, 10 mM Tris-HCl, 10 Mm MgCl ₂ , 50 Mm NaCl, 1 Mm DTT	pH 7.5, 6 Mm Tris-HCl, 6 Mm MgCl ₂ , 6 Mm NaCl, 1 Mm DTT	pH 7.5, 6 Mm Tris-HCl, 6 mM MgCl ₂ , 50 Mm NaCl, 1 mM DTT	pH 7.9, 20 mM Tris-acetato, 10 mM Mg(CH ₃ COO) ² , 50 mM KCH ₃ COO, 1 mM DTT
Marca	Promega	Promega	Promega	NEB

5.11 Clonación de productos obtenidos por la PCR

Para clonar los productos de la PCR purificados del gen 16S ARNr, se utilizó el kit comercial pCR 2.1-TOPO® (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante con algunas modificaciones (anexos). La **Figura 4** muestra el mapa del vector.

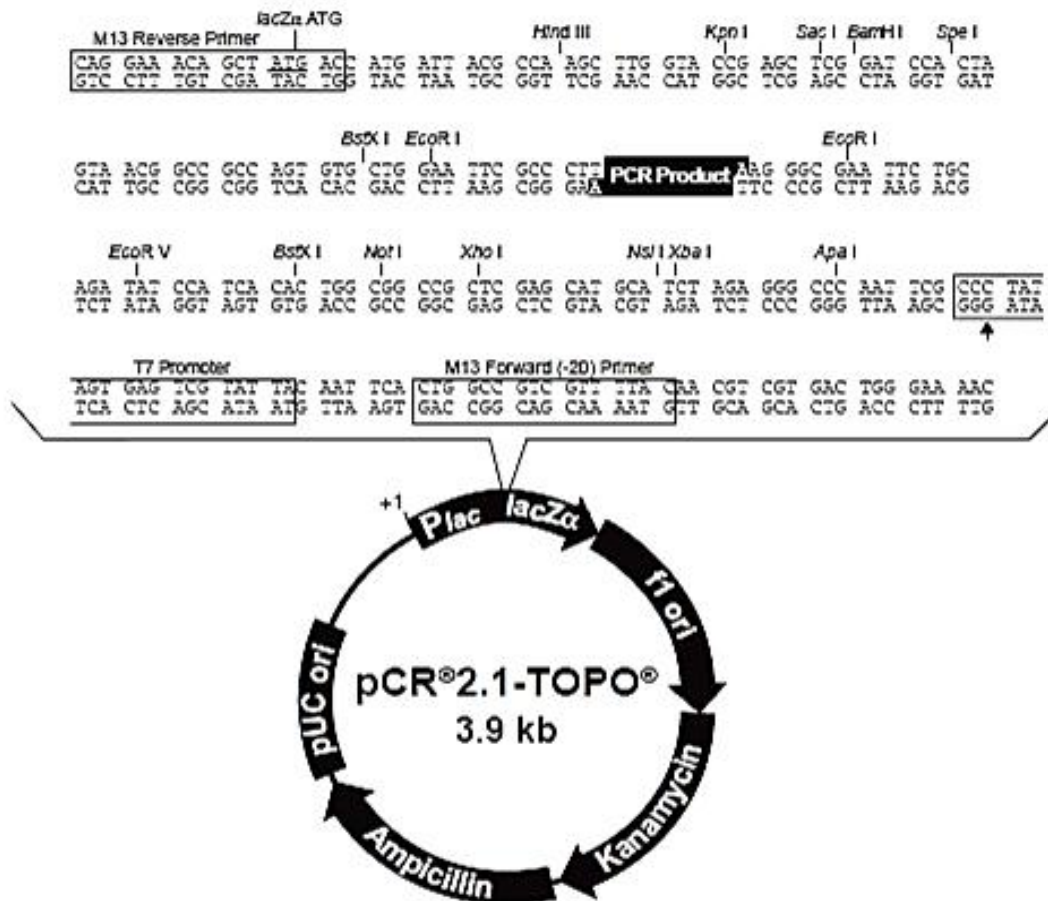


Figura 4. Mapa del vector de clonación pCR 2.1-TOPO.

Se realizó primero la reacción de ligación en presencia de la enzima topoisomerasa para posteriormente realizar la transformación de las células de *E. coli* cepa XL1 Blue tratadas con calcio. Esta posee el genotipo “recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB, lacIqZΔM15 Tn10 (**TetR**)]” el cual indica una resistencia a tetraciclina.

Posteriormente se realizó una selección de clonas positivas (colonias blancas, las más separadas y mejor formadas) a las cuales se les aislaron los plásmidos con el inserto mediante el kit “Ultra Clean® 6 minute Mini Plasmid Prep” de MoBio Laboratories, Inc. nuevamente se siguieron las indicaciones del fabricante con pequeñas modificaciones (anexos). Este kit purifica el ADN del plásmido a partir de cultivos bacterianos líquidos de las clonas seleccionadas, con una lisis alcalina el ADN queda atrapado en un filtro de sílice en el cual se realizan una serie de lavados y centrifugaciones para obtener el ADN plasmídico. La verificación de la cantidad y calidad de los plásmidos aislados se realizó mediante electroforesis en gel y espectrofotometría.

Una vez aislado el plásmido se verificó que cada uno de estos tuviera el inserto, para ello se realizó una digestión con la enzima *EcoRI* de Promega, con los reactivos mostrados en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Reacción de digestión con *EcoRI*.

Reactivo	Cantidad (μL)
Agua estéril	8.1
Buffer H de Promega	1.5
BSA (10 μg/μL)	0.15
Enzima <i>EcoRI</i> (10 u/μL)	0.25
ADN del Plásmido	5
Volumen final	15

Para esta reacción se realizó un cóctel por separado con todos los reactivos mencionados excepto los 5μL de ADN del plásmido, el cual fue colocado directamente en cada tubo de microcentrífuga de 0.5 mL en hielo. Una vez que se realizó el cóctel este se mezcló por pipeteo ligero y se colocaron 10 μL de este en cada tubo con ADN. Posteriormente se incubo a 37°C por 24 horas para su digestión. La verificación de la digestión se hizo mediante una electroforesis en gel de agarosa.

5.12 Secuenciación del gen 16S ARNr

Tras comprobar con la digestión de *EcoRI* que los plásmidos tenían el inserto, se reamplificó el gen 16S ARNr de estos. Se comparó que el fragmento correspondiera a este gen (aproximadamente 1500 pb) y se purificó esta reacción con Kit Ultra Clean® PCR Clean-Up de MoBio Laboratorios, Inc.

Los fragmentos de la PCR purificados fueron secuenciados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, utilizando el oligonucleótido Bac8f. Posteriormente, se analizó la secuencia obtenida utilizando BLAST (en inglés: *Basic Local Alignment Search Tool*), disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, mediante el cual se seleccionaron las bacterias que presentaban un mayor porcentaje de identidad con el aislado.

6 RESULTADOS

6.1 Aislamientos

La habilidad de oxidar $S_2O_3^{2-}$ está ampliamente distribuida en diversos microorganismos, principalmente BSO tanto quimiolitótrofos como quimiorganótrofos, estas últimas usan el $S_2O_3^{2-}$ como un suplemento, más no como única fuente de energía (por ejemplo algunas especies de *Pseudomonas* y *Halomonas*) (Petri *et al.* 2001). El $S_2O_3^{2-}$ es un componente reducido del azufre, estable a pH neutral y alcalino, fácilmente soluble y no es tóxico en altas concentraciones. Uno de sus átomos de azufre está en el mismo estado de oxidación que el átomo de azufre del H_2S (S^{2-}) y el otro se oxida totalmente.

El agar noble no tiene fuentes de carbono exógenas y está libre de impurezas, lo cual es esencial para el aislamiento y cultivo de BHASO ya que ha reportado que algunas bacterias organótrofas no son capaces de oxidar el $S_2O_3^{2-}$, pero puede crecer activamente en agar bacteriológico debido a la presencia de trazas que pueden ser utilizadas como componentes orgánicos (Sorokin 2003). El agar noble también fue considerado porque proporciona un medio sólido claro que permite diferenciar entre morfologías coloniales.

Del consorcio de BSOHA desarrollado en el laboratorio, se obtuvieron un total de 9 aislados, los cuales fueron separados en tres grupos para su mejor estudio. El primero pertenecía a aquellas que al crecer las colonias mostraban un color amarillo, el segundo a las que presentaban un color blanco y el tercer grupo, para aquellas que mostraban una ausencia de color, llamándolas “transparentes” (**Tabla 12**).

6.1.1 Morfología colonial de los aislados

La **Tabla 12** muestra la descripción de la morfología colonial de todos los aislados, en donde los parámetros a comparar fueron color, forma, margen y elevación colonial. Las morfologías coloniales más representativas fueron diferenciadas principalmente por el color de las colonias.

Tabla 12. Morfología colonial de aislados de BSOHA.

Nombre	Color	Forma	Margen	Elevación
4ap_org	Amarilla	puntiforme	entero	plana
5bp1_2	Blanca	circular	entero	plana
1a_2	Blanca	puntiforme	entero	plana
2aa3	Blanca	puntiforme	entero	plana
31_2	Blanca	circular	entero	elevado
81_3(b)	Blanca	circular	entero	elevado
6a_3	Blanca	circular	entero	plano
3at_1a	Transparente	circular	ondulado	plana
3at_1b	Transparente	irregular	ondulado	plana

6.2 Extracción de ADN_g

Se obtuvo el ADN_g de los 9 aislados de BSOHA, al cual se le realizó una electroforesis en gel de agarosa teñido con SYBR Gold como se describió en el apartado de Materiales y métodos (**Figura 5**).

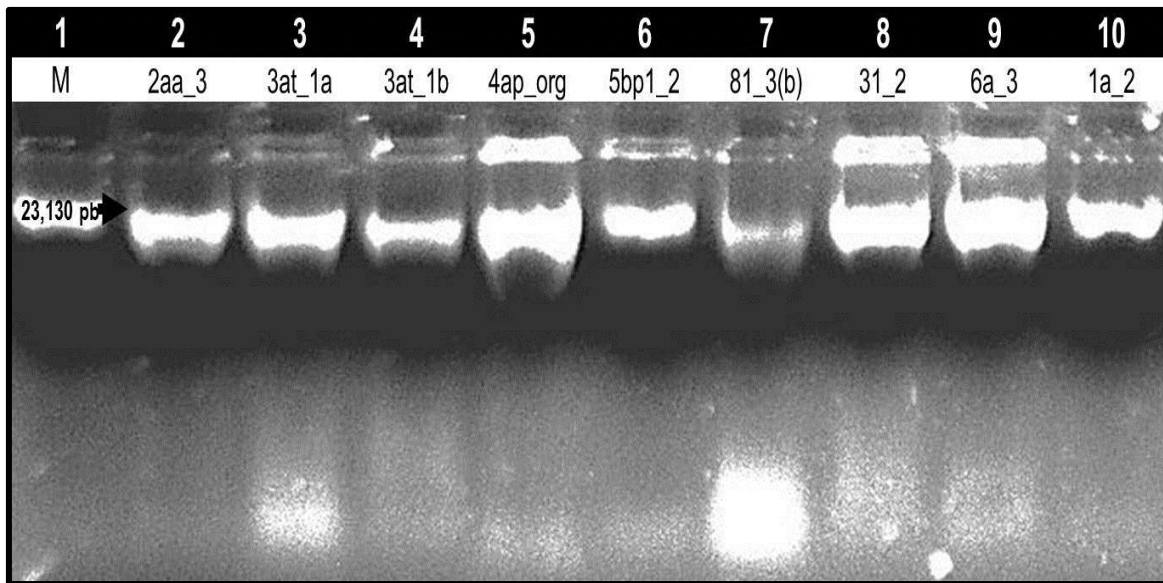


Figura 5. Análisis de ADN_g de aislados de BSOHA. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1% (p/v) y el gel fue teñido con SYBR Gold como se describe en Materiales y métodos. Se cargaron 5 µL de ADN_g y 2 µL de marcador de peso molecular. En el carril 1 se muestra el marcador (M) λ-HindIII; carril 2: 2aa_3; carril 3: 3at_1a; carril 4: 3at_1b; carril 5: 4ap_org; carril 6: 5bp_2; carril 7: 81_3 (b); carril 8: 31_2; carril 9: 6a_3; carril 10: 1a_2.

En este gel se observa que el ADN_g de los aislados es de alto peso molecular ya que su migración en el gel de agarosa es lenta. En el carril 7 correspondiente al aislado 81_3 (b) se observa una ligera degradación de la banda y menor consistencia de la misma, lo que indica que posiblemente la cantidad en ng de ADN_g obtenido de este aislado es menor y de baja calidad. Los demás bandas se ven bien con una buena calidad y cantidad de ADN.

Una vez que se verificó mediante la electroforesis la existencia de ADN_g extraído, se prosiguió a realizarlas mediciones espectrofotométricas de este para determinar la cantidad exacta de ADN_g extraído por aislado así como determinar su pureza. Los resultados se muestran en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Cuantificación de ADN_g de aislados de BSOHA y su pureza.

Nº	Nombre	ng/µL	A260	A280	260/280	260/230
1	2aa_3	11,16	0,223	0,161	1,39	0,34
2	3at_1a	11,25	0,225	0,179	1,26	0,31
3	3at_1b	34,79	0,696	0,447	1,56	0,44
4	4ap_org	12,07	0,241	0,156	1,55	0,39
5	5bp1_2	11,74	0,235	0,15	1,56	0,38
6	81_3(b)	8,55	0,171	0,118	1,45	0,78
7	31_2	13,52	0,27	0,175	1,55	0,43
8	6a_3	14,14	0,283	0,179	1,58	0,53
9	1a_2	1,88	0,038	0,03	1,23	0,98

En la **Tabla 13** se muestra que el rango de absorbancia 260/280 nm para todos los aislados se encuentra por debajo de 1.8, lo que indica que el ADN_g no se encuentra totalmente libre de proteínas, fenoles u otros contaminantes; más sin embargo las mediciones de 230/260 nm se encuentran dentro del rango 0.3-0.6 para la mayoría de los aislados (excepto para el aislado 81_3(b) y 1a_2), por lo que los que se encuentran en este rango están libres de contaminantes co-purificados como solventes y sales. En el caso del aislado 81_3 (b), las mediciones espectrofotométricas confirman que la degradación de la banda se debe a pequeñas impurezas, en el caso del aislado 1a_2 las mediciones se salen del rango esperado notablemente, pero esto se puede deber a que la concentración de ADN_g obtenida para este es muy baja, pero suficiente (como en todos los demás ADN obtenidos) para realizar una amplificación por la PCR.

6.3 Obtención del gen 16S ARNr de los aislados

6.3.1 Amplificación por la PCR

Para las reacciones de la PCR se calculó que hubiera 25 ng de ADN por cada reacción de PCR de 25 μ L con la finalidad de optimizar y homogenizar las reacciones de PCR. Se utilizaron primers que permiten la amplificación de este gen entre las bases 8 y 1,492, obteniéndose el gen prácticamente completo con un tamaño aproximado de 1,500 pbs para el producto de la PCR. La **Figura 6** muestra los amplicones obtenidos para cada aislado, el tamaño observado en el gel corresponde al tamaño esperado. Las bandas en el gel se ven uniformes ya que la concentración de ADN_g usado para las amplificaciones fue la misma.

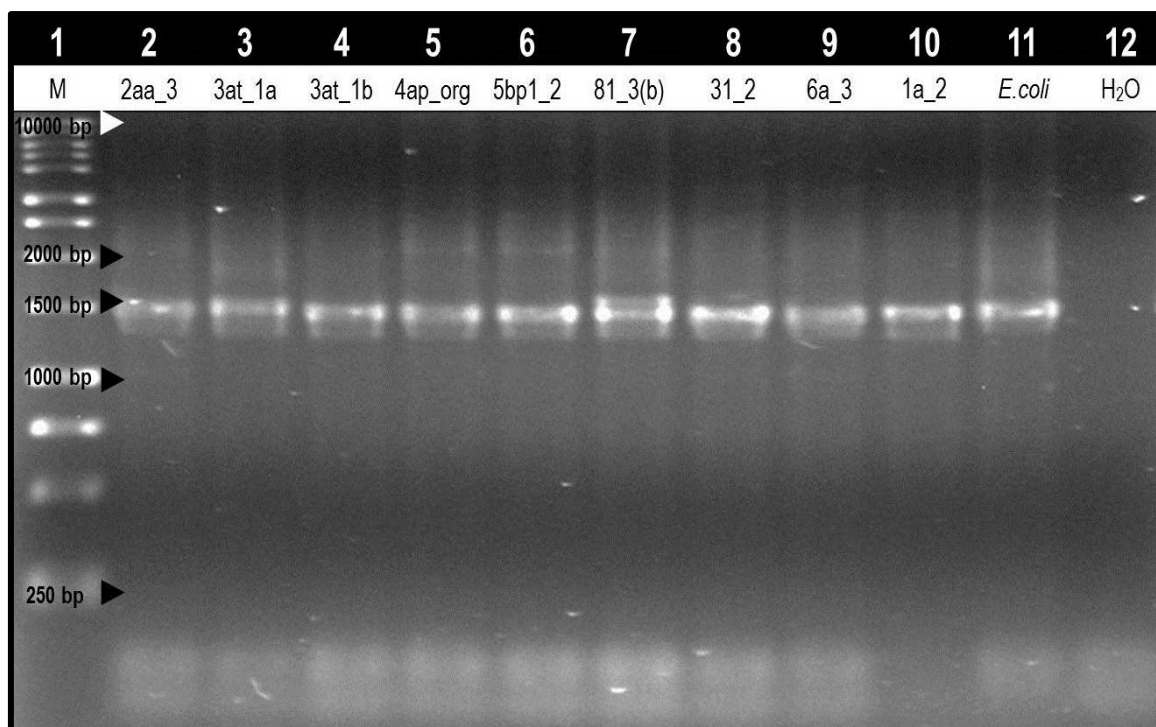


Figura 6. Análisis de productos de PCR del gen 16S ARNr de aislados de BSOHA. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) y el gel fue teñido con BrEt como se describe en el apartado de Materiales y métodos. Se cargaron 5 μ L de los productos después de la reacción de PCR y 2 μ L de marcador de peso molecular. En el carril 1 se muestra el marcador (M)1kb; carril 2: 2aa_3; carril 3: 3at_1a; carril 4: 3at_1b; carril 5: 4ap_org; carril 6: 5bp_2; carril 7: 81_3 (b); carril 8:31_2; carril 9: 6a_3; carril 10: 1a_2; carril 11: control + con *E. coli*; carril 12: control – con H₂O.

6.3.2 Clonación de los productos de la PCR

Antes de clonar el producto de la PCR, fue necesario limpiarlo para quitar los componentes de la reacción de la PCR. Esto se hizo mediante el uso de un kit como se describe en Materiales y métodos. La **Figura 7** muestra los productos de la PCR purificados. En este gel se observa que la concentración de muestra es muy similar en todas las bandas y en la parte superior a las bandas se ve una ligera degradación en todas las muestras, lo cual puede reflejar impurezas por proteínas (enzimas DNAsas).

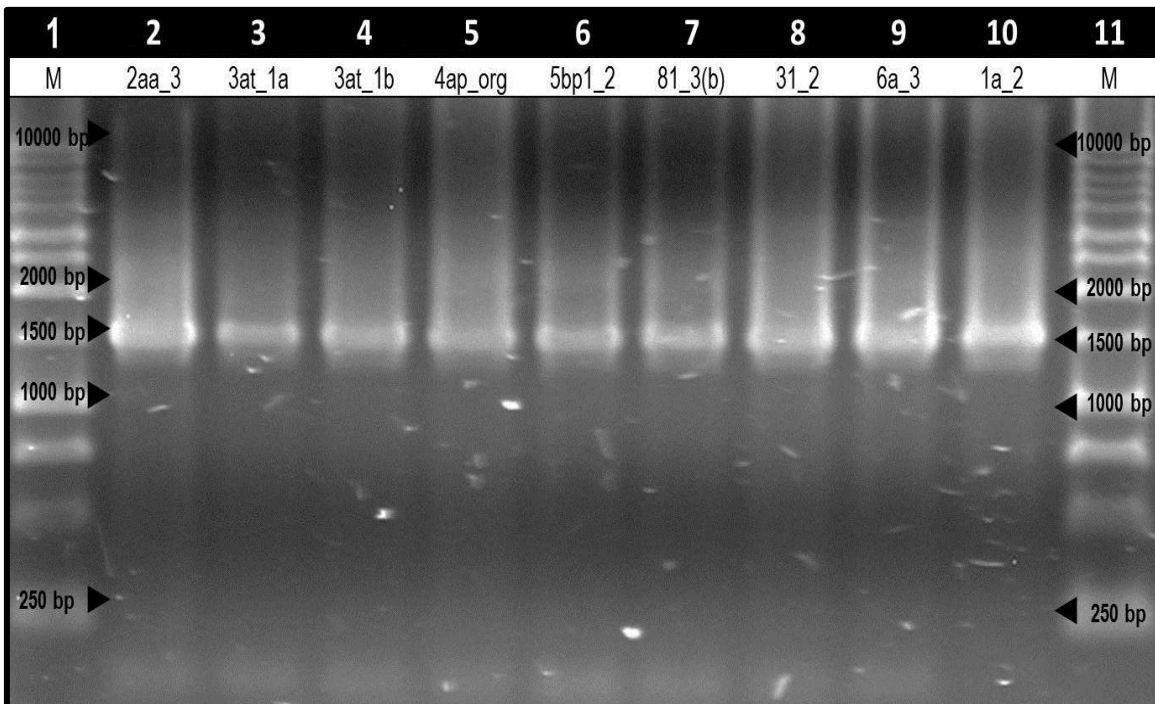


Figura 7. Análisis de la purificación de los fragmentos del gen 16S ARNr de aislados de BSOHA. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) y el gel fue teñido con BrEt como se describe en el apartado de Materiales y métodos. Se cargaron 5 μ L de los productos de PCR purificados y 2 μ L de marcador de peso molecular. El carril 1 y 11 muestran el marcador (M) 1kb; carril 2: 2aa_3; carril 3: 3at_1a; carril 4: 3at_1b; carril 5: 4ap_org; carril 6: 5bp_2; carril 7: 81_3 (b); carril 8: 31_2; carril 9: 6a_3 y carril 10: 1a_2.

La **Tabla 14** muestra las concentraciones de los fragmentos purificados así como su pureza, la concentración en la mayoría es de alrededor de 20 ng/ μ L con una pureza aceptable en las muestras: 2aa_3, 6a_3, 1a_2 (según las mediciones de 260/280 nm), en las demás muestras las mediciones de pureza son ligeramente menores al rango esperado, lo cual confirma la presencia de un pequeño porcentaje de impurezas, muy probablemente por proteínas. A pesar de que las mediciones en 260/280 nm no son las óptimas en todas las muestras estas pueden ser utilizadas para la clonación.

Tabla 14. Cuantificación y pureza de los fragmentos del gen 16S ARNr purificados de aislados de BSOHA.

N°	Nombre	ng/ μ l	A260	A280	260/280
1	2aa_3	22,68	0,454	0,239	1,89
2	3at_1a	12,17	0,243	0,164	1,49
3	3at_1b	20,6	0,412	0,265	1,56
4	4ap_org	20,32	0,406	0,241	1,69
5	5bp1_2	19,93	0,399	0,247	1,61
6	81_3(b)	17,67	0,353	0,245	1,44
7	31_2	20,35	0,407	0,242	1,68
8	6a_3	22,23	0,445	0,254	1,75
9	1a_2	15,29	0,306	0,175	1,75

Para realizar la reacción de clonación en el plásmido comercial pCR-2.1 TOPO fue necesario hacer los cálculos correspondientes para que en cada reacción se tuvieran 3 mol de producto por cada mole de vector, realizando una dilución de la concentración de ADN en las reacciones de PCR del gen 16S ARNr. La **Tabla 15** muestra las cantidades de muestra diluida usada en la reacción de clonación para tener una relación molar inserto/vector de 3/1.

Tabla 15. Dilución de productos de la PCR a clonar.

N°	Nombre	ng/ μ l	Dilución 1:10 (ng)	Vol. Final a agregar (μ L)
1	2aa_3	22,68	2,27	0,51
2	3at_1a	12,17	1,22	0,94
3	3at_1b	20,6	2,06	0,56
4	4ap_org	20,32	2,03	0,56
5	5bp1_2	19,93	1,99	0,58
6	81_3(b)	17,67	1,77	0,65
7	31_2	20,35	2,03	0,57
8	6a_3	22,23	2,22	0,52
9	1a_2	15,29	1,53	0,75

La clonación fue exitosa, el control negativo no presentó crecimiento de células en el medio selectivo con antibióticos (ampicilina y tetraciclina), lo que indicó que las células competentes y el medio utilizado no estaban contaminados con alguna cepa resistente. Las clonas positivas que pudieron haber ligado el inserto, se mostraron como colonias blancas, diferenciándose de las clonas sin inserto, las cuales eran de color azul. El número de colonias blancas en todas las cajas fue de alrededor de 30 (en todos los casos mayor al número de colonias azules), de estas se seleccionaron las colonias blancas más separadas y mejor formadas, que posterior a la resiembra de las mismas se verificó que la morfología de fuera la misma (permanecieran blancas).

La comprobación de que el inserto fue ligado al plásmido se realizó primeramente mediante la purificación y digestión de los plásmidos con la enzima *EcoRI*. Como se mostró en el mapa del vector de clonación (**Figura 4**), el plásmido utilizado tiene dos sitios de reconocimiento para la enzima *EcoRI* los cuales flanquean el producto de la PCR insertado, por lo que se espera que en el análisis de digestión con esta enzima se encuentren bandas con un peso aproximado a 3.9 Kb para el vector sin inserto; y para el vector con inserto se esperan 2 o más bandas (la o las correspondientes al vector y la o las del inserto) que en total sumen aproximadamente 5.5 Kb, lo cual corresponde al vector (3.9 kb) mas el inserto (1.5 kb).

Se analizaron 3 colonias por cada aislado. La **Figura 8** muestra los resultados de las digestiones con *EcoRI* de los plásmidos purificados. Este gel muestra que para la mayoría de los carriles hay 3 bandas y que estas cumplen con el peso estimado del vector con el inserto. La primer banda que se observa en estos carriles a aproximadamente 4,000 pb corresponde al vector y las 2 bandas muy juntas que se encuentran entre 1,000 y 750 pb corresponden al gen 16S ARNr insertado. El carril 8, correspondiente a la clona “1” del aislado 4ap_org, presenta sólo dos bandas, la del vector (a 4,000 pb) y otra a 1,500 pb, lo cual si bien corresponde al peso esperado (5,500 pb) para clonas con inserto, es diferente a las otras dos clonas de este mismo inserto, por lo que la clona 1 de la muestra 4ap_org fue usada para secuenciar.

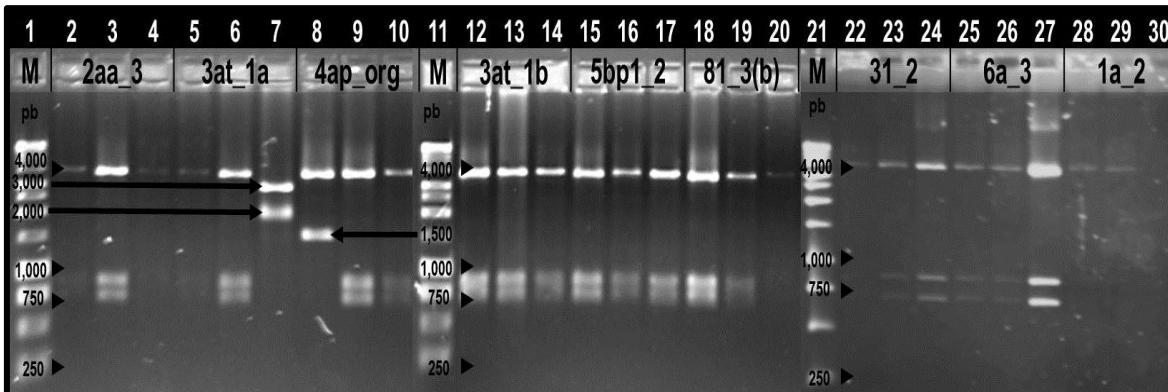


Figura 8. Análisis de la digestión con *EcoRI* de los plásmidos aislados. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) y el gel fue teñido con BrEt como se describe en el apartado de Materiales y métodos. Se cargaron 5 μ L de los productos de PCR purificados y 2 μ L de marcador de peso molecular. En los carriles 1, 11 y 21 se muestra el marcador (M)1kb; los carriles 2-4 corresponden a clonas provenientes del aislado 2aa_3; en los carriles 5-7: 3at_1a; carriles8-10: 4ap_org; carriles12-14: 3at_1b; carriles 15-17: 5bp_2; carriles18-20: 81_3 (b); carriles 22-24: 31_2; carriles 25-27: 6a_3 y carriles 28-30: 1a_2.

La migración de un plásmido en un gel de agarosa puede no reflejar exactamente el peso en bp que se estima, ya que como este gel no es desnaturizante el nivel de súperenrollamiento del ADN puede mostrar otros pesos sobre todo cuando la digestión es incompleta como se muestra en el carril 7 correspondiente a la clona “3” del aislado 3at_1a. En base a los perfiles mostrados en el análisis con la enzima *EcoRI*, así como en las mediciones espectrofotométricas de los plásmidos aislados, se eligió una clona por aislado, a excepción del 4ap_org en donde se eligieron dos clonas. Las clonas elegidas para secuenciar y tipificar por RFLP se muestran en gris en la **Tabla 16**. La selección de clonas se basó principalmente en la concentración y pureza de estas, siempre y cuando la mejor candidata (más concentrada y con una medición de 260/280 nm cercana a 1.8-2.0) tuviera un buen perfil en el gel de agarosa del análisis con *EcoRI* que las bandas correspondieran a lo esperado para vector con inserto y la nitidez y brillo de estas fuera bueno.

Tabla 16. Cuantificación y pureza de los plásmidos purificados.

Plásmido/clona	ng/ μ L	A260	A280	260/280
2aa_3/1	22,8	0,456	0,26	1,76
2aa_3/2	19,64	0,393	0,222	1,77
2aa_3/3	18,25	0,365	0,204	1,79
3at_1a/1	15,94	0,319	0,195	1,64
3at_1a/2	23,53	0,471	0,281	1,68
3at_1a/3	41,76	0,835	0,47	1,78
3at_1b/1	43,13	0,863	0,487	1,77
3at_1b/2	39,4	0,788	0,471	1,67
3at_1b/3	18,36	0,367	0,208	1,77
4ap_org/1	41,36	0,827	0,454	1,82
4ap_org/2	34,82	0,696	0,396	1,76
4ap_org/3	17,8	0,356	0,214	1,66
5bp1_2/1	43,44	0,869	0,528	1,65
5bp1_2/2	22,68	0,454	0,283	1,6
5bp1_2/3	26,88	0,538	0,341	1,57
81_3(b)/1	53,89	1,078	0,644	1,67
81_3(b)/2	23,62	0,472	0,297	1,59
81_3(b)/3	17,29	0,346	0,218	1,59
31_2/1	30,23	0,605	0,322	1,88
31_2/2	59,32	1,186	0,576	2,06
31_2/3	35,42	0,708	0,389	1,82
6a_3/1	19,51	0,390	0,197	1,98
6a_3/2	22,42	0,448	0,231	1,94
6a_3/3	72,63	1,453	0,776	1,87
1a_2/1	29,66	0,593	0,331	1,79
1a_2/2	31,77	0,635	0,360	1,76
1a_2/3	16,70	0,334	0,163	2,05

Para mandar a secuenciar se necesitaban al menos 500 ng de ADN plasmídico en 10 μ L, y debido a que las cantidades de plásmido obtenidas fueron bajas (la mayoría no alcanzaba los 50 ng/ μ L) se decidió hacer una re-amplificación del gen 16S ARNr con los *primers* Bac8f y 1492r, escogiendo para ello una clona de cada aislado, a excepción de la muestra 4ap_org, en donde se escogieron 2 clonas debido a que la clona 2 tuvo una digestión con la enzima *EcoRI*, diferente a las clonas 1 y 3 del mismo aislado. La **Figura 9** muestra los productos de la PCR obtenidos. Estas reacciones de la PCR permitieron verificar que hubiera inserto también ya que la reacción con un plásmido sin inserto extraído de una colonia azul no da ninguna banda con estos primers debido a que codifican por secuencias que no están dentro del vector pCR2.1TOPO (**Figura 9**, carriles 8 y 15).

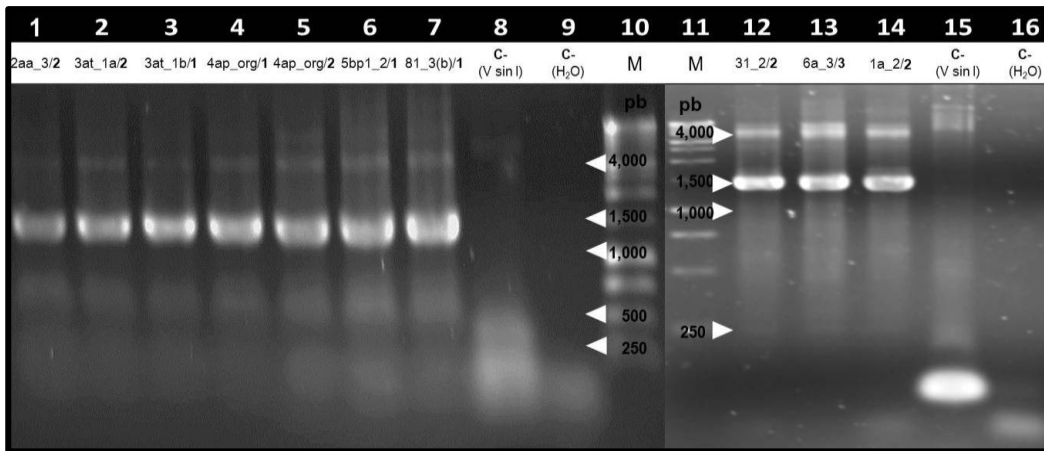


Figura 9. Análisis de la amplificación del gen 16S ARNr en plásmidos purificados, con los oligos Bac8f y 1492r. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) y el gel fue teñido con BrEt como se describe en el apartado de Materiales y métodos. Se cargaron 5 μ L de los productos después de la reacción de PCR y 2 μ L de marcador de peso molecular. En el carril 1 se muestra la amplificación correspondiente a la muestra 2aa_3 clona2; carril 2: 3at_1a clona 2; carril 3: 3at_1b clona 1; carril 4: 4ap_org clona 1; carril 5: 4ap_org clona 2; carril 6: 5bp_2 clona 1; carril 7: 81_3 (b) clona 1; los carriles 8 y 15 muestran el control – correspondiente a una colonia azul (vector sin inserto); los carriles 9 y 16 son controles negativos de la reacción de PCR (reacción con H₂O en lugar de ADN); carriles 10 y 11: marcador 1kb ; carril 12: 31_2 clona 2; carril 13: 6a_3 clona 3 y carril 14 : 1a_2 clona 2.

Otro control que se realizó para comprobar la presencia de los insertos (gen 16S ARNr de cada aislado) fue realizando reacciones de PCR con los primers M13 Forward y M13 Reverse provistos en el kit de clonación. La **Figura 10** muestra los fragmentos obtenidos por la PCR, los cuales son un poco superiores a 1,500 pares de bases. M13 Reverse está a 90 pb antes del inserto y M13 Forward se encuentra a 112 pb, lo cual se aprecia en el mapa del vector (**Figura 4**), por lo que se espera que la ubicación de los fragmentos con el inserto amplifiquen una región de aproximadamente a 1,700 pb (1,500 pb del inserto y 202 de la región adicional amplificada por los primers de M13). La **Figura 10** muestra la amplificación por PCR con los primers M13 del plásmido purificado. En este gel se confirma nuevamente que el inserto fue clonado en el vector en todas las muestras pertenecientes a clonas positivas (carriles 2-8 y 12-14), la banda perteneciente a esta se observa por encima de la línea de 1,500 pb del marcador, lo cual le da una aproximación a 1,700 pb que es lo esperado para un plásmido con el inserto. Los carriles 9 y 16 correspondientes a un control negativo del inserto (usando una colonia azul) en la que la amplificación sólo dio fragmentos de bajo peso molecular, se observan por debajo de la marca de 250 pb del marcador lo cual corresponde con lo esperado (región de 202 pb comprendida entre los primers de M13).

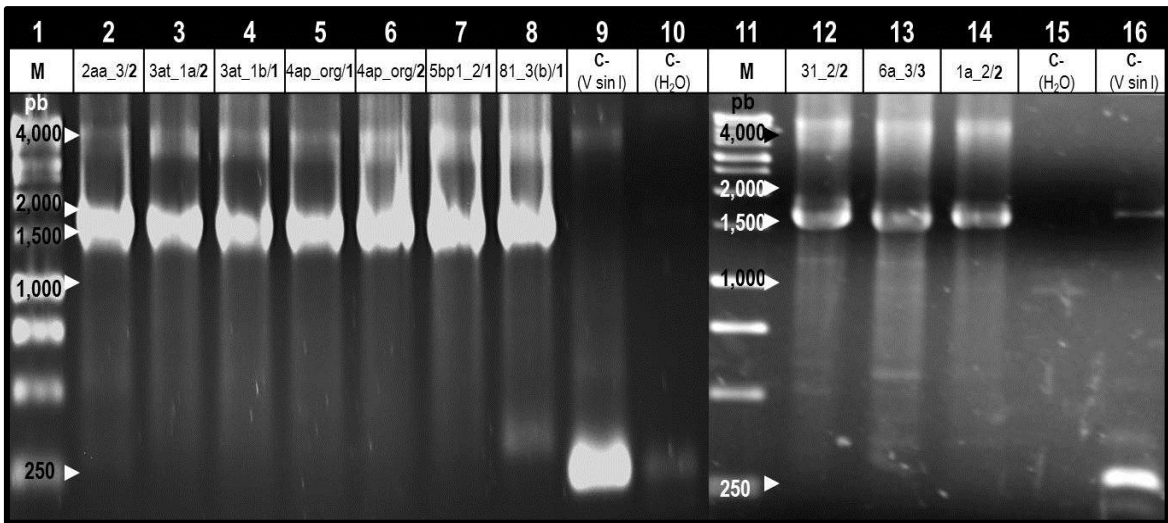


Figura 10. Análisis de la amplificación del gen 16S ARNr con los oligos M13F y M13R en plásmidos purificados. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) y el gel fue teñido con BrEt como se describe en el apartado de Materiales y métodos. Se cargaron 5 μ L de los productos después de la reacción de PCR y 2 μ L de marcador de peso molecular. En los carriles 1 y 11 está el marcador de peso molecular (M) 1kb; en el carril 2 la amplificación correspondiente a la muestra 2aa_3 clona 2; carril 3: 3at_1a clona 2; carril 4: 3at_1b clona 1; carril 5: 4ap_org clona 1; carril 6: 4ap_org clona 2; carril 7: 5bp_2 clona 1; carril 8: 81_3 (b) clona 1; los carriles 9 y 16 muestran el control – del inserto; los carriles 10 y 15 son controles negativos de la reacción de PCR (reacción con H₂O en lugar de ADN); carril 12: 31_2 clona 2; carril 13: 6a_3 clona 3 y carril 14: 1a_2 clona 2.

Posterior a la amplificación con los primers M13 F y M13 R se hizo una limpieza de estos fragmentos con el kit “Ultra Clean® PCR Clean-Up” de MoBio como se describió en el apartado Material y métodos. Se realizaron 2 reacciones de 25 μ L extras con 10 ng de templado para acumular una cantidad suficiente de producto de la PCR a los cuales se les realizó la limpieza, disolviendo en H₂O grado Biología molecular. En la **Figura 11** se muestra el gel obtenido, en el cual se observa solamente la banda correspondiente a la región amplificada, que es nítida y con una intensidad uniforme en todas las muestras amplificadas. En los carriles 2 a 8 se observa que por debajo de la banda hay una “sombra” lo cual puede deberse a la presencia de ARN o simplemente un error en la corrida de electroforesis, lo cual puede confirmarse con las mediciones espectrofotométricas.

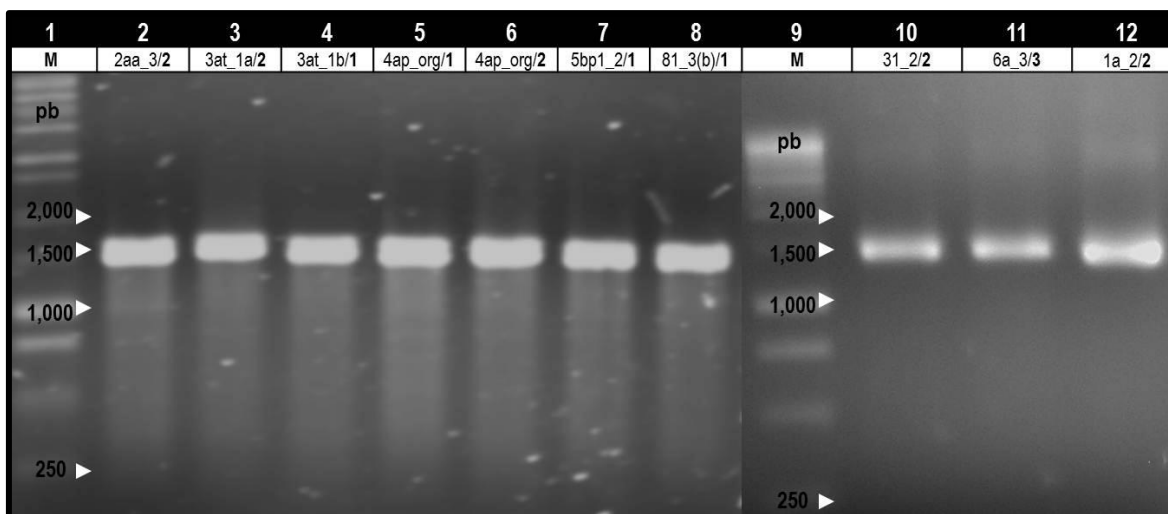


Figura 11. Análisis de los fragmentos purificados correspondientes al gen 16S ARNr amplificado con el oligo Bac8f y 1492r. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) y el gel fue teñido con BrEt como se describe en el apartado de Materiales y métodos. Se cargaron 5 μ L de los productos después de la reacción de PCR y 2 μ L de marcador de peso molecular. En los carriles 1 y 9 está el marcador de peso molecular (M)1kb; en el carril 2 la purificación correspondiente a la muestra 2aa_3 clona2; carril 3: 3at_1^a clona 2; carril 4: 3at_1b clona 1; carril 5: 4ap_org clona 1; carril 6: 4ap_org clona 2; carril 7: 5bp_2 clona 1; carril 8: 81_3 (b) clona 1; carril 10: 31_2 clona2; carril 11: 6a_3 clona 3 y carril 12: 1a_2 clona 2.

Se realizó una medición espectrofotométrica con el fin de evaluar la concentración y pureza de este ADN como se muestra en la **Tabla 17**. Las concentraciones de ADN obtenidas son de alrededor de 50 ng/ μ L y todas las muestras reflejan un grado de pureza ideal, el cual está marcado por mediciones entre 1.8 y 2.0 a 260/280 nm. Estos productos de la PCR fueron los que se utilizaron para secuenciar y para realizar pruebas de RFLP como se describe a continuación.

Tabla 17. Cuantificación y pureza de fragmentos purificados de la re-amplificación del gen 16S en plásmidos.

Aislados	ng/ μ L	A260	A280	260/280
2aa_3/2	52,77	1,055	0,583	1,81
3at_1a/2	61,04	1,221	0,67	1,82
3at_1b/1	66,8	1,336	0,734	1,82
4ap_org/1	54,79	1,096	0,588	1,86
4ap_org/2	53,31	1,066	0,561	1,9
5bp1_2/1	51,48	1,03	0,544	1,89
81_3 (b)/1	51,99	1,04	0,555	1,87
31_2/2	43,25	0,865	0,471	1,84
6a3/3	48,79	0,976	0,560	1,74
1a2/2	53,19	1,064	0,566	1,88

6.4 Tipificación molecular por métodos de “huella dactilar del ADN”

6.4.1 Análisis de los espacios intergénicos ribosomales

Como la **Figura 12** muestra, las bandas se encuentran un poco degradadas, lo cual se puede deber a que los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR-RISA se encontraban un poco degradados, ya que el control positivo con *E. coli* también presenta este aspecto. Aun así es posible observar diferentes filotipos, como se marca en la figura con numeración romana, hay 7 filotipos diferentes en las 9 muestras analizadas, siendo la mayoría diferentes a excepción de los aislados 2aa_3 y 1a_2 que muestran el filotipo I, y los aislados 4ap_org y 5bp1_2 con filotipo IV, los cuales se ven similares. La agrupación de las muestras no parece tener relación con los grupos morfológicos en el caso de los aislados pertenecientes al filotipo IV no presentan una morfología colonial parecida ya que el aislado 4ap_org es de color amarillo mientras que el aislado 5bp_2 es de color blanco, pero para los aislados que se encuentran en el filotipo I la morfología colonial de ambos es muy similar, siendo ambos de colonias blancas, puntiformes, enteras y planas.

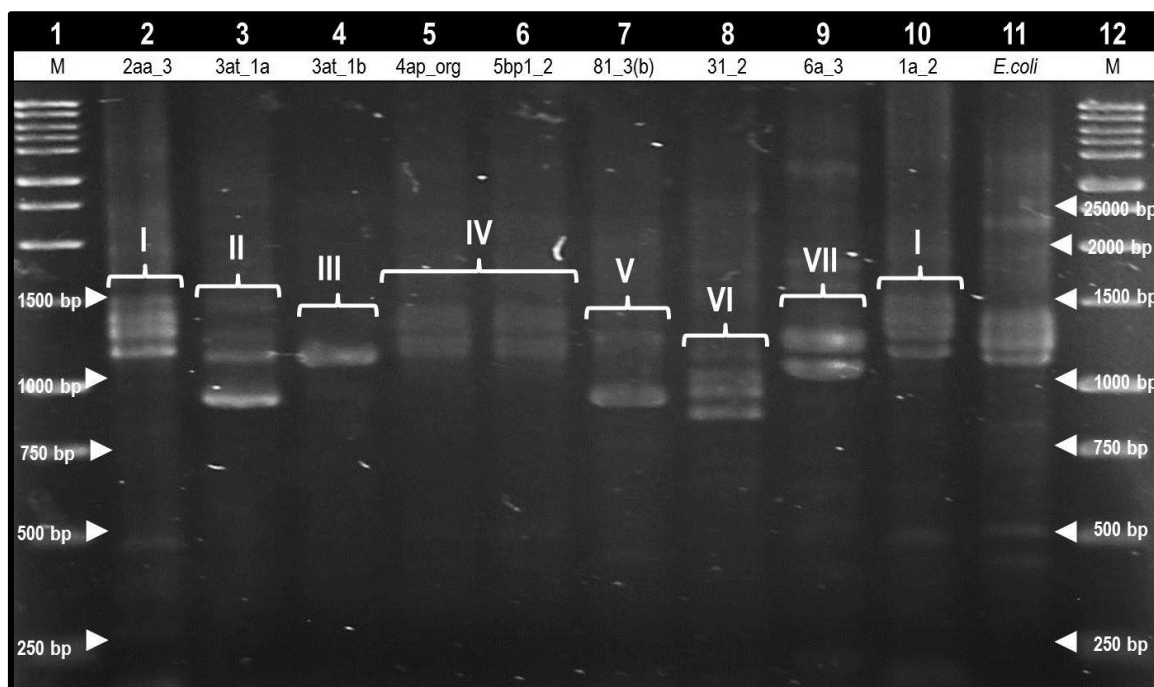


Figura 12. Tipificación molecular correspondiente al análisis por RISA de aislados de BSOHA. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 2% (p/v) y el gel fue teñido con BrEt como se describe en Materiales y métodos. Se cargaron 5 μ L de ADNg y 2 μ L de marcador de peso molecular. En los carriles 1 y 12 se muestra el marcador (M) 1kb; carril 2: 2aa_3; carril 3: 3at_1a; carril 4: 3at_1b; carril 5: 4ap_org; carril 6: 5bp_2; carril 7: 81_3 (b); carril 8:31_2; carril 9: 6a_3; carril 10: 1a_2 y en el carril 11 se muestra un control positivo de la reacción, utilizando ADNg de *E. coli*. La numeración romana marca los filotipos.

6.4.2 Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción

En la primera tipificación del gen 16S ARNr con la enzima *HhaI* mostrada en la **Figura 13**, se aprecian claramente 3 filotipos, siendo el filotipo I el que más integrantes tiene con los aislados 2aa_3/2, 4ap_org/1, 4ap_org/2, 5bp_2/1, 81_3(b)/1, 31_2/2, 6a_3/3 y 1a_2/2. Los filotipos II y III tienen como miembros únicos a los aislados 3at_1a/2 y 3at_1b/1 respectivamente.

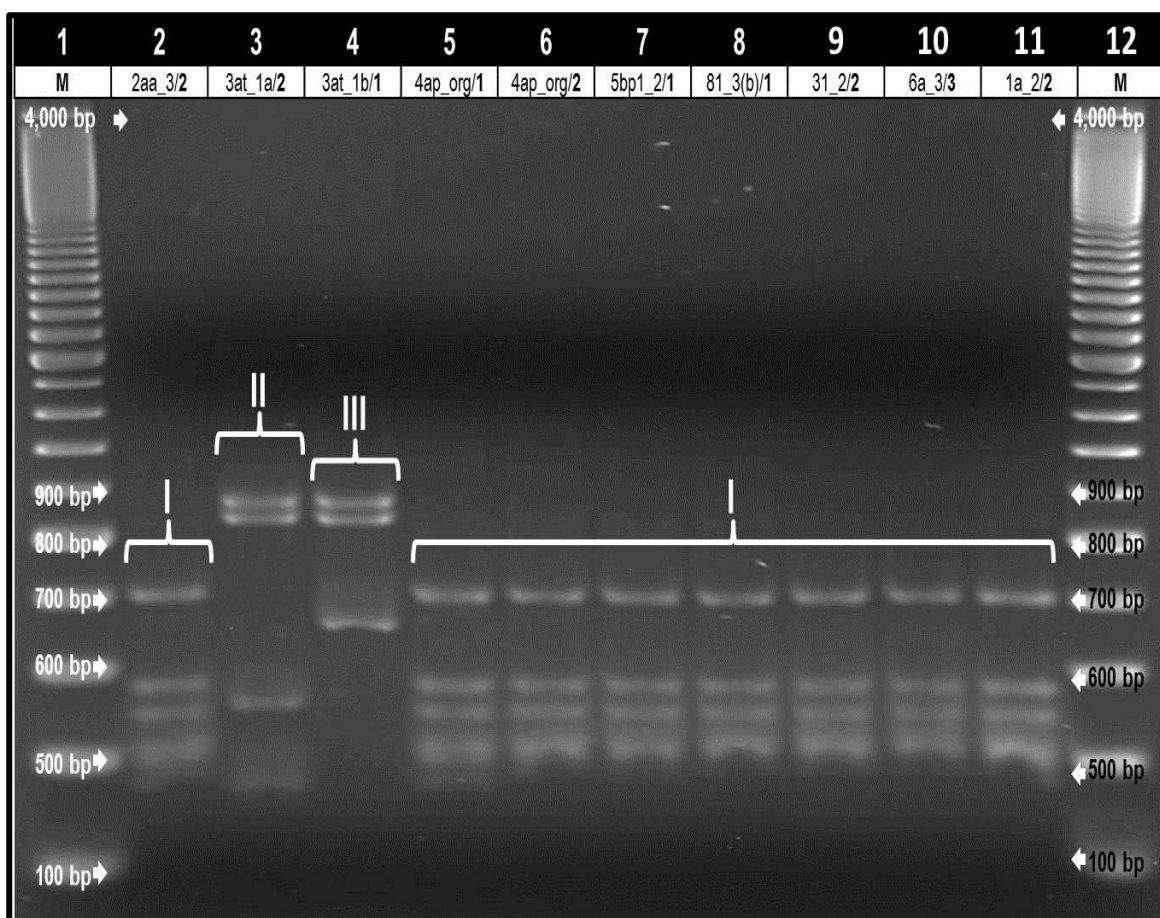


Figura 13. Análisis por RFLP del gen 16S ARNr de aislados de BSOHA con la enzima *HhaI*. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 2% (p/v) y el gel fue teñido con BrEt como se describe en el apartado de Materiales y métodos. Se cargaron 5 μ L de los productos después de la reacción de PCR y 2 μ L de marcador de peso molecular. En los carriles 1y 12 está el marcador de peso molecular (M) 100 bp; en el carril 2 la muestra 2aa_3 clona 2; carril 3: 3at_1a clona 2; carril 4: 3at_1b clona 1; carril 5: 4ap_org clona 1; carril 6: 4ap_org clona 2; carril 7: 5bp_2 clona 1; carril 8: 81_3 (b) clona 1; carril 9: 31_2 clona 2; carril 10: 6a_3 clona 3 y carril 11: 1a_2 clona 2. La numeración romana marca los filotipos

La **Figura 14** corresponde a la digestión del gen 16S ARNr con la enzima *Hpa*II. Se muestran 4 filotipos, en donde el filotipo I está integrado por el aislado 2aa_3/2. El filotipo II es el que más integrantes presenta, encontrándose a los aislados 3at_1a/2, 81_3 (b)/1, 31_2/2 y 6a_3/3. En el filotipo III están los aislados 3at_1b/1 y 1a_2/2. Por último el filotipo IV cuenta con los aislados 4ap_org/1, 4ap_org/2 y 5bp_2/1.

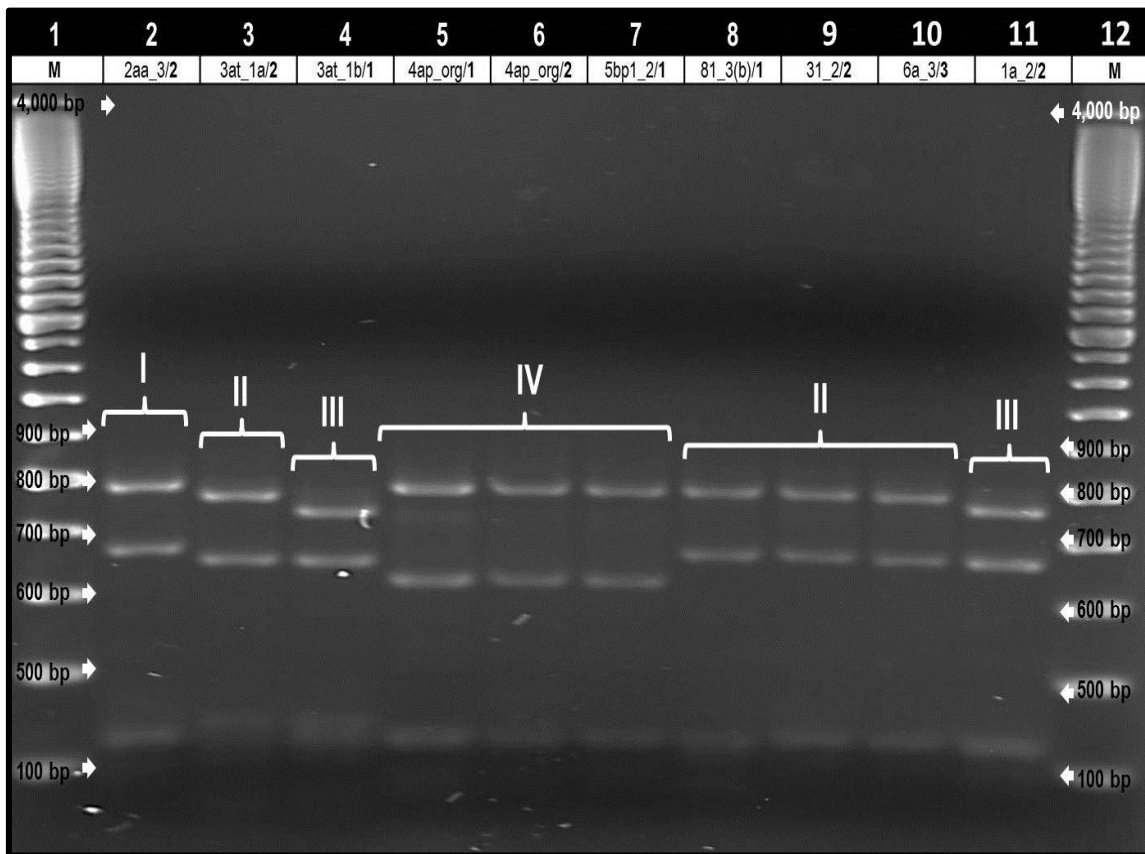


Figura 14. Análisis por RFLP del gen 16S ARNr de aislados de BSOHA con la enzimas *Hpa*II. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 2% (p/v) y el gel fue teñido con BrEt como se describe en el apartado de Materiales y métodos. Se cargaron 5 μ L de los productos después de la reacción de PCR y 2 μ L de marcador de peso molecular. En los carriles 1 y 12 está el marcador de peso molecular (M) 100 bp; en el carril 2 la muestra 2aa_3 clona 2; carril 3: 3at_1^a clona 2; carril 4: 3at_1b clona 1; carril 5: 4ap_org clona 1; carril 6: 4ap_org clona 2; carril 7: 5bp_2 clona 1; carril 8: 81_3 (b) clona 1; carril 9: 31_2 clona 2; carril 10: 6a_3 clona 3 y carril 11: 1a_2 clona 2. La numeración romana marca los filotipos.

La última tipificación por RFLP se realizó con la digestión del gen 16S ARNr con las enzimas *MspI* y *HinpII* (combinadas en la misma reacción de digestión), esta tipificación se muestra en la **Figura 15**, en donde se aprecian 5 filotipos. El filotipo IV es el que más integrantes tiene, encontrándose aquí los aislados 4ap_org/1, 4ap_org/2, 5bp_2/1 y 81_3 (b)/1. En el filotipo V están los aislados 31_2/2, 6a_3/3 y 1a_2/2. Finalmente los filotipos I, II y III tienen sólo un integrante, siendo los aislados 2aa_3/2, 3at_1a/2 y 3at_1b/1, respectivamente los integrantes de estos filotipos.

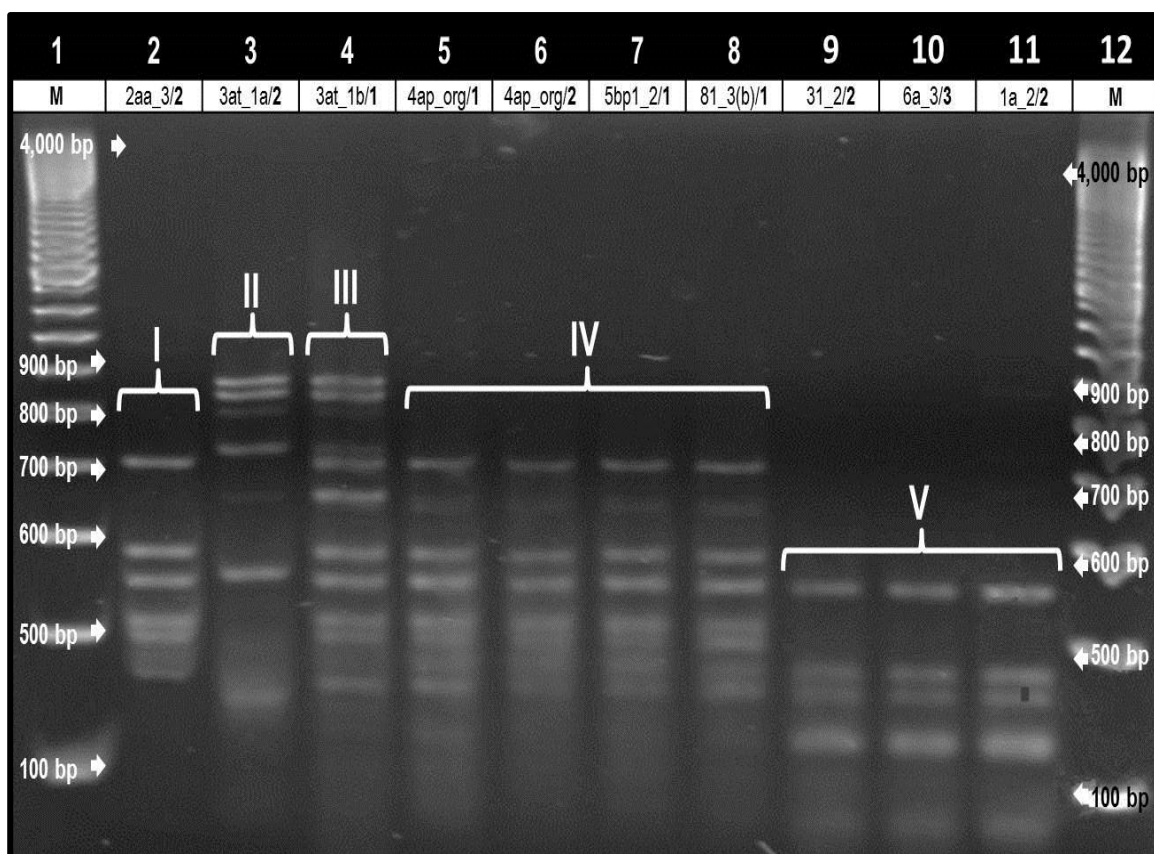


Figura 15. Análisis por RFLP del gen 16S ARNr de aislados de BSOHA con las enzimas *MspI* + *HinpII*. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 2% (p/v) y el gel fue teñido con BrEt como se describe en el apartado de Materiales y métodos. Se cargaron 5 μ L de los productos después de la reacción de PCR y 2 μ L de marcador de peso molecular. En los carriles 1 y 12 está el marcador de peso molecular (M) 100 bp; en el carril 2 la muestra 2aa_3 clona 2; carril 3: 3at_1a clona 2; carril 4: 3at_1b clona 1; carril 5: 4ap_org clona 1; carril 6: 4ap_org clona 2; carril 7: 5bp_2 clona 1; carril 8: 81_3 (b) clona 1; carril 9: 31_2 clona 2; carril 10: 6a_3 clona 3 y carril 11: 1a_2 clona 2. La numeración romana marca los filotipos.

Los análisis por RFLP de las clonas revelaron que hay dos grupos de muestras que presentan el mismo perfil molecular en todas las digestiones. En el primer grupo se encuentran las muestras 4ap_org/1, 4ap_org/2 y 5bp_2/1. En el segundo grupo las muestras 6a_3/3 y 31_2/2. Con respecto a la muestra “4ap_org” se esperaba encontrar diferencias en los perfiles moleculares de las dos clonas seleccionadas de esta muestra, debido a que en el análisis de los plásmidos digeridos con *EcoRI* presentó diferentes perfiles en ambas clonas, pero los análisis de huella genómica no revelaron diferencia alguna entre estas.

Todas las tipificaciones moleculares por “huella dactilar del ADN” demuestran que hay diferencias en los perfiles de los aislados 2aa_3, 3at_1a y 3at_1b; lo cual resulta peculiar ya que las dos últimas son similares morfológicamente (ambas pertenecen al grupo llamado “transparentes”), pero los perfiles moleculares dicen lo contrario. También para todas las tipificaciones se encontró que los aislados 4ap_org y 5bp_2 tienen el mismo filotipo (IV en todos), pero estos aislados tienen una morfología colonial diferente (la primera es de colonias amarillas y la segunda blancas).

6.5 Análisis de las secuencias del gen 16S ARNr

Las secuencias obtenidas del gen 16S ARNr fueron analizadas mediante el software BioEdit en donde tras observar los electroferogramas se decidió que la calidad de las secuencias no era la óptima, ya que los picos no eran altos y agudos en toda la secuencia. En todas las secuencias los picos decaían al final y no eran muy claros en al menos las primeras 10 bases, por lo que se decidió analizar cada secuencia por separado, descartando los primeros y últimos nucleótidos que en el electroferograma no se veían claros, después se fueron descartaron nucleótidos de la parte final de la secuencia y analizando en BLAST esta selección, hasta elegir el fragmento más largo posible de nucleótidos, el cuál presentara el porcentaje más alto de identidad y mayor *Score* siempre y cuando el *E. value* fuera de 0.0. El fragmento elegido para cada secuencia se muestra subrayado en gris en todas las secuencias, esto se puede ver en el apartado de anexos.

Una vez seleccionada la longitud de la secuencia a analizar, esta fue exportada en formato FASTA e introducida al programa informático de alineamiento de secuencias “BLAST” eligiendo la base de datos de nucleótidos y excluyendo a las secuencias de muestras ambientales no cultivadas. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 17**. Los parámetros mostrados en la tabla son explicados a continuación:

- *Score*. Indica el grado de similitud entre la secuencia problema y la secuencia analizada. Está en función del tipo y posición de las diferencias, así como de la longitud del fragmento analizado.
- *E. value*. Describe el número de éxitos que se pueden esperar. Entre más cercano a 0 sea este valor, la secuencia encontrada será más significativa.
- *Query Coverage*. Es el porcentaje de la longitud de las consultas que se incluyen en los segmentos alineados.

Tabla 18. Análisis BLAST de secuencias del gen 16S ARNr.

Nombre del aislado	Score	Query Coverage	E. value	% de identidad	Bacteria más cercana
2aa_3/2	743	97	0.0	99	<i>Halomonas</i> sp. LBB1
3at_1a/2	1013	97	0.0	98	<i>Methylostratum kenyense</i> AMT3
3at_1b/1	1808	97	0.0	97	<i>Methylostratum kenyense</i> AMT3
4ap_org/1	1893	100	0.0	99	<i>Halomonas</i> sp. 5a22
4ap_org/2	1740	99	0.0	99	<i>Halomonas desiderata</i> FB2
5bp1_2/1	1857	100	0.0	99	<i>Halomonas</i> sp. 5a22
81_3 (b)/1	697	99	0.0	98	<i>Halomonas</i> sp. SB136-2
31_2/2	1917	99	0.0	99	<i>Halomonas</i> sp. KM-1
6a_3/3	732	98	0.0	100	<i>Halomonas</i> sp. LBB1
1a_2/2	1821	99	0.0	99	<i>Halomonas</i> sp. KM-1

A continuación se describen las principales características de las bacterias más cercanas reportadas para los alineamientos de los aislados de BHASO:

- *Halomonas* sp. LBB1 fue aislada de muestras de agua del Lago Bogoria en Kenia, el cual es un lago alcalino-sódico. El reporte de Vargas *et al.* (2004) menciona que las colonias de estas bacterias son de color blanco, forma rizada y margen filamentosos, Gram-negativas con una temperatura óptima de crecimiento a 37°C, con un pH óptimo de 10. Puede crecer a concentraciones de 2.5 a 10% de Na⁺ y a un 10% (p/v) de NaCl.
- *Methylohalobium kenyense* AMT3 fue reportada por Sorokin (2007). Aislada de sedimentos de un lago alcalino-sódico en la estepa de Kulunda en Rusia. Es una bacteria haloalcalófila metilotrófica Gram-negativa con células cocoides. Utiliza metanol, formato o metanoato, etanol y acetato como fuente de energía y carbono. Con metanol crece a un pH 8.3-10.5 (el pH óptimo es de 10). Es extremadamente halo-tolerante ya que puede crecer a concentraciones de Na⁺ de 0.3 a 4 M con una óptima de 0.5-1.0 M. Tiene un contenido de 62-62.9 mol% de G+C en su ADN.
- *Halomonas* sp. KM-1 aislada de suelo en el área de Ikeda en Japón. Esta bacteria crece a temperaturas de 20 a 45°C y a pH de 6.5-10. Fue reportada por Kawata & Aiba (2010). El autor describe que este aislado produce el bioplástico poly(3hydroxybutyrate) a partir de residuos de glicerol derivados de biodiesel como fuente de carbono.
- *Halomonas desiderata* FB2. Se aisló de una planta de tratamiento de aguas residuales del municipio de Göttingen, en Alemania. Es una bacteria Gram negativa desnitrificante que crece a un pH óptimo entre 9 y 10, puede usarse en la degradación de nitrocelulosa (Berendes 1996).
- *Halomonas* sp. 5a22 aislada de un biorreactor que degrada oxalato. Fue reportada por McSweeney (2010), pero la referencia dada en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> está sin publicar aún, por lo que no es posible describir más características de esta cepa.
- *Halomonas* sp. SB136-2 aislada de una salina solar en Grecia. Fue referenciada pero no publicada en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

6.5.1 Construcción de árbol filogenético

Posterior al análisis de la calidad de secuencias (el fragmento seleccionado) se hizo un árbol filogenético empleando el software MEGA 4.0.2 (Tamura *et al.* 2007). Primero se realizó un alineamiento mediante el ClustalW de las secuencias de nucleótidos provenientes de la región ribosomal 16S ARNr de los aislados de BHASO.

En la **Figura 16** se muestra el árbol filogenético propuesto para los aislados de BHASO. En este árbol se observa que los aislados 4ap_org clona 1 y 5bp_2 están relacionados con *Halomonas* sp. 5A22; el aislado 4ap_org clona 2 está más relacionado con *Halomonas desiderata* cepa FB2, pero estas 5 bacterias mencionadas pertenecen a la misma rama junto con *Halomonas* sp. LBB. El aislado 1a_2 es muy parecido al aislado 31_2, pero ambos tienen parentesco con *Halomonas* sp. KM-1, siendo el último aislado mencionado el más cercano a esta cepa referenciada. Los aislados 2aa_3 y 6a_3 son muy parecidos entre sí. El aislado 81_3 (b) está en la misma rama que *Halomonas* SB136-2 por lo que están muy relacionados. Posteriormente se encuentra *Halomonas elongata* DSM 2581, considerada como cepa tipo de *Halomonas* ya que actualmente se tiene secuencia del genoma completo de esta, en el filograma no se observa que esta cepa tipo tenga una relación muy directa (en la misma rama) con algún aislado, pero aun así no se puede descartar el parentesco con todas las bacterias anteriormente mencionadas. En otro nodo aparte, sin ninguna relación directa con los aislados, se encuentra otra cepa tipo para BHASO *Thioalkalivibrio jannaschii*. El siguiente nodo marca la bifurcación de todas las bacterias mencionadas anteriormente, aquí se encuentran los aislados 3at_1a y 3at_1b, los cuales están muy relacionados entre sí y tienen parentesco con *Methylostratum kenyense* cepa AMT 3. Otra cepa tipo para BHASO *Thioalkalimicrobium* sp. ALE 3, se encuentra en un nodo aparte muy alejado del nodo de *Halomonas* y ligeramente cercano al nodo de las metilotróficas. Por último se encuentra *Escherichia coli* cepa O157:H7 la cual es tomada como grupo externo en este filograma.

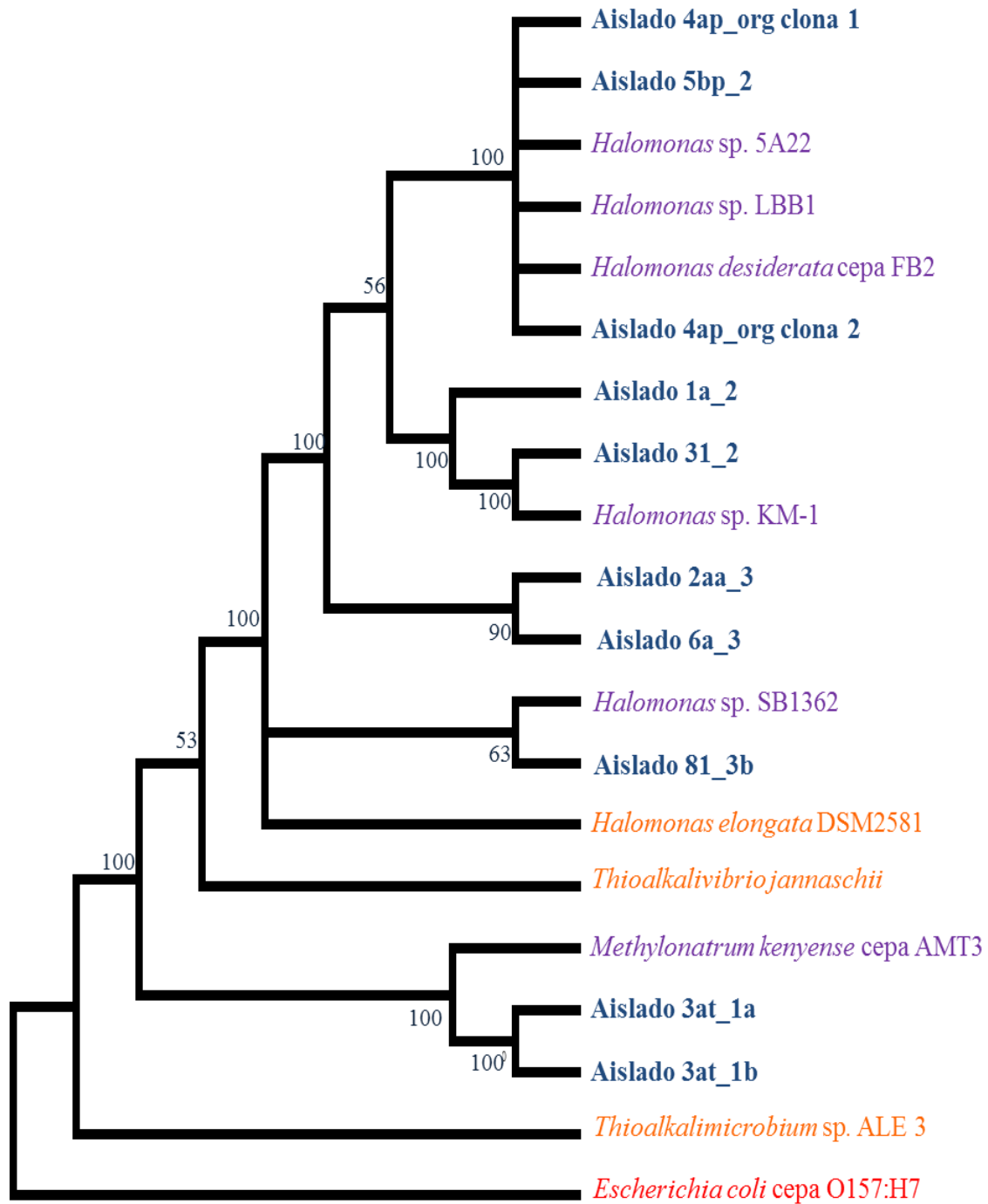


Figura 16. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S ARNr de aislados de BHASO. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Máxima Parsimonia (Eck & Dayhoff 1966). Este árbol fue elegido como el más parsimonioso de 65 árboles inferidos. Se utilizó el algoritmo del Vecino Más Cercano (Nei & Kumar 2000). En color azul se muestran los aislados de BHASO, en morado y con cursivas se señala la bacteria más cercana a alguno de los aislados, en naranja se muestran algunas cepas tipo de BSO, por último en rojo el grupo externo.

7 DISCUSIÓN

La tipificación molecular por métodos de “huella dactilar del ADN” ayudaron a separar en grupos o filotipos a los aislados, mostrando las diferencias a nivel nucleotídico de estos, lo cual al ser comparado también con la morfología colonial indicó grupos bien diferenciados que coincidían o discernían entre sí, viéndose esto reflejado en el árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S ARNr. Tal es el caso del grupo formado por los aislados 4ap_org y 5bp_2, en el que ambos poseen perfiles iguales en todas las tipificaciones, indicando un parecido a nivel molecular entre ellos que fue confirmado en el árbol filogenético aunque morfológicamente eran diferentes, ya que el primero era de colonias amarillas y el segundo de colonias blancas. Sin embargo, la tipificación molecular no fue igualmente indicativa para otros aislados como el 2aa_3, 3at_1a y 3at_1b que mostraban filotipos diferentes en todas las tipificaciones, indicando que podrían pertenecer a grupos muy separados, lo cual fue desmentido parcialmente en el árbol filogenético ya que si bien existe una distancia considerable entre 2aa_3 con respecto a 3at_1a y 3at_1b, entre estas últimas el parentesco es muy notorio, encontrándose incluso en la misma rama del árbol filogenético, pero en este caso la morfología colonial sí marcó las diferencias mostradas en el árbol ya que 2aa_3 era de colonias blancas mientras que 3at_1a y 3at_1b de colonias transparentes.

A partir del análisis de las secuencias del gen 16S ARNr se muestra que este gen no tienen un buen alcance ya que sólo sirvió para identificar el género y en algunos casos la especie, por lo que el gen 16S ARNr no es un buen marcador para tipificar cepas aisladas.

El género *Halomonas* se reportó por Sorokin (2003) como ampliamente distribuido, con representantes heterótrofas haloalcalófilas con capacidad de oxidar compuestos azufrados en diferentes hábitats salinos (sedimentos marinos y hábitat alcalino-sódicos). El autor las describe como bacterias Gram-negativas con diferentes mecanismos de sulfoxidación capaces de oxidar $S_2O_3^{2-}$ de manera incompleta a tetratiónato en cultivos halo-alcalinos (pH 10, 0.6-4 M total de Na^+) con $S_2O_3^{2-}$ y acetato. También reportó que algunas especies desnitrificantes de *Halomonas* son capaces de oxidar anaeróticamente el $S_2O_3^{2-}$ a sulfuro usando óxidos de nitrógeno como aceptor de electrones.

Actualmente se cuenta con la secuencia del genoma completo de *Halomonas elongata* DSM 2581 (Schwibbert *et al.* 2010), en donde se encuentran genes asociados a la oxidación de compuestos azufrados. Tal es el caso de los genes *sseA*, *rhda*, *glpE* y *thtR* que codifican para la enzima tiosulfato transferasa que utiliza $S_2O_3^{2-}$ y cianato para producir sulfito y tiocianato; así como el gen *dsrF* codificante para la proteína sulfito reductasa desasimilatoria relacionada con la oxidación del azufre almacenado en glóbulos intracelulares; genes como *soxA*, *soxB*, *soxG*, *soxD* también fueron encontrados en este genoma, los cuales se relacionan con la oxidación de $S_2O_3^{2-}$ a SO_4^{2-} , mediante una ruta metabólica en la cual la oxidación del azufre almacenado en los glóbulos procedería vía la participación de las enzimas *dsr* para liberar H_2S , SO_3^{2-} y finalmente SO_4^{2-} (Espinosa *et al.* 2010). El gen *cysE* de la familia de genes *sat* codificantes para serina O-acetiltransferasa también fue encontrado, lo cual es muy interesante ya que esta enzima participa en la ruta metabólica de asimilación de sulfato en bacterias. Otro aspecto interesante a considerar en el genoma de *H. elongata* es la presencia de reguladores y genes relacionados con la enzima RuBisCO (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa), esta enzima es una de las dos únicas enzimas en la ruta metabólica Calvin-Benson-Bassham el cual es usado por todas las plantas, cianobacterias y muchas bacterias autótrofas para la fijación de dióxido de carbono (CO_2), la enzima RuBisCO cataliza la reacción de fijación de CO_2 . Al considerar a *Halomonas elongata* DSM 2581 como cepa tipo para el género *Halomonas* se tiene la premisa de que algunos de estos genes relacionados con la oxidación de compuestos azufrados y con la fijación de CO_2 puedan estar presentes en los aislados de BHASO, siendo los responsables de que estos se hayan desarrollado en un medio haloalcalófilo con $S_2O_3^{2-}$ como única fuente de energía y CO_2 como única fuente de carbono, por lo que en el futuro se puede buscar amplificar estos genes en los aislados y realizar pruebas fisiológicas para la degradación de compuestos azufrados.

El género *Halomonas* posee una ecología interesante además de un gran potencial biotecnológico, por lo que mediante una breve revisión, se dan a conocer a continuación algunas características generales de cepas pertenecientes a este género que han sido reportadas recientemente.

Halomonas stenophila fue aislada de suelos salinos, crece a concentraciones de NaCl en un intervalo de 3% a 15% (p/v) a temperaturas de 15°C a 37°C y en un intervalo de pH de 6 a 8. Es una bacteria quimiorganótrofa que produce exopolisacáridos sulfatados con actividad biológica los cuales inhiben el crecimiento de virus y la proliferación de células tumorales en leucemia (Llamas *et al.* 2010).

Halomonas sp. 19-A y Y2 aisladas de aguas residuales provenientes de plantas de celulosa (específicamente una parte llamada licor negro de la paja de trigo) con un pH alto y una carga importante de contaminación. Estas cepas son capaces de usar el carbazol como fuente de carbono y nitrógeno a pH 9.5 en presencia de NaCl, producen hidrolasas las cuales son enzimas con potencial para aplicaciones en las industrias alimenticia y química, pero también para la biorremediación ya que son capaces de degradar celulosa, hemicelulosa y componentes orgánicos como vanillina, guaiacol, dibenzofurano, bifenilo, carbazol y fluoreno (Yang *et al.* 2010).

Halomonas boliviensis DSM 15516 (Van-Thuor *et al.* 2010) al igual que *Halomonas elongata* DSM 2581 (Schwibbert *et al.* 2010) producen un compuesto llamado ectionina, la cual tiene un papel fundamental en la adaptación celular a los ambientes halófilos, protege a las células del calor, desecación y congelamiento; esta acción protectora tiene un alto potencial en campos relacionados con la biología molecular, agricultura, procesamiento de comida, biotecnología, farmacia, medicina y puede ser utilizada como estabilizador de enzimas y como protector celular en aplicaciones del cuidado de la piel y la salud.

Halomonas boliviensis tiene la habilidad de sintetizar ectionina y poly(3-hidroxi butirato) en el mismo proceso. Este último compuesto es un bioplástico que también se reportó es producido por *Halomonas* sp. KM-1 (Kawata & Aiba 2010) cepa que presentó un 99% de homología con los aislado 31_2 y 1a_2.

Halomonas titanicae es una bacteria heterótrofa y aeróbica. Fue aislada de muestras de “rusticles” (es el nombre dado a formaciones que aparentan estalactitas pero que está creadas por la corrosión de metal en la profundidades marinas) colectadas del sitio de

nafragio del Titanic. Esta cepa crece a 30-37°C, pH 7-7.5, en presencia de 2-8% de NaCl (Sánchez-Porro *et al.* 2010).

Halomonas sp. cepa C2SS100 degrada eficientemente hidrocarburos bajo condiciones salinas en aguas de producción en un yacimiento petrolero en Túnez. Fue aislada en cultivos enriquecidos con petróleo crudo con 100 gL (-1) de NaCl a 37°C. Productos refinados del petróleo como combustible diesel y aceite lubricante fueron utilizados como única fuente de carbono, y fueron degradadas eficientemente por el aislado, el cual también es capaz de degradar hexadecano (C16). El potencial de biodegradación de esta cepa puede ser aplicado en la biorremediación de aguas contaminadas con hidrocarburos en sitios con altos niveles de salinidad (Mnif *et al.* 2009).

A partir de *Halomonas* sp. LOB-5 se aislaron un conjunto de sideróforos. Esta cepa es una bacteria marina heterótrofa que oxida Mn(II). Fue aislada de la superficie parcialmente degradada de basaltos marinos asociados a hidrotermales en un Rift al oeste de Hawái. Tiene una relevancia ambiental y amplia distribución, por lo que puede ser un buen modelo de investigación en el ciclo de los metales en el fondo marino. Los sideróforos aislados pueden ser utilizados potencialmente en la oxidación de Mn (II) y Fe (III). La caracterización de los sideróforos producidos por esta bacteria es un tema de interés debido al papel potencial que estos pueden desempeñar en el control de las tasas y los mecanismos de oxidación de metales complejos (Homann *et al.* 2009).

Halomonas maura es un claro ejemplo de la versatilidad metabólica de este género, con un interés biotecnológico y ecológico. Crece a concentraciones de 0.5 a 2.5 M de NaCl en ambientes hipersalinos donde se enfrenta a factores que hacen difícil la supervivencia como sequía, fuerte radiación solar, altas temperaturas y a veces pH extremos. Juega un papel importante en el ciclo del nitrógeno, es capaz de tener respiración anaerobia en presencia de nitrato y ha sido identificada recientemente como una bacteria diazotrófica (fijadora de nitrógeno). Esta bacteria produce un exopolisacárido llamado mauran que contribuye a la formación de biopelículas y proporciona una ventaja a las bacterias en la colonización de estos nichos salinos. El mauran es un eficiente estabilizador y emulsionante de aceites

vegetales, hidrocarburos y en especial petróleo; aumenta la viscosidad de la emulsión, lo cual es de interés para la industria cosmética; también puede capturar metales pesados y ejerce un efecto inmunomodulador en la medicina (Llamas *et al.* 2006).

Halomonas organivorans es moderadamente halófila, fue aislada de suelos salinos de una isla en Huelva, España y crece a concentraciones de 10% (p/v) de NaCl a 37°C. Tiene la capacidad de crecer en fenol o ácido p-cumarico utilizándolos como única fuente de energía, siendo así capaz de degradar un amplio rango de compuestos orgánicos aromáticos y puede ser usada para descontaminar hábitat salinos (García *et al.* 2004).

8 CONCLUSIONES

Se logró aislar colonias de bacterias en un medio de cultivo haloalcalófilo con $S_2O_3^{2-}$ como fuente de energía. Mediante la caracterización morfológica se visualizaron diferencias entre las colonias, pero la mayoría eran colonias blancas. El análisis de los filotipos encontrados en las técnicas de “la huella génica del ADN”, mostró diferencias notables entre los aislados, siendo el análisis de RISA el que reveló más. La secuenciación parcial del gen 16S ARNr amplificado en las clonas dejó ver que la mayoría de los aislados pertenecían al género *Halomonas* entrando aquí todas las colonias blancas y la amarilla, y los aislados con colonias transparentes tuvieron un mayor porcentaje de homología con *Methylostratum kenyense*. La revisión en la literatura de las bacterias más cercanas reveló que ambos géneros están asociados a ambientes alcalino-sódicos y que el potencial biotecnológico de estos es muy amplio.

9 PERSPECTIVAS

Para mejorar la identificación molecular es preciso secuenciar la totalidad del gen 16S ARNr con diferentes oligonucleótidos en ambas direcciones para así poder obtener una mayor calidad en las secuencias y una mejor certeza de las mismas en diferentes fragmentos. Tras comprobarse esto será necesario hacer una hibridación con la cepa reportada más cercana para comprobar si efectivamente se trata de ella o es una diferente. Los resultados de similitud entre secuencias no descartan la posibilidad de encontrar nuevas especies o cepas.

Se deberá realizar una caracterización bioquímica y fisiológica de los aislados para comprobar su actividad sulfoxidante (en compuestos azufrados orgánicos e inorgánicos) y autotrofia. Además se deberán realizar diferentes pruebas para investigar su potencial biotecnológico, producción de bioplásticos, compuestos bioactivos, sideróforos, enzimas hidrolasas haloalcalófilas u otros.

Se deberá hacer un seguimiento individual por cepa para mejorar las condiciones de cultivo y con ello poder aplicarlas a los biofiltros para el tratamiento de gases azufrados o cualquier otro tipo de aplicación biotecnológica.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Acinas G., Antón J. & Rodríguez-Valera F. (1999). Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 514-522.
2. Baird C. (2001). Química ambiental. 2da edición. Reverté. Barcelona, España.
3. Berendes F., Gottschalk G., Heine-Dobbernack E., Moore E. & Tindall B. (1996). *Halomonas desiderata* sp. nov., a new alkaliphilic, halotolerant and denitrifying bacterium isolated from a municipal sewage works. *Systematic and Applied Microbiology*, **19**: 158–167.
4. Brenner D., Krieg N. & Staley J. (2006). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer-Verlag. Nueva York, Estados Unidos.
5. Brüser T., Lens P. & Trüper H. (2000). *The biological sulfur cycle*, In: Lens P. & Hulshoff Pol L. (Eds.), Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution: Principles and Engineering. International Water Association. Londres, Inglaterra.
6. Dahl C., Friedrich, G. & Kletzin, A. (2008). *Sulfur oxidation in prokaryotes*, In Encyclopedia of Life Sciences (ELS), John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, Inglaterra.
7. Deviny J., Deshusses M & Webster T. (1999). Biofiltration for air pollution control. Lewis Publishers. Boca Raton, FL, Estados Unidos.
8. Eck R. & Dayhoff M. (1966). Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation. Silver Springs, Maryland, Estados Unidos.
9. Espinosa J., Revah S. y Le Borgne S. (2010). Rutas metabólicas de oxidación del azufre en bacterias quimiolitioautótrofas, relevancia ambiental y biotecnología. *Mensaje bioquímico*, **XXXIV**: 101-120.
10. Fisher M. & Triplett W. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 4630-4636.
11. Foti M., Ma S., Sorokin D., Rademaker J., Kuenen J. & Muyzer G. (2006). Genetic diversity and biogeography of haloalkaliphilic sulphur-oxidizing bacteria belonging to the genus *Thioalkalivibrio*. *FEMS Microbiology Ecology*, **65**: 95-101.

12. Friedrich G., Rother D., Bardischewsky F., Quentmeier A. & Fischer J. (2001). Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 2873-2882.
13. Friedrich G., Bardischewsky F., Rother D., Quentmeier A. & Fischer J. (2005). Prokaryotic sulfur oxidation. *Current Opinion in Microbiology*, **8**: 253–259.
14. García M., Mellado E., Ostos J. & Ventosa A. (2004). *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54** (5): 1723-1728.
15. Grant W. (2006). *Alkaline environments and biodiversity*. In: Gerdan C. and Glansdorff N (Eds), Extremophiles, Encyclopedia of Life Support System. Eolss Publishers, Oxford, Inglaterra.
16. Hansen J. (2010). *Energy*. In: Understanding environmental pollution, 3era edición. Hill M. (Eds), Cambridge University Pres, Cambridge, Inglaterra.
17. Homann V., Sandy M., Tincu J., templeton A., Tebo B. & Butler A. (2009). Loihichelins A-F, a suite of amphiphilic siderophores produced by the marine bacterium *Halomonas* LOB-5. *Journal of Natural Products*, **72** (5): 884-888.
18. Jones B., Grand W., Dockworth A. & Owenson G. (1998). Microbial diversity of Soda Lake. *Extremophiles*, **2** (3): 191-200.
19. Kawata Y. & Aiba S. (2010). Poly (b-hydroxybutyrate) production by isolated *Halomonas* sp. KM-1 using waste glycerol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **74** (1): 175-177.
20. Kreuzer H. & Massey A. (2001). Recombinant DNA and Biotechnology. 2da edición. ASM Press. Washington, Estados Unidos.
21. Lewin B. (1994). Genes V. Oxford University Press. Cambridge, Estados Unidos.
22. Llamas I., Del-Moral A., Martínez-checa F., Arco Y., Arias S. & Quesada E. (2006). *Halomonas maura* is a physiologically versatile bacterium of both ecological and biotechnological interest. *Antonie van Leeuwenhoek*, **89** (3-4): 395–403.
23. Llamas I., Béjar V., Martínez-Checa F., Martínez-Cánovas M., Molina I. & Quesada E. (2010). *Halomonasstenophila* sp. nov., a halophilic bacterium that produces sulphate exopolysaccharides with biological activity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, en prensa: doi:10.1099/ijs.0.026369-0.

24. Lomans P., van der Drift C., Pol A. & Op den Camp M. (2002). Microbial cycling of volatile organic sulfur compounds. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **59**: 575–588.
25. López-Valdez F., Fernández-Luqueño F., Luna-Guido M., Marsch R., Olalde-Portugal V. & Dendooven L. (2010). Microorganisms in sewage added to an extreme alkaline saline soil affect carbon and nitrogen dynamics. *Applied soil ecology*, **45**: 225-231.
26. Madigan M., Martinko J & Parker J. (2004). Brock: Biología de los Microorganismos, 10ª edición. Prentice-Hall. Madrid, España.
27. McSweeney N., Kaksonen A., Tilbury A., Nyeboer H., Sumich M., McKinnon A., Franzmann P. & Sutton D. (2010). Population shift of the microbial community in a full-scale bioreactor treating Bayer liquor wastes during start up and isolation of novel oxalate-degrading bacteria. Sometido a *Land and Water*.
28. Mnif S., Chamkha M. & Sayadi S. (2009). Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions. *Journal of Applied Microbiology*, **107** (3):785-794.
29. Nei M. & Kumar S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press,, Nueva York, Estados Unidos.
30. Newby D., Marlowe E. & Maier R. (2008). *Nucleic acid-bases methods of analysis*. In: Maier R., Pepper I. & Gerba C.(Eds), Environmental Microbiology, 2da ed, Elsevier Science, San Diego, CA, Estados Unidos.
31. Oren A. (2008). *Biogeochemical cycles*, In Encyclopedia of Life Sciences (ELS), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, Inglaterra.
32. Petri R., Podgorsek L. & Imhoff F. (2001). Phylogeny and distribution of the soxB gene among thiosulfate-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **197**: 171-178.
33. Ranjard L., Brothier E. & Nazaret S. (2000). Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and micro scale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 5334–5339.
34. Sánchez-Porro C., Kaur B., Mann H. & Ventosa A. (2010). *Halomonas titanicae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS Titanic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, en prensa, doi:10.1099/ijs.0.020628-0.

35. Schwibbert K., Marin-Sanguino A., Bagyan J., Heidrich G., Lentzen G., Seitz H., Rampp M., Schuster S., Klenk H., Pfeiffer F., Oesterhelt D. & Kunte HJ. (2010). A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581(T). *Environmental microbiology*, en prensa. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02336.x.
36. Smet E., Lens P. & Van langenhove H. (1998). Treatment of waste gases contaminated with odorous sulfur compounds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **28** (1): 89-117.
37. Sorokin D. (2003). Oxidation of Inorganic Sulfur Compounds by Obligately Organotrophic Bacteria. *Microbiology*, **72** (6): 641-653.
38. Sorokin D., Banciu H., van Loosdrecht M. & Kuenen J. (2003). Growth physiology and competitive interaction of obligately chemolithoautotrophic, halophilic, sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes. *Extremophiles*, **7**: 195-203.
39. Sorokin D. & Kuenen J. (2005). Chemolithotrophic haloalkaliphiles from soda lakes. *FEMS Microbiology Ecology*, **52**: 287-295.
40. Sorokin D. & Kuenen, J. (2005). Haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria in soda lakes. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**: 685–702.
41. Sorokin D., Tourova P., Kolganova V., Sjollem A. & Kuenen J. (2002). *Thioalkalispira microaerophila* gen. nov., sp. nov., a novel lithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from a soda lake. *International Journal of Systematic and evolutionary Microbiology*, **52**: 2175-2182.
42. Sorokin D., Trotsenko Y., Doronina N., Tourova T., Galinski E., Kolganova T. & Muyzer G. (2007). *Methylohalomonas lacus* gen. nov., sp. nov. and *Methylonatronum kenyense* gen. nov., sp. nov., methylotrophic gammaproteobacteria from hypersaline lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**: 2762-2769.
43. Steudel R. (2000). *The chemical sulfur cycle*. In: Lens L. y Hulshoff L. (Eds) Environmental technologies to treat sulfur pollution: Principles and Engineering., IWA Publishing. Londres, Inglaterra.

44. Tamura K. Nei M. & Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**:1596-1599.
45. Thiel T., Bissen S., & Lyons E. (2001). Biotechnology DNA, to protein: a laboratory project in molecular biology. McGraw-Hill, Boston, Estados Unidos.
46. Van-Thuor D., Guzmán H., Quillaguamán J. & Hatti-Kaul R. (2010). High productivity of ectoines by *Halomonas boliviensis* using a combined two-step fed batch culture and milking process. *Journal of Biotechnology*, **147**: 46-51.
47. Vargas V., Delgado O., Hatti-Kaul R. & Mattiasson B. (2004). Lipase-producing microorganisms from a Kenyan alkaline soda lake, *Biotechnology Letters*, **26**: 81-86.
48. Weisburg G., Bams M., Pelletier A. & Lane J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, **173**: 679-703.
49. Wilson K. & Walker J. (2006). Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 6^a edición. Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra.
50. Woese C., Kandler O. & Wheelis M. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87**: 4576–4579.
51. Yang C., Wang Z., Li Y., Du M., He X., Ma C., Tang H. & Xu P. (2010). Metabolic versatility of halotolerant and alkaliphilic strains of *Halomonas* isolated from alkaline black liquor. *Bioresource Technology*, **101**: 6778-6784.
52. Yazdankhah, Siamak P. & Bjørn-Arne Lindstedt. (2008). *Variable Number Tandem Repeat Typing of Bacteria*. In: Bergman N., Comparative Genomics, Humana Press. Londres, Inglaterra.

11 ANEXOS

11.1 Protocolo de extracción de ADN

“UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories Inc. USA)”

Usar guantes todo el tiempo

1. Agregar 1.8 mL de cultivo a un tubo de colección (provisto) y centrifugar a 10,000 xg por 5 minutos (aproximadamente) a temperatura ambiente, decantar el sobrenadante y centrifugar a 10,000 xg por 30 segundos; este paso se repetirá hasta agregar 10 mL de la muestra en un el tubo de colección o lo suficiente para obtener un pellet visiblemente grande. Retirar todo el sobrenadante del tubo (dejando únicamente el pellet, sin medio).
2. Re suspender el pellet en 300 µL de solución “MicroBead” y dar vortex suavemente para mezclar. Transferir el contenido en un tubo “MicroBead” proporcionado por este kit.
3. Agregar 50 µL de solución “MD1” al tubo “MicroBead”.
4. Opcional: para incrementar el rendimiento calentar a 65° C por 10 minutos.
5. Asegurar horizontalmente los tubos “MicroBead” a un vortex con cinta adhesiva y dar vortex al máximo de velocidad por 10 minutos.
6. Centrifugar los tubos “MicroBead” a 10,000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente. Precaución: asegurarse que la centrifugación no exceda los 10,000 x g porque si no los tubos se pueden romper.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo de colección limpio de 2 mL (proporcionados por el kit).
8. Nota: La expectativa de sobrenadante es de 300 a 350 µL.
9. Agregar a este sobrenadante 100 µL de la solución “MD2” y dar vortex por 5 segundos. Incubar a 4°C por 5 minutos.
10. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente por 1 minuto a 10,000 x g.
11. Evitar el pellet, transferir el volumen completo del sobrenadante a un tubo de colección limpio (proporcionado por el kit). La expectativa de líquido es aproximadamente de 450 µL.

12. Agregar 900 μL de la solución “MD3” al sobrenadante y dar vortex por 5 segundos.
13. Cargar aproximadamente 700 μL dentro del “Spin Filter” (proporcionado por el kit) y centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante y agregar los siguientes 700 μL (o lo restante) del sobrenadante obtenido en el paso 13; centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos. Nota: en total se requerirán 2 ó 3 cargas por cada muestra procesada.
14. Agregar 300 μL de la solución “MD4” y centrifugar por 30 segundos a 10,000 x g.
15. Descartar el sobrenadante.
16. Centrifugar a temperatura ambiente por 1 minuto a 10,000 x g.
17. Cuidadosamente colocar el “Spin Filter” dentro de un nuevo tubo de colección de 2 mL (proporcionado por el kit). Evitar salpicar remanentes de la solución dentro del “Spin Filter”.
18. Agregar 50 μL de la solución “MD5” justo en el centro del “Spin Filter” (dentro de la membrana blanca).
19. Centrifugar por 30 segundos a 10,000 x g. a temperatura ambiente.
20. Descartar el “Spin Filter”. El ADN se encontrara eluído en estos 50 μL , dentro del tubo. Almacenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

11.2 Protocolo de PCR para amplificar 16S bacteriano con Bac8f y 1492r con Taq ADN polimerasa y ThermoPol buffer

Primer	Dirección	Secuencia¹
Bac8f	Forward (F)	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
1492r	Reverse (R)	5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'

¹ Noah Fierer, University of Colorado at Boulder.

Para una reacción individual, se tienen las siguientes cantidades:

Reactivo	Volumen final de reacción			
	25 μ L	50 μ L	75 μ L	100 μ L
H ₂ O	20.8 -X	41.6 -X	62.4 -X	83.2 -X
10X Thermopol reaction buffer (NEB) ²	2.5	5	7.5	10
dNTPs (10 mM)	1	2	3	4
Bac8f (50 μ M)	0.25	0.50	0.75	1
1492r (50 μ M)	0.25	0.50	0.75	1
Templado	X	X	X	X
Taq ADN polymerase with ThermoPol Buffer (NEB) (5U/ml)	0.20	0.40	0.60	0.80

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	2 min.
35	94°C	45 seg.
	56°C	30 seg.
	72°C	1 min.
1	72°C	5 min.

Preparación de cócteles de reacción:

Los siguientes cócteles de reacción son calculados para un volumen de templado de 5 μ L en una reacción de 25 μ L. En caso de ser necesario se ajusta el volumen de templado a 5 μ L con H₂O para poder utilizar estos cócteles de reacciones para cualquier volumen de templado \leq 5 μ L.

Se preparan los cócteles de reacción sin polimerasa y se conservan por varios días a +4°C en el refrigerador:

Reactivo	Reacción tipo de 25 μ L	10 rxn de 25 μ L	20 rxn de 25 μ L	50 rxn de 25 μ L	100 rxn de 25 μ L	200 rxn de 25 μ L
H ₂ O	15.8	158	316	790	1580	3160
10X Thermopol reaction buffer (NEB)	2.5	25	50	125	250	500
dNTPs (10 mM)	1	10	20	50	100	200
Bac8f (50 mM)	0.25	2.5	5	12.5	25	50
1492r (50 mM)	0.25	2.5	5	12.5	25	50
Templado	5					

² Contiene 2 mM de MgSO₄

Se adiciona la polimerasa al momento de hacer las reacciones. Para una reacción de 25 μL , se requiere 19.80 μL de cóctel de reacción y 0.20 μL de enzima.

Para x reacciones de 25 μL , se requiere $x \times 19.80 \mu\text{L}$ de cóctel de reacción y $x \times 0.20 \mu\text{L}$ de enzima. El cóctel sobrante se regresa a + 4°C en el refrigerador.

11.3 Protocolo para purificación de fragmentos de PCR

Mediante el Kit UltraClean® PCR Clean-Up de MoBio laboratorios, Inc.

1. Sacudir para mezclar el “SpinBind” antes de usar. Agregar 5 veces el volumen de “SpinBind” por cada volumen de reacción PCR (5:1). Por ejemplo: agregar 500 μL a 100 μL de reacción de PCR.
2. Mezclar bien por pipeteo. Si se usó aceite, entonces habrá 2 capas. La capa superior es la de aceite.
3. Transferir la mezcla de PCR/SpinBind a un filtro Spin, evitando transferir la parte aceitosa.
4. Centrifugar de 10-30 segundos a un mínimo de 10,000 x g (aproximadamente 13,000 rpm).
5. Remover la canasta del filtro y descartar el líquido sobrenadante del tubo por decantación.
6. Colocar la canasta del filtro de nuevo en el mismo tubo.
7. Agregar 300 μL del búfer “Spin Clean” al filtro.
8. Centrifugar de 10-30 segundos a un mínimo de 10,000 x g.
9. Remover la canasta del filtro y descartar el sobrenadante por decantación, después colocar la canasta del filtro de nuevo en el mismo tubo.
10. Centrifugar de 30-60 segundos a un mínimo de 10,000 x g.
11. Transferir el filtro a un nuevo tubo de 2mL de microcentrífuga (provisto en el kit).
12. Agregar 50 μL de búfer de elución (10mM Tris) provisto en el kit o agua estéril directamente en el centro de la canasta, donde se encuentra una membrana blanca.
13. Centrifugar de 30-60 segundos a un mínimo de 10,000 x g.

14. Descartar el la canasta de la unidad de “spin” filtro. El ADN purificado ahora se encuentra en el tubo de microcentrífuga. El ADN en este paso ya está libre de componentes como oligonucleótidos, enzima, sal y dNTP. Almacenar a -20°C.

11.4 PCR para amplificar la región intergénica 16S – 23S de bacterias (RISA³)

Los primers y condiciones de amplificación son los reportados por Acinas *et al.* 1999.

Primer	Orientación	Posición	Dominio	Gen	Secuencia
B1055	Forward	1,055-	<i>Bacteria</i>	Subunidad 16S del rRNA	5’AATGGCTGTCGTCAGCTCGT
23SOR	Reverso	38-	<i>Bacteria</i>	Subunidad 23S del rRNA	5’TGCCAAGGCATCCACCGT

Para una reacción individual, se tienen las siguientes cantidades:

Reactivo	Volumen final de reacción			
	25 µL	50 µL	75 µL	100 µL
H ₂ O	21.125- X	42.25-X	63.375-X	84.5-X
HotStar Taq ADN polymerase Buffer (10X) ⁴	2.5	5	7.5	10
dNTPs (10 mM)	0.5	1	1.5	2
B1055 (50 mM)	0.25	0.5	0.75	1
23S (50 mM)	0.25	0.5	0.75	1
Templado	X	X	X	X
HotStar Taq ADN polymerase (5U/ml)	0.125	0.25	0.375	0.5

Las condiciones de amplificación son las siguientes:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95° C	15 min.
35	94° C	1 min.
	55° C	1 min.
	72° C	2 min.
1	72° C	10 min.

³ Ribosomal Intergenic Spacer Analysis.

⁴ Contiene 15 mM de MgCl₂.

Preparación de cócteles de reacción:

Reactivo	25 μ L	10 rxn de 25 μ L	20 rxn de 25 μ L	50 rxn de 25 μ L	100 rxn de 25 μ L	200 rxn de 25 μ L
H ₂ O	16.375	163.75	327.5	818.75	1637.5	3275
HotStar Taq ADN polymerase Buffer (10X) ⁵	2.5	25	50	125	250	500
dNTPs (10 mM)	0.5	5	10	25	50	100
B1055 (50 mM)	0.25	2.5	5	12.5	25	50
23S (50 mM)	0.25	2.5	5	12.5	25	50
Templado ⁶	5					
HotStar Taq ADN polymerase (5U/ml) ⁷	0.125					

Para una reacción, se requiere 19.875 μ L de cóctel de reacción. Según el número de reacciones a realizar, se toma el volumen de cóctel correspondiente y se adiciona la polimerasa (0.125 μ L por cada reacción de 25 μ L).

11.5 Protocolo de Clonación

Kit "TOPO-TA cloning" con el vector pCR 2.1 TOPO, marca Invitrogen.

Se requiere realizar una reacción de clonación de 6 μ L para la eventual transformación mediante células competentes químicamente:

Reacción de clonación	
Productos de PCR recientes y purificados	1.15 ng
Solución salina	1 μ L
Agua estéril	a 5 μ L
Vector TOPO	1 μ L
Volumen final	6 μL

Todo se debe manejar en hielo, ya que algunos componentes son sensibles a la temperatura. Cada reacción se hará en un tubo de microcentrífuga de 0.2 mL, previamente esterilizado.

⁵ Contiene 15 mM de MgCl₂.

⁶ Se ajusta el volumen de templado a 5 μ l con H₂O en caso de ser necesario.

⁷ Se adiciona la polimerasa en el instante.

1. Mezclar todos los componentes de la reacción de clonación e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente (22-23 °C).

Nota: *debido a que los productos de PCR a clonar, en este caso, son mayores a 1kb (1.5 kb) se incrementó el tiempo de incubación de 5 a 30 minutos, para así tener mayor rendimiento y eficiencia de las colonias.*

2. Colocar los tubos con las reacciones en hielo y proceder a la transformación.

Nota: *se puede almacenar las reacciones de clonación a -20°C toda la noche.*

11.6 Protocolo de transformación de células de E. coli tratadas con calcio

Antes de comenzar la clonación se deberá preparar 2 cajas de medio LB sólido con ampicilina, tetracilina, X-gal e IPTG, por cada vial de células competentes.

Soluciones agregadas en 1L de medio LB	
Tetraciclina	500 µL
Ampicilina	1000 µL
X-gal	2.5 mL
IPTG	1000 µL

1. Una vez que las células competentes tratadas con CaCl₂ son alícotadas (cuando se preparan las células competentes, se hacen alícuotas de 50µL de estas células por tubo, lo cual corresponde al volumen para una reacción de transformación) y almacenadas en un ultra congelador a -70°C, estas pueden manejarse con facilidad. Para comenzar con la transformación se debe sacar las alícuotas necesarias del ultra congelador y dejarlas descongelar por alrededor de 5 minutos en hielo. Homogenizar las células golpeando suavemente el fondo del tubo sin dispersar las células en las paredes del tubo.

Nota: evitar pipetear las células en exceso y NO darles vortex. Siempre conservarlas en el hielo. ¡FRAGILES!

2. Colocar el ADN a transformar sobre las células competentes (En este caso, como se usa el kit TOPO TA, se usa solamente 2 μL) y homogenizar suavemente golpeando ligeramente el fondo del tubo sin dispersar las células en las paredes del tubo.

Nota: considerar un máximo de 50 μL de células competentes.

3. Incubar en hielo por 20 minutos.
4. Dar choque térmico por 45 a 50 segundos en un baño de agua a exactamente 42°C (sin agitación).
5. Inmediatamente colocar los tubos en hielo por 2 minutos.
6. Agregar 959 μL de medio SOC en tubos de cultivo e inocular con las células transformadas.
7. Incubar por 1.5 horas a 37°C con agitación orbital suave (150 rpm).
8. Plaquear 100 μL de los cultivos en cajas de medio selectivo.

Nota: si se desea obtener un mayor número de transformantes, centrifugar los cultivos a 1,000 x g por 10 minutos, re suspender en 300 μL de medio SOC y plaquear 100 μL por triplicado.

9. Incubar cajas a 37°C durante 16 a 24 horas.

11.6.1 Selección de clonas positivas

Control negativo:

Las células se transforman sin ADN. Por lo tanto, no debe observarse crecimiento en las cajas de medio selectivo sin inocular.

Si se observa crecimiento, puede ser por debido a que las células competentes o el medio SOC están contaminados con una cepa resistente al antibiótico utilizado, o por que las cajas de medio selectivo son defectuosas, o también debido a que las cajas de medio selectivo están contaminadas por una cepa resistente al antibiótico utilizado.

Control positivo:

Las células se transforman con una cantidad conocida de una preparación de plásmido circular superenrollado (1° ng de ADN por cada 50 µL de células competentes) lo cual permite, además de comprobar la competencia, calcular la eficiencia de transformación (ufc/µg de ADN).

Buenas preparaciones de células competentes con CaCl₂ deben arrojar 10⁵ – 10⁶ transformantes por µg de plásmido (hasta 10⁸ transformantes para preparaciones comerciales). Cuando se transforma una reacción de ligación, se espera una eficiencia de al menos 100 veces menos que con un plásmido circular superenrollado.

1. Elegir 8 colonias blancas de cada caja (elegir las más separadas y mejor formadas, que se distinga claramente que son blancas).
2. Para la verificación de las clonas positivas se hará una resiembra de estas en cajas de Petri con medio LB, se hará una cuadrícula, en donde tendrán lugar cada una de las colonias picadas (se enumerara de la colonia 1 a la 8). Una vez previstas las cajas, se usaran palillos de madera estériles (uno por cada colonia elegida) para picar las colonias numeradas y volver a picar en las nuevas cajas cuadriculadas (una resiembra).
3. Incubar a 37°C por 16 horas

Una vez crecidas las colonias en las cajas cuadriculadas se comprobará si efectivamente estas eran clonas positivas (deben ser blancas). Elegir 3 colonias positivas para su posterior crecimiento en medio líquido y proseguir a aislar el plásmido.

11.7 Protocolo para aislar plásmidos

Kit “Ultraclean® 6 minute Mini Plasmid prep” de MoBio laboratorios, Inc.

Usar guantes todo el tiempo.

El punto crítico para el correcto aislamiento del plásmido usando este kit son el paso 5-6 de este protocolo. Remover el medio residual del pellet antes de adicionar al re

suspendido la solución S1, seguida de la lisis alcalina y una compactación del pellet después de la neutralización. Fallar en este paso puede resultar en un bajo rendimiento.

1. Crecer las clonas positivas, previamente elegidas en 3 mL de medio líquido LB.
2. Cada preparado de plásmido requerirá de dos tubos de microcentrífuga de 2 mL y un filtro “spin “. Etiquetar los tubos con un marcador resistente al etanol.
3. Agregar 2 mL del cultivo a un tubo de 2mL. Centrifugar por 1 minuto a 16,000 x g.
4. Decantar el sobrenadante por inversión del tubo. Repetir este paso hasta que sea procesado los 3 mL del cultivo.
5. Centrifugar la muestra por un poco más de 5 segundos a 16,000 x g.
6. Remover cualquier remanente de líquido del tubo, se puede utilizar una punta de micropipeta muy fina (**Este paso es crítico**).
7. Re suspender el pellet en 50µL de la **solución 1** dando vortex por 1 minuto.
8. Agregar 100 µL de **solución 2**. Mezclar por inversión 8 veces. No dar vortex.
9. Agregar 325 µL de **la solución 3**. Invertir el tubo 8 veces para mezclar. No dar vortex.
10. Centrifugar 1 minuto a 16,000 x g. si no se obtiene un pellet, centrifugar por más tiempo.
11. Transferir el sobrenadante dentro del filtro “Spin” por decantación o pipeteando.
12. Centrifugar el filtro por 30 segundos a 10,000 x g. descartar el sobrenadante.
13. Agregar 300 µL de la **solución 4**. Centrifugar 30 segundos a 16,000 x g.
14. Descartar el sobrenadante y centrifugar de nuevo por 30 segundos.
15. Cuidadosamente transferir la canasta del filtro a un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 mL.
16. Agregar 50 µL de la solución 5 justo en el centro de la canasta donde se encuentra la membrana blanca. Centrifugar 30 segundos a 10,000 x g.
17. Remover la canasta del filtro. El ADN del plásmido se encuentra dentro del tubo de centrífuga de 2 mL, ahora está listo para usarcé.

11.8 Secuencias del gen 16S ARNr

11.8.1 2aa_3/2

```

      10      20      30      40      50      60      70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCGGAGGGGAAGGACTACCTGCAGTCGAGCGGCAGCACGGGAAGCTTGCTTCCTGGTGGCGAGCGGCGGA

      80      90     100     110     120     130     140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGGGTGAGTAATGCATAGGAACTGCCCGGTAGTGGGGGATAACCTGGGGAAACCCAGGCTAAATACCGCA

     150     160     170     180     190     200     210
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TACGTCCACGGGAGAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTGCCTATCGGATGAGCCATGTTCGGATTAGCT

     220     230     240     250     260     270     280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGTTGGTGAGGTAAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGG

     290     300     310     320     330     340     350
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GACTGAGACACGGCCGAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGCACAAGCCCTGA

     360     370     380     390     400     410     420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCCAGCCATACCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAAGCACTTTCAGTGGGGAAGAAAGCCCTGG

     430     440     450     460     470     480     490
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGGTAAATACCCGCGCAGGAAGGACATCACCCACAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG

     500     510     520     530     540     550     560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTAATACGGAGGGTCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGCCGTGATAAGCC

     570     580     590     600     610     620     630
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGTTGTGAAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAACTGTCAGGCTAGAGTGCACGAGAGGAA

     640     650     660     670     680     690     700
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGTAGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCCTTC

     710     720     730     740     750     760     770
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGGACTGACACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTATTCCACC

     780     790     800     810     820     830
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCGTAAACGATGTCAACTACCTGTTGGGTCCTTCGCGGACGTTGTGGCGCACTTAACCCGAAAAGTCGA

```



```

          990          1000          1010          1020          1030          1040          1050
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCCTTCGGGGAACCGAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGGTTTA

          1060          1070          1080          1090          1100          1110          1120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTGTCCTAGTTTGCCAGCGGTTTCGGCTGGCTACTCTATGGAGAAC

          1130          1140
.....|.....|.....|.....|.....|
TGACCGGTGAACAAAACCCGGGA

```

11.8.3 3at_1b/1

```

          10          20          30          40          50          60          70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGTGGGGCTGCCTACCCTGCAGTCGAGCGGTAACAGGCCTTTTCGGGGTGCTGACGAGCGGCGGACGGGT

          80          90          100          110          120          130          140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTAGTAACGCGTGGGAATCTGCCAATAGTGGGGGATAACCCGGGGAACTCGGGCTAATACCGCATACG

          150          160          170          180          190          200          210
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCCTACGGGGAGAAGGGGCCTTACTTGTAAGTCTCGTATTGGATGAGCCCGCTCCGATTAGCTTG

          220          230          240          250          260          270          280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTGGTAGGGTAACGCCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGA

          290          300          310          320          330          340          350
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATC

          360          370          380          390          400          410          420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CAGAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTGCGGTTGTAAGCACTTTCAGTAAGGAGGAAAAGCTCAGG

          430          440          450          460          470          480          490
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCTAATACCTCTGAGTCTTGACGTTACTTACAGAAGAAGCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCACGGT

          500          510          520          530          540          550          560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTCGTAAAGTTAG

          570          580          590          600          610          620          630
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CTGTGAAGCCCCGGGCTTAACCTGGGAATGCAGTTAATACTGGCGGACTAGAGTCTGGTAGAGGGTAG

```


360 370 380 390 400 410 420
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 CCATGCCGCGTGTGTAAGAAGGCCCTCGGGCTGTAAAGCACTTTCAGTGGGGAAGAAAGCCTTCCGGTT

430 440 450 460 470 480 490
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 AATACCCGGGAGGAAGGACATCACCCACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAAT

500 510 520 530 540 550 560
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 ACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAACTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGCTTGATAAGCCGGTTG

570 580 590 600 610 620 630
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 TGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAACGTGCAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAG

640 650 660 670 680 690 700
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 AACTCCCGGTGTAGCGGTGAAGTGCCTAGAGATCGGGAGGAAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCCTTCTGGAC

710 720 730 740 750 760 770
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 TGACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTA

780 790 800 810 820 830 840
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 AACGATGTCGACTAGCCGTTGGGTCCCTTCGCGGACTTTGTGGCGCAGTTAACCGGATAAGTCGACCCGCT

850 860 870 880 890 900 910
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 GGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG

920 930 940 950 960 970 980
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 TTTAATTCGATGCAACGCCAAGAACCCTTACCTACCCCTTGACATCCTGCCAACCCTTCGGAGACGAAGGGG

990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 TGCCCTTCGGGAAACGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAA

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 GTCCCGTAACGAAGCGCAAACCCCTTGTCCCTATTGCCAGCGATTTCCGTCCGGGAACCTTAGGGAGAAC

1130 1140 1150
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 CTGTGGCCCGGGTGAACGAAACCGGGATGA

11.8.5 4ap_org/2

10 20 30 40 50 60 70
CGTGGGTTAGCAACCTGCAGTCGAGCGGCAGCACGGGAAGCTTGCCTCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGT

80 90 100 110 120 130 140
GAGTAATGCATAGGAATCTGCCCGTAGTGGGGGATAACCTGGGGAAACCCAGGCTAATACCGCATACGT

150 160 170 180 190 200 210
CCTACGGGAGAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTGCCTATCGGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTGGTTG

220 230 240 250 260 270 280
GTGAGGTAATGGCTACCCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGACTG

290 300 310 320 330 340 350
AGACACGGCCCGAACCTCCACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAG

360 370 380 390 400 410 420
CCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTGGGGAAGAAAGCCTTCGGTTT

430 440 450 460 470 480 490
AATACCCGGGAGGAAGGACATCACCCACAGAAGAAGCACCGGCTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGGTAAAT

500 510 520 530 540 550 560
ACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGCTTGATAAGCCGGTTG

570 580 590 600 610 620 630
TGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAACGTGCAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAG

640 650 660 670 680 690 700
AATTCCCGGTGTAGCGGTGAGATGCCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCCTCTGGAC

710 720 730 740 750 760 770
TGACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTA

780 790 800 810 820 830 840
AACGATGTCGACTAGCCGTTGGGTCCCTTCGCGGACTTTGTGGCGCAGTTAACACGATAAGTCGACCCGCT

850 860 870 880 890 900 910
GGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGGGGTGGAGCATGTGG

920 930 940 950 960 970 980
TTTAAATTTCGATGCAACCGCAAGAACCCTTACCTACCCCTTGACATCCCTCGGAATCCGCCAGAGATGGGTGGG

```

          990          1000          1010          1020          1030          1040          1050
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGTGCCTTTCGGGAACCGAGAGACACGTGCTGCATGGGCTGTCGTTTCAGCTCGTGTGTGAATGGTTGGG

          1060          1070          1080          1090          1100          1110          1120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTAAGTTCCGTAACGAGCGCCACCCCTGGTCCCTATTGGCAGCGATTCCGGTCCGGCACCTCAGGGAGACT

          1130          1140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCCGCGTGACAAACCACCGAAGGAAAAGT

```

11.8.6 5bp1_2/1

```

          10          20          30          40          50          60          70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACGTGGGACGCCACACATGCAGTCGAGCGGCAGCACGGGAAGCTTGCCTTCCTGGTGGCGAGCGCGGACG

          80          90          100          110          120          130          140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGTGAGTAGTGATAGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGATAAACCCTGGGAAACCAGGCTAATACCGCATA

          150          160          170          180          190          200          210
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGCCCTACGGGGAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCCTTGCCTATCGGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTGG

          220          230          240          250          260          270          280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTGGTGAGGTAAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGA

          290          300          310          320          330          340          350
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CTGAGACACGGCCCGAACCTCCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATC

          360          370          380          390          400          410          420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTGGGGAAGAAAGCCTCCG

          430          440          450          460          470          480          490
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTTAATACCCGGGAGGAAGGACATCACCCACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT

          500          510          520          530          540          550          560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AATACGGAGGGTGCAGCATTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGCTTGATAAGCCGG

          570          580          590          600          610          620          630
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAACCTGTCAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAG

```

```

        640      650      660      670      680      690      700
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TAGAATTCCC GGTTG TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCCGGCCTTCTG

        710      720      730      740      750      760      770
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GACTGACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC

        780      790      800      810      820      830      840
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGTCCCTTCGCGGACTTTTGTGGCGCAGTTAACCGGATAAGTCGACCCG

        850      860      870      880      890      900      910
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAGAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATG

        920      930      940      950      960      970      980
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGGTTTAATTTCGATGCAACCGCAAGAACCCTTACCTACCCTTGACATCCTGCCAACCCCTTCGGAGACGAAA

        990     1000     1010     1020     1030     1040     1050
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGGTGCCCTTCGGGAACGCAGAGACAGGTGCCGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAAATGTTTGGG

        1060     1070     1080     1090     1100     1110     1120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTTTAAGTCCCTGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCTATTTTGCCAGCGATCGGTCCGGAAACCTCTAGCA

        1130     1140     1150     1160
.....|.....|.....|.....|
GACTGCCCGGTGACAAACCGAAGGAAGGGTGTGGGGGAACG

```

11.8.7 81_3(b)/1

```

        10      20      30      40      50      60      70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGTGGGGGCCGGCTACCTGTCAGTCGAGCGGAAACGATGGGAGCTTGTCCC GGCGTCGAGCGGCGGACG

        80      90      100     110     120     130     140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGTGAGTAATGCATAGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGATAACCTGGGGAAACTCAGGCTAATACCGCATA

        150     160     170     180     190     200     210
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGTCCACGGGAGAAAGCGGGGGCTCTTCGGACCTCGCGCTATCGGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTGG

        220     230     240     250     260     270     280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCGGCCACATCGGGA

        290     300     310     320     330     340     350
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CTGAGACACGGCCCGAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATC

```

360 370 380 390 400 410 420
CAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTGGGAAGAAGGCCTTGGG

430 440 450 460 470 480 490
GTTAATAGCCTCGAGGAAGGACATCACCCACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT

500 510 520 530 540 550 560
AATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGCTTGATAAGCCGA

570 580 590 600 610 620 630
CTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAACGTTCGGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGG

640 650 660 670 680 690 700
TAGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCCGGCCTTCTG

710 720 730 740 750 760 770
GACTGACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCC

780 790 800 810 820 830 840
GTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGCTCCTCGCGAGCTTAGTGGCGCAGTTAACCGGATAAGTCGACCG

850 860 870 880 890 900 910
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAATCAAATGAAATTTACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATG

920 930 940 950 960 970 980
TGGTTTAAATTCGATGCAACCGCAAGAACCCTTACCTATCCCTTGACATCGAGAGAACTTGGCAGAGATGCC

990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
TGTTGCCCTTCGGGAACCTCAGACAGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGGTA

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
AGTCCCCGTAGACGAGCGCAACCCCTTGGTCCCTATTTTGGCCAGCCGAATCCGGTTCGGGAAACTTCTAA

1130 1140 1150 1160 1170 1180
GGGAAGACTGCCGGGTGACCAAACGGAGGAGGGTGGGGACCGAACGTCCTCAAGTCCATATCATATG

11.8.8 31_2/2

10 20 30 40 50 60 70
GGAGGGCGAGGCC**TACCTGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGAAGCTTGC**TTCC**TGGTGGCGAGCGCGGAC**

80 90 100 110 120 130 140
GGG**TGAGTAATGCATAGGAATCTGCCCGTAGTGGGGGATAACCTGGGGAAACCCAGGC**TAAT**ACCGCAT**

150 160 170 180 190 200 210
ACG**CCCTACGGGGGAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTGCCTATCGGATGAGCCTATGTCCGAT**TAG**CTG**

220 230 240 250 260 270 280
G**TTGGT**GAGG**TAATGGCTC**CC**AAAGCGACGATCCG**TAG**CTGGTCTAAGAGGATGATCAGCCACATCGGG**

290 300 310 320 330 340 350
A**CTGAGACACGGCCCGAAC**TCC**TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGGACAATGGGC**CAAG**CC**T**GAT**

360 370 380 390 400 410 420
CCAG**CCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGCAC**TT**TCAGTGGGGAAAGAAAGCC**T**GGT**

430 440 450 460 470 480 490
GG**TTAATACCCGCCAGGAAGGACATCACCCACAGAAGAAGCACCGGC**TA**ACTCCGTGCCAGCAGCCGGG**

500 510 520 530 540 550 560
T**AA**TACGGAGGG**TGCAGCGTTAA**TCGG**AATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGC**TT**GATAAGCCG**

570 580 590 600 610 620 630
G**TTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAAC**T**GT**CAG**GTAGAGTGCAGGAGAGGAAG**

640 650 660 670 680 690 700
G**TAGAA**TT**CCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCC**TT**CT**

710 720 730 740 750 760 770
GG**ACTGACACTGACACTGAGGTGTGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGAT**TTAG**ACACCC**TGG**TAGTCCACGC**

780 790 800 810 820 830 840
CG**TAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGTCC**TT**CGCGGACTTTGTGGCGCAGTTAACCGGATAAGT**CG**ACC**

850 860 870 880 890 900 910
GC**CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA**ACT**CAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCAT**

920 930 940 950 960 970 980
GTGG**TTTAAATTCGATGCAACCGGAAGAACC**TT**ACCTACCC**TT**GACATCC**T**GCGAACC**TT**TCGGAGACGAA**


```

      640      650      660      670      680      690      700
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TAGAATTCCC GGTTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCTTCTG

      710      720      730      740      750      760      770
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GACTGACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACGCC

      780      790      800      810      820      830      840
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGTCC TTCGCGGACTTTTGTGGCGCAGTTAACCGGATAAGTCGACCG

      850      860      870      880      890      900      910
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAATC AAATGAATTTGACGGGGGCCCGCAC AAGCGGTGGAGCATG

      920      930      940      950      960      970      980
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACC TTACCTACCC TTGACATCC TCGGAACCC TTCGGAGACGAAG

      990     1000     1010     1020     1030     1040     1050
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGGTGCC TTCGGGAAACGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT CAGCTCGTGT TGTGAAATGGTTGGG

     1060     1070     1080     1090     1100     1110     1120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAAACCC TTTGTTCTGTTATTTGCCAGCGAGTAAAGTT CGGGACTCTACGG

     1130     1140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGACTGCCGGGTGACCAAACCTGGA

```

11.8.10 1a2/2

```

      10      20      30      40      50      60      70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGCATGCGAGGCC TACCTGCAGTCGAGTGGCAGCACGGGAAGCTTGC TTTCC TGGTGGCGAGCGGGCGGACC

      80      90      100     110     120     130     140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGTGAGTAATGCATAGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGATAACCTGGGGAAACCCAGGCTAATACCGCATA

      150     160     170     180     190     200     210
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGTCC TACGGGAGAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTTCGCTATCGGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTGG

      220     230     240     250     260     270     280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTGGTGAGGTAAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGA

      290     300     310     320     330     340     350
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CTGAGACACGGCCCCGAAC TCC TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATC

```


360 370 380 390 400 410 420
 CAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGTGGGAAGAAAGCCTGGTG

430 440 450 460 470 480 490
 GTTAAATACCCGCCAGGAAGGACATCACCCACAGAAGAAGCACCGGCTAAC TCCGTGCCAGCAGCCGCGGT

500 510 520 530 540 550 560
 AATACGGAGGGTGCAGCGTTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGCTTGATAAGCCGG

570 580 590 600 610 620 630
 TTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAACGTGCAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGG

640 650 660 670 680 690 700
 TAGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCCGGCCTTCTG

710 720 730 740 750 760 770
 GACTGACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACGCC

780 790 800 810 820 830 840
 GTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGTCC TTCGCGGACTTTGTGGCGCAGTTAACGCGATAAGTCGACCG

850 860 870 880 890 900 910
 CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA ACTCAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT

920 930 940 950 960 970 980
 GGTTTAATTTCGATGCAACGCCAAGAACC TTACCTACCC TTGACATCCTGCCAACCCTTCGGAGAACGAAA

990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 GGGTGCCCTTCGGGAACGCAGAGACAGGTGCTGCCATGGGCTGTCGTCAGCTCGTGT TTTGTGAATGGTTG

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 GGGTTAAGTTCCCGTTAACGAGCGCAAACCCGTTGTCTGTTATTTGCAAGCGGGTCATGCCGAAC TCTAGG

1130 1140 1150
 AGACTGCGGTTACAACCGTAGGGAAAAGTG