



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA NO CULTIVABLE
PRESENTE EN EL SUELO DE CULTIVO DE CAÑA DURANTE LAS
PRIMERAS ETAPAS DEL CICLO DE PRODUCCIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ELSI IDELI JUÁREZ ARROYO



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Q.F.B Alejandro Camacho Cruz
VOCAL: Q.F.B Ruth Edith Martin Fuentes
SECRETARIO: Dr. José Adelfo Escalante Lozada
1er. SUPLENTE: Dr. José de Jesús García Trejo
2° SUPLENTE: M. en B. Martha Giles Gómez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

- (1)** Cepario, Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM.
- (2)** Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en B. Martha Giles Gómez

SUSTENTANTE (S):

Elsi Ideli Juárez Arroyo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a todos mis profesores, por brindarme una formación académica extraordinaria que me enorgullece. En sus recintos pasé los mejores momentos de mi vida preparatoriana y universitaria.

Al apoyo financiero para la realización de esta tesis, con beca del proyecto CONACYT Ciencia Básica 106428 y al apoyo financiero del proyecto DGAPA PAPIME PE203410.

Al Dr. José Adelfo Escalante Lozada por ser un gran asesor, permitirme formar parte de este proyecto, por todo el apoyo, los conocimientos y las grandes oportunidades brindadas durante el desarrollo de ésta tesis.

A la M. en B. Martha Giles Gómez por ser un ejemplo siempre, una excelente profesora y magnífica persona. Por la confianza, el trato y el apoyo incondicional durante la carrera y guía durante el desarrollo de la tesis.

Al Departamento de Biología de la Facultad de Química por brindarme la confianza y el espacio para el desarrollo de la tesis, por permitirme conocer un verdadero ambiente de trabajo. Al Dr. Rodolfo Pastelín y la profesora Pilar Granada Macías por la grandiosa oportunidad de permitirme formar parte de este magnífico departamento, por su comprensión y apoyo siempre.

Al QFB. Alejandro Camacho Cruz, la QFB. María Antonieta Silva Chávez y a la Sra. Laura Ramírez por el apoyo técnico facilitado durante el desarrollo experimental, y por formar parte importante de mi desarrollo académico.

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM y la Unidad de Secuenciación del IBT.

Al M. en B. José Félix Aguirre Garrido de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos laboratorio de Ecología Molecular por su apoyo para la realización de la técnica de DGGE que facilitó la elaboración de esta tesis.

Al Ingeniero Juan Solano Zamora, Supervisor de calidad y al Ingeniero Héctor López de la Oficina de campo del Fideicomiso Comercializador (FICO).

Al Ingenio Emiliano Zapata, Zacatepec, Morelos, por su valioso apoyo para la obtención de las muestras de suelo analizadas en este proyecto.

DEDICATORIAS

Esta tesis va con mucho amor y orgullo, dedicada especialmente a mi familia; a mi madre, Maribel Arroyo, mi padre Victoriano Juárez y mi hermano, Eduardo Juárez. Por tener a los mejores padres que una hija pudiera desear. Por siempre, siempre apoyarme en las mejores decisiones de mi vida y darme una educación que es reflejo de la persona que soy. Agradecida estoy por siempre con ellos.

A mi adorada mamá, gracias por mostrarme el mayor cariño y amor que una madre puede dar a sus hijos. Gracias por todo el inmenso esfuerzo que realizaste para que me superara y siempre diera lo mejor de mí. Por todo tu ejemplo, por ser mi amiga, mi madre y mi hermana. Porque tu amor es infinito, siempre has estado en las buenas y en las malas conmigo; nunca me has dejado caer. Por eso, deseo sigas estando muy orgullosa de mí y sepas que siempre haré mi mejor esfuerzo por salir adelante, así como tú lo has hecho, imprimiendo gran dedicación tanto en tu trabajo, como con tus hijos. Sin tus cuidados, sin tu confianza, sin tu apoyo, no hubiera sido igual. Mami gracias por darme la vida, gracias por escucharme siempre, por quererme tanto y por alentarme constantemente. Agradecida estoy con la vida por tener una mami así, a quien quiero con todo mi corazón, de quien estoy muy orgullosa y a quien dedico mayormente esta tesis y este día de mi titulación.

A mi amado papá, por ser el mayor ejemplo de fuerza y cariño que puede haber en un padre. Porque eres mi ejemplo continuo de superación y dedicación. Gracias por ser el mejor padre para mí y para mi hermano, por querernos tanto, por apoyarme infinitamente y por guiarme con madurez y sabiduría durante toda mi vida. Gracias por todas las aventuras vividas y por vivir, por mantener esta familia unida, por procurarme siempre y por darme un hogar en el que he sido muy feliz. Todo tu esfuerzo ha valido la pena y estaré eternamente agradecida contigo y con la vida porque me dio a un padre que no tiene igual y de quien estoy orgullosa. Papá, te quiero mucho y te dedico esta tesis con mucho cariño.

A mi hermano, que es mi ángel, mi confidente, mi amigo. Gracias por ser mi "hermaniti" y por haber llegado a mi vida. Te esperé con mucho amor y fui muy

feliz cuando llegaste a mi vida hermanito, por eso estoy orgullosa de que este momento lo compartas conmigo, pues estamos y estaremos juntos en los mejores momentos de nuestras vidas. Has de saber que siempre voy a estar apoyándote en todo lo que hagas. Jamás olvides que nos tenemos el uno para el otro. Eres nuestro orgullo en la familia, pues has mostrado ser un hijo impecable. Sigue esforzándote por tus sueños y cumpliendo con tus metas como hasta ahora. Los sueños NO son inalcanzables, debemos luchar por ellos, por eso siempre lucha por lograr los tuyos que yo estaré ahí alentándote, apoyándote y queriéndote como siempre.

A mis abuelitos, a mis tíos y a mis primitos, eternamente gracias por su cariño, por su amor y por su apoyo. El valor de la unión familiar y el respeto son valores que sin duda me han inculcado. No hallo palabras para expresarles todo mi amor hacia ustedes, que siempre han estado conmigo. Siento orgullo de compartirles este momento pues como excelentes profesionistas, son uno de mis ejemplos a seguir. Gracias a mis abuelitos por quererme tanto, por apoyarme y haberme dado sus cuidados toda la vida. A mis tíos y padrinos gracias por procurarme siempre, por estar junto a mí y por ser parte de mi familia, por quererme como se quiere a un hijo y por compartir sus vidas y experiencias conmigo, que son ejemplos de superación, trabajo y constancia. Les hago entrega de esta muestra de cariño, queriendo que sepan que soy feliz de tener a unos abuelitos, tíos y primitos como ustedes, a quienes quiero mucho y respeto.

A mis amigos de la prepa, mis amadas Ujitas: Pily, Adri, Jessy, Lulú, mis hermanas, y a mi adorado Christian. Sin ustedes la vida en la prepa no hubiera sido igual. Llevo muy presentes los extraordinarios momentos que vivimos juntos y que, después de casi ya 8 años de amistad, aún conservamos. A pesar de los tiempos, siempre nos hemos mantenido unidos y deseo sea por mucho tiempo más. Sin duda fui, soy y seré muy feliz en compañía de ustedes. Cómo olvidar nuestra adorada Prepa 2: nuestra jardinera, a nuestros profesores, mi grupo de danza regional, las canchas, los ELFOS. Eso cafés, esas salidas al cine, la patinada, hasta que se nos hizo la pijamada! Sin duda son momentos memorables y me llevo a los mejores amigos que pueda tener. En las buenas y en las malas siempre!

Mi amiga Carolina. Qué te puedo decir amiga...en verdad que estoy feliz de habernos cruzado de nuevo y retomar esa bella amistad que teníamos desde secundaria. Sin duda tú y Adriana son lo mejor que me pude haber llevado del Colegio Vasconcelos, nuestra secundaria. De aquellos poemas, de aquellas risas, de aquellas travesuras y complicidades! Pensar que ahora, no sólo hemos consolidado una amistad de años, sino también una unión y apoyo que compartimos en nuestras vidas profesionales y personales. Gracias por todo, por esos buenos momentos que hemos tenido. Quién iba a pensar que te iba a alcanzar hasta Cuernavaca amiga! Gracias por tu cariño y por tu amistad, sabes que siempre contarás con la mía.

A mi muy amado Mario González Sin duda tú has sabido ser siempre un maravilloso e increíble amigo para mí. No tengo cómo agradecerte el que estés en mi vida y que me hayas dado todas esas muestras de cariño incondicional. Hemos estado juntos en las buenas y en las malas, desde que nos conocimos y no me cansaré de decir que tengo al mejor amigo del mundo. Eres una persona extraordinaria, una maravilla de caballero y has de saber que eres y serás, sin duda alguna, parte de mi corazón por siempre. Gracias por ser mi compañero, por haber sido y seguir siendo mi corazón, mi amigo y como un hermano para mí. De las personas que quiero en mi vida para siempre, sin duda estás tú. No hace falta decir que en mí tienes un apoyo incondicional, a una amiga y confidente. Siempre con la cabeza muy en alto debemos estar y orgullosos de quiénes somos y de las cosas que hemos logrado y lograremos. Te quiero mucho y te agradezco que compartas este momento especial junto a mí. De lo mejor que me llevo de la Universidad!

Para mis Cuchus!: Oscarito, Andy, Fabián, Kiskey, Kari, Jaz, Joel, Colín. Qué inolvidables y buenos momentos he vivido a su lado. He disfrutado los últimos y mejores momentos como universitaria de una manera extraordinaria junto a ustedes. Gracias por esas aventuras, por apoyarme siempre, por su buena vibra, por robarme sonrisas y ser grandes amigos y compañeros para mí. Son increíbles personas, muy queridos por su amiga Chelzi. Sepan que muchas aventuras y viajes nos esperan, así que muy listos todos. Los quiero infinitamente friends!

A mis adorados amigos de primer semestre: Fabián, Paul, Martín, Allan, Ascencio, Jenny y por supuesto, mi querido Alan Bruno. Las clases de primer semestre no hubieran sido iguales sin ustedes. Son amigos muy especiales para mí que, sin duda, son parte importante de mi vida. A ustedes también debo agradecerles todo el apoyo que me dieron, las alegrías y las tristezas que compartieron conmigo, las historias que vivimos y el haberme dejado conocer a personas tan especiales y queridas para mí. Sigamos escribiendo y trazando esas historias llenas de felicidad, superación y éxito!

A mis amigos y compañeros de la carrera: Claudita, Irma, Edelí, Carito, Felipe, Erick, Belén, Kari; a los del grupo "poder-cepario": Ale Mejía, Areli, Carlitos, Javito, por ser extraordinarios compañeros y amigos, por las aventuras y por la bonita convivencia a lo largo de la carrera. En especial quiero agradecer a Erick Ramírez y Ale Domínguez (Bubu) por haber colaborado conmigo, por ser un gran equipo de laboratorio, de trabajo y muy buenos amigos. Cada uno de ustedes me brindó lo mejor de sí. Los llevo muy presentes, con mucho cariño y respeto.

Les deseo la mejor de las suertes QAs generación 2008!

ÍNDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Generalidades	5
III.1. La caña de azúcar y propiedades del suelo vertisol para su cultivo	5
III.1.1. Caña de azúcar.....	5
III.1.2. Vertisoles	10
III.2. El suelo como nicho ecológico	11
III.3. Estudio de la diversidad metabólica del suelo	14
III.4. Impacto de la actividad humana sobre la pérdida de la capacidad agrícola de los suelos: Efectos negativos sobre su diversidad microbiana.	15
III.5. Estudio de la diversidad bacteriana del suelo.....	18
III.5.1. Métodos para el análisis de la diversidad microbiana por técnicas dependientes del cultivo	18
III.5.2. Métodos de estudio no dependientes del cultivo e implicaciones biotecnológicas	20
III.5.3. Electroforesis en gradiente en gel desnaturizante (DGGE).....	26
IV. Justificación e Hipótesis	29
V. Objetivos	30
VI. Metodología	31
VI.1. Análisis de la diversidad bacteriana por métodos moleculares no dependientes del cultivo.....	31
VI.2. Análisis de la diversidad bacteriana por técnicas moleculares dependientes del cultivo. 32	
1. Toma de muestras.....	33
2. Metodología no-dependiente del cultivo	33
2.1. Extracción del metagenoma bacteriano.....	33
2.2. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE).....	34
2.3. Secuenciación de las bandas de DGGE.....	36
3. Metodología dependiente del cultivo	37
3.1. Determinación de bacterias mesofílicas aerobias.....	37
3.2. Extracción de ADN cromosomal	38

3.3.	Amplificación por PCR de los genes ADNr 16S	38
3.4.	Electroforesis en gel de agarosa.....	39
3.5.	ARDRA e identificación de aislados únicos	40
3.6.	Purificación de los amplificados	41
3.7.	Análisis de secuencias	41
3.8.	Perfil metabólico. Preparación de placas EcoPlate™	42
VII.	Resultados y Discusión	43
VII.1.	Método No dependiente del cultivo	46
VII.1.1.	Extracción del metagenoma bacteriano.....	46
VII.1.2.	Perfiles de DGGE	47
VII.1.3.	Secuenciación de las bandas de DGGE.....	52
VII.2.	Resultados de la aplicación de Métodos dependientes del cultivo	56
VII.2.1.	Cuenta microbiana	56
VII.2.3.	Amplificación por PCR del gen ADNr 16S y purificación.	58
VII.2.4.	ARDRA e identificación de aislados únicos	59
VII.3.	Implicaciones biológicas de los grupos bacterianos detectados en las muestras T0-T3 fracción cultivable: mesófilos aerobios y facultativos.....	75
VII.4.	Perfil Metabólico determinado por el sistema EcoPlate.	81
VIII.	Conclusiones	87
IX.	Perspectivas	88
X.	Anexos	89
XI.	Bibliografía.....	90

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- ADN**, Ácido desoxirribonucleico
- AMR**, Average Metabolic Response;
- ARN**, Ácido ribonucleico
- ARDRA**, Amplified Ribosomal ADN-Restriction Analysis
- APS**, Peroxidosulfato de amonio
- BLAST**, Basic Local Alignment Search Tool
- BLASTn**, Standard Nucleotide BLAST
- ClustlalW**, Multiple alignment of nucleic acid and protein sequences
- CMD**, Community Metabolic Diversity
- CLPP**, Community Level Physiological Profiling
- DGGE**, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
- FAOSTAT**, Statistics Division of the Food and Agriculture Organization
- FISH**, Fluorescent in situ hybridization
- NCBI**, National Center for Biotechnology Information
- PCR**, Polimerase Chain Reaction
- PFLA**, Phospholipid Fatty Acid Analysis
- RAPD**, Random Amplified Polymorphic ADN
- RDP**, Ribosomal Database Project
- TBE**, Tris-borato-EDTA amortiguador
- T-RFLP**, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
- SDS**, Dodecil sulfonato de sodio
- TEMED**, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
- UFC**, Unidad Formadora de Colonias
- UPGMA**, Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Representación esquemática de los diferentes ciclos que pueden estar involucrados en el cultivo de caña de azúcar.</i>	8
<i>Figura 2. Estrategia del análisis de una muestra ambiental por técnicas dependientes del cultivo.</i>	19
<i>Figura 3. Técnicas moleculares no dependientes del cultivo microbiano utilizadas en el análisis de la diversidad bacteriana de suelos</i>	25
<i>Figura 4. Resolución taxonómica de las principales técnicas de caracterización bacteriana.</i>	27
<i>Figura 5. Estrategia del análisis de la muestra ambiental por técnicas no dependientes del cultivo.</i>	31
<i>Figura 6. Estrategia del análisis de la muestra ambiental por técnicas dependientes del cultivo</i>	32
<i>Figura 7. Gráfico de apoyo donde se observa el ciclo de cultivo convencional de la caña de azúcar.</i>	43
<i>Figura 8. Ubicación geográfica del campo de muestreo en la localidad de Lagunillas, Municipio de Tlaquitenango, Morelos.</i>	44
<i>Figura 9. Vista general del área de cultivo para la muestra T0 (suelo recién arado-19 de Enero del 2010); muestra T1 (siembra y primer riego-25 de Enero de 2010); muestra T2 (después de la adición de herbicida y segundo riego-12 de Febrero de 2010); muestra T3 (con fertilizante y parte de la planta-18 de Mayo de 2010)</i>	45
<i>Figura 10. ADN metagenómico visualizado en gel de agarosa 1%.</i>	47
<i>Figura 11. Perfil DGGE de la comunidad bacteriana no cultivable de suelo para un cultivo de caña de azúcar correspondiente a los primeros cuatro tiempos de cultivo. Las bandas en el gel identificadas con números y flechas fueron secuenciadas.</i>	48
<i>Figura 12. Gráfico que relaciona la etapa de cultivo contra el número de bandas DGGE presentes en cada etapa.</i>	49

<i>Figura 13. Extracción de ADN cromosomal visualizado en gel de agarosa 1%_</i>	<i>58</i>
<i>Figura 14. Electroforesis en gel del de agarosa 1% de los ADNr 16S amplificados a partir del ADN cromosomal extraído de los aislados bacterianos del suelo vertisol en estudio.</i>	<i>59</i>
<i>Figura 15. Muestra de suelo con fertilizante; muestra T3. Patrones de restricción generados con Bsp143I (parte superior) y BsuRI (parte inferior). El primer y último carril corresponden al marcador de peso molecular de Fermentas.</i>	<i>60</i>
<i>Figuras 16. Digestiones con Bsp143I que producen diferentes patrones de restricción en cada uno de los aislados para la muestra T3.</i>	<i>61</i>
<i>Figura 17. Árbol construido por UPGMA de los tipos ARDRA detectados e identificados en las muestras T0.</i>	<i>63</i>
<i>Figura 18. Árbol construido por UPGMA de los tipos ARDRA detectados e identificados en las muestra T1.</i>	<i>64</i>
<i>Figura 19. Árbol construido por UPGMA de los tipos ARDRA detectados e identificados en las muestra T2.</i>	<i>65</i>
<i>Figura 20. Árbol construido por UPGMA de los tipos ARDRA detectados e identificados en las muestra T3.</i>	<i>66</i>
<i>Figura 21. Abundancia relativa de tipos ARDRA detectados e identificados en las muestras T0-T3.</i>	<i>72</i>
<i>Figura 22. AMR (A) y CMD (B) de las muestra T0, T1 T2 y T3. Los valores son el promedio de los datos registrados y analizados para dos placas por muestra. T0, T1, T2, T3.</i>	<i>82</i>
<i>Figura 23. EcoPlate después de incubación por 96 horas</i>	<i>83</i>

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Extracción estimada de nutrientes en Kg/TM de caña producida.....</i>	<i>6</i>
<i>Tabla 2. Principal proceso de la microbiota que influye en el crecimiento de la planta.....</i>	<i>13</i>
<i>Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR para la región V6-V8 del ADNr 16S.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 4. Porcentaje de solución desnaturalizante para el gel de DGGE.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 5. Condiciones para PCR (cálculos para 50 µL en cada tubo de reacción)</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 6. Mezcla de reacción para las digestiones de productos de PCR.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 7. Identificación de las secuencias obtenidas a partir del DGGE de la microbiota no cultivable del suelo.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 8. Cuenta microbiana presente en muestras analizadas por métodos cultivables tradicionales.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 9. Distribución de aislados identificados en las muestras de suelo T0-T3 Diversidad Cultivable.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabla 10. Índice de Shannon-Weaver y valor de Evenness parte cultivable.....</i>	<i>74</i>
<i>Tabla 11. Características relevantes de los principales microorganismos detectados en las muestras T0-T3 de suelo para cultivo de caña de azúcar. Muestra cultivable.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabla 12. Patrón de uso de las 31 fuentes de carbono de las muestras de suelo T0-T3 obtenido por el sistema EcoPlate.....</i>	<i>85</i>

I. Resumen

El cultivo de la caña de azúcar ocupa un lugar preponderante y trascendente en la actividad económica y social de México; sin embargo, a pesar de su importancia, existen problemas de diversa índole asociados al cultivo de la caña de azúcar. En realidad, no existen reportes que consideren el efecto de las prácticas agrícolas empleadas sobre la diversidad bacteriana presente en los suelos utilizados para su cultivo. En este trabajo se analizó la diversidad bacteriana cultivable y no cultivable, así como el perfil metabólico, presente en una muestra de suelo empleado para el cultivo de caña de azúcar en la localidad de Lagunillas, Municipio de Tlalquitenango, Estado de Morelos, durante cuatro etapas del ciclo de cultivo: 0) suelo recién arado; 1) después de plantar la caña y primer riego; 2) aplicación de herbicida; 3) aplicación de fertilizante. Los resultados mostraron que por tipificación mediante ARDRA los microorganismos identificados en la muestra pertenecen al grupo de los Firmicutes, γ -Proteobacterias y Bacteroidetes. El género *Bacillus*, fue el mayormente predominante en todas las etapas de cultivo. Por este análisis y secuenciación de aislados únicos, *Bacillus* sp. y *Bacillus cereus* destacaron por estar presentes en todas las etapas del cultivo analizadas independientemente del tratamiento aplicado al suelo; mientras que, microorganismos como *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., y *Escherichia coli* se encontraron en sólo una de las etapas, así la diversidad y abundancia de las especies en este suelo se modifica a lo largo de los tiempos de cultivo. Mediante la aplicación de técnicas moleculares independientes del cultivo para aislamiento de microorganismos no cultivables, la información obtenida por el análisis de DGGE difiere a la obtenida por el método dependiente del cultivo. Por DGGE se identificaron microorganismos pertenecientes a clonas bacterianas no cultivables, acidobacterias no cultivables, así como secuencias pertenecientes a rizobacterias no cultivables y a un vector de clonación para plantas. Se observó que la comunidad bacteriana no cultivable permaneció constante a lo largo de las etapas de cultivo y a los tratamientos aplicados, no mostrando mayores implicaciones sobre la diversidad microbiana.

II. Introducción

La caña de azúcar es la principal fuente de obtención de azúcar a nivel mundial y nacional; sin embargo, a pesar de su importancia, existen problemas de diversa índole asociados a su cultivo. Un ejemplo de ello ha sido la reducción del rendimiento de la planta y su producción, reflejo de algunas de las prácticas agrícolas llevadas a cabo; así como, el uso desmedido de fertilizantes químicos nitrogenados y pesticidas, que ha traído graves consecuencias ambientales. De esta manera, se ha prestado gran atención al estudio de la microbiota nativa de los cultivos y sus beneficios a la planta, la caña de azúcar (Rodríguez *et al.*, 2005).

Las plantas al ser un ambiente donde pueden desarrollarse poblaciones y comunidades microbianas tales como las bacterias, levaduras y hongos, proveen una fuente de nutrimentos para dichos microorganismos por la actividad que desarrollan, por sus requerimientos nutricionales y por sus componentes celulares. Estos microorganismos a su vez son la causa de respuestas morfológicas, bioquímicas o patológicas en el individuo con el cual están asociados y por lo cual la relación entre macro y microorganismos es altamente interdependiente, debido a la proximidad física tan estrecha que presentan.

En cuanto a las relaciones microbianas, estas pueden ocurrir en la rizósfera, en la filosfera o *en el suelo* a una distancia cercana a la planta. La manera en que las bacterias pueden afectar el desarrollo y la productividad de una planta es a través de diferentes mecanismos: disminuyendo la eficiencia del proceso fotosintético, siendo patógenos, actuando como núcleos de condensación y por la producción de fitohormonas; siendo los factores que participan en la relación planta-bacteria: la distribución geográfica y clima, la edad de la planta y *la genética de las bacterias asociadas a ella* (Rosas *et al.*, 2004).

En el suelo existe una inmensa cantidad de organismos, que obtienen energía necesaria para su ciclo de vida a partir de compuestos orgánicos presentes en el medio. De todos los organismos presentes en el suelo, las bacterias son sin duda alguna el componente más abundante. El estudio de su diversidad bacteriana ha

permitido determinar la presencia de microorganismos cultivables, así como microorganismos considerados como no cultivables; siendo éstos últimos, según diversos reportes, del 90 a 99% de la diversidad total presente en el suelo (Escalante *et al.*, 2004).

Se ha propuesto que el carácter no cultivable de esta proporción de la diversidad bacteriana y la imposibilidad de cultivarlos en el laboratorio se debe principalmente al desconocimiento de posibles relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que mantienen los miembros de una comunidad microbiana y que determinan requerimientos nutricionales, así como de las condiciones fisicoquímicas para el desarrollo, las cuales no pueden mayoritariamente reproducirse en el laboratorio. Esta situación tiene un impacto negativo muy importante sobre investigaciones que pretenden realizar un estudio de la diversidad bacteriana total presente en una muestra. A pesar de lo anteriormente mencionado, no existen informes que consideren el efecto de las prácticas agrícolas empleadas durante el cultivo de la planta sobre la diversidad bacteriana presente en los suelos utilizados para su producción.

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se realizó el estudio de la diversidad bacteriana cultivable presente en una muestra de suelo vertisol utilizado para cultivo de caña de azúcar (Vázquez, 2011) de la localidad de Lagunillas, Estado de Morelos, durante las primeras tres etapas de cultivo que comprendieron:

- (T0)** El suelo recién arado
- (T1)** Después de la siembra y riego
- (T2)** Después de aplicación de un herbicida.

Debido a las posibles limitaciones para determinar la diversidad bacteriana total presente en éste tipo de suelo, asociadas al uso de los métodos dependientes de cultivo empleados, en éste trabajo se pretendió completar el reciente estudio sobre la diversidad bacteriana cultivable anteriormente mencionado, con el estudio realizado sobre una etapa más de cultivo que conformó ésta tesis. Dicha etapa

corresponde al **T3**, que comprendió el suelo vertisol con fertilizante y parte de la planta.

Así mismo, se pretendió integrar dicho análisis con el uso de técnicas no dependientes de cultivo microbiano, siendo la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE, por sus siglas en inglés), la técnica empleada para el análisis. Además, se compararon los resultados obtenidos en el perfil de diversidad metabólica de cada muestra.

Los resultados de este trabajo permitirán complementar y obtener por primera vez la información sobre diversidad bacteriana y el perfil metabólico asociado a un suelo vertisol empleado para el cultivo de caña de azúcar, permitiendo con esto, la identificación de grupos microbianos dominantes e indicadores de este tipo de suelo. Además se propondrá una hipótesis sobre la importancia que tiene la presencia de estos microorganismos identificados en el suelo utilizado para el cultivo de caña de azúcar. Por otro lado se obtendrá y conservará una colección de bacterias cultivables que conformarán una colección de referencia para este tipo de suelo.

III. Generalidades

III.1. La caña de azúcar y propiedades del suelo vertisol para su cultivo

III.1.1. Caña de azúcar

La caña de azúcar es una gramínea tropical, un pasto gigante emparentado con el sorgo y el maíz en cuyo tallo se forma y acumula un jugo rico en sacarosa, compuesto que al ser extraído y cristalizado en el ingenio forma el azúcar. Es el cultivo de mayor importancia desde el punto de vista de la producción azucarera, además representa una actividad productiva y posee varios subproductos, entre los que se encuentran: la producción de energía eléctrica derivada de la combustión del bagazo, alcohol de diferentes grados como carburante o farmacéutico (Alexander, 1985).

Se cultivan aproximadamente 20 millones de hectáreas de caña de azúcar en todo el mundo, distribuidas en América con un 54.21% de producción, Asia con 39.62%, África y Oceanía con 4.65% y 1.52%, respectivamente. Como es un cultivo tropical, la gran mayoría se cultiva en América Latina, India y el Lejano Oriente. Para el año 2011, México obtuvo el 5to. lugar entre los primeros diez países productores de caña de azúcar, destacando Brasil en primer lugar, posteriormente India, China, Tailandia, Pakistán, Filipinas, E.U., Australia y Argentina (FAOSTAT, 2011).

La clasificación taxonómica de la caña de azúcar es la siguiente:

Reino: Vegetal

Tipo: Fanerógamas

Subtipo: Angiospermas

Clase: Monocotiledóneas

Orden: Glumales

Familia: Gramíneas

Género: *Saccharum*

Especies: *spontaneum* y *robustum* (silvestres), *edule*, *barberi*, *sinense* y *officinarum* (domésticas)

Este cultivo se desempeña bien en una amplia gama de formaciones geomórficas de suelos, clases de texturas, pH, en suelos sueltos, profundos y fértiles. Dependiendo de la textura, es decir la proporción porcentual de los agregados arcilla, arena y limo puede producirse en suelos marginales como los arenosos hasta en suelos arcillosos. Los suelos francos y franco-arcillosos son adecuados para el cultivo de la caña pues en condiciones de buen drenaje, generan rendimientos físicos y buena calidad de la caña. En la forma en cómo se unan las partículas para formar terrones, un suelo con buena estructura facilita el desarrollo del cultivo pues el agua y el aire penetran muy bien, la lluvia y el viento no lo arrastrarán fácilmente y las raíces de las plantas se desarrollarán en buenas condiciones. Una mala estructura del suelo cuando está húmedo, forma una gran masa que anula la aireación de las raíces y dificulta el laboreo (Díaz y Portocarrero, 2002).

La caña puede cultivarse de forma óptima dentro de los límites de pH que van de 5.5 a 7.2, y logra adaptarse bien a los suelos con un pH que va desde 4 a 8.3 (Chaves, 2002). Es muy exigente en elementos nutritivos, pues una cosecha de 100 toneladas de caña extrae del suelo alrededor de 125 kilos de nitrógeno, 77 kilos de fósforo y 32 kilos de potasio. Estas cantidades de elementos nutritivos los toma la planta de las existencias presentes en el suelo en forma natural, o bien cuando son aplicados por el agricultor en forma de abono. La cantidad de los nutrimentos extraídos por la planta y su forma absorbible son presentados como ejemplo en la tabla 1.

Tabla 1. Extracción estimada de nutrientes en Kg/TM de caña producida

Nutrimento	Extracción de suelo			
	Kg/TM		Kg en 80 TM promedio/ha	
	Nutrimento	Forma extraíble	Nutrimento	Forma extraíble
N	0.93	0.93	74.4	74.4
P	0.27	0.62	21.6	49.6
K	1.65	1.98	132.0	158.4
Ca	0.34	0.48	27.2	38.4
Mg	0.25	0.41	20.0	32.8
S	0.29	0.87	23.2	69.6
Si	0.93	1.99	74.4	159.2

(Chaves, 2002).

Esta especie es típica de los climas tropicales y puede producirse hasta los 35 grados latitud norte y sur, se desempeña mejor en altitudes que van desde 0 a 1,000 metros sobre el nivel del mar, aunque los rendimientos obtenibles hasta 1500 metros son económicamente aceptables. Se desempeña bien con una temperatura media de 24 °C, además de una precipitación anual de 1500 mm bien distribuidos durante su ciclo de crecimiento (Diaz y Portocarrero, 2002).

El cultivo de la caña de azúcar está expuesto a diferentes condiciones agroecológicas, las cuales varían altamente de forma natural en el espacio del sistema de producción y en el tiempo en que se mantenga dicho sistema. Estas variaciones son incontrolables y se convierten en un fenómeno normal en un agroecosistema. La comprensión de ella y de sus efectos en la producción de caña es limitada, por tanto, es necesario desarrollar un conocimiento sistemático de estas variaciones con el fin de entender el cultivo y diseñar sistemas administrativos más eficientes y productivos que incorporen esa variación en los agroecosistemas (Almekinders *et al.*, 1995).

Por tanto, es sin duda necesario conocer los rendimientos, además del análisis de suelos y foliar que definen la cantidad de fertilizantes a usar. El cultivo de una variedad determinada de caña en condiciones óptimas de adaptación no es suficiente para obtener altos rendimientos, también es necesario aplicar buenas prácticas agrícolas del cultivo como: adecuación y preparación del terreno, sistemas de siembra, fertilización, control de maleza, manejo de plagas y enfermedades, riego, maduración y cosecha (FAO, 2002).

En la **figura 1** se presenta el proceso principal de cultivo de caña de azúcar, el cual comprende varios ciclos.

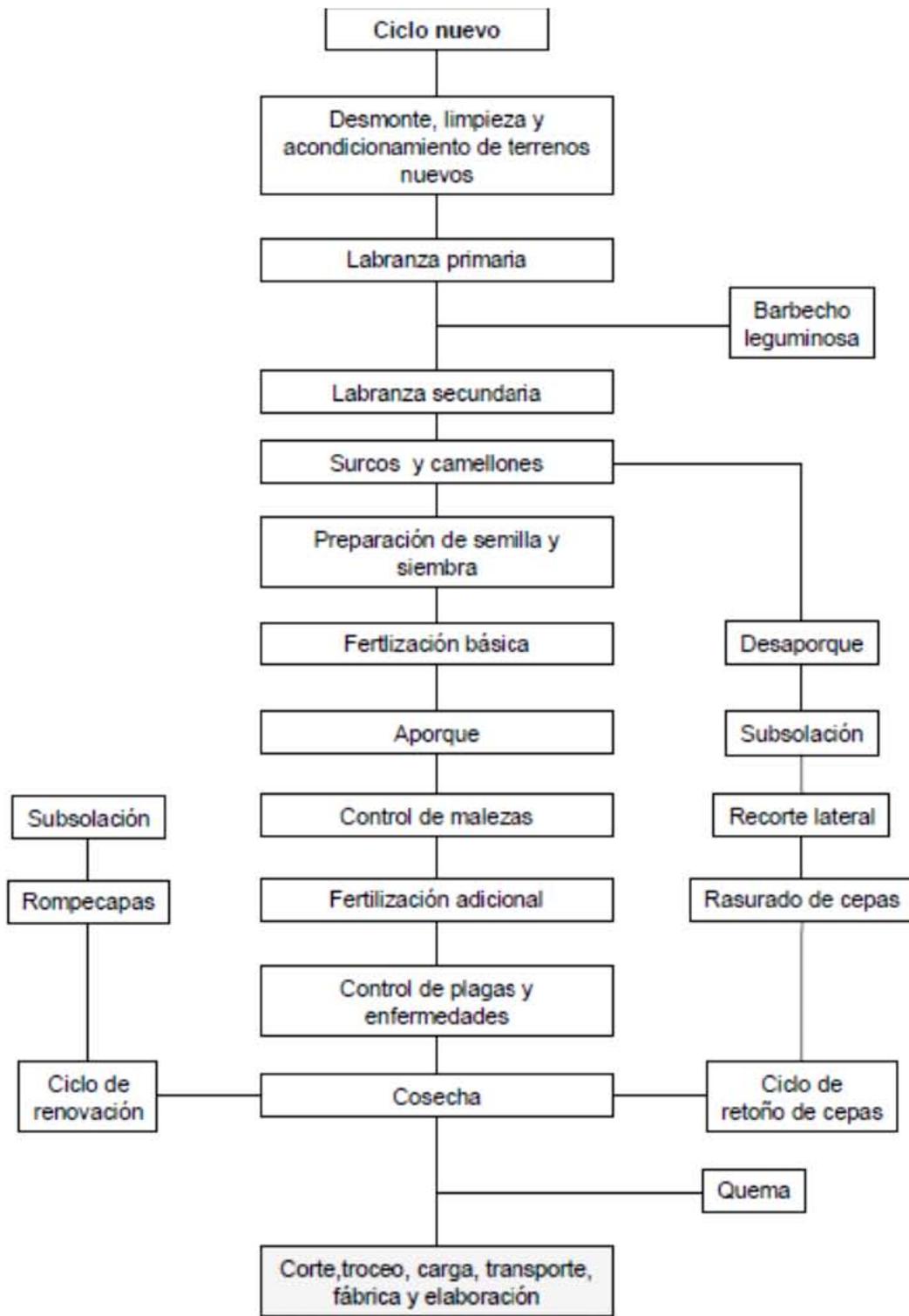


Figura 1. Representación esquemática de los diferentes ciclos que pueden estar involucrados en el cultivo de caña de azúcar.

(Vázquez, 2011)

El punto de partida para el cultivo de caña es la preparación de las tierras de cultivo, en donde las labores mecánicas de preparación son muy importantes para asegurar una buena germinación y un mejor aprovechamiento de los fertilizantes: limpia del terreno de malezas, nivelación, barbecho, rastreo, levantamiento topográfico y surcado. La preparación de la semilla y la siembra se realiza actualmente por dos métodos de siembra, el directo a partir de trozos de caña y el de trasplante, a partir de plántulas de 1 a 1.5 meses de edad. Las fechas de siembra varían según las regiones agro-climáticas del país. Una fecha es entre junio-agosto y la otra es entre noviembre-febrero, temporada considerada como más conveniente por el mejor aprovechamiento de la humedad y temperatura, además de que favorece las labores de cultivo (Vázquez, 2011).

Finalmente, las labores de cultivo, se refieren a aquéllas actividades que deben de realizarse después de la germinación y que favorecen que el cultivo se desarrolle de manera sana y vigorosa, las cuales comprenden: el cultivo para control y eliminación de malezas que se realiza cuando la planta alcanza 15 cm de altura; el aporque, proceso mecánico sobre el suelo que tiene como finalidad darle a los tallos pequeños un mayor soporte para favorecer así el enraizamiento y para que el amacollamiento sea más vigoroso, esta operación se realiza cuando la planta alcanza los 40-50 cm de altura; el redondeo, acción mecánica que tiene la finalidad de definir la forma de los surcos para asegurar una buena circulación de agua y; el chapoleo, eliminación de la maleza que se desarrolla en el terreno después del redondeo (Vázquez, 2011).

Existen factores como el riego y la disponibilidad de agua, disponibilidad de nutrientes en el suelo, fertilización, presencia y control de malezas y plagas, que se ha determinado afectan de forma importante el cultivo de la caña de azúcar. En la actualidad existen diferentes estrategias que han permitido mantener estos factores dentro de parámetros que aseguran el buen desarrollo de un cultivo, sin embargo, es importante destacar que no existen en la literatura reportes sobre la diversidad bacteriana asociadas a suelos empleados para el cultivo de caña, ni sobre el papel de este componente biológico en relación a las diferentes etapas de su cultivo.

III.1.2. Vertisoles

Los vertisoles (del latín *vertere*) son los suelos arcillosos que poseen una proporción alta de arcillas expansivas. En estos suelos se forman grietas anchas desde la superficie hacia la profundidad cuando se secan, que ocurre en la mayoría de las veces del año. Los nombres locales comunes para muchos vertisoles son: suelos negros de algodón, regurgitación (India), césped de suelo negro (África del Sur), margalites (Indonesia), vertosols (Australia), vertissolos (Brasil) y vertisoles (Estados Unidos de América). De acuerdo al Centro Internacional de Referencia e Información de Suelos (ISRIC, 2009), los vertisoles son suelos que se producen predominantemente a nivel del valle, bajo climas con una estación seca pronunciada. Vastas áreas se encuentran en Australia, India, noreste de África (Sudán, Etiopía), al sur de Latinoamérica y Estados Unidos.

Los suelos vertisoles poseen un horizonte vértico (un horizonte subsuperficial arcilloso con agregados pulidos y ranuras o agregados estructurales en forma de cuña o paralelepípedo), dentro de los primeros 100 cm de profundidad del suelo. Poseen 30% o más de arcilla en todos los horizontes a una profundidad de 100 cm o más y una capa contrastante (lítico o paralítico, petrocálcico, discontinuidad sedimentaria, etc.) entre 50 y 100 cm. Además, los vertisoles exhiben grietas de 1 cm de ancho o más, que abren y cierran periódicamente (FAO, 2009)

De acuerdo a las diferentes clasificaciones de suelos, por parte de la Food and Agriculture Organization y de la Base de Referencia Mundial para los recursos de los suelos, un vertisol es aquel suelo generalmente negro que posee un alto contenido de arcilla expansiva conocida como montmorillonita. Los vertisoles se forman típicamente de rocas altamente básicas tales como basaltos, en climas estacionalmente húmedos o sujetos a sequías erráticas y a inundaciones. Estos suelos, generalmente, presentan acumulación de calcio (WRB, 2007).

El pH del suelo es casi neutro (6.2 a 7.6) que tiende a lo alcalino, de los 50 cm de profundidad del suelo debido a la presencia de la roca parental aluvial con alto nivel de CaCO_3 (Llorente, 2004).

Dependiendo del material parental y del clima, pueden oscilar del gris o rojizo, al más familiar negro, con horizontes superficiales ricos en materia orgánica, textura arcilloso-limosa con estructura en bloques angulares y subangulares. La porosidad de estos suelos es elevada, debido a la gran cantidad de microporos que presentan (Llorente, 2004; WRB, 2007; FAO, 2009)

La agricultura de este tipo de suelo es muy difícil debido a que sólo puede trabajarse en un rango de humedad muy estrecho pues los suelos son extremadamente duros en seco y demasiado plásticos en húmedo (WRB, 2007; ISRIC, 2009).

III.2. El suelo como nicho ecológico

El suelo representa uno de los ambientes más importantes sobre la Tierra, tan es así que es una de las más grandes fuentes de diversidad microbiana ubicado en el planeta entero, con una biodiversidad que no ha sido descubierta en su totalidad y la cual podría ser un recurso de obtención de productos naturales para la agricultura y para aplicaciones biotecnológicas; además de que en él tiene lugar el desarrollo de muchos procesos determinantes para el sustento de la vida sobre nuestro planeta, lo que hace que el suelo sea un sistema muy complejo que comprende una variedad de microhábitats en donde viven en conjunto microorganismos con límites más o menos definidos, interaccionando entre ellos y con otros componentes del suelo. Estos microhábitats se caracterizan por la presencia de gradientes fisicoquímicos y condiciones ambientales discontinuos que permiten el desarrollo de diferentes formas de vida a ambos lados de su superficie. La actividad combinada de los seres vivos que habitan el suelo (plantas, animales y microorganismos), enriquecen de forma importante la cantidad de nutrientes, agua y aire presentes, generándose así un ciclo dinámico que mantiene la vida en ellos y en una escala funcional mayor, lo que hace posible la vida sobre la superficie de la Tierra (Madigan y Martinko, 2006; Tortora *et al.*, 2006).

De todos los organismos presentes en el suelo, las bacterias son sin duda alguna el componente más abundante y probablemente uno de los más importantes componentes de su microbiota. Los microorganismos del suelo son fundamentales para procesos terrestres, jugando roles importantes en varios ciclos biogeoquímicos para contribuir al nutrimento de las plantas, en la salud y calidad del suelo (término propuesto por la Sociedad Internacional de la Ciencia del Suelo); que se refiere a la capacidad específica del suelo para funcionar en un ecosistema natural o antrópico con la finalidad de sostener la productividad de la planta y que se relaciona ampliamente con las características biológicas, químicas y físicas que son esenciales para una productividad agrícola sostenible a largo plazo con un mínimo impacto ambiental.

Como resultado de la actividad microbiana, la materia orgánica e inorgánica del suelo (carbón, nitrógeno, azufre y CO₂ del aire), entra a los ciclos biogeoquímicos y son oxidados y reducidos por diferentes microorganismos para satisfacer sus requerimientos nutricionales (Torsvik y Øvreås, 2002). Los efectos de las prácticas del manejo de suelos agrícolas aunados a los factores naturales que causan también la alteración de sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, pueden tener un impacto muy importante sobre la actividad de las poblaciones microbianas presentes. El estudio de la diversidad bacteriana y de los procesos en los que participa, es por lo anterior de gran importancia, no tan sólo desde el punto de vista ecológico, sino también, en el contexto agrícola y biotecnológico. Varios procesos microbianos que afectan directa o indirectamente en el desarrollo de la planta, son mostrados a continuación (**Tabla 2**).

Tabla 2. Principal proceso de la microbiota que influye en el crecimiento de la planta

Función microbiana	Proceso o efecto	Ejemplos
Descomposición de materia orgánica	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Aceleración de compostaje</i> • <i>Descomposición de materia orgánica en el suelo</i> 	<i>Trichoderma, Fusarium, Bacillus, Streptomyces</i>
Fijación de nitrógeno	<ul style="list-style-type: none"> • Efecto nutricional para las plantas 	<i>Rhizobium, Azotobacter, Aerobacter</i>
Mineralización del nitrógeno	<ul style="list-style-type: none"> • Efecto nutricional para las plantas 	<i>Bacillus, Pseudomonas, Serratia</i>
Nitrificación	<ul style="list-style-type: none"> • Efecto nutricional para las plantas 	<i>Nitrobacter, Nitrosomas</i>
Desnitrificación	<ul style="list-style-type: none"> • Mejoramiento del suelo 	<i>Pseudomonas</i>
Solubilización de fosfato	<ul style="list-style-type: none"> • Efecto nutricional para las plantas • Mejoramiento del suelo 	<i>Enterobacter, Bacillus, Aspergillus, Penicillium</i>
Transformación de azufre		<i>Desulfovibrio</i>
Producción de fitohormonas	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento de plantas, enzimas, etc. 	<i>Azotobacter, Pseudomonas, Rhizobium, Bacillus, Flavobacterium, Alternaria</i>
Control biótico	<ul style="list-style-type: none"> • Efecto supresivo a patógenos, nematodos 	<i>Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces</i>

(Varma *et al.*, 2008)

Se ha estimado que el número total de células procarióticas en la tierra ha sido de 4 a 6×10^{30} , incluyendo 10^6 - 10^8 genomas individuales pertenecientes a diferentes especies. Es por ello que el suelo representa uno de los ambientes de mayor reto para los microbiólogos, respecto a las funciones y diversidad de la comunidad microbiana. Las investigaciones describen las propiedades de este ambiente así como los procesos implicados en la interacción del ciclo de carbono con la vida microbiana. Sin embargo no se ha elucidado completamente su biogeoquímica o complejidad espacial (Mocali y Benedetti, 2010).

III.3. Estudio de la diversidad metabólica del suelo

La caracterización de la diversidad metabólica de un ambiente permite identificar las actividades microbianas predominantes y puede ser utilizada como un indicador de su funcionalidad. Una de las metodologías desarrolladas y aplicadas para dicho fin es el análisis del perfil metabólico de una muestra por medio de la determinación de algunos marcadores específicos, entre los que se encuentran como ejemplo: el perfil de ácidos grasos de membrana (PFLA, por sus siglas en inglés), y el perfil fisiológico a nivel de comunidad (CLPP, por sus siglas en inglés). Estos son métodos que no necesariamente dependen de técnicas moleculares basadas en la extracción del metagenoma bacteriano ni de la capacidad de poder cultivar a los microorganismos en un medio (Rosas *et al.*, 2004).

Ya que en todos los microorganismos encontramos fosfolípidos, principalmente en las membranas celulares, las cuales pueden ser degradadas fácilmente dejando libre el componente fosfolipídico, pueden servir como indicadores de la biomasa microbiana activa. Además se sabe existen lípidos únicos en grupos específicos de organismos microbianos, por ejemplo en grupos bacterianos y fúngicos, que facilitan mediante PFLA la determinación de la diversidad microbiana basada en la extracción y análisis de los lípidos por cromatografía de gases para establecer el tipo y concentración de cada uno. De este modo, la relación entre los PLFA bacterianos:fúngicos, es utilizada como un índice de la abundancia relativa de estos dos grupos saprófitos del suelo (Torsvik, 2002; Handelsman, 2002).

Respecto al CLPP, este es un método utilizado para comparar comunidades microbianas basándose en las capacidades fisiológicas de la comunidad, pudiendo ser evaluado directamente de muestras de suelos por medición de la capacidad de catabolizar sustratos específicos. Para facilitar su análisis, se han desarrollado estrategias que involucran el uso de microplacas las cuales contienen sustratos que al ser metabolizados, y con el uso de indicadores, indican la capacidad de metabolizar dichos sustratos.

Se ha propuesto que las modificaciones en las características metabólicas de la diversidad microbiana pueden preceder a cambios detectables en las propiedades fisicoquímicas del suelo, por lo que esta característica puede ser utilizada con fines prácticos como un indicador de posibles síntomas de mejoramiento o degradación del suelo (Torsvik y Øvreas, 2002; Handelsman, 2002; Gómez *et al.*, 2006; Green y Keller, 2006). Por tal motivo, el estudio de las caracterizaciones fisiológicas de la microbiota endófitas constituye la piedra angular de las nuevas tecnologías de cultivo, que posibiliten el uso de prácticas de producción sustentables, dirigidas hacia la explotación racional de los recursos naturales y la reducción del uso de sustancias químicas. Las bacterias endófitas tienen la ventaja de la gran cantidad de nutrientes que disponen, así como la protección que les brinda la planta de las condiciones adversas del medio. Además, por hallarse en contacto íntimo con la planta, podrían brindar beneficios más directos a su hospedero en comparación con las bacterias rizosféricas (Rodríguez *et al.*, 2005).

III.4. Impacto de la actividad humana sobre la pérdida de la capacidad agrícola de los suelos: efectos negativos sobre su diversidad microbiana.

La aplicación de diferentes tecnologías para la producción de cultivos que satisfagan las demandas de alimentación humana y animal en diferentes partes del mundo, han tenido un impacto negativo muy importante sobre las características fisicoquímicas y biológicas de los suelos utilizados para su cultivo, debido principalmente a la continua remoción de nutrientes y por el uso intensivo de fertilizantes y pesticidas asociados a la actividad agrícola, resultando en problemas serios de salinización (principalmente asociada a estrategias de irrigación y disponibilidad de agua con una cantidad de sales), acidificación y contaminación de los suelos (Mocali y Benedetti, 2010).

La pérdida de nutrientes y/o materia orgánica inducida por el hombre, ocurre si la agricultura es practicada en suelos pobres o moderadamente fértiles sin la aplicación de abonos o fertilizantes. Esta situación causa una degradación de los

suelos generando bajos rendimientos en la producción de cultivos. La pérdida de nutrientes en los suelos es un fenómeno generalizado y de gran importancia, sobre todo en países con prácticas agrícolas en las que son reducidas las cantidades de químicos (fertilizantes químicos, plaguicidas y herbicidas) aplicados al suelo y que están por debajo de las dosis recomendadas, sin que esto signifique la completa eliminación de su aplicación. Este tipo de prácticas tiene como objetivo por un lado, mantener los rendimientos haciendo énfasis en muchos casos en prácticas tradicionales y por otro, para reducir los costos asociados al cultivo, minimizar el impacto sobre el ambiente o bien debido a la posibilidad del establecimiento de regulaciones estrictas al uso de cierto tipo de pesticidas.

Los países desarrollados enfrentan también otra serie de problemas asociados a la aplicación de prácticas agrícolas intensivas a gran escala, en las que los rendimientos obtenidos dependen del uso de fertilizantes y pesticidas. Los efectos de las prácticas de manejo de suelos agrícolas aunadas a los factores naturales que causan también la alteración de sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, pueden tener un impacto muy importante sobre la actividad de las poblaciones microbianas presentes. El análisis de la diversidad microbiana presente en muestras de suelo utilizando estrategias dependientes e independientes de cultivo (**Figuras 2 y 3**), ha permitido obtener diversas evidencias del impacto de la actividad agrícola sobre la diversidad y actividad microbianas presentes (Escalante *et al.*, 2004; Vázquez, 2011).

Como ejemplo, un estudio de la variación estacional de la diversidad bacteriana detectada en una muestra de suelo agrícola experimental demostró variaciones importantes en la proporción de bacterias Gram-positivas, proteobacterias, nitrosporas, cianobacterias y bacterias verde-sulfurosas, asociadas a las etapas de arado, fertilización y cosecha, mediante análisis de secuencias de ADNr 16S amplificadas a partir del metagenoma del suelo, complementado el estudio con técnicas de cultivo tradicional, PLFA y por análisis de los perfiles totales de fragmentos de ADNr 16S por DGGE (Smit *et al.*, 2001). La caracterización por PFLA y la caracterización de la composición microbiana total de bacterias amonio-

oxidantes por DGGE, en zonas de alta a baja precipitación que son utilizadas para fines agrícolas con diferentes practicas de cultivo, demostraron un efecto negativo importante en suelos labrados convencionalmente sobre el PFLA y los perfiles de ADNr 16S totales, mientras que no mostró un efecto importante sobre la diversidad de bacterias amonio-oxidativas (relacionadas a *Nitrospora*) (Ibekwe *et al.*, 2002). El análisis de la complejidad genómica presente en el suelo para cultivo y determinada por la técnica de reasociación del metagenoma bacteriano extraído y desnaturalizado térmicamente, demostraron que la aplicación de fertilizantes causó una disminución de hasta un 96% en la diversidad genómica microbiana respecto a la determinada para suelos circundantes sin uso agrícola (Torsvik y Øvreås, 2002; Weisburg *et.al.*,1991).

Otro estudio como ejemplo del efecto del uso de herbicidas, tal como el glifosato e imazaquim, sobre la diversidad bacteriana asociada al rizoplasma y la nodulación de cultivos de soya analizada por la técnica de DGGE, demostró un efecto diferencial sobre la biomasa bacteriana manifestando que el glifosato es particularmente tóxico para bacterias relacionadas con *Herbaspirillum*, mientras que el imazaquim afecta preferencialmente a microorganismos relacionados con *Ralstonia*. El caso de la sensibilidad microbiana al glifosato, es de particular interés ya que este compuesto inhibe la actividad de la enzima 3-fosfoshikimato-1-carboxivinil transferasa codificada por el gen *aroA* (en *E. coli*) y que cataliza la reacción de shikimato-3-P a 5-enol-piruvil-shikimato-3-P (EPSP), en la vía común de síntesis de compuestos aromáticos. Es importante destacar que esta vía es una característica metabólica común en plantas y bacterias por lo que los efectos potenciales de este herbicida sobre la vía de síntesis de metabolitos aromáticos en bacterias pueden tener efectos muy importantes sobre la diversidad microbiana presente en suelos tratados con este compuesto (Herrmann y Weaver, 1999).

III.5. Estudio de la diversidad bacteriana del suelo

III.5.1. Métodos para el análisis de la diversidad microbiana por técnicas dependientes del cultivo

El punto de partida para el análisis de la diversidad bacteriana presente en una muestra ambiental por técnicas dependientes del cultivo microbiano es mediante un aislamiento inicial en medios de cultivo de los microorganismos presentes en la muestra con los nutrientes necesarios para su desarrollo y posteriormente la extracción del ADN bacteriano de dichos microorganismos. En la actualidad existen diferentes compañías que comercializan sistemas para la extracción de ADN microbiano total de diferentes fuentes, a partir de muestras de hasta 0.5 g y que permiten su obtención en menos de 1 hora. Los protocolos para la extracción del ADN de muestras ambientales se han optimizado desde sus orígenes. El uso de este tipo de sistemas de extracción asegura la obtención rápida de ADN bacteriano de buena calidad (alto peso molecular, no degradado y libre de contaminantes como ácidos húmicos).

La evaluación de la diversidad bacteriana presente en una muestra ambiental se realiza por el análisis de sus secuencias del ADNr 16S parciales o totales, amplificadas directamente del metagenoma por medio de primers específicos o universales y tipificadas por diferentes técnicas (**figura 2**), dentro de las que destacan por la frecuencia con las que son referidas en la literatura la técnica de análisis de restricción de ADNr 16S amplificado (ARDRA, por sus siglas en inglés) o las técnicas de electroforesis en gel en gradiente térmico o desnaturalizante (TGGE/DGGE, por sus siglas en inglés). La secuenciación (total o parcial, dependiendo de la técnica), de estos amplicones y su comparación contra una base de datos [base de datos de secuencias nucleotídicas no redundantes del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés; www.ncbi.nlm.nih.gov)], permite obtener la identidad o una filiación taxonómica del organismo a la que pertenece dicha secuencia (Tringe y Hugenholtz, 2008). A partir de la diversidad obtenida y de las relaciones filogenéticas que guardan estas secuencias con las de organismos conocidos o

con clonas ambientales, es posible realizar una inferencia de su papel en ese ambiente de acuerdo a la información existente en la literatura (Borneman *et al.*, 1996; Smit *et al.*, 2001).

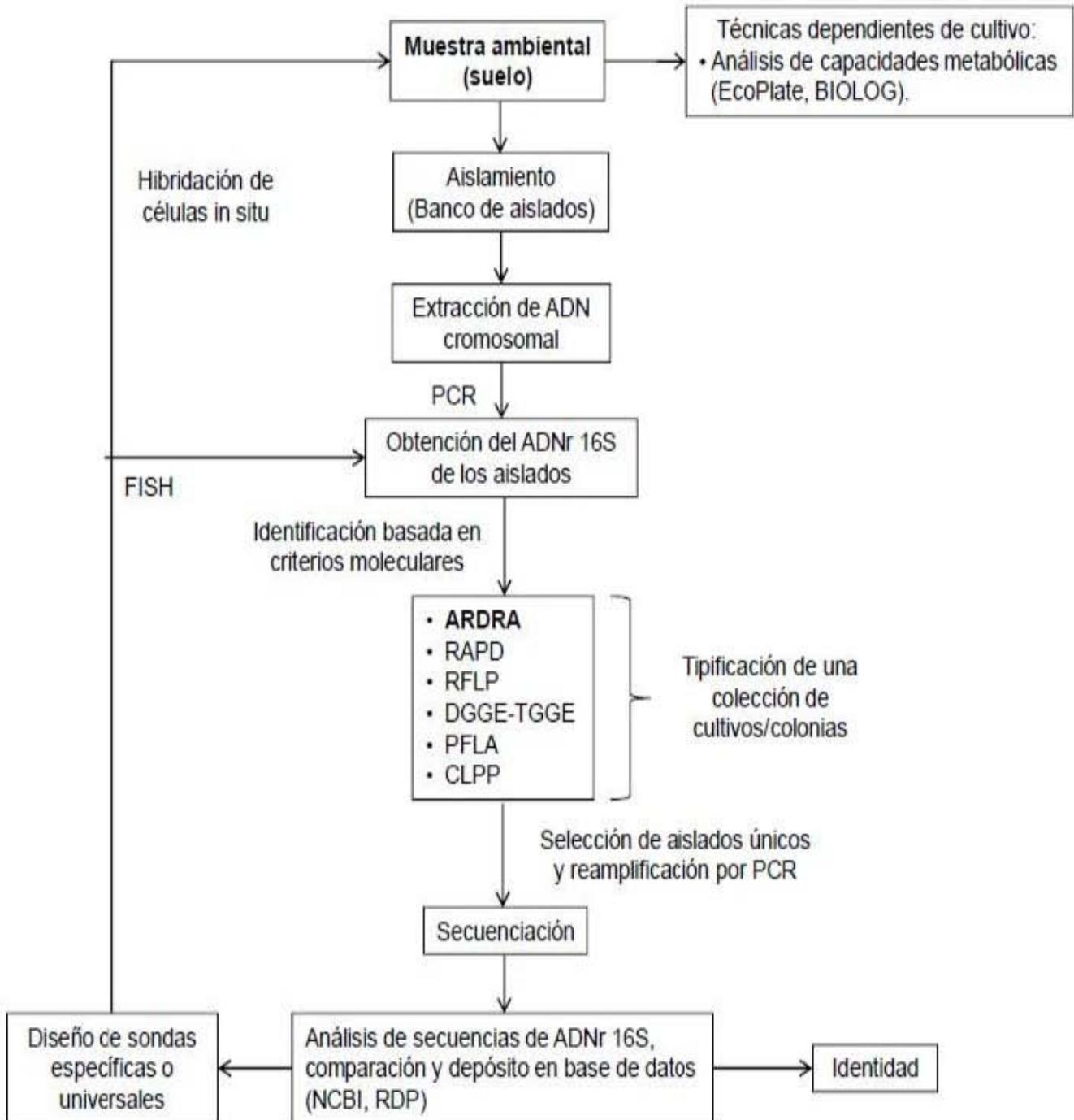


Figura 2. Estrategia del análisis de una muestra ambiental por técnicas dependientes del cultivo.

(Vázquez, 2011)

III.5.2. Métodos de estudio no dependientes del cultivo e implicaciones biotecnológicas

Las bacterias son un componente crucial de la biosfera debido a que catalizan procesos que mantienen la vida en la Tierra y son, por tanto, los motores de los ciclos biogeoquímicos (Torsvik y Øvreås, 2002). El estudio de la diversidad bacteriana y de los procesos en los que participa, es de gran importancia, no tan solo desde el punto de vista ecológico, sino también en el contexto agrícola y biotecnológico.

Desde siempre los microorganismos se han diferenciado con base a características fenotípicas, propiedades celulares observables y estructura de componentes celulares. Debido a que su cultivo es un prerrequisito para examinar dichas propiedades, la mayoría de los microorganismos no pueden ser caracterizados en su medio natural, por lo que se vuelve imposible determinar la diversidad bacteriana total de una muestra ambiental. Tradicionalmente los estudios para caracterizar la diversidad bacteriana en diferentes muestras ambientales se basan en la suposición de que las técnicas de cultivo permiten recuperar la mayor parte de los microorganismos en una muestra. Sin embargo, se ha demostrado ampliamente que estas técnicas dependientes del cultivo presentan una serie de limitaciones muy importantes y que sólo permiten obtener únicamente entre 0.1 y 10% de las bacterias en el ambiente (Escalante *et al.*, 2004).

Utilizando métodos moleculares se ha podido detectar una diversidad considerablemente mayor. Para explicar este fenómeno se han sugerido diversas hipótesis, dentro de ellas destaca que se desconocen los requerimientos nutricionales y las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de un gran número de grupos microbianos en su ambiente natural. Entre las posibles razones por las que los microorganismos no se expresan fuera de sus condiciones de crecimiento se encuentra que los requerimientos de sustratos están a concentraciones extremadamente altas o requieren de un conjunto de nutrientes específicos para su desarrollo. Es por ello que algunos autores sugieren que las

bacterias “no cultivables” sean llamadas “bacterias todavía no cultivadas”. Además, hay poca información sobre las relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que mantienen los miembros de una comunidad microbiana. También se ha propuesto que las bacterias no cultivables son microorganismos filogenéticamente similares a los cultivables, pero en un estado fisiológico que los hace recalcitrantes a ser cultivados. La base de esta explicación es que algunas bacterias cultivables pueden convertirse en viables, pero no cultivables en condiciones ambientales adversas, y revertirse a un estado cultivable al restaurarse las condiciones favorables para su crecimiento (McDougald *et al.*, 1998). No obstante, se han desarrollado técnicas alternativas de cultivo, por ejemplo, técnicas de microcultivo de células bacterianas individuales inmovilizadas y suplementadas con infusiones del suelo de origen, demostrando la capacidad de crecimiento de especies no cultivadas en placa (Keller y Zengler, 2004).

Este hecho plantea la siguiente pregunta: ¿Cuál es el significado de investigar la diversidad microbiana si está limitada a poder aislar organismos cultivables? En orden de sobrellevar estos problemas, varios métodos independientes del cultivo han sido desarrollados, entre los que podemos encontrar: el análisis de fosfolípidos en ácidos grasos (PLFA) y numerosas aproximaciones moleculares basadas en ADN y ARN. También existen ahora herramientas moleculares que permiten realizar la ingeniería genética molecular o tecnología del ADN recombinante (Escalante *et al.*, 2004), con ella es posible el aislamiento, la modificación y la caracterización del ADN de cualquier organismo.

El desarrollo de técnicas moleculares por análisis de patrones de bandeo para analizar productos de PCR también representaron una herramienta rápida y poderosa para el entendimiento de la dinámica y diversidad de las comunidades microbianas desde que la clonación y secuenciación mostraron ser técnicas de una tarea extensiva y cara a la vez para ser usadas rutinariamente para un conjunto grande de muestras. Sin embargo, el análisis de la diversidad bacteriana de diferentes muestras ambientales por secuenciación de los genes que codifican los ARNr 16S (ADNr 16S) amplificados directamente del metagenoma de

muestras ambientales, han mostrado la presencia de nuevos taxa bacterianos en los cuales no existen miembros que estén relacionados con representantes previamente cultivados (Handelsman, 2002; Keller y Zengler, 2004). Este resultado, sugiere que la diversidad bacteriana del suelo, está conformada tanto por grupos bacterianos cultivables, viables pero no cultivables y una gran diversidad de especies desconocidas.

Por tal motivo, la diversidad genética microbiana es comúnmente estudiada a través de numerosos métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que analiza la variabilidad de genes que codifican al ARNr 16S (para eucariotes es el ARNr 18S o también las regiones conocidas como ITS, Internal Transcribed Spacer) considerados como “cronómetros moleculares” porque están presentes en todos los microorganismos, tienen regiones bien definidas y conservadas para clasificación taxonómica y poseen suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos. Estos procedimientos, tal como la técnica de PCR, van de la mano con estas herramientas moleculares y se han propuesto para detectar directamente microorganismos en muestras ambientales y clínicas, basado en el análisis del ADN que codifica al ARN ribosómico (con un peso alrededor de 1500 pb.) y que permite identificar al microorganismo. Por ejemplo, para las bacterias existen los genes ADNr 16S y 23S y para hongos los genes 18S y 28S (Baker *et al.*, 2003; Rosas *et al.* 2004; Li *et al.*, 2009).

La elección del gen ADNr 16S para el diseño de PCR universales entre todas las secuencias conservadas de genes en bacterias se debió a varias razones: son genes que tienen más de una copia en el genoma de cada bacteria, están en la mayoría de los microorganismos de un mismo grupo, son secuencias muy conservadas a lo largo de la evolución bacteriana (con poca frecuencia de mutación), para su aplicación no se necesita tener información específica del microorganismo en estudio y facilita el diseño de primers comunes para detectar casi cualquier bacteria, debido a la disposición de los ADNr 16S que permite el diseño de tales primers complementarios de las regiones conservadas. Entre las

regiones conservadas se encuentran Intercaladas otras cuya secuencia presenta variaciones entre los distintos géneros y especies de bacterias y cuyo análisis se utiliza para identificarlas. Finalmente, existen también regiones hipervariables que permiten diferenciar entre los distintos miembros de una misma especie y que se emplean para tipificación molecular (Baker *et al.*, 2003; Chakravorty *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009).

A través de la secuenciación de los productos obtenidos se puede identificar el microorganismo presente en una muestra mediante comparación de su secuencia de bases con las depositadas en registros públicos internacionales. Aunque las bacterias presentes en distintas muestras sean diferentes, el tamaño del amplicón obtenido será el mismo, pero su secuencia será distinta. Esta tecnología es fundamental para comprender un número importante de procesos biológicos, y para el estudio de la diversidad biológica. Por esto, el uso de técnicas moleculares para la detección y análisis de microorganismos en el medio ambiente ha ido en aumento constante (Escalante *et al.*, 2004; Smit *et al.*, 2001).

Para obtener la mayor cantidad de información posible, el análisis de la diversidad microbiana se debe de realizar utilizando un enfoque polifásico que abarque la parte dependiente y la no dependiente de cultivo. Es por lo anterior que los estudios actuales pretenden caracterizar tanto a los microorganismos cultivables como a los no cultivables, siendo en estos últimos el análisis basado en el metagenoma, por medio de técnicas moleculares y comparaciones filogenéticas (**figura 3**). Esto se complementa en algunos casos con el análisis de las propiedades metabólicas de la muestra, como la capacidad de utilización de distintas fuentes de carbono o bien la determinación de actividades enzimáticas específicas a partir de suspensiones de muestras de suelo por ejemplo, el uso de microplacas para determinar la capacidad de utilización de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno por los microorganismos presentes, o mediante la determinación de actividades enzimáticas específicas a partir de suspensiones de muestras de suelo (Escalante *et al.*, 2004).

El estudio de la diversidad bacteriana con estas técnicas ha permitido obtener información sobre la composición y estructura de poblaciones y comunidades bacterianas, establecer el impacto de los factores ambientales sobre la diversidad bacteriana, y diseñar marcadores con fines de diagnóstico e identificación tanto de bacterias cultivables como no cultivables (Torsvik y Øvreås, 2002). El análisis de las secuencias de los genes que codifican los ARN ribosomales 16S (ADNr 16S) ha permitido establecer firmas moleculares a varios niveles taxonómicos, utilizadas como la base de una identificación bacteriana por comparación filogenética (Theron y Cloete, 2000). También se han utilizado para caracterizar la diversidad bacteriana en diferentes tipos de suelos (Borneman *et al.*, 1996; Smit *et al.*, 2001).

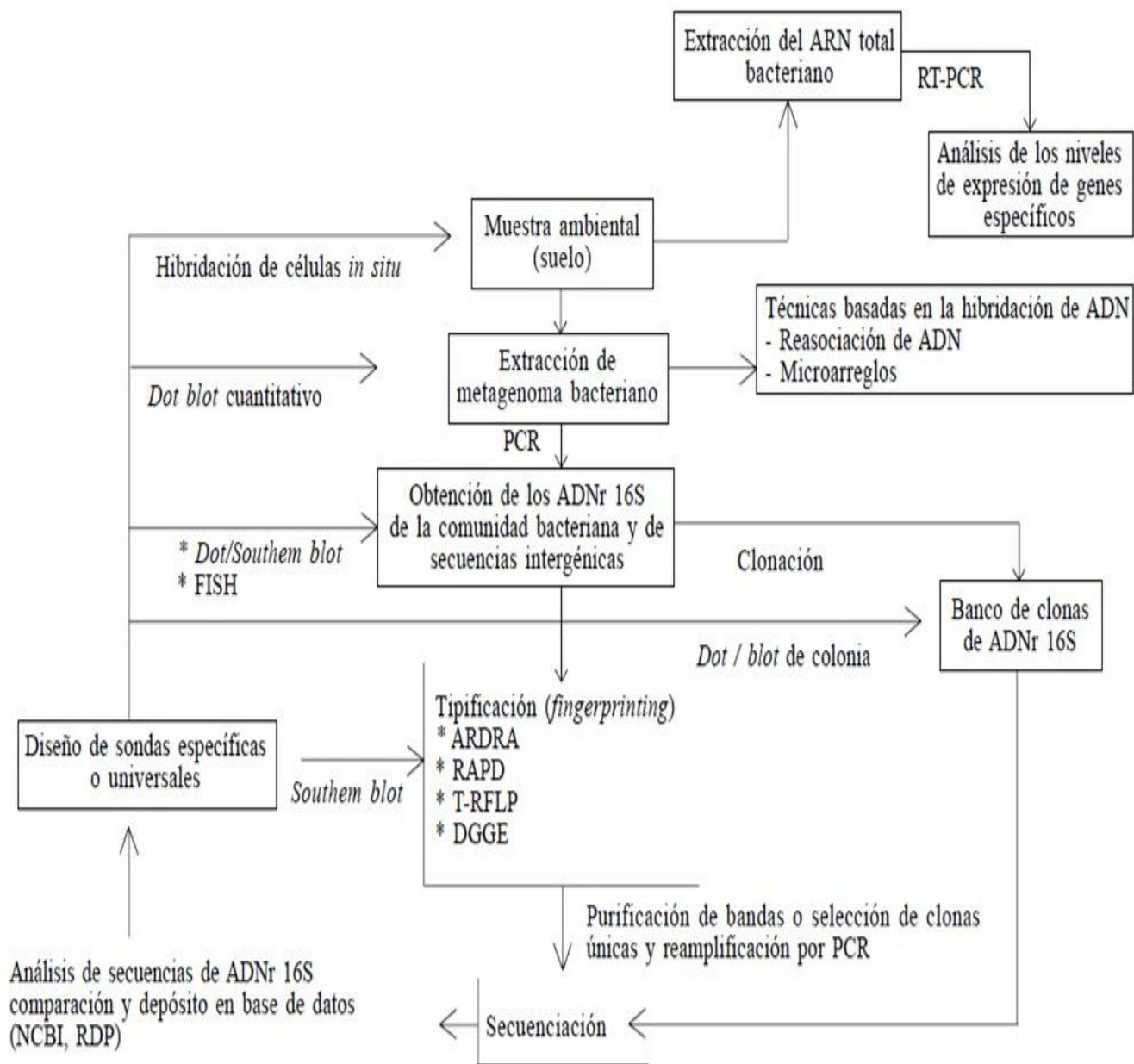


Figura 3. Técnicas moleculares no dependientes del cultivo microbiano utilizadas en el análisis de la diversidad bacteriana de suelos (Escalante *et al*, 2004).

III.5.3. Electroforesis en gradiente en gel desnaturalizante (DGGE)

Antes del DGGE, los estudios de la comunidad microbiana presente en muestras ambientales se habían logrado principalmente por metodologías dependientes del cultivo (**figura 4**), a través de la creación de bancos de clonas de ADNr 16S y su posterior identificación por secuenciación y comparación contra la base de datos no redundantes del GenBank. Ésta última aproximación es una tarea muy laboriosa y costosa de realizar.

Una alternativa para el análisis de la diversidad presente en comunidades microbianas a partir de muestras ambientales fue la aplicación de la técnica de DGGE. La principal hipótesis en la que se basa ésta técnica de DGGE cuando se aplica al análisis de comunidades bacterianas, es que las moléculas de ADN de cadena doble de la misma longitud pero que difieren en su secuencia, pueden ser separadas a medida que migran a lo largo de un gel de poliacrilamida que contiene un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturalizantes, que normalmente suele ser una mezcla de urea y formamida.

La aplicación de esta técnica al estudio de comunidades microbianas inicia con la extracción del ADN total de la comunidad bacteriana a partir de la muestra en estudio, seguida por una amplificación mediante PCR de un fragmento del ADN 16S de cada uno de los miembros de la comunidad, utilizando primers específicos o universales dependiendo del alcance del estudio (análisis de la diversidad total o de grupos microbianos específicos). Posteriormente, los fragmentos amplificados se someten a dicha electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones que permiten la separación de los fragmentos del mismo tamaño en función de su secuencia. La desnaturalización parcial de las moléculas de ADN de doble cadena en cadena sencilla tiene como consecuencia el cambio en su movilidad electroforética.

Teóricamente, cada banda DGGE corresponde a una sola unidad taxonómica operativa (OTU), donde el patrón total de bandas es un reflejo de la riqueza de especies y la diversidad de la comunidad (Gafan y Spratt, 2005). Estos perfiles se

caracterizan por el número, posición (presencia o ausencia de bandas particulares) e intensidad relativa de las bandas, donde cada banda representa un grupo taxonómico diferente. De este modo el método no sólo permite la identificación de bacterias, sino también la cuantificación relativa de las mismas en la muestra.

Se ha estimado que el 50% de las posibles secuencias que pueden darse en un fragmento de 500pb podrían diferenciarse utilizando esta técnica, si bien, este porcentaje puede aumentarse hasta el 100% insertando en el extremo 5' de los fragmentos amplificados una secuencia de 40-50pb ricas en GC. La inserción de este fragmento puede llevarse a cabo mediante clonación o PCR.

TÉCNICAS	Comunidades	Género	Especie	Subespecie	Cepa
Fenotípicas (clásicas, API, Biolog, LOPAT...)					
Secuenciación ADN					
Sondas ADN					
Secuenciación ARNr					
Perfil ácidos grasos					
Hibridaciones ADN-ADN					
Patrón electroforético proteínas totales					
Serológicas					
Fagotipado					
Amplificación ADN (específica, RADP, ITS, AP-PCR, rep-PCR, AFLP)					
Ribotipado					
PFGE					
RFLP					
Macromatrices					
Biochips					
FISH					
DGGE, TGGE					

Figura 4. Resolución taxonómica de las principales técnicas de caracterización bacteriana.

(Modificado de Pallas *et al.*, 2008).

El estudio de la diversidad bacteriana y de los procesos en los que participa, es por lo anterior de gran importancia, no tan sólo desde punto de vista ecológico, sino también en el contexto agrícola y biotecnológico. Se estima que la fracción de la comunidad bacteriana del suelo que puede ser cultivada está entre 0.1 y 10% del total; utilizando métodos moleculares se ha podido detectar una diversidad considerablemente mayor (Smit *et al.*, 2001; Escalante *et al.*, 2004).

IV. Justificación e Hipótesis

Justificación

Dado que no se han realizado estudios recientes de la composición bacteriana del suelo para cultivo de caña de azúcar y las implicaciones biotecnológicas que podrían asociarse a los microorganismos presentes en dicho suelo, este estudio es parte de la primera aproximación que se lleva a cabo para obtener información sobre esa diversidad bacteriana y del perfil metabólico asociado, presentes en un suelo vertisol utilizado para el cultivo de caña de azúcar, ubicado en la localidad conocida como Lagunillas, Municipio de Tlalquitenango, Estado de Morelos, permitiendo con esto: (1) la identificación de aquellos grupos que se puedan considerar como dominantes e indicadores del tipo de suelo, de las etapas asociadas al ciclo de cultivo y de las variaciones en el perfil fisicoquímico del suelo. (2) La integración de la información resultante de este trabajo y de los análisis llevados a cabo en trabajos anteriores involucrados en este estudio, permitirá elaborar hipótesis sobre la importancia que tiene la presencia de los microorganismos identificados en el suelo utilizado para el cultivo de caña de azúcar; y (3) la creación de una colección bacteriana de referencia para este tipo de suelo.

Hipótesis

Las actividades agrícolas que conforman un ciclo nuevo de cultivo de caña de azúcar afectarán la composición de la diversidad bacteriana cultivable y no cultivable de microorganismos mesófilos aerobios y facultativos, así como sus propiedades metabólicas asociadas al suelo utilizado para su cultivo.

V. Objetivos

Objetivo General

Estudiar la fluctuación de la diversidad bacteriana no cultivable y cultivable, así como su perfil metabólico global presente en el suelo utilizado para cultivo de la caña de azúcar durante las primeras cuatro etapas de su cultivo.

Objetivos particulares

- Aislar, purificar e identificar la diversidad microbiana cultivable presente en la muestra de suelo T3 para completar el análisis previo del cultivo de la caña de azúcar en estudio.
- Tipificar la diversidad microbiana cultivable por la técnica ARDRA e identificación de tipos únicos
- Extraer el ADN metagenómico bacteriano de cada una de las muestras de suelo, representantes de las primeras etapas asociadas al cultivo de la caña.
- Analizar de la diversidad no cultivable por medio de la técnica de DGGE, identificación de bandas únicas, secuenciación, análisis de secuencias y asignación de identidad.
- Analizar el perfil metabólico de cada etapa del cultivo de la caña de azúcar, por medio del sistema EcoPlate™ de Biolog.
- Integración de la información obtenida por las aproximaciones cultivables y no cultivables.

VI. Metodología

VI.1. Análisis de la diversidad bacteriana por métodos moleculares no dependientes del cultivo.

En la **figura 5** se muestra el esquema general de trabajo que se siguió durante este proyecto para la microbiota no cultivable de las muestras del suelo de la caña de azúcar analizadas.

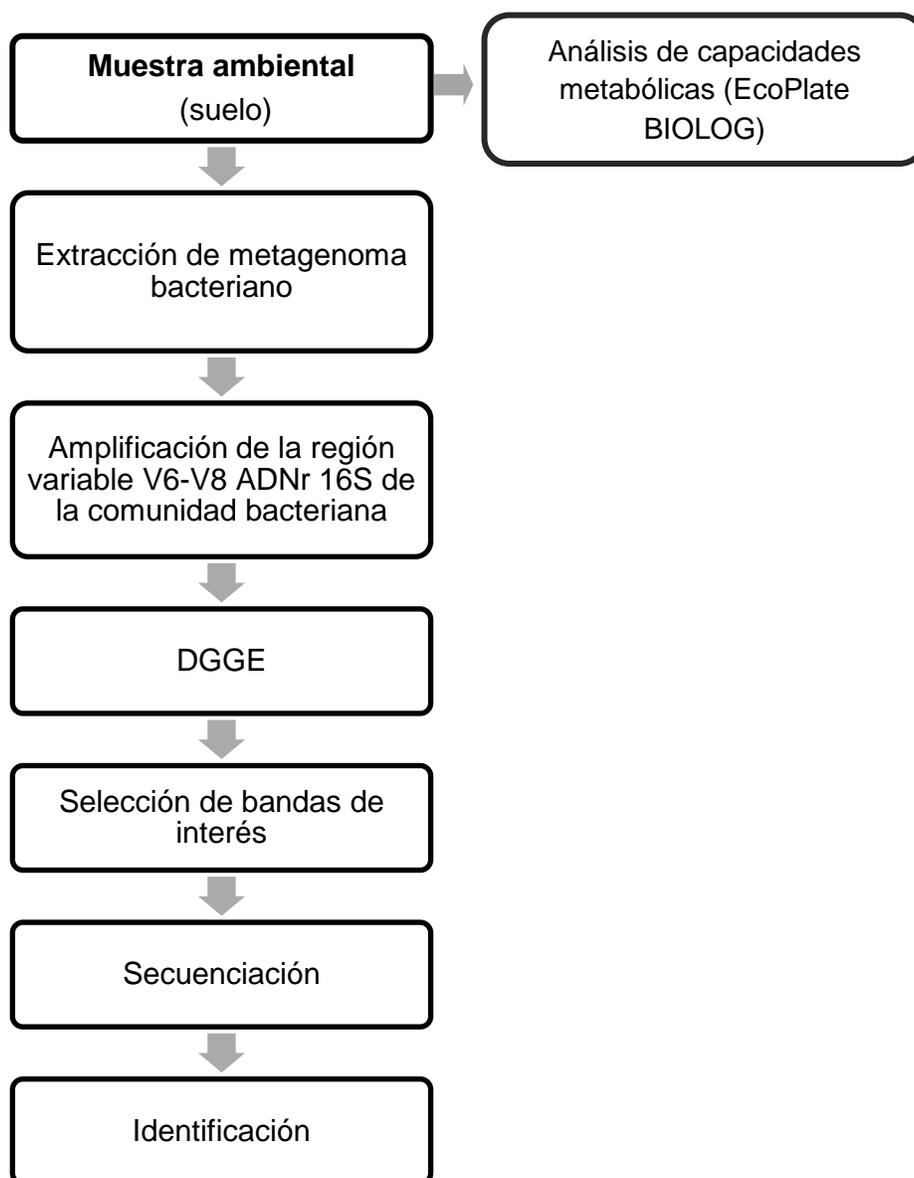


Figura 5. Estrategia del análisis de la muestra ambiental por técnicas no dependientes del cultivo.

VI.2. Análisis de la diversidad bacteriana por técnicas moleculares dependientes del cultivo.

En la **figura 6** se muestra el esquema general de trabajo que se siguió durante este proyecto para la microbiota cultivable de las muestras del suelo de la caña de azúcar analizadas.

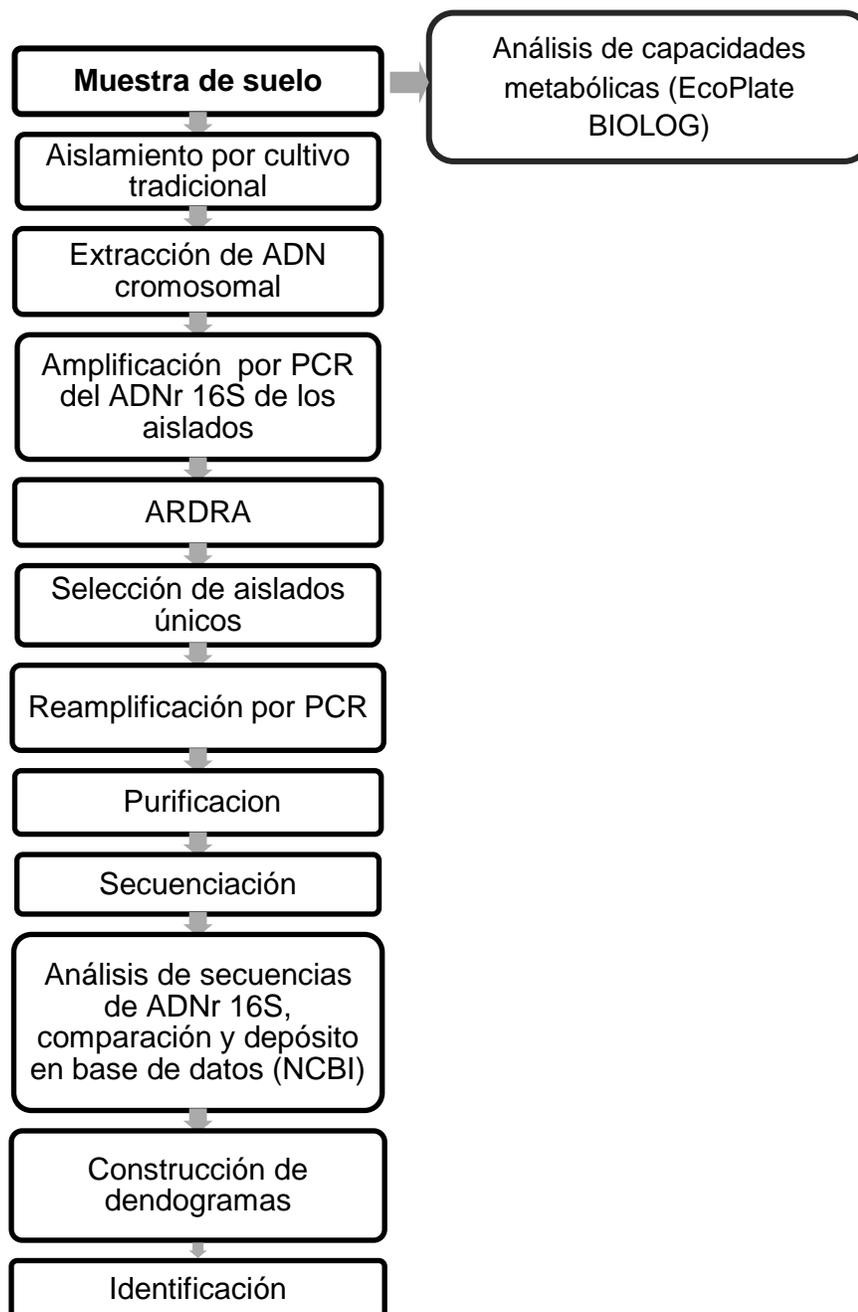


Figura 6. Estrategia del análisis de la muestra ambiental por técnicas dependientes del cultivo

1. Toma de muestras

Las muestras de suelo se tomaron de una parcela utilizada para cultivo de caña de azúcar ubicada en la localidad de Lagunillas, Municipio de Tlalquitenango, Morelos, la cual posee un tipo de suelo vertisol. Se tomaron 5 muestras de alrededor de 1 Kg de suelo en distintos puntos de la misma y se mezclaron homogéneamente; el suelo se extrajo a 30cm de profundidad con una barreta. La muestras de suelo contenían: **(T0; 19/01/10)** suelo recién arado, **(T1; 25/01/10)** Después de siembra y riego, **(T2; 12/02/10)** Después de aplicación de herbicida Gesapax H 375 de Syngenta, **(T3; 18/05/10)** con fertilizante de formulación cañera 18:4.5:3 y parte de la planta. Se transportaron al laboratorio y se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

2. Metodología no-dependiente del cultivo

2.1. Extracción del metagenoma bacteriano

Para la extracción del ADN metagenómico de cada muestra se utilizó el sistema de extracción PowerMix Soil DNA Isolation kit (Mobio Laboratories Inc.) siguiendo las especificaciones del fabricante (<http://www.mobio.com/powersoil-dna-isolation-kit.html>). El principio de éste consiste en la suspensión en un amortiguador de las partículas de suelo con la finalidad de dispersarlas y proteger los ácidos nucleicos de la degradación enzimática. Mediante una fuerza mecánica y la adición de dodecilsulfato de sodio (SDS) una solución detergente aniónica que lleva a cabo la lisis de las células presentes en la muestra. El SDS rompe los ácidos grasos y lípidos asociados a la membrana de la célula permitiendo extraer el ADN. Otra serie de agentes precipitantes de material inorgánico y orgánico que no era propiamente ADN impide la contaminación y la reducción de la pureza del ADN metagenómico. El ADN liberado se captura en un filtro de silica dentro de una columna eliminando sustancias húmicas (partículas que dan un color café característico de las muestras). El ADN se enjuaga y se recupera en un amortiguador.

2.2. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

Esta técnica es recientemente utilizada como técnica de análisis de amplificadas del gen 16S de una muestra que resultan en un perfil de bandeo característico en un gel de poliacrilamida en gradiente desnaturizante (generalmente formamida y urea). Tiene como principio el que los fragmentos de ADN amplificadas por PCR son separados de acuerdo a su información de secuencia, principalmente su contenido en guanina-citosina (GC), los productos de PCR con alto contenido en GC migran en el gel a zonas con alta concentración del agente desnaturizante, en cambio las que poseen un bajo contenido de GC se resuelven en la zona del gel con baja concentración del agente (Dolores Martínez, 2009). Este procedimiento fue realizado por parte del M. en B. José Félix Aguirre Garrido en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, en el Departamento de Sistemas Biológicos, laboratorio de Ecología Molecular.

Para cada una de las muestras de suelo se llevó a cabo la amplificación de los productos de extracción del metagenoma mediante la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando como marcador molecular la región variable V6-V8 del gen ADNr 16S. La región se amplificó usando el par de primers: **GC 968 Forward** [5'-GCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGAACGCGAAGAA CCTTACC-3'] y el **UNI 1401 Reverse** [5'- GCGTGTGTACAAGACCC -3']. Estos primers son ampliamente utilizados en el análisis DGGE de consorcios microbianos y se afirma son universales para la detección de las eubacterias (Heuer *et al.*, 1997, Zoetendal *et al.*, 1998; Yu y Morrison, 2004; Aguirre, 2005).

El volumen final de cada mezcla de reacción de PCR fue de 25 μ L. Los volúmenes y concentraciones para cada mezcla de reacción de amplificación se describen a continuación:

Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR para la región V6-V8 del ADNr 16S

Componentes de la reacción	Concentración final	25 µl de reacción
Agua MQ	c.b.p	15.80 µl
Amortiguador 10x	1 x	2.50 µl
MgCl ₂	2 Mm	2.5 µl
dNTP's	10 mM de cada dNTP	1 µl
Forward GC968	10 pmol/µl	1.0 µl
Reverse 1401	10 pmol/µl	1.0 µl
Taq DNA polimerasa	1 U	0.2 µl
DNA metagenoma	Variable	1.0 µl

Los parámetros para los ciclos de amplificación del PCR que se llevaron a cabo en un termociclador fueron como a continuación se describen:

Desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos de amplificación que abarcaron: desnaturalización, a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 20s, extensión 72°C por 40s; finalmente un ciclo de extensión final a 72°C por 7 min.

2.2.1. Preparación del gel con gradiente de desnaturalización

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%, empleando como solución desnaturalizante urea:formamida, con las condiciones de preparación descritas en Aguirre, 2005. A continuación se presenta una tabla con los rangos de porcentajes de desnaturalización, mostrando el porcentaje utilizado en este trabajo que fue de 40-60%.

Tabla 4. Porcentaje de solución desnaturalizante para el gel de DGGE

Desnaturalizante urea y formamida (%)	Volumen final (mL)	Desnaturalizante 0 % (mL)	Desnaturalizante 100 % (mL)	TEMED µL	APS µL
0	6	6	0	6	20
40	12	7.20	4.8	12	45
60	12	4.90	7.10	12	45

2.2.2. Preparación del gel

El procedimiento para la preparación del gel se describe en Aguirre, 2005; proceso que involucra la preparación del gel de poliacrilamida con el gradiente desnaturizante y la carga de las muestras en los pozos del gel.

Los productos de amplificación de la región de V6-V8 del gen ADNr 16S se prepararon mezclándose con amortiguador de carga TAE 1X. El gel se corrió ajustando la fuente de poder a 200V durante 5 min y posteriormente a 85V por 16 horas.

2.2.3. Tinción, revelado y conservación.

Se colocó el gel en una charola metálica, se fijó con una solución de Carlos 8X (200 mL de etanol al 96% con 10 mL de ácido acético glacial), agitándose a 26 rpm durante 3 min. Se llevó a cabo el proceso de tinción con una solución de nitrato de plata (al 0.2% en solución fijadora Carlos 8X) durante 10 min a 26 rpm. Para el proceso de revelado se empleó una solución de hidróxido de sodio al 1.5% con 10 mg de borohidruro de sodio y 750 µl de formaldehído. Finalmente se llevaron a cabo lavados con agua destilada y el gel se sumergió en una solución de preservación de Carlos (50 mL de etanol 96% con 20 mL de glicerol y 130 mL de agua destilada) para su conservación. El secado se llevó a cabo a 37°C durante 24 horas.

2.3. Secuenciación de las bandas de DGGE

A partir del análisis del gel obtenido se seleccionaron alrededor de 26 bandas, éstas se cortaron y purificaron empleando el sistema Ultrafree-DA columns (Millipore Corp.). Las muestras obtenidas fueron utilizadas como templado para ser secuenciadas empleando el primer **UNI 1401 Reverse** en la Unidad de Secuenciación del IBT, UNAM. Las secuencias obtenidas fueron comparadas contra las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank para una identificación preliminar, haciendo uso del programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, por sus siglas en inglés)

3. Metodología dependiente del cultivo

3.1. Determinación de bacterias mesofílicas aerobias

3.1.1. Diluciones.

A partir de 10 g de la muestra correspondiente de suelo, se disolvió en 90 mL de agua peptonada estéril (Difco) al 0.1% (por triplicado). Después de homogenizar, se continuaron realizando diluciones decimales seriadas en tubos de ensaye con 9 mL del mismo diluyente, hasta obtener una dilución de 10^{-7} .

3.1.2. Siembra por extensión en superficie.

Se tomaron 0.1 mL de cada dilución (por duplicado para cada serie de diluciones) y se inocularon en agar triptona-soya (TSA) suplementada con 3.5 mL de cicloheximida (Fluka) como inhibidor de hongos, por cada 500 mL de medio estéril. Se extendió superficialmente mediante perlas de vidrio estériles. La incubación se hizo a 35 °C durante 24 horas.

3.1.3. Aislamiento y Purificación.

Se seleccionaron las placas de la dilución que presentó de 25 a 250 UFC/mL; se seleccionaron al azar alrededor de 100 UFC y se aislaron en una nueva placa de TSA. Cada aislado se inoculó en tubos con 3 mL de caldo soya triptona más cicloheximida y se incubó a 30°C por 24 horas. Posteriormente, aquellas colonias puras se resembraron en TSA, realizando una estría única. Se incubaron a 37°C por 24 horas.

3.1.4. Mantenimiento en Ultracongelación.

A partir del crecimiento en TSA se realizó una suspensión masiva en 3 mL de caldo triptona soya o caldo infusión cerebro corazón (BHI), según fuera el caso, transfiriéndose 1 mL de la suspensión a criotubos adicionados con 1 mL de glicerol 50% (Baker) estéril para su posterior conservación a -70°C.

3.2. Extracción de ADN cromosomal

Las cepas fueron reactivadas en 3 mL de caldo BHI incubando a 37°C por 24 horas. Para la extracción del ADN cromosomal se utilizó un sistema de extracción UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories), siguiendo indicaciones del protocolo (<http://www.mobio.com/microbial-dna-isolation/ultraclean-microbial-dna-isolation-kit.html>). El principio de este sistema consiste en la lisis de las células y solubilización del ADN por combinación de detergente y fuerza mecánica. El ADN que se libera se captura en un filtro de sílica dentro de una columna, se enjuaga y se recupera en un amortiguador. Para verificar la calidad del ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (inciso 3.4).

3.3. Amplificación por PCR de los genes ADNr 16S

El ADN extraído se empleó como templado para la amplificación por PCR de los ADNr 16S bacterianos (tamaño alrededor de 1.5 kb) procedentes de la muestra; haciendo uso de un termociclador BIO-RAD My Cyclor (V 1.065) y empleando como enzima *TaqDNA polymerase* (Fermentas). Los primers fueron **fD1**: [5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'] y **rD1**: [5' CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'] (Weisburg *et al.*, 1991). Se ajustaron las condiciones de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C por 5 min, 30 ciclos de amplificación: 95°C durante 1 min, 45°C durante 1.5 min, 72°C por 1.30 min, y un ciclo de elongación final durante 5 min. Se verificó la presencia del producto en un gel de agarosa 1% (inciso 3.4).

Para la extensión, al observarse tamaños de 1.5 kbp de los fragmentos de PCR, se utilizó un tiempo de 1.5 min para permitir que la polimerasa trabajase adecuadamente; tomando en consideración lo descrito por Henegariu (1997), que establece que para un producto de 1 kbp, 1 min en el tiempo de extensión es suficiente, si es de 2 kbp, 2 min, y si es menos, se hace la conversión equivalente.

En la **tabla 5** se muestra cada uno de los componentes para la mezcla de reacción de PCR.

Tabla 5. Condiciones para PCR (cálculos para 50 µL en cada tubo de reacción)

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (1 rxn)
Taq Buffer (KCl)	10X	1X	5.0 µL
MgCl₂	25 mM	2.5 mM	5.0 µL
dNTPs*	10 mM (c/u)	200 µM	1.0 µL
Oligo forward	10 µM	0.12 µM	0.6 µL
Oligo reverse	10 µM	0.12 µM	0.6 µL
H₂O	Aforo a 50 µL	-	36.3 µL
Enzima	5 U/µL	2.5 U	0.5 µL
Templado ADN	0.1mg/ml	~0.1mg genómico (máximo 500ng; de bacteria de 1 a 10ng y si es plásmido de 0.1 a 1ng)	1.0 µL

*La concentración de los dNTPs a 10mM, se refiere a la suma de los 4 dNTPs, y cada uno está a 2.5mM.

3.4. Electroforesis en gel de agarosa

La realización de la electroforesis se llevó a cabo para corroborar la calidad y pureza los productos obtenidos después de: la extracción del ADN cromosomal, los productos obtenidos por PCR y después de su purificación.

Se preparó el gel de agarosa al 1% (p/v) de concentración, fundiendo agarosa grado electroforesis (BioRad) en un amortiguador TBE 1X (89 mM Tris base, J.T. Baker; 89 mM de ácido bórico, Sigma; 2 mM EDTA, BioRad; ajustando a pH 8). Una vez a temperatura de 40°C, se le adicionó a la solución 4 µL de bromuro de etidio 0.04% como revelador por cada 25 mL de solución de agarosa. Sobre una cámara de electroforesis con peines, se depositó la solución de agarosa y se dejó enfriar. Una vez solidificado el gel y formados los pozos se cubrió totalmente con amortiguador TBE 1X, para posteriormente depositar en cada uno de ellos la cantidad de muestra necesaria.

Con la cantidad apropiada de colorante para analizar la muestra, se mezclaron 3 μL de colorante de carga Loading buffer 10X (Fermentas) por cada 5 μL de muestra. Se depositaron en el primer pozo del gel 2 μL de un marcador de peso molecular de ADN (O'GeneRuler, Fermentas) de 1 kbp listo para usar, para verificar el tamaño de los productos analizados en el mismo. Una fuente de poder permitió que las muestras migraran a través del gel, bajo condiciones de 1 a 10 V/cm de gel (100-150 volts). Los resultados se revisaron en un transiluminador de luz ultravioleta donde fue depositado el gel.

3.5. ARDRA e identificación de aislados únicos

Esta técnica se basa en que cada uno de los productos de amplificación por PCR del gen ADNr 16S obtenidos de una comunidad bacteriana se sometan a digestiones enzimáticas realizadas por endonucleasas de restricción; las cuales al ser analizadas en una electroforesis en gel de agarosa resulten en un perfil de bandas característico (Endlich y Linn, 1981) Para ello, se determinó la concentración del ADN con equipo espectrofotómetro (NanoDrop, 200C Spectrophotometer, Thermo Scientific), para estandarizar la concentración en las digestiones. Los amplicones de tamaño alrededor de 1.5 kbp, se sometieron a un análisis de los perfiles de restricción del ADNr 16S amplificado (ARDRA, por sus siglas en inglés).

Con la enzima Bsp143I (Sau3AI; Fermentas; **tabla 6**), las reacciones se incubaron durante 2 horas a 37°C, posteriormente adicionando 3 μL de colorante de corrida (0.03% de azul de bromofenol, 0.03% de cianol:xileno y 60% de glicerol) para detener la reacción. Con la finalidad de observar los patrones de restricción, se realizó una electroforesis en gel de agarosa bajo las condiciones establecidas en el inciso 3.4, modificando la concentración de la solución de agarosa al 2%, depositando un volumen de 23 μL de mezcla de reacción con el colorante en total y utilizando un marcador de peso molecular Ladder de 1000 pares de bases (Fermentas).

Tabla 6. Mezcla de reacción para las digestiones de productos de PCR.

Reactivo	Concentración	Volumen para 20 µL de reacción
DNA amplificado	0.1-0.5 µg/µL	x µL
Enzima Bsp143I	10U/ µL	0.1 µL
Buffer Bsp143I	10X	2.0 µL
H₂O	-	Aforo a 20 µL

3.6. Purificación de los amplificados

A partir del patrón de bandeo generado del total de los aislados analizados, se construyó una matriz binaria considerando la presencia o ausencia de bandas obtenidas en cada caso. Dicha matriz se empleó para la construcción del dendograma por el método de UPGMA.

Se eligió un representante de los aislados que presentaron un patrón de restricción único para ser reamplificados (utilizando las mismas condiciones de amplificación del gen ribosomal 16S descritas previamente; inciso 3.3), purificados y enviados a secuenciar. Se usó el sistema de purificación PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen). El sistema se basa en la unión selectiva de la cadena de ADN a una membrana de sílica en presencia de sales caotrópicas en una columna dentro de un tubo. El producto de PCR es mezclado con un amortiguador para ajustar las condiciones para su posterior unión a la columna. El ADN se une a la membrana de sílica en la columna y las impurezas son removidas por un lavado minucioso con un buffer de lavado. Después el ADN es eluido en un volumen de amortiguador que es bajo en sales.

3.7. Análisis de secuencias

3.7.1. Secuenciación de aislados únicos

La secuenciación de los aislados se llevó a cabo en la Unidad de Secuenciación y Síntesis de Oligos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing. Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730. Para secuenciar se utilizó el producto de PCR a concentraciones de 100 ng, y los primers fD1 y rD1 a una concentración de

10 pmol, para cada ADNr de cada aislado seleccionado, con la finalidad de obtener la secuencia completa del gen. Los resultados se obtuvieron en formato *.ab1., fueron visualizados en el programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) evaluando la calidad de la secuencia.

3.7.2. Búsqueda de identidad de las secuencias de ADNr 16S

Empleando el programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) y las secuencias obtenidas para cada aislado, se ensamblaron usando la aplicación ClustlalW (alineamiento múltiple de ácidos nucleicos y secuencias de proteínas) incluida en el programa. Las secuencias se compararon con las de la base de datos de secuencias nucleotídicas no redundantes del GeneBank mediante el programa BLASTn, incluida en el sitio del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para conocer su identidad, la cual se asignó considerando el porcentaje de identidad más alto, porcentaje de cobertura y un valor de expectancia (e-value) cercano o igual a 0.

3.8. Perfil metabólico. Preparación de placas EcoPlate™

Se prepararon diluciones seriales de 12 mL a partir de 10 g de las muestras de suelo fresco en agua peptonada 0.1% estéril. Tomando los resultados de cuenta en placa de UFC's, se utilizó la dilución representativa por muestra para inocular las placas EcoPlate™ (BIOLOG) a una concentración estandarizada de 10^5 UFC/g suelo. Se transfirieron 100 μ L de la dilución a cada uno de los 96 pozos de la placa.

La placa contiene 31 sustratos diferentes con un control sin fuente de carbono, donde cada pozo de estas placas posee el indicador violeta de tetrazolio, el cual es reducido durante el proceso de degradación del sustrato causando el desarrollo de un color morado cuya intensidad medida espectrofotométricamente es proporcional a la capacidad de degradación de una determinada fuente de carbono. Las lecturas se realizaron en un equipo lector de placas (Versanax Tunable Microplate reader, Molecular Devices) a 590 nm, cada 24 horas durante 5 días.

VII. Resultados y Discusión

Se muestra en la **figura 7** un esquema que comprende las etapas del ciclo de producción de la caña de azúcar. En dicho esquema, se señalan en rojo las etapas de cultivo de la caña de azúcar que fueron objeto de estudio en este proyecto, comprendiendo la etapa T0, que corresponde al suelo vertisol recién arado; la etapa T1 que corresponde a la siembra y primer riego de la planta; la etapa T2, en la cual se adicionó el herbicida; la etapa T3, que posee el fertilizante y de la cual fueron extraídas las muestras de suelo para el análisis comprendido en este trabajo. En la **figura 8** se observa la ubicación geográfica de la zona de muestreo, y en la **figura 9** se muestran imágenes de la zona durante la toma de muestra del T0, T1, T2 y T3.

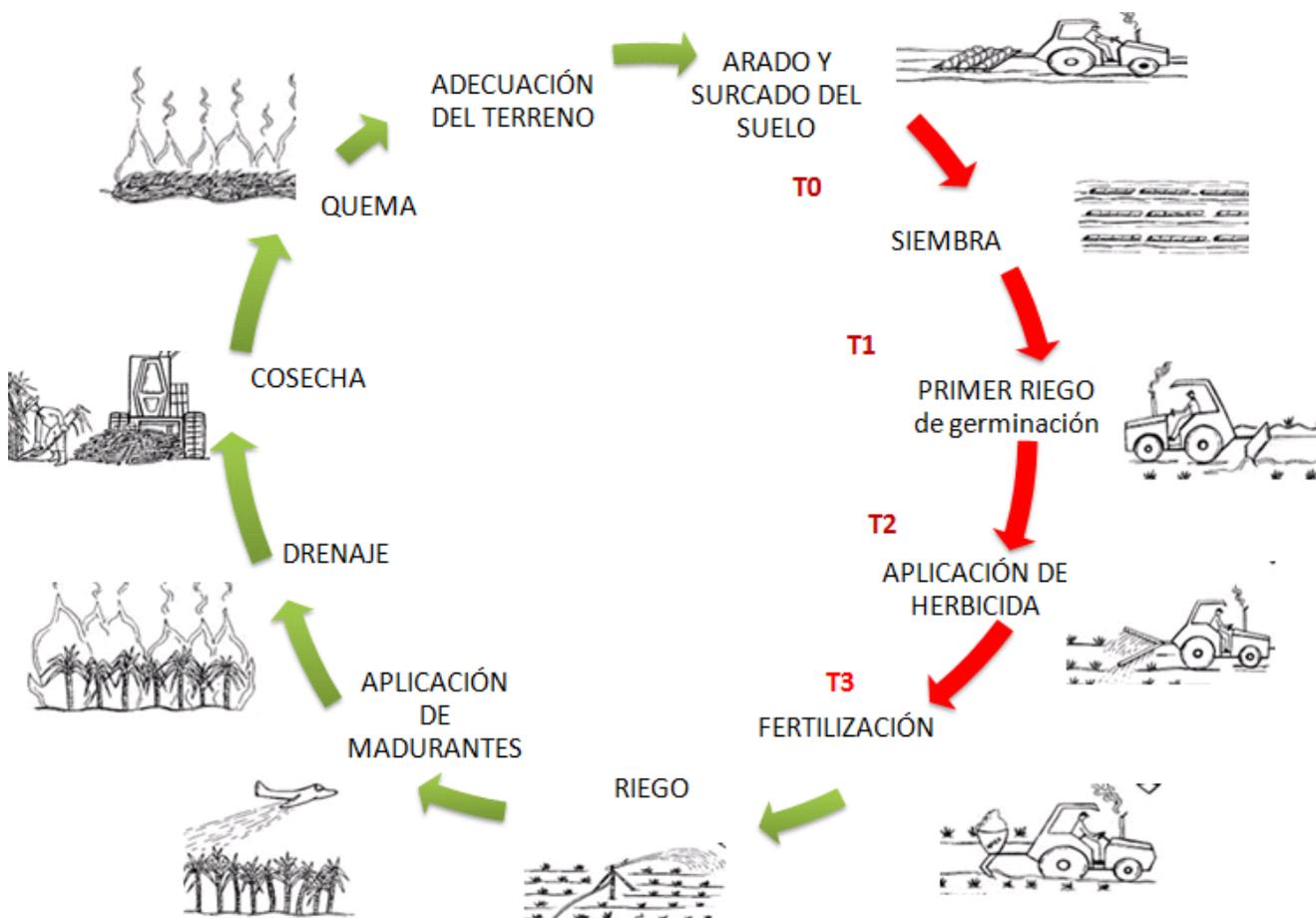


Figura 7. Gráfico de apoyo donde se observa el ciclo de cultivo convencional de la caña de azúcar.



Figura 8. Ubicación geográfica del campo de muestreo en la localidad de Lagunillas, Municipio de Tlaquitenango, Morelos.

(Vázquez, 2011)

En el recuadro se muestra la zona utilizada para cultivo con coordenadas de ubicación geográfica correspondientes a los puntos blancos. El valor de 933 y 921m corresponde a la altura sobre el nivel de mar. Imagen e información obtenidas de Google Earth (<http://maps.google.com.mx/>, 2012).



Figura 9. Vista general del área de cultivo para la muestra T0 (suelo recién arado-19 de Enero del 2010); muestra T1 (siembra y primer riego-25 de Enero de 2010); muestra T2 (después de la adición de herbicida y segundo riego-12 de Febrero de 2010); muestra T3 (con fertilizante y parte de la planta-18 de Mayo de 2010)

VII.1.Método No dependiente del cultivo

VII.1.1. Extracción del metagenoma bacteriano

Varios protocolos han sido descritos para la recuperación de ADN de muestras de suelos y sedimentos, los cuáles se han clasificado como procedimientos de extracción directos e indirectos. El método aquí empleado para la extracción de ADN metagenómico fue un método directo, el cual se basó en la lisis celular dentro de la matriz de la muestra de suelo y la subsecuente separación del ADN de esa matriz y otros restos celulares. En este trabajo se utilizó el sistema de extracción PowerMix Soil DNA Isolation kit (MoBio) para extraer el ADN metagenómico de las cuatro muestras de suelo correspondientes a las primeras cuatro etapas del cultivo de la caña de azúcar. El tamaño del ADN aislado por este método directo fue alrededor de 10 Kbp, tamaño característico de una muestra de ADN cromosomal y que migra en un gel de agarosa al 1% ligeramente arriba de la banda de 10 Kbp. Esto se muestra en la **figura 10**, donde se observó ADN no degradado, característica que junto al peso molecular, es indicador de una extracción de ADN de buena calidad. Este ADN metagenómico representa la colección de ADN de toda la biota naturalmente asociada del suelo, en sus diferentes etapas de cultivo. De forma adicional este sistema permite obtener ADN libre de sustancias húmicas, las cuales pueden interferir con etapas posteriores del procesamiento y análisis del ADN, como puede ser inhibición de enzimas de restricción y polimerasas. Recientes estudios han mostrado que los buenos rendimientos de extracción de ADN no siempre equivalen a la mayor riqueza de especies bacterianas y que la representación de sus secuencias está íntimamente ligada a la eficiencia del método de extracción empleado (Rajendhran y Gunasekaran, 2008; <http://www.mobio.com/powersoil-dna-isolation-kit.html>, 2013)

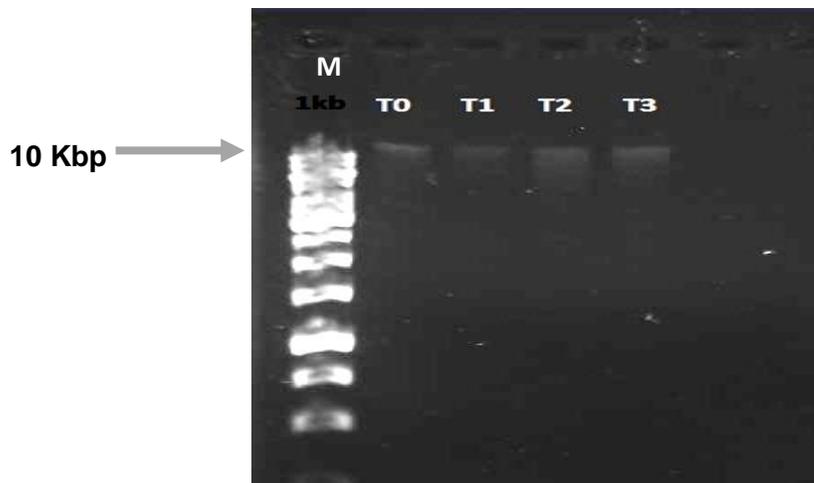


Figura 10. ADN metagenómico visualizado en gel de agarosa 1%.

El primer carril corresponde al marcador de peso molecular de Fermentas 1 Kbp DNA. Los carriles subsecuentes corresponden a cada etapa de cultivo del suelo identificados como: tiempo 0 (T0); tiempo 1(T1); tiempo 2 (T2) y tiempo 3 (T3). En cada carril se depositaron 5 μ L de muestra.

VII.1.2. Perfiles de DGGE

Se empleó la técnica de DGGE con la finalidad de caracterizar muestras de un suelo destinado para un cultivo de caña de azúcar basándose en la microbiota dominante presente, en el origen y propiedades del suelo. La diversidad bacteriana no cultivable en las muestras del suelo se determinó por amplificación de la región V6-V8 del gen ADNr 16S por PCR, usando primers específicos. El PCR amplificó eficientemente el fragmento esperado de la región V6-V8 con un tamaño de alrededor de 400 pares de bases. El análisis de los productos de PCR obtenidos por DGGE para cada una de las muestras permitió observar bandas definidas presentes en los cuatro perfiles de DGGE, los cuales representan cada una de las muestras de suelo en diferentes etapas del cultivo; estos resultados se observan en la **figura 11**. El análisis por DGGE mostró que la diversidad microbiana no cultivable se mantiene constante independientemente de los tratamientos aplicados.

A partir del gel mostrado en la **figura 11**, se seleccionaron 25 bandas (resaltadas con flechas) que fueron elegidas del total de los patrones de bandeo, definidas

como bandas específicas presentes o ausentes en las cuatro muestras. Con la finalidad de identificarlas, se les asignaron números.

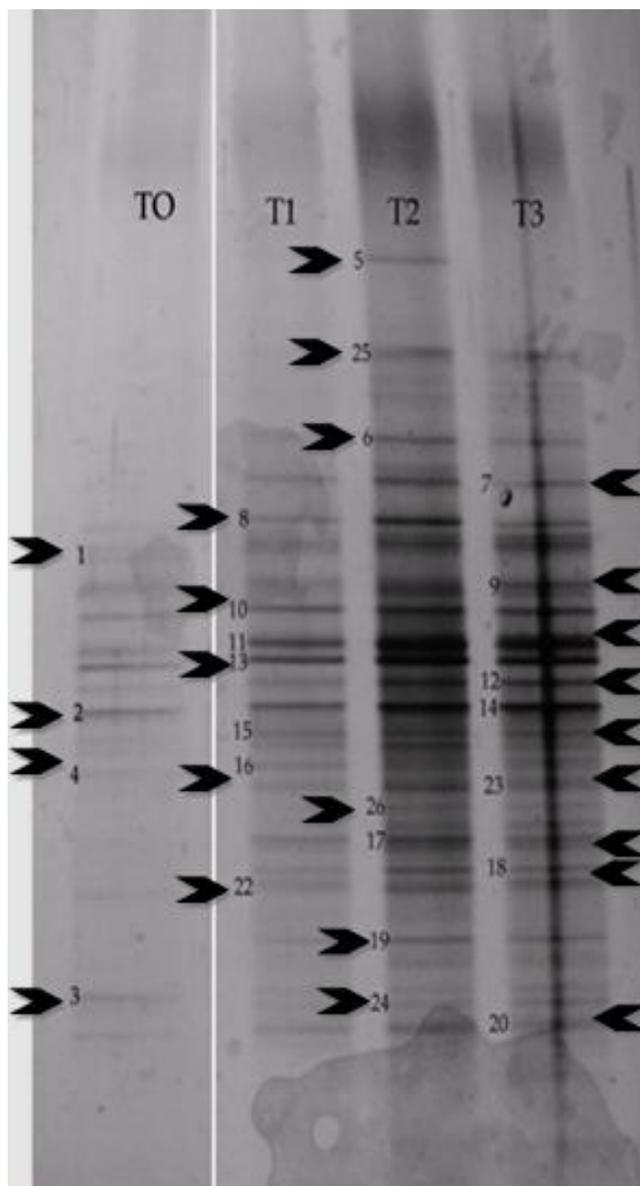


Figura 11. Perfil DGGE de la comunidad bacteriana no cultivable de suelo para un cultivo de caña de azúcar correspondiente a los primeros cuatro tiempos de cultivo. Las bandas en el gel identificadas con números y flechas fueron secuenciadas.

En el gel que se muestra en la **figura 11**, el carril que representa la muestra del T0 corresponde a los productos de amplificación de las regiones variables V6-V8 del ADNr 16S, que pertenecen a los microorganismos que conforman la microbiota inicial nativa del suelo destinado para el cultivo de la caña de azúcar. Los perfiles

de bandeo observados en las muestras T1, T2, y T3 corresponden a aquellos microorganismos que tanto se encontraban presentes inicialmente en T0, así como los que se fueron incorporando en las etapas posteriores; es decir, aquellos que se mantuvieron, desaparecieron y aparecieron a lo largo de los tratamientos aplicados.

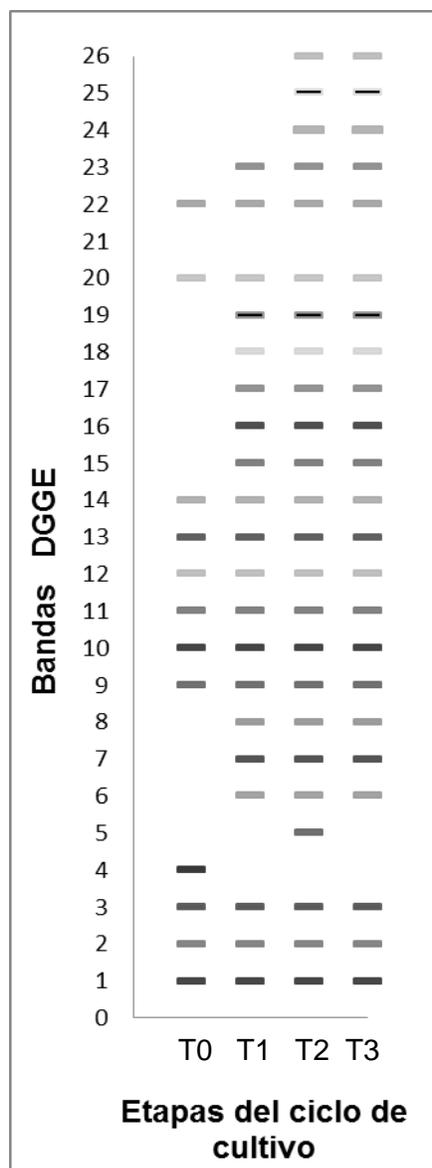


Figura 12. Gráfico que relaciona la etapa de cultivo contra el número de bandas DGGE presentes en cada etapa.

Como se muestra en la **figura 12**, de acuerdo al perfil de bandeo observado en el T0, las bandas: 1, 2, 3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 20 y 22 son bandas que se mantienen constantes en todas las etapas que se analizaron, pues se encuentran presentes no sólo en T0 sino también en T1, T2 y T3, indicando que los correspondientes microorganismos permanecen en el suelo independientemente del tratamiento aplicado.

Por otra lado, las bandas de número: 6, 7, 8, 15, 16, 17, 18, 19 y 23 que inicialmente no se detectaron en el T0, se identificaron en los perfiles de bandeo de las etapas 1, 2 y 3, sugiriendo que los microorganismos a los que les corresponden estas bandas se incorporaron al suelo como resultado de los tratamientos aplicados o bien, que de acuerdo a los cambios ocurridos en las condiciones ambientales del suelo, éstos probablemente pudieron haberse encontrado inicialmente en T0 pero en proporciones bajas, de tal forma que no fueron detectados durante esta primera etapa del ciclo.

La banda número 4, originalmente presente en T0, ya no se detectó en los tiempos T1, T2 y T3, lo cual indicó que ese microorganismo de algún modo se podría estar inhibiendo en presencia de otros microorganismos incorporados al suelo que tuvieran la capacidad de ser competitivos, comprometiendo su desarrollo ya sea por la aplicación de los tratamientos posteriores o por la alteración de ciertas condiciones del suelo que ya no favorecieran su crecimiento y que por ende hicieran difícil su detección. Así mismo, los posibles cambios ocurridos en el ambiente fisicoquímico del suelo como: cambios en la humedad por la adición de agua, por temperatura debida a cambios estacionales durante el cultivo, alteración en el flujo de aire del suelo, por la posible disminución del pH debido a la aplicación del herbicida por su contenido del ácido 2,4-D, diclorofenoxiacético (2,4-D) pudieron afectar la permanencia de este grupo microbiano en el mismo.

En el T1, que corresponde a la etapa de primer riego realizado en el suelo de cultivo, las bandas: 6, 7, 8, 15, 16, 17, 18, 19 y 23 se detectaron por primera vez, sugiriendo por un lado, que los microorganismos correspondientes fueron

incorporados a través de la adición del agua, o bien, como se mencionó, es probable que inicialmente se hallaran en la etapa T0 pero en una baja concentración y que la disponibilidad de agua favoreció su crecimiento.

Respecto al T2, que hace referencia a la etapa en la que se adicionó el herbicida Gesapax H 375 (Syngenta), el cual se encuentra en forma del éster isobutílico del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) poco soluble en agua, se identificaron nuevas bandas: 5, 24, 25 y 26, de las cuáles la número 5 cabe destacar fue la banda que estuvo presente únicamente en esta etapa. Así mismo, cabe mencionar que todas las bandas halladas en T1 se mantuvieron durante esta etapa de T2. Actualmente se tienen reportes del funcionamiento del herbicida 2,4-D en las plantas, el cual es un herbicida *sistémico* que se absorbe por las hojas o la raíz transportándose por la savia a todo el cuerpo, alcanzando los tejidos internos de la maleza, acumulándose en los puntos de crecimiento de las raíces y tallos induciendo malformaciones que inhiben el desarrollo de la planta de hoja ancha (Harikrishan y Usha, 2007). Se piensa que durante su fabricación pueden generarse compuestos furanos o dioxinas, de tal forma que estos compuestos generados y la acidificación del medio en el que es depositado el herbicida podrían provocar sobre las células de los microorganismos del suelo, o la propia planta, alteraciones en su composición celular que no favorecieran su crecimiento.

Para el T3, que corresponde a la etapa en la que se realiza la aplicación del fertilizante de formulación cañera 18-4.5-3, se observó la permanencia de las bandas anteriormente halladas en T2, a excepción de la banda 5, la cual desapareció en este tiempo; de tal forma que la adición del fertilizante podría tener un efecto en cuanto a la disponibilidad de nutrientes en el suelo. Se ha reportado que se requieren 1,000 kg de la fórmula 18(P)-4.5(N)-3(K), de los cuales 500 kg/ha se depositan bajo la semilla al sembrar y, el resto se aplicará inmediatamente una vez que el terreno y la semilla están preparados para fertilizar en el fondo del surco (Aranda y Méndez, 2000).

Por tanto, el cultivo de la caña de azúcar es un cultivo exigente en nutrientes pues la planta toma del suelo los elementos nutritivos disponibles de manera natural por

los procesos tales como la fijación del carbono, nitrógeno y fósforo, así como también los adicionados de manera exógena por el agricultor en forma de abonos o fertilizantes. La permanencia de los grupos detectados en el T3 pudo deberse a que los nutrientes disponibles en esta etapa pudieron ser aprovechados por los microorganismos que se hallaban presentes en el suelo y que tuvieron la capacidad de transformar los compuestos de nitrógeno. Lo anterior pudo favorecer el rendimiento de la planta, de la microbiota cultivable, así como de los microorganismos viables pero no cultivables, siendo posiblemente de importancia biotecnológica para fines agrícolas.

VII.1.3. Secuenciación de las bandas de DGGE

Las bandas de interés anteriormente discutidas fueron escindidas del gel y los fragmentos se extrajeron para reamplificarlas y secuenciarlas.

En este trabajo de las 25 bandas identificadas en el gel, únicamente se seleccionaron 16 para secuenciación con la finalidad de posteriormente ser identificadas en la base de datos no redundante del GenBank, utilizando el programa BLAST. Se pretende posteriormente concluir la identificación de las bandas restantes. Los resultados se muestran a continuación en la **tabla 7**.

Tabla 7. Identificación de las secuencias obtenidas a partir del DGGE de la microbiota no cultivable del suelo

Banda DGGE	Identificación relacionada a:	Número GenBank	Etapas
DGGE 1	Rizobacteria no cultivable asociada a pastizales en ambiente volcánico	JF816552.1	T0,T1,T2,T3
DGGE 2	Clona bacteriana no cultivable asociada a la rizósfera de cítricos	JF416162.1	T0,T1,T2,T3
DGGE 3	Clona de gama-proteobacteria no cultivable aislada de humedales	JN038927.1	T0,T1,T2,T3
DGGE 4	Vector de transformación para plantas, y vector de clonación pBOB de secuencia completa	GU734657.1	T0
DGGE 5	Clona de una acidobacteria no cultivable	HM224438.1	T2
DGGE 9	Clona bacteriana no cultivable aislada de yacimiento petrolífero	GU375820.1	T0,T1,T2,T3

DGGE 11	Clona bacteriana no cultivable aislada de una muestra de suelo ambiental	EU669649.1	T0,T1,T2,T3
DGGE 15	Clona bacteriana no cultivable aislada de un suelo salino de la costa de India	HQ397554.1	T1,T2,T3
DGGE 16	Clona bacteriana no cultivable asociada a suelos salinos de la zona costera de India	HQ397554.1	T1,T2,T3
DGGE 17	Clona bacteriana no cultivable asociada a un suelo agrícola y clona bacteriana no cultivable relacionada con <i>Rhizoctonia solani</i>	HQ397554.1	T1,T2,T3
DGGE 18	Acidobacteria no cultivable de muestra ambiental	HQ597544.1	T1,T2,T3
DGGE 19	Clona bacteriana de una delta-proteobacteria no cultivable asociada a suelos humedales	FJ516878.1	T1,T2,T3
DGGE 22	Acidobacteria no cultivable de parcelas no usadas anteriormente	HM061981.1	T0,T1,T2,T3
DGGE 23	Clona bacteriana no cultivable de muestra de suelo petrolífero	GU375745.1	T1,T2,T3
DGGE 24	Acidobacteria no cultivable del suelo de la rizósfera del chile en Dalian	JF319244.1	T2,T3
DGGE 25	Clona bacteriana no cultivable de Firmicutes aislada de una muestra de suelo de la rizósfera del haba <i>Vicia faba</i> L.	EU979031.1	T2,T3

El resultado de la secuencia de la banda 1, expuso una identidad máxima de un 84% a una rizobacteria no cultivable asociada a un suelo de pastizales en ambiente volcánico. La banda número 2 mostró una identidad máxima del 93% a una clona bacteriana asociada a una rizósfera de cítricos. Por su lado, la banda número 3 y la banda 19, se asociaron a clonas bacterianas no cultivables de una gama-proteobacteria y una delta-proteobacteria, con un porcentaje de identidad del 82% y 91%, respectivamente, siendo estas dos secuencias de microorganismos las que tuvieron una clasificación taxonómica del rango de Clase, a la cual podrían pertenecer. De la banda 4, se tuvo un 85% de identidad a un vector de transformación para plantas y una identidad máxima del 86% al vector de clonación pBOB, de secuencia completa. La banda 5, presente sólo en el T2, se asoció con un 87% de homología a clonas de una acidobacteria no cultivable y a clonas bacterianas no identificadas de suelo de gen parcial de ARNr 16S con 86% de homología. Por otra parte, la secuencia de la banda 9 tuvo un

84% de identidad a una clona bacteriana no cultivable aislada de un suelo sobre yacimiento petrolífero.

Respecto a la banda 11, se obtuvo una identificación máxima del 85% a una clona bacteriana no cultivable aislada de una muestra de suelo ambiental. Las bandas 15 y 16, que se detectaron por primera vez a partir del T1, se asociaron a suelos salinos costeros. De la banda 17, se obtuvo un 95% de identidad a una clona bacteriana no cultivable asociada a un suelo agrícola. Así mismo, se encontró que para una clona bacteriana no cultivable del phylum de Verrucomicrobia y descrita como una clona bacteriana relacionada al hongo *Rhizoctonia solani*, la identidad máxima que resultó de la secuencia 17 fue de un 94%. Respecto a la banda 22, esta correspondió a una clona bacteriana de una acidobacteria no cultivable proveniente de una muestra de suelo tomada de 0-7 cm de profundidad de parcelas nunca antes utilizadas para la agricultura.

La banda de DGGE 18 tuvo un valor de identidad del 87% a una clona bacteriana de acidobacteria no cultivable aislada de una muestra ambiental. Respecto a la secuencia 23, tuvo una identificación máxima del 91% contra la secuencia de una clona bacteriana de un microorganismo no cultivable proveniente de una muestra de suelo, primordialmente de un yacimiento de petróleo. Finalmente, las bandas número 24 y 25, que se detectan hasta el T2 por primera vez, se asociaron a suelos rizosféricos de chile y de haba, respectivamente; siendo que para la secuencia 24, se identificó en un 98% como una acidobacteria no cultivable, mientras que la banda 25 obtuvo una identidad máxima del 98% a una clona bacteriana que pertenece al phylum de los Firmicutes.

Pese a que se asignó a cada banda una identidad a un grupo bacteriano, es importante resaltar que el porcentaje de identidad en muchos casos fue de cuando mucho del 85%, esto en el sentido de la debilidad que muestra el DGGE al realizar una identificación parcial de amplicones de 16S de cuando mucho 400 a 500 bases, en el mejor de los casos.

Sin embargo, comparada esta técnica con los métodos tradicionales, la técnica de DGGE se consideró como una herramienta que requirió de un menor tiempo y

que sin duda resultó adecuada para el análisis de esta comunidad bacteriana perteneciente a una matriz de suelo compleja. Los resultados mostraron que, de acuerdo a los criterios de ausencia o presencia de las bandas en el gel de poliacrilamida a diferentes tiempos, no hubo cambios muy significativos en la microbiota presente a lo largo de las cuatro etapas de cultivo, ya que la mayor parte de la microbiota identificada como no cultivable presente en el suelo se mantuvo constante a lo largo de los tratamientos aplicados y por tanto, se puede decir que no hay mayores implicaciones sobre la diversidad de la comunidad microbiana no cultivable por parte de las técnicas de cultivo empleadas para la preparación del suelo de cultivo analizado de caña de azúcar.

Aunque algunos trabajos se han realizado para estudiar la ecología bacteriana presente en suelo agrícola u otro tipo de muestras de suelo ambiental (Enwall, Philippot y Hallin, 2005; Freitag *et al.*, 2005; Petersen y Dahllöf, 2005; Millette, Bodelier y Laanbroek, 2007; Jousset *et al.*, 2012), aún no se sabe acerca de un análisis realizado por PCR-DGGE para estudiar la composición bacteriana no cultivable de una muestra de suelo para cultivo de caña de azúcar. En este trabajo, se secuenciaron 16 bandas del DGGE, las cuales revelaron un predominio de microorganismos pertenecientes a clonas bacterianas de acidobacterias aisladas de muestras de suelo agrícola, seguido por clonas bacterianas no cultivables asociadas a la rizósfera de diferentes plantas, una secuencia identificada como una rizobacteria no cultivable, y una secuencia identificada como un vector de clonación para plantas. Estos resultados podrían indicar que las bacterias no cultivables no sólo podrían estar jugando un papel importante durante el ciclo de cultivo de la caña de azúcar sino que también el hecho de que la mayoría pertenezca a un grupo de acidobacterias no cultivables nos podría dar una idea del por qué resulta difícil cultivar estos microorganismos fuera de su ambiente natural, pues este tipo de suelo por sus propiedades físicas y químicas lo hace un ambiente único.

VII.2. Resultados de la aplicación de Métodos dependientes del cultivo

VII.2.1. Cuenta microbiana

Tabla 8. Cuenta microbiana presente en muestras analizadas por métodos cultivables tradicionales.

MUESTRA	UFC/mL	Colonias aisladas	Fecha muestreo	Condición del suelo
T0	86×10^4	79	19-ENERO-10	Recién arado
T1	56×10^5	99	25-ENERO-10	Después de siembra y riego
T2	11.2×10^5	100	12-FEBRERO-10	Después de aplicación de herbicida Gesapax H375
T3	30×10^5	100	18-MAYO-10	Con fertilizante (fórmula cañera 18:4.5:3) y parte de la planta

Llevado a cabo en este estudio el aislamiento de la fracción cultivable en agar triptonsoya, suplementado con cicloheximida, bajo condiciones de incubación aerobias, sólo se favoreció el crecimiento de la microbiota que abarca a bacterias mesófilas aerobias y/o facultativas, que crecen en este medio general empleando métodos tradicionales de cultivo. Los resultados del conteo microbiano expresados en UFC/mL muestran que, conforme transcurre el tiempo y los diferentes tratamientos agrícolas son aplicados al suelo de cultivo de la caña de azúcar, la comunidad microbiana no presenta cambios significativos durante sus primeras cuatro etapas, pues se mantiene en el mismo orden de magnitud (10^5), a excepción de la primera etapa (T0) respecto a la que comprende la etapa de siembra y riego (T1) en la cual hay un cambio en un orden de magnitud mayor.

Esta es una primera observación de las implicaciones que tendría la manipulación del suelo sobre su composición bacteriana nativa, ya que ésta manipulación que sufre no es bajo condiciones estandarizadas donde se controlen parámetros específicos como la temperatura, la humedad, gradientes de nutrientes, los contaminantes que puedan estar en contacto con el suelo a lo largo del periodo de cultivo, existiendo así muchas variables que podrían dar explicación a la diferencia

notable que existe entre la microbiota que se está expresando en las dos primeras etapas. Cabe destacar que para las muestras del T2 y T3, no parece haber un efecto importante de la aplicación de herbicida y la aplicación del fertilizante sobre la cuenta total bacteriana.

Se ha visto que a pocos milímetros en la profundidad del suelo, se es posible encontrar una variedad de micrositios con diferentes propiedades fisicoquímicas. Partículas minerales y orgánicas propias del suelo interactúan fuertemente con la microbiota presente en él, a través de la formación y estabilización de microagregados y complejos con materia orgánica, arcilla, los cuáles son las características estructurales de la matriz del suelo y entre los más importantes parámetros que afectan la composición microbiana (Mocali y Benedetti, 2010)

Es indispensable controlar los procedimientos de muestreo siendo que se ha encontrado que las comunidades microbianas pueden tener varios niveles de organización y distribución que podrían ser dependientes de diferentes propiedades del suelo, dado que éste es un ambiente muy complejo resultado de la interacción múltiple de diversos parámetros como los anteriormente mencionados además del pH, las variaciones climáticas y por supuesto la biota del ambiente.

VII.2.2. Extracción de ADN

Para el estudio de la diversidad bacteriana por medio de técnicas dependientes de cultivo, se realizó la extracción del ADN cromosomal microbiano total de los aislados pertenecientes a las muestras T0 – T3. En la **figura 13** se muestra un ejemplo de la electroforesis en gel de agarosa al 1%, realizado para visualizar el resultado de la extracción de ADN cromosomal que corresponde a los primeros siete aislados obtenidos en la muestra T3. El tamaño del ADN aislado por este método fue de alrededor de 10 Kbp, tamaño característico de una muestra de ADN cromosomal que migra en un gel de agarosa al 1%.

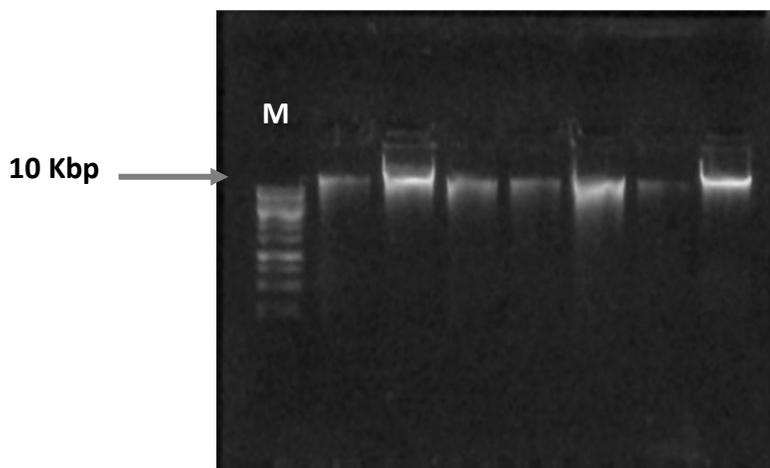


Figura 13. Extracción de ADN cromosomal visualizado en gel de agarosa 1%

El carril (M) corresponde al marcador de peso molecular de Fermentas 1 Kbp DNA. Los carriles subsecuentes corresponden a la muestra de ADN de los aislados. En cada carril se depositaron 5 μ L de muestra.

El sistema UltraClean® Microbial DNA Isolation está diseñado para aislar ADN genómico de alta calidad a partir de 1.8 mL de cultivo microbiano. El principio de este es lisar los microorganismos mediante una combinación de calor, detergente, y la fuerza mecánica contra perlas especiales para lisis. El ADN liberado se une entonces a una columna de sílica gel, se lava y se recupera en un buffer Tris-EDTA pH 8.0. De esta manera, siendo que el sistema garantiza una buena extracción de ADN, aquellas muestras que no presentaron bandas intensas o que no se encontraban íntegras se repitieron hasta obtener un ADN de buena calidad; es decir, alta pureza y alto peso molecular.

VII.2.3. Amplificación por PCR del gen ADNr 16S y purificación.

Para la realización de la PCR se empleó la enzima *Taq*DNA polimerasa recombinante (Fermentas) con las condiciones anteriormente descritas. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, observándose una banda de un peso de alrededor de 1.5 Kbp (**Figura 14**).

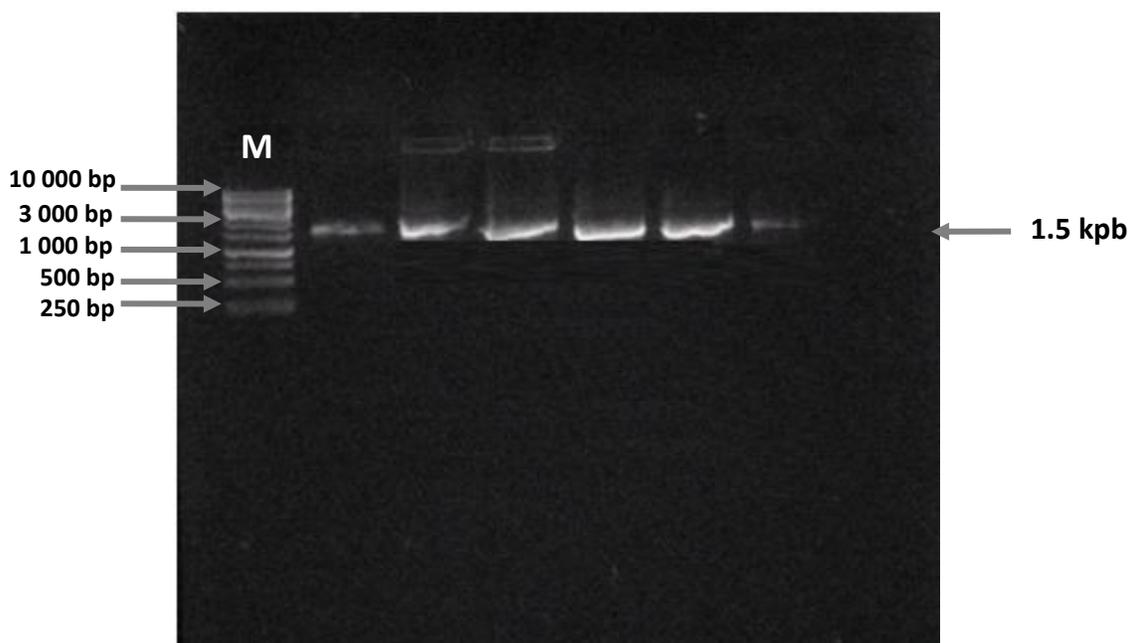


Figura 14. Electroforesis en gel del de agarosa 1% de los ADNr 16S amplificados a partir del ADN cromosomal extraído de los aislados bacterianos del suelo vertisol en estudio.

El carril (M) corresponde al marcador molecular de Fermentas 1 Kbp DNA. Los carriles subsecuentes corresponden al producto de PCR de los aislados.

Para el ADNr 16S el tamaño que corresponde a este gen es de alrededor de 1541 bases, el cual logra migrar en un gel de agarosa al 1% a la altura de la banda de 1.5 Kbp del marcador de peso molecular (M), por tanto, la imagen que se muestra en la **figura 14** reveló que durante la amplificación bajo las condiciones establecidas, fue posible amplificar este gen 16S.

VII.2.4. ARDRA e identificación de aislados únicos

Se realizó una tipificación por ARDRA de 100 aislados bacterianos para cada una de las cuatro etapas de cultivo que se estudiaron de la muestra de suelo. Con este análisis se identificaron los tipos únicos basados en el patrón de restricción generado a partir de la digestión del ADNr 16S. Inicialmente se utilizaron las enzimas Bsp143I (Sau3AI) y BsuRI (HaeIII) para la digestión del ADNr 16S de cada aislado; sin embargo, se obtuvo un patrón de bandeo de mejor resolución con la enzima Bsp143I para la muestra T3 analizada en este trabajo (**figura 15**),

por lo que se eligió esta enzima para la digestión de todos los aislados los cuales se muestran en la **figura 16**.

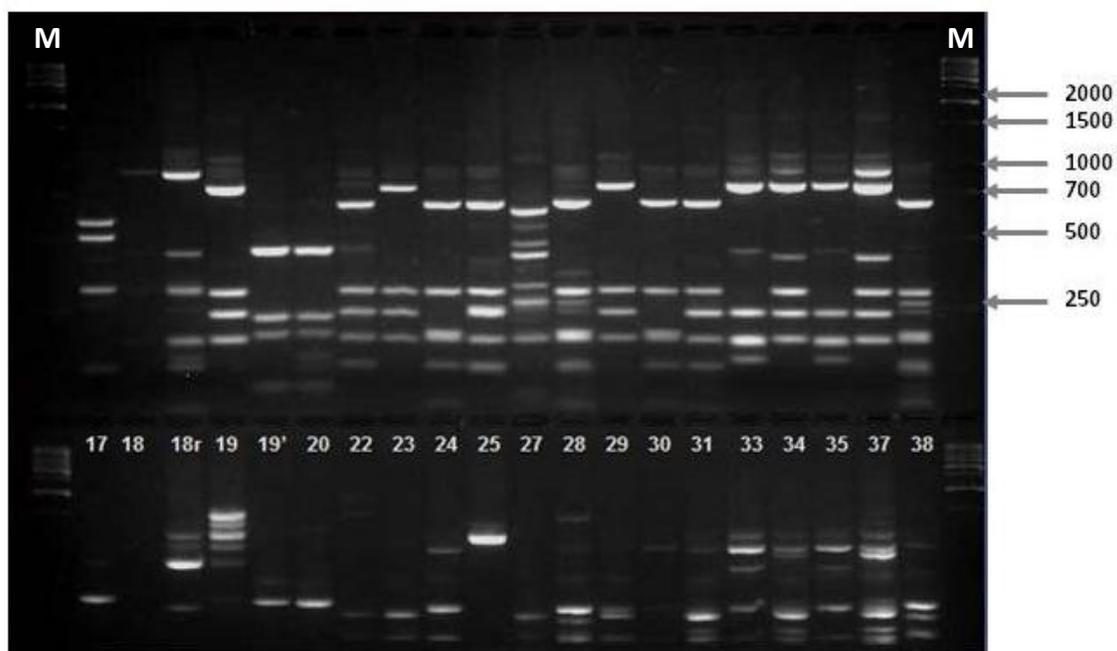
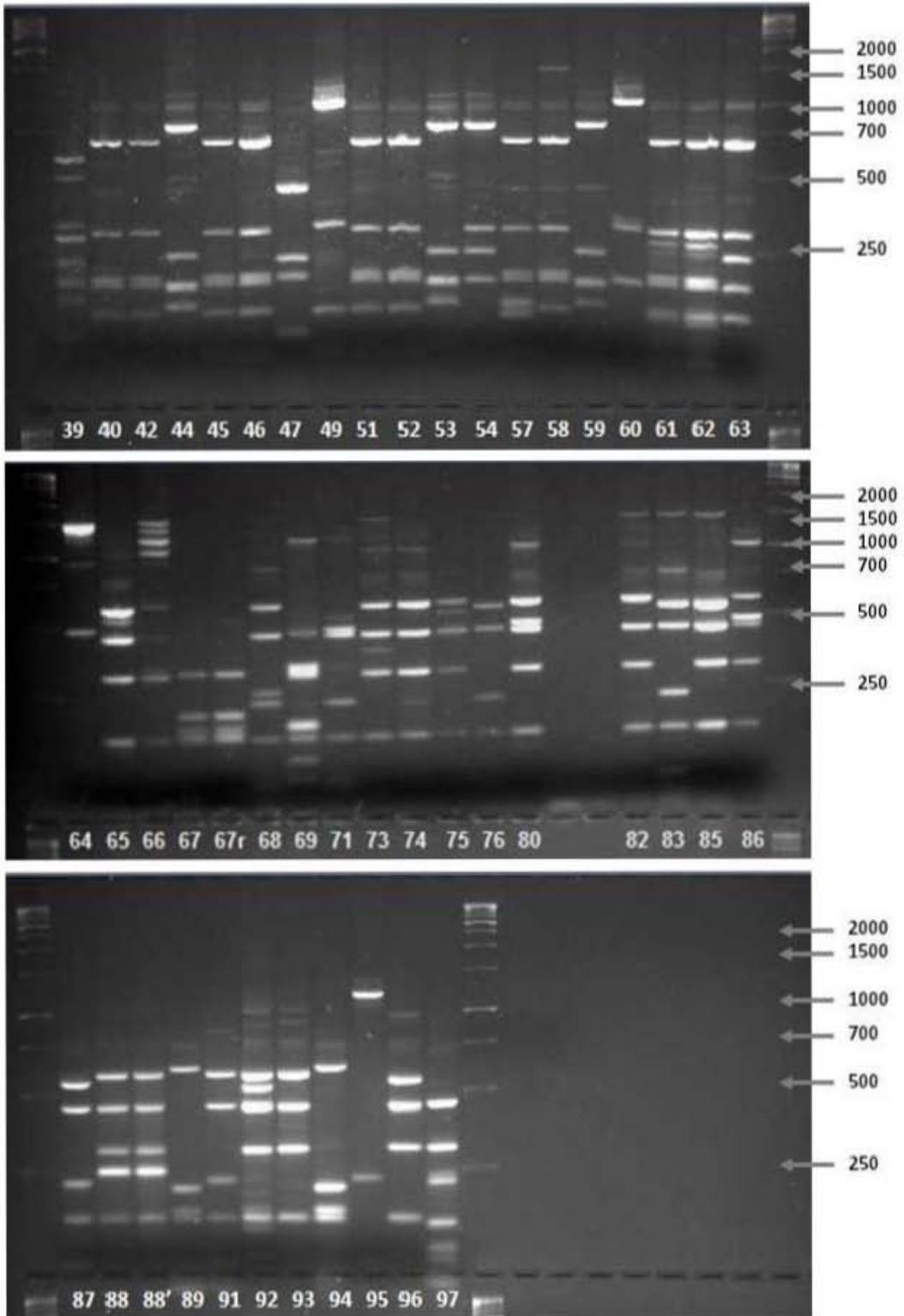


Figura 15. Muestra de suelo con fertilizante; muestra T3. Patrones de restricción generados con Bsp143I (parte superior) y BsuRI (parte inferior). El primer y último carril corresponden al marcador de peso molecular de Fermentas.



Figuras 16. Digestiones con Bsp143I que producen diferentes patrones de restricción en cada uno de los aislados para la muestra T3.

Para integrar estos resultados, en un trabajo previo se realizó el análisis ARDRA con la enzima BsuRI para las muestras del T0, T1 y T2 (Vázquez, 2011). El análisis de las digestiones realizadas sobre un gel de agarosa al 2% permitió observar los siguientes resultados:

De acuerdo al patrón de bandeo generado en cada aislado por la zona de corte de la enzima Bsp143I, se determinó el número de bandas que correspondían a cada uno de los perfiles y las bandas totales presentes, mediante una comparación global de los aislados. Esto con la finalidad de generar una matriz la cual se construyó haciendo un registro de la presencia (1) o ausencia (0) de cada banda, para los aislados analizados. Con la matriz generada se construyó un dendograma por el método de Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages (UPGMA) utilizando las aplicaciones incluidas en el programa Phylogeny Inference Package (PHYLIP) cálculo de una matriz de distancia; con la elaboración del árbol por el método de UPGMA se realizó un análisis de bootstrap (100 réplicas) **(Figuras 17 a 20)**. Al analizar las agrupaciones de los microorganismos en el dendograma, se tomó a un representante de cada cluster para secuenciación y asignación de una identidad.

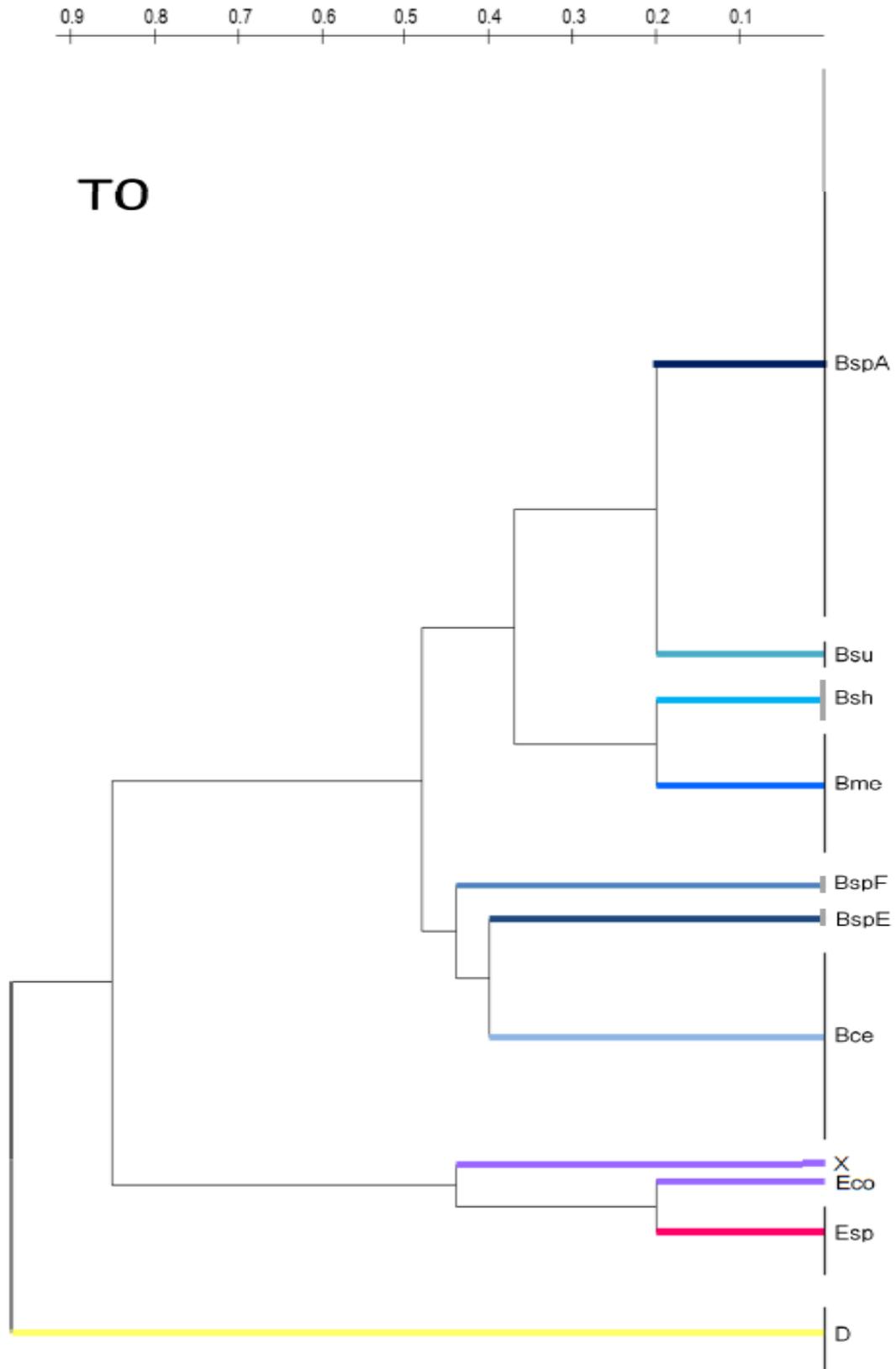


Figura 17. Árbol construido por UPGMA de los tipos ARDRA detectados e identificados en las muestras T0. (Vázquez D., 2011)

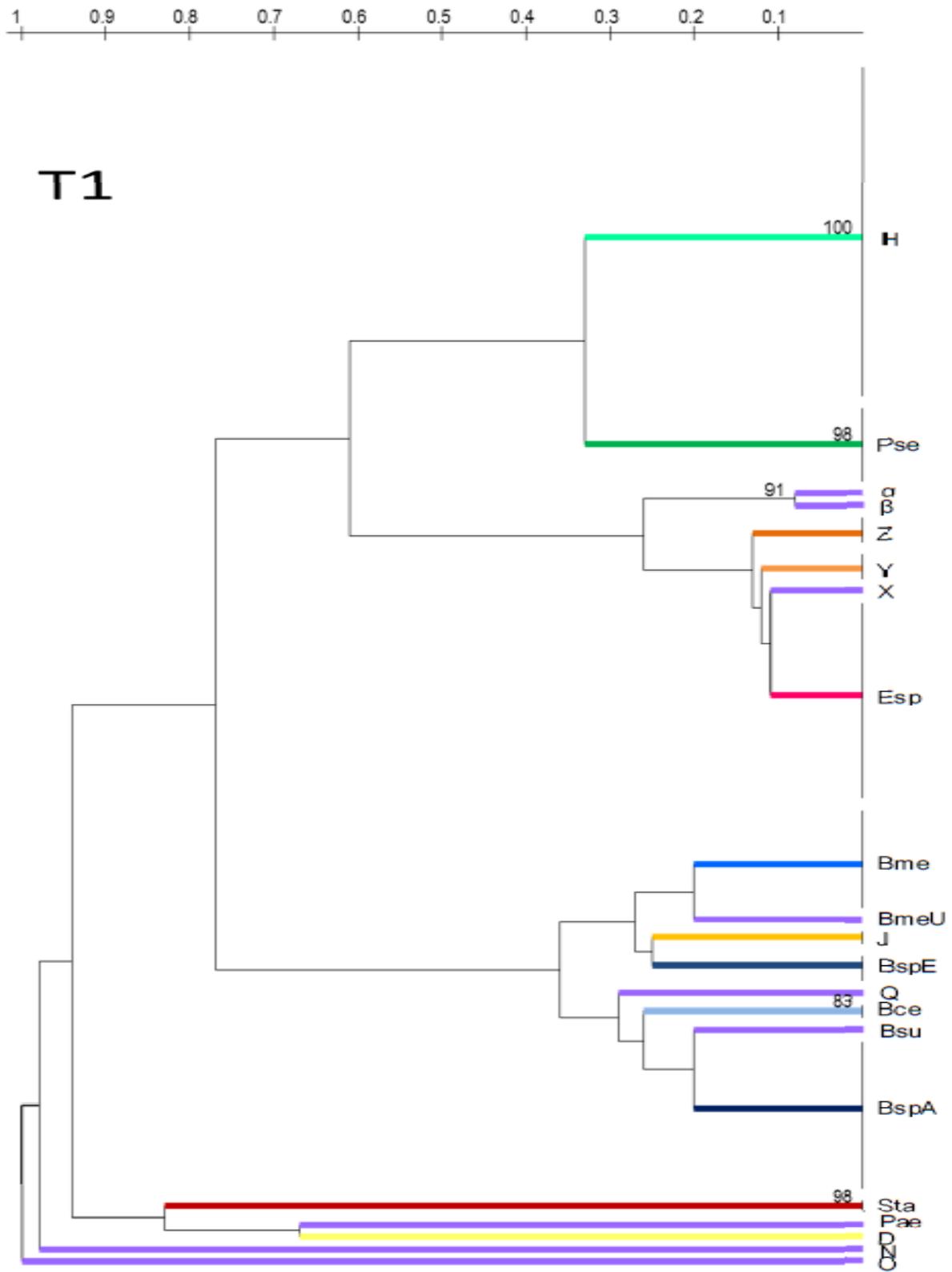


Figura 18. Árbol construido por UPGMA de los tipos ARDRA detectados e identificados en las muestra T1. (Vázquez, 2011)

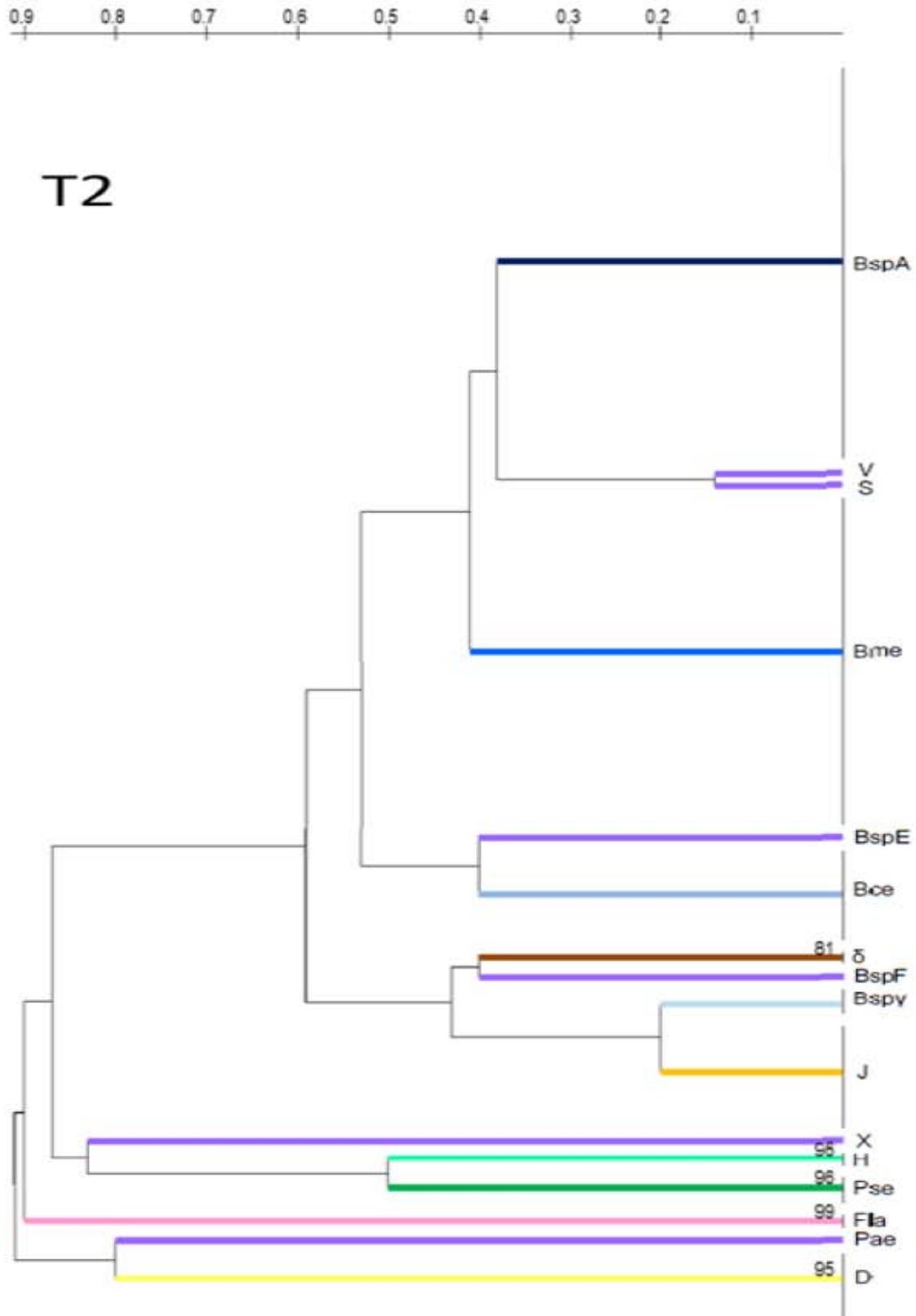


Figura 19. Árbol construido por UPGMA de los tipos ARDRA detectados e identificados en las muestra T2. (Vázquez, 2011)

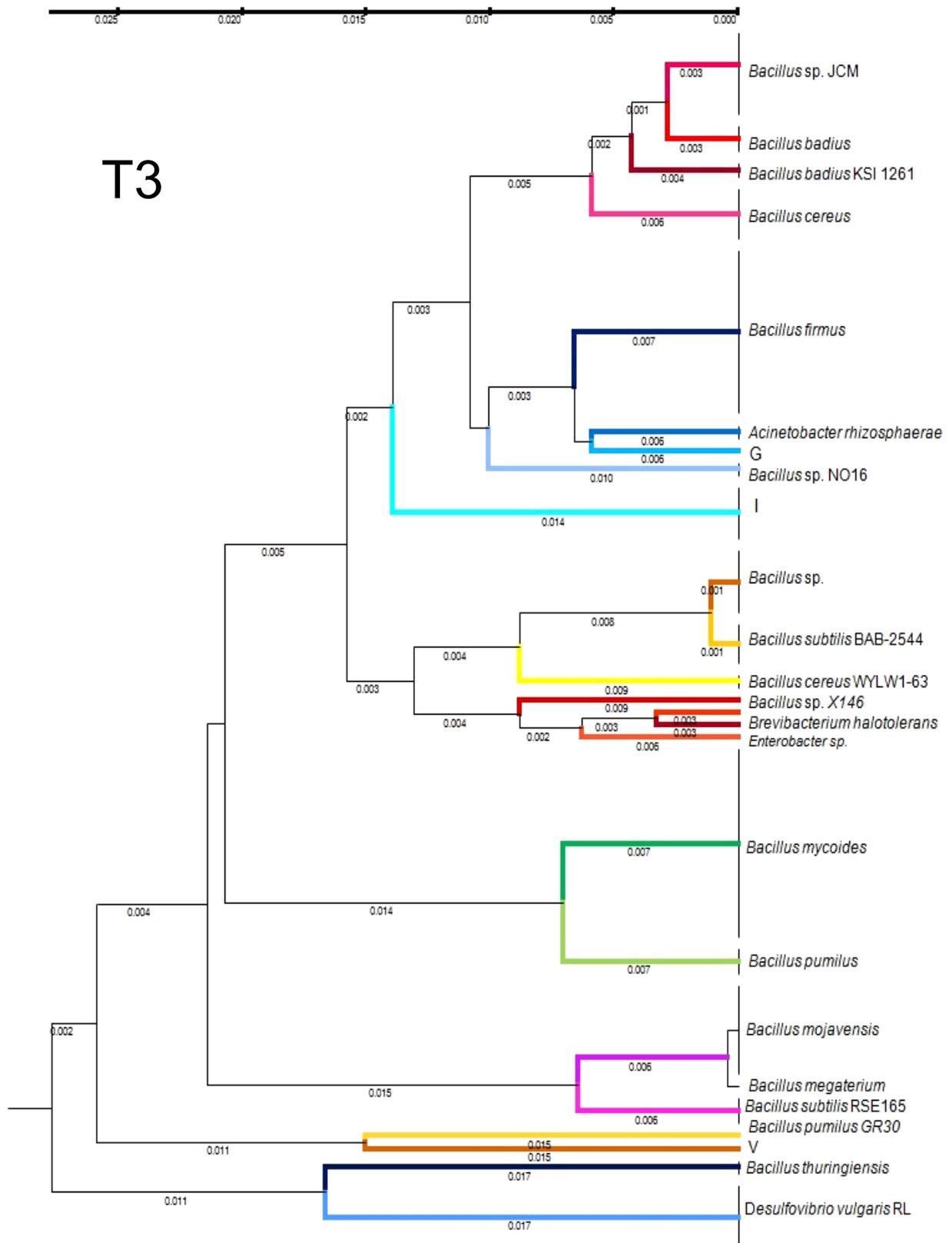


Figura 20. Árbol construido por UPGMA de los tipos ARDRA detectados e identificados en la muestra T3.

Bsp, *Bacillus* sp; **Bme**, *B. megaterium*; **Bce**, *B. cereus*; **Bsu**, *B. subtilis*; **Bsh**, *B. spahericus*; **Esp**, *Enterobacter* sp; **Eco**, *Escherichia coli*; **Fla**, *Flavovacterium* sp.; **Pse**, *Pseudomonas* sp; **Sta**, *Staphylococcus* sp.; **Pae**, *Paenibacillus* sp; **D, G, H, I, J, N, O, Q, S, V, X, Y, Z, α, β**, Tipos ARDRA no identificados; **Uni**, tipos ARDRA únicos. Los valores numéricos que aparecen en algunas de las ramas de cada árbol, representan en valor de bootstrap sobre 100.

Observando las gráficas de la **figura 21**, el grupo bacteriano que más abundó en la muestra **T0** corresponde a miembros del género *Bacillus* (82.2% del total de aislados), entre los que destacaron *Bacillus* sp. que correspondió a un 48.0% del total de los aislados tomados de esa muestra; *Bacillus cereus* con un 16.5% en abundancia, siendo una especie detectada en particular; seguido por *Bacillus megaterium* con 11.4%, y finalmente *Bacillus subtilis* con 3.8%. Para el **T1** se observó una abundancia de aislados identificados como *Bacillus* (28.2% del total de aislados por género). De los aislados 28.3% se identificaron como *Pseudomonas* sp. Así mismo, se halló la presencia de *Staphylococcus* sp. (2.0%), y *Enterobacter* sp. (17.2%). En la muestra **T2** se detectó a miembros del género *Bacillus* como el grupo de mayor abundancia, conformado por *Bacillus* sp. (37.0%), *B. megaterium* (27.0%), *Bacillus cereus* (8.0%); mientras que en menor proporción se encontró a *Paenibacillus* sp. (1.0%), *Pseudomonas* sp. (3.0%) y *Flavobacterium* sp. (2.0%) (Vázquez, 2011)

De acuerdo a los tiempos en los que fueron colectadas las muestras, la diversidad bacteriana que se halló en la muestra T0 correspondería a la microbiota inicial presente naturalmente en la muestra de suelo utilizada para iniciar el ciclo de cultivo de la caña de azúcar en la localidad analizada. Dadas las condiciones iniciales del terreno, un suelo vertisol que se constituye principalmente de arcilla expansiva la cual se hincha en contacto con el agua proporcionando una humedad suficiente para el crecimiento de microorganismos, con valores de pH cercanos a la neutralidad que oscilan entre 6.0 a 8.0 y con constante movimiento interno del material del suelo, se afirma que los miembros del género *Bacillus* son los organismos más abundantes y naturalmente asociados a este terreno presentes en aquella etapa inicial de cultivo; no habiendo sido utilizado este terreno previamente para dicho cultivo de caña de azúcar (al menos por un período de un año, de acuerdo a comunicación con personal del Fideicomiso Comercializador).

La muestra correspondiente al **T1** (después de la siembra y primer riego), muestra una disminución de las especies de *Bacillus* detectadas en el T0 y un incremento

del género *Enterobacter* y la aparición de la γ -Proteobacteria *Pseudomonas* sp. El incremento de *Enterobacter* sp. permite suponer que la disponibilidad de una mayor cantidad de agua en el medio favoreció su crecimiento, mientras que la abundante presencia de *Pseudomonas* sp. puede deberse a que aunque pudiera haber estado presente este microorganismos en la muestra T0 y no se detectó, la presencia de agua tuvo el mismo efecto sobre su crecimiento como lo observado para el caso de *Enterobacter* sp. aunque no se descarta la posibilidad de que el agua utilizada para riego pudiera haber incorporado a este microorganismo al suelo analizado.

Respecto a la muestra **T2** (después de la adición del herbicida Gesapax H 375 (Syngenta), se observó un incremento en los aislados del género *Bacillus* (72.0% del total de aislados, por género), dentro de los cuales destacaron *Bacillus* sp. (37.0%), *B. megaterium* (27.0%), y *Pseudomonas* sp. (3.0%), Es importante señalar que en esta muestra se presentó una importante disminución de las γ -Proteobacterias detectadas como los grupos más abundantes en la muestra T1, lo que sugiere que el incremento de este grupo microbiano en la etapa T1 se debió al efecto de una mayor cantidad de agua disponible en el suelo como resultado del primer riego. El herbicida Gesapax es una mezcla de dos ingredientes activos, ametrina y ácido 2,4-D en forma de éster, los cuales ejercen una acción enérgica contra maleza de hoja ancha en cultivo de caña de azúcar y maíz. La ametrina inhibe la fotosíntesis provocando un desarrollo anormal que afecta la respiración, reservas alimenticias y la división celular de la maleza. Aunque se reporta a la ametrina como ligeramente tóxica para el humano sólo en dosis elevadas (Syngenta, 2007), el 2,4-D es el componente más tóxico del herbicida y a pesar de que no está reportado el efecto sobre diversos grupos bacterianos, es posible que por su modo de acción tenga un efecto inhibitorio sobre el crecimiento microbiano (Vázquez, 2011).

Como se muestra en las gráficas, para el **T3** destacaron microorganismos como *Bacillus mycoides* (16.0%) siendo éste el de mayor predominio, *Bacillus firmus* (14.0%) y *Bacillus mojavensis* (8.0%); nuevamente detectándose a *Bacillus cereus*

(5.0%) pero en menor proporción con respecto a los otros tiempos de cultivo, y a *Bacillus* sp. (6.0%). Estos resultados evidencian que en la muestra T3 (etapa que implicaba la adición de un fertilizante de fórmula cañera 18:4.5:3) se lograron conservar miembros del género *Bacillus*; género que mostró ser el más abundante en las muestra T0, T1 y T2, pues dadas las posibles prácticas agrícolas y la presencia de un fertilizante éste, en conjunto con las condiciones del suelo, permitió el crecimiento de microorganismos, especies, que anteriormente no se habían presentado.

Se podría decir, con base a los resultados reportados y a los obtenidos en este trabajo, que hay un incremento en la diversidad para la muestra T3 y que posiblemente tenga una implicación la adición de un fertilizante. Sin embargo, a pesar de la variación que hubo en el T2 con una reducción hasta un 28.2% del género *Bacillus*, para la muestra T3 no hubo mayor contradicción pues se esperaría que conforme las prácticas agrícolas son llevadas a cabo, la microbiota inicial predominante vaya disminuyendo en su abundancia (hasta casi un 60%) pero sin que deje de colonizar el suelo en el que habita, ya que se parte de una concentración inicial importante de un género en particular y subsecuentemente se va dando la aparición de otras especies y géneros tras el cambio en las condiciones del suelo y los tratamientos de cultivo aplicados. Tal es el caso de aquellos microorganismos no detectados en etapas anteriores, que fueron identificados en este tiempo; por ejemplo, *Bacillus badius* (2.0%), *Brevibacterium halotolerans* (2.0%), *Bacillus pumilus* (3.0%), *Bacillus thuringiensis* (2.0%), *Desulfovibrio vulgaris* (6.0%) y *Acinetobacter rhizosphaerae* (2.0%).

Se debe tomar en consideración la presencia de barreras, que son condiciones que evitan la expresión de otras especies, aunque no necesariamente deben ser un obstáculo físico, ya que pueden ser sustancias u organismos los que puedan evitar la colonización microbiana. Se infiere por tanto que la adición de nutrientes inorgánicos y orgánicos (tal como es la adición de un fertilizante o un pesticida) pueden alterar las condiciones de crecimiento de las bacterias en la matriz del suelo. Y esto fue evidenciado no sólo en el conteo de células viables formadoras

de colonias, que mostró una mayor diversidad en el T3 respecto a los otros tiempos de cultivo y el tratamiento del suelo era aplicado, sino también durante el análisis ARDRA donde se generaron patrones de bandeo específicos que, mediante la elaboración y análisis del dendograma correspondiente, denotaron filotipos que permitieron observar los clusters formados en cada etapa de cultivo en el que fue muestreado el suelo.

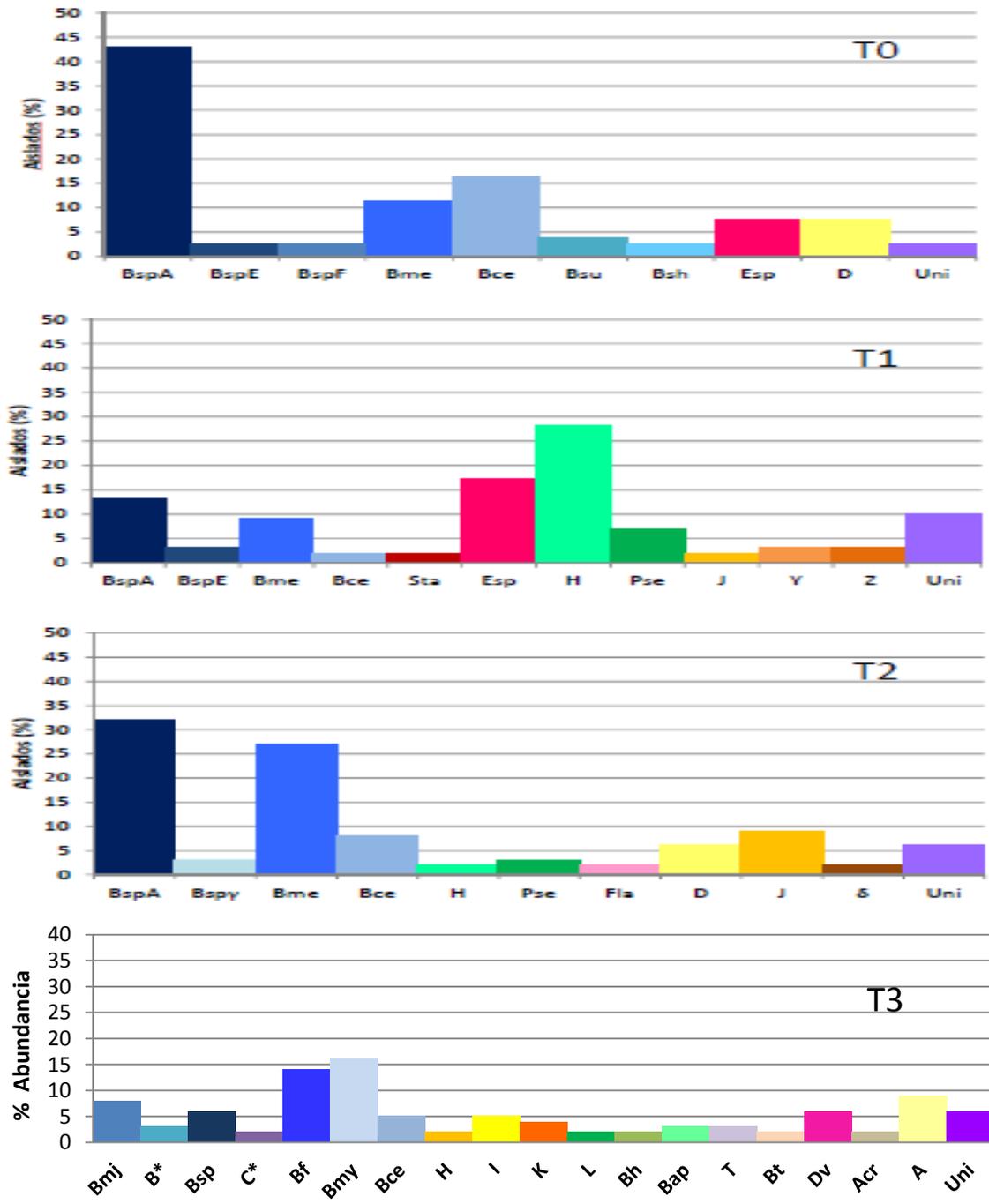


Figura 21. Abundancia relativa de tipos ARDRA detectados e identificados en las muestras T0-T3.

Bsp: *Bacillus* sp.; **Bme:** *B. megaterium*; **Bce** y **L:** *Bacillus cereus*; **Bmy:** *Bacillus mycoides*; **Bsu** y **K:** *B. subtilis*; **Bmj:** *B. mojavensis*; **Bf:** *B.firmus*; **Bsh:** *B.spahericus*; **B*:** *Bacillus badius*; **Esp:** *Enterobacter* sp.; **Fla:** *Flavovacterium* sp.; **Pse:** *Pseudomonas* sp.; **Bh:** *Brevibacterium halotolerans*; **Bap:** *Bacillus pumilus*; **Bt:** *Bacillus thuringiensis*; **Dv:** *Desulfovibrio vulgaris*; **Sta:** *Staphylococcus* sp. **D, H, I, J, M, Y, Z:** Tipos ARDRA no identificados; **Uni,** tipos ARDRA únicos.

**Tabla 9. Distribución de aislados identificados en las muestras de suelo T0-T3
Diversidad Cultivable.**

Phyllum/clase IDENTIDAD	No. (%) de aislados detectados en cada muestra			
	T0	T1	T2	T3
Firmicutes / Bacilli				
<i>Bacillus</i> sp.	38 (48.0%)	16 (16.1%)	37 (37.0%)	18 (18.0%)
<i>B. megaterium</i>	9 (11.4%)	9 (9.1%)	27 (27.0%)	1 (1.0%)
<i>B. cereus</i>	17 (16.5%)	2 (2.0%)	8 (8.0%)	7 (7.0%)
<i>B. sphaericus</i>	2 (2.5%)	ND	ND	ND
<i>B. firmus</i>	ND	ND	ND	14 (14.0%)
<i>B. subtilis</i>	3 (3.8%)	1 (1.0%)	ND	7 (7.0%)
<i>B. mycoides</i>	ND	ND	ND	16 (16.0%)
<i>B. mojavensis</i>	ND	ND	ND	8 (8.0%)
<i>Bacillus badius</i>	ND	ND	ND	5 (5.0%)
<i>Bacillus pumilus</i>	ND	ND	ND	3 (3.0%)
<i>Brevibacterium halotolerans</i>	ND	ND	ND	2 (2.0%)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	ND	ND	ND	2 (2.0%)
<i>Staphylococcus</i> sp.	ND	2 (2.0%)	ND	ND
Proteobacteria / δ-Proteobacteria				
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	ND	ND	ND	6 (6.0%)
Proteobacteria / γ-Proteobacteria				
<i>Enterobacter</i> sp.	6 (7.6%)	17 (17.2%)	ND	1 (1.0%)
<i>Escherichia coli</i>	1 (1.3%)	ND	ND	ND
<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	35 (35.4%)	5 (5.0%)	ND
<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i>	ND	ND	ND	2 (2%)
Bacteroidetes / Chlorobi, Bacteroidetes				
<i>Flavobacterium</i> sp.	ND	ND	2 (2.0%)	ND

*ND: No detectado

Para determinar la diversidad bacteriana de la muestra de acuerdo al número total de tipos ARDRA y de la proporción de individuos con el mismo tipo ARDRA, se calculó el índice de Shannon-Weaver (H) y el valor de Evenness (igualdad) (E), de acuerdo a las siguientes expresiones:

Índice de Shannon-Waever (H): $H = -\sum(\rho_i \ln[\rho_i])$

Donde: ρ_i es la proporción de aislados pertenecientes a un tipo ARDRA en relación con el número total de aislados.

Evenness (E): $E = H / \ln S$

Donde: H es el índice de Shannon-Weaver y S es el número total de tipos ARDRA.

Uno de los índices más utilizados para cuantificar la biodiversidad específica es el de Shannon. El índice refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa (Pla, 2006). Como se muestra en la **tabla 10**, se observa claramente que el valor H obtenido a partir de los tipos ARDRA para la muestra T3 fue mayor que el de las muestras T0, T1 y T2, habiendo una diferencia notable de lo observado en la muestra T3 en comparación con las otras muestras que presentan una diversidad muy similar. Sin embargo, no sigue una tendencia puesto que para la muestra T2 disminuye el valor de H, esperándose que incrementase conforme al tiempo de cultivo o al tratamiento que se aplicó al suelo. El valor de E , es una medida de distribución de organismos individuales entre especies en el que se considera la diversidad máxima ($\ln S$) que se alcanza cuando todas las especies están igualmente presentes; si este valor de E aumenta, la diversidad de la muestra analizada también aumenta (Borneman *et al.*, 1996; Smit *et al.*, 2001; Escalante *et al.*, 2004). Cabe resaltar que la fracción de microorganismos desarrollados bajo las condiciones de cultivo, corresponde sólo a la fracción de bacterias mesófilas aerobias, cumpliéndose el cálculo de estos índices para este grupo microbiano.

Tabla 10. Índice de Shannon-Weaver y valor de Evenness parte cultivable

Muestra	H	E
T0	1.62	0.74
T1	2.23	0.76
T2	1.83	0.71
T3	2.82	0.88

VII.3. Implicaciones biológicas de los grupos bacterianos detectados en las muestras T0-T3 fracción cultivable: mesófilos aerobios y facultativos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las muestras de suelo respecto a la diversidad microbiana presente, se realizó una búsqueda de algunas de las características biológicas de los microorganismos identificados y los roles que posiblemente desempeñarían al encontrarse en las muestras analizadas.

Así mismo, cabe aclarar que los resultados obtenidos en la fracción cultivable concuerdan muy bien con los microorganismos mesófilos aerobios, pues las identidades obtenidas a partir de las secuencias de los aislados tienen esta característica, de acuerdo a lo reportado en bibliografía.

Se muestra a continuación una tabla (**tabla 11**) que describe el phylum, clase y etapa en la cual se detectó el microorganismo y características presentes asociadas al tipo de suelo del que se aisló el microorganismo (vertisol), así como implicaciones biotecnológicas y/o biológicas del microorganismo identificado.

Tabla 11. Características relevantes de los principales microorganismos detectados en las muestras T0-T3 de suelo para cultivo de caña de azúcar. Muestra cultivable

Phyllum/Clase	Etapa del que se aisló	Características asociadas	Referencias
Identidad			
Firmicutes / Bacilli			
<i>Bacillus sp.</i>	T0,T1,T2,T3	Bacteria alcalófila facultativa por lo que crece bien no sólo alrededor de pH 10 sino que también en un rango de pH neutro. Reportes afirman que <i>Bacillus sp.</i> permite a la planta mantenerse saludable y aumentar su rendimiento en cuanto a crecimiento, pues la digestión microbiana de residuos orgánicos mejora la estructura del suelo e incrementa la disponibilidad de nutrientes para la planta.	(Shen, 1997)
<i>Bacillus megaterium</i>	T0,T1,T2,T3	Principalmente una bacteria del suelo, <i>que</i> también se encuentra en ambientes diversos desde arrozales hasta en alimentos secos, agua de mar, sedimentos, e incluso en la miel de abeja. Taxonómicamente, se coloca en el grupo de <i>B. subtilis</i> de la clase Bacilli. Debido a su aplicación para la producción de varias sustancias biotecnológicas, <i>B. megaterium</i> es de interés general para la industria. No produce endotoxinas asociadas a la membrana externa. Tiene una amplia variedad de uso de fuentes de carbono. Para nombrar unos cuantos productos de gran importancia industrial, <i>B. megaterium</i> se utiliza para la producción de varias alfa- y beta-amilasas que se utilizan para la modificación del almidón en la industria de la panificación. Además, <i>B. megaterium</i> se utiliza para la producción de penicilin-acilasas que son esenciales para la síntesis de nuevos antibióticos β -lactámicos. Además, <i>B. megaterium</i> es conocido por su capacidad para sintetizar vitamina B12 aeróbica y anaeróbicamente.	(Kim, 2003; Von Tersch <i>et al.</i> , 1997; Robbins, 1990; Priest, 1997)
<i>Bacillus cereus</i>	T0,T1,T2,T3	<i>Bacillus cereus</i> es una bacteria formadora de esporas, es aerobio facultativo, gram-positivo cuyas células son bacilos grandes. Se encuentra comúnmente en el suelo, el aire, y el agua, forma esporas que le permiten sobrevivir a la pasteurización y a bajos niveles de calor. Muchos casos de intoxicación alimentaria <i>B. cereus</i> se producen por comer arroz contaminado. Se ha aislado de alimentos con alto contenido de almidón. Produce penicilinasas.	(Nature 423, 2003)

Tabla 11. (Continuación)

<i>Bacillus subtilis</i>	T0,T1	<p><i>Bacillus subtilis</i> es una bacteria comúnmente del agua, el suelo, el aire y de los residuos en descomposición de las plantas. La bacteria produce endoesporas que le permiten soportar condiciones extremas de calor y de desecación en el medio ambiente. Crece débilmente en la ausencia de oxígeno excepto en la presencia de nitratos los cuáles puede utilizar como un aceptor de electrones alternativo. <i>B. subtilis</i> produce una variedad de proteasas y otras enzimas que le permiten degradar una variedad de sustratos naturales. Se considera un organismo benigno, ya que no se considera patógena o toxigénica a los seres humanos, animales o plantas. Además, Klier <i>et al.</i> (1983) demostraron la capacidad de <i>B. subtilis</i> para el intercambio de plásmidos de transferencia de alta frecuencia.</p> <p>Las aplicaciones industriales incluyen la producción de amilasas, proteasas, y aminoácidos. Produce el antibiótico bacitracina, bacillin, y bacillomycin B (Parry <i>et al.</i>, 1983)</p>	(Claus y Berkeley, 1986)
<i>B. firmus</i>	T3	Microorganismos gram positivo, aerobio y alcalófilo. <i>B. firmus</i> sirve como agente de control biológico de <i>Phytophthora capsici</i> Leo. en jitomate. (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) También es ampliamente utilizado como nematocida en algunos alimentos como las zanahorias. Es una bacteria móvil con flagelos peritricos, de esporas subterminales y anaerobio facultativo.	(EFSA Journal, 2012)
<i>Brevibacterium halotolerans</i>	T3	Bacilos cortos gram-positivos aeróbicos, anteriormente clasificados en el género Bacterium. El género a veces ha alojado una amplia gama de organismos con muy diversas características fisiológicas, químicas y bioquímicas; aunque muchos de ellos ya han sido trasladados a otros géneros (tales como <i>Arthrobacter</i> , <i>Aureobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Exiguobacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Oerskovia</i> y <i>Rhodococcus</i>).	Carlotti y Funke, 1994)
<i>Bacillus badius</i>	T3	Este microorganismo gram positivo que se caracteriza por formar colonias arborescentes. Estas colonias no son diferentes a los de <i>mycoides</i> y <i>Bacillus prausnitzii</i> del grupo <i>mycoides</i> . Se diferencia de estos organismos en sus reacciones bioquímicas y en la producción de un pigmento marrón, pero puede ser colocado en el mismo grupo. Se ha encontrado en muestra de heces. Su morfología es un bacilo largo con extremos redondos, que varía en longitud de 2,35 a 4,5 micras. Rara vez se forman cadenas cortas. Presenta movilidad activa en cultivos jóvenes. Forma esporas ovales subterminales desde el primer día en agar de glucosa, pero sólo después de cuatro a cinco días en agar nutritivo.	(Dietz y Batchelor, 1980)

Tabla 11. (Continuación)

<i>Bacillus thuringiensis</i>	T3	<p><i>Bacillus thuringiensis</i> es un bacilo gram positivo, de flagelación peritrica, que posee la característica de desarrollar esporas de resistencia elipsoidales. Es anaerobio facultativo, quimiorganótrofo y con actividad de catalasa. Posee la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetilglucosamina. Forma parte del grupo de <i>Bacillus cereus</i>, el que incluye a <i>B. anthracis</i>, <i>B. cereus</i> y <i>B. mycoides</i>.</p> <p><i>Bacillus thuringiensis</i> es el insecticida biológico más aplicado en el mundo y se utiliza para controlar diversos insectos que afectan la agricultura, la actividad forestal y que transmiten patógenos humanos y animales ya que durante el proceso de esporulación produce una inclusión parasporal, formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos.</p>	(Sauka y Benintende, 2008)
<i>B. mycoides</i>	T3	Bacteria saprófita del suelo que puede ser aislada rápidamente con la capacidad de formar endoesporas termorresistentes y ser identificada por su única morfología colonial rizoide, no móvil. Es un miembro del complejo de especies de <i>B. cereus</i> ; siendo que se ha mostrado a éstas especies como complejas por el poder de someterse a la transferencia célula a célula de plásmidos y material genético cromosomal, bajo condiciones de laboratorio. Esta bacteria produce un antibiótico que ha sido utilizado en algunos cultivos para suprimir hongos causantes de enfermedades.	(Bell y Friedman, 1994)
<i>B. sphaericus</i>	T0	Es ampliamente utilizado para el control de plagas de insectos al producir una toxina con actividad larvívica.	(Vázquez, 2011)
<i>B. mojavenis</i>	T3	Aislados de <i>Bacillus mycoides</i> y <i>B. mojavenis</i> se han analizado respecto a su capacidad para controlar a <i>Glomerella cingulata</i> , el agente causal de la antracnosis del pepino. Una cepa de <i>B. mojavenis</i> es antagónica del hongo <i>Fusarium moniliforme</i> , un patógeno endófito de plantas de maíz y otros, productor de micotoxinas.	(Neher et al., 2009)
<i>Staphylococcus</i> sp.	T1	Cepas de este género han sido aisladas de suelos contaminados con petróleo y han mostrado ser útiles para su biorremediación.	(Vázquez, 2011)

Tabla 11. (Continuación)

Proteobacteria/ γ -proteobacteria			
<i>Pseudomonas</i> sp.	T1,T2	Este microorganismo, encontrado en las zonas de la rizósfera de los campos de cultivo, son poderosos solubilizadores de fosfato y ciertas especies (<i>P. putida</i>) son capaces de transformar las formas orgánicas de sulfuro presentes en suelo a sulfato inorgánico biodisponible. <i>Pseudomonas</i> lleva a cabo la solubilización de fosfatos en el suelo sin representar un peligro al ambiente. Son bacterias desnitrificantes.	(Vázquez, 2011)
<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i>	T3	Especies de <i>Acinetobacter</i> son bacterias oxidasa-negativas, no móviles, que aparecen como cocobacilos gram-negativos agrupados en parejas, bajo el microscopio. <i>Acinetobacter</i> es un género de bacterias ampliamente distribuido en el suelo y en medios acuáticos. En la actualidad cuenta con 17 especies descritas válidamente y 14 especies genómicas identificadas. Se ha reportado que <i>Acinetobacter rhizosphaerae</i> es capaz de hidrolizar el nematocida FEN, un nematocida organofosforado (OP) que se utiliza en los cultivos hortícolas.	(Chanika et al., 2011)
<i>Escherihchia coli</i>	T0	Es un importante residente del colon de los seres humanos y de otros animales de sangre caliente, que resulta bastante útil en el análisis del agua para determinar si existe contaminación fecal.	(Prescott et al., 2004)
<i>Enterobacter</i> sp.	T0, T1,T3	Estas bacterias son conocidas por promover el crecimiento de las plantas.	(Taghavi et al.,2010)
Proteobacteria/ δ -Proteobacteria			
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	T3	<i>Desulfovibrio</i> presenta un genoma de alrededor de 3Mbp. <i>Desulfovibrio vulgaris</i> es un bacilo anaerobio gram-negativo, no formador de esporas, en forma de bastoncillos curvos, aislado del suelo, los intestinos de animales, heces, del agua dulce y salada. Es una bacteria conocida por su flexibilidad en la variedad de aceptores de electrones que utiliza como: sulfato, azufre, nitrato, nitrito, entre otros. <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough ha sido estudiado como modelo de interés para biorremediación, por su capacidad de reducir varios metales tóxicos tales como el uranio (VI), cromo (VI) y hierro (III) así como estudio del metabolismo de la energía de las bacterias reductoras de sulfato.	(Enigma & Hydrogen regulation, 2013; Cabrera et al., 2006)

Bacteroidetes/Chlorobi, Bacteroidetes			
<i>Flavobacterium</i> sp.	T2	Estas bacterias se encuentran en suelo, agua fresca y habitats marinos. Muchas especies se adaptan al frio, mientras que otras son patógenas a peces de agua dulce.	(Liu <i>et al.</i> , 2008)

VII.4. Perfil Metabólico determinado por el sistema EcoPlate.

Se utilizó el sistema EcoPlate™ de BIOLOG el cual contiene 31 de las fuentes de carbono (por triplicado) más útiles para el análisis metabólico de la comunidad bacteriana del suelo. Ya que los organismos presentes en una comunidad pueden ser considerados como una unidad funcional caracterizada por la suma de las propiedades metabólicas de los individuos, la determinación del perfil fisiológico a nivel de comunidad (CLPP, por sus siglas en inglés) a través de los indicadores de respuesta metabólica promedio (AMR, por sus siglas en inglés) y la diversidad metabólica de la comunidad (CMD, por sus siglas en inglés), representa un método rápido y sensible para evaluar la diversidad metabólica potencial de comunidades microbianas, así como también el impacto de la adición de hidrocarburos, fertilizantes y metales sobre las bacterias del suelo.

AMR describe la utilización promedio de las fuentes de carbono por la comunidad microbiana y proporciona una métrica única por la cual las comunidades pueden ser comparadas. El AMR se calcula como el promedio de la diferencia media entre la densidad óptica (O.D.) de los pocillos que contiene la fuente de carbono y el control.

CMD está representado por el número de sustratos utilizados por la comunidad microbiana y es equivalente a la riqueza funcional de la comunidad. CMD se calcula sumando el número de respuestas positivas (pozos de color púrpura) observados después de la incubación. A partir de los datos de absorbancia obtenidos para el análisis de cada muestra se calculó el AMR y CMD (**Figura 22**).

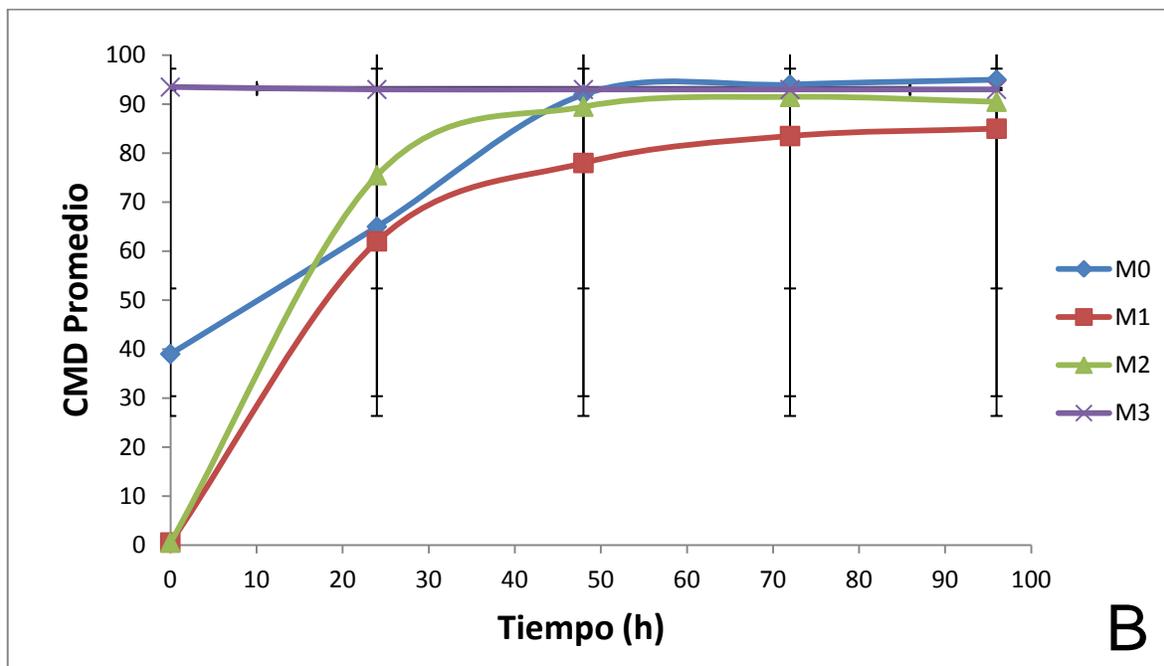
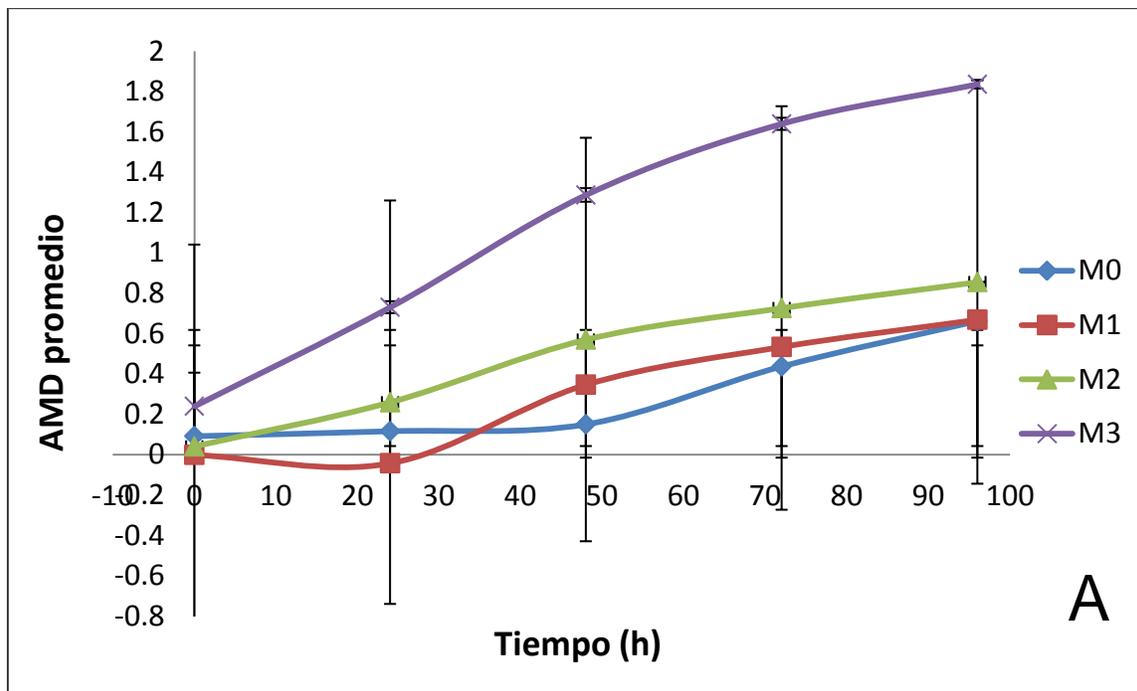


Figura 22. AMR (A) y CMD (B) de las muestra T0, T1 T2 y T3. Los valores son el promedio de los datos registrados y analizados para dos placas por muestra. T0, T1, T2, T3.

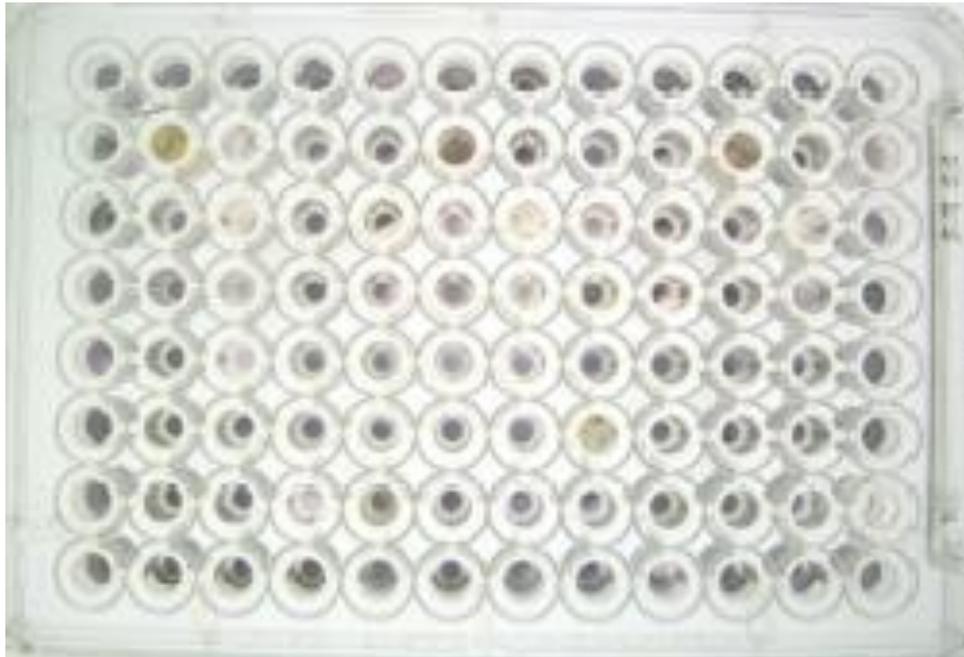


Figura 23. EcoPlate™ después de incubación por 96 horas

Para el cálculo de los parámetros AMR y CMD de las muestras T0-T3 se debe de establecer un valor umbral de absorbancia el cual debe de corresponder a la D.O._{590nm} de la coloración purpura que indica el uso de una fuente de carbono.

De acuerdo a los datos observados en la **figura 22**, no existen diferencias entre los valores de AMR y CMD entre las muestras T0, T1 y T2, lo que indica un perfil metabólico microbiano similar entre las tres muestras analizadas. Sin embargo, en lo que respecta a la muestra T3, ésta presenta diferencias en el perfil metabólico en comparación con las otras muestras ya que, de acuerdo a los tiempos en que fue analizado el uso de sustratos en el sistema EcoPlate, se incrementa la asimilación de las fuentes de carbono y en un menor tiempo. De esta manera se explica que, ya que la caña de azúcar posee altos requerimientos nutricionales debido a su elevada capacidad de producción de material vegetal y la prolongada duración de su ciclo, es una razón por la cual la diversidad microbiana presente permite o colabora con una elevada extracción y asimilación de nutrientes del suelo.

En sentido estricto, el valor de absorbancia de cero indicaría la no asimilación de la fuente de carbono donde se establece un valor umbral de $O.D._{590nm} = 0.25$ (Garland, 1997), observándose en la tabla 12, que los valores promedio de absorbancia porcentual para cada fuente de carbono incluidas en la EcoPlate están en un rango arbitrario de 0% hasta >2.0% de utilización, indicando respectivamente la no asimilación de una fuente de carbono y el máximo de utilización detectado para las muestras analizadas de suelo de los tiempos T0, T1, T2 y T3. Estos valores presentados en la Tabla 12 muestran que hay una asimilación de diversas aminos, aminoácidos, carbohidratos, ácidos carboxílicos, polímeros y compuestos fenólicos, siendo pocos los sustratos que presentan una mayor asimilación (>2.0%). Es importante considerar que en la literatura se reportan valores de absorbancia porcentual (valores <6%) mayores al valor máximo observado en este trabajo para las muestras T0-T3 (Tiquia, 2010), lo que sugiere que el perfil metabólico de las muestras del suelo analizado en este trabajo es bajo. Así mismo, es importante considerar también que la cuenta microbiana total detectada en las muestras fue de 10^4 UFC/mL para T0 y de 10^5 para T1, T2 y T3, respectivamente y que la diversidad bacteriana que se logró identificar (Firmicutes) se considera relativamente baja en cuanto a la diversidad de grupos bacterianos posibles en la muestra y de acuerdo también a la diversidad de sustratos fermentados en el sistema EcoPlate.

Debido a que no existen reportes previos de la diversidad bacteriana asociada a algún tipo de cultivo de caña de azúcar, no es posible establecer una comparación con la diversidad y abundancia microbiana detectada en este trabajo; sin embargo se puede hacer una comparación con los microorganismos aislados obtenidos en estudios que hayan realizado un análisis a un tipo de suelo agrícola o ambiental.

Tabla 12. Patrón de uso de las 31 fuentes de carbono de las muestras de suelo T0-T3 obtenido por el sistema EcoPlate.

Fuente de Carbono	Muestra			
	T0	T1	T2	T3
<u>Aminas</u>				
Putrescina				
Feniletilamina				
<u>Aminoácidos</u>				
L-arginina				
L-asparagina				
L-fenilalanina				
L-serina				
Ácido glicil-L-glutámico				
L-Treonina				
<u>Carbohidratos</u>				
α -D-lactosa				
Metil- β -D-glucósido				
D-celobiosa				
D-manitol				
I-eritritol				
Glucosa-1-fosfato				
Ácido D-galactónico γ -lactona				
N-acetil-D-glucosamina				
D,L- α -glicerol fosfato				
D-xilosa				
<u>Ácidos carboxílicos</u>				
Ácido α -cetobutírico				
Acido D-glucosamínico				
Ácido D-malico				
Ácido γ - hidroxibutírico				

0.0 - 0.49%	
0.5 - 0.99%	
1.0 - 1.49%	
1.5 - 1.99%	
>2.0%	

Piruvato de metilo				
Acido D- galacturónico				
Ácido itacónico				
<u>Polímeros</u>				
α-ciclodextrina				
Tween 40				
Tween 80				
Glicógeno				
<u>Compuestos fenólicos</u>				
Acido 2- hidroxibenzoico				
Acido 4- hidroxibenzoico				

VIII. Conclusiones

En este trabajo se reporta por primera vez un estudio sobre la fluctuación de la diversidad bacteriana no cultivable y cultivable presente en el suelo utilizado para cultivo de la caña de azúcar, durante las primeras cuatro etapas de su cultivo.

El método de DGGE resultó una herramienta de diagnóstico alternativa rápida que permitió comparar estructuras de la comunidad microbiana no cultivable presente en un suelo para cultivo de caña de azúcar.

El alcance que mostró la técnica de DGGE no permitió como tal asignar una identificación de los grupos microbianos no cultivables a un género en específico, pero sí identificó grupos microbianos pertenecientes a acidobacterias aisladas de muestras agrícolas, a una rizobacteria no cultivable y a clonas bacterianas no cultivables para las secuencias analizadas.

El DGGE reveló patrones de bandeo muy parecidos en las cuatro muestras de suelo lo cual indica que la diversidad no cultivable de microorganismos mesófilos aerobios no presenta cambios importantes asociados a los diferentes tratamientos del suelo.

La cuenta microbiana total para las etapas de cultivo analizadas por métodos dependientes de cultivo se mantuvo en un orden de magnitud de 10^5 UFC/mL, por tanto, no hay impacto de los tratamientos del suelo sobre la cuenta bacteriana total.

El patrón de restricción (ARDRA) funcionó como una herramienta discriminativa entre los aislados obtenidos por el método dependiente de cultivo.

La diversidad de la comunidad bacteriana cultivable mesófila aerobia o facultativa, si se ve afectada por la adición de agua, aplicación de herbicida y fertilizante al suelo.

El género microbiano predominante identificado en este suelo vertisol para producción de caña de azúcar fue el género *Bacillus*, el cual no se ve afectado por las prácticas agrícolas aplicadas.

Mediante la integración de la información obtenida por métodos dependientes de cultivo de la fracción microbiana mesófila aerobia o facultativa, los microorganismos *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis*, se identificaron como los microorganismos dominantes de este tipo de suelo de cultivo, asociados inicialmente y naturalmente al suelo.

Las técnicas empleadas para la fracción cultivable y la no cultivable no son excluyentes una de la otra pues, pese a ciertas debilidades en la metodología para la identificación de la diversidad bacteriana del suelo, se complementaron en información.

El perfil metabólico de la comunidad microbiana mostró que no existen diferencias muy significativas entre las muestras T0, T1 y T2; sin embargo, la muestra T3 implica una mayor asimilación de fuentes de carbono relacionada ampliamente a la adición del fertilizante.

IX. Perspectivas

Analizar los aislados cuya identidad no se pudo determinar por análisis de secuencias de ADNr 16S: secuenciación del operón ribosomal completo.

Analizar y comparar un set diferente de primers que permitan mejorar la amplificación de la región variable analizada por DGGE de la diversidad bacteriana del suelo, favoreciendo tanto la identificación de la fracción cultivable como la no cultivable.

Realizar el estudio de la fracción cultivable y no cultivable con base en otras condiciones de incubación, búsqueda de medios de cultivo de composición distinta, que favorezcan tanto el crecimiento de bacterias anaerobias, microaerófilas, de hongos y levaduras, microorganismos fastidiosos, etc., que puedan estar presentes en el suelo de estudio.

X. Anexos

Anexo I. Fuentes de carbono en el EcoPlate™

A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine
H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

Anexo II. Composición del medio TSA (Agar tripticaseína soya)

<i>(Fórmula en gramos por Litro)</i>	
Peptona de Caseína	15.0
Peptona de Soya	5.0
Cloruro de Sodio	5.0
Agar Bacteriológico	15.0
pH 7.3 ± 0.2	
<p>El Agar de Soya Trypticaseína provee un excelente soporte de crecimiento para organismos aerobios y anaerobios, según lo demostró Leavit en 1955. En este medio las peptonas proveen la fuente de nitrógeno y minerales. El azúcar de la peptona de soya provee la fuente de carbohidratos. El cloruro de sodio tiene su función en el balance osmótico y el agar es incorporado como agente solidificante.</p>	

(Leavit, 1955)

XI. Bibliografía

- Aguirre Garrido, J. F. (2005). *Seguimiento de la comunidad bacteriana en suelos contaminados por hidrocarburos durante su tratamiento en biorreactores de fase semisólida*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana.
- Alexander, M. (1997). *Introduction to Soil Microbiology*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Arcuri, E. F., El Sheikha, A. F., & Rychlik, T. (2012). Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacteria communities by PCR-DGGE: preliminary application to traditional Minas cheese. *Food Control* , Accepted Manuscript.
- Baker, G., Smith, J., & Cowan, D. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* , 55: 541– 555.
- Bertrand, H., Poly, F., Tran Van, V., Lombard, N., Nalin, R., Vogel, T. M., y otros. (2005). High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction. *Journal of Microbiological Methods* , 62:1– 11.
- Boddey, R. (1995). Biological Nitrogen fixation in sugarcane. A key for energetically viable biofuel production. *Critical Reviews in plant sciences* , 14: 263-279.
- Borneman, J., Skroch, P. W., O'sullivan, K. M., & Palus, J. A. (1996). Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology* , 62:1935–1943.
- Braun, B., Bockelmann, U., Grohmann, E., & Szewzyk, U. (2006). Polyphasic characterization of the bacterial community in an urban soil profile with in situ and culture-dependent methods. *Applied Soil Ecology* , 31: 267–279.
- Brian Endlich, S. L. (1981). Type I, II. Restriction enzymes. *The enzymes* , 14:137-156.
- Calábria de Araújo, J., & Schneider, R. P. (2008). DGGE with genomic DNA: Suitable for detection of numerically important organisms but not for identification of the most abundant organisms. *Water Research* , 42: 5002–5010.

- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., & Connell, N. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* , 69; 330–339.
- Dolores Martínez, P. (2009). *Identificación de levaduras en el queso cotija por métodos moleculares dependientes e independientes del cultivo*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* , 56: 297– 314.
- Escalante-Lozada, A., Gosset-Lagarda, G., Martínez-Jiménez, A., & Bolívar-Zapata, F. (2004). Diversidad bacteriana del suelo: Métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Publicado como ensayo en Agrociencia* , 38: 583-592.
- FAO. (2009). *Guía para la descripción de suelos*. Roma, Italia: Cuarta edición.
- FAOSTAT. (2011). *Crops - Production quantity*. Recuperado el 6 de Abril de 2013, de Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://faostat.fao.org/site/567/>
- Felske, A., Wolterink, A., van Lis, ,. R., M. de Vos, W., & Akkermans, A. D. (1999). Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiology Ecology* , 30: 137-145.
- Fengchao, W., Fan, L., Guanjun, C., & Weifeng, L. (2009). Isolation and characterization of novel cellulase genes from un cultured microorganisms in different environmental niches. *Microbiological Research* , 164: 650—657.
- Gafan, G. P., & Spratt, D. A. (2005). Denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion (DGGE) – An attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities. *FEMS Microbiology Letters* , 253:303–307.
- Green, B. D., & Keller, M. (2006). Capturing the uncultivated majority. *Current Opinion in Biotechnology. ELSEVIER* , 17:236–240.
- Handelsman. (2002). Cloning the metagenome: culture independent access to the diversity and functions of the uncultivable microbial world. *Methods in Microbiology vol. 33. Functional Genomics. Wren, B. and N. Dorrel, (eds). Academic Press. Amsterdam, The Netherlands.* , pp: 241-255.

- ISRIC. (2009). *World Soil Information*. Recuperado el Abril de 2013, de <http://www.isric.org/>
- Jousset, A., Lara, E., Nikolausz, M., Harms, H., & Chatzinotas, A. (2012). Application of the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique as an efficient diagnostic tool for ciliate communities in soil. *Science of the Total Environment* , 408: 1221–1225.
- Keller, M., & Zengler, K. (2004). Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews* , 2: 141-150.
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Hung, L., y otros. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* , 58: 169– 188.
- Li, H., Zhang, Y., Li, D.-s., Xu, H., & Guan-X. (2009). Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for fingerprinting of microbial communities in paddy soils. *Soil Biology & Biochemistry* , 41: 954–968.
- Llorente Sánchez, M. (2004). *Caracterización física y química de vertisoles del noreste de México sometidos a distintas formas de manejo*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Microbiology, A. S. (2005). *Applied and Environmental Microbiology*. Washington, DC: American Society for Microbiology 71: 7633-9012.
- Miletto, M., Bodelier, P. L., & Laanbroek, H. J. (2007). Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments. *Journal of Microbiological Methods* , 70: 103–111.
- Mocali, S., & Benedetti, A. (2010). Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology* , 161:497-505.
- Pallas, V., Escobar, C., Rodriguez Palenzuela, P., & F. Marcos, J. (2008). *Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología*. Madrid: Editorial Mundi-Prensa.
- Petersen, D. G., & Dahllorf, I. (2005). Improvements for comparative analysis of changes in diversity of microbial communities using internal standards in PCR-DGGE. *FEMS Microbiology Ecology* , 53: 339–348.

- Pla, L. (2006). Biodiversidad basada en el índice de Shannon y la Riqueza. *Interciencia* , 31:583-590.
- Rajendhran, J., & Gunasekaran, P. (2008). Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnology Advances* , 26: 576–590.
- Rodriguez, A. J., Trujillo, I. D., Bringas, Y., Rojas, M., Manzano, J., & Pérez, M. H. (2005). Caracterización fisiológica de la comunidad microbiana endófitas de la caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología* , 2:66-75.
- Rosas, Irma; Cravioto, Alejandro; Exequiel, Ezcurra;. (2004). La ecología microbiana: una nueva ciencia para un nuevo siglo. En *Microbiología ambiental* (págs. 107-127). México.
- Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., Van Den Broek, J., Van Mii, S., & Wernars, K. (2001). Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial Soil Community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology* , 67:2284–2291.
- Taupp, M., Mewis, K., & Hallam, S. J. (2011). The art and design of functional metagenomic screens. *Current Opinion in Biotechnology* , 22:465–472.
- Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* , 5:240–245.
- Tortora, G. J. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Panamericana.
- Varma, A., Werner, D., & Abbott, L. (2008). Plant surface Microbiology. En *Functional diversity of soil microflora* (págs. 71-75). New York: Springer.
- Vázquez Domínguez, A. (2011). Análisis de la fluctuación estacional de la diversidad microbiana de un suelo agrícola utilizado para cultivo de caña de azúcar. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Viti, C., & Giovannetti, L. (2005). Characterization of cultivable heterotrophic bacterial communities in Cr-polluted and unpolluted soils using Biolog and ARDRA approaches. *Applied Soil Ecology* , 28: 101–112.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* , 173(2):697-703.

Williamson, K. E., Kan, J., Polson, S. W., & Williamson, S. J. (2011). Optimizing the indirect extraction of prokaryotic DNA from soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 43: 736-748.

WRB, W. G., & IUSS. (2007). *World Reference Base for Soil Resources 2006, first update 2007*. World Soil Resources Reports No.103: FAO, Rome.