

MANUAL DE MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE EXTREMÓFILOS

María Eugenia Hidalgo Lara / Rosa María Camacho Ruiz
Ma. Nieves Trujillo Tapia / Ramón Alberto Batista García

(editores)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

MANUAL DE MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE EXTREMÓFILOS

Primera edición, mayo de 2023

D.R. © 2023, María Eugenia Hidalgo Lara, Rosa María Camacho Ruiz,
Ma. Nieves Trujillo Tapia, Ramón Alberto Batista García (editores)

D.R. © 2023, Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, CP 62209
Cuernavaca, Morelos, México
publicaciones@uaem.mx
libros.uaem.mx

Corrección de estilo: Dirección Editorial de la UAEM
Diseño de portada e interiores: Yusleidy Llerena Fernández

ISBN: 978-607-8951-07-9
DOI: 10.30973/2023/manual-extremofilos



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0).

Hecho en México

ÍNDICE

1

INTRODUCCIÓN ORGANISMOS EXTREMÓFILOS Y SUS BIOMOLÉCULAS, IMPORTANCIA DE LOS MÉTODOS PARA SU ESTUDIO

10 Rosa María Camacho Ruiz

2

MUESTREO, AISLAMIENTO, CONSERVACIÓN Y MANTENIMIENTO

- 13 **AISLAMIENTO DE BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTAS DE AGUAS Y SEDIMENTOS MARINOS SUPERFICIALES.** Cynthia Lizzeth Araujo-Palomares, Hortencia Silva Jiménez
- 19 **ELABORACIÓN DE MAPAS PARA LOCALIZAR A HONGOS MICROSCÓPICOS DEL HIELO.** Mónica Cervantes Jiménez, Javier Arturo Moreno Morán, Rosa Paulina Calvillo Medina
- 24 **AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS TERMÓFILOS DE AGUAS TERMALES Y SUELOS ASOCIADOS.** Rosa María Oliart Ros, Rodolfo Quintana Castro, Graciela Espinosa Luna
- 30 **MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN *Rhizobium*, *Azotobacter* y *Azospirillum* PARA USO EN SUELOS EXTREMOS.** Yad Ciri Ojendiz Mata, Jeiry Toribio Jiménez, Erubiel Toledo Hernández
- 39 **MUESTREO DE AGUAS TERMALES DEL VOLCÁN EL CHICHÓN PARA EL AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS TERMÓFILOS.** Arturo Peña Blassi, Sandy Luz Ovando Chacón, Cristina Ventura Canseco
- 44 **TÉCNICA PARA EL CULTIVO DE BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS ROJAS Y VERDES DEL AZUFRE.** María Teresa Núñez Cardona, Jordi Mas Gordi, Olga Sánchez Martínez
- 52 **AISLAMIENTO DE BACTERIAS ENDÓFITAS ASOCIADAS A RAÍCES DE LEGUMINOSAS A PARTIR DE SUELOS IMPACTADOS POR ESTRÉS ABIÓTICO.** Miguel Angel Villalobos López, Selma Ríos Meléndez, Analilia Arroyo Becerra
- 61 **LA COLECTA Y PRESERVACIÓN DE CIANOBACTERIAS DE LA ZONA SUPRAMAREAL PARA UNA TAXONOMÍA CON APROXIMACIÓN POLIFÁSICA.** María Laura González Resendiz, Mónica Ramírez Vázquez, Hilda Patricia León Tejera

3

IDENTIFICACIÓN: MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA Y MOLECULAR

- 69 **MÉTODO SIMPLIFICADO PARA EL ESTUDIO MORFOLÓGICO, POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO, DE ACTINOMICETOS HALÓFILOS.** Horacio Sandoval Trujillo, Ninfa Ramírez Durán
- 75 **DEL GLACIAR A LA CAJA DE PETRI: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS PSICRÓFILOS.** Rosa Paulina Calvillo Medina

4

PROSPECCIÓN DE ORGANISMOS EXTREMÓFILOS, DE SUS GENES, PROTEÍNAS U OTROS PRODUCTOS PARA SU UTILIZACIÓN EN DIFERENTES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS:

4.1 ENZIMAS

- 81 **BIOPROSPECCIÓN DE EXTREMOENZIMAS HIDROLÍTICAS CON POTENCIAL EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS.** Lourdes Yaret Ortiz Cortés, Cristina Ventura Canseco, Peggy Elizabeth Álvarez Gutiérrez
- 88 **PROSPECCIÓN DE ENZIMAS DE TERMÓFILAS CON APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA.** Rodolfo Quintana Castro, María Guadalupe Sánchez Otero, Graciela Espinosa Luna
- 95 **IDENTIFICACIÓN DE *Geobacillus* PRODUCTORES DE LIPASA AISLADOS DEL LAGO CRÁTER DEL VOLCÁN EL CHICHÓN.** Arturo Peña Blassi, Sandy Luz Ovando Chacón, Peggy Elizabeth Álvarez Gutiérrez
- 100 **BIOPROSPECCIÓN DE ÓXIDO-REDUCTASAS EN HONGOS FILAMENTOSOS PARA LA REMOCIÓN DE COLORANTES EN MEDIO LÍQUIDO.** Marina Gutiérrez Antón, Alejandro Santiago Hernández, María Eugenia Hidalgo Lara
- 107 **SELECCIÓN FUNCIONAL DE ENZIMAS TERMOFÍLICAS CON POTENCIAL APLICACIÓN EN LA DEGRADACIÓN DE BIOMASA VEGETAL.** Maribel Cayetano Cruz, Alejandro Santiago Hernández, María Eugenia Hidalgo Lara

4.2 INDUSTRIA DE DETERGENTES

- 114 **DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE EXTRACTOS PROTEOLÍTICOS EN SOLUCIONES DE DETERGENTES DE LAVANDERÍA: SOLVENTES, TENSOACTIVOS Y AGENTES OXIDANTES.** Lilia Arely Prado Barragán, Juan Carlos Coronado Corral
- 119 **DETERMINACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD DEL EXTRACTO PROTEOLÍTICO CRUDO DE UNA BACTERIA HALÓFILA CON FORMULACIONES DE DETERGENTES COMERCIALES.** María Isabel Estrada Alvarado, Luis Alberto Cira Chávez

4.3 BIOPELÍCULAS

- 125 **ESTUDIO DE BIOPELÍCULAS FOTOSINTÉTICAS SUBAÉREAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL.** Mónica Ramírez Vázquez, María Laura González Reséndiz, Hilda Patricia León Tejera

4.4 BIORREMEDIACIÓN

- 133 **SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO INORGÁNICO POR BACTERIAS AISLADAS DE JALES MINEROS.** Brenda Celeste Rodríguez Chacón, Diana Iveth Orbe Díaz, Angela Forero Forero

4.5 INDUSTRIA FARMACÉUTICA

- 139 **MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN EN AGAR.** Kevy Guerra, Carlos Angulo
- 144 **MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR MICRODILUCIÓN.** Kevy Guerra, Carlos Angulo

4.6 PREPARACIÓN DE BIOFERTILIZANTES O AGENTES PROMOTORES DE CRECIMIENTO DE PLANTAS

- 152 **MÉTODO DE ELABORACIÓN DE BIOINOCULANTES DE BAJO COSTO COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL.** Diana Iveth Orbe Díaz, Brenda Celeste Rodríguez Chacón, Jeiry Toribio Jiménez

5

MÉTODOS BIOQUÍMICOS. PRODUCCIÓN, AISLAMIENTO, INMOVILIZACIÓN, CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS Y OTRAS BIOMOLÉCULAS DE EXTREMÓFILOS

- 158 **OBTENCIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE TEMPERATURA, PH Y AGITACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS EN *Geobacillus* sp.** César Octavio García Hernández, Sandy Luz Ovando Chacón, Peggy Elizabeth Álvarez Gutiérrez
- 165 **CARACTERIZACIÓN DE SOLUTOS COMPATIBLES DE BACTERIAS EXTREMÓFILAS MEDIANTE RMN.** Sandra I. Ramírez Jiménez, Marisela Aguirre Ramírez
- 171 **CUANTIFICACIÓN DE PROTEASAS HALOALCALINAS EMPLEANDO UN MÉTODO CINÉTICO BASADO EN pH.** Rosa María Camacho Ruiz, Raúl Balam Martínez Pérez, María Angeles Camacho Ruiz
- 175 **DETECCIÓN CUANTITATIVA Y CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA.** Graciela Espinosa Luna, María Guadalupe Sánchez Otero, Rosa María Oliart Ros
- 181 **INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS TERMÓFILAS PARA SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA DE LOS ALIMENTOS Y OTRAS.** Rosa María Oliart Ros, Rodolfo Quintana Castro, María Guadalupe Sánchez Otero
- 185 **PRODUCCIÓN DE CLEAS DE ENZIMAS TERMÓFILAS PARA SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA.** Rodolfo Quintana Castro, Graciela Espinosa Luna, María Guadalupe Sánchez Otero
- 189 **PROCEDIMIENTO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BACTERIOCLOROFILAS EN BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS.** María Teresa Núñez Cardona, Mas Gordi Jordi, Olga Sánchez Martínez

6

MÉTODOS MOLECULARES. AISLAMIENTO DE DNA, RNA Y DNA METAGENÓMICO

- 195 **EXTRACCIÓN DE ARN DE HONGOS FILAMENTOSOS EN CONDICIONES DE HIPERSALINIDAD.** Heidy Peidro Guzmán, Ramón Alberto Batista García

- 202 **EXTRACCIÓN DE ADN Y ARN EN *Bacillus* TERMOTOLERANTES.** Augusto Rojas Aparicio, Miguel Angel Rodríguez Barrera, Yanet Romero Ramírez
- 209 **CONTROL DE LA PUREZA EN EL ADN DE ACTINOBACTERIAS HALÓFILAS.** Ninfa Ramírez Durán, Horacio Sandoval Trujillo
- 215 **AISLAMIENTO DE DNA CROMOSÓMICO DE BACTERIAS TERMÓFILAS.** Rosa María Oliart Ros, María Guadalupe Sánchez Otero, Rodolfo Quintana Castro
- 220 **EXTRACCIÓN DE DNA METAGENÓMICO DEL AMBIENTE RUMINAL.** Beatriz Elena Castro Valenzuela, Perla Lucía Ordóñez Baquera

7

MÉTODOS DE CIENCIAS ÓMICAS: GENÓMICA, TRANSCRIPTÓMICA, PROTEÓMICA

- 227 **MANUAL PARA LA PREPARACIÓN DE BIBLIOTECAS DEL GEN 16S ARN_r PARA SECUENCIACIÓN ILLUMINA.** Santiago Cadena, Abril M. Gamboa, José Q. García

8

MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS. SIMULACIÓN MOLECULAR, MODELADO MOLECULAR

- 235 **PREDICCIÓN Y ANÁLISIS DE MODELOS DE PROTEÍNAS.** Graciela Espinosa Luna, Aarón Salvador Bustos Baena, Rosa María Oliart Ros

9

ANEXOS. MÉTODOS GENERALES DE BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO

- 241 **ANEXO 1. PREPARACIÓN DE MATERIAL, LIMPIEZA Y ESTERILIZACIÓN.** Ma. Nieves Trujillo Tapia
- 245 **ANEXO 2. MANEJO DE RESIDUOS BIOLÓGICOS.** Ma. Nieves Trujillo Tapia
- 249 **ANEXO 3. MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS.** Ma. Nieves Trujillo Tapia

1

**INTRODUCCIÓN
ORGANISMOS EXTREMÓFILOS Y SUS BIOMOLÉCULAS,
IMPORTANCIA DE LOS MÉTODOS PARA SU ESTUDIO**

INTRODUCCIÓN

Rosa María Camacho Ruiz

ORGANISMOS EXTREMÓFILOS Y SUS BIOMOLÉCULAS, IMPORTANCIA DE LOS MÉTODOS PARA SU ESTUDIO

El estudio de los organismos extremófilos y sus biomoléculas ha sido de gran interés, en principio se les buscó para comprender si la vida fuera de la Tierra era posible. Desde el punto de vista de la astrobiología se pensaba que, si era posible encontrar vida en ambientes con elevada o baja temperatura, con valores de pH muy ácidos o alcalinos, o en lugares con baja disponibilidad de agua, alta presión o alta salinidad, entonces era posible encontrar vida en otros planetas cuyas condiciones extremas fueran similares. Es así como se exploraron los desiertos, glaciares, geiseros, lagos salados, volcanes, ventanas hidrotermales y numerosos lugares extremos. El estudio de los ambientes extremos nos llevó a la mejor comprensión de la evolución de la vida en la Tierra, nos ayudó a entender ejemplos de interacciones que se establecen en las comunidades bacterianas y su colaboración para sobrevivir en ambientes hostiles. Comprendimos algunos de los mecanismos adaptativos que han prevalecido a lo largo de la evolución en organismos extremófilos y sus biomoléculas para hacer frente a condiciones adversas para la vida. Por otro lado, los estudios metagenómicos han contribuido a la descripción de la ecología y diversidad de microorganismos en dichos ambientes.

Otro gran aporte del estudio de los ambientes y organismos extremos está relacionado con la bioprospección de sus biomoléculas, este enfoque ha permitido encontrar aplicaciones de los microorganismos extremos y sus moléculas en diversas áreas para beneficio humano. Se han encontrado aplicaciones en el desarrollo de biocatalizadores, exopolisacáridos, pigmentos, biosurfactantes, antibióticos, promotores del crecimiento de plantas, entre otras muchas aplicaciones.

Los grandes retos en el estudio de los organismos extremófilos y sus biomoléculas han sido el desarrollo de métodos de aislamiento, cultivo, caracterización, identificación, conservación, extracción de ADN, etc.

Ya que los métodos clásicos para organismos mesófilos muchas veces no funcionan bien con los extremófilos. Por ejemplo, hace veinte años que comenzaba el estudio de la búsqueda de enzimas lipolíticas producidas a partir de arqueas halófilas, que requieren hasta 4 M de NaCl para ser activas, era complicado ya que los métodos que se utilizaban implicaban generar emulsiones con sustratos oleicos; sin embargo, precisamente al adicionar sal en esos sistemas de reacción se generaban emulsiones muy turbias que impedían su observación por métodos espectrofotométricos disponibles. Este inconveniente requirió para su evolución el desarrollo de nuevos métodos analíticos para lipasas que permitieran la incorporación de elevadas cantidades de sal en las mezclas de reacción. Hay numerosos ejemplos como éste de como los métodos tradicionales han tenido que ser adaptados para el estudio de moléculas y microorganismos extremófilos.

El presente *Manual de Métodos para el Estudio de Extremófilos*, compilado por miembros de la Red Mexicana de Extremófilos (REMEX), se concibió con el propósito de contribuir con este gran reto a través de la difusión del conocimiento adquirido por la comunidad científica mexicana que se ha enfocado al estudio de los ambientes extremos y sus organismos. Esta publicación compila métodos para el estudio de extremófilos que han sido adaptados y desarrollados por integrantes de la REMEX. El manual está organizado en ocho capítulos que abordan temas como: aislamiento, identificación, conservación de microorganismos; extracción, producción, cuantificación, prospección, aplicaciones de sus biomoléculas, así como enfoques bioinformáticos y metagenómicos, incluye además recomendaciones para buenas prácticas y manejo de residuos. La REMEX y los investigadores que la integran pretendemos con esta publicación facilitar el estudio de los organismos extremos y sus biomoléculas a investigadores y estudiantes que deseen introducirse en el estudio de la vida al extremo, esperamos que este manual de métodos sea de gran ayuda.

2

**MUESTREO, AISLAMIENTO, CONSERVACIÓN
Y MANTENIMIENTO**

AISLAMIENTO DE BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTAS DE AGUAS Y SEDIMENTOS MARINOS SUPERFICIALES

Cynthia Lizzeth Araujo-Palomares¹, Hortencia Silva Jiménez^{1*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

silvah@uabc.edu.mx

INTRODUCCIÓN

Las bacterias marinas hidrocarbonoclastas son blancos potenciales para ser utilizadas como herramientas en los procesos de biorremediación en sitios con presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y otros derivados del petróleo, ya que se adaptan rápidamente al cambio y a los ambientes nocivos, cuentan con un metabolismo especializado y con mecanismos tanto para tolerar como para potencializar la degradación de estos contaminantes (1,4).

Para acceder a esta diversidad bacteriana, es esencial que estos microorganismos sean aislados y caracterizados respecto a sus mecanismos metabólicos, así como a su habilidad para degradar estos contaminantes, para posteriormente ser utilizados en procesos de biorremediación de sitios contaminados por petróleo y sus derivados (5). Para ello, el presente protocolo se centra en la obtención de cultivos axénicos de bacterias halotolerantes y/o halófilas con alto potencial para degradar HAP provenientes de sedimentos y aguas superficiales de zonas costeras.

MATERIALES Y EQUIPO

A continuación, se describen los materiales (tabla 1) así como las soluciones y reactivos necesarios para este aislamiento (tabla 2).

1. Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México.

MATERIALES	NECESARIO
■ Bolsas de plástico estériles para muestreo	1 por muestra
■ Frascos de vidrio ámbar de boca ancha	1 por muestra
■ Matraces Erlenmeyer de 50 mL	1 por muestra
■ Cajas de Petri	3 por muestra
■ Asa de sembrado	1
■ Micropipetas de 20, 200 y 1000 L	1 de c/u
■ Cajas de puntas para micropipetas	1 de c/u
■ Autoclave	1

Tabla 1. Materiales necesarios para el aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas de aguas y sedimentos marinos superficiales.

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO	NECESARIO
■ Agua destilada	1
■ Agua de mar	1
■ Etanol al 70%	1
■ Medio Bushnell Haas	1
■ (BH)(6)	1
■ NaCl	1
■ Peptona	1
■ Extracto de levadura	1
■ Cloruro férrico	1
■ Agar	1
■ Fenantreno	1
■ Pireno	1
■ Acetona	1

Tabla 2. Reactivos necesarios para el aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas de aguas y sedimentos marinos superficiales.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Toma de muestras.

1. Recolectar muestras de la capa superficial de los sedimentos marinos con la ayuda de una draga de Van Veen, o bien, por la inmersión de personal especializado (buzos).
2. Las muestras líquidas se toman a 15 cm debajo de la superficie marina en frascos de vidrio estériles.
3. Una vez tomadas las muestras, éstas serán almacenadas en frío y transportadas al laboratorio para su inmediato procesamiento.

Aislamiento de las bacterias marinas que crecen en HAP.

Utilizar como única fuente de carbono y energía 100-300 mgL⁻¹ de fenantreno o pireno (o el HAP de interés).

1. A partir de una solución stock concentrada de HAP disuelto en acetona, adicionar al matraz estéril el volumen correspondiente para obtener la concentración deseada del HAP de interés. Bajo condiciones de esterilidad, dejar que la acetona se evapore hasta observar los cristales del hidrocarburo y entonces, adicionar el medio de cultivo líquido BH adicionado con 1.5 % de NaCl (o a diversas concentraciones crecientes de NaCl). La solución stock de hidrocarburos también puede ser adicionada directamente al medio de cultivo líquido BH y permitir la evaporación de la acetona por agitación (160 rpm) a 25 °C durante 24 a 48 h, en oscuridad.
2. Adicionar 1 g de sedimento superficial o 1 mL de muestra líquida, según sea el caso, por cada 10 mL de medio de cultivo.
3. Incubar a una temperatura de 25 °C, en agitación (160 rpm) y en oscuridad, durante 7 días o, hasta observar un aumento de la turbidez del medio.
4. Iniciar el proceso de enriquecimiento inoculando el 10 % (v/v), del primer cultivo de enriquecimiento en medio fresco BH-NaCl suplementado con el HAP de interés.
5. Repetir los pasos 3 y 4 al menos tres veces antes de iniciar el proceso de aislamiento en medio sólido.
6. Del último cultivo de enriquecimiento, tomar alícuotas de 20, 50 y 100 µL, y sembrarlas directamente en las placas de Petri conteniendo medio BH-NaCl (con 1.5 % de agar) suplementado con 100-300 mgL⁻¹ del hidrocarburo previamente esparcido en la superficie.
7. Incubar a 25 °C durante 7 días y en oscuridad.
8. Recuperar las colonias morfológicamente distintas e iniciar la etapa de aislamiento por el método de estriado en placas con BH-NaCl-agar 1.5 % enriquecido con el HAP de interés, hasta la obtención de cultivos con colonias homogéneas en su apariencia (cultivos axénicos).

9. Una vez obtenidos los cultivos puros, transferir a medio líquido Zobell (0.5 % de peptona; 0.1 % de extracto de levadura; 0.001 % de cloruro férrico; 75 % de agua de mar filtrada; 25% de agua destilada, pH de 7.6) para la obtención de biomasa y análisis posteriores.
10. Conservar una alícuota de cada cultivo puro utilizando el método de almacenamiento de preferencia (liofilización o ultracongelación).

RECOMENDACIONES ESPECIALES

Los sedimentos superficiales marinos pueden ser recolectados a una profundidad de 15-20 metros de la superficie y almacenarlos en frascos de vidrio ámbar estériles.

La solución stock de hidrocarburos puede ser preparada en acetona a una concentración de 5 gL^{-1} . Para cada HAP es recomendable utilizar frascos de vidrio de color ámbar o cubrir los frascos con aluminio para evitar la fotodegradación. Es importante mantener las soluciones stock a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, al igual que las puntas para micropipetas que serán utilizadas para adicionar el hidrocarburo. Lo anterior para evitar la evaporación de la acetona y agregar el volumen adecuado para obtener la concentración requerida de cultivo.

El protocolo general se muestra en la figura 1.

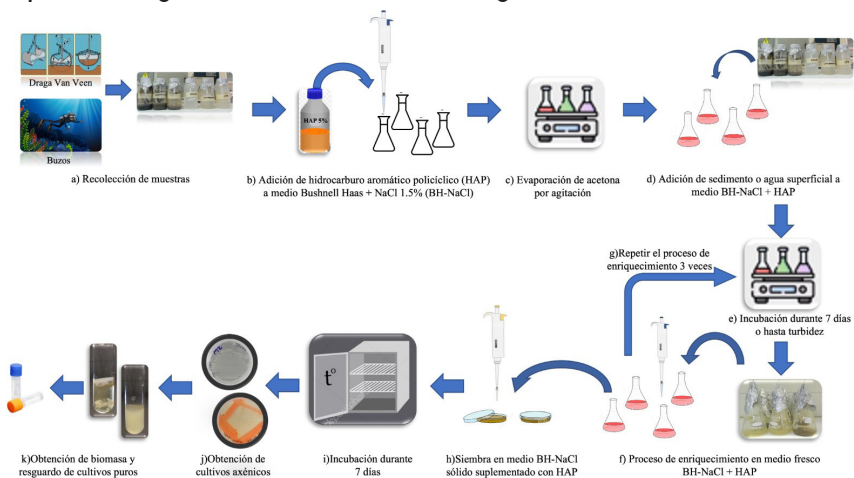


Figura 1. Diagrama del método de aislamiento de bacterias marinas hidrocarbonoclastas.

RESULTADOS

Una vez que se haya logrado obtener los cultivos puros, éstos pueden ser identificados molecularmente y sometidos a una caracterización fenotípica: crecimiento en diferentes hidrocarburos como su única fuente de carbono y energía, temperatura, pH, salinidad óptimos de crecimiento, eficiencia de degradación de compuestos orgánicos tóxicos, formación de biopelículas, producción de biosurfactantes, presencia de enzimas de rutas catabólicas de hidrocarburos, análisis genómico, etc. Lo anterior para conocer a las capacidades y mecanismos implicados en los procesos de biodegradación de hidrocarburos y poder utilizar a estos microorganismos como una herramienta biotecnológica en los procesos de biorremediación de espacios contaminados con HAP.

REFERENCIAS

1. Brito, E. M. S., de la Cruz-Barrón, M., Caretta, C. A., Goñi-Urriza, M., Andrade, L. H., Cuevas-Rodríguez, G., Malm, O., Torres, J. P. M., Simon, M. & Guyoneaud, R. (2015). Impact of hydrocarbons, PCBs and heavy metal on bacterial communities in Lerma River, Salamanca, México: Investigation of hydrocarbon degradation potential. *Sci Total Environ*, 521-522: 1-10
2. Chunk, W. K. & King, G. M. (2001). Isolation, characterization, and polyaromatic hydrocarbons degradation potential of aerobic bacteria from marine macrofaunal burrow sediments and description of *Litibacterium anuloderans* gen. nov., sp. nov., and *Cycloclasticusspirillensus* sp. nov. *Appl Environ Microbiol.*, 67(12): 5585-5592.
3. Cincinelli, A., Stortini, A. M., Perugini, M., Checchini, L. & Lepri, L. (2001). Organic pollutants in sea-surface microlayer and aerosol in the coastal environment of Leghorn- (Tyrrhenian Sea). *Mar Chem*, 76: 77-98. [http://dx.doi.org/10.1016.S0304-4203\(01\)00049-4](http://dx.doi.org/10.1016.S0304-4203(01)00049-4).
4. Haritash, A. K. & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J Hazard Mater*, 169: 1-15.

5. Silva-Jiménez, H., Araujo-Palomares, C. L., Macías-Zamora, J. V., Ramírez-Álvarez, N., García-Lara, B. & Corrales-Escobosa, A. R. (2018). Identification by MALDI-TOF MS of Environmental Bacteria with High Potential to Degrade Pyrene. *J Mex Chem Soc*, 62(2), 214-225. <https://dx.doi.org/10.29356/jmcs.v62i2.411>
6. BD Diagnostics (2009). *Difco™ & BBL™ Manual, Manual of Microbiological Culture Media*, 2nd Edition, Becton, Dickinson and Company, https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/257820.pdf

ELABORACIÓN DE MAPAS PARA LOCALIZAR A HONGOS MICROSCÓPICOS DEL HIELO

Mónica Cervantes Jiménez¹, Javier Arturo Moreno Morán², Rosa Paulina Calvillo Medina^{3*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:
rosapaulinacalvillomedina@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La ubicación geográfica de los microorganismos psicrófilos permite tener certeza sobre donde habitan en la criosfera, las relaciones con el medio ambiente, el estatus para un estudio histórico o prever cuales son las condiciones ambientales que se aproximan en un futuro (1). En el estudio biogeográfico de los microorganismos, parte importante del proceso, es la correcta localización y georreferenciación de los aislados para así poder entender las particularidades y comparar con otros microorganismos del ecosistema. El objetivo de este capítulo es explicar la elaboración de mapas mediante el sistema de información geográfica (GIS) con base en la geolocalización previa de microorganismos. La cual se basa en el correcto uso de un sistema de posicionamiento global (GPS), con el que se georreferencia la zona de muestreo. Obteniendo puntos delimitados para hacer referencia sobre los eventos particulares que se obtuvieron en el lugar, e.g. riqueza, abundancia, diversidad de microorganismos, etc. El resultado es un mapa que ayuda, de manera directa, a entender cuál es la situación biográfica de los microorganismos y del sitio de estudio. El método propuesto ha sido implementado por Calvillo-Medina et al. 2020 (2) en el estudio de la riqueza de hongos psicrófilos, así como en proyectos académicos y en tesis de licenciatura.

1. *Facultad de Ciencias Naturales, UAQ, Av. De las Ciencias s/n, Querétaro, Qro.*
2. *Licenciatura en Geografía, Facultad de Filosofía y Letras UNAM, Av. Universidad 3000, Coyoacán, CDMX.*
3. *Laboratorio de Microbiología, Facultad de Química, UAQ, Cerro de las Campanas s/n, Querétaro, Qro.*

MATERIALES Y EQUIPO

MATERIALES	NECESARIO
▪ Base de datos geográficos	1
▪ Software Qgis	1
▪ Computadora	1

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. Colectar muestras de hielo y marcar las coordenadas geográficas del lugar de muestreo.
2. Identificar los microorganismos siguiendo el protocolo del capítulo 14 denominado “Del glaciar a la caja de Petri: Aislamiento e identificación de hongos psicrófilos” de este Manual (en caso de ser hongos).
3. Estructurar la base de datos, la primera columna son los sitios de muestreo, la segunda de latitud y la tercera de longitud, ambas en grados decimales. Las columnas adicionales son una para cada género identificado y el número de individuos en cada sitio.
4. Exportar la base de datos en un archivo delimitado por comas (*.csv).
5. Importar la capa en el software Qgis (<https://www.qgis.org>) (3), usando la herramienta capa - agregar - archivo de texto delimitado. Definir la columna de x para longitud y y para latitud.
6. Dar click derecho en la capa de la base de datos para desplegar las propiedades. Dar click en la pestaña de diagramas, asignar un tipo de diagrama (gráfica de pie u otra) y seleccionar las columnas de la base de datos con los géneros de los ejemplares. Se desplegará una gráfica para cada sitio de muestreo.
7. Descargar capas complementarias como el Modelo de Elevación Digital (DEM), la capa de los límites estatales y de propiedades geográficas como el área cubierta de hielo, para enriquecer el mapa (<https://www.inegi.org.mx/app/mapas/?tg=1015>). (4)
8. Crear una composición de mapa, agregar una flecha de norte, la leyenda que describa la correspondencia entre los atributos del mapa y la base de datos, una barra de escala, asignar un título al mapa y las coordenadas de referencia en el borde exterior.

- Exportar el mapa con la herramienta de archivo – exportar. Usar un formato de imagen o pdf de al menos 150 puntos por pulgada (dpi).



Figura 1. Diagrama de flujo del método para la elaboración de mapas espaciales de diversidad de hongos.

RESULTADOS

El punto medular de esta metodología es la estructuración de la base de datos (tabla 1), se debe mostrar como sigue para su correcta importación en el software.

SITIO DE COLECTA	LATITUD	LONGITUD	GÉNERO 1 # DE ESPECIES	GÉNERO 2 # DE ESPECIES
Izt1	19.16	-98.60	-	1
Izt2	19.2	-98.63	2	-
Izt3	19.23	-98.64	-	-

Tabla 1. Estructura de la base de datos usando la referencia espacial de los sitios de colecta y la riqueza fúngica.

El mapa debe contener los elementos básicos: flecha de norte, la leyenda, una barra de escala y las coordenadas de referencia en el borde exterior (figura 2).

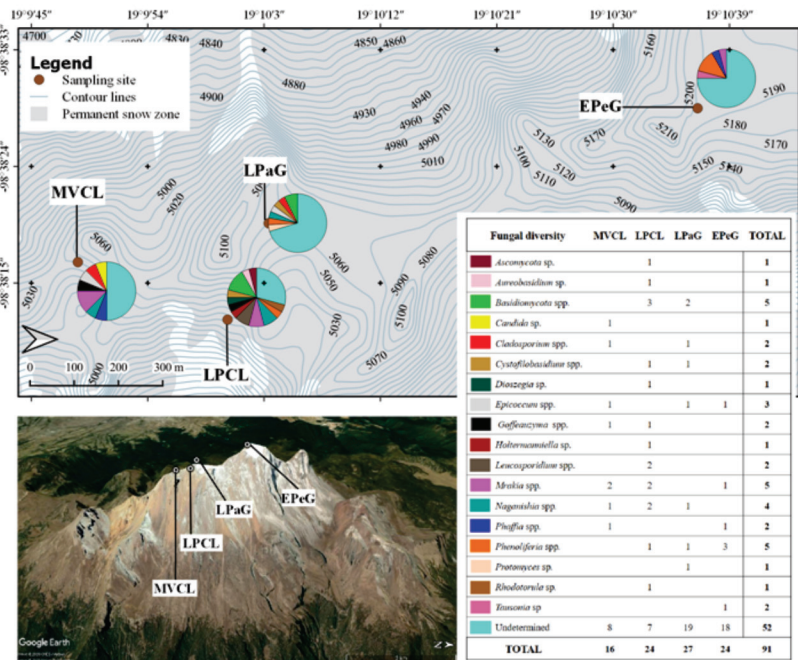


Figura 2. Mapa de la riqueza fúngica de los glaciares del volcán Iztacihuatl. Cráteres Monte de Venus (CLMV) y La Panza (LPCL) y glaciares La Panza (LPaG) y El Pecho (EPeG).

El diseño del mapa puede seleccionarse en función de lo que se quiere representar. En este caso, las gráficas circulares se eligieron como opción, pero igual pudieron seleccionarse gráficas de barras con la misma finalidad. La presente propuesta puede ayudar a generar conocimiento respecto a la localización, riqueza y abundancia de las

comunidades microscópicas de los glaciares mexicanos y generar un panorama sobre las adaptaciones a sitios extremos de estos hongos.

REFERENCIAS

1. Crisci, J., Katinas, L., Posadas, P. (2003) *Historical biogeography an introduction*, USA, Harvard University Press
2. Calvillo - Medina R. P., Gunde - Cimerman N., Escudero - Leyva E., Barba - Escoto L., Fernández - Tellez E. I., Medina - Tellez A. A., Bautista - de Lucio V., Ramos-López M. A. & Campos - Guillén J. (2020) Richness and metallo - tolerance of cultivable fungi recovered from three high altitude glaciers from Citlaltépetl and Iztaccíhuatl volcanoes (México). *Extremophiles* 24: 625–636. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01182-0>
3. *QGIS Geographic Information System. QGIS Association.* <http://www.qgis.org> (enero2021)
4. *Instituto Nacional de Estadística y Geografía, México (INEGI)* <https://www.inegi.org.mx/app/mapas/?tg=1015> (enero2021)

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS TERMÓFILOS DE AGUAS TERMALES Y SUELOS ASOCIADOS

Rosa María Oliart Ros, Rodolfo Quintana Castro², Graciela Espinosa Luna^{1*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:
graciespinosa@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

El estudio de ambientes extremos y de los microorganismos que ahí viven es de interés microbiológico, ecológico, evolutivo y biotecnológico. Los sitios con altas temperaturas, como las zonas volcánicas y geotermales, son fuente de microorganismos termófilos que pueden estudiarse utilizando métodos dependientes e independientes del cultivo a partir del suelo, rocas, lodo o agua, entre otros (1). En los métodos dependientes de cultivo se pueden utilizar medios ricos para obtener el mayor número de microorganismos posible, o medios selectivos; si se busca aislar microorganismos con características metabólicas particulares. En cualquier caso, el aislamiento consiste en alcanzar un cultivo puro a partir de uno mixto, lo que se logra por medio de diluciones y siembras en medio sólido para poder seleccionar una sola colonia. Este método ha resultado útil para el aislamiento de bacterias termófilas de diferentes géneros a partir de muestras de agua, sedimentos y lodos de ambientes termales.

1. Laboratorio de Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Veracruz. Av. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar, CP 91897, Veracruz.
2. Laboratorio de Química Médica y Quimiogenómica, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana. Carmen Serdán s/n Col. Centro, CP 91897, Veracruz, Ver.

MATERIALES	NECESARIO
▪ Bolsas plásticas con cierre de tamaño grande	2 cajas
▪ Cucharas o palas metálicas estériles	6
▪ Bidones de plástico resistentes al calor, esterilizados	3
▪ Cavahoyos de pala	1
▪ Mantas térmicas	suficientes
▪ Flexómetro	1
▪ Termómetro	1
▪ Rotulador permanente y etiquetas	suficientes
▪ Solución sanitizante en atomizador	1 L
▪ Cajas Petri esterilizadas	40
▪ Matraces de 250 mL	12
▪ Tubos de ensaye con tapa roscada de 15 mL	40
▪ Equipo de microfiltración al vacío con membranas de varios cortes nominales	suficientes
▪ Campana de flujo laminar	1
▪ Microtubos de 0.5 mL esterilizados	suficientes
▪ Autoclave	1

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO	NECESARIO
▪ Medio LB:	
Triptona de caseína	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
▪ Agar	20 g/L
▪ Glicerol al 80 % esterilizado por autoclave 15 min a 120 °C	100 mL

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. El primer paso es seleccionar el área de muestreo y verificar si se trata de un Área Natural Protegida. De ser así, deben cumplirse los requisitos y documentación necesarios para obtener los permisos de acceso a la zona y toma de muestras. Una vez en el lugar, se deben registrar las coordenadas del sitio de muestreo,

altitud, temperatura ambiente, temperatura y pH de la muestra, fecha, hora, así como tomar fotografías del lugar. Es muy importante evitar la contaminación de las muestras y del lugar de muestreo, y evitar cambios físicos, químicos o biológicos en las mismas. Ante todo, deberá cuidarse la seguridad de la persona que realice la colecta.

2. Si se va a coleccionar agua, ésta debe ser coleccionada con la ayuda de recipientes estériles adecuados dependiendo del sitio de toma, utilizando guantes y pinzas; el agua se depositará en un garrafón de 20 L estéril, llevando a cabo el procedimiento lo más cercano al sitio de toma de muestra.
3. El garrafón se debe transportar al laboratorio y llevar a cabo las microfiltraciones en un máximo de tres horas después de coleccionada la muestra. Para transportar el garrafón al laboratorio se recomienda envolver en mantas térmicas para conservar lo más posible la temperatura del agua. Microfiltrar el agua coleccionada utilizando membranas de tamaño de poro entre 5 y 0.45 μm . Empezar con la membrana de 5 μm , el filtrado pasarlo por la membrana del siguiente tamaño de poro, hasta llegar a 0.45 μm . Cada membrana será cortada en tres porciones, que serán inoculadas en medio LB líquido.
4. Si se van a tomar muestras de suelo, la forma de colecta dependerá de la profundidad de la muestra que se desee obtener y de la cantidad. Se puede utilizar una sonda de muestreo, palas, cava hoyos, y cucharas, todas estériles o previamente lavadas y flameadas con alcohol etílico. Las muestras se colocarán en recipientes estériles, que pueden ser bolsas plásticas con cierre, o directamente en matraces con medio de cultivo (1 g de suelo en matraces de 250 mL con 50 mL de medio), y llevarse al laboratorio cubiertas con mantas térmicas para conservar la temperatura.
5. Se puede utilizar el medio de cultivo líquido LB (triptona de caseína (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L), cloruro de sodio (5 g/L), pH 7.0, esterilizado a 120 °C por 15 min en autoclave. Una vez inoculado, incubar por triplicado, con agitación, en tres temperaturas diferentes según la temperatura del sitio de colecta, por al menos 24 h o hasta que haya crecimiento.

6. Se deberá también preparar medio LB sólido (triptona de caseína (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L), cloruro de sodio (5 g/L), pH 7.0, y agar (20 g/L)). Esterilizar a 120 °C por 15 min, dejar enfriar hasta 50 °C, y servir en las cajas de Petri. Preparar solución salina (NaCl al 0.9 % (p/v) para las diluciones posteriores en tubos de ensaye con tapa roscada (9 mL). Esterilizar a 120 °C por 15 min.
7. En los matraces donde haya crecimiento (turbidez visible), hacer diluciones seriadas a partir de 1:10 hasta $1:1.0 \times 10^9$ en los tubos con solución salina, agitar e inocular en las cajas Petri preparadas con medio sólido para obtener colonias aisladas por medio de resiembras. Si se va a incubar por arriba de 40 °C, se recomienda sellar las cajas con papel Parafilm, introducirlas en una bolsa de plástico con cierre, añadir tres o cuatro torundas de algodón humedecidas en agua destilada, cerrar la bolsa e incubar para prevenir la desecación del medio. Esto es adecuado para cultivos que serán incubados hasta 70 °C.
8. Finalmente, para conservar las cepas aisladas se deberá tomar una colonia con un asa estéril, para inocular en medio líquido y cultivar hasta la fase exponencial, determinada a través de la medición de la densidad óptica a 660 nm. De ese cultivo, tomar una alícuota para conservar en glicerol a concentración final de 15 %. Conservar a -80 °C.
9. Hacer los análisis fisicoquímicos correspondientes a las muestras de suelo y agua, que pueden incluir, contenido de materia orgánica, conductividad eléctrica, pH, nitrógeno, fósforo y otros elementos disponibles, así como la concentración de cationes como calcio, magnesio, entre otros.

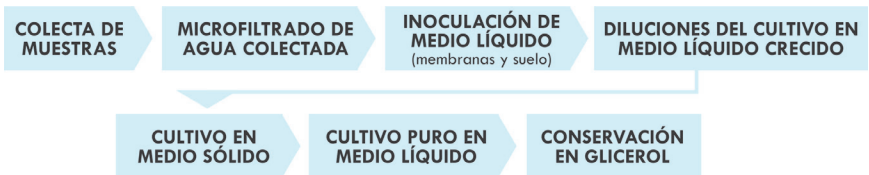


Figura 1. Esquema general para el aislamiento de termófilos.

RESULTADOS

Es muy importante obtener cultivos axénicos de cada cepa, y realizar las observaciones macroscópicas pertinentes y las microscópicas previa Tinción de Gram. Se puede llevar un registro de las cepas aisladas asignando un nombre a cada una, mencionando su origen y una descripción de su morfología.



Figura 2. Muestras de suelo colectadas a distintas profundidades en Los Humeros, Puebla.

CEPA	TIPO DE MUESTRA (AGUA, SUELO, SEDIMENTO)	PH	TEMPERATURA	PROFUNDIDAD	MORFOLOGÍA

De forma ilustrativa, en la figura 2 se muestran suelos colectados a distintas profundidades en los suelos de la zona geotérmica de Los Humeros, Puebla (2). En la figura 3 se muestra el área en campana de flujo laminar para inocular el medio líquido y la turbidez de un cultivo bien crecido.

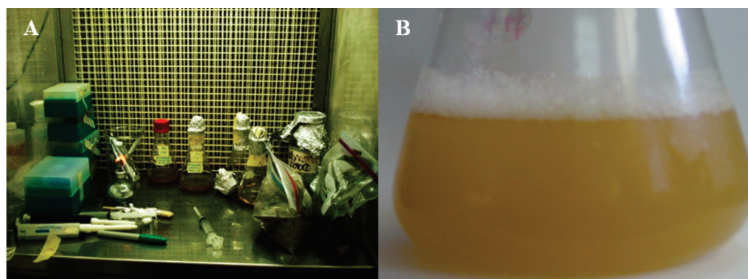


Figura 3. Área en campana de siembra para inocular medio líquido (A) y la turbidez de un medio líquido con un cultivo crecido (B).

El método propuesto permitirá generar una colección de cepas axénicas, listas para ser evaluadas en medios selectivos de producción de enzimas, aplicación en fermentadores, entre otros posibles estudios.

REFERENCIAS

1. Pinzón Martínez, D. L., Rodríguez Gómez, C., Miñana Galbis, D., Carrillo Chávez, J. A., Valerio Alfaro, G., & Oliart Ros, R. (2010). Thermophilic bacteria from Mexican thermal environments: isolation and potential applications. *Environmental technology*, 31(8-9):957-966.
2. Mora-González, P. C., Espinosa-Luna, G., Ramírez-Higuera, A., Peña-Montes, C., Valerio-Alfaro, G., Sánchez-Flores, A., ... & Oliart-Ros, R. M. (2020). Metagenomic Approach to Bacterial Diversity and Lipolytic Enzymes' Genes from a Steam Soil of Los Humeros Geothermal Field (Puebla, México). *Geomicrobiology Journal*, 38(4): 304-314.

MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN *Rhizobium*, *Azotobacter* Y *Azospirillum* PARA USO EN SUELOS EXTREMOS

Yad Ciri Ojendiz Mata¹, Jeiry Toribio Jiménez², Erubiel Toledo Hernández^{2*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

euribelth@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Las bacterias endófitas colonizan el interior de las plantas sin causar aparentemente daño alguno, estableciendo una simbiosis mutualista en su hospedero, debido a que son favorecidas selectivamente. Estas bacterias son fijadoras de nitrógeno atmosférico (N_2) tienen la capacidad de convertir el N_2 , que constituye el 78 % en la atmósfera, en forma asimilable para las plantas. Debido a esta capacidad que participan de forma natural en los ecosistemas en el ciclo del nitrógeno y son una fuente potencial para formular biofertilizantes y promover una agricultura sostenible sobre todo en sitios o suelos con características extremas (1). Los métodos más utilizados para aislar bacterias fijadoras de nitrógeno incluyen el aislamiento en medio libre de nitrógeno. El presente protocolo tiene como objetivo describir de forma detallada el método de aislamiento y detección de *Azotobacter*, *Azospirillum* y especies bacterianas fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium*, que se encuentran entre las bacterias ambientales más importantes involucradas en la fijación de N_2 , es normal para estos microorganismos aislarlos en medios libres de nitrógeno inoculados con suelos, nódulos o raíces. Sin embargo, Luciana et al., (2) han descubierto que, en algunos casos, las bacterias fijadoras

1. Centro de Ciencias de Desarrollo Regional de la Universidad Autónoma de Guerrero. Los Pinos No. 13, Col. El Roble, Acapulco, Guerrero, México. CP 39640. Teléfono (52) + 744 4876624 ext. 4526.
2. Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero.

están estrechamente asociadas con otros microorganismos y que la obtención de cultivos puros no es fácil. Por lo tanto, este protocolo describe una técnica sencilla que permite el reconocimiento de colonias de microorganismos fijadores de nitrógeno en placas y facilita el aislamiento de cultivos puros.

MATERIALES

Para medio sólido añadir 20 mg de extracto de levadura y 15 g de agar.

ELMA-RC⁽¹⁾

ELEMENTOS	GRAMOS
■ K_2HPO_4	0.5 g
■ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
■ NaCl	0.1 g
■ Extracto de levadura	1 g
■ Manitol	10 g
■ Agar	18 g
■ Solución Rojo Congo	15 ml (1:400)
■ Agua destilada	1000 ml

ASHBY SACAROSA⁽²⁾

ELEMENTOS	GRAMOS
■ Sacarosa	5.0 g
■ Manitol	0.75 g
■ K_2HPO_4	0.01 g
■ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01 g
■ NaCl	0.01 g
■ $CaCO_3$	0.015 g
■ $CaSO_4$	0.005 g
■ $C_7H_5NaO_2$	0.5 g
■ Agar bacteriológico	8 g
■ Agua destilada	500 ml
■ pH	6.8-7.0

Tabla 1. Preparación de medios de cultivos libres de nitrógeno.

BIOQUÍMICAS⁽²⁾

ELEMENTOS	GRAMOS
■ Citrato	1.21 g
■ Urea	1.45 g
■ LIA	1.65 g
■ MIO	1.55 g
■ Kliger	2.6 g
■ Agua destilada	50 ml
■ pH	6.9

NFB semisólido⁽³⁾

ELEMENTOS	GRAMOS
■ Acido málico	5 g
■ KOH	4 g
■ K_2HPO_4	0.5 g
■ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25 g
■ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01 g
■ $MnSO_4 \cdot H_2O$	0.002 g
■ $CaCl_2$	0.02 g
■ NaCl	0.1 g
■ $NaMoO_4 \cdot H_2O$	2 g
■ Biotina	0.1 mg
■ Agar bacteriológico	2 g
■ Agua destilada	1000 ml
■ Azul de bromotimol	0.5% m/v en 2 mL Etanol

ROJO CONGO⁽³⁾

ELEMENTOS	GRAMOS
■ Ácido Málico	5.0 g
■ K_2HPO_4	5.0 g
■ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
■ NaCl	0.1 g
■ Extracto de levadura	0.5 g
■ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.015 g
■ KOH	4.8 g
■ Solución acuosa de Rojo Congo	15 ml (1:400)
■ Agua destilada	1000 ml
■ pH	6.8-7.0

Aislamiento de *Rhizobium* spp.⁽⁴⁾

1. Lavar los nódulos con agua potable, para eliminar partículas de suelo. Con ayuda de unas pinzas de disección, desprender los nódulos cuidadosamente y colocarlos en una caja Petri (15-20 nódulos). Adicionar hipoclorito de sodio al 2 % durante 5 min.
2. Lavar los nódulos con agua destilada estéril de 4-6 veces. Vaciar los nódulos en cajas Petri limpias. Colocar 500 μL de H_2O estéril y macerar en un mortero. Sembrar por estría masiva en medio ELMA-RC. Incubar las cajas en posición invertida a 30 °C durante 48 h.
3. Realizar tinción de Gram de las colonias (blancas o rosadas). En caso de observar bacilos pequeños Gram negativos, seleccionar la colonia y sembrar por picadura en medio ELMA-RC para su purificación.
4. Del cultivo puro de 48 h, inocular tubos de Citrato. Incubar a 30 °C por 12 h.

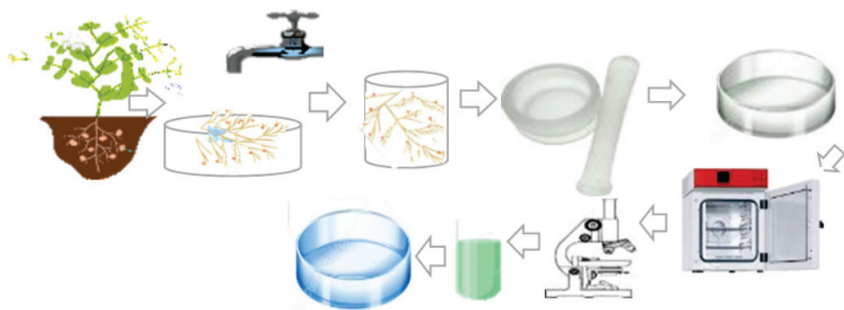


Figura 1. Diagrama del aislamiento. Fuente: Elaboración propia.

Aislamiento de *Azotobacter*⁽³⁾

1. Pesar 1 g de suelo rizosférico. Colocar en tubos que contengan 9 mL de Solución salina al 0.9 %. Homogenizar con ayuda de un vórtex durante 3 min y dejar reposar la mezcla durante 24 h a temperatura ambiente.
2. Realizar diluciones seriadas a partir de la muestra original hasta la dilución 1×10^4 . Tomar 100 μL de la dilución 1×10^4 e inocular en medio Ashby-Sacarosa sólido. Incubar las cajas a 30 °C durante 48 h.

3. Realizar tinción de Gram de las colonias (traslúcidas). En caso de observar bacilos pequeños Gram negativos, seleccionar la colonia y sembrar por picadura en medio Ashby Sacarosa para purificarlas. Incubar a 30 °C durante 48 h.
4. Del cultivo de 48 h, inocular en un juego de pruebas bioquímicas. Incubar a 30 °C por 12 h.

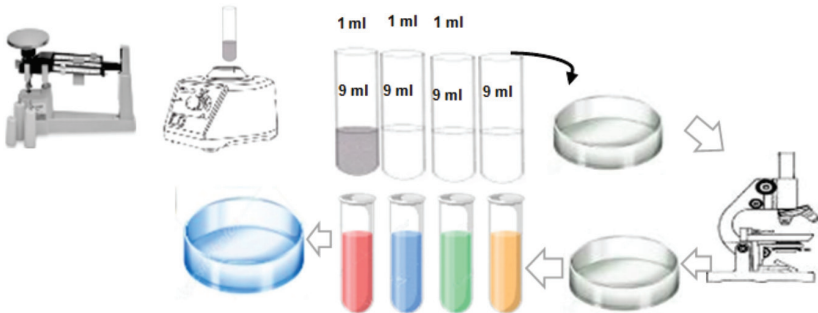


Figura 2. Diagrama del aislamiento. Fuente: Elaboración propia.

Aislamiento de *Azospirillum* sp.⁽³⁾

1. Lavar las raíces de las plantas con agua potable, para eliminar el suelo remanente. Cortar fragmentos de 2 cm de longitud (desde el extremo final hacia arriba). Depositar en un vaso de precipitado. Desinfectar las raíces con Hipoclorito de Sodio al 2 % durante 5 min y enjuagar dos veces con agua destilada estéril.
2. Depositar las raíces entre 1 a 1.5 cm por debajo de la superficie, en tubos con 6 mL de medio NFB semisólido libre de Nitrógeno, a razón de un fragmento por tubo. Incubar a 30 °C durante una semana. (Se consideran como fijadoras de nitrógeno, las bacterias donde se observa una película blanquecina entre 3 a 5 cm bajo la superficie y el viraje del color del indicador verde al azul en el medio de cultivo).
3. Una vez observado lo anterior, tomar una alicuota de la película y hacer una suspensión en 1 mL de solución salina al 0.87 %. Sembrar por agotamiento de estría en placas de Petri con medio NFB sólido e incubar a 30 °C durante cinco días. Realizar tinción de Gram de las colonias (blanquecinas). En caso de observar bacilos pequeños Gram negativos, seleccionar la colonia y sembrar por picadura en medio NFB semisólido.

4. Incubar a 30 °C por una semana, hasta observar la alcalinización del medio de cultivo mediante un cambio de color (de verde a azul), desarrollo del crecimiento y la formación de un halo alrededor de las colonias blanquecinas entre 3 a 5 mm, debido al tinte redox azul de bromotimol. Posteriormente sembrar por agotamiento y estría en placas de Petri con medio ácido málico Rojo Congo. Incubar a 30 °C por 48 a 72 h. Realizar tinción de Gram de las colonias (rojo escarlata) para confirmación de la morfología.
5. Inocular en tubos de TSI las colonias (rojo escarlata), para diferenciar *A. brasilense* de *A. lipoferum*.

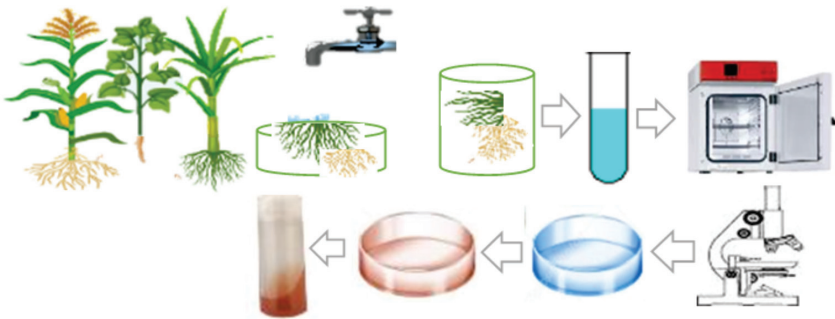


Figura 3. Diagrama del aislamiento. Fuente: Elaboración propia (Dr. Erubiel Toledo Hernández).

RESULTADOS

Caracterización macroscópica de las colonias del género *Rhizobium* sp., en ELMA-RC.

En agar ELMA-RC, es un medio de cultivo selectivo para el género *Rhizobium* sp. en la cual se observan colonias blancas, circulares, pequeñas, de forma regular, elevación convexa y aspecto mucoso, véase en las siguientes figuras de autoría propia.

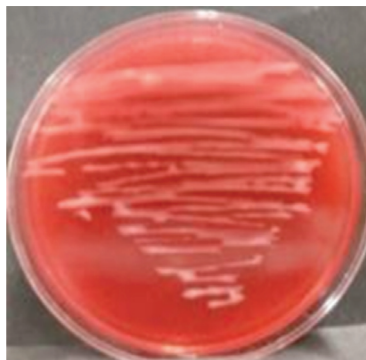


Figura 4.

Figura 4. Macroscopía de *Rhizobium* sp., en agar ELMA-RC.

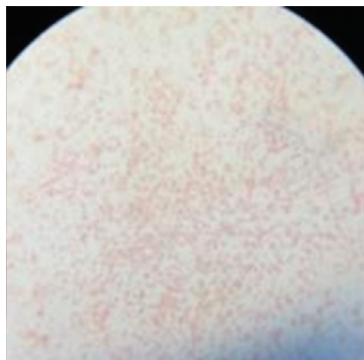


Figura 5.

Figura 5. Tinción de Gram. 100x. Bacilos Gram negativos corto, características del género *Rhizobium* sp.



Figura 6.

Figura 6. Citrato positivo, característica del género *Rhizobium* sp.

Caracterización macroscópica de las colonias en el Agar ASHBY-SACAROSA.

El Agar ASHBY-SACAROSA es un medio de cultivo selectivo que se utiliza para el cultivo de especies de *Azotobacter* sp., que utilizan el nitrógeno atmosférico como fuente de nitrógeno, ya que este medio no lo contiene. Las colonias que se observan presentan las siguientes características: medianas, translúcidas, convexas y de bordes irregulares, con un aspecto viscoso, véase en la siguiente figura.

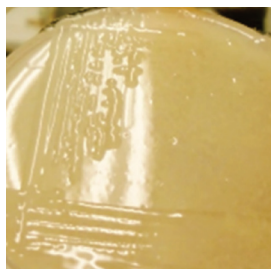


Figura 7.

Figura 7. Macroscopía de *Azotobacter* sp., en agar ASHBY-SACAROSA.

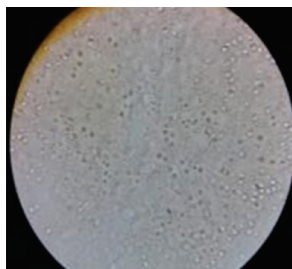


Figura 8.

Figura 8. Tinción de Lugol 100x. Se observan quistes, características del género *Azotobacter* sp.



Figura 9.

Figura 9. Tinción de Gram. 100x. Bacilos gram negativos corto, características del género *Azotobacter* sp.

Detección de la fijación de nitrógeno.

La fijación de nitrógeno atmosférico se evidenció en tubos con medio NFB semisólido libre de nitrógeno, durante el periodo de incubación el crecimiento comienza con la formación de un halo (flecha blanca) alrededor de la colonia. Se forma un crecimiento típico de una película blanca “similar a un velo”. Después de 7 días de incubación a 30 °C en el tubo (A) se observa el cambio de color que indica la alcalinización del medio de cultivo mediante un cambio de color verde a azul, debido al tinte redox de bromotimol derivado de la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azospirillum* sp. Teniendo en cuenta lo anterior, en agar Rojo-Congo, se observan colonias de tamaño mediano a pequeño, de color rojo escarlata, con elevación convexa, superficial lisa y bordes regulares, estas características son presuntivamente del género *Azospirillum* sp.

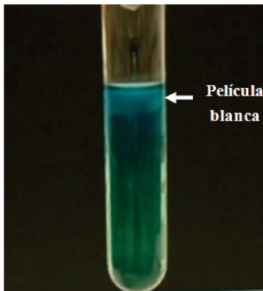


Figura 10.

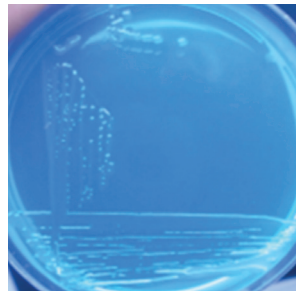


Figura 11.

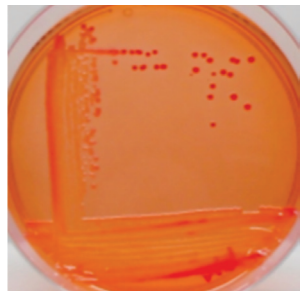


Figura 12.

Figura 10. Macroscopía de *Azospirillum* sp., en NFB semisólido.

Figura 11. Macroscopía de *Azospirillum* sp., en NFB sólido.

Figura 12. Macroscopía de *Azospirillum* sp., en agar ácido málico Rojo Congo.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno (N) juegan un papel muy importante en la aportación de este elemento químico a las plantas. Este N absorbido por las plantas es transformado mediante las diferentes rutas bioquímicas formando parte estructural de macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, componentes esenciales para la vida. Debido al potencial de estos microorganismos en la agricultura, en las últimas décadas han sido objeto de estudio, principalmente por su uso como biofertilizantes, disminuyendo con ello el impacto ambiental debido a la disminución de insumos agroquímicos. El aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno tales como; *Rhizobium*, *Azotobacter* y *Azospirillum*, entre otras, es de vital importancia para

su uso e implementación en la agricultura sostenible, debido a ello es importante contar con métodos de aislamiento e identificación, para posteriormente explotar su potencial uso en el campo agrícola.

REFERENCIAS

1. Gonzales, E., Alcarraz, M., Castro, A., y Casas, S. (2018). Efecto del biofertilizante *Azotobacter-Rhizobium* en tarwi (*Lupinus mutabilis* SWEET.), como alternativa a la fertilización química. *Ciencia e Investigación*, 21(2), 7-12.
2. Luciana P. Di Salvo., y de Salomone, I. E. G. (2019). Veil-like pellicle development by *Azospirillum brasilense* in semisolid NFb medium. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(2), 184-185. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.04.002>.
3. Flores Gallegos, A. C., Contreras-Esquivel, J. C., Reyes-Valdés, M. H., y Rodríguez-Herrera, R. (2012). Aislamiento e identificación de cepas nativas del suelo mexicano del género *Azotobacter*. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(8). <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/divulgacionA-QM.html>.
4. López, A, J. D. J., Lépez, Ildefonso, R., González, E, D. R., Rodríguez-Macias, R., López-Alcocer, E., y Olalde-Portugal, V. (2017). Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de *Rhizobium* colectadas en frijol común silvestre y domesticado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(1). <https://doi.org/10.35196/rfm.2017.1.73-81>

MUESTREO DE AGUAS TERMALES DEL VOLCÁN EL CHICHÓN PARA EL AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS TERMÓFILOS

Arturo Peña Blasi¹, Sandy Luz Ovando Chacón^{1*}, Cristina
Ventura Canseco¹

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

ovansandy@hotmail.com / sandy.oc@tuxtla.tecnm.mx

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe un gran interés por el estudio de la diversidad microbiana de ambientes extremos para determinar las características peculiares que permiten a estos microorganismos sobrevivir en condiciones extremas (1). Los microorganismos extremófilos, particularmente los termófilos en las últimas décadas han recibido un amplio reconocimiento principalmente por sus aplicaciones biotecnológicas (2). Diferentes estrategias de muestreo han sido reportadas, como el realizado con aguas termales ubicadas en el distrito del occidente de Bengala en la India, en donde las muestras de aguas termales fueron recolectadas aeróbicamente en frascos de vidrio ámbar estériles (2). El protocolo para el muestreo de aguas termales volcánicas depende de las condiciones de la zona, ya que por lo general estas fuentes son inestables. El método de muestreo permitió aislar un consorcio de cepas cultivables que habitan en el agua del lago cráter del volcán El Chichón, dos de las cuales fueron caracterizadas morfológica, bioquímica y molecularmente identificándose como *Geobacillus stearothermophilus* y *Geobacillus jurassicus*.

1. Peña Blasi, A.1, *Ovando Chacón, S.L.1, Ventura Canseco, C.1 TecNM / Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Carretera Panamericana km. 1080, col. Juan Crispín, 28050. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

MATERIALES	NECESARIO
■ Matraz Erlenmeyer de 50 mL	3
■ Vaso de precipitado de 50 mL	3
■ Pinza para vaso de precipitado	1
■ Papel Parafilm	1
■ Termo de 1 L	3
■ Marcador de resaltado	2 colores
■ Bitácora de laboratorio	1
■ Equipo portátil Hanna HI 98128	1
■ GPS portátil	1
■ Incubadora	1

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO	NECESARIO
■ Agua destilada	c.b.p.
■ Extracto de carne	500 g
■ Peptona	500 g
■ Extracto de levadura	500 g
■ Aceite de oliva comercial	1 L
■ NaCl	250 g
■ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250 g
■ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	250 g
■ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	250 g
■ KH_2PO_4	250 g
■ K_2HPO_4	250 g
■ $(NH_4)_2SO_4$	250 g

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. Identificación de la zona de muestreo
 - 1.1. Realizar un reconocimiento de la zona de muestreo, identificando los puntos accesibles de muestreo del lago cráter del volcán que presenten diferentes temperaturas.
 - 1.2. Registrar la temperatura y el pH *in situ*, con un equipo portátil Hanna HI 98128, de los puntos identificados que se encuentren a una distancia equidistante mayor o igual a 10 metros.
 - 1.3. Seleccionar al menos tres puntos de muestreo, tomando como criterio principal la temperatura en un intervalo de entre 60 a 90 °C, como único factor de importancia en el escrutinio de microorganismos termófilos.

- 1.4. Referenciar las coordenadas geográficas de ubicación de los puntos de monitoreo con un GPS portátil.
2. Toma de muestra *in situ*
 - 2.1. Opción 1: Tomar las muestras de agua de los puntos identificados con una jeringa estéril de 50 mL y colocarlo en matraces Erlenmeyer con tapón de rosca de 50 mL previamente esterilizados. Las jeringas y los matraces estériles deben manipularse en el punto del muestreo. Transportar las muestras al laboratorio dentro de un recipiente hermético.
 - 2.2. Opción 2: Tomar las muestras de agua de los puntos identificados con un vaso de precipitado estéril de 50 mL manipulado con pinzas de laboratorio y depositar el agua en termos con capacidad de 1 L, previamente lavados tres veces con agua del volcán y abiertos en el punto de muestreo. De esta manera se asegura conservar la temperatura del agua hasta el laboratorio.
 - 2.3. Transportar las muestras al laboratorio dentro de recipientes herméticos.
3. Siembra *in vitro* de microorganismos cultivables

Realizar la siembra *in vitro* en dos medios de cultivo como se describe a continuación.

 - 3.1. Inocular en condiciones de esterilidad 3 mL del agua del lago cráter del volcán (3) en un matraz Erlenmeyer de 100 mL con 25 mL de medio nutritivo (extracto de carne 3 g/L, peptona 5 g/L). De igual manera inocular 3 mL de agua del lago cráter del volcán en un matraz Erlenmeyer de 100 mL de medio base (extracto de levadura 1 g/L, aceite de oliva 5 mL/L, NaCl 2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.7 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.5 g/L, KH_2PO_4 0.3 g/L, K_2HPO_4 0.3 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g/L. solución de vitaminas 1 mL/L: B1, B2, B3, B5, B6, B12, solución de oligoelementos: $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, H_3BO_3 , $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 1 mL/L) estéril (4).
 - 3.2. Incubar los medios de cultivo inoculados en las condiciones de pH y temperatura del correspondiente punto de muestreo durante 192 h. Tomar una alícuota de 1 mL cada 48 h y cuantificar la D.O. a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro. Realizar la propagación del inóculo por triplicado.

4. Aislamiento de la cepa

- 4.1. Tomar una asada de los matraces con medios de cultivo que mostraron crecimiento microbiano.
- 4.2. Realizar siembras por estría cruzada en placas con agar nutritivo y placas con agar base.
- 4.3. Sellar las cajas Petri con papel Parafilm para reducir la evaporación (5).
- 4.4. Incubar a 60 °C durante 72 h para obtener las cepas puras.

RESULTADOS

Se recomienda presentar los resultados del registro de temperatura, pH y coordenadas de los puntos de muestreo como se indica en la siguiente tabla.

ELEMENTO	COORDENADAS DE MUESTREO	TEMPERATURA (°C)	pH
Muestreo 1			
Muestreo 2			
Muestreo 3			

Tabla 1. Registro de los puntos de muestreo.

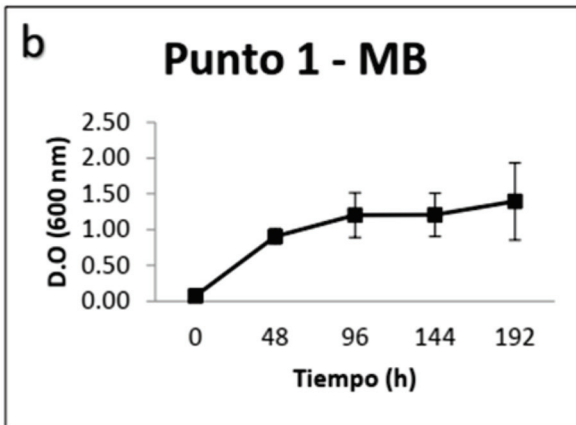


Figura 1. Crecimiento microbiano con medio base.

El método de muestreo de las aguas termales implementado ha permitido aislar microorganismos con actividad de lipasa, proteasa y celulasa (2), por lo que es un método promisorio que podría aplicarse en otros sitios de muestreo volcánicos con la finalidad de aislar y cultivar bacterias con algún potencial biotecnológico. En particular del muestreo descrito, actualmente se están realizando estudios con *Geobacillus stearothermophilus* y *Geobacillus jurassicus*.

REFERENCIAS

1. Del Carmen J., Mosso R. (2000). Diversidad microbiana de las aguas minerales termales. Panorama actual de las aguas minerales y minero-medicinales en España. Ministerio de Medio Ambiente de España.
2. Goutam P., Amit G., Kaushik S. (2013). Isolation, characterization and molecular identification of esterolytic thermophilic bacteria from an Indian hot spring. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*. 1(4):196-202.
3. Mahmoud M. B., Taha I. Z., Yasser R. A., Hesham M. S., Mohamed S. (2009). Production of a novel glycerol-inducible lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25:287-294. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9891-3>
4. Pyun Y., Lee D., Choi H., Kim B., Koh Y., Kim K., Suhartono M. (1999). Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*. 179:393-400. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08754.x>
5. Martins M. L., Nunes de Souza A. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32:271-275. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000400003>

TÉCNICA PARA EL CULTIVO DE BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS ROJAS Y VERDES DEL AZUFRE

María Teresa Núñez Cardona^{1*}, Jordi Mas Gordi², Olga Sánchez Martínez³

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

mtnunez@correo.xoc.uam.mx

INTRODUCCIÓN

Dentro de los microorganismos extremófilos se encuentran los termófilos que habitan ambientes con temperaturas mayores a 50 °C, los psicrófilos crecen de 0-25 °C; a los halófilos se les encuentra en zonas marinas y salinas (concentraciones altas de cloruro de sodio y otras sales); mientras que los alcalófilos crecen a pH mayor a 9 y los acidófilos a pH de 4-6 (1). Algunas bacterias fotosintéticas anoxigénicas, que incluye a las rojas y verdes del azufre son extremófilas, se les puede encontrar, en ventilas hidrotermales, sedimentos marinos profundos y en salinas (Ej. Guerrero Negro). Estas bacterias pueden utilizar, para la fotosíntesis, compuestos reducidos del azufre (sulfuro de hidrógeno, tiosulfato, sulfatos), polisulfuros y aminoácidos que contienen a este elemento (Ej. metionina y cisteína); sin embargo, no hay producción de oxígeno, de allí su distintivo de ser bacterias anoxigénicas. En condiciones de laboratorio, el sulfuro de sodio es el más utilizado para la elaboración de medios de cultivo líquidos que permiten el crecimiento masivo de estos microorganismos, sin embargo, este se oxida con facilidad, es citotóxico y controlado para su venta. Con la técnica aquí propuesta, es posible observar el crecimiento de las bacterias fotosintéticas rojas y verdes del azufre, simplemente con observar el cambio de color en los cultivos líquidos (rosas, púrpuras, marrón y verdes), usando como donadores de electrones al tiosulfato de sodio y una solución de polisulfuros; también se pueden utilizar

1. *Lab. Ecología microbiana, Departamento el hombre y su ambiente, Universidad autónoma Metropolitana-Xochimilco.*
2. y 3. *Departament Genètica i Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona.*

metionina o cisteína, así como la adición de una mezcla de acetatos de sodio y magnesio.

Por otro lado, esta técnica también podría ser útil para contar con cultivos masivos de bacterias fotosintéticas anoxigénicas rojas y verdes del azufre, las cuales son utilizadas para diversos procesos biotecnológicos, tales como la obtención de anticancerígenos, antioxidantes, antibióticos, entre otros.

MATERIALES Y EQUIPO

Se preparará medio de cultivo líquido, con tiosulfato de sodio y/o polisulfuros, como donadores de electrones; los materiales y reactivos requeridos se presentan en las tablas 1 y 2.

MATERIALES	NECESARIO
▪ Matraces Erlenmeyer	1
▪ Balanza digital	1
▪ Autoclave	1
▪ Potenciómetro	1
▪ Campana de flujo laminar y/o extracción	1
▪ Agitador magnético y barras magnéticas	1-3
▪ Lámparas con luz incandescente (40-60 watts)	2
▪ Lápices	2
▪ Hoja para registro de resultados	2
▪ Tubos de ensayo con tapa de baquelita de 13.0 mL	50
▪ Lámparas con luz fluorescente (40-60 watts)	2
▪ Matraces Erlenmeyer con tapa de rosca	5
▪ Frascos ámbar de 100 mL (tapa de rosca)	5
▪ Pipetas serológicas de 1.0, 5.0 y 10.0 mL	10 de c/u
▪ Propipetas	2
▪ Micropipetas 1.0 mL (opcional)	1
▪ Metionina	1.0 g/L
▪ Cisteína	1.0 g/L

Tabla 1. Material necesario para el desarrollo de la técnica.

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO

NECESARIO

■ Agua destilada	5.0 L
■ Solución de elementos traza	1000 mL
■ Solución de vitamina B12	100 mL
■ Reactivos para preparar Medio base	100 mL
■ Solución de tiosulfato de sodio	100 mL
■ Solución de polisulfuros	100 mL
■ Solución de acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$) y acetato de magnesio	100 mL
■ Muestras de agua de mar o ambientes salinos	

Tabla 2. Soluciones, reactivos y material biológico para el desarrollo de la técnica. El detalle de ésta se presenta en el Anexo 1.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. Preparar los medios de cultivo de acuerdo con el anexo 1 y colocar 10-11 mL de cada uno de estos en los tubos de ensayo con tapa de baquelita de 13.0 mL de capacidad. También es posible utilizar frascos de vidrio estériles como se indica en la figura 1.
2. En condiciones estériles (en campana de flujo laminar o bien usar mecheros Fisher), inocular al medio de cultivo con 1.0 mL de muestra de agua. Se puede agregar menos cantidad de este a los tubos y aumentar el volumen de la muestra (inóculo).
3. Conservar los cultivos en obscuridad durante 12 horas; pasado este tiempo exponer los cultivos a luz natural o bien utilizar focos con luz incandescente y/o fluorescente de 40-60 Watts (intensidad luminosa aproximada de 2,000 Lux). La luz incandescente se utiliza para favorecer el crecimiento de las bacterias rojas y la fluorescente para las verdes.
4. Hacer observaciones cada 5-10 días, la presencia color en los cultivos (rojo, rosa, púrpura) indicará la presencia de bacterias fotosintéticas rojas sulfurosas, en tanto que el color verde y marrón indicarán el crecimiento de bacterias fotosintéticas verdes del azufre.
5. Puede agregarse cloruro de sodio y cloruro de magnesio para acelerar el crecimiento bacteriano (opcional), en la sección de anexos se describe cómo se prepara.



Figura 1. Cultivos de bacterias rojas y verdes del azufre.

RESULTADOS

Registra en la tabla 3 los parámetros que se indican como el color de los cultivos, también puedes hacer observaciones al microscopio óptico, o bien analizar los pigmentos fotosintéticos para verificar la presencia de las bacterias fotosintéticas anoxigénicas.

Muestra (clave)	Medio de cultivo utilizado	Fecha del inoculación	Fecha de cambio de color en los cultivos	Color del cultivo	Formas celulares (opcional)
1.					
2.					
3.					

Tabla 3. Registro de la presencia de bacterias fotosintéticas en los cultivos.

CUESTIONARIO

1. Anota, qué otros donadores de electrones podrían ser utilizados para preparar medios de cultivo para el crecimiento de las bacterias fotosintéticas rojas y verdes del azufre.
2. Investiga cómo se realiza la fotosíntesis en las bacterias.
3. Escribe el nombre y la descripción de una especie de bacteria fotosintética que habite en un ambiente extremo.
4. Investiga cómo se pueden diferenciar, morfológicamente a las bacterias rojas y verdes del azufre.

REFERENCIAS

1. Georgea D. M, Vincenta A. S., Mackeya H. R. 2020. An overview of anoxygenic phototrophic bacteria and their applications in environmental biotechnology for sustainable resource recovery. *Biotechnol Rep.* 28: e00563. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00563>
2. Núñez-Cardona M.T. (1999). Optimización de técnicas para el análisis de pigmentos y ácidos grasos en bacterias fototróficas del azufre. [Tesis de Doctorado] Universidad Autónoma de Barcelona (España). 175 pp.

ANEXO 1. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

MEDIO BASE PARA EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS ROJAS Y VERDES DEL AZUFRE [2]

950	mL	Agua destilada
1	mL	Soluciones 2A o 2B
1	g	KH_2PO_4
0.5	g	NH_4Cl_2
3	g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.05	g	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
20	g	NaCl_2

Esterilizar por autoclave en un matraz Erlenmeyer con tapa de baquelita, a 121 °C durante 20 minutos.

SOLUCIÓN 2A [2]

3	g	EDTA
1.1	g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
300	mg	H_3BO_3
190	mg	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
50	mg	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
42	mg	ZnCl_2
24	mg	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
18	mg	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
2	mg	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1000	mL	Agua destilada

SOLUCIÓN 2B [2]

1.1	g	FeSO ₄ ·7H ₂ O
300	mg	H ₃ BO ₃
190	mg	CoCl ₂ ·6H ₂ O
50	mg	MnCl ₂ ·4H ₂ O
42	mg	ZnCl ₂
24	mg	NiCl ₂ ·6H ₂ O
18	mg	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
2	mg	CuCl ₂ ·2H ₂ O
1000	mL	Agua destilada

Las soluciones 2A y 2B, se preparan en frascos ámbar con tapa de baquelita, se esterilizan por autoclave a 121 °C, durante 20 minutos, se dejan enfriar y se conservan a 4 °C. En condiciones de esterilidad, se agregan 1 mL de cada solución por litro al medio base con pipetas serológicas estériles o micropipetas de 1 mL.

SOLUCIÓN 3. VITAMINA B12

2	mg	Cianocobalamina (vitamina B12)
100	mL	Agua destilada

Esterilizar por filtración (filtros Millipore 0.22 µm de poro) en un frasco ámbar estéril con tapa de rosca y conservar a 4 °C. En condiciones estériles, agregar 1 mL por 1,000 mL de medio base.

SOLUCIÓN 4. BICARBONATO DE SODIO

5	g	NaHCO ₃
100	mL	Agua destilada

SOLUCIÓN 5. TIOSULFATO DE SODIO

10	g	Na ₂ S ₂ O ₃
95	mL	Agua destilada

Preparar en un frasco con tapa de rosca, esterilizar por autoclave a 121 °C, enfriar y conservar a 4 °C. Agregar 1 mL por cada 100 mL de medio base.

SOLUCIÓN 6. SOLUCIÓN DE POLISULFUROS

24	g	$\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$
6.4	g	Azufre en polvo (98%)
20	g	Agua destilada

Colocar en un tubo de ensaye con tapa de baquelita el azufre e inmediatamente después agregar el sulfuro de sodio, agitar vigorosamente varias veces. La mezcla se mantiene en un baño de agua caliente hasta disolver completamente los reactivos. Una vez logrado lo anterior, se distribuye la solución en viales para esterilizarlos a 110.0 °C durante 15 minutos. Agregar 1 mL por cada 1,000 mL de medio de cultivo base. Es recomendable preparar esa solución en una campana de extracción debido a que el sulfuro de sodio es muy tóxico.

SOLUCIÓN DE ACETATOS

2.0	g	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$
2.0	g	$\text{C}_4\text{H}_6\text{MgO}_4$
100.0	mL	Agua destilada

Preparar en un frasco de vidrio con tapa de baquelita y esterilizar por autoclave (121 °C durante 20 minutos), conservar a 4 °C; agregar 1.0 mL por cada 1000 mL de medio de cultivo base.

MEDIO DE CULTIVO A-TIOSULFATO

950	mL	Medio Base
1.0	mL	Solución 2A o 2B (para bacterias rojas y verdes, respectivamente)
1.0	mL	Solución 3 (Vitamina B12)
30.0	mL	Solución 4 (bicarbonato de sodio)
10-20	mL	Tiosulfato de sodio (10.0 para bacterias rojas y 20 mL para las verdes)

El pH final del medio de cultivo debe ser de 7.3 para las bacterias rojas y 6.5 para las verdes. Si es necesario, ajustar el pH con una solución de ácido clorhídrico 1 N, o carbonato de sodio 1 N (ambos estériles).

MEDIO DE CULTIVO B – POLISULFUROS

950	mL	Medio Base
1	mL	Solución 2A o 2B (para bacterias rojas y verdes, respectivamente)
1	mL	Solución 3 (Vitamina B12)
30	mL	Solución 4 (bicarbonato de sodio)
1-2	mL	Solución de polisulfuros (1 ml para bacterias rojas y 2 mL para las bacterias verdes)

El pH final del medio de cultivo debe ser de 7.3 para las bacterias rojas y 6.5 para las verdes. Si es necesario, ajustar el pH con una solución de ácido clorhídrico (o bien ácido sulfúrico 2 M estéril) o carbonato de sodio 2 M (estéril).

AISLAMIENTO DE BACTERIAS ENDÓFITAS ASOCIADAS A RAÍCES DE LEGUMINOSAS A PARTIR DE SUELOS IMPACTADOS POR ESTRÉS ABIÓTICO

Miguel Angel Villalobos López^{1*}, Selma Ríos Meléndez¹, Analilia Arroyo Becerra¹

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

mwillalobosl@ipn.mx

INTRODUCCIÓN

Muchos miembros de la familia *Rhizobiaceae* inducen la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de plantas leguminosas, lo cual representa un ejemplo clásico de simbiosis en las interacciones planta-microorganismo. El presente protocolo describe la estrategia de trampeo, aislamiento y preservación de bacterias asociadas a nódulos. El método se basa en la infección de raíces de leguminosas por parte de bacterias simbióticas presentes en el suelo. Como resultado de esa asociación, se forman nódulos en las raíces, los cuales son estructuras especializadas en donde se lleva a cabo la fijación simbiótica de nitrógeno. Para que se formen los nódulos, las bacterias (*Rhizobium*) y las raíces de las leguminosas llevan a cabo un intercambio de señales moleculares que resulta en la inducción de la formación de nódulos. Dentro de los nódulos las bacterias se diferencian hacia bacteroides, los cuales tienen la capacidad de fijar nitrógeno. Nuestro grupo ha adaptado el protocolo de trampeo (1-3) para el aislamiento de bacterias presentes en suelos impactados por factores abióticos de diversa índole: sequía, salinidad, jales mineros, organofosforados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre otros. La clase de bacterias que se aíslan con este método puede

1. Laboratorio de Genómica Funcional y Biotecnología de Plantas. Centro de investigación en biotecnología aplicada, Instituto Politécnico Nacional. Ex-hacienda San Juan Molino, Carretera estatal Tecuexcomac-Tepetitla km. 1.5. Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, CP 90700.

variar dependiendo del tipo de suelo, el tipo y grado de estrés abiótico que lo ha impactado, y de la leguminosa elegida para el trampeo. Aunque es común aislar miembros de la familia *Rhizobiaceae*, en nuestra experiencia se pueden obtener también *Bacillus* asociadas a nódulos. En este método, plántulas de leguminosas germinadas en condiciones asépticas se siembran en suelos recolectados en la zona de estudio, y se mantienen con riego utilizando solución nutritiva sin fuente nitrogenada para promover la nodulación. Después de al menos tres semanas, se recolectan los nódulos y se esterilizan superficialmente. Los nódulos se machacan para liberar su contenido, el cual es tomado como inóculo para estriar cajas de Petri conteniendo medio PY sólido. Los aislados obtenidos se purifican sucesivamente a partir de una sola colonia, y se almacenan en glicerol para su posterior caracterización.

MATERIALES Y EQUIPO

EQUIPO	NECESARIO
▪ Pala grande	1
▪ Pala chica	1
▪ Equipo de GPS	1
▪ Incubadora con temperatura controlada	1
▪ Incubadora con temperatura controlada, con agitación	1
▪ Autoclave	1
▪ Agitador horizontal	1
▪ Agitador tipo vórtex	1
▪ Refrigerador 4 °C	1
▪ Ultracongelador -80 °C	1
▪ Campana de flujo laminar	1

MATERIALES**NECESARIO**

■ Costal grande de nylon para recolectar el suelo rizosférico	1
■ Macetas con capacidad de 1 kg de suelo	20
■ Bandejas (recipientes) de aluminio de 20 cm de diámetro y 8 cm de profundidad/altura	5
■ Asa bacteriológica	1
■ Pinzas	1
■ Varilla de vidrio	1
■ Palillos de madera	1000
■ Cajas de Petri desechables de 100 X 20 mm	200
■ Tubos de ensayo de vidrio 20 X 150 mm	200
■ Gradillas	4
■ Marcador de resaltado/permanente	2
■ Tijeras	1
■ Suelo	25 kg
■ Semillas de <i>Phaseolus vulgaris</i> (cualquier variedad, preferentemente de cosecha reciente; se pueden usar semillas de otras especies de leguminosas)	100
■ Tubos Falcón (15 ml) conteniendo 1 g de sílica al fondo y un poco de algodón (todo estéril)	20
■ Bisturí estéril	20

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO**NECESARIO**

■ Agua destilada	20 L
■ Etanol al 70 %	1 L
■ Tween 20 al 0.1 %	0.1 L
■ Hipoclorito de sodio 1 % (el Clorox regular tiene una concentración entre 5.5-6.3 %, tomarlo como un stock y diluirlo 2:8 v/v)	0.5 L
■ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.7 M esterilizado en autolave	0.5 L
■ Glicerol esterilizado en autolave	0.1 L

MEDIO PY:

En 800 mL de agua destilada añadir:

Peptona de caseína	5.0 g
Extracto de Levadura	3.0 g

Agitar con agitador magnético hasta disolver perfectamente

Aforar a 1 L (para medio sólido añadir 15 g de agar bacteriológico)

Esterilizar en autoclave

* Añadir los componentes en el orden mencionado. Cuando el medio ya no está tan caliente (aprox. 55 °C) añadir CaCl₂ a una concentración final de 7 mM (a partir de stock 0.7 M esterilizado en autoclave). Si se añade el CaCl₂ cuando el medio está muy caliente este se precipita y el medio ya no sirve.

**SOLUCIONES, REACTIVOS
Y MATERIAL BIOLÓGICO****NECESARIO****SOLUCIÓN DE PRESERVACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS
(Glicerol+PY+CaCl₂*):**

Para preparar 10 ml:

Glicerol estéril	8 ml
Medio PY líquido con CaCl ₂	2 ml

Mezclar bien en vórtex.

En un tubo Eppendorf estéril tomar 500 µl de esta solución y mezclar con 500 µl de un cultivo saturado cultivado por toda una noche a 30 °C, mezclar con vórtex y almacenar a -80 °C (se recomienda preparar nuevos gliceroles a partir de una colonia aislada, al menos cada 12 meses).

*La solución completa de Glicerol+PY+CaCl₂ se puede almacenar a -20 °C al menos por 6 meses.

SOLUCIÓN NUTRITIVA FAHRAEUS SIN NITRÓGENO (4):

Macronutrientes (X10; preparar cada uno por separado para evitar que se precipiten):

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	14.703 g/L, esterilizar en autoclave
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22.58 g/L, esterilizar en autoclave
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24.65 g/L, esterilizar en autoclave
KH_2PO_4	10 g/L, esterilizar en autoclave
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.551 g/L *

Micronutrientes (X100) (mezclar en una sola solución, esterilizar en autoclave):

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.17 g
H_3BO_3	0.123 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.143 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0499 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0237 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.024 g
H_2O	1 L

Para preparar 10 L de solución nutritiva Fahraeus sin nitrógeno:

Añadir 100 ml de cada macronutriente 10X en 9 L de agua destilada

Añadir 10 ml de micronutrientes 100X

Ajustar el pH a 6.8 y aforar con agua hasta 10 L

Esterilizar en autoclave

*El stock de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se esteriliza por filtración (0.22 μm) y se añade a la mezcla en campana de flujo laminar una vez que esta fue esterilizada en autoclave. El stock de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se almacena a 4 °C cubierto con papel aluminio.

Recolección de suelos y crecimiento de leguminosas en macetas.

1. Tomar registro del sitio de muestreo con el GPS (longitud, latitud y altitud).
2. Elegir y marcar el área del terreno a muestrear.
3. Tomar 50 submuestras (c/u de 500 g), avanzando en zig-zag e intentando cubrir toda el área de muestreo, a una profundidad de 20 cm (evitar recolectar hojas secas y materia orgánica superficial).
4. Juntar y mezclar muy bien todas las submuestras, para conformar la muestra principal del cuadrante (+/- 25 kg).
5. Transportar a temperatura ambiente, bajo sombra, y almacenar a 4 °C en el laboratorio a la brevedad. Reservar al menos 1 kg de suelo para análisis fisicoquímicos.
6. Lavar al menos 100 semillas de frijol con abundante agua corriente.
7. En la campana de flujo laminar, desinfectar las semillas en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % por 15 min con agitación constante, y enjuagar con abundante agua destilada estéril.
8. Para la germinación de las semillas, preparar previamente las bandejas/los recipientes de aluminio cubiertos con papel aluminio y conteniendo al fondo varias capas de papel absorbente humedecidas con agua estéril. Esterilizar en autoclave (30 min, 121 °C, 15 libras de presión).
9. Colocar las semillas desinfectadas dentro de los recipientes de aluminio sobre el papel humedecido con agua estéril (aproximadamente 20 semillas por bandeja). Cubrir perfectamente con el papel aluminio e incubar en oscuridad a 30 °C. Revisar diariamente para evaluar germinación, suministrar agua estéril en caso de ser necesario, y monitorear la posible aparición de contaminantes microbianos (desinfección mal aplicada, presencia de endófitas o patógenos en la semilla).
10. Una vez germinadas (3-5 días), trasplantar dos plántulas por maceta, y humedecer el suelo con agua estéril. Cada maceta debe contener 1 kg del suelo previamente recolectado (en caso necesario se puede mezclar 1:1 el suelo con arena de río estéril). Utilizar al menos 20 macetas.

11. Regar las macetas cada tercer día con 200 ml de solución nutritiva carente de fuente nitrogenada para favorecer la nodulación (medio Fahraeus sin nitrógeno (Fahraeus, 1957)).
12. Dejar crecer las plantas hasta obtener nódulos maduros fijadores de nitrógeno de color rosa (en el caso de frijol esto ocurre de manera evidente a las 3 semanas). En el caso de que las plantas no puedan crecer en los suelos impactados por estrés abiótico, se recomienda considerar diferentes variedades de frijol, o el uso de leguminosas nativas del sitio de estudio, o bien, utilizar otras especies de leguminosas con mejor tolerancia al estrés abiótico de interés. Por ejemplo, las variedades de frijol Pinto Saltillo y Azufrado Higuera presentan mejor tolerancia que el Negro Jamaica a estrés por sequía y salinidad.
13. Recolectar al menos 10 nódulos de las plantas de cada maceta, haciendo énfasis en aquellos con apariencia de color rosado, con la ayuda de bisturí y pinzas, depositándolos en tubos Falcon de 15 ml estériles (previamente preparados con un 1 g de material desecante a base de sílica al fondo y un poco de algodón encima). Almacenar los tubos a 4 °C hasta su uso (se recomienda procesarlos a la brevedad, no exceder de 1-2 semanas).

Desinfección de nódulos y aislamiento de bacterias (trabajar en campana de flujo laminar).

1. Hidratar los nódulos con agua destilada estéril durante 1 h a temperatura ambiente.
2. Lavar en etanol al 70 % durante 30 s.
3. Lavar con Tween al 0.1 % durante 10 min.
4. Enjuagar al menos 5 veces con abundante agua estéril hasta eliminar el exceso de espuma.
5. Desinfectar superficialmente los nódulos durante 5 min en una solución de Hipoclorito de sodio al 1%.
6. Enjuagar al menos 6 veces con abundante agua estéril.
7. Colocar un nódulo desinfectado en una caja de Petri estéril, y macerarlo con una varilla de vidrio añadiendo una gota de agua estéril (usar 2 nódulos por planta/maceta).
8. Tomar asadas del nódulo macerado y estriar en cajas de Petri con medio PY.
9. Incubar en obscuridad a una temperatura de 30 °C y observar el crecimiento de colonias durante los siguientes 2-5 días.

10. Tomar una colonia aislada y re-estriarla con el asa bacteriológica en una nueva placa con medio PY e incubar por 2-3 días. Repetir este paso 2 veces para purificar el aislado.
11. Almacenar en glicerol (glicerol+PY+CaCl₂) a -80 °C (usar nomenclatura que permita conocer el origen de la maceta y planta de la cual se aisló el nódulo del cual proviene el aislado).

RESULTADOS

Normalmente suelen obtenerse una buena cantidad de aislados siguiendo las instrucciones descritas. Se pueden aislar miembros de la familia *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Ensifer*) y endófitos oportunistas como *Bacillus*, con diferentes características de tolerancia a ambientes extremos. Si la disponibilidad de suelo es poca, alternativamente puede utilizarse vermiculita, arena o cualquier otro sustrato estéril, inoculando diariamente por 8 días consecutivos con una solución de suelo y agua (10 g de suelo en 50 ml de agua estéril, agitar al menos 1 h). Es importante mencionar que el protocolo puede adaptarse para usar semillas de especies de leguminosas nativas de la zona de muestreo. Las semillas de algunas especies de leguminosas requieren un pretratamiento para romper su dormancia, a través de tratamientos de agua caliente, ácido sulfúrico, o bien a través de daño mecánico provocado con un papel de lija. Otra alternativa es recolectar en campo los nódulos de las leguminosas nativas de la zona de estudio. Para evitar la descomposición de los tejidos, los nódulos recolectados en campo se colocan en tubos Falcon conteniendo 1 g de material desecante (sílica) y un poco de algodón hasta su utilización en el laboratorio. Antes de desinfectar los nódulos desecados, es importante rehidratarlos 1 h con agua destilada estéril.

Para la verificación de bacterias del orden *Rhizobiales* se pueden realizar ensayos de Eckhardt para determinar perfil plasmídico, amplificar y secuenciar DNAr16S, así como marcadores como *nodC* y *nifH*. Es recomendable verificar la capacidad de nodulación utilizando aislados puros como inóculo en las plantas, así como la capacidad de fijación de nitrógeno.

Al final del experimento, se recomienda devolver las muestras de suelo al sitio de origen.

1. Cristina Ramos Peña. (2011). Tesis nivel Licenciatura: Ingeniería en Biotecnología. Universidad Politécnica de Puebla. Título: “Aislamiento y Caracterización de cepas de *Rhizobium* obtenidas en campos de cultivos de frijol en Puebla, Tlaxcala y Veracruz” (2011).
2. Lorena Jaqueline Gómez Godínez. (2014). Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Aplicada, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-Instituto Politécnico Nacional. Título: “Aislamiento y caracterización de cepas de *Rhizobium* de la zona Centro de México y su relación con la tolerancia a sequía de *Phaseolus vulgaris*” (2014).
3. Tak, N., Bissa, G. & Gehlot, H. S. (2020). Methods for Isolation and Characterization of Nitrogen-Fixing Legume-Nodulating Bacteria. in *Methods in Molecular Biology* vol. 2057 119–143 (Humana Press Inc., 2020).
4. Fahraeus, G. (1957). *The Infection of Clover Root Hairs by Nodule Bacteria Studied by a Simple Glass Slide Technique*. *J. gen. Microbiol* vol. 16 (1957).

LA COLECTA Y PRESERVACIÓN DE CIANOBACTERIAS DE LA ZONA SUPRAMAREAL PARA UNA TAXONOMÍA CON APROXIMACIÓN POLIFÁSICA

María Laura González Resendiz¹, Mónica Ramírez Vázquez²,
Hilda Patricia León Tejera^{3*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

UNAMhlt@ciencias.unam.mx

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias, también llamadas algas verde azules, cianofitas o cianoprocariontes, son organismos procariontes fotoautótrofos evolutivamente muy antiguos, principalmente habitan ambientes acuáticos, sean marinos o continentales, pueden utilizar como sustrato rocas, suelo u otros organismos, algunas viven en condiciones extremas para varios factores ambientales como temperatura, pH o salinidad. Se considera que estos organismos presentan un nivel de organización simple debido a que son procariontes, sin embargo aunque su morfología y nivel de complejidad es diverso, se tienen relativamente pocas características diagnósticas. Por ello, se considera actualmente que para que las poblaciones sean caracterizadas taxonómicamente de modo adecuado, se debe utilizar una aproximación polifásica, que combina la aplicación de métodos moleculares, citomorfológicos y ecológicos (1).

Las cianobacterias supramareales son en general los organismos predominantes que crecen en las zonas costeras por encima del nivel máximo de la marea (Fig. 1A). Este ambiente, se considera extremo, ya que en regiones tropicales, los organismos están sometidos a desecación, insolación directa, exposición a rayos UV y a soportar altas

1. Depto. Procesos y Tecnología, UAM-C mlauragonzalez@ciencias.unam.mx

2. Unidad de Microscopía Avanzada, REMAv-INECOL monica.ramirez@inecol.mx

3. Lab. Ficología Marina, Facultad de Ciencias, UNAMhlt@ciencias.unam.mx

temperaturas. Dentro de esta zona se presenta diversidad de microambientes, por tanto, la caracterización de los parámetros físicos y químicos, la distancia o altura del nivel del mar, la temperatura, el tipo de sustrato, el pH, la humedad etc., junto con los componentes biológicos permiten generar el conocimiento ecológico, taxonómico, funcional etc., de este ambiente extremo (2).

Para la caracterización taxonómica de las cianobacterias con una aproximación polifásica (1,3), se debe realizar una colecta suficiente y con réplicas para ser procesada con distintas herramientas. Es necesario además del registro cuidadoso del ambiente, realizar una buena descripción morfológica que requiere de distintas técnicas de microscopía y sobre todo la aplicación de métodos moleculares.

Para llevar a cabo de modo exitoso esta aproximación, es necesaria una buena preservación de muestras, con réplicas suficientes tanto para obtener los cultivos, necesarios para la caracterización molecular de las poblaciones, como para realizar la adecuada descripción morfológica de las poblaciones de campo. Por ello, se describen los métodos de colecta y preservación de cianoprocariontes de la zona supramareal, necesarios para la correcta aplicación de una aproximación polifásica.

MATERIALES Y EQUIPO

MATERIALES (COLECTA PARA 10 MUESTRAS)	NECESARIO
Libreta de campo	1
Lápiz graso	1
Bolsas resellablesde 10 x 10 cm o similares	10
Marcador indeleble	1
Pinzas de relojero/punta fina	2
Agujas de disección	2
Etiqueta de albanene grueso (3 x 3cm)	10
Portaobjetos	10
Cubreobjetos	10
Caja Petri de vidrio	2
Termómetro	1
Caja de papel medidor de pH	1
Refractómetro	1

MATERIALES (COLECTA PARA 10 MUESTRAS)

NECESARIO

Cámara fotográfica	1
Espátula	1
Agua destilada	200 ml
Sílica	100 gr
Formaldehído al 4 % en agua de mar o continental	1000 ml
Frascos opacos de boca ancha 200 ml	10
Papel filtro	necesario
Agua de la localidad	2-4 L
Cajas de Petri de 6 mm diámetro con medio mineral BG11**	10
Microscopio estereoscópico y/o óptico	1

***La elaboración del medio BG11 (blue Green algae) se puede consultar en <http://web.biosci.utexas.edu/utex/Media%20PDF/bg-11-medium.pdf> [4], se debe preparar con agua de mar de la localidad, si no se puede conseguir, utilizar 35g/L de NaCl. Para medio sólido adicionar 15g/L de agar noble, para preparar 10 cajas de medio sólido en cajas de 6 mm de diámetro es necesario preparar aproximadamente 200 mL de medio.*

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Caracterización ecológica.

1. En cada localidad/sitio de colecta realizar su descripción en libreta de campo y de ser posible en un formato de datos campo (anexo 1); incluyendo desde datos generales como ubicación geográfica, coordenadas o ambiente general, con datos de temperatura del aire y del sustrato, así como temperatura, pH, y salinidad del agua. Se recomienda revisar los horarios de las mareas y coleccionar en marea baja, para una mejor descripción de la localidad.
2. Para cada población-muestra, anotar la forma y color del crecimiento visible (costra, biopelícula, césped, etc.) (Fig. 1 B-C), tipo de microambiente (altura sobre el nivel del mar, insolación/sombra, pendiente, sustrato, etc.), y presencia de organismos asociados (algas, líquenes, gasterópodos, etc.).
3. Tomar fotografías tanto de la localidad y ambientes generales, como de los crecimientos visibles de cianobacterias en cada punto de colecta y muestra, a fin de caracterizar las condiciones ambientales de las poblaciones de interés (Fig. 1 B-C).

Colecta.

1. Se desprende el crecimiento detectado con espátula y se coloca dentro de una bolsa de preferencia re-sellable, etiquetada con los siguientes datos: número de muestra, localidad, fecha y colector.
2. En libreta de campo en el formato (anexo 1), registrar número de muestra y foto del crecimiento colectado, así como detalles de cada muestra como son: localidad, colectores, fecha de colecta, textura (suave, mucilaginoso, áspera, etc.), y coloración. Respalda la información en la bolsa y libreta y/o formato de campo es importante en el caso de pérdida de alguna de las formas de registro de las muestras y sus réplicas.
3. No agregar agua a la muestra y mantenerla en un sitio fresco, de ser posible a la sombra.

Es recomendable después de la colecta hacer una revisión y registrar el estado y características de las muestras (de ser posible con un microscopio estereoscópico u óptico), en especial si representa una comunidad (varias poblaciones de especies en similares proporciones), o si es unialgal (una sola población), así como el estado de la muestra (decolorada vs coloración brillante, lo que puede denotar un malo/buen estado de salud).

Preservación de muestras.

Cada muestra se debe revisar de preferencia al microscopio, puede ser estereoscópico y si los organismos son de dimensiones pequeñas en microscopio óptico; esto permitirá dividir la muestra en tres partes que serán consideradas réplicas.

- a. Una réplica, será preservada en una solución de formol al 4 % en agua de mar, para ser utilizada en la caracterización morfológica, ya que este fijador mantiene las características morfológicas de las poblaciones de campo si se mantiene lejos de la luz.
- b. La segunda se siembra en medio mineral BG11 marino sólido, para establecer cultivos de las poblaciones más abundantes en la muestra. Los cultivos permitirán seguir el ciclo de vida de las poblaciones y se usarán para la extracción de ADN para los análisis moleculares (Fig. 1D). Para consultar otras recetas de

medios y protocolos especializados en cianobacterias se recomienda consultar <https://www-cyanosite.bio.purdue.edu/>.

- c. La tercera, se preserva en seco, utilizando ya sea papel filtro, secante o con sílica. Esta constituye un respaldo importante ya que permite, tanto la aplicación de técnicas moleculares como el establecimiento de cultivos.

Organización y sistematización de los datos ambientales.

Es de gran importancia tener un registro adecuado y fidedigno de las características tanto del ambiente como de las muestras y aún el estado fenológico de las poblaciones colectadas, ya que de requerirse el establecimiento de cultivos es necesario conocer bajo que condiciones ambientales (temperatura, insolación, salinidad, etc.) crecen las poblaciones de interés. Esto facilitará el establecimiento de cepas en cultivo en condiciones lo más parecidas a su hábitat.

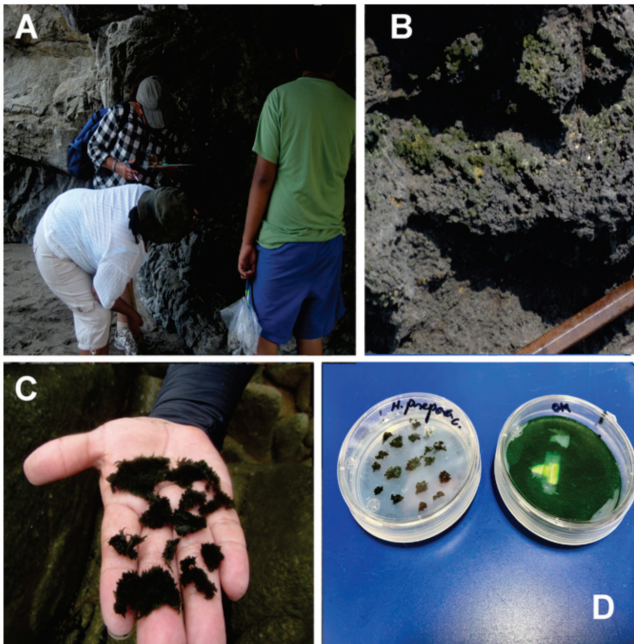


Figura 1.
A) Toma de datos y registro de principales crecimientos de cianobacterias en la zona supramareal.
B) Tapete de cianobacterias en la zona supramareal.
C) Tapetes de cianobacterias colectados.
D) Cultivo de cianobacterias supra-mareales en medio mineral.

RESULTADOS

1. Caracterización ambiental de las poblaciones de interés incluyendo los principales parámetros ambientales registrados (pH, temperatura, salinidad, incluidos los organismos acompañantes).
2. Composición taxonómica de cianobacterias por muestra, ambiente y localidad.
3. Conocer la riqueza de especies de cianobacterias por ambiente y localidad.
4. Descripción e identificación taxonómica de cianobacterias.

REFERENCIAS

1. Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J. & Johansen, J.R. (2014) Taxonomic classification of Cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295–335.
2. González-Resendiz, L., León-Tejera, H., & Gold-Morgan, M. (2015). Morphological diversity of benthic Nostocales (Cyanoprokaryota/Cyanobacteria) from the tropical rocky shores of Huatulco region, Oaxaca, México. *Phytotaxa*, 219(3): 221-232.
3. Komárek, J. (2016) A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology*, 51(3): 346-353.

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Formato de colecta de cianobacterias marinas de la zona supramareal.

FORMATO COLECTA DE CIANOBACTERIAS EN SUPRAMAREAL

NOMBRE:		LOCALIDAD - COORDENADAS:		FECHA Y HORA:		T° AMBIENTE:		T°, SALINIDAD Y pH AGUA:	
NOMBRE DE MUESTRA	TIPO DE MICROAMBIENTE ALTURA SOBRE EL NIVEL DEL MAR (ASNM)	DISTANCIA DESDE LA ORILLA DE LA PLAYA	OLEAJE INTENSIDAD	INSOLADO-SOMBRA	SUSTRATO ROCA, (SEDIMENTARIA, VOLCÁNICA, ETC.)	FORMA Y COLOR DE CRECIMIENTO. (TAPETE, MOTA, COSTRA, CÉSPED, ETC.)	OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ORGANISMOS EVIDENTES No. DE MUESTRA	OBSERVACIONES O NOTAS ADICIONALES	

3

**IDENTIFICACIÓN: MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA
Y MOLECULAR**

MÉTODO SIMPLIFICADO PARA EL ESTUDIO MORFOLÓGICO, POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO, DE ACTINOMICETOS HALÓFILOS

Ángel Horacio Sandoval Trujillo^{1*}, Ninfa Ramírez Durán²

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

hsandov@correo.xoc.uam.mx

INTRODUCCIÓN

El término Actinomicetos es un nombre informal para bacterias del orden Actinomycetales. Estos microorganismos se consideraron inicialmente hongos porque tienen verdaderas hifas aeróbicas. Sin embargo, estudios sobre la composición de la pared celular, especialmente la envoltura lipídica y la composición de la peptidoglicana, han demostrado que los actinomicetos son verdaderas bacterias aerobias, que en la actualidad se denominan Actinobacterias.

Aunque estos microorganismos se han encontrado en varios tipos de hábitats, sólo recientemente se han aislado de ambientes hipersalinos (1-4). Estos microorganismos, que pueden vivir en ambientes con determinadas concentraciones de sal, y que pueden agruparse en microorganismos halotolerantes o halófilos (5), tienen propiedades morfológicas y metabólicas muy específicas que les permiten vivir en estos ambientes. Por otro lado, los microorganismos halófilos son de gran utilidad para el desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos que tienen diversas aplicaciones industriales.

El medio natural en el que estas bacterias se desarrollan está formado por suelos y aguas muy salinos, por lo tanto, las técnicas de investigación tanto bioquímica como morfológica deben adaptarse a estas condiciones (6).

1. Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Ciudad de México. E-mail: hsandov@correo.xoc.uam.mx
2. Lab de Microbiología Médica y Ambiental. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, EdoMex. E-mail: nramirez@uaemex.mx

El presente trabajo se refiere a una técnica específicamente diseñada para la investigación morfológica de actinomicetos halófilos, mediante microscopía electrónica de barrido. Dadas las dificultades de mantener la morfología de las células de microorganismos halófilos esta técnica fue exitosa y preservó la morfología de las actinobacterias pudiéndose evidenciar las inusuales formaciones cristalinas que presentan algunas cepas del género *Saccharomonospora*, aisladas de lagunas costeras de Oaxaca (6).

Para la realización de esta técnica se requieren los siguientes materiales:

MATERIALES Y EQUIPO

MATERIALES	NECESARIO
■ Cubreobjetos	1 caja
■ Incubadora	1
■ Lápiz de diamante	1
■ Cajas de Petri pequeñas	1 paquete
■ Pinzas de punta fina	2
■ Pipetas Pasteur	1 caja

Tabla 1. Materiales y equipo necesarios para el proceso.

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO	NECESARIO
■ Agua destilada	1L
■ Etanol al 70 %, 80 %, 90 % y absoluto	100 mL de c/u
■ Solución de 10 % de NaCl y 2 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1L
■ Solución de Glutaraldehído al 2,5 %, en Buffer de cacodilato 0.1 M	20 mL
■ Medio de cultivo sólido para halófilos (Medio MH)	
■ Mezcla de etanol y acetona al 50 %	200 mL
■ Buffer de cacodilato 0.1 M	100 mL

Se utilizan cubreobjetos bien limpios y desengrasados con alcohol-acetona y que son seccionados, con un lápiz de diamante, en cuatro secciones; éstos se colocan en una caja de Petri de vidrio vacía y se esterilizan en horno seco, a 180 °C durante 1.5 horas.

Se prepara medio de agar MH convencional y se inocula con el microorganismo a estudiar en cada caja se insertan, en un ángulo de 45 ° unas cuatro a seis secciones de cubreobjetos estériles, esto con el objetivo de tomar muestras del crecimiento celular bacteriano a diferentes tiempos, y a continuación se incuban.

En cada toma de muestras se retiran dos secciones las cuales son enseguida procesadas.

MARCHA PARA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Lavar, desengrasar y esterilizar cubreobjetos
- Con el lápiz de diamante cortar los cubreobjetos en cuatro segmentos
- Insertar los segmentos de cubreobjetos en el medio sólido ya inoculado
- Incubar a la temperatura y tiempo adecuados
- Una vez trascurrido el tiempo, retirar los cubreobjetos del agar

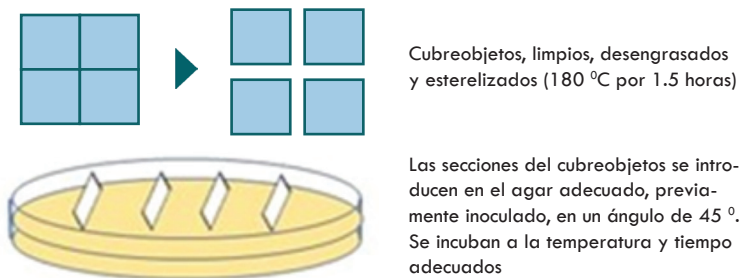


Figura 1. Representación gráfica de los primeros seis pasos del protocolo experimental.

- Colocar los cubreobjetos sobre dos varillas de vidrio acomodadas en una caja de Petri (figura 1).
- Con pipeta Pasteur hacer un prelavado con la solución de sales 10 % de NaCl y 2 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (figura 2).
- Igualmente con pipeta Pasteur colocar una solución de glutaraldehído al 2.5 % en buffer de cacodilato 0.1 M y mantener durante 3 horas para completar la fijación, cuidando que no se seque.

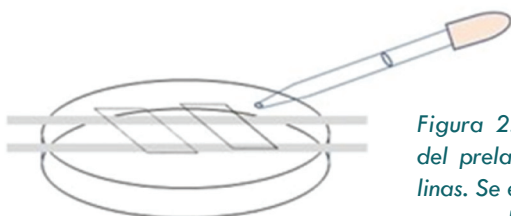


Figura 2. Representación gráfica del prelavado con soluciones salinas. Se emplea pipeta de Pasteur para realizar el prelavado.

- Pasado el tiempo de fijación los cubreobjetos se lavan con la solución de sales y se someten a deshidratación con las soluciones de Etanol, manteniéndolas durante 10 minutos cada una, empezando con la de 70 % hasta el Etanol absoluto, cuidando que no se sequen (figura 3).

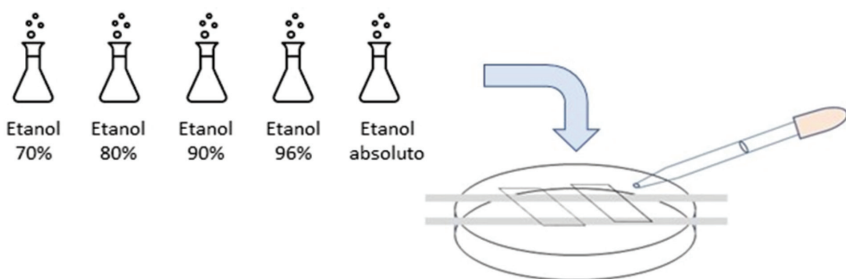


Figura 3. Representación gráfica del lavado con etanol utilizando un gradiente de concentración en el rango 70 % a 100 %.

Una vez deshidratadas las muestras se secan y se envían al Servicio de Microscopía de la universidad o instituto donde se procesarán de acuerdo con los procedimientos estandarizados por ellos. Se les puede sugerir que el sombreado se haga con oro, aunque eso dependerá de su experiencia.

RESULTADOS

La técnica descrita permite observar el micelio celular bien conservado, mostrando sus estructuras con una turgencia adecuada y sin artefactos que impidan un buen análisis de sus estructuras, tanto celulares como cristalinas.

Las estructuras cristalinas, presentes en la superficie de la célula, tienen buena definición morfológica, mostrando los diversos tipos de estructuras cristalinas presentes en la superficie externa micelial.

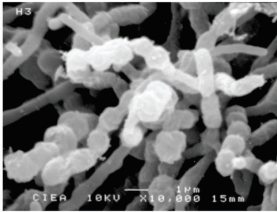


Figura 4.

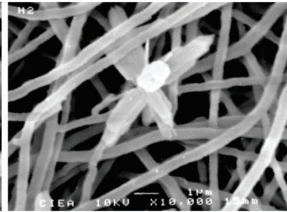


Figura 5.

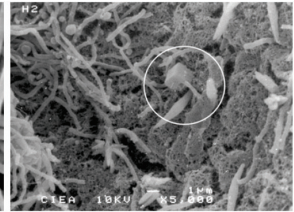


Figura 6.

Figura 4. *Saccharomonospora* sp. Se aprecian el micelio aéreo y las esporas.

Figura 5. *Saccharomonospora* sp. Forma cristalina inusual asociada al micelio.

Figura 6. Cristal cúbico de NaCl en el medio de cultivo.

En toda técnica de microscopía electrónica, los artefactos que se generan durante el procesamiento de la muestra son una importante fuente de error al tratar de interpretarlos, sobre todo porque en medios hipersalinos las técnicas convencionales son poco útiles. La técnica, aquí presentada, nos da preparaciones con muy pocos artefactos, lo que nos permite tener una mejor idea de las formaciones cristalinas presentes en los cultivos y son lo suficientemente limpias para hacer determinaciones de difracción de rayos X.

REFERENCIAS

1. Al-Tai A. M., Ruan J. (1994) *Nocardiosis halophila* sp. Nov. a New Halophilic Actinomycete Isolated From Soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*; 44: 474-478
2. Cui X.-L., Mao P.-H., Zeng M., Li-W J. M., Zhang L.-P., Xu L.-H., & Jiang C.-L. (2001) *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov. a new member of the family Nocardiosporeaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 51: 357-363.
3. Gochner, M. B., Leppard G. G., Komarata P., Kates M., Novitsky T., Kushner D. J. (1975) Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et. sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. *Can J Microbiol*; 21: 1500-1511.
4. Ramírez N., Castro K., González A., Márquez M. C., Sandoval H., & Ventosa A. (2001) Isolation of Actinomycetes from Hipersaline in the South of México. In International Conference on Halophilic Microorganisms Sevilla España 2001; Abstract N° P11
5. Ventosa A., Nieto J. J., Oren A. (1998) Biology of Moderately

Halophilic Aerobic Bacteria, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 62: 504-544.

6. Sandoval H., Serrano J. A., Ramírez N., & Ventosa A. (2002) Unusual Crystal Formation Found in Halophilic Actinomycetes. *Proceed. IUMS Congress (Paris), the World of Microbes*. pp.195

DEL GLACIAR A LA CAJA DE PETRI: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS PSICRÓFILOS

Rosa Paulina Calvillo Medina^{1*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:
rosapaulinacalvillomedina@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El estudio de los microorganismos amantes del frío (psicrófilos) es necesario en la investigación de organismos extremófilos. En particular los micro hongos que habitan estos sitios representan un vasto reservorio biológico, el cual puede ayudar a comprender los mecanismos biológicos de tolerancia a sitios extremos, o los procesos de resistencia al estrés oxidante generado por el ecosistema que habitan. En México los sitios extremos donde hay glaciares son el volcán Iztaccíhuatl y el Citlaltépetl. Los cuales no solo son extremos por las bajas temperaturas que existen en ellos sino por la gran altura a la cual se localizan (arriba de los 5000 msnm). Debido a lo anterior el objetivo de este trabajo es mostrar un método de aislamiento, cultivo e identificación de micro hongos aislados de los glaciares mexicanos. El cual se basa, en el aislamiento en cajas de Petri y en la amplificación de dos marcadores moleculares (MM) altamente informativos en el reino Fungi, el espaciador interno del nrDNA (ITS) y parte del gen que codifica para la subunidad mayor ribosomal 28S (LSU) (1, 2). El presente método ha sido usado con éxito en el aislamiento e identificación de hongos extremófilos de los glaciares del Iztaccíhuatl y el Citlaltépetl. Se ha usado en artículos indexados y en tesis de licenciatura y maestría de la Facultad de Química de la UAQ (2,3).

1. Laboratorio de microbiología, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas s/n, Querétaro, Qro.

MATERIALES Y EQUIPO

MATERIALES	NECESARIO
■ Piolet (esterilizado por flameo <i>in situ</i> con etanol 96 °)	1
■ Frascos de vidrio estériles de 500 ml	1 por sitio
■ Hielera y tijeras estériles	1 de cada uno
■ Filtros de 0.22 µm	1 por sitio
■ Cajas de Petri estériles	2 por muestra
■ Porta y cubreobjetos	Suficientes
■ Microscopio y termociclador	1 de cada uno
■ Pipetas de distinta capacidad, puntas y tubos de 200 µL	Suficientes
■ Campana de flujo laminar y refrigerador 4 °C	1 de cada uno

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO

NECESARIO

■ Etanol 96 °	Suficiente
■ Agar dextrosa Sabouraud (SDA) y Agar Rosa de Bengala (RBA) con cloranfenicol (100 µg/ml), Agar de papa y dextrosa (PDA)	2 cajas de cada medio por muestra
■ Azul de Algodón Lactofenol (AAL)	Una gota por muestra
■ Primers ITS1f y ITS4r para el nrDNA ITS y LORO y LR5 para LSU	0.5 µL cada uno (20 pM)
■ Taq Polimerasa	1 µL (2.5 U/µL)
■ Mix de PCR	25 µL por muestra

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. Una vez en el glaciar, cavar un agujero de 60 cm de profundidad con el piolet estéril y dentro del mismo abrir los frascos, coleccionar el hielo glaciar y cerrar el frasco.
2. Transportar los frascos en la hielera en frío al laboratorio tan rápido como sea posible, una vez ahí dejar que el hielo glaciar se descongele en el refrigerador a 4 °C.
3. En la campana de flujo laminar, usando los filtros de 0.22 µm, filtrar las muestras de cada sitio por separado y cortar los filtros con las tijeras estériles.

4. Colocar los fragmentos de papel filtro en SDA y RGA por duplicado e incubar a 28 °C y 4 °C hasta observar crecimiento. Después resembrar en PDA para obtener cultivos axénicos.
5. Tomar una muestra de cada cultivo con morfología diferente usando una punta de pipeta y observar en el microscopio en porta y cubreobjetos añadiendo una gota AAL.
6. Con los aislados que resulten ser diferentes morfológicamente, realizar “Colony PCR”, tomando con una punta de 10 µl una pequeñísima cantidad de biomasa y resuspender en 50 µl de agua estéril. Usar 1 µl para realizar la PCR White et al. (5) para la amplificación de la región ITS con los primers ITS1f e ITS4r; y de acuerdo al método descrito por Vilgalys y Hester (4) para la amplificación de la región LSU con los primers LOR0 y LR5.
7. Una vez amplificados los MM mandar secuenciar el producto de PCR, analizar vía BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>) (6) y realizar inferencia filogenética de cada aislado para descifrar su categorización biológica.



Figura 1. Diagrama de los métodos de aislamiento, identificación morfológica y molecular de micro hongos psicrófilos.

RESULTADOS

La presente metodología permite el aislamiento e identificación de micro hongos cultivables de los glaciares. Combinando características morfológicas, indispensables en la identificación taxonómica, y métodos moleculares, basados en ITS y LSU. Con esto se identificarán parcialmente (a nivel de género) o específicamente (a nivel de especie) los hongos. En algunos casos resulta indispensable realizar amplificación de más MM específicos de acuerdo con el género fúngico encontrado. Los hongos filamentosos más abundantes aislados de los glaciares mexicanos han sido: *Cladosporium Alternaria* y *Penicillium* y las levaduras: han sido miembros de los géneros: *Cladosporium*, *Alternaria* y *Penicillium* (Calvillo-Medina et al., 2020). Es importante recalcar que un análisis de inferencia filogenética (basado en MM) es útil para la correcta caracterización de los aislados. Así como de ser posible, caracterizar fisicoquímicamente parte de las muestras de agua glaciar para poder realizar análisis funcionales y ecológicos.

Sitio	Coordenadas	Msnm y °C	Etiqueta Frasco	# aislados SDA	# aislados BRA	Morfología distinta	# axénicos SDA	PCR ITS	PCR LSU
Iztaccíhuatl Glaciar La panza	N 19° 10.003' W 098° 38.203'	5020msnm -5°C	ILP1, ILP2	75	74	63	63	40	40

Tabla 1. Muestras tomadas, hongos aislados y PCR realizadas a colectas de glaciares.

La presente metodología puede contribuir a explorar la riqueza y diversidad fúngica de las comunidades microscópicas de los glaciares mexicanos en busca de hongos extremófilos. Dichos psicrófilos pueden haber desarrollado adaptaciones a condiciones extremas y podrían utilizarse para biorremediación u otra aplicación industrial o médica.

REFERENCIAS

1. Branda E., Turchetti B., Diolaiuti G. et al (2010) Yeast and yeast-like diversity in the southernmost glacier of Europe (Calderone Glacier, Apennines, Italy). *FEMS Microbiol Ecol* 72:354–369. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00864.x>

2. Calvillo-Medina R. P., Gunde-Cimerman N., Escudero-Leyva E., Barba-Escoto L., Fernández-Tellez E. I., Medina-Tellez A. A., Bautista-de Lucio V., Ramos-López M. A. & Campos-Guillén J. (2020) Richness and metallo-tolerance of cultivable fungi recovered from three high altitude glaciers from Citlaltépetl and Iztaccíhuatl volcanoes (México). *Extremophiles* 24: 625–636. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01182-0>
3. Calvillo-Medina R. P., Raymundo T. & Cobos-villagrán (2020) A. *Periconiacitlatepetlensis* sp. nov. (*Periconiaceae*, *Pleosporales*): A psychrotolerant fungus from high elevation volcanic glacier (Mexico). *Phytotaxa* 459: 235–247. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.459.3.5>
4. Vilgalys R, Hester M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol* 172 (8): 4238-4246. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990>
5. White T, Bruns T, Lee S&Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky SS& White TJ, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York, NY: Academic Press Inc:315-322.
6. *GenBank* (2021) from the NCBI databases. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (enero 2021)

4

PROSPECCIÓN DE ORGANISMOS EXTREMÓFILOS, DE SUS GENES, PROTEÍNAS U OTROS PRODUCTOS PARA SU UTILIZACIÓN EN DIFERENTES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS:

4.1 ENZIMAS

BIOPROSPECCIÓN DE EXTREMOENZIMAS HIDROLÍTICAS CON POTENCIAL EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

Lourdes Yaret Ortiz Cortés¹, Cristina Ventura Canseco¹, Peggy Elizabeth Álvarez Gutiérrez^{1*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

peggy.alvarez@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Los extremófilos son organismos que pueden crecer en diferentes condiciones fisicoquímicas (1). Tienen una maquinaria metabólica que les permite vivir en condiciones extremas, así como utilizar diferentes fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico (2). Bajo estas condiciones, los extremófilos secretan enzimas extracelulares, las cuales inician la degradación de macromoléculas inorgánicas (3,4). Recientemente, el interés por el aislamiento y la caracterización de nuevos extremófilos ha incrementado porque producen extremozimas (5). Las extremozimas presentan características estructurales que les permiten llevar a cabo la catálisis en condiciones extremas y son ideales para su aplicación en la industria, así como para el desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos (6). Generalmente, se puede inducir la producción de extremozimas en un organismo previamente aislado, para ello es necesario agregar al medio de cultivo, un inductor específico de la enzima de interés y en ocasiones se requiere un indicador ácido-base (7). Por todo esto, el objetivo de este trabajo es aislar bacterias extremófilas productoras de extremozimas con aplicación industrial. Para el aislamiento de las bacterias, se inocularon medios ricos mediante estriado en placa hasta la obtención de cultivos axénicos. La inducción de enzimas se llevó a cabo en medios selectivos con inductores específicos para hacer un cribado de su capacidad para producir extremoenzimas.

1. Laboratorio de Microbiología del Polo Tecnológico, Tecnm-Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Carr. Panamericana km 1080, Col. Junan Crispín. CP 28050, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

MATERIALES Y EQUIPO

A continuación, se describen los materiales necesarios para este aislamiento y cribado enzimático (tabla 1), así como las soluciones, reactivos y material biológico (tabla 2).

MATERIALES	NECESARIO
■ Matraz Erlenmeyer 250 mL	10
■ Probeta 100 mL	1
■ Tubos cónicos de polipropileno 15 mL	50
■ Tubos cónicos de polipropileno 50 mL	50
■ Cajas Petri	100
■ Asa bacteriológica	1
■ Autoclave	1
■ Varilla acodada	1
■ Incubadora	1
■ Micropipeta 1 mL	1
■ Pipeta 10 mL	10

Tabla 1. Materiales necesarios para aislamiento y cribado enzimático.

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO	NECESARIO
■ Solución HCl 0.1 M	100 mL
■ Solución NaOH 0.1 M	100 mL
■ Peptona de caseína	10 g
■ Extracto de levadura	10 g
■ CaCl_2	5g
■ MgSO_4	5g
■ FeCl_3	5g
■ Lactosa	100 g
■ Carboximetil celulosa	100 g
■ Xilano de abedul	100 g
■ Aceite de oliva	100 mL
■ Rojo fenol	5g
■ Yodo lugol	100 mL
■ Material biológico (muestra de agua de sitios termales o extremos)	500 mL

Tabla 2. Soluciones, reactivos y material biológico para aislamiento y cribado enzimático.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. Colectar al menos cuatro muestras (M1, M2, M3, M4) de 30 mL de agua del sitio termal. Las muestras se colocarán en tubos cónicos de polipropileno de 50 mL estériles. Registrar la temperatura, pH y conductividad eléctrica del sitio de colecta (figura 1).
2. Preparar 300 mL de medio de cultivo medio basal MB (1.5 g de lactosa, 6 g de peptona de caseína, 0.2 g de CaCl_2 , 0.1 g de MgSO_4 y adicionar 0.8 mL de 1 % FeCl_3 por litro) ajustar el pH a 3.0 con HCl o NaOH. Colocar alícuotas de 3 mL de medio MB en tubos de polipropileno de 15 mL y esterilizar a 1 lb/plg² por 15 min.
3. Inocular 1 mL de muestra de agua del sitio termal en los tubos de propileno con 3 mL de medio (A1, A2, A3, A4). Incubar los tubos inoculados a temperatura de aislamiento durante 48 horas. Revisar el cambio de turbidez cada 24 h por observación directa.
4. Una vez que exista turbidez en los cultivos de enriquecimiento realizar diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} con medio de cultivo estéril como diluyente de cada una de los tubos inoculados que hayan presentado turbidez.
5. Inocular 300 μL de cada una de las diluciones en cajas de Petri con medio sólido MB con de una varilla acodada y extenderlo de forma homogénea en el medio. Incubar a temperatura de muestreo durante 48 h. Observar la formación de colonias aisladas. Registrar características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las colonias que presenten características particulares o diferencias morfológicas notables.
6. Tomar una colonia aislada con un asa bacteriológica estéril e inocular en medio sólido MB mediante estriado en placa. Incubar a temperatura de muestreo durante 24-48 h.
7. Identificar colonias aisladas del medio MB sólido. Transferirlas a 3 mL de medio MB líquido estéril en tubos cónicos de polipropileno de 15 mL. Incubar a temperatura de muestreo y observar la turbidez del cultivo.
8. Propagar el cultivo mediante resiembras periódicas en medio MB líquido estéril con aumentos de volumen de cinco a diez veces. La relación inóculo: medio se recomienda de 1:10. Medir el crecimiento. Monitorear la Absorbancia mediante espectrofotometría hasta registrar una D.O 600 nm entre 0.600-0.800 en el cultivo.

9. La selección de los organismos con extremoenzimas extracelulares se llevará a cabo mediante la determinación cualitativa de la actividad enzimática. Para ello, los aislados se siembran en medio MB sólido de selección en el que se variará la fuente de carbono del medio. Para la selección de organismos con actividad β -galactosidasa, utilizar medio MB + lactosa (3 %) + rojo fenol (0.25 %); celulasa, utilizar medio MB + carboximetil celulosa(3 %); lipasa, medio MB + aceite de oliva (1.5 %); proteasa, medio MB + peptona de caseína (3 %); y, xilanasa, medio MB + xilano de abedul (3 %). Los aislados con actividad enzimática presentan un halo alrededor del crecimiento (figura 2).

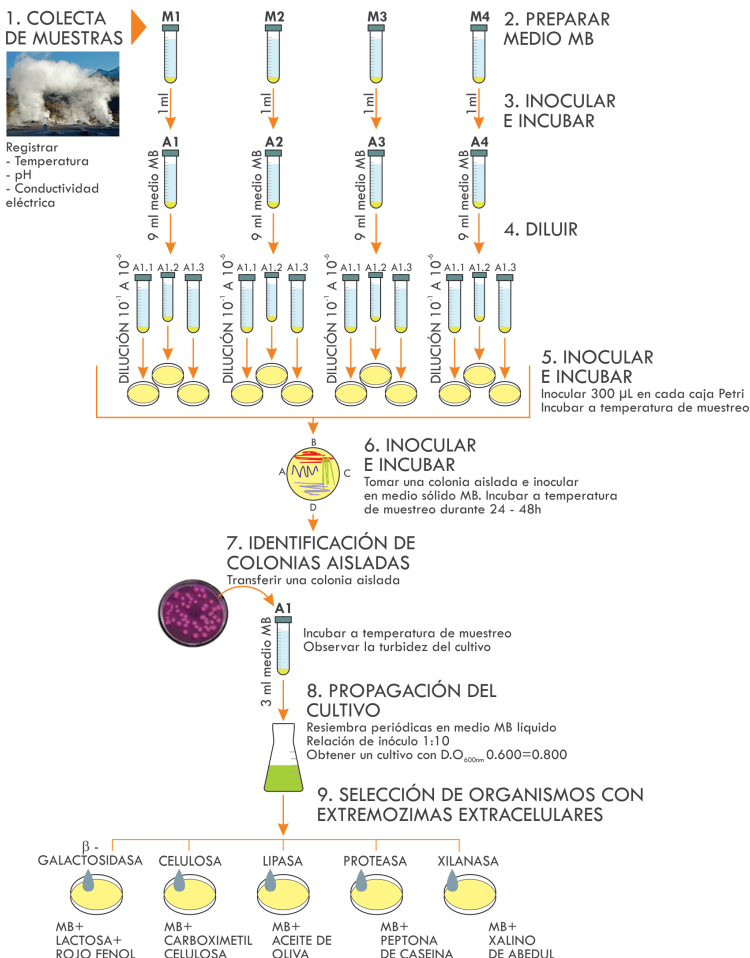


Figura 1. Diagrama de flujo para el aislamiento de bacterias extremófilas productoras de extremoenzimas.

RESULTADOS

Los resultados se reportan con las características macro y microscópicas de los aislados de acuerdo a la tabla 3. La actividad enzimática cualitativa es positiva si presenta halo de actividad enzimática (figura 1).

CARACTERÍSTICAS MORFOLOGÍA COLONIAL	DESCRIPCIÓN
Tamaño	Diámetro de la colonia en medio sólido
Forma	Está determinada por su borde y su espesor y puede ser circular, puntiforme, irregular, rizoide o fusiforme
Borde	Los bordes de la colonia se describen como entero, ondulado, lobulado o filamentosos
Elevación	La elevación de la colonia respecto a la superficie del medio se define como plana, convexa o elevada
Superficie	La superficie de la colonia se define como lisa, rugosa o plegada
Consistencia	La consistencia se determina con el asa y puede ser cremosa o membranosa
Color	El color de la colonia se define en general y se usan términos comunes para definirlo, en algunos casos de específica si existe un pigmento producido difusible o no
Luz transmitida	Las características ópticas consisten en observar a través de la colonia para determinar la luz transmitida, la cual puede ser opaca, traslúcida o transparente
Luz reflejada	La característica óptica de la luz reflejada se observa en la superficie de la colonia y se describe como opaca o brillante
CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	
Tamaño	Diámetro del organismo
Forma	La forma puede ser redonda o coco, bacilo, hifa, espirilo o espiroqueta
Agrupación	La agrupación puede ser de dos o más células y se define según la forma
Tipo	El tipo de célula puede ser vegetativa, hifa o espora
Tinción Gram	La tinción Gram aplica solo para bacterias y puede ser positiva o negativa
Otras características	Las células pueden presentar otras características importantes como estructurales subcelulares, cilios, flagelos, tubos germinativos, etc.
CONDICIONES DE CRECIMIENTO	
Temperatura (°C)	
pH	
Agitación (rpm)	
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	
β- Galactosidasa	Positivo si hay presencia de halo
Celulasa	Positivo si hay presencia de halo
Xilanas	Positivo si hay presencia de halo
Proteasa	Positivo si hay presencia de halo

Tabla 3. Características morfológicas y macroscópicas de los organismos.

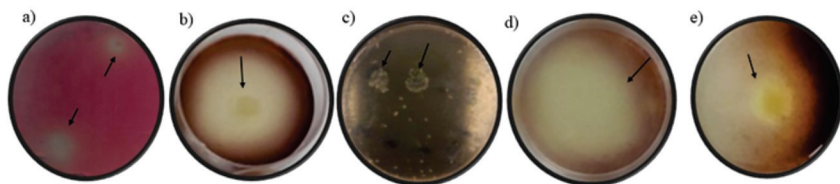


Figura 2. Determinación cualitativa de extremozimas hidrolíticas.

a) Actividad β -galactosidasa,

b) actividad celulasa,

c) actividad lipasa,

d) actividad proteasa,

e) actividad xilanasa.

La flecha indica la presencia del halo de actividad.

REFERENCIAS

1. Rampelotto PH. (2013) Extremophiles and extreme environments. *Life Sci* 3:482-485.
2. Cowan, DA., Ramond, JB., Makhalanyane, TP., De Maayer, P. (2015) Metagenomics of extreme environments. *Curr Opin Microbiol* 25:97-102.
3. Burns, RG. (2010) How do microbial extracellular enzymes Locate and Degrade Natural and Synthetic Polymers in Soil. In *Molecular Environmental Soil Science at the Interfaces in the Earth's Critical Zone* pp 294-297.
4. Li, Y., Sun, LL., Sun, YY., Qian-Qian C., Chun-Yang, L., Dian-Li, Z., Xiao-Yan, S., Min, W., Andrew, M., Xiu-Lan, C., Yu-Zhong, Z., Qi-Long, Q. (2019) Extracellular Enzyme Activity and Its Implications for Organic Matter Cycling in Northern Chinese Marginal Seas. *Front Microbiol*. 10:1-13.
5. Schröder, C., Burkhardt, C., Antranikian, G. (2020) What we learn from extremophiles. *ChemTexts* 6:8-14.
6. Shrestha, N., Chilkoor, G., Vemuri, B., Rathinam, N., Sani, RK., Gadhamshetty, V. (2018) Extremophiles for microbial-electrochemistry applications: A critical review *Bioresour Technol* 255:318-330.
7. Pawlak-Szukalska, A., Wanarska, M., Popinigis, AT., Kur, J. (2014) A novel cold-active β -D-galactosidase with transglycosylation activity from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32cB - Gene cloning, purification and characterization. *Process Biochem* 49:2122-2133.

Figura 1.

Diagrama de flujo para el aislamiento de bacterias extremófilas productoras de extremozimas.

Esta figura no ha sido previamente publicada. Muestra el flujo de trabajo que ha sido estandarizado en el laboratorio 3, para el aislamiento de bacterias extremófilas productoras de extremozimas.

Figura 2.

Determinación cualitativa de extremozimas hidrolíticas. a) Actividad β -galactosidasa, b) actividad celulasa, c) actividad lipasa, d) actividad proteasa, e) actividad xilanas. La flecha indica la presencia del halo de actividad.

Esta figura no ha sido previamente publicada. La presencia de halos indica la hidrólisis de polisacáridos a moléculas menos complejas. Esta imagen puede usarse como referencia para identificar microorganismos productores de extremozimas tales como β -galactosidasa, celulasa, lipasa, proteasa y xilanas.

Tabla 3.

Características morfológicas y macroscópicas de los organismos.

A través de esta tabla se pueden conocer las características microbiológicas y bioquímicas de los aislados. Esto permite diferenciarlas de otros organismos y determinar características únicas del organismo estudiado.

PROSPECCIÓN DE ENZIMAS DE TERMÓFILOS CON APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

Rodolfo Quintana Castro^{1*}, María Guadalupe Sánchez Otero²,
Graciela Espinosa Luna³

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

roquintana@uv.mx

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos termófilos son fuente de enzimas de interés biotecnológico debido a su resistencia a altas temperaturas. Una forma de detectar la producción de estas enzimas es por medio del crecimiento de los microorganismos en medios de cultivo que poseen una fuente de carbono específica: almidón (amilasas), aceite (lipasas), quitina (quitinasas) y proteína (proteasas), y la consecuente formación de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia. Los métodos propuestos en este trabajo han sido utilizados específicamente para la determinación de actividad lipolítica de *Geobacillus thermoleovorans* CCR11, y en general para actividades proteolíticas y quitinolíticas en bacterias del género *Bacillus*.

1. Laboratorio de Química Médica y Quimiogenómica, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana. Carmen Serdán s/n Col. Centro, CP 91000 Veracruz, Ver.
2. Laboratorio de Química y Biotecnología, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana. Carmen Serdán s/n Col. Centro, CP 91000 Veracruz, Ver.
3. Laboratorio de Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Veracruz. Av. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar, CP 91897 Veracruz, Ver.

MATERIALES Y EQUIPO

MATERIALES	NECESARIO
■ Cajas Petri esterilizadas	40
■ Campana de flujo laminar	1
■ Autoclave	1
■ Licuadora	1
■ Frascos de vidrio de licuadora para papilla (frasco, base, aspa y empaque)	2
■ Equipo de microfiltración con membranas de 0.45 μm	2
■ Jeringas de 10 mL para equipo de microfiltración	2
■ Matraces de 500 mL	
■ Filtro de lana de vidrio	1
■ Centrifuga refrigerada	1

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO

NECESARIO

■ Triptona de caseína	cbp
■ Extracto de levadura	cbp
■ Agar	20 g/L
■ 0.6 M Tris-HCl [pH 8.0]	200 mL
■ Albúmina de suero bovina	cbp
■ Cloruro de calcio dihidratado	cbp
■ Caseinato de sodio	cbp
■ Gelatina	cbp
■ Tributirina	cbp
■ Cloruro de sodio	cbp
■ Aceite de cártamo alto en ácido oleico	cbp
■ Rodamina B solución stock 0.001 % (p/v)	10 mL
■ Caldo nutritivo	cbp
■ Almidón soluble	cbp
■ Solución de Yodo de Gram	200 mL
■ Quitina de caparazón de cangrejo	20 g
■ HCl concentrado frío	350 mL
■ Etanol frío	2 L

cbp: cuanto baste para

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. Producción de proteasas. Para detectar proteasas se pueden utilizar como sustratos la caseína, albúmina o gelatina (1). Para preparar el medio con albúmina, primero se prepara el medio de cultivo suspendiendo la triptona de caseína (2 g/L) y el extracto de levadura (0.2 g/L) en 750 mL de agua destilada, se agregan 50 mL de amortiguador Tris-HCl 0.6 M [pH 8.0] y finalmente el agar (15 g/L). Se esteriliza a 120 °C por 15 min y se deja enfriar hasta 50 °C. La albúmina (5 g/L) se disuelve en 200 mL de agua destilada, se esteriliza por microfiltración con membranas de 0.45 μm y se calienta a 50 °C. Finalmente, se mezclan las dos porciones y se vierte en las cajas de Petri.

Para preparar el medio con caseína, se suspende la triptona de caseína (2 g/L), el extracto de levadura (0.2 g/L), el cloruro de calcio dihidratado (0.5 g/L), y el caseinato de sodio (5 g/L) en 950 mL de agua destilada. Se agregan 50 mL de amortiguador Tris-HCl 0.6 M [pH 8.0] y el agar (15 g/L). Se esteriliza a 120°C por 15 min, se deja enfriar hasta 50 °C, y se vierte en las cajas de Petri.

Para preparar el medio con gelatina, se suspende la triptona de caseína (2 g/L), el extracto de levadura (0.2 g/L), y la gelatina (6 g/L) en 950 mL de agua destilada. Se agregan 50 mL de amortiguador Tris-HCl 0.6 M [pH 8.0] y el agar (15 g/L). Se esteriliza a 120 °C por 15 min, se deja enfriar hasta 50 °C, y se vierte en las cajas de Petri.

2. Producción de enzimas lipolíticas. Para detectar la producción de enzimas lipolíticas se pueden utilizar como sustratos la tributirina (2) o la rodamina B (3). Para preparar el medio con tributirina, se suspende la triptona de caseína (10 g/L), el extracto de levadura (5 g/L), y el cloruro de sodio (5 g/L) en 995 mL de agua destilada; se agrega el agar (10 g/L) y se esteriliza a 120 °C por 15 min. Una vez que se enfría a 50 °C, se añade la tributirina (5 mL/L), se homogeniza por 1 min a velocidad alta en el frasco de licuadora esterilizado, y se vierte en las cajas de Petri. Para preparar el medio con rodamina B, primero se disuelve la rodamina B (0.001 % p/v) en agua destilada y se esteriliza

por microfiltración con membranas de 0.45 μm . Se prepara el medio de cultivo disolviendo el caldo nutritivo (8 g/L) y el cloruro de sodio (4 g/L) en 970 mL de agua destilada, ajustar a [pH 7.0], se agrega el agar (10 g/L), y se esteriliza a 120 °C por 15 min. Se deja enfriar hasta 60 °C, y se añade aceite de cártamo alto en oleico (25 mL/L) y la solución de rodamina B estéril (5 mL/L), se homogeneiza por 1 min a velocidad alta en el frasco de licuadora esterilizado, y se vierte en las cajas de Petri. Para una mejor visualización de los halos de hidrólisis, es necesario irradiar las cajas con luz UV.

3. Producción de amilasas. Para detectar la producción de amilasas, se prepara el medio suspendiendo la triptona de caseína (10 g/L), el cloruro de sodio (10 g/L), y el almidón soluble (20 g/L) en 1000 mL de agua destilada. Se agrega el agar (15 g/L) y se esteriliza a 120 °C por 15 min. Se deja enfriar hasta 50 °C, y se vierte en las cajas de Petri. Para detectar la zona de hidrólisis, se agrega en las placas solución de yodo de Gram (4).
4. Producción de quitinasas. Para detectar la producción de quitinasas, primero se suspende la quitina (1 mg/mL) en agua destilada y se pasa cinco veces por un homogenizador manual del tipo VWR®. Se disuelve el caldo nutritivo (16 g/L) en agua destilada y se mezcla un volumen de la quitina con un volumen del caldo nutritivo, se agrega agar (20 g/L), y se esteriliza a 120 °C por 15 min. Se deja enfriar hasta 50 °C, y se vierte en las cajas de Petri (5). La quitina se puede comprar o se puede obtener suspendiendo 20 g de caparazón de cangrejo en 350 mL de HCl concentrado frío, y dejando reposar a 4 °C por 24 h. Se filtra con lana de vidrio en un matraz con 2 L de etanol absoluto a -20 °C con agitación vigorosa, se centrifuga la suspensión resultante a 10,000 g a 4 °C por 20 min, y se lavan los precipitados de quitina repetidamente con agua hasta que el pH sea neutro. Finalmente, se liofilizan los precipitados hasta sequedad y se almacenan a -20 °C.

En todos los casos, se deben inocular las cajas preparadas con la cepa de estudio por estría cruzada, e incubar a la temperatura óptima de crecimiento por 24 h. En temperaturas por arriba de 40 °C, se recomienda sellar las cajas con papel Parafilm, introducirlas en una bolsa de plástico con cierre, añadir tres o cuatro torundas de algo-

dón humedecidas en agua destilada, cerrar la bolsa e incubar. Si el medio sólido se funde durante la incubación, se puede incrementar la concentración de agar a 20 g/L. Al finalizar la incubación, se observarán halos de hidrólisis alrededor de las colonias.



Figura 1. Esquema general para identificación de cepas con actividad enzimática por cultivo en placa.

RESULTADOS

Anotar el nombre de la cepa y registrar si hubo (+) o no (-) halo de hidrólisis en la tabla siguiente:

Cepa	Albúmina	Caseína	Gelatina	Tributirina	Rodamina	Almidón	Quitina

Tabla 1. Registro de aparición de halo de hidrólisis en cultivo en placa.

A manera de ejemplo, en la figura 2 se muestra el halo de hidrólisis en placas con rodamina B bajo luz visible y luz UV; y en la figura 3 se observa el halo de hidrólisis, con fondo claro y oscuro, en placas de tributirina.

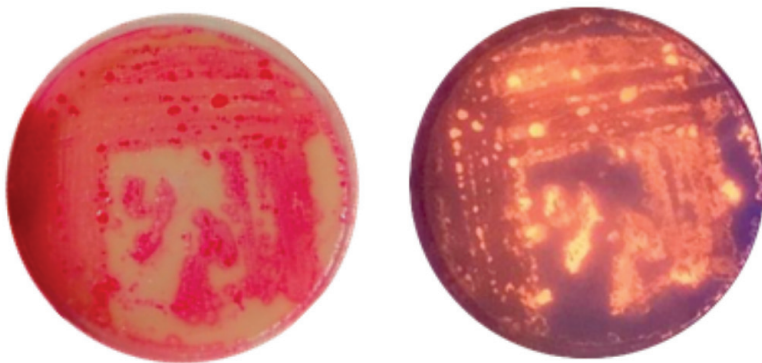


Figura 2. Placa de medio de cultivo con rodamina B, a la izquierda bajo luz visible y a la derecha bajo luz UV a 365 nm. La fluorescencia indica hidrólisis del sustrato (6).

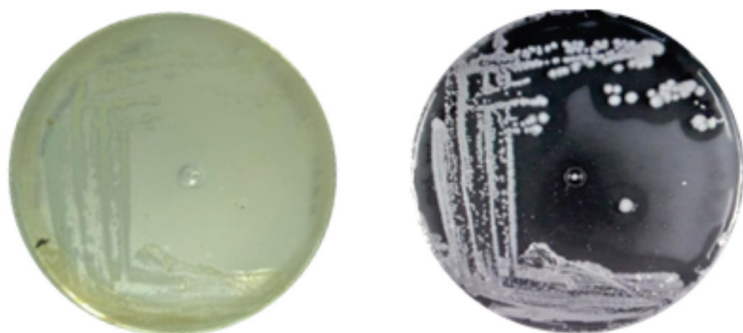


Figura 3. Placa de medio de cultivo con tributirina, a la izquierda con el fondo iluminado y a la derecha con el fondo obscuro (6).

Los métodos descritos tienen una importante aplicación en la fase inicial para la identificación de actividades enzimáticas de microorganismos, ya que permiten, de una manera rápida, la detección de estas características sin la necesidad de realizar extractos crudos enzimáticos y la consecuente aplicación de un protocolo espectrofotométrico.

REFERENCIAS

1. Shotts, E. B., Hsu, T. C., & Waltman, W. D. (1985). Extracellular proteolytic activity of *Aeromonas hydrophila* complex. *Fish Pathology*, 20(1): 37-44.
2. Kugimiya, W., Otani, Y., Hashimoto, Y., & Takagi, Y. (1986). Molecular cloning and nucleotide sequence of the lipase gene from *Pseudomonas fragi*. *Biochemical and biophysical research communications*, 141(1): 185-190.
3. Kouker, G., & Jaeger, K. E. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and environmental microbiology*, 53(1): 211-213.
4. Shanmughapriya, S., Kiran, G. S., Selvin, J., Gandhimathi, R., Baskar, T. B., Manilal, A., & Sujith, S. (2009). Optimization, production, and partial characterization of an alkalophilic amylase produced by sponge associated marine bacterium *Halobacterium salinarum* MMD047. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(1): 67-75.

5. Roberts, W. K., & Selitrennikoff, C. P. (1988). Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Microbiology*, 134(1): 169-176.
6. Escalante García, Nubia Maribel. (2020). Determinación de la actividad lipolítica de *Acinetobacter junii* MVU2 aislada de suelos marinos del Golfo de México (Tesis de pregrado). Universidad Veracruzana, Veracruz, México.

IDENTIFICACIÓN DE *Geobacillus* PRODUCTORES DE LIPASA AISLADOS DEL LAGO CRÁTER DEL VOLCÁN EL CHICHÓN

Arturo Peña Blasi¹, Sandy Luz Ovando Chacón^{1*}, Peggy Elizabeth Álvarez Gutiérrez¹

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

ovansandy@hotmail.com / sandy.oc@tuxtla.tecnm.mx

INTRODUCCIÓN

El género *Geobacillus* ha sido aislado de pozos petroleros, del subsuelo, fosas marinas y respiradores hidrotermales. En 2004 se reportó el aislamiento de una cepa del género *Geobacillus* en el sur de California a una temperatura de 4 °C (1). Posteriormente, se reportó el potencial biotecnológico de este género de bacterias termófilas como en la síntesis de diferentes enzimas hidrolíticas con actividad lipasa, proteasa y amilasa, además de su potencial en la producción de exopolisacáridos, bacteriocinas y biocombustibles, así como en la biorremediación (2). Las lipasas producidas por microorganismos termófilos han tenido una mayor demanda por su amplia gama de aplicaciones en diferentes industrias como la de alimentos, combustible, detergente, farmacéutica entre otras, debido a que exhiben una estructura altamente estable a altas temperaturas, así como en presencia de solventes orgánicos (3). Las lipasas producidas por los *Geobacillus* aislados de las aguas del lago cráter del volcán El Chichón han mostrado ser termoestables a temperatura de hasta 71 °C, por lo que se pretende optimizar las condiciones para maximizar el rendimiento de producción de enzimas y su potencial en la industria alimentaria; así mismo, los miembros del género *Geobacillus* han mostrado tener potencial para la producción de biosurfactantes.

1. Peña Blasi, A.1, *Ovando Chacón, S.L.1, Álvarez Gutiérrez, P.E.1 TecNM / Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Carretera Panamericana km. 1080, col. Juan Crispín, CP 28050. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

MATERIALES Y EQUIPO

MATERIALES	NECESARIO
■ Matraz Erlenmeyer de 250 mL	3
■ Espátula	1
■ Cajas Petri	30
■ Asa bacteriológica	1
■ Matraz aforado de 25 mL	1
■ Filtro tamaño de poro 0.22 μm	10
■ Ultra turrax	1
■ Incubadora	1
■ Transiluminador UV	1
■ Papel Parafilm®	1 rollo
■ Película plástica	1 rollo
■ Bolsas Ziploc	1 paquete
■ Probeta de 50 mL	1
■ Probeta de 25 mL	1
■ Marcador de resaltado	2 colores
■ Bitácora de laboratorio	1

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO	NECESARIO
■ Agua destilada	1 L
■ Rodamina B	5 g
■ Peptona	500 g
■ NaCl	250 g
■ Extracto de levadura	500 g
■ Agar	500 g
■ Aceite de oliva comercial	1 L

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. Aislamiento de *Geobacillus* con capacidad lipolítica.

- 1.1. Tomar una asada a partir del matraz proporcionado que presenta crecimiento de *Geobacillus* para su escrutinio en placas.
- 1.2. Realizar siembra por estría cruzada en placa con medio rodamina B (MRB) (peptona 10 g/L, NaCl 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, agar 17 g/L, aceite de oliva 31.25 mL/L y

rodamina 0.001 %) (4). Preparar previamente la solución de rodamina B en agua destilada estéril a una concentración de 1 mg/mL, la solución resultante y el aceite de oliva se esterilizan mediante filtración con un filtro de nitrocelulosa de 0.22 μm de tamaño de poro.

- 1.3. Incorporar el aceite de oliva y la rodamina B en el agar bajo condiciones asépticas y agitar la mezcla con un Ultra Turrax IKA T25 digital a 60 °C (5), finalmente verter en las cajas Petri (figura 1).
- 1.4. Sellar las cajas Petri con película plástica y colocar dentro de bolsas de polipropileno para reducir la evaporación (6).
- 1.5. Incubar las cajas Petri a 60 °C durante 72 h.
- 1.6. Transcurrido el tiempo de incubación observar las cajas Petri en un transiluminador UV marca Bio Rad-2000 a una longitud de onda de 360 nm (5).
- 1.7. La formación de un halo naranja brillante alrededor de las colonias es indicativa de cepas puras con capacidad para sintetizar enzimas lipasas (figura 2).

RESULTADOS

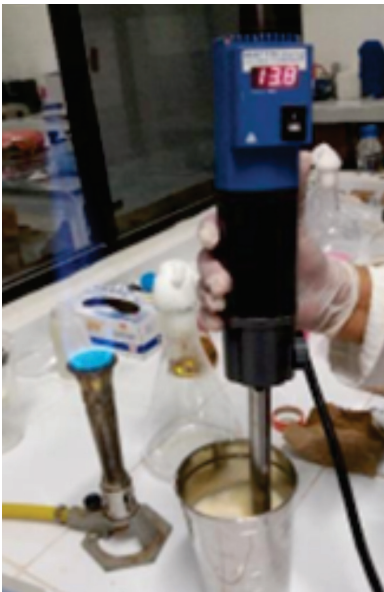


Figura 1. Incorporación del aceite de oliva y Rodamina, mezclado.

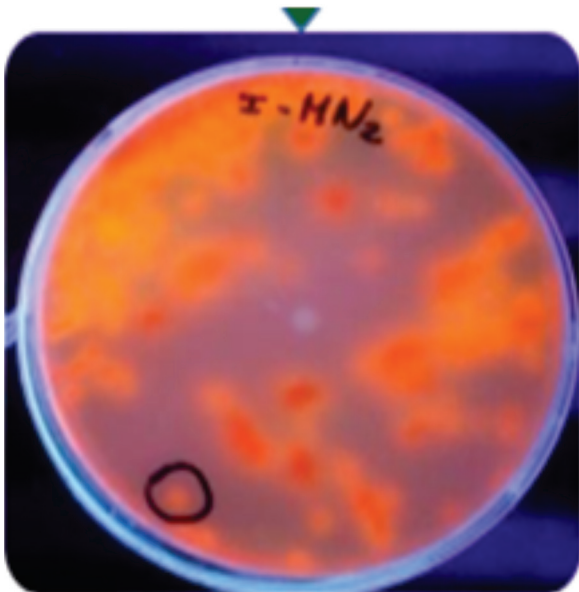


Figura 2. Aislamiento de microorganismos con actividad lipasa.

Uno de los *Geobacillus* ya fue evaluado en cuanto a su perfil de actividad en función del pH, temperatura y su capacidad para degradar diferentes tipos de aceites, por lo que en un futuro se pretende evaluar su capacidad para degradar diferentes residuos ricos en lípidos como son los residuos generados de industrias aceiteras del estado de Chiapas. Así como su capacidad para producir biosurfactantes que de pruebas preliminares se obtuvieron algunos indicios.

REFERENCIAS

1. Zeigler D. R. (2014). The *Geobacillus* paradox: Why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet?. *Microbiology*.160:1-11.<https://doi.org/10.1099/mic.0.071696-0>
2. Novik G., Savich V., Meerovskaya O. (2018). *Geobacillus* bacteria: Potential comercial applications in industry, bioremediation and bioenergy production. *Growing and Handling of Bacterial Cultures*. DOI:10.5772/intechopen.76053
3. Tuysuz E., Baltaci M. O., Ozkan H., Taskin M., Adiguzel A. (2019). Lipase production from thermophilic bacteria using waste frying

oil as substrate. *Journal of Technical Sciences*. 9(3):23-27. <https://doi.org/10.35354/tbed.510140>

4. Prasad M. P., Manjunath K. (2012). Effect of media and process parameters in the enhancement of extracellular lipase production by bacterial isolates from industrial effluents. *International Journal of Microbiology Research*. 4(8):308-311. <http://dx.doi.org/10.9735/0975-5276>
5. Kouker G., Jaeger K. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(1):211-213. DOI: 10.1128/AEM.53.1.211-213.1987
6. Martins M. L., Nunes de Souza A. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32:271-275. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000400003>

BIOPROSPECCIÓN DE ÓXIDO - REDUCTASAS EN HONGOS FILAMENTOSOS PARA LA REMOCIÓN DE COLORANTES EN MEDIO LÍQUIDO

Marina Gutiérrez Antón¹, Alejandro Santiago Hernández¹,
María Eugenia Hidalgo Lara^{1*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:
ehidalgo@cinvestav.mx

INTRODUCCIÓN

Los colorantes sintéticos son usados globalmente en numerosas industrias, tales como: textil, farmacéutica y cosméticos (1); sin embargo, estas industrias producen grandes cantidades de desechos de colorantes con contenido químico tóxico, algunos no bio-degradables y carcinogénicos, considerados como una amenaza para el medio ambiente y la salud humana (2). Los tratamientos biológicos son considerados para la remoción y detoxificación de colorantes, pues ahorran costos y son amigable con el medio ambiente; por ejemplo, el uso de hongos y su producción de enzimas involucradas en la degradación de colorantes por óxido-reducción (3). El objetivo de este método es la bioprospección de enzimas termofílicas fúngicas con actividad de óxido-reducción, tales como lacasa (Lac); ligninoperoxidasa, (LiP) y manganeso-peroxidasa (MnP), provenientes de aislados fúngicos termófilos, para su aplicación en la degradación de colorantes presentes en cuerpos de agua.

1. Gutiérrez-Antón Marina, Santiago-Hernández, Alejandro, Hidalgo-Lara María Eugenia. Laboratorio de Ingeniería de Proteínas. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, CP 07360, Cd. de México, México.

MATERIALES Y EQUIPO

MATERIAL / EQUIPO	CANTIDAD
■ Cajas Petri	3
■ Tubo Eppendorf	9
■ Tubo de polipropileno de 50 mL	2
■ Matraz Erlenmeyer de 250 mL	3
■ Pipeta de 5 mL, 1 mL y 100 μ L	1 c/u
■ Vaso de precipitado de 100 y 250 mL	5
■ Microfibra sintética p/filtro	1 pza
■ Espátula	2
■ Charolas para pesar	5
■ Autoclave	1
■ Potenciómetro	1
■ Incubadora rotatoria	1
■ Espectrofotómetro de UV-Vis con celda de cuarzo de 1 mL	1
■ Parrilla para agitación	1
■ Balanza analítica	1
■ Agitadores magnéticos	3
■ Centrífuga para tubos Eppendorf	1

Medio sólido para la producción de esporas (por litro)

REACTIVOS	CANTIDAD
■ Glucosa	10 g
■ Extracto de malta	10 g
■ Peptona	2 g
■ Extracto de Levadura	2 g
■ Asparagina	1 g
■ KH_2PO_4	2 g
■ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
■ Tiamina-HCl	1 mg
■ Agar	20 g
■ Esterilizar en autoclave	

MATERIAL BIOLÓGICO

- Inóculo de 1×10^6 de esporas/mL del hongo filamentoso

Colorantes

REACTIVOS	CANTIDAD
■ Rojo Congo (RC)	45 mg
■ Azul de Bromofenol (AB)	45 mg

Medio de cultivo líquido para la producción de enzimas (por litro)

REACTIVOS	CANTIDAD
■ Medio Basal III ^{ea} (ver Anexo A)	100 mL
■ Glucosa (10 %) ^{ef}	100 mL
■ Tiamina (100 mg/L) ^{ef}	10 mL
■ Tartrato de amonio ^{ea} (ver Anexo A)	25 mL
■ 2,2 - dimetilsuccinato, pH 4.2 ^{ea}	100 mL
■ Sol. de elementos traza ^{ef} (ver Anexo A)	60 mL
■ Esporas ($A_{650}=0.5$)	100 mL

^{ef} esterilizado por filtración

^{ea} esterilizado por autoclave

Soluciones amortiguadoras

SOLUCIONES	CANTIDAD
■ Glicina-HCl 100 mM pH 3.0 con ABTS 5 mM.	100 mL
■ Tartrato de sodio 50 mM pH 2.5, con AV (2 mM) y H ₂ O ₂ (0.4 mM)	100 mL
■ Malonato de sodio 50 mM pH 4.5, con MnSO ₄ (0.5 mM) y H ₂ O ₂ (0.5 mM)	100 mL

*Nota: Preparar la solución de H₂O₂ minutos antes de la toma de lectura.

METODOLOGÍA

1. Sembrar una muestra del hongo filamentoso termófilo de interés en tres placas Petri con medio de cultivo sólido (4), para la producción de esporas (~20 mL) e incubar de 30 a 45 °C por 7 días.
2. Colectar las esporas en agua destilada esterilizada (5 mL) en un tubo de polipropileno de 50 mL, y filtrar con microfibras sintéticas para homogenizar el inóculo. Medir la Absorbancia de una muestra de inóculo hasta obtener una lectura de $A_{650}=0.5$.
3. Inocular con 1×10^6 esporas/mL en los tres matraces Erlenmeyer conteniendo 100 mL de medio de cultivo líquido (Tien-Kirk, 1988, modificado), para la producción de enzimas.

4. Añadir al matraz 150 mg/L de Rojo Congo (RC) y Azul de Bromofenol (AB), por separado. Designar un matraz como control.
5. Incubar los tres matraces Erlenmeyer (45 °C; agitación orbital, 120 rpm, en oscuridad, 12 días).
6. Por intervalos regulares (cada 24 h), colectar una muestra de 1.5 mL del cultivo en un tubo Eppendorf de 2 mL y centrifugar a 5,000 rpm por 15 min para remover sólidos.
7. Recuperar el sobrenadante (~1.2 mL) en otro tubo Eppendorf de 2 mL limpio.
8. Medir la actividad enzimática y cantidad de colorante reducido.

a) Actividad enzimática.

1. Preparar una mezcla de reacción de volumen total de 1 mL (100 μ L de muestra enzimática) con el volumen de la solución amortiguadora y sustrato correspondiente (900 μ L) para cada enzima.

2. Verter la mezcla de reacción (1 mL) en una celda de cuarzo y leer en espectrofotómetro de UV-Vis la Absorbancia a λ_{max} requerida. Todas las actividades enzimáticas son expresadas en U/mL.

Lacasa (Lac): la actividad de Lac se determina utilizando ABTS (2,2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolina-(6)-ácido sulfónico]) como sustrato. La mezcla de reacción contiene ABTS (5 mM) en solución amortiguadora Glicina-HCl 100 mM a pH 3.0. La oxidación de ABTS se mide por el incremento en Absorbancia a 420 nm por la formación del radical ABTS de $\epsilon_{420} = 29\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

Lignino Peroxidasa (LiP): la actividad de LiP se determina usando alcohol veratrílico (AV) como sustrato. La mezcla de reacción contiene AV (2 mM) y H_2O_2 (0.4 mM) en solución amortiguadora de tartrato de sodio 50 mM a pH 2.5. La oxidación de AV se mide por el incremento en Absorbancia a 310 nm por la formación de veratraldehído de $\epsilon_{310} = 9\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

Manganeso Peroxidasa (MnP): la actividad de MnP se determina usando MnSO_4 0.5 mM y 0.5 mM de H_2O_2 en solución amortiguadora de malonato de sodio 50 mM a pH 4.5. La oxidación de Mn^{2+} se mide por el incremento en la Absorbancia a 270 nm por la formación de Mn^{3+} -malonato de $\epsilon_{270} = 11\,590\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

b) Análisis de decoloración por UV-Visible

1. Colocar 1 mL de sobrenadante en una celda de cuarzo y leer en espectrofotómetro de UV-Vis la Absorbancia a λ_{max} requerida. AB (A_{595}) y RC (A_{495}). La reducción de color se mide por la diferencia de Absorbancia entre las muestras analizadas y y , es expresada en porcentaje (%) siguiendo la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Decoloración} = \frac{A_o - A_t}{A_o} \times 100$$

Donde A_o es la Absorbancia medida, inmediatamente después de añadir el colorante al cultivo de fermentación líquida y A_t es la medida de Absorbancia después de cada intervalo de tiempo (cada 24 h).

9. Graficar y completar la tabla de resultados

Nota: Para el tratamiento de desechos ver Anexo B

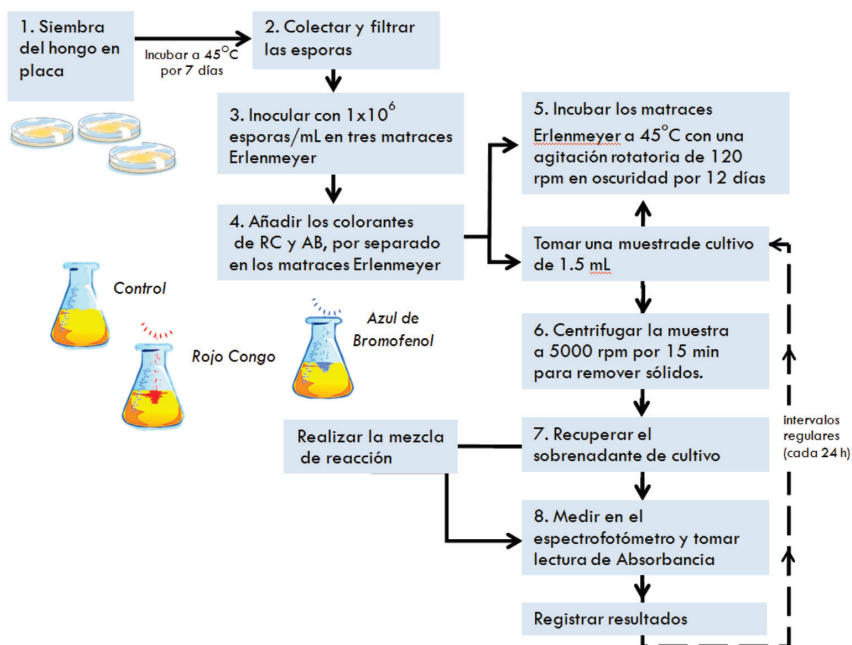


Figura 1. Estrategia experimental, para cuantificar actividad enzimática y decoloración.

REFERENCIAS

1. Levin L. N., Hernández C. E., Guillermo N. M, et al. (2019) Decolorization and detoxification of synthetic dyes by mexican strains of *Trametes* sp. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16:4610; doi:10.3390/ijerph16234610.
2. Hassaan, M. A.; El-Nemr, A. (2017) Health and environmental impacts of dyes: Mini Review. *AJESE* 1:64-67.
3. D'Souza D. T., Tiwari R., Sah A. K, and Raghukumar C. (2006) Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 38:504-511.
4. Tien M, Kirk K. T. (1988) Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol* 161:238-49. doi:10.1016/00766879(88)61025-1.

AGRADECIMIENTO

Al CONACYT por la beca de Doctorado otorgada a la M. en C. Marina Gutiérrez Antón del Programa de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biotecnología del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con número de CVU 332520.

SELECCIÓN FUNCIONAL DE ENZIMAS TERMOFÍLICAS CON POTENCIAL APLICACIÓN EN LA DEGRADACIÓN DE BIOMASA VEGETAL

Maribel Cayetano Cruz¹, Alejandro Santiago Hernández¹,
María Eugenia Hidalgo Lara^{1*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

ehidalgo@cinvestav.mx

INTRODUCCIÓN

La utilización de enzimas en la industria, como catalizadores biológicos, ha demostrado la disminución de los tiempos en los procesos industriales. Las enzimas hidrolíticas son las más empleadas en la industria y las que dominan las ventas a nivel mundial (1). En la actualidad ha surgido un creciente interés en el estudio de enzimas, principalmente hidrolasas, entre ellas las que se encargan de la degradación de la biomasa vegetal: celulasas, xilanasas. Una limitante de la utilización de enzimas en este proceso se debe a que son necesarias enzimas que trabajen eficientemente a altas temperaturas y diferentes condiciones de pH (2). En la búsqueda de celulasas con características adecuadas para la degradación de biomasa vegetal es útil poder realizar una selección funcional en medio sólido para poder analizar un gran número de microorganismos candidatos en poco tiempo y con esto, seleccionar aquellos que cumplan con las características adecuadas para el proceso industrial.

El ensayo funcional mediante tinción con Rojo Congo en medio sólido ha demostrado ventajas sobre otros métodos utilizados para detectar la actividad enzimática de enzimas hidrolíticas de interés industrial (3). El fundamento de este método consiste en que el colo-

1. Cayetano-Cruz Maribel, Santiago-Hernández Alejandro, Hidalgo-Lara María Eugenia. Laboratorio de Ingeniería de Proteínas, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV, Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, CP 07360, Cd. de México, México.

rante Rojo Congo forma una interacción estable con diferentes polisacáridos como la carboximetilcelulosa (CMC), carboximetil (1,3)- β -d-glucano (CMP) y con heteropolisacáridos como la xilano (4). Al ser degradado el sustrato por la enzima, el colorante ya no puede formar el complejo con el sustrato. Por esta razón, después de los lavados con cloruro de sodio (NaCl) se observan las regiones en donde no pudo ser retenido el colorante como halos de hidrólisis. Por lo que el método descrito a continuación permite, de manera rápida, detectar la actividad enzimática y al mismo tiempo determinar si dicha actividad enzimática prevalece a una temperatura más alta (45-70 °C). De tal forma, sería posible seleccionar bacterias, levaduras u hongos que secretan enzimas celulósicas termofílicas extracelulares de interés industrial, ya que estas enzimas estarían siendo seleccionadas por su capacidad de exhibir actividad catalítica a altas temperaturas.

MATERIALES Y EQUIPO

MATERIALES	NECESARIO
■ Cajas Petri de plástico estéril 90 x15 mm	4
■ Asa bacteriológica	2
■ Incubadora	2
■ Agitador de placas	1

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO

NECESARIO

■ Bacterias productoras de enzimas hidrolíticas de los géneros <i>Bacillus</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Micrococcus</i> , entre otros (colonias)	
■ Xilano o carboximetilcelulosa (CMC)	1
■ Agua destilada	1
■ Agar 2TY con xilano o CMC (peptona 1.6 % (w/v), extracto de levadura 1 % (w/v), cloruro de sodio NaCl 0.5 % (w/v), Agar 2 % (w/v), xilano 0.2 % (w/v) o CMC 0.5 % (w/v)	1
■ Solución Rojo Congo 1 % (w/v)	1
■ Solución cloruro de sodio NaCl 1 M	1

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. Preparar 4 cajas Petri con agar 2TY para el crecimiento de las bacterias productoras de las enzimas hidrolíticas. Preparar 100 mL de medio para las 4 cajas Petri de 90 mm de diámetro como sigue: pesar 1.6 g de peptona, 1 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl, 2 g de agar y 0.2 g de xilana para la detección de actividad de xilanasas.

Para detectar actividad de celulasa, utilizar CMC al 0.5 % (W/V) como sustrato. Pesar 1.6 g de peptona, 1 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl, 2 g de agar y 0.5 g de CMC para 100 mL de medio.

Verter 25 mL de medio en cada caja Petri y dejar solidificar.

2. En las cajas Petri con medio preparadas en el paso 1, sembrar por duplicado una asada de colonia de las bacterias a evaluar, colocando la biomasa sobre el agar sin extender. Se recomienda colocar máximo 30 colonias por cada caja Petri, para que haya buena separación entre ellas. Dejar una distancia de aproximadamente 1 cm entre colonias (figura 1).
3. La temperatura y tiempo de incubación se determinarán mediante estudios previos de acuerdo con la actividad enzimática de interés y las condiciones en las que deseamos estudiar la actividad de la enzima. Una vez determinadas las condiciones, incubar una caja Petri a la temperatura adecuada para detectar la actividad enzimática de interés e incubar el duplicado de la caja a una temperatura mayor (se recomienda probar incrementos de 5 a 10 °C).
NOTA: Para una xilanasas con temperatura óptima de actividad a 50 °C, incubar una caja a 50 °C por 1 h y el duplicado a 60 o 70 °C por 1 h.
4. Retirar las placas de la incubadora. En condiciones de no esterilidad, adicionar 3 mL de la solución de Rojo Congo 1 %, agitar por 3 min. Desechar el exceso en un recipiente debidamente etiquetado. Los residuos deben eliminarse de acuerdo con normativas locales.
5. Adicionar 3 mL de la solución de NaCl 1 M, agitar por 3 min. Desechar el exceso. Repetir los lavados las veces necesarias hasta revelar los halos de hidrólisis (se recomienda hacer 3 lavados).

6. Observar las colonias que presentan un halo de hidrólisis en la caja incubada a la temperatura más alta. Un método para estimar la colonia que produce una enzima más activa es medir el diámetro del halo de hidrólisis, el cual será igual al diámetro de la colonia con su halo menos el diámetro de la colonia.

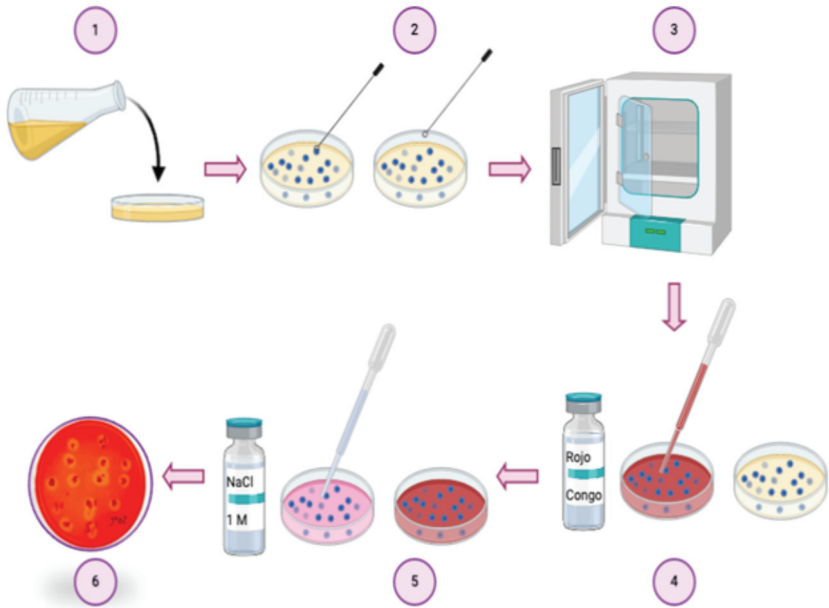


Figura 1. Esquema de procedimientos para la selección de enzimas por medio del ensayo funcional mediante tinción con Rojo Congo. Los números representan cada uno de los pasos de la descripción del método. Creado con BioRender.com.

RESULTADOS

Las colonias que presentan un halo de hidrólisis en la caja incubada a una mayor temperatura están produciendo una enzima que es activa a una temperatura más alta. De esta forma se pueden incubar cajas Petri inoculadas con las colonias a mayores temperaturas hasta seleccionar aquellas colonias que producen las enzimas más estables (en este caso, estables y activas a una mayor temperatura).

Para ejemplificar los resultados esperados, presentaremos el caso del escrutinio de una biblioteca en *Escherichia coli* expresando variantes del gen (gen con mutaciones aleatorias) de una xilanasa. Una caja fue incubada a 50 °C, temperatura óptima a la que trabaja

la xilanasa silvestre y a 70 °C que es la temperatura en la que la xilanasa silvestre (control) pierde la actividad. Lo que se buscó fue alguna colonia cuya xilanasa producida presentara actividad xilanolítica a una mayor temperatura.

En la figura 2 se muestra un esquema representativo con los posibles resultados esperados. En a se observan halos de hidrólisis en las colonias sembradas en la caja Petri. En b se muestran las mismas colonias que en a pero esta placa se sometió a una temperatura más alta.

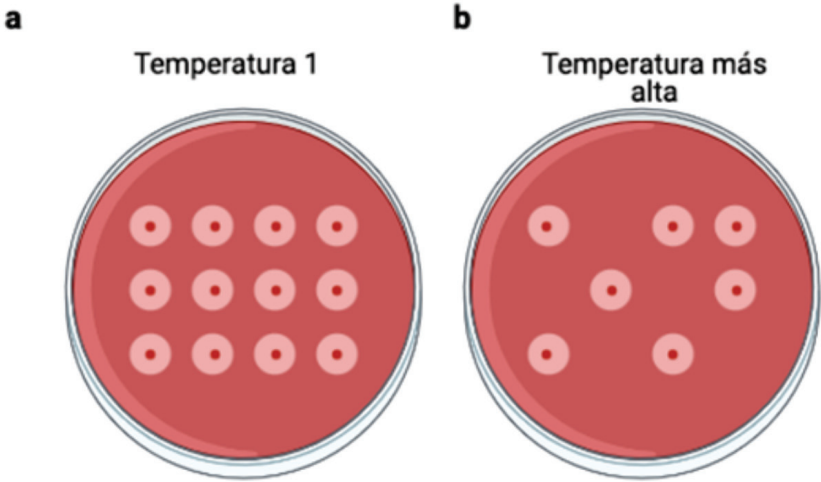


Figura 2. Esquema representativo de resultados esperados. Tinción con Rojo Congo. a) Placa incubada a temperatura óptima de la actividad enzimática y b) placa incubada a temperatura más alta. Se observan halos de hidrólisis de clonas con actividad xilanolítica a cada temperatura (círculos en color más claro).

De esta forma, las colonias que presentan un halo de hidrólisis en las placas incubadas a la temperatura más altas secretan una enzima estable a una mayor temperatura en comparación con aquellas colonias que no presentan el halo de hidrólisis.

Por tanto, el método aquí descrito permite seleccionar funcionalmente microorganismos, bacterias, levaduras u hongos, que secretan celulasas o xilanasas termofílicas, las cuales son catalíticamente activas a altas temperaturas, en el rango de 50 a 80 °C.

REFERENCIAS

1. Del Monte-Martínez A, Cutiño-Avila B V, González-Bacerio JO, González-Abradelo D, Figueroa Espí V, Cao-Vásquez R. (2013) Aplicación de enzimas en biocatálisis. Perspectivas de la utilización de nanoarreglos como biocatalizadores. *Rev. Cuba. Ciencias biológicas* 2:7–23
2. Viñals-Verde M, Bell-García A, Michelena-Álvarez G, Ramil-Mesa M. (2012) Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica ICIDCA. ICIDCA. *Sobre los Deriv. la Caña Azúcar.* 46(1):7–16
3. Meddeb-Mouelhi F, Moisan JK, Beauregard M. (2014) A comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulase and xylanase activity. *Enzyme Microb. Technol.* 66:16-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.07.004>
4. Teather RM, Wood PJ. (1982) Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(4):777–80

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca de Doctorado otorgada a la M. en C. Maribel Emilia Cayetano Cruz del Programa de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biotecnología del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con número de CVU 329997.

4

**PROSPECCIÓN DE ORGANISMOS
EXTREMÓFILOS, DE SUS GENES, PROTEÍNAS U
OTROS PRODUCTOS PARA SU UTILIZACIÓN EN
DIFERENTES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS:**

4.2 INDUSTRIA DE DETERGENTES

DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE EXTRACTOS PROTEOLÍTICOS EN SOLUCIONES DE DETERGENTES DE LAVANDERÍA: SOLVENTES, TENSOACTIVOS, Y AGENTES OXIDANTES

Lilia Arely Prado Barragán¹, Juan Carlos Coronado Corral^{2*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

juan.coronado47095@potros.itson.edu.mx

INTRODUCCIÓN

El mercado internacional de enzimas está dominado por la venta de proteasas microbianas alcalinas, las cuales son la clave del éxito en limpieza de los detergentes para lavandería biológicos. Los extractos proteolíticos se adicionan como parte de la formulación de los detergentes de lavandería doméstica y son responsables de la catálisis de la hidrólisis del material proteico que conforma las manchas de mugre o suciedad. Dentro de las principales características de las proteasas se encuentra su estabilidad frente al resto de los componentes presentes en la formulación (surfactantes, polifosfatos, silicatos, carbonatos, perboratos, sulfato de sodio, abrillantadores, blanqueadores; entre otros); así como a temperaturas elevadas ($> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$), mantener actividad en amplio rango de pH (7 - 11) y períodos cortos de agitación (1, 2). Además, deben ser efectivas a bajas concentraciones y ser compatibles con compuestos oxidantes y sequestrantes iónicos (3, 4). La proteasa alcalina compatible con detergentes de *Bacillus* sp. APP-07, aislada de suelo de lavandería de Solapur, Maharashtra, India mostró excelente estabilidad y compatibilidad con detergentes, surfactantes, blanqueadores y agentes oxidantes (5).

1. Departamento de Biotecnología, Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana. Avenida San Rafael Atlixco No. 186, Colonia Vicentina CP 09340 Iztapalapa, CDMX.
2. Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 Sur, Col. Centro. CP 85000, Ciudad Obregón, Sonora.

En este trabajo se describe un protocolo para la determinación de la estabilidad de extractos proteolíticos en soluciones de detergentes de lavandería: solventes, tensoactivos, y agentes oxidantes.

MATERIALES Y REACTIVOS:

MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

- Tubos de ensaye (10x 100 mm)
- Micropipeta de 1000 μL
- Micropipeta de 200 μL
- Micropipeta 20 μL
- Microtubos 2000 μL
- Gradilla
- Termómetro
- Baño de agua con recirculación de agua y temperatura controlada
- Vórtex
- Microcentrífuga
- Papel filtro (Whatman No.1)

REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA MÉTODO DE LOWRY

- Agua destilada
- Buffer fosfatos 50 mM
- Na_2CO_3 2% (p/v)
- NaOH 0.1% (p/v)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- Reactivo Folin-Ciocalteu

TENSOACTIVOS

- Tween 80
- Triton X-100

REACTIVOS PARA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

- Ácido tricloroacético al 5%
- CaCl_2 5 mM
- Caseína Hammerstain® 1% (p/v)
- Ácido tricloroacético al 5 % (p/v)
- Tirosina
- Extracto proteolítico (proteasa)

AGENTE OXIDANTE

- H_2O_2

SOLVENTES

- Metanol
- Etanol
- Acetona
- 2-butanol
- Isopropanol
- Acetonitrilo

MÉTODO

Estabilidad proteolítica en presencia de solventes, tensoactivos y oxidantes

1. Pre-incubara 60 °C (10 min) por separado el extracto enzimático (EE), y los agentes (A), como: disolventes orgánicos (20 % v/v), tensoactivos (0.1 % v/v) y agentes oxidantes (1.0 % v/v).
2. Mezclar el extracto enzimático con cada una de las soluciones a una proporción 1:1 agitar e incubar a 60 °C durante 45 min (6). Determinación de actividad proteolítica residual.
3. Adicionar 50 µL de la mezcla de reacción con 750 µL de una solución de caseína Hammerstein ® al 1 % (p/v) preparada en solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7). Agitar e incubar a 60 °C por 10 min.
4. Detener la reacción con la adición de 1,200 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 5 %.
5. Centrifugar las muestras a 10,000 g por 10 min y filtrar a través de papel filtro Whatman No. 1 (7).

Determinación de proteína soluble por el método de Lowry.

- Mezclar 200 μL del filtrado con 1000 μL de reactivo A [(Na_2CO_3 al 2 % en NaOH 0.1 N) y ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5 %, proporción 50:1 mL)] y 100 μL de reactivo B [$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ al 1 %]. Agitar la mezcla de reacción por 5 s (vórtex).
- Dejar reposar 10 min a temperatura ambiente.
- Adicionar 100 μL de reactivo Folin-Ciocalteu 1N.
- Agitar por 5 s (vórtex).
- Reposar en la oscuridad por 30 min a temperatura ambiente.
- Medir la Absorbancia a 750 nm (7).
- Calcular la concentración de la actividad proteolítica por interpolación a una curva patrón de tirosina (8). La curva patrón se elabora de acuerdo a la siguiente tabla:

NÚMERO DE TUBO	1	2	3	4	5	6
CONCENTRACIÓN DE TIROSINA (mg/mL)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0
SOLUCIÓN DE TIROSINA (mL)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0
AGUA DESTILADA (mL)	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0

- Se considera como el 100 % de actividad proteolítica a la actividad generada por el extracto tratado de la manera descrita a partir del numeral 3. La actividad residual o porcentaje de estabilidad (%) se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad residual} = \left(\frac{\text{Actividad proteolítica EE} - A}{\text{Actividad proteolítica EE}} \right) \times 100$$

La tolerancia y estabilidad de las enzimas extremas son candidatas prometedoras para las diversas aplicaciones potenciales en los detergentes para lavandería. Además, dadas estas características de compatibilidad con solventes, agentes oxidantes y surfactantes. Los extractos enzimáticos podrían servir para varias aplicaciones posibles en las industrias del cuero y otros procesos industriales rigurosos.

REFERENCIAS

- Masse FWJL, van Tilburg R. J Am Oil Chem Soc (1983). 60:1672-75.
- Kumar D., Savitri, N. Thakur, R. Verma and T. C. Bhalla, Res J Microbiol, (2008). 3: 661-672.

3. Joo, H.-S., Kumar, C. G. Park, G - C., Paik S. R. and Change C. - S. *J Appl Microbiol* (2003). 95: 267–272.
4. Banika R. M. and Prakash M. *Microbiol Res.* (2004). 159(2): 135-140.
5. Shaikh, I. K., Dixit, P. P., & Shaikh, T. M. (2018). *J Genet EngBio-technol.* 16(2): 273-279.
6. Beena, A. K., Geevarghese, P. I. and Jayavardanan, K. K. *Am J Food Technol*, (2012). 7(2): 89-95.
7. Johnvesly B., Manjunath B. R., Naik G. R. *Bioresour. Technol.* (2002).82: 61-64.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall, R. L. *J Biol Chem.* (1951). 193: 265–273.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a PROFAPI por el apoyo en esta investigación.

DETERMINACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD DEL EXTRACTO PROTEOLÍTICO CRUDO DE UNA BACTERIA HALÓFILA CON FORMULACIONES DE DETERGENTES COMERCIALES

María Isabel Estrada Alvarado¹, Luis Alberto Cira Chávez^{1*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

luis.cira@itson.edu.mx

INTRODUCCIÓN

Las bacterias secretan proteasas extracelulares para hidrolizar proteínas grandes en moléculas más pequeñas facilitando la absorción por la célula. Las proteasas son una de las enzimas comerciales más importantes utilizadas, con aplicaciones en el procesamiento de alimentos, cuero, formulación de detergentes comerciales, recuperación de plata, industria farmacéutica, síntesis de péptidos, procesamiento de proteínas, tratamiento de residuos y formulaciones plaguicidas (1). Las proteasas alcalinas de bacterias halófilas se utilizan esencialmente en la industria de los detergentes y no deben tener una estructura pura (2). Las enzimas se utilizan en cantidades muy pequeñas en las preparaciones de detergentes para aumentar la capacidad limpiadora de las mismas (3). En el rendimiento de una enzima es fundamental la compatibilidad con los ingredientes del mismo, el tipo de manchas a eliminar, la dureza del agua, la temperatura de lavado y el procedimiento (4). El objetivo del método es determinar la compatibilidad de extractos enzimáticos con actividad proteolítica de una bacteria halófila con detergentes comerciales.

1. Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 Sur, col. Centro. CP 85000, Ciudad Obregón, Sonora.

MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

- Tubos de ensaye (10 x 100 mm)
- Micropipeta de 1000 μL
- Micropipeta de 200 μL
- Micropipeta 20 μL
- Microtubos 2000 μL
- Gradilla
- Baño de agua con recirculación de agua y temperatura controlada
- Vórtex
- Microcentrífuga
- Papel filtro (Whatman No.1)

Reactivos para determinación de actividad proteolítica

- Ácido tricloacético al 5 %
- CaCl_2 5 mM
- Caseína Hammerstein® 1 % (p/v)
- Ácido tricloroacético al 5 % (p/v)
- Tirosina

Detergentes en polvo

- Ariel, Ace y Tide (Procter Gamble, México)
- Viva, 123 y Persil (Henkel, México)
- Carisma (La Corona, México)

Detergentes líquidos

- Ariel, Tide, Gain y Ace (Procter Gamble, México)
- Viva y Persil (Henkel, México)
- Arm & Hammer (Arm & Hammer, EE.UU.)
- Great Value, Vide

Extracto enzimático con actividad proteolítica obtenido de la bacteria halófila

REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA MÉTODO DE LOWRY

- Reactivo A
- Agua destilada
- Buffer fosfatos 50 mM
- Na_2CO_3 2 % (p/v)
- NaOH 0.1 % (p/v)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- Reactivo B
- $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- Reactivo C
- Reactivo Folin- Ciocalteu (1N)

MÉTODO

Inactivación de enzimas endógenas de los detergentes.

1. Diluir cada detergente en agua destilada; los detergentes sólidos a 7 mg/ml y líquidos al 1 % v/v, para simular las dosis en condiciones de lavado reales reportado por Hmidetet al (2009) (5).
2. Inactivar las proteasas endógenas de los detergentes sólidos y líquidos incubándolos a 70 °C en baño de agua durante 1 h, antes de la adición del extracto enzimático (EED).

Determinación de actividad proteolítica residual.

1. Mezclar 50 µL del extracto enzimático (EED con 750 µL de una solución de caseína Hammerstain® al 1 % (p/v) preparada en solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7), agitar e incubar a 60 °C por 10 min. El blanco consiste en la misma mezcla de reacción utilizando 50 µL de agua destilada en lugar del extracto enzimático.
2. Detener la reacción con la adición de 1200 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 5 %.
3. Se recomienda realizar la prueba por triplicado. Centrifugar las muestras a 10,000 g por 10 min y filtrar a través de papel filtro Whatman No.1 (6).

Determinación de proteína soluble por el método de Lowry.

1. Mezclar 200 μL del filtrado con 1000 μL de reactivo A [$(\text{Na}_2\text{CO}_3$ al 2 % en NaOH 0.1N) y $(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5 %, proporción 50:1 mL) y 100 μL de reactivo B [$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ al 1 %].
2. Agitar la mezcla de reacción por 5 segundos (vórtex).
3. Dejar reposar 10 min a temperatura ambiente.
4. Adicionar 100 μL de reactivo Folin-Ciocalteu 1N.
5. Agitar por 5 s (vórtex).
6. Reposar en la oscuridad por 30 min a temperatura ambiente.
7. Medir la Absorbancia a 750 nm (7).
8. Calcular la concentración de la actividad proteolítica por interpolación a una curva patrón de tirosina (7). La curva patrón se elabora de acuerdo a la siguiente tabla:

Número de tubo	1	2	3	4	5	6
Concentración de tirosina (mg/mL)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0
Solución de tirosina (mL)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0
Agua destilada (mL)	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Se entiende que la suma es:	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

9. Se considera como el 100 % de actividad proteolítica a la actividad generada por el extracto tratado de la manera descrita a partir del numeral 3. La actividad residual o porcentaje de estabilidad (%) se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad residual} = \left(\frac{\text{Actividad del extracto enzimático con detergente EED}}{\text{Actividad del extracto enzimático EE}} \right) \times 100$$

10. La compatibilidad del extracto proteolítico está directamente relacionada con la actividad residual. A mayor actividad residual mayor será la compatibilidad del extracto enzimático con el detergente, es decir, el extracto enzimático es candidato para utilizarse en la formulación del detergente.

RESULTADOS

DETERGENTE	ACTIVIDAD RESIDUAL (%)	COMPATIBILIDAD

REFERENCIAS

1. Thaz C. J. Jayaraman G. (2014) Stability and Detergent Compatibility of a predominantly β -Sheet Serine Protease from Halotolerant *B. aquimaris* VITP4 Strain. *Appl Biochem Biotechnol* 172:687–700. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0524-4>
2. Ghareib, M.; Fawzi, E. M.; Aldossary, N. A. (2012) Thermostable alkaline protease producing mycoflora from the soils of the Eastern Province of Saudi Arabia. *Wulfenia* 1912, 95-111
3. Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC (2002) Industrial enzymes applications. *Curr Opin Biotechnol* 13 (4): 345–351. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00328-2)
4. Adinarayana K, Ellaiah P, Prasad DS (2003) Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS Pharm SciTech* 4(4):1–9. <https://doi.org/10.1208/pt040456>
5. Hmidet, N., Ali, N. E. H., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S. K., & Nasri, M. (2009). Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochem Eng J*, 47(1-3), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.005>
6. Johnvesly B., Manjunath B. R., Naik G. R. (2002). Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline from a thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. *Bioresour. Technol.* 82:61-64. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00147-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00147-X)
7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*; 193:265–273.

4

**PROSPECCIÓN DE ORGANISMOS
EXTREMÓFILOS, DE SUS GENES, PROTEÍNAS U
OTROS PRODUCTOS PARA SU UTILIZACIÓN EN
DIFERENTES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS:**

4.3 BIOPELÍCULAS

ESTUDIO DE BIOPELÍCULAS FOTOSÍNTÉTICAS SUBAÉREAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Mónica Ramírez Vázquez¹, María Laura González Reséndiz²,
Hilda Patricia León Tejera^{3*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:
UNAMhlt@ciencias.unam.mx

INTRODUCCIÓN

El fundamento de la microscopía confocal es el uso de la fluorescencia, esta técnica no invasiva es útil para obtener imágenes de alta resolución y reconstrucciones tridimensionales; se generan imágenes punto a punto de cada plano focal de la preparación para su posterior reconstrucción digital en una imagen única. Un microscopio confocal emplea como fuente de iluminación rayos láser de distintas longitudes de onda, un láser puntual incide sobre la muestra, la cual absorberá la energía y emitirá luz propia que pasará por un diafragma (pinhole) y será amplificada por detectores obteniendo una serie de imágenes en distintos planos focales (1). Para el estudio de cianobacterias y algas, en particular para aquellas que viven en condiciones extremas como son los ambientes subaéreos expuestos a desecación, altas temperaturas y radiación UV, esta técnica es una herramienta muy valiosa; ya que es posible llevar a cabo la exploración de los patrones de distribución de las células, colonias u organismos dentro de una comunidad sobre un determinado sustrato o bien, estudiar el estado fisiológico y la respuesta de los organismos a un ambiente extremo, pudiendo estimar y reconocer pigmentos naturales (clorofilas, ficobilinas) o usar fluorocromos para resaltar sustancias poliméricas extracelulares (EPS), material genético u organelos de interés si el objeto de estudio es eucarionte. Además, se pueden realizar protocolos de inmunomarcajes de proteínas específicas involucradas en procesos de respuesta a estrés ambiental. El

1. Unidad de Microscopía Avanzada, REMAv-INECOL monica.ramirez@inecol.mx
2. Depto. Procesos y Tecnología, UAM-C mlauragonzalez@ciencias.unam.mx
3. Lab. Ficología Marina, Facultad de Ciencias.

microscopio confocal permite realizar secciones ópticas horizontales o sagitales de biopelículas intactas, vivas de hasta 400 μm de grosor, para la caracterización y reconstrucción de su estructura tridimensional (2). La combinación de esta técnica con el análisis digital de las imágenes permite determinar y discriminar el grosor de la biopelícula, el material inorgánico y la fluorescencia natural de los pigmentos fotosintéticos o de otras moléculas, las interacciones entre los organismos y las superficies a las cuales se adhieren. También es posible analizar la distribución de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y la viabilidad de los microorganismos presentes (3, 4).

MATERIALES Y EQUIPO

Preparación de las muestras.

Es preferible la observación del material recién recolectado, sin embargo, si se deben observar gran número de muestras o bien retrasar su observación, es preferible fijar una parte para preservar la integridad y arquitectura del material. Para evitar la pérdida de la fluorescencia del material se recomienda una solución de paraformaldehído al 3 % en tampón fosfato (PBS) 0.1 M y Sacarosa 60 mM, mantenido a 4 °C (2, 4).

Montaje de las muestras.

Las muestras estudiadas pueden presentar un problema adicional para su observación en el microscopio confocal; se trata de substratos rígidos, opacos y gruesos, con los que no siempre es posible realizar el montaje convencional entre porta y cubreobjetos y preservar de forma óptima la estructura tridimensional de la muestra. Para este caso las muestras se montan en placas MatTek (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA), a las que se añaden pequeñas cantidades de PBS para evitar su deshidratación durante la observación al microscopio.

Observación de las muestras y captación de imágenes.

Para la observación de las muestras cuyas imágenes se incluyen, se usa un microscopio confocal invertido espectral Leica TCS-SP8+STED (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany), equipado con cuatro rayos láser y tres canales de detección ó un equipo con características similares. Se sugiere usar objetivos Plan Apocromáticos: 40x (1.25 AN) y 63x de aceite (1.4 AN).

La fluorescencia natural (autofluorescencia) de los pigmentos (clorofilas y ficobiliproteínas) es utilizada como marcador para conocer la distribución de las microalgas y las cianobacterias dentro de las biopelículas, permitiendo visualizar la morfología, la presencia o no de una cubierta o vaina de EPS (exopolisacáridos) y el estado de los microorganismos. En los casos de requerir resaltar las vainas, se recurre al uso de marcadores como la Lectina Concanavalina A (Con-A Alexa-Fluor 488, Molecular Probes, Inc, Eugene, OR) o WGA para marcar los polisacáridos extracelulares (EPS o mucílago) que forman parte de la matriz de la biopelícula (2,4). El DNA, tanto en células vivas como muertas, se puede observar con el fluorocromo Hoechst 33258 (Molecular Probes, Inc, Eugene, OR).

MATERIALES

NECESARIO

■ Placas de cultivo celular (fondo de cristal) MatTeck	1
■ Portaobjetos	1
■ Cubreobjetos	1
■ Pinzas de punta fina	2
■ Papel aluminio	1 hoja
■ Caja Petri de vidrio	1
■ Tubos Falcon de 5 ml	2

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO

NECESARIO

■ Agua destilada	200 ml
■ Tampón de fosfatos salino (1X) (PBS) (Catálogo EMS. Ref. RT-19344-10)	500 ml
■ Marcadores (ConcA, WGA, Hoechst)	30 μ L
■ Solución de paraformaldehído al 3% en tampón fosfato (PBS) 0.1M+Sacarosa 60 mM	200 ml

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Detección de sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

1. Colocar una porción de la biopelícula obtenida en campo (1-10 mm²) en un tubo Falcón de 5 ml la solución fijadora paraformaldehído (PF 3 % en PBS 0.1 M y Sacarosa 60 mM) por un mínimo de 6-8 h y mantener en refrigeración (4 °C) hasta su observación.

2. Lavar la muestra 3 a 4 veces con el tampón de fosfato salino (PBS) 0.1 M / pH 7.4, para retirar el fijador (agitar y decantar).
3. Para el marcaje de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) se añade de 10 a 30 μ L Concanavalina (ConA) 0.8 mM o WGA durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad cubriendo con papel aluminio.
4. Transcurrido el tiempo, eliminar el marcador (ConA o WGA) y lavar con PBS de 3 a 4 veces.
5. Colocar el material en placas de cultivo con fondo de cristal (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) o en Portaobjetos con cubreobjetos y observar en un microscopio confocal (invertido).

Detección de ácidos nucleicos.

6. Este marcaje se puede añadir directamente a la muestra previamente marcada para visualizar los EPS.
7. Añadir 30 μ l de Hoechst 33258 (Molecular Probes, Inc, Eugene, OR).

Observación y condiciones del equipo. (Nota: cabe mencionar que estas condiciones pueden variar dependiendo de la marca y el modelo de equipo; así como la potencia de los rayos láser). La autofluorescencia de clorofila a fue observada en el canal azul (excitación=594 nm, emisión=670-790 nm) y en el canal rojo las ficobilinas (excitación=561 nm, emisión=575-625 nm). La línea 488 nm de láser Ar fue empleada en el canal verde para observar los EPS marcados con ConA (emisión=500-550 nm) y en el canal gris para la observación de la reflexión (emisión=480-495 nm).

RESULTADOS

Esta técnica facilita visualizar la arquitectura (estructura y grosor) y los distintos componentes de una biopelícula; cada componente y su arreglo celular (pared, vaina, arreglo tilacoidal, etc.) emitirá en una longitud de onda específicas, se registrará la señal y se podrá elegir un pseudocolor diferente para cada uno (figura 1). Se pueden realizar marcajes adicionales (fluorocromos específicos) con el fin de evidenciar otros componentes o sus estructuras, como son las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (figura 2). Con el uso de software para análisis digital se facilita observar el grosor de la

biopelícula, su relación con el sustrato colonizado y la distribución de los EPS (figura 3). Finalmente, si el microscopio cuenta con la función Lambda se pueden reconocer los principales picos de emisión de los pigmentos presentes de uno o distintos individuos dentro de la biopelícula y evaluar su estado fisiológico (figura 4).

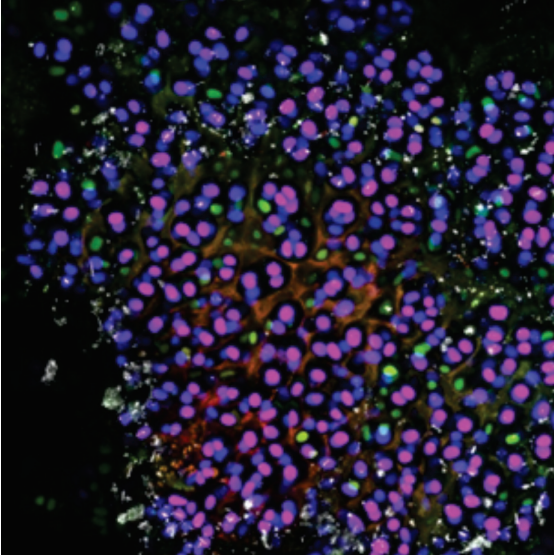


Figura 1. Reconstrucción tridimensional (3D) de biopelícula subaérea de *Gloeotheca* sp. (Cianobacteria). Registro de clorofila a (azul), ficobilinas (rojo), chl a+FB (rosa), EPS (verde), sustrato (blanco-gris).

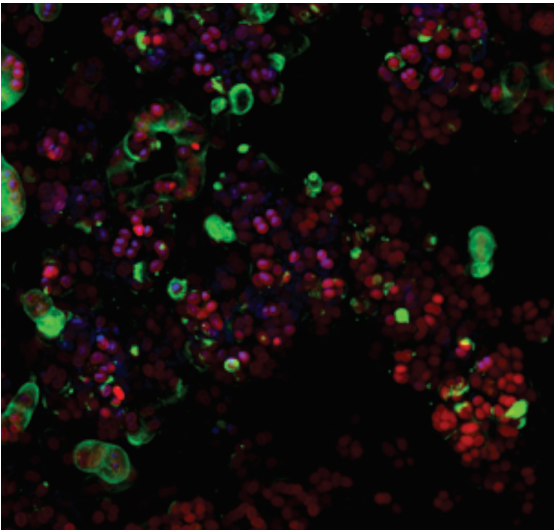


Figura 2. Reconstrucción tridimensional (3D) de biopelícula subaérea de *Nostoc* cf. *commune*. Registro de clorofila a (azul), ficobilinas(rojo), chl a+FB (rosa), EPS (verde).

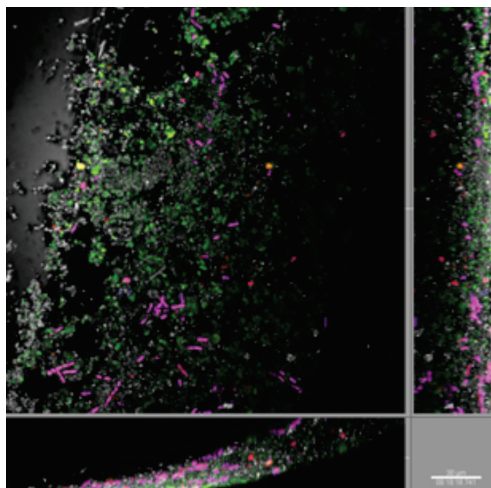


Figura 3. Máxima proyección; sección ortogonal de una biopelícula subaérea. Se observa clorofila *a* (azul), ficobilinas (rojo), chl+FB (rosa), EPS (verde), sustrato (blanco-gris). Los cortes sagitales permiten visualizar la localización de los organismos en las superficies que habitan, analizar el grosor de la biopelícula y la distribución de las sustancias poliméricas extracelulares.

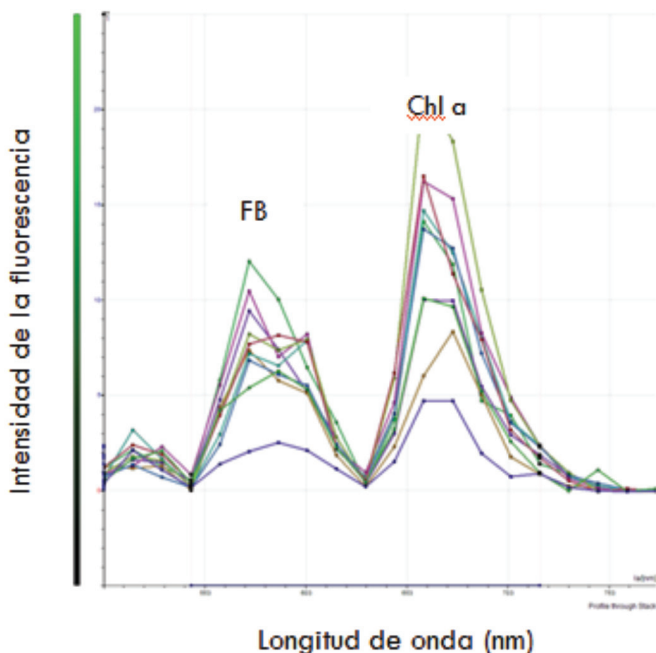


Figura 4. Perfil espectral proveniente de una exploración λ_{exc} 488 nm. Se observan dos picos significativos de emisión de autofluorescencia; el primer pico emitido por las ficobilinas (562-620 nm) y el segundo por *a* Chla (665-760nm). Estos datos permiten evaluar el estado fisiológico del espécimen.

1. Hernández-Mariné M., Clavero E. & Roldán M. (2004). Microscopy methods applied to research on cyanobacteria. *Limnetica* 23(1-2): 179-186.
2. Roldán M., Thomas F., Castel S., Quesada A. & Hernández-Mariné M. (2004). Noninvasive pigment identification in single cells from living phototrophic biofilms by confocal imaging spectrofluorometry. *Appl Environ Microbiol* 70:3745-3750.
3. Neu T. R., Woelfl S. & Lawrence J. R. (2004). Three-dimensional of photo-autotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy (single-photon and two-photon excitation). *J Microbiol Methods* 56:161-172.
4. Ramírez M., Hernández-Mariné M., Novelo E. & Roldán M. (2010). Cyanobacteria-containing biofilms from a Mayan monument in Palenque, Mexico. *Biofouling* 26:399-409.

4

**PROSPECCIÓN DE ORGANISMOS
EXTREMÓFILOS, DE SUS GENES, PROTEÍNAS U
OTROS PRODUCTOS PARA SU UTILIZACIÓN EN
DIFERENTES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS:**

4.4 BIORREMEDIACIÓN

SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO INORGÁNICO POR BACTERIAS AISLADAS DE JALES MINEROS

Brenda Celeste Rodríguez Chacón¹, Diana Iveth Orbe Díaz²,
Angela Forero Forero^{3*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

avforerof@ciencias.unam.mx

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son muy sensibles y responden rápidamente a los cambios en el medio, por lo que han sido consideradas como eficientes bioindicadores de la calidad del suelo. Las asociaciones planta-bacteria pueden ser utilizadas para mejorar la producción de biomasa y la rehabilitación de suelos contaminados con metales, utilizando tecnologías como la fitorremediación y fitominería. Las Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV's) realizan dos mecanismos que benefician a la planta, los indirectos en los que destacan la producción de enzimas líticas y sideróforos, y los mecanismos directos en donde se encuentran la producción de fitohormonas, fijación de nitrógeno y solubilización de fósforo inorgánico, siendo este el segundo más requerido, después del nitrógeno. A pesar de ser abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas, los niveles de fósforo en el suelo se encuentran en concentraciones que van de 200 a 5000 mg fósforo / kg suelo. El fósforo insoluble se encuentra en forma mineral como apatita, hidroxapatita y oxiapatita, de esta manera no está disponible para favorecer el crecimiento de las

1. Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, 15179773@uagro.mx
2. Centro de Ciencias de Desarrollo Regional, Universidad Autónoma de Guerrero, Ivethod11@gmail.com
3. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, avforerof@ciencias.unam.mx

plantas; sin embargo, es convertido a formas orgánicas tales como inositol fosfato, fosfomonoésteres, fosfodiésteres y fosfotriésteres por las BPCV's (1,2,3).

Los microorganismos solubilizadores de fosfato son reconocidos promotores de crecimiento vegetal. Estas poblaciones microbianas realizan una actividad importante, ya que en muchos suelos se encuentran grandes reservas de fósforo insoluble, que no pueden ser asimilados por las plantas. Los microorganismos solubilizadores de fosfato usan diferentes mecanismos de solubilización, como la producción de ácidos orgánicos, que solubilizan dichos fosfatos insolubles en la zona rizosférica. Los fosfatos solubles son absorbidos por la planta, lo cual mejora su crecimiento y productividad. Por lo anterior, el empleo de bacterias con la capacidad de solubilizar el fósforo contenido en jales mineros ayudaría a diseñar una estrategia integral para biorremediar estos sitios contaminados (4,5).

El reconocimiento de bacterias poliextremas capaces de solubilizar fósforo ofrece una alternativa para implementar estrategias de fitorremediación asistidas con bacterias que ayuden a recuperar sitios contaminados con xenobióticos.

MATERIALES Y EQUIPO

SOLUCIONES Y REACTIVOS	NECESARIO
■ Agua destilada	1000 ml
■ Glucosa	10 g
■ $\text{Ca}_3(\text{PO})_4$	5 g
■ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5 g
■ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3 g
■ KCL	0.2 g
■ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1 g
■ Azul de bromofenol	0.025 g
■ Agar con pH 7	17 g/L

Tabla 1. Preparación de medio NBRIP (Medio de fosfatos del National Botanical Research Institute) (6).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Solubilización de fosfatos inorgánicos

1. Mezclar los reactivos glucosa, $\text{Ca}_3(\text{PO})_4$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, azul de bromofenol, agar con pH 7 y agua destilada en un matraz de 1,000 mL y esterilizar en autoclave a 15 Lb durante 15 min (figura 1).
2. En esterilidad, con mechero o campana de flujo laminar, vaciar 20 mL de medio por caja Petri, dejar solidificar.
3. Tomar una asada del inóculo o muestra utilizando el asa bacteriológica e inocular por picadura en el medio NBRIP e incubar 96 h a 30 °C (figura2).
4. Después del tiempo de incubación medir el diámetro de las colonias y el diámetro de los halos.
5. Calcular el índice de solubilización (IS) con la fórmula siguiente:

$$\text{Fórmula: IS} = \text{Dh} / \text{Dc}$$

Donde Dc es Diámetro de la colonia y Dh es el diámetro del halo.



Figura 1. Preparación de medio NBRIP. Fuente los autores.

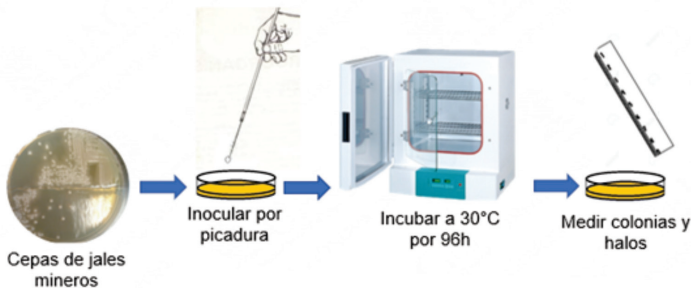


Figura 2. Solubilización de fosfatos. Fuente los autores.

RESULTADOS

Se considera un resultado positivo cuando hay formación de un halo transparente alrededor de la colonia (figura 3).

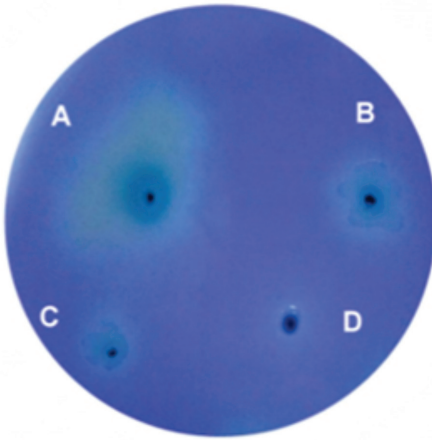


Figura 3. Solubilización de fosfatos en medio NBRIP.

- A) cepa problema,*
- B) cepa problema,*
- C) control positivo y*
- D) control negativo*

Cabe resaltar que existen muchos microorganismos capaces de solubilizar fosfatos, pero existen algunos que lo solubilizan con mayor éxito (cantidad evaluado por el tamaño del halo, y por la rapidez del tiempo en la que lo hacen), pero son relativamente menos las especies bacterianas que son más especializadas que otras, dado que son capaces de solubilizar en mayor cantidad y menor tiempo con condiciones de ambiente extremo, es decir que solubilizan estando en ambientes oligotróficos, con xenobióticos, y en micronichos muy ácidos que existen en los Drenajes Ácidos de Mina (DAM).

Por lo dicho anteriormente, contar con bacterias poliextremas capaces de solubilizar fósforo ofrece una alternativa para implementar estrategias de fitorremediación asistidas con bacterias que ayuden a recuperar sitios contaminados con xenobióticos.

Con este trabajo se busca aportar una técnica para el entendimiento de las asociaciones planta-suelo-microorganismos, y cuál es el papel de cada uno de los microorganismos presentes en un ecosistema, desde el punto de vista ecológico. La aplicación del mismo en múltiples escenarios de características similares apoyará en la realización de modificaciones o mejoras del mismo.

REFERENCIAS

1. Naik, P. R., Raman, G., Narayanan, K. B. y Sakthivel, N. (2008). Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiology*. 8: 230
2. Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*. 2012: 963401.
3. Esquivel-Cote, R., Gavilanes-ruiz, M., Cruz-ortega, R. y Huante, P. (2013). Agrobiotechnological importance of the ACC deaminase in rhizobacteria. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36: 251–258.
4. Ahemad, M. y Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University Science*. 26: 1–20.
5. Beltrán Pineda, M. E. (2015). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101-113. https://doi.org/10.21930/rcta.vol15_num1_art:401.
6. Nautiyal, SC. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. *FEMS Microbiology Letters*.170:265-275.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por las becas de Maestría otorgada a la QBP. Brenda Celeste Rodríguez Chacón de la Maestría en Biociencias de la Universidad Autónoma de Guerrero, con número de CVU 753819 y de Doctorado otorgada a la QBP. Diana Iveth Orbe Díaz del Doctorado en Ciencias Ambientales de la Universidad Autónoma de Guerrero, con número de CVU 883216.

4

**PROSPECCIÓN DE ORGANISMOS
EXTREMÓFILOS, DE SUS GENES, PROTEÍNAS U
OTROS PRODUCTOS PARA SU UTILIZACIÓN EN
DIFERENTES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS:**

4.5 INDUSTRIA FARMACÉUTICA

MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN EN AGAR

Kevyn Guerra^{1*}, Carlos Angulo^{1*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

kmgueerra@pg.cibnor.mx / eangulo@cibnor.mx

INTRODUCCIÓN

Existen diferentes técnicas de difusión en agar para evaluar la actividad antimicrobiana de una muestra. En éstas, el agente antimicrobiano que puede estar contenido en extractos, sobrenadantes, entre otros, difunde en el agar e inhibe el crecimiento de una bacteria patógena (1,2). En común, las técnicas de difusión en agar son sencillas, de bajo costo y no requieren equipo especializado. Son pruebas cualitativas y se deben adaptar a las características específicas del microorganismo a confrontar (3). Si bien no es un método específico para el estudio de microorganismos de ambiente extremos, este ha sido utilizado exitosamente en la identificación de microorganismos halotolerantes con actividad antimicrobiana (1). El objetivo de este método es evaluar la actividad antimicrobiana de extractos, sobrenadantes y compuestos purificados de microorganismos halotolerantes aislados de ambientes extremos sobre una bacteria patógena de interés.

MATERIALES Y EQUIPO

El medio de cultivo se seleccionará dependiendo de los requerimientos nutricionales del microorganismo patógeno con el que se trabajará. Se recomienda el uso de medios sin componentes que puedan interferir en la medición, como Mueller-Hinton y TSA (Agar de digerido de soja y caseína).

1. Laboratorio de Inmunología & Vacunología; Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Instituto Politécnico Nacional No. 195. Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, CP 23096 La Paz, B.C.S. México.

MATERIALES NECESARIOS

Placas Petri	■ Asa de Digralsky
Pipeta 10 mL	■ Asa bacteriológica
Micropipeta 1000 μ L	■ Microtubos de 2 mL
Puntas de 100 - 1000 μ L	■ Incubadora
Sacabocados 6 - 9 mm	■ Mecheros

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO NECESARIOS

Solución salina de cloruro de sodio (NaCl 0.85 %)
Medio de cultivo (Agar de digerido de soja y caseína (TSA) o Mueller-Hinton)
Muestra a evaluar
Bacteria patógena

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Con el fin de confirmar que los resultados obtenidos sean reproducibles, se recomienda realizar por lo menos dos experimentos independientes y tres réplicas por cada tratamiento.

1. El diseño del experimento debe incluir un grupo tratamiento (sobrenadante, extracto o compuesto purificado), un control (+) (un antibiótico al cual el patógeno sea sensible) y un grupo control negativo (-). En caso de utilizar extractos como tratamiento, se deberá utilizar el solvente de resuspensión como control (-); si se usa un sobrenadante, se deberá utilizar el medio de cultivo empleado.

Preparación de las placas de Petri con agar:

- 1.1. Preparar el medio de cultivo (Ej. TSA o Mueller Hinton) según las instrucciones del fabricante y esterilizar en autoclave.
- 1.2. Una vez que el medio estéril se atempere (aproximadamente 45 °C), con ayuda de una pipeta estéril y cuidando las condiciones axénicas, agregar 15 mL por cada placa Petri a utilizar. Dejar solidificar a temperatura ambiente y reservar.
2. Preparación del inóculo bacteriano:
 - 2.1. Previo a la aplicación del método, cultivar la bacteria a confrontar en el medio agar correspondiente a la temperatura necesaria (30-37 °C), por un periodo no mayor a 24 h (ajustable a las necesidades de la bacteria problema).

- 2.2. Transcurrido el tiempo de incubación, transferir colonias de la placa en un tubo con solución salina (0.85 %) hasta ajustar una densidad óptica equivalente al 0.5 de la escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL).
3. Desarrollo del método:
 - 3.1. En las placas de agar, depositar 100 μ L del cultivo bacteriano ajustado a 0.5 de la escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL).
 - 3.2. Con movimientos circulares, realizar la dispersión del inóculo por toda la placa con ayuda de un asa de Digralski. Dejar reposar por 10-30 min hasta que el exceso de líquido se absorba.
 - 3.3. Considerando la distancia entre los tratamientos, realizar perforaciones (6-9 mm) con un sacabocados estéril en cada placa inoculada. Retirar los bloques circulares de agar y dejar libres los pozos para distribuir los tratamientos.
 - 3.4. Agregar 20 μ L del tratamiento a evaluar (extractos, supernadantes de cultivo microbiano halotolerante, etc.) a cada pozo. Dejar reposar 30 min e incubar las placas con la tapa hacia arriba a la temperatura correspondiente.
 - 3.5. Incubar hasta la aparición de halos de inhibición del crecimiento en el grupo control (+) (24-48 h).
 - 3.6. Medir el diámetro de los halos de inhibición generados con un Vernier.
 - 3.7. Comparar, si es el caso, el diámetro del halo de inhibición del grupo tratamiento con el grupo control (+).

En la figura 1 se representan los pasos previamente descritos.

RESULTADOS

Se espera observar halos de inhibición como se presentan en la figura 2. Se deberá apreciar un halo de inhibición en el grupo control (+) y, si es el caso, halos de inhibición en los tratamientos (muestras aplicados).

El resultado se expresa colocando la dimensión del diámetro del halo de inhibición (mm) comparado con el del grupo control (+) como se muestra en la tabla 1.

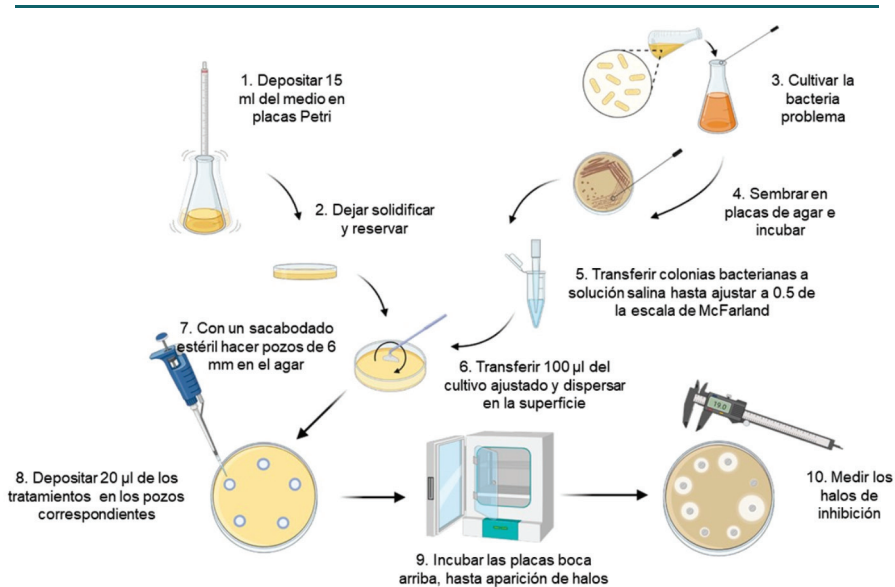


Figura 1. Técnica de difusión en pozo de agar para la detección de actividad antimicrobiana a partir de sobrenadante, extracto o compuesto purificado de microorganismos halotolerantes aislados de ambientes extremos. Creado con Biorender.

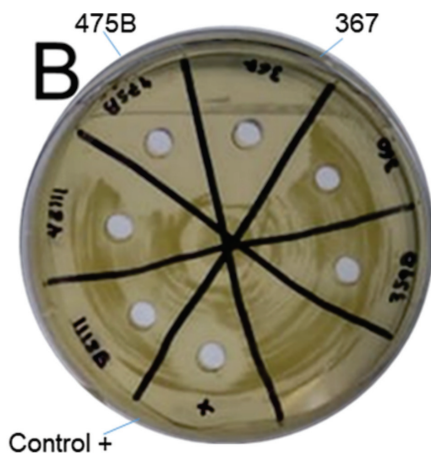


Figura 2. Actividad antimicrobiana de un sobrenadante de microorganismos halotolerantes aislados de ambientes extremos frente a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por método de difusión en pozo de agar. Control (+): estreptomycin (0.5 mg/mL).

AISLADO	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	
	DIFUSIÓN EN DISCO (mm)	DIFUSIÓN EN POZO (mm)
Control (+)	15.5 ± 0.5	13.13 ± 1.52
359B	12 ± 0.1	10 ± 0.6
367	22 ± 0.8	32 ± 2
475B	24 ± 0.1	14.43 ± 0.15
1118 A	-	-

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes de microorganismos halotolerantes aislados de ambientes extremos frente a *Clavibacter michiganensis* sub sp. *michiganensis*.

Control (+): estreptomicina 0.5 mg/mL.

Con la implementación de esta metodología se logrará identificar de manera sencilla y práctica microorganismos con potencial capacidad de producir compuestos antimicrobianos. Una vez identificados se podrán caracterizar con técnicas más específicas, con el fin de dilucidar el compuesto activo, sus características químicas y su mecanismo de acción.

REFERENCIAS

1. Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Duraipandiyan, V., Arasu, M. V., & Salem-Bekhit, M. M. (2016) Isolation, identification and screening of antimicrobial thermophilic *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-1 isolated from Tharban hot spring, Saudi Arabia. *Extremophiles*, 20(1), 79-90.
2. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016) Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
3. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). (2006) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard— 9th ed. CLSI document M2-A9. 26:1. Clinical Laboratory Standards Institute.

MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR MICRODILUCIÓN

Kevyn Guerra^{1*}, Carlos Angulo^{1*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

kmgueerra@pg.cibnor.mx / eangulo@cibnor.mx

INTRODUCCIÓN

El método de microdilución en medio de cultivo líquido es una técnica de susceptibilidad a antimicrobianos. A diferencia del método de difusión en agar, los compuestos a evaluar se encuentran en una mayor disponibilidad en el medio, permitiendo obtener resultados cuantitativos (1). Esta técnica permite determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) si se evalúa el mismo compuesto a diferentes concentraciones. Para discernir del crecimiento e inhibición de un microorganismo se recomienda el uso de algún colorante (2). Un ejemplo es el azul de alamar (resazurina) que se transforma en resorufina rosa fluorescente en presencia de células metabólicamente activas (3). Por lo tanto, este método puede ser evaluado de manera visual (colorimetría); y si se cuenta con un lector de microplacas capaz de medir fluorescencia se puede calcular el porcentaje de células viables. El objetivo de este método es evaluar la actividad antimicrobiana de extractos, sobrenadantes y compuestos purificados de microorganismos halotolerantes aislados de ambientes extremos sobre bacterias patógenas de manera cuantitativa, sencilla y reproducible.

MATERIALES Y EQUIPO

El medio de cultivo se seleccionará dependiendo de los requerimientos nutricionales del microorganismo patógeno con el que se trabajará. Se

1. Laboratorio de Inmunología & Vacunología; Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Instituto Politécnico Nacional No. 195. Col. Playa Palo de Santa Rita Sur CP 23096 La Paz, B.C.S. México.

recomienda el uso de medios sin componentes que puedan interferir en la medición, como Mueller-Hinton y TSB (caldo de digerido de soja y caseína).

MATERIALES NECESARIOS

- Micropipeta de 100 μL
- Micropipeta 1000 μL
- Microplacas estériles con tapa de 96 pozos
- Microtubos de 2 mL
- Incubadora
- Mecheros
- Lector de microplacas (opcional)
- Microfiltro (0.22 μm)
- Parafilm

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO NECESARIOS

Resazurina 0.2 % esterilizada por filtración
Medio de cultivo caldo de digerido de soja y caseína(TSB)
o Mueller-Hinton)
Agua destilada estéril
Muestra a evaluar
Bacteria patógena

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Este método consiste en evaluar si un sobrenadante, extracto, o compuesto purificado a partir de microorganismos halotolerantes aislados de ambientes extremos puede ser capaz de inhibir el crecimiento de una bacteria patógena. Con el fin de confirmar que los resultados obtenidos sean reproducibles, se recomienda realizar por lo menos dos experimentos independientes y tres réplicas por cada tratamiento.

En la tabla 1 se presenta el grupo tratamiento y los grupos control que se deberán considerar para comparar y calcular la viabilidad celular, y el contenido en cada pozo. En todos los casos, se agregarán 10 μL de resazurina estéril.

GRUPOS

COMPONENTES

Muestra a evaluar*	50 μ L de la muestra + 50 μ L del cultivo de la bacteria patógena a 1×10^6 UFC/mL
Control de crecimiento	50 μ L de medio de cultivo estéril + 50 μ L del cultivo de la bacteria patógena a 1×10^6 UFC/mL
Control de esterilidad	100 μ L del medio de cultivo estéril
	50 μ L de medio de cultivo estéril + 50 μ L de la muestra
Control positivo	50 μ L de antimicrobiano comercial + 50 μ L del cultivo de la bacteria patógena a 1×10^6 UFC/mL

Tabla 1. Muestras y controles para la detección de actividad antimicrobiana por microdilución en microplaca.

*Muestra a evaluar: puede ser extracto, sobrenadante o compuestos purificados a partir de microorganismos aislados de ambientes extremos.

¿Porqué se llama blanco y no control de muestra?

1. Preparación del inóculo bacteriano:

- 1.1. Previo al desarrollo del método, cultivar la bacteria patógena a confrontar en el medio agar correspondiente, a la temperatura necesaria (30-37 °C), por un periodo no mayor a 24 horas (ajustable a las necesidades de la bacteria patógena con la que se evaluará el efecto de la muestra de interés).
- 1.2. Transcurrido el tiempo de incubación, transferir colonias de la placa a un tubo con medio de cultivo estéril y cultivar hasta obtener una densidad óptica equivalente al 0.5 de la escala de Mcfarland (1×10^8 UFC/mL).
- 1.3. Diluir el inóculo 1/150 en medio de cultivo estéril para una concentración 1×10^6 UFC/mL.

2. Preparación de las muestras.

- 2.1. En caso de trabajar con extractos o compuestos purificados de microorganismos halotolerantes, preparar la muestra a la concentración deseada y diluir 1/10 en el medio de cultivo estéril (Mueller- Hinton o TSB).
- 2.2. En caso de utilizar sobrenadantes libres de células de microorganismos halotolerantes, utilizar la muestra directa y

realizar diluciones seriadas de la muestra en el medio a utilizar. Las diluciones se realizarán hasta observar como mínimo una inhibición del crecimiento del 50 %.

3. Preparación del colorante:

3.1. Preparar una solución de resazurina al 0.2 % pesando el reactivo suficiente para el volumen final deseado. Para un volumen de 10 mL, se deberán agregar 2 mg de resazurina. Considerar que se agregaran 10 μ L por cada muestra, blanco o control positivo (+).

3.2. Agregar el reactivo a agua destilada estéril. Una vez homogenizado, esterilizar la solución por filtración (filtro de PVDF 0.22 μ m) y mantener a 4 °C hasta su uso.

4. Desarrollo del método:

4.1. Según su diseño experimental y distribución en la microplaca, colocar 50 μ L de la(s) muestra(s) en los pozos correspondientes.

4.2. Agregar a cada pozo 50 μ L del cultivo de la bacteria patógena ajustado a 1×10^6 UFC/mL.

4.3. Cerrar la microplaca y sellarla con Parafilm. Incubar a la temperatura correspondiente para el cultivo del patógeno.

4.4. Incubar hasta observar turbidez en los controles de crecimiento del microorganismo (24-48 h).

4.5. Al observar turbidez, agregar 10 μ L de resazurina estéril (0.2 %). Incubar de 1-2 h, hasta observar cambio de tonalidad de azul a rosa en el control de crecimiento.

4.6. Si se cuenta con lector de microplacas, medir la fluorescencia a una longitud de onda de 590 nm de emisión y 560 nm de excitación.

4.7. Calcular el porcentaje (%) de viabilidad celular con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{F_t - F_b}{F_c - F_e} (100)$$

Donde:

F_t = Lectura del tratamiento (muestra + bacteria);

F_b = lectura del blanco; F_c = lectura del control de crecimiento

F_e = lectura del control de esterilidad.

- 4.8. Se considerará la CMI cuando la viabilidad celular sea menor al 10 %.
- 4.9. En caso de no contar con lector de microplacas, se considerará como presencia de células viables al pozo de tonalidad rosa, y con inhibición del crecimiento los pozos de color azul.

En la figura 1 se representan los pasos previamente descritos.

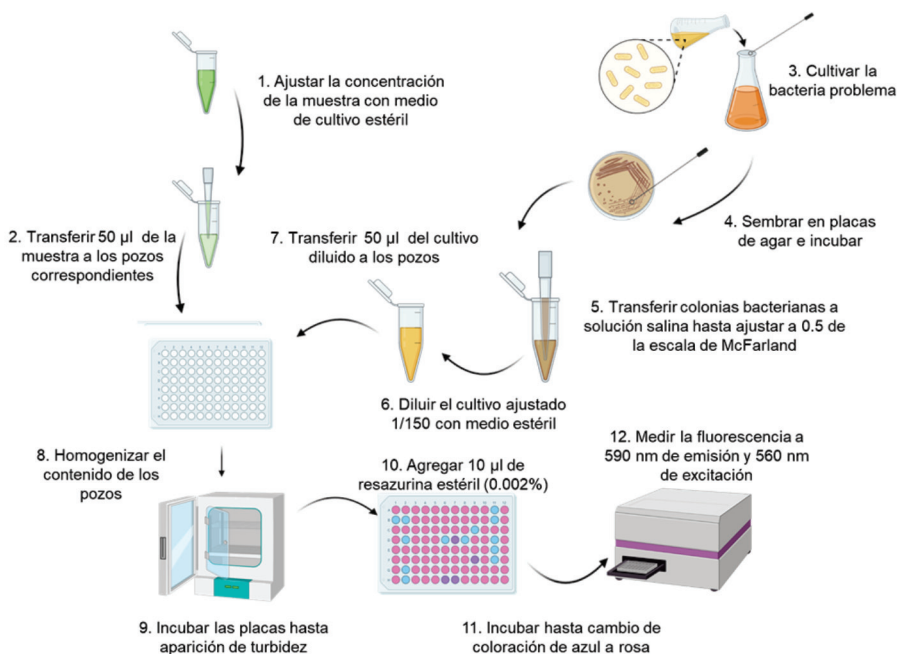


Figura 1. Técnica de microdilución para la detección de actividad antimicrobiana de extractos, sobrenadantes y compuestos purificados de microorganismos halotolerantes aislados de ambientes extremos. Creado con Biorender.

RESULTADOS

Se espera observar un cambio de coloración de azul a rosa, donde el color rosa representa la presencia de células metabólicamente viables, esto se debe observar al menos en el control de crecimiento. Las tonalidades de color azul representan células muertas o la inhibición del crecimiento, esto se debe observar al menos en el control positivo.

En caso de obtener los datos de fluorescencia se grafican los resultados (figura 2) utilizando la fórmula previamente mencionada.

Además, si se realizaron diluciones del mismo tratamiento (muestra) se calcula el valor de la CMI (tabla 2).

Con la implementación de esta metodología se logrará identificar microorganismos con potencial capacidad de producir compuestos antimicrobianos y permitirá determinar la concentración mínima inhibitoria. Una vez identificados se podrán caracterizar con técnicas más específicas, con el fin de dilucidar el compuesto activo, sus características químicas y su mecanismo de acción.

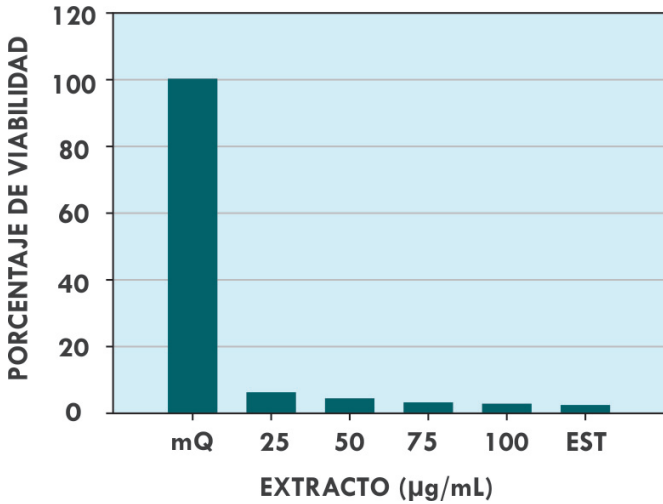


Figura 2. Viabilidad celular de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* tratada con de extractos de microorganismos halotolerantes aislados de ambientes extremos.

AISLADO	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	
	<i>S. aureus</i> CMI (mg/mL)	<i>E. coli</i> CMI (mg/mL)
Control (+)	11.5 ± 0.5	18.33 ± 1.52
367	26 ± 1	30 ± 2
475B	26 ± 0	32.33 ± 1.15
1118 B	-	-

Control (+): estreptomycin 0.5 mg/mL.

Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de extractos de microorganismos halotolerantes aislados de ambientes extremos contra bacterias patógenas de humanos.

1. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute.
2. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2): 71-79.
3. Tye, K. Y., Gan, S. Y., Lim, S. H. E., Tan, S. E., Chen, C. A., & Phang, S. M. (2016) Comparison of visual observation and emission intensity of resazurin for antimicrobial properties of hexane, dichloromethane, methanol and water extracts from a brown alga, *Turbinaria ornata*. *Cogent Biology*, 2(1): 1225877.

4

**PROSPECCIÓN DE ORGANISMOS
EXTREMÓFILOS, DE SUS GENES, PROTEÍNAS U
OTROS PRODUCTOS PARA SU UTILIZACIÓN EN
DIFERENTES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS:**

**4.6 PREPARACIÓN DE BIOFERTILIZANTES O
AGENTES PROMOTORES DE CRECIMIENTO
DE PLANTAS**

MÉTODO DE ELABORACIÓN DE BIOINOCULANTES DE BAJO COSTO COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL

Diana Iveth Orbe Díaz¹, Brenda Celeste Rodríguez Chacón²,
Jeiry Toribio Jiménez^{2*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:
jeiryjimenez2014@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de una mayor eficiencia en la producción agrícola conlleva el uso de grandes cantidades de agroquímicos, estos se han aplicado de manera excesiva en diversos cultivos, afectando seriamente el deterioro de las tierras de cultivo y a la generación de mecanismos de resistencia para sobrevivir algunas plagas y enfermedades. Actualmente diversos grupos de trabajo se han enfocado en la búsqueda de diversas estrategias como fuentes de nutrientes para promover cultivos más amigables con el ambiente (biofertilizantes, enmiendas agrícolas, compostaje, etc.) (1-3), siendo la utilización de los propios microorganismos aislados de las zonas de cultivos y adaptados a condiciones “extremas” propias de los suelos agrícolas contaminados (xenobióticos, infértiles, oligotróficos, salinos o ácidos entre otras características), los que representan una utilidad viable al momento de aplicarlos. Como se ha mencionado, uno de los principales problemas del diseño de bioinoculantes y por ende su uso a gran escala en el sector agrícola, es la multiplicación de las células microbianas en medios de cultivos que contengan los nutrientes necesarios y que sean de bajo costo (producción de microorganismos dentro de un sistema ligeramente extremo), es por ello que a continuación se describe una metodología en sólido y líquido de fácil producción y uso, bajo costo, y amigable con el ambiente (4-7).

1. *Centro de Ciencias de Desarrollo Regional, Universidad Autónoma de Guerrero, Acapulco, Guerrero.*
2. *Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero.*

MATERIALES	NECESARIO
■ Contenedor con tapa de 20 L	1
■ Probeta 1L	2
■ Balanza granataria	1
■ Contenedores de 1 Kg	3
■ Marcador indeleble	1
■ Agitador de madera	2
■ Contenedor con tapa 5 Kg	1
■ Guantes de látex	1 par
■ Cubrebocas	1

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO	NECESARIO
■ Agua de garrafón	20 L
■ Melaza o piloncillo	3Kg
■ Arroz blanco de grano entero	4 Kg
■ Cloruro de sodio 0.9%	1.2 L
■ 100 mL de un cultivo de 18 h de las cepas de trabajo (Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal)	6 x 100 ml c/u
■ Refresco de cola	500 mL

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Formulación líquida (figura 1)

1. Colocar en una garrafa 3.8 L de agua y 125 g de melaza por cada L, agitar vigorosamente.
2. Colocar 1.2 L de la solución salina y el inóculo de las cepas de trabajo.
3. Mezclar con un agitador de madera, tapar y dejarlo fermentar por tres días a temperatura ambiente.
4. Revisar la producción de gas cada 24 h y liberarlo abriendo la tapa ligeramente.
5. Cada 15 días agregar 2 L de la mezcla con agua, melaza y solución salina (proporción 70 %, 125 g/L y 30 %) hasta alcanzar un volumen de 16 litros en los contenedores.
6. Para utilizarlos en los cultivos, diluir 1 litro del fermentado en 19 litros de agua y aplicar por asperjado.
7. Se puede almacenar por hasta tres meses a temperatura ambiente y alejado de la luz.

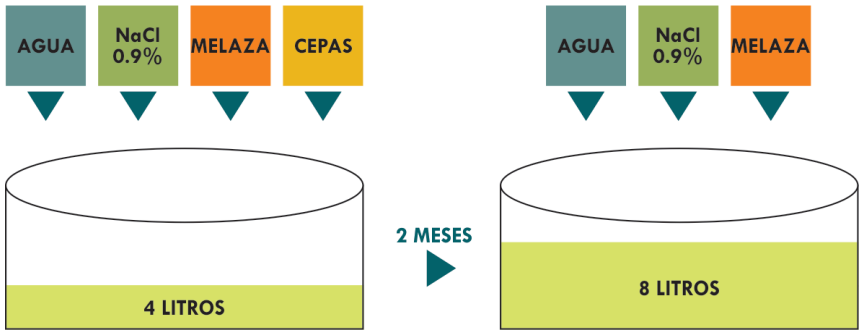


Figura 1. Preparación y mantenimiento de bioinoculantes líquidos en dos meses. Elaboración propia.

Formulación sólida (figura 2)

1. Colocar en un recipiente 4 kg de arroz previamente esterilizado.
2. En 100 mL de agua disolver 12.5 g de melaza o piloncillo y agregarlo al arroz.
3. Mezclar hasta que se incorpore perfectamente la melaza en el arroz.
4. Colocar 50 mL de refresco de cola, como adherente.
5. Mezclar perfectamente.
6. Agregar los 100 mL del inóculo.
7. Mezclar y tapar.
8. Almacenar hasta por tres meses a temperatura ambiente y alejado de la luz.
9. Se puede aplicar directamente en la base del tallo del cultivo a tratar o disolver 4 kg en 450 L de agua y aplicar por asperjado.

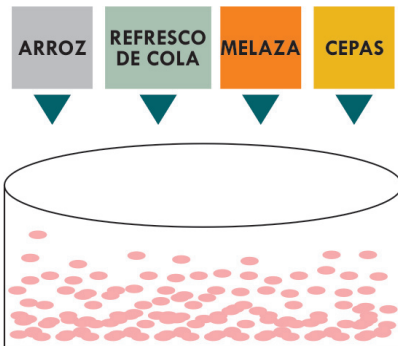


Figura 2. Preparación de bioinoculantes en sólido. Elaboración propia.



Figura 3. Apariencia y aplicación de bioinoculantes. A) Aspecto de formulación sólida, B) Aspecto de formulación líquida y C) Aplicación por asperjado

Las metodologías usadas para los bioinoculantes en fase líquida y sólida constituye una estrategia de fácil acceso, barata, reproducible y segura desde la perspectiva de la salud humana para que los agricultores o madres de familia incursionen en la producción de diversos cultivos y hortalizas para su consumo cuidando su entorno.

REFERENCIAS

1. Pantoja-Guerra M., Mendoza-Reyes S. & Valero-Valero N. (2018). Design of culture medium for biomass production of *Microbacterium* sp. (BSC3) to the humified organic matter generation from lignite. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XX No. 1
2. González-Delgado, A. D., Barajas-Solano, A. F., & Ardila-Álvarez, A. M. (2017). Producción de biomasa y proteínas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Chlorellales: Chlorellaceae) a través del diseño de medios de cultivo selectivos. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(3)
3. Montoya-Gonzalez AH, Quijano-Vicente G, Morales-Maza A, Ortiz-Uribe N, Hernandez-Martinez R (2016) Isolation of *Trichoderma* Spp. from Desert Soil, Biocontrol Potential Evaluation and Liquid Culture Production of Conidia Using Agricultural Fertilizers. *J Fertil Pestic* 7: 163.
4. Oerke E.C. (2006). Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144 (1): 31-43. DOI: 10.1017/S0021859605005708
5. Harsimran K.G. y Harsh G. (2014). Pesticides: environmental impacts and management strategies. En: *Pesticides-toxic aspects* (M.L. Larramendy y S. Soloneski, Eds.). Intech, Rijeka, DOI: 10.5772/57399

6. Albert L.A. (2015). Panorama de los plaguicidas en México [en línea]. <http://alef.mx/el-jarocho-cuatico-49-los-plaguicidas-en-mexico/> 17/04/2017.
7. SAGARPA (2015). III Informe de labores 2014-2015. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [en línea]. http://www.sagarpa.gob.mx/Transparencia/POT_2015/FRACCION_X/3er_Informe_de_Labores_Sagarpa_2015.pdf17/04/2017.

5

**MÉTODOS BIOQUÍMICOS. PRODUCCIÓN,
AISLAMIENTO, INMOVILIZACIÓN,
CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE ENZIMAS Y OTRAS BIOMOLÉCULAS
DE EXTREMÓFILOS.**

OBTENCIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE TEMPERATURA, pH Y AGITACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS EN *Geobacillus* sp.

César Octavio García Hernández¹, Sandy Luz Ovando
Chacón¹, Peggy Elizabeth Álvarez Gutiérrez^{1*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

peggy.alvarez@hotmail.com / peggy.ag@tuxtla.tecnm.mx

INTRODUCCIÓN

Los organismos extremófilos poseen enzimas con gran potencial para ser empleadas en distintas aplicaciones biotecnológicas (1). Las enzimas lipasas (EC 3.1.1.3) han sido empleadas en la producción de biocombustibles, modificación de grasas, en la industria farmacéutica y alimentaria, y actualmente existe una demanda en procesos que requieren actividad catalítica a diferentes rangos de temperatura y pH (2). Debido al complejo proceso de crecimiento de organismos extremófilos y la purificación de sus enzimas, presentamos un protocolo para encontrar las mejores condiciones de cultivo que permitan la mayor producción de lipasas a partir del extracto libre de células, tomando en cuenta tres de los factores más importantes en cultivos microbianos: temperatura, pH y agitación del medio de cultivo. Este método se ha utilizado exitosamente para obtener las mejores condiciones de temperatura, pH y agitación en las cepas *Geobacillus* sp CHI1 y *Geobacillus* sp CHI2, aisladas del lago cratérico del volcán “El Chichón” (México).

1. Laboratorio de Microbiología del Polo Tecnológico, Tecnm-Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Carr. Panamericana km 1080, Col. Junan Crispín. CP 28050 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

MATERIALES Y EQUIPO

A continuación se describen los materiales necesarios para este análisis (tabla 1) así como las soluciones, reactivos y material biológico necesario, tanto para el cultivo de *Geobacillus* como para la detección de la actividad lipasa (tabla 2).

MATERIALES	NECESARIO
■ Matraz Erlenmeyer 50 mL	1
■ Matraces Erlenmeyer 250 mL	10
■ Tubos de ensayo 13 x 100 mm	10
■ Vasos de precipitado 250 mL	2
■ Probeta 100 mL	1
■ Vidrios de reloj	2
■ Gradilla para tubos de ensayo	1
■ Espátula	1
■ Bitácora de laboratorio	1

Tabla 1. Materiales necesarios para la producción de actividad lipasa.

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO	NECESARIO
■ Solución amortiguadora de citratos 50 mM (pH 3-6)	1 L
■ Solución amortiguadora de fosfatos 50 mM (pH 7-8)	1 L
■ Solución amortiguadora de carbonatos 50 mM (pH 9-11)	1 L
■ Solución HCl 0.1 M	100 mL
■ Solución NaOH 0.1 M	100 mL
■ Aceite de oliva comercial	100 mL
■ Peptona	10 g
■ Extracto de levadura	10 g
■ NaCl	25 g
■ CaCl ₂	25 g
■ MgSO ₄	25 g
■ FeCl ₃	25 g
■ p-NPP (p-nitrofenil palmitato)	5 g
■ p-NP (p-nitrofenol)	500 mg
■ 2-propanol	1 L
■ Goma arábica	100 g
■ Material biológico (cepa de cultivo liofilizada de <i>Geobacillus</i> sp.)	1

Tabla 2. Soluciones, reactivos y material biológico para actividad lipasa.

1. Propagación del inóculo

- 1.1. Inocular el cultivo liofilizado de *Geobacillus* en un matraz de 50 mL (matraz A) con 10 mL de medio productor de lipasas (MPL) (peptona 0.6 % p/v, extracto de levadura 0.2 % p/v, CaCl_2 0.02 % p/v, MgSO_4 0.01 % p/v, FeCl_3 0.04 % p/v, aceite de oliva 1.5 % v/v, pH 5.4) estéril en una proporción 1:10 (inóculo: medio estéril v/v). Incubar el matraz A a 60 °C durante 48 h sin agitación.
- 1.2. Inocular 10 mL del cultivo del matraz A en un matraz de 250 mL (matraz B) con 90 mL de MPL. Incubar el matraz B a 60 °C durante 24 h sin agitación.

2. Ensayo de la actividad enzimática lipasa

- 2.1. Centrifugar 5 mL del cultivo cosechado, a 4,000 rpm durante 10 minutos. Separar el sobrenadante (extracto libre de células).
- 2.2. Preparar una emulsión a partir de un volumen de p-nitrofenil palmitato (p-NPP) a una concentración 0.79 mM disuelto en 2-propanol, con nueve volúmenes de goma arábiga 0.1 % p/v disuelta en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM (pH 8) (3).
- 2.3. Iniciar el ensayo enzimático agregando 300 μL del extracto libre de células a un tubo de ensayo con 2.7 mL de la emulsión descrita en el paso 2.2. Mantener la mezcla en un baño termostático a 60 °C durante 10 min. Determinar la Absorbancia a 402 nm empleando un espectrofotómetro UV/Vis y calcular la actividad enzimática (ver sección resultados y ecuación 1).

3. Obtención de las mejores condiciones de cultivo para la producción de lipasas

- 3.1. Para encontrar la mejor temperatura para la producción de lipasas, preparar tres matraces Erlenmeyer de 250 mL con 90 mL de MPL pH 5.4 (matraces C) para cada temperatura a evaluar (30, 40, 50, 60, 70 y 80 °C). Inocular 10 mL del cultivo del matraz B en cada uno de los matraces C, e incubarlos durante 24 h sin agitación. Realizar el ensayo de la actividad enzimática por triplicado, como se indica en la sección 2 (4-6).

- 3.2. Para encontrar el mejor pH para la producción de lipasas, preparar tres matraces Erlenmeyer de 250 mL con 90 mL de MPL (matraces D) para cada valor de pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11). Emplear soluciones amortiguadoras de citratos (pH 3-6), fosfatos (pH 7-8) o carbonatos (pH 9-11) para preparar el medio MPL. Inocular 10 mL del cultivo del matraz B en cada matraz D, e incubarlos a la temperatura donde se obtuvo la mayor actividad enzimática (paso 3.1) durante 24 h sin agitación. Realizar el ensayo de la actividad enzimática por triplicado, como se indica en la sección 2.
- 3.3. Para encontrar la mejor velocidad de agitación para la producción de lipasas, preparar tres matraces Erlenmeyer de 250 mL con 90 mL de MPL (matraces E) para cada velocidad de agitación (0, 50, 100, 150 y 200 rpm); el pH del medio MPL será el que haya presentado la mayor actividad enzimática del paso 3.2. Inocular 10 mL del cultivo del matraz B en cada matraz E, e incubarlos a la mejor temperatura obtenida en el paso 3.1. Posterior a las 24 h de incubación, realizar el ensayo de la actividad enzimática por triplicado, como se indica en la sección 2.
- 3.4. Finalmente, comparar los valores de actividad enzimática obtenidos en el cultivo en condiciones basales (60 °C, pH 5.4, sin agitación) con los valores de actividad enzimática obtenidos en el cultivo incubado en las mejores condiciones de temperatura, pH y agitación.

RESULTADOS

Una unidad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la reacción de un nmol de sustrato por minuto en las condiciones de pH y temperatura del ensayo. En este caso, una U corresponde a los nanomoles de p-NP liberados por minuto a 60 °C pH 8. La U se calcula como se muestra en la ecuación 1.

$$U = \frac{A_{420} \cdot V_f}{\epsilon \cdot t \cdot V_e} [1]$$

Donde: A_{420} , es la Absorbancia a 402 nm; V_t , es el volumen del ensayo (3 mL); ϵ , es el coeficiente de extinción molar del p-NP a 402 nm ($\epsilon_{420} = 1.489 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); t , es el tiempo del ensayo (10 min); V_e , es el volumen de la enzima empleada (0.3 mL). La actividad enzimática (AE) se calcula a partir de las unidades enzimáticas (U) y el volumen total de reacción enzimática (mL). Los resultados de la actividad enzimática se reportan para cada condición de pH, temperatura y agitación (figura 1). Las determinaciones enzimáticas se realizan por triplicado. Se recomienda presentar los resultados en un gráfico para cada una de las condiciones de cultivo evaluadas (temperatura, pH y agitación), como variables independientes y la actividad enzimática obtenida como variable dependiente, como el ejemplo que se muestra en la figura 2.

La obtención de las mejores condiciones de cultivo de lipasas de extremófilos permiten el desarrollo de sistemas de producción a nivel industrial. Las lipasas de extremófilos presentan características deseables para su aplicación biotecnológica a nivel industrial como son la resistencia a solventes, la termoestabilidad, el pH y la estabilidad a pH. Este tipo de lipasas pueden utilizarse para la modificación de sabores y colores en la industria alimentaria y cosmética, el desarrollo de sistemas de biorremediación de agua y la producción de biocombustibles como el biodiesel.

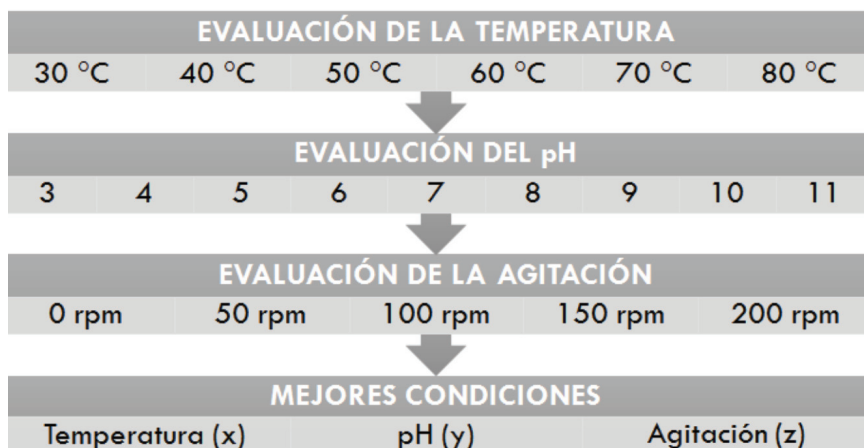


Figura 1. Diagrama del procedimiento para la obtención de las mejores condiciones de cultivo para la producción de lipasas en la bacteria termófila *Geobacillus* sp.

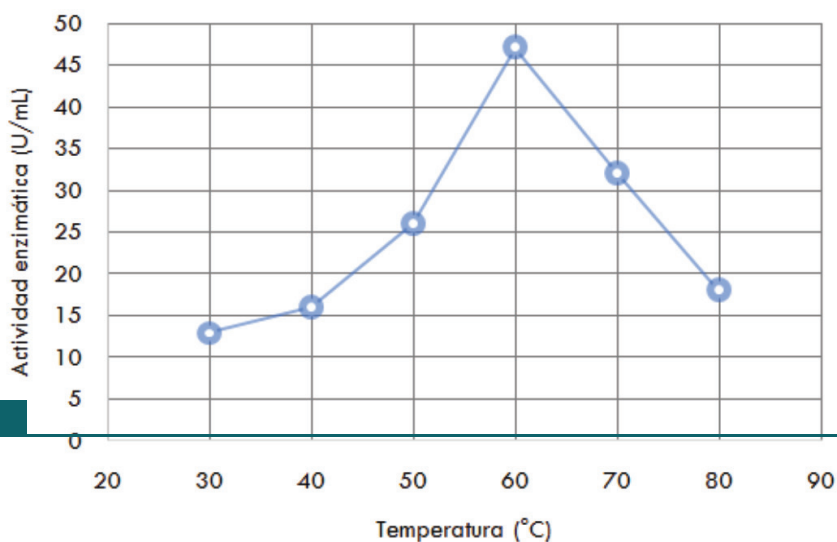


Figura 2. Actividad lipasa de *Geobacillus sp* expresada en U/mL a diferentes temperaturas de cultivo.

REFERENCIAS

1. Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M., & Fava, F. (2015) Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*99(19): 7907–7913.
2. Gerits, L. R., Pareyt, B., Decamps, K., & Delcour, J. A. (2014) Lipases and their functionality in the production of wheat-based food systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*13(5): 978–989.
3. Vorderwülbecke, T., Kieslich, K., & Erdmann, H. (1992) Comparison of lipases by different assays. *Enzyme and Microbial Technology*14(8): 631–639.
4. Abol Fotouh, D. M., Bayoumi, R. A., & Hassan, M. A. (2016) Production of Thermoalkaliphilic Lipase from *Geobacillus thermoleovorans* DA2 and Application in Leather Industry. *Enzyme Research* 2016: 1–9.
5. Berekaa, M. M., Zaghloul, T. I., Abdel-Fattah, Y. R., Saeed, H. M., & Sifour, M. (2009) Production of a novel glycerol-inducible lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*25(2): 287–294.

6. Li, H., & Zhang, X. (2005) Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. *Protein Expression and Purification*42(1): 153–159.

CARACTERIZACIÓN DE SOLUTOS COMPATIBLES DE BACTERIAS EXTREMÓFILAS MEDIANTE RMN

Sandra I. Ramírez Jiménez^{1*}, Marisela Aguirre Ramírez^{2*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

ramirez_sandra@uaem.mx / marisela.aguirre@uacj.mx

INTRODUCCIÓN

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica utilizada en la identificación química de moléculas que contienen núcleos magnéticamente activos. Si se utiliza un estándar interno, permite realizar estudios cuantitativos para estimar la concentración de las moléculas identificadas (1). Entre las diversas moléculas que se pueden identificar y cuantificar mediante RMN se encuentran los solutos compatibles, moléculas orgánicas de bajo peso molecular que frecuentemente son acumuladas por algunos microorganismos para compensar los gradientes de concentración y de presión osmótica en los que se encuentran, evitando así la deshidratación y la pérdida de su turgencia celular. Las bacterias extremófilas acumulan derivados de aminoácidos como la trehalosa, la prolina, la glicina, betaína o bien, derivados de alcoholes como el glucosil glicerol para utilizarlos como solutos compatibles. La identificación y la cuantificación de los solutos compatibles utilizados por algún organismo específico permite conocer detalles sobre sus estrategias de adecuación al ser expuesto natural o artificialmente a algún estrés particular.

La resonancia magnética nuclear cuantitativa (RMNc) se puede realizar analizando núcleos de hidrógeno (^1H), de carbono-13 (^{13}C) y de nitrógeno-15 (^{15}N), aunque la más utilizada es la que analiza

1. Laboratorio de Simulación de Ambientes Planetarios, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, av. Universidad no. 1001, col. Chamilpa, CP 62209, Cuernavaca, Morelos, México.
2. Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Anillo Envoltente y Estocolomo s/n zona pronaf, CP 32310, Ciudad Juárez, Chihuahua, México.

núcleos de hidrógeno (^1H RMNc) debido a que el ^1H tiene una abundancia natural superior a 99 %. Algunos de los requisitos necesarios para que una molécula sea cuantificable por ^1H RMNc es que necesita generar al menos una señal intensa y aislada de otras, que sea preferentemente un singulete, es decir una señal que no presente multiplicidad. Es deseable que la mayoría de las señales de la molécula de interés no se traslapen con otras señales presentes en la muestra bajo estudio y se debe realizar un mínimo de 128 barridos o recolección de información, para la obtención de un espectro que permita realizar estimaciones cuantitativas. Para realizar la cuantificación, es necesario utilizar un estándar interno de alta pureza con una concentración conocida que genere señales que no interfieran con las señales de la molécula de interés (2). El método aquí descrito se ha empleado exitosamente en la identificación y cuantificación de los solutos compatibles que transportan y/o producen bacterias halotolerantes y halófilas al exponerse a altas concentraciones de sales sulfatadas, semejantes a las reportadas para el océano de agua líquida del satélite Europa (3).

MATERIALES Y EQUIPO

MATERIALES	NECESARIO
▪ Centrífuga	1
▪ Tubos Falcón	10
▪ Estufa	1
▪ Caja Petri	5
▪ Balanza analítica	1
▪ Mortero de ágata con pistilo	1
▪ Cartucho de polipropileno	5
▪ Baño de agua	1
▪ Equipo de RMN de 400 MHz	1
▪ Programa MestRenova v6.0.2	1

■ Biomasa seca	200.0 mg
■ Disolución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4)	50.0 mL
■ Fase C ₁₈	500.0 mg
■ Metanol puro	200.0 mL
■ Agua destilada	200.0 mL
■ Agua deuterada con FHP	25.0 mL

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Se requieren como mínimo 200 mg de biomasa seca provenientes de un cultivo bacteriano crecido bajo las condiciones de salinidad de interés. El cultivo se detiene a la mitad de la fase exponencial, se centrifuga a 4,000 rpm a una temperatura de 4 °C, se desecha el sobrenadante y el sedimento se lava con 10 mL de disolución amortiguadora de fosfatos (pH de 7.4) y se centrifuga una vez más bajo las mismas condiciones. Se recupera la pastilla bacteriana y se coloca en una estufa a 60 °C hasta alcanzar un peso constante. Se pesan 150 mg de biomasa seca que se homogenizan con 300 mg de fase C₁₈ (Macherey-Nagel), un tipo de fase estacionaria que exhibe cadenas hidrocarbonadas con 18 átomos de carbono unidas a esferas de sílica, en un mortero de ágata para romper a las células bacterianas y provocar que los solutos compatibles interactúen con la fase C₁₈ aprovechando su carácter polar. Una vez que se alcanza el grado de maceración adecuado, es decir, que la sílica está completamente empapada con la biomasa, la mezcla se empaca en un cartucho de polipropileno y se eluye con una disolución 1:1 de metanol (CH₃OH) y agua destilada (figura 1).

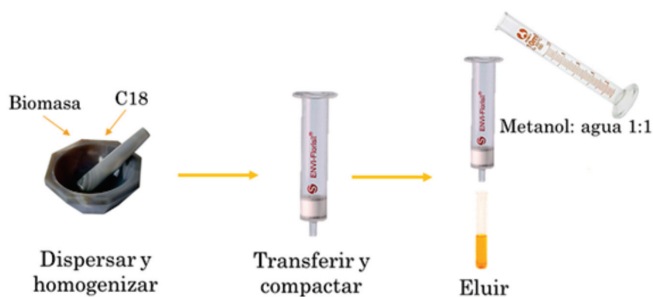


Figura 1. Extracción de los solutos compatibles con la elución de metanol:agua (1:1) a partir de la biomasa.

El extracto obtenido se lleva a sequedad en un baño de agua a 70 °C. El residuo se disuelve en 0.5 mL de agua deuterada (D₂O) que contiene 10 mg de ftalato monohidrogenado de potasio (FHP) (Sigma Aldrich) utilizado como estándar interno para realizar la cuantificación de los solutos compatibles identificados. Esta disolución se coloca dentro de un tubo para RMN y se obtiene el correspondiente espectro, como ejemplo se muestra el espectro de RMN de la betaína (figura 2).

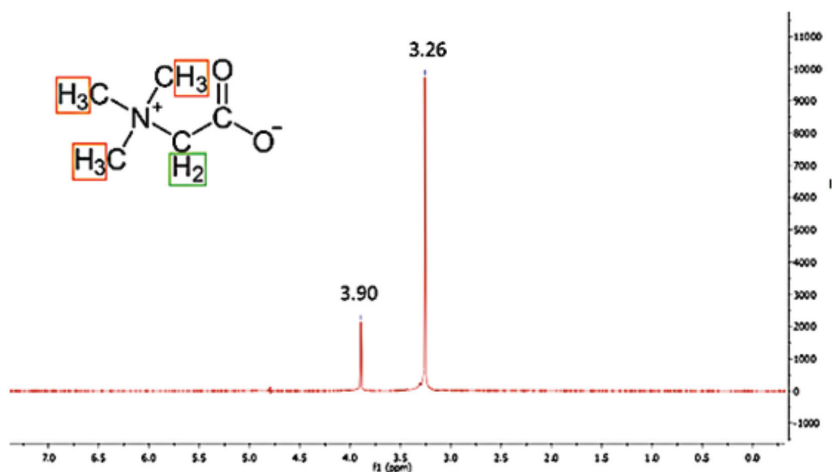


Figura 2. Espectro de resonancia magnética nuclear del soluto compatible betaína. En la esquina superior izquierda se representa a una molécula de betaína y se resaltan en naranja los protones que originan la señal de 3.26 ppm y en verde los que originan la señal de 3.9 ppm.

RESULTADOS

El espectro obtenido se procesa utilizando al programa MestRenova v6.0.2 (MestrelabResearch S. L.). La identidad de cada soluto compatible se basa en el reconocimiento del número y tipo de señales que proporciona, así como de la ubicación de cada una de ellas en el espectro de RMN, es decir, de su desplazamiento químico expresado en partes por millón (ppm) como se ilustra en la figura 2. Posteriormente, la concentración de cada soluto compatible se determina utilizando el área bajo la curva de alguna señal específica de cada soluto, seleccionada para tal fin. También se necesita el área bajo la curva y la concentración específica del ftalato monohidrogenado de potasio (estándar interno). La concentración del soluto compatible se determina con ayuda de la Ecuación 1:

$$C_s = \left(\frac{\frac{A_s}{H_s}}{\frac{A_b}{H_b}} \right) \times C_b \times V \frac{PM}{p}$$

Ecuación 1

C_s = Concentración del soluto compatible de interés (μg de soluto/
mg de biomasa)

A_s = Área correspondiente a la señal del soluto compatible de interés

A_b = Área correspondiente a la señal del ftalato monohidrogenado
de potasio

H_s = Número de protones de la señal del soluto compatible

H_b = Número de protones de la señal del ftalato monohidrogenado
de potasio

C_b = Concentración del ftalato monohidrogenado de potasio (mmol)

V = Volumen total en el tubo de resonancia (mL)

PM = Peso molecular del soluto compatible (mg/mmol)

p = cantidad de biomasa seca utilizada (mg)

1. En el espectro obtenido, identifique la señal para el ftalato monohidrogenado de potasio (estándar interno) y las señales para cada uno de los solutos compatibles presentes en la muestra.
2. Determine, con ayuda del programa MestRenova v6.0.2, el área bajo la curva para la señal del estándar interno y para la señal que representa a cada uno de los solutos compatibles identificados.
3. Calcule la concentración para cada soluto compatible identificado.
4. Reporte sus resultados en una tabla.

REFERENCIAS

1. Skoog, D. (2000). *Principios de análisis instrumental*. McGraw Hill.
2. Wu, Y., He, Y., He, W., Zhang, Y., Lu, J., Dai, Z. & Lin, R. (2014) Application of quantitative ^1H NMR for the calibration of protoberberine alkaloid reference standards. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 90: 92–97.

3. Avendaño, R. E., Montoya, L., Olmos, J. & Ramírez, S.I. (2015) Growth of *Bacillus pumilus* and *Halomonas halodurans* in sulfates: prospects for life on Europa. Bull. Soc. Geol. Mex., 67: 367-375.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEASAS HALOALCALINAS EMPLEANDO UN MÉTODO CINÉTICO BASADO EN PH

Rosa María Camacho Ruiz^{1*}, Raúl Balam Martínez Pérez¹,
María Angeles Camacho Ruiz²

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

rcamacho@ciatej.mx

INTRODUCCIÓN

Los métodos para la medición de la actividad de proteasas halófilas y/o alcalinas son escasos y la mayoría están diseñados para realizarse a punto final. Este método fue desarrollado en CIATEJ, se trata de un método cinético capaz de funcionar en concentraciones de sal hasta 4 M (NaCl) y pH en un rango de 7.4 a 10.9, el método permite análisis de muestras numerosas con bajo gasto de reactivos porque puede hacerse en microplaca (1). El fundamento del método consiste en la medición indirecta de la ruptura del enlace peptídico por acción de la proteasa en una solución débilmente tamponada empleando un indicador de pH; cuando el enlace peptídico es escindido se libera un protón que es captado por el indicador de pH sufriendo un cambio de color que es monitoreado por un espectrofotómetro. El método debe ser empleado conjugando un par indicador de pH y buffer para cada pH deseado como se indica en la tabla 1. Este método ha sido empleado de manera exitosa para determinar actividad proteasa extracelular producida por bacterias halófilas aisladas de distintos ambientes (2), en condiciones de elevada salinidad y pH alcalino, cabe mencionar que el método es muy sensible.

1. *Biología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Normalistas 800, Colinas de la Normal, CP 44270, Guadalajara, Jalisco.*
2. *Departamento de Fundamentos del Conocimiento, CUNorte, Universidad de Guadalajara, Carretera Federal No. 23 Km 191, Colotlán, Jalisco, CP 46200.*

MATERIALES Y EQUIPO

MATERIALES	NECESARIO
▪ Espectrofotómetro con lector para microplacas UV/VIS	1
▪ Micropipetas, 1000 μ L, 200 μ L, 20 μ L	3
▪ Microplacas de 96 pozos	1
▪ Puntas para micropipeta, 1000 μ L, 200 μ L, 20 μ L	20
▪ Microtubos 1.5 mL	1
▪ Tubo de 15 mL	1

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO

NECESARIO

▪ Buffer-Sustrato: Tris 2.5 mM (pH 8.2) + Rojo de cresol (0.2 mM) + NaCl (4 M)* +	
▪ Caseinato de sodio (0.5 % w/v)	10 mL
▪ Muestra propiamente diluida y filtrada	2 mL
▪ Blanco, muestra desnaturalizada (o medio de cultivo)	2 mL
▪ Control positivo, proteasa comercial diluida	2 mL
▪ Buffer: Tris 2.5 mM (pH 8.2) + Rojo de cresol (0.2 mM) + NaCl (4 M)* para curva	2 mL
▪ HCl: 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 0.7 mM (curva estándar diluida en Buffer)	2 mL
▪ Dimetilsulfóxido (DMSO) para dilución previa del indicador	2 mL

*La molaridad del NaCl puede variar desde 0 hasta 4 M de acuerdo con lo requerido. El par Buffer-Indicador puede cambiar de acuerdo con pH que se desee evaluar (Ver tabla 1).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. Preparar soluciones stock, en particular del indicador, que debe diluirse en DMSO concentrado 25 mM.
2. Preparar la mezcla (Buffer-Sustrato) fresca, no se recomienda guardar. Utilizar soluciones stock concentradas para generar la mezcla, en la figura 1 se sugieren concentraciones de las soluciones stock y las cantidades a usar para preparar la mezcla Buffer-Sustrato (figura 1). El pH de la mezcla se ajusta de acuerdo con el par Buffer-Indicador, en este ejemplo a pH 8.2 (Tris-Rojo cresol).
3. Preparar la muestra, el blanco y el control positivo, filtrar y diluir como convenga.

- Colocar en la microplaca 100 μL de la solución (Buffer-Sustrato) para cada muestra, blanco o control (realizando triplicados).
- Adicionar 20 μL de muestra, blanco o control como corresponda.
- Colocar la microplaca en lector de microplacas (espectrofotómetro).
- Programar la opción cinética en lector de microplacas para incubar durante 5-15 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$, tomando lecturas cada 30 s, con 5 s de agitación antes de las lecturas. Tomar lecturas a una longitud de onda de 574 nm. Esta longitud cambia en función del par Buffer-Sustrato que se seleccione en función del pH deseado (tabla 1).
- La curva estándar se prepara con HCL disuelto en Buffer (libre de sustrato), se realizan diluciones para tener concentraciones en un rango de 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 0.7 mM, se colocan 120 μL de cada dilución estándar en la microplaca y se lee a 574 nm (pH 8.2).
- Realizar cálculos como se indica en ecuación 1.

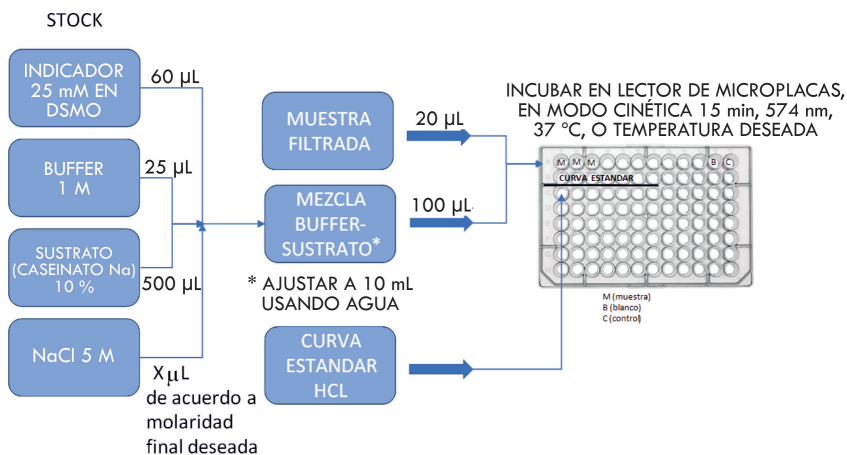


Figura 1. Protocolo para cuantificación de actividad proteasa, las concentraciones de las soluciones stock son sugeridas.

pH	Buffer	Indicador*	Longitud de onda	Cambio de color
7.4	MOPS 2.5 mM	Rojo fenol 0.35 mM	558	Rojo a amarillo
8.2	TRIS 2.5 mM	Rojo cresol 0.2 mM	574	Rojo a amarillo
9.7	CHES 2.5 mM	Fenoltaleína 0.5 mM	553	Fucsia a incoloro
10.9	CAPS 2.5 mM	Alizarina 0.5 mM	493	Rojo a amarillo

*Indica la molaridad final en la mezcla Buffer-Sustrato, pero estos se preparan concentrados: 25 mM en DMSO

Tabla 1. Par Buffer-Sustrato a emplear en función del pH que se desea evaluar.

RESULTADOS

Una unidad (U) de actividad proteasa se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un micromol de H (equivalente en HCl) por minuto, del grupo amino terminal de la caseína, en las condiciones del ensayo. De acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{U}{mL} = \frac{R_m - R_b * 120 * FD}{R_s * 20}$$

Ecuación 1: donde

R_m = pendiente de reacción de la muestra en unidades de ABS/min,

R_b = pendiente de reacción del blanco en unidades de ABS/min,

R_s = pendiente de la curva estándar en unidades de ABS/min,

FD = factor de dilución de la muestra,

120 es el volumen de reacción y

20 el volumen de muestra empleado.

Este método podría desarrollarse más a futuro investigando valores de pH distintos empleando otros pares Buffer-Indicador, de igual manera buscar sustratos distintos del Caseinato de sodio.

REFERENCIAS

1. Martínez-Pérez R. B., Camacho-Ruiz M. A., Estrada-Alvarado I., Armenta-Pérez V., Camacho-Ruiz R. M. (2019) Time-efficient pH-based method to quantify the activity of alkaline and halo-alkaline proteases. *Rev Mex Ing Quim* (18) 3:1063–1071. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/Martinez>
2. Martínez-Pérez R. B., Camacho-Ruiz M. A., Camacho-Ruiz R. M. (2020) Aplicación del método Red-Protease para el cribado de actividad proteasa en cultivos microbianos. *Memorias del XLI Encuentro Nacional de la AMIDIQ* 112–117.

DETECCIÓN CUANTITATIVA Y CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

Graciela Espinosa Luna¹, María Guadalupe Sánchez Otero², Rosa María Oliart Ros^{1*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

rosa.or@veracruz.tecnm.mx

INTRODUCCIÓN

La actividad lipolítica de las lipasas, carboxilesterasas, cutinasas y fosfolipasas puede ser detectada por métodos espectrofotométricos (basados en la hidrólisis de la cadena unida al *p*-nitrofenilo), o fluorescentes (por hidrólisis de la cadena lateral del *p*-metilumbeliferilo). Aquí se presentará un método cualitativo, también denominado zimograma o detección *in situ* (1) y un método cuantitativo (2), ambos útiles en la detección, identificación y caracterización de las enzimas lipolíticas. Ambos métodos han sido utilizados exitosamente en la identificación y cuantificación de la actividad lipolítica de una lipasa y una carboxilesterasa producidas por el termófilo *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 (3).

1. Laboratorio de Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Veracruz. Av. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar, CP 91897 Veracruz, Ver.
2. Laboratorio de Química y Biotecnología, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana. Carmen Serdán s/n Col. Centro, CP 91000 Veracruz, Ver.

MATERIALES Y EQUIPO

MATERIALES	NECESARIO
■ Minigel de poliacrilamida en condiciones disociantes con la muestra del extracto enzimático (crudo o purificado), recién corrido, sin teñir	1 pz
■ Caja de Petri o cristizador donde quepa el minigel	1 pz
■ Microtubos nuevos de 1.5 mL	20 pz
■ Pipeta automática 1000 μ L	1
■ Pipeta automática 20 μ L	1
■ Puntas nuevas para pipetas	C. sufici.
■ Celdas desechables para espectrofotómetro	10 pz
■ Balancín para agitación	1
■ Transiluminador de luz UV	1
■ Microcentrífuga refrigerada	1
■ Agitador vórtex	1
■ Parrilla de calentamiento para microtubos	1
■ Espectrofotómetro ajustado a 405 nm	1

SOLUCIONES	NECESARIO
■ Solución de <i>p</i> -metilumbeliferilo butirato (MUF-butilato) 25 mM en etilenglicol monometil éter	200 μ L
■ Solución 2.5 % (v/v) de Tritón X-100	20 mL
■ Amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.0	50 mL
■ <i>p</i> -nitrofenil laurato 0.01 M en etanol absoluto	1 mL
■ Carbonato de sodio 0.1 M recién preparado	100 mL
■ Extracto de la enzima en amortiguador adecuado	1 mL
■ Mismo amortiguador para hacer diluciones	100 mL

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Método cualitativo

1. Desmontar el minigel de poliacrilamida, colocarlo en la caja Petri o cristizador.
2. Agregar de 20 a 25 mL de solución de Triton X-100 2.5 % (v/v), agitar en el balancín durante 30 min. Desechar la solución de Tritón X-100.
3. Agregar de 15 a 20 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM pH 7.0, agitar por 20 min. Desechar el amortiguador y repetir el enjuague con más solución amortiguadora por otros 20 min.

4. Agregar de 10 a 15 mL de amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.0 más 200 μ L de solución de MUF-butirato. Agitar por 1 min y observar inmediatamente bajo a luz UV en el transiluminador. El MUF-butirato se prepara previamente en ambiente libre de oxígeno y protegido de la luz. Se almacena en alícuotas en microtubos forrados con papel aluminio y conservados a -20 °C.
5. La banda de proteína con actividad lipolítica se verá fluorescente. Hacer una incisión sobre la banda fluorescente para identificarla posteriormente con uno de los protocolos ampliamente conocidos de tinción de geles de poliacrilamida (azul de Coomassie o plata).

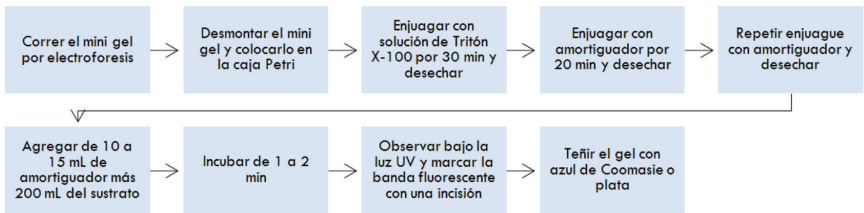


Figura 1. Diagrama de flujo del método cualitativo de detección de la actividad lipolítica.

Método cuantitativo

1. Preparar tres diluciones del extracto enzimático obtenido de la cepa de estudio, de 500 μ L cada una en proporción 1:10, 1:100 y 1:1000 diluyendo con el amortiguador adecuado, agitar por vórtex.
2. Rotular diez microtubos para las reacciones: uno será para el blanco y nueve serán para las diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000, por triplicado.
3. Agregar en los microtubos 800 μ L del amortiguador con el que se diluyó el extracto enzimático.
4. En el blanco, agregar 100 μ L del mismo amortiguador, y 100 μ L de cada una de las diluciones del extracto enzimático (1:10, 1:100, y 1:1000) a los microtubos correspondientes.
5. Agregar 100 μ L de p-nitrofenil laurato en etanol absoluto al blanco de reacción, mezclar por vórtex y colocar en incubación en el baño precalentado a la temperatura óptima de la enzima, marcar el inicio de la incubación; repetir en secuencia para el resto de los tubos de reacción. Incubar por 30 min con agitación moderada.

La reacción se observa por la aparición de un color amarillo claro. Se puede reemplazar el sustrato *p*-nitrofenil laurato por otro *p*-nitrofenil que tenga distinta longitud de cadena (acetato, butirato, caproato, palmitato, etc.), dependiendo de la preferencia de sustrato de la enzima de estudio. Los sustratos de cadena más larga, a partir de 16 carbonos, deberán solubilizarse con acetonitrilo grado reactivo.

6. Pasados 30 min de incubación, detener la reacción con 250 μL de solución de carbonato de sodio, empezando por el blanco. Centrifugar a 16,000 g a 15 $^{\circ}\text{C}$ por 15 min.
7. Medir la Absorbancia a 405 nm del sobrenadante. Empezar con el blanco y restar la Absorbancia a las lecturas de las muestras.
8. NOTA: Para cuantificar la actividad de una enzima previamente liofilizada o inmovilizada en un soporte o por entrecruzamiento, se deben colocar 2.5 mg en el microtubo, después se agregará el amortiguador adecuado y se finalizará con los pasos 5, 6 y 7.
9. La actividad enzimática se cuantifica de acuerdo al coeficiente de extinción molar (ϵ) del *p*-nitro fenol a 405 nm, en unidades de $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, dicho coeficiente se obtiene mediante la elaboración de una curva estándar de concentraciones conocidas de *p*-nitro fenol (mM) vs. Absorbancia, en las condiciones del análisis.
10. Por ejemplo, si se utiliza como amortiguador el Tris-HCl 50 mM a pH 7.5 y 50 $^{\circ}\text{C}$, el coeficiente es de $1.1591 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera 1 mmol de *p*-nitro fenol en 30 min bajo las condiciones del análisis. El cálculo de la actividad enzimática se realiza con la Ecuación 1.

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\text{Abs}_{405}}{\epsilon (1\text{cm})(1.250 \text{ mL})} \times \text{dilución}^{-1}$$

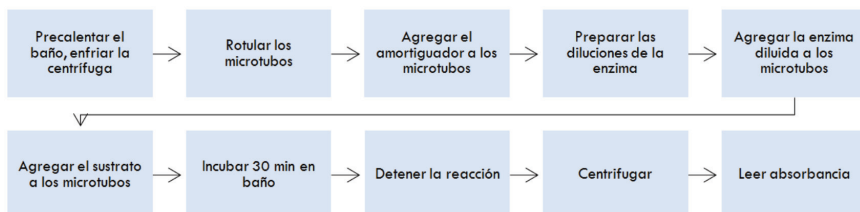


Figura 2. Diagrama de flujo del método cuantitativo para determinar la actividad lipolítica.

RESULTADOS

Método cualitativo

En la figura 3 se muestra un gel de poliacrilamida donde pueden verse del lado derecho las bandas fluorescentes con actividad lipolítica (B) y del lado izquierdo, el mismo gel teñido con azul de Coomassie (A). El primer carril es el marcador de peso molecular, de tal manera que puede calcularse el peso molecular de la proteína con actividad lipolítica (3).

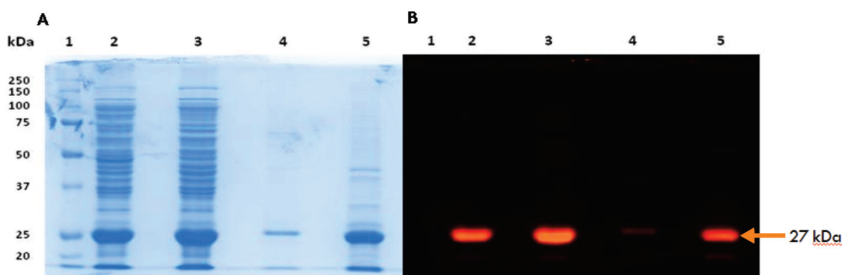


Figura 3. Purificación parcial por membranas de ultra filtración de CaesCCR11. Carriles (1) marcador, (2) Extracto crudo, (3) Retenido de membrana de 100 kDa, (4) Filtrado de membrana de 100 kDa y (5) Retenido de 10 kDa del filtrado de 100 kDa.

Método cuantitativo

Los valores obtenidos para la Absorbancia de cada muestra y el cálculo de las unidades de actividad lipolítica pueden registrarse en la tabla 1; al ser por triplicado, puede también conocerse la desviación estándar de los datos obtenidos.

Dilución	Absorbancia			U/mL			Promedio (U/mL)	Desviación estándar
1:10								
1:100								
1:1000								

Tabla 1. Determinación del valor promedio de la actividad enzimática en U/mL.

Los métodos aquí presentados tienen utilidad en el seguimiento del proceso de purificación de las lipasas y carboxilesterasas, para detectar actividad lipolítica en extractos celulares o medios libres de células, así como en los distintos protocolos de inmovilización de enzimas, ya que es posible verificar la eficiencia por la retención de la actividad durante el almacenamiento o los ciclos de reuso.

1. Prim, N., Sánchez, M., Ruiz, C., Pastor, F. J., & Diaz, P. (2003). Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*:22(5-6): 339-346.
2. Nawani, N., Dosanjh, N. S., & Kaur, J. (1998). A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. *Biotechnology Letters*, 20(10):997-1000.
3. Espinosa-Luna, G., Sánchez-Otero, M. G., Quintana-Castro, R., Matus-Toledo, R. E., & Oliart-Ros, R. M. (2016). Gene cloning and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 carboxylesterase CaesCCR11, a new member of family XV. *Molecular Biotechnology* 58(1):37-46.

INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS TERMÓFILAS PARA SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA DE LOS ALIMENTOS Y OTRAS

Rosa María Oliart Ros¹, Rodolfo Quintana Castro², María
Guadalupe Sánchez Otero^{3*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

guadsanchez@uv.mx

INTRODUCCIÓN

Las enzimas lipolíticas poseen amplias aplicaciones biotecnológicas. La inmovilización mejora la estabilidad del biocatalizador, le confiere la ventaja de aumentar su estabilidad en solventes orgánicos, fluidos supercríticos, líquidos iónicos y en condiciones extremas de procesos industriales tales como elevadas temperaturas, pH extremo, elevada fuerza iónica y la presencia de agentes desnaturizantes. Además, permite su uso repetido y hace más fácil la separación del medio de reacción. Existen diferentes métodos de inmovilización, entre los que se encuentran aquellos que utilizan soportes inertes. Entre los soportes que han despertado mayor interés para la inmovilización de enzimas lipolíticas se encuentra el polipropileno, que permite de manera rápida y económica la inmovilización vía adsorción (1). Este método es útil en la preparación de derivados inmovilizados de lipasas y esterases de microorganismos termófilos tales como *Geobacillus thermoleovorans* CCRR11 (2).

1. Laboratorio de Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Veracruz. Av. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar, CP 91897 Veracruz, Ver.
2. Laboratorio de Química Médica y Quimiogenómica, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana. Carmen Serdán s/n Col. Centro, CP 91000 Veracruz, Ver.
3. Laboratorio de Química y Biotecnología, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana. Carmen Serdán s/n Col. Centro, CP 91000 Veracruz, Ver.

MATERIALES Y EQUIPO

MATERIALES	NECESARIO
■ Polipropileno poroso Accurel EP-100, tamaño 200 a 1000 μm , poro de 0.05 a 0.5 μm y superficie de 90 m^2/g	1 g
■ Matraces Erlenmeyer de 25 mL ó viales con tapón	10
■ Microtubos nuevos de 1.5 mL	suficientes
■ Pipeta automática 1000 μL	2
■ Pipeta automática 20 μL	1
■ Papel Whatman No. 1	suficiente
■ Parrilla de calentamiento o baño María	1
■ Centrífuga refrigerada	1
■ Placa de agitación	1
■ Espectrofotómetro	1
■ Vórtex	1

SOLUCIONES	NECESARIO
■ Extracto enzimático y/o crudo de la enzima de interés (lipasa)	1 mL
■ Amortiguador de fosfato de potasio 50 mM [pH 6.5]	100 mL
■ Etanol absoluto	100 mL
■ Solución stock 1 mg/mL albúmina sérica bovina	3 mL
■ Agua ultrapura	5 mL

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. En viales de vidrio agregar 25 mg de polipropileno (pretratado a temperatura ambiente durante 30 min con 0.15 mL de etanol al 50 %, y su evaporación a 50 °C por 10 min).
2. Agregar 1.5 mL de extracto enzimático diluido en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM [pH 6.5] hasta alcanzar una concentración de 2.5 mg proteína/mL. El extracto deberá estar previamente caracterizado en cuanto a actividad y concentración de proteínas, y se debe hacer un estudio previo de isotermas de adsorción para determinar la concentración de proteínas en la que el soporte adsorbe la mayor actividad específica (3).
3. Agitar a 250 rpm en un agitador orbital durante 3 h (se requiere evaluar previamente el tiempo en el que la adsorción sea la máxima).

- Al final de la inmovilización se debe separar el sobrenadante por filtración con embudos de filtración y papel filtro (peso constante), y se determina la actividad lipolítica y la concentración de proteínas en el sobrenadante.
- El inmovilizado se debe lavar al menos tres veces con 3 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 [pH 6.5] y secarse al vacío a temperatura ambiente durante 18 h.
- Verificar la actividad lipolítica del inmovilizado de acuerdo con el método descrito en la sección “Detección cuantitativa y cualitativa de la actividad lipolítica”. Se puede hacer también ciclos de reúso, verificar la termoestabilidad y resistencia a pH extremo utilizando el mismo método de actividad lipolítica. Se puede también evaluar la capacidad sintética en solventes orgánicos.

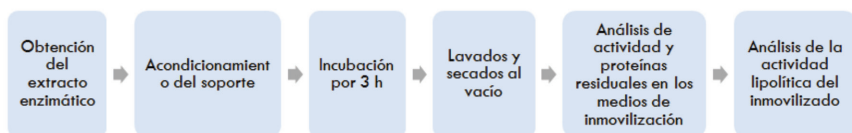


Figura 1. Esquema de trabajo del protocolo de inmovilización enzimática en polipirileno.

RESULTADOS

Para calcular la actividad enzimática en la enzima inmovilizada y en los sobrenadantes, referirse al procedimiento descrito en el capítulo “Detección cuantitativa y cualitativa de la actividad lipolítica”. Las unidades de actividad de cada etapa se registran en la tabla 1.

Muestra	Inicio	Sobrenadante	Enjuague 1	Enjuague 2	Enjuague 3	Inmovilizado

Tabla 1. Cuantificación de actividad (U/mL) para las muestras de enzima.

Para calcular la concentración de proteínas en los sobrenadantes y determinar la proteína inmovilizada, se hace uso del método de Lowry (4). La concentración de proteína se registra en la tabla 2. La cantidad de proteína en el inmovilizado se calcula por diferencia con la concentración de inicio, antes de la inmovilización.

Muestra	Inicio	Sobrenadante	Enjuague 1	Enjuague 2	Enjuague 3	Inmovilizado

Tabla 2. Cuantificación de proteína (mg/mL) para las muestras de enzima.

El método propuesto permite obtener derivados sólidos de enzimas lipolíticas con una elevada actividad específica y una buena resistencia al reuso y al almacenamiento. Estos biocatalizadores de lipasa inmovilizada pueden utilizarse en la exploración de reacciones de síntesis de aromas como el butirato de butilo.

REFERENCIAS

1. Cesarini S, Infazón B, Pastor FIJ, Díaz P. (2014) Fast and economic immobilization methods described for non-commercial Pseudomonas lipases. *BMC Biotechnol.* 14(1): 27-36.
2. Sanchez-Otero, MG; Valerio-Alfaro, G; Garcia-Galindo, HS, Oliart-Ros RM (2008). Immobilization in the presence of Triton X-100: modifications in activity and thermostability of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 lipase. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35(12): 1687-1693.
3. Badillo Zeferino GL, Ruiz López II, Oliart Ros RM, Sánchez Otero MG. (2017) Improved expression and immobilization of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermostable recombinant lipase. *Biotechnol Appl Biochem.* 64(1): 62-69.
4. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Department of Pharmacology Washington University. School of Medicine, St. Louis Missouri. *Journal Biological Chemistry* 193: 265-275.

PRODUCCIÓN DE CLEAS DE ENZIMAS TERMÓFILAS PARA SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA

Rodolfo Quintana Castro¹, Graciela Espinosa Luna², María
Guadalupe Sánchez Otero^{3*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:
guadsanchez@uv.mx

INTRODUCCIÓN

Las enzimas extremófilas poseen múltiples aplicaciones en diversos campos de la industria. Algunos de los procesos donde estas enzimas se ven involucradas pueden ser llevados a cabo de manera más eficiente a elevadas temperaturas o en presencia de solventes orgánicos, por ello se ha buscado obtener derivados enzimáticos que sean adecuados a estos retos, como la inmovilización. La producción de agregados enzimáticos reticulados o CLEAs es una estrategia de inmovilización covalente libre de soporte, que permite obtener catalizadores sólidos y más estables a la desnaturalización por calor, solventes orgánicos y proteólisis, que sus formas solubles o liofilizadas (1). Este método ha sido utilizado para generar CLEAs de la lipasa termófila recombinante LipMat CCR11, proveniente del termófilo *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 y se ha obtenido un derivado enzimático con termoestabilidad mejorada y buena resistencia al reuso.

1. Laboratorio de Química Médica y Quimiogenómica, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana. Carmen Serdán s/n Col. Centro, CP 91000 Veracruz, Ver.
2. Laboratorio de Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Veracruz. Av. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar, CP 91897 Veracruz, Ver.
3. Laboratorio de Química y Biotecnología, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana. Carmen Serdán s/n Col. Centro, CP 91000 Veracruz, Ver.

MATERIALES Y EQUIPO

MATERIALES	NECESARIO
■ Matraces Erlenmeyer de 25 mL o viales con tapón	10
■ Microtubos nuevos de 1.5 mL	Suficientes
■ Pipeta automática 1000 µL	2
■ Pipeta automática 20 µL	1
■ Pipeta automática 200 µL	Suficiente
■ Concentrator MiniVac	1
■ Parrilla de calentamiento o baño María	1
■ Centrífuga refrigerada	1
■ Placa de agitación	1
■ Espectrofotómetro	1
■ Vórtex	1

SOLUCIONES	NECESARIO
■ Extracto enzimático y/o crudo de la enzima de interés (lipasa)	10 mL
■ Glutaraldehído	10 mL
■ Sulfato de amonio	100 g
■ Tritón X-100	10 mL
■ Amortiguador de fosfato de potasio 50 mM [pH 7.0]	100 mL
■ Agua ultrapura	5 mL

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. Diluir la enzima con solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM [pH 7.0] para obtener una concentración de proteína de 1-10 mg/mL.
2. Adicionar Tritón-X100 a una concentración final del 0.15 % en la mezcla de reacción.
3. Agregar la solución de sulfato de amonio hasta una concentración que estará en el intervalo de 20-60 %, a temperatura ambiente. El valor óptimo de este porcentaje se determina haciendo pruebas con distintas concentraciones de tal forma que se logre el mayor entrecruzamiento de proteína activa, lo que se verifica con la determinación de actividad de los CLEAs (2).
4. Enseguida, adicionar la solución acuosa de glutaraldehído a una concentración final de 300 mM. Esta mezcla se deja reaccionar,

a 4 °C durante al menos 2 h, con agitación constante a 300 rpm, hasta observar la formación de precipitado. La reacción se detiene diluyendo la concentración de sulfato de amonio en el medio por debajo del 15 %.

5. Separar los CLEAs centrifugando la mezcla de reacción a 9,000 g a 10 °C por 15 min, y decantando la fase soluble.
6. Lavar los CLEAs añadiendo solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM [pH 7.0] hasta cubrir los sólidos y centrifugar. Este procedimiento se repite tres veces.
7. Someter los CLEAs a un secado al vacío en un concentrador centrífugo para su posterior caracterización y almacenamiento a -4 °C. Para determinar la actividad enzimática en los CLEAs y en los sobrenadantes, referirse al procedimiento descrito en el capítulo “Detección cuantitativa y cualitativa de la actividad lipolítica”. Para calcular la concentración de proteína en los sobrenadantes y calcular la proteína entrecruzada en los CLEAs, se puede hacer uso de la técnica de Lowry (3).

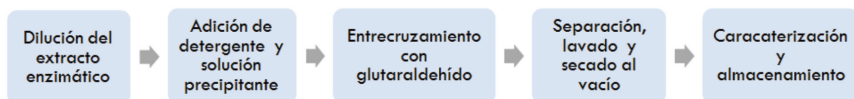


Figura 1. Esquema para la inmovilización de enzimas por entrecruzamiento con glutaraldehído.

RESULTADOS

Las unidades de actividad de cada etapa obtenidas con el método descrito en la sección “Detección cuantitativa y cualitativa de la actividad lipolítica” se registran en la tabla 1.

Muestra	Inicio	Sobrenadante	Enjuague 1	Enjuague 2	Enjuague 3	Inmovilizado

Tabla 1. Cuantificación de actividad (U/mL) para las muestras de enzima.

Muestra	Inicio	Sobrenadante	Enjuague 1	Enjuague 2	Enjuague 3	Inmovilizado

Tabla 2. Cuantificación de proteína (mg/mL) para las muestras de enzima.

Este método permite obtener biocatalizadores sólidos con una mayor resistencia a diversas condiciones de síntesis, tales como elevadas temperaturas, fuerzas iónicas o presencia de detergentes y otros agentes caotrópicos, y puede ser aplicada en reacciones llevadas a cabo en disolventes orgánicos o en ausencia de disolvente.

REFERENCIAS

1. Gupta, P. et al. (2009) Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. *Biores Technol* 100 (18): 4074-4076.
2. Talekar, S. et al. (2013) Parameters in preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *RSC Advances* 3 (31): 12485-12511.
3. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Department of Pharmacology Washington University. School of Medicine, St. Louis Missouri. *Journal Biological Chemistry* 193: 265-275.

PROCEDIMIENTO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BACTERIOCLOROFILAS EN BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS

María Teresa Núñez Cardona^{1*}, Jordi Mas Gordi², Olga Sánchez Martínez³

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

mtnunez@correo.xoc.uam.mx

INTRODUCCIÓN

Las bacterias fotosintéticas anoxigénicas (BFA), habitan en una gran diversidad de ambientes y son frecuentes en aquellos considerados extremos (Ej. alcalinos, salinos, fondos marinos), especialmente en donde no hay oxígeno, abunda la materia orgánica en descomposición y el sulfuro de hidrógeno, resultado de la degradación de esta última. Las BFA rojas y verdes (sulfurosas y no sulfurosas) se pueden distinguir gracias a los pigmentos que contienen y en condiciones naturales crecen masivamente coloreando los cuerpos de agua. Las diferencias en su pigmentación (color) se deben a la naturaleza de sus bacterioclorofilas que pueden ser de los tipos: *a*, *b*, *c*, *d*, *e* y *g* (1) y de sus carotenos (Ej. espiriloxantina, rodopinal, licopeno, clorobacteno, etc.), en las bacterias rojas se localizan en sus membranas formando complejos con proteínas. La bacterioclorofila *a* es frecuente entre las especies de las BFA rojas (sulfurosas y no sulfurosas), la bacterioclorofila *b* sólo ha sido detectada en algunos miembros de los géneros de *Rhodopseudomonas*, *Thiocapsa*, *Ectothiorhodospira* y también, en la extremófila *Thioalkalicoccuslimnaeus* (2). Las bacterioclorofilas *c*, *d* y *e*, son características de BFA verdes (*Chlorobiaceae* y *Chloroflexaceae*) que además, cuentan con cantidades pequeñas de

1. Lab. Ecología Microbiana, Departamento el Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, CDMX, México.
2. y 3. Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona.

bacterioclorofila *a*; finalmente, la bacterioclorofila *g*, es característica de *Heliobacteria*. Los pigmentos de las BFA son utilizados para caracterizarlas (especialmente analizados *in vivo*) y para estimar su biomasa por espectrofotometría, previa extracción con solventes orgánicos (Ej. acetona al 90 %, etanol al 100 %, metanol frío, acetona: metanol, hexano, etc.). Las bacterioclorofilas presentan absorción máxima en el azul (menos de 450 nm) así como en el rojo e infra-rojo (650-1000 nm); los carotenos entre el 400-500 nm y las ficobiliproteínas entre 550-650 nm del espectro de la luz.

MATERIALES Y EQUIPO

MATERIALES	NECESARIO
▪ Centrífuga	1
▪ Espectrofotómetro	1
▪ Tubos para centrífuga (10 X 1.5 cm/13 mL)	10
▪ Celdas para espectrofotómetro	4
▪ Pro-pipetas	1
▪ Pipetasserológicas de 5.0 ml	3
▪ Pipetas serológicas de 10.0 ml (opcional)	5
▪ Gradilla	1
▪ Lápices	2
▪ Piseta 250 ml	2
▪ Papel secante	Rollo

SOLUCIONES	NECESARIO
▪ Agua destilada 500 ml	500 mL
▪ Metanol 100 ml	100 mL
▪ *Cultivos líquidos de bacterias fotosintéticas*	6

*Descrito en otro capítulo de esta obra

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. En tubos para centrífuga, colocar un volumen conocido del cultivo bacteriano y centrifugar a 5,000 rpm durante 15-20 minutos.
2. Eliminar el sobrenadante evitando que las bacterias se suspendan.
3. Resuspender las células bacterianas golpeando suavemente los tubos y agregar el metanol (3-5 mL). Envolver los tubos con papel aluminio

o bien colocar las muestras en una caja oscura para evitar la exposición a la luz. Conservar a 4 °C durante 16 h para extraer los pigmentos.

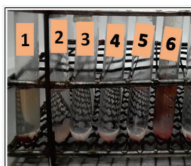
4. Pasado el tiempo de extracción (16 h), centrifugar las muestras a 5,000 rpm durante 15-20 min (protegerlas de la luz) y realizar las lecturas en el espectrofotómetro. Si este es de doble haz (Ej. Shimadzu UV160), en uno de los fotodetectores se coloca la celda con la muestra (pigmentos extraídos) y en otra celda al metanol (blanco). Las lecturas pueden realizarse de 300 a 800 nm. En el caso de utilizar un espectrómetro con un solo haz, este se calibra con el solvente. Para cuantificar la bacterioclorofila α , se utiliza la absorbancia a 770 nm y para la bacterioclorofila c a 670 nm, para ello se utiliza la fórmula siguiente:



Cultivos



Centrifugado



Cultivos centrifugados



Espectrofotómetro

$$BChla/c \text{ (gL}^{-1}\text{)} = [(Absorbancia/C.E.)(VS/ VCC)] * 1000 \text{ (3)}$$

Absorbancia a 770 nm para la bacterioclorofila α

Absorbancia a 670 nm para la bacterioclorofila c

Los Coeficientes de Extinción (C.E.) en metanol (4) son los siguientes:

Bacterioclorofila α a 770 nm: $84.1 \text{ gL}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Bacterioclorofila c a 670 nm: $86.0 \text{ gL}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

VS: Volumen de metanol utilizado para la extracción

VCC: Volumen del cultivo de bacterias fotosintéticas centrifugado

RESULTADOS

Una vez realizadas las lecturas de la Absorbancia y los cálculos respectivos de la concentración de las bacterioclorofilas, estas se pueden concentrar en una tabla y en su caso representarlas en un gráfico. En la tabla 1 se registran los datos y la concentración de la bacterioclorofila en los cultivos (muestras).

Tabla 1. Registro de datos para calcular la concentración de bacterioclorofilas

Clave del cultivo	Color del cultivo	VCC (mL)	VS (mL) (metanol)	Absorbancia a 770 nm o 670nm	Concentración de bacterioclorofila
1	Rosa	10.0	3.0		

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Además de determinar la biomasa de las BFA mediante los pigmentos fotosintéticos es posible conocer su capacidad de utilizar compuestos diferentes como fuentes de carbono (acetato, piruvato, etc.) [3], así como su respuesta a variables químicas (diferente salinidad, pH, fuentes de azufre) y físicas (iluminación, calidad de la luz, etc.), entre otros, ya que la respuesta de las BFA a estos factores se evidencia en la producción de sus pigmentos (Ej. bacterioclorofilas).

CUESTIONARIO

1. Escribe las características generales de las bacterias fotosintéticas rojas y verdes del azufre.
2. Anota a cuántos nanómetros, además de 770 nm, se puede detectar la bacterioclorofila a en las bacterias rojas del azufre.
3. ¿En qué ambientes extremos se han aislado bacterias fotosintéticas? Menciona tres ejemplos de estas.
4. Escribe tres ejemplos de carotenos presentes en las bacterias fotosintéticas rojas del azufre y su utilidad en la medicina y/o biotecnología.
5. ¿Cómo podemos distinguir si el color verde de un cultivo se debe a la presencia de un procarionte o a un eucarionte fotosintético? Las respuestas de este cuestionario deben llevar citas y al final la lista de referencias bibliográficas.

MANEJO DEL METANOL Y SUS RESIDUOS

El metanol es flamable y tóxico por inhalación, provocando irritación de las vías respiratorias. Puede irritarla piel al contacto y los ojos

provocando ceguera por lesión irreversible del nervio óptico. La ingestión provoca náuseas, vómitos, dolores de cabeza y vértigos. Para el manejo de residuos, el contenido de las celdas debe colocarse en un recipiente especial (sin combinar con otros solventes) y etiquetar como residuo peligroso. Generalmente en las instituciones se realizan campañas para su recolección y disposición final.

REFERENCIAS

1. Blakenship R. E., Madigan M. T., Bauer C. E. (1985). Anoxygenic-photosynthetic bacteria. Kluwer Academic Publishers.
2. Bryantseva I. A., Gorlenko, V. M., Kompantseva, E. I., Imhoff, J. F. (2000). *Thioalkalicoccus limnaeus* gen. nov. sp. nov., a new alkaliphilic purple sulfur bacterium with bacteriochlorophyll b. *Int J Syst Evol Microbiol* 50(6):2157-2163. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-6-2157>.
3. Núñez-Cardona M. T., Chávez-Hernández M., Signoret-Poillon M. (2011). Aislamiento y caracterización de bacterias rojas no sulfurosas provenientes del humedal de la Mixtequilla, Veracruz (México). *ECIPerú* 8(2):33-38.
4. Stal L. J., Van Gemerden H., Krumbein W. E. (1984). The simultaneous assay of chlorophyll and bacteriochlorophyll in natural microbial communities. *J Microbiol Meth* 2(6):295-306.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco y Universidad Autónoma de Barcelona, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo financiero y las facilidades otorgadas para facilitar el trabajo en colaboración.

6

**MÉTODOS MOLECULARES. AISLAMIENTO
DE DNA, RNA Y DNA METAGENÓMICO**

EXTRACCIÓN DE ARN DE HONGOS FILAMENTOSOS EN CONDICIONES DE HIPERSALINIDAD

Heidy Peidro Guzmán¹, Ramón Alberto Batista García^{1*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

rabg@uaem.mx

INTRODUCCIÓN

Las tecnologías ómicas ofrecen una oportunidad única para el estudio fisiológico de las adaptaciones microbianas a diferentes condiciones de extremofilia. En particular, los estudios transcriptómicos, los cuales se basan en la secuenciación de ARN, permiten el análisis de los perfiles transcripcionales para identificar genes diferencialmente expresados en condiciones de extremofilia, como aquellas que imponen elevadas concentraciones de sales inorgánicas (ejemplo $[\text{NaCl}] > 1 \text{ M}$). Uno de los principales retos en los estudios transcriptómicos es el aislamiento de ARN de calidad suficiente ($\text{RIN} > 9$) para la construcción de librerías y posterior secuenciación. La extracción de ARN a partir de hongos filamentosos cultivados en condiciones de hipersalinidad se puede realizar utilizando diferentes kits comerciales (ejemplo: Sigma, Invitrogen, etc.). Sin embargo, en la experiencia de nuestro grupo de trabajo, estos kits no siempre son útiles para lograr purificar ARN de microorganismos cultivados en presencia de condiciones hipersalinas, como, por ejemplo, una concentración saturada de NaCl (5.13 M). En este caso se propone emplear el método del fenol ácido, el cual ha resultado muy útil para la extracción y purificación de ARN en condiciones de saturación de NaCl, MgCl_2 , KCl, sorbitol, etc.

Este método se basa en la separación de las moléculas de acuerdo con su solubilidad, y considera la adición de fenol ácido a una solución acuosa de células lisadas o tejido homogenizado. Esto conlleva

1. Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México.

a la separación de la muestra en dos fases: una superior acuosa y una inferior orgánica, que pueden ser separadas por centrifugación (1). Los ácidos nucleicos son compuestos polares con carga negativa debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura. La extracción con fenol ácido posibilita que los ácidos nucleicos queden en la fase acuosa superior en lugar de la fase orgánica inferior. Por otro lado, el núcleo hidrofóbico de las proteínas interactúa con el fenol y causa su precipitación, así como de otros polímeros, incluyendo carbohidratos o lípidos. El pH del fenol, por su parte, determina el particionamiento del ADN y el ARN en estas fases (2).

A medida que el pH disminuye, la concentración de protones aumenta y las cargas de los grupos fosfatos del ADN son neutralizados. Por su parte, el ARN, al ser una molécula de simple cadena, tiene sus bases nitrogenadas expuestas a la solución, las que pueden formar puentes de hidrógeno con el agua, manteniendo al ARN en la fase acuosa (3). El método propuesto ha sido utilizado exitosamente para la extracción de ARN del hongo *Aspergillus sydowii*, en condiciones de baja actividad de agua impuesta por NaCl (4).

MATERIALES Y EQUIPO

Los materiales y soluciones que se utilizarán en la extracción de ARN se describen en las tablas 1 y 2, respectivamente.

MATERIALES	NECESARIO
■ Pipetas (1 mL, 200 µL, 20 µL)	1 c/u
■ Tubos Eppendorf (1.5 mL)	(1 ó 2 por muestra)
■ Caja puntas amarillas (200 µL)	1
■ Caja puntas azules (1 mL)	1
■ Morteros	(1 por muestra)
■ Espátulas	(1 por muestra)
■ Centrífuga	1
■ Incubadora	1
■ Cámara de electroforesis	1
■ Ultracongelador (-80 °C)	1
■ Guantes	1
■ Horno	1

Tabla 1. Materiales a utilizar para la extracción de ARN de hongos halófilos.

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO

NECESARIO

■ Nitrógeno líquido	1
■ TRIzol	1
■ Dietilpirocarbonato (DEPC)	1
■ Agua destilada	1
■ Dodecilsulfato sódico (SDS) al 10 %	1
■ Acetato de sodio 3 M pH 4.8	1
■ EDTA 0.5 M pH 8	1
■ Fenol ácido pH 4.8	1
■ Etanol absoluto	1
■ Etanol al 70 %	1
■ Agua libre de nucleasas	1

Tabla 2. Reactivos y soluciones necesarios para la extracción de ARN de hongos halófilos.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Consideraciones:

Para evitar la degradación del ARN, mantener siempre el espacio de trabajo limpio, utilizar guantes y tratar en autoclave todo el material. Es recomendable aplicar dos rondas de esterilización en autoclave para todo el material, o utilizar una segunda ronda de esterilización utilizando un horno a 260 °C durante 12 h.

1. Centrifugar el cultivo deseado en tubos Falcón de 50 mL durante 10 min a 4,500 rpm.
2. Congelar inmediatamente los cultivos en nitrógeno líquido.
3. Colocar la muestra en un mortero pre-congelado previamente a -80 °C, agregar nitrógeno líquido, macerar y añadir 2 mL de Trizol (el Trizol actúa sobre las ARNsas conforme son liberadas durante la maceración), y continuar macerando el micelio hasta obtener un polvo fino, evitando en todo momento que la muestra se descongele, o tenga contacto con las manos u otros objetos.
4. Tomar aproximadamente 200 mg de micelio macerado, colocarlo en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y añadir a la muestra 1 mL de Trizol.
5. Aplicar vórtex a la muestra durante 15 s y centrifugar a 13,500 rpm durante 10 min.

6. Pasar el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo/estéril y desechar la pastilla del cultivo.
7. Añadir a la muestra 600 μ L de Solución A (Agua DEPC: 36.9 mL; SDS 10 %: 2 mL; Acetato de sodio 3 M pH 4.8: 267 μ L; EDTA 0.5 M pH 8: 800 μ L).
8. Aplicar vórtex durante 15 s (en este paso se pueden dividir las muestras si el volumen sobrepasa la capacidad del tubo Eppendorf).
9. Añadir la muestra a un tubo con 600 μ L de fenol ácido precalentado a 62 °C.
10. Aplicar vórtex durante 15 s.
11. Incubar a 62 °C durante 5 min. Agitar vigorosamente por 10 s (manualmente) cada 50 s hasta alcanzar los 5 min de incubación.
12. Centrifugar a 12,200 rpm por 2.5 min.
13. Transferir cuidadosamente la fase acuosa (no arrastrar residuos) a un tubo Eppendorf nuevo/estéril con 1 mL de etanol absoluto (para no precipitar sales).
14. Aplicar vórtex durante 15 s.
15. Centrifugar a 13,200 rpm por 5 min. Decantar el sobrenadante.
16. Al precipitado añadir 1 mL de etanol al 70 % y agitar usando vórtex durante 15 s.
17. Centrifugar a 12,200 rpm por 2.5 min. Decantar el sobrenadante cuidadosamente.
18. Resuspender la pastilla con 400 μ L de Solución A. Aplicar vórtex durante 15 s.
19. Añadir 1 mL de etanol absoluto y repetir del paso 14 al 17, posteriormente pasar al paso 20.
20. Secar la pastilla en una centrifuga al vacío tipo Savant por 5 min o dejar secar en la mesa de trabajo hasta que se evapore por completo el etanol (50 min aproximadamente).
21. Resuspender la pastilla en 20 μ L de agua libre de nucleasas.
22. Almacenar a -80 °C.

En la figura 1 se muestra un flujo de trabajo general para el protocolo mencionado anteriormente.

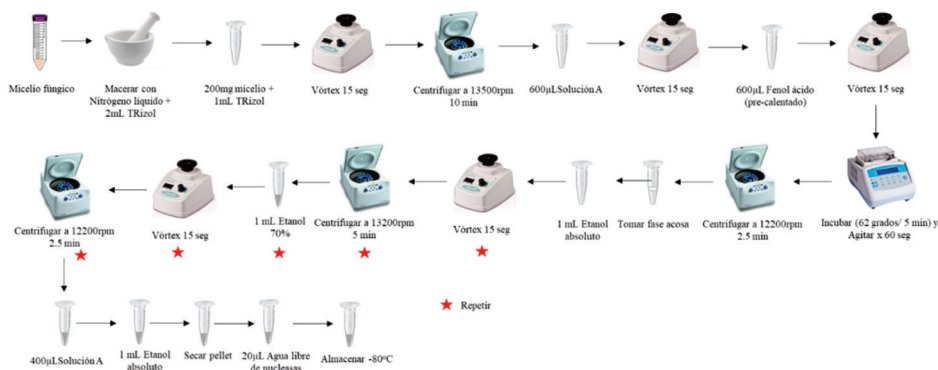


Figura 1. Esquema simplificado de extracción de ARN.

RESULTADOS

Una vez purificado el ARN por el método anterior, se comprueba su integridad mediante una electroforesis convencional en gel de agarosa. En la figura 2 se puede observar cómo se visualizan las muestras de ARN purificadas. En este caso en particular, se muestra ARN purificado a partir del crecimiento de *Aspergillus sydowii* en cultivos suplementados con 0.5 M NaCl (carril 1) y 5.13 M NaCl (solución saturada) (carriles 2 y 3). Las bandas intensas que se observan corresponden al ARN ribosomal (aproximadamente el 90 % del ARN total de la célula). En la figura 2, también se observa el ARN ribosomal 28S y el ARN ribosomal 18S, característicos de eucariontes. La intensidad de la banda que corresponde al ARN ribosomal 28S suele ser el doble en comparación con la banda que corresponde al ARN ribosomal 18S. Si el patrón de bandas del ARN purificado se observa con las características anteriores, podemos augurar que la extracción ha sido exitosa. Finalmente, la calidad del ARN debe ser confirmada en un bioanalizador para conocer el RIN (RNA Integrity Number) de las muestras. Cuando el $RIN > 9$ podemos enviar las muestras a secuenciación. Algunas compañías dedicadas a la secuenciación de ácidos nucleicos exigen valores de RIN más flexibles (>7).

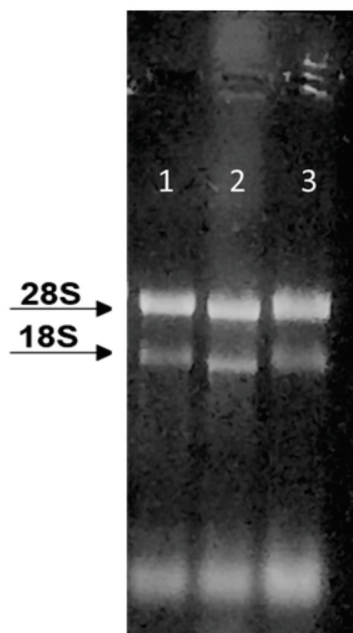


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa correspondiente a la extracción del ARN del hongo *Aspergillus sydowii*. 1- Condición óptima de crecimiento (0.5M NaCl), 2 y 3. Condiciones de hipersalinidad (5.13M NaCl).

Este método puede ser aplicado para la extracción de ARN de hongos filamentosos en condiciones extremas de cultivo como baja actividad de agua. Particularmente fue aplicado con éxito para la extracción de ARN utilizado en el análisis transcriptómico de *Aspergillus sydowii* en condiciones saturantes de NaCl, MgCl₂, KCl y sorbitol, entre otras.

REFERENCIAS

1. Brawerman, G., Mendecki, J. & Lee, S. Y. (1972) A Procedure for the Isolation of Mammalian Messenger Ribonucleic Acid. *Biochemistry* 11 (4).
2. Perry, R. P., & Kelley, D. E. (1972) The Production of Ribosomal ARN from High Molecular Weight Precursors. *J. Mol. Biol.*, 70: 265.279.
3. Puissant, C. & Houdebine, L. M. (1990) An Improvement of the Single-Step Method of ARN Isolation by Acid Guanidinium-Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *BioTechniques* 8: 148 – 149.

4. Jiménez-Gómez, Irina; Valdés-Muñoz, Gisell; Moreno-Perlin, Tonatiuh; Mouriño-Pérez, Rosa R.; Sánchez-Carbente, María del Rayo (2020) Haloadaptative Responses of *Aspergillus sydowii* to Extreme Water Deprivation: Morphology, Compatible Solutes, and Oxidative Stress at NaCl Saturation.

AGRADECIMIENTOS

Este método fue estandarizado en el Laboratorio de Microorganismos Extremófilos del Centro de Investigación en Dinámica Celular de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por las estudiantes de doctorado Irina Jiménez, Deborah González y Heidy Peidro. Además, también participaron en la estandarización las estudiantes de maestría Lyselle Ruíz y Gisell Valdéz.

EXTRACCIÓN DE ADN Y ARN EN *Bacillus* TERMOTOLERANTES

Augusto Rojas Aparicio¹, Miguel Ángel Rodríguez Barrera¹, Yanet Romero Ramírez^{1*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

yanetromero7@gmail.com

INTRODUCCIÓN

En este capítulo describimos los protocolos para extracción de ADN modificados de los descritos por Sambrook et al., 1989 (1), y para extracción de ARN modificados de los protocolos de Koronakis et al., 1988 y Dammet al., 2015 (2, 3). Los protocolos originales son funcionales en la extracción de ADN o ARN de algunos géneros de bacterias Gram-negativas y no son eficaces en bacterias Gram-positivas. En este capítulo, describimos un método modificado que ha sido utilizado exitosamente para la extracción de ADN y ARN de cepas de *Bacillus licheniformis* termorresistentes (4, 5). Uno de los inconvenientes principales al extraer ADN y ARN a partir de bacterias termorresistentes, es que sus proteínas soportan altas temperaturas de desnaturalización, por lo que se necesita cambiar los métodos convencionales de extracción, para garantizar la calidad, intensidad y reproducibilidad del material genético. El aislamiento del ADN descrito en este protocolo se basa en el uso de una solución de lisis de alta fuerza iónica a base de dodecil sulfato sódico (SDS), proteínaasa K y NaCl para destruir rápidamente la membrana celular e inactivar las DNAsas. Posteriormente, el ADN de alto tamaño molecular (entre 30 y 80 kb de longitud) se extrae con Fenol: Cloroformo y se precipita con isopropanol. En el caso del método de extracción de ARN total el principio se basa en la extracción con fenol ácido y cloroformo, lo que provocan la desnaturalización de proteínas y lípidos. Lo que hace eficiente este proceso, son las múltiples extracciones con los solventes que reducen la pérdida de ARN debido a la formación de complejos insolubles con proteínas, que después son desnaturalizadas por el cloroformo.

1. Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México.

MATERIALES

Preparar todas las soluciones con agua bidestilada (ddH₂O) y utilizar reactivos para biología molecular grado analítico. Preparar los reactivos a temperatura ambiente; manteniendo a temperatura ambiente los de uso a corto plazo y a -20 °C los de uso a largo plazo. Para los últimos se recomienda realizar alícuotas.

MATERIALES

NECESARIO

■ Incubadora a 37 °C	1
■ Baños María	2
■ Microcentrífuga	1
■ Agitador	1
■ Vortex	

SOLUCIONES

- Extracción ADN genómico
- Agua destilada
- Etanol al 70 %
- Etanol al 95 %
- Isopropanol
- Cultivo bacteriano (≥ 1.5 mL)
- Solución de Lisis (0.6 M NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, SDS 4 %)
- Acetato de amonio 5 M
- NaCl (5 M)
- TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0)
- Fenol: cloroformo (1:1, v/v)
- Proteinasa K (10 mg/mL en TE, pH 8.0)
- RNAsa (1 mg/mL en TE, pH 8.0)
- Extracción ARN total
- H₂O con DEPC (dietil pirocarbonato) 0.1 y 0.5 %
- Acetona helada a -20 °C
- Agua destilada helada a -20 °C
- lizozima (10 mg/mL) preparada con agua con DEPC 0.5 %
- Proteinasa K (100 mg/mL) preparadas con agua con DEPC 0.5 %
- Fenol saturado pH 4.5

Extracción de ADN genómico.

1. Centrifugar 1.5 mL de cultivo bacteriano durante 30 s a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante
2. Añadir 500 μL de solución de lisis y resuspender la pastilla celular mediante vórtex o pipeteo, añadir 50 μL de proteinasa K (10 mg/mL). Incubar el lisado bacteriano a 37 °C durante 1 h.
3. Añadir 500 μL de una mezcla 1:1 de fenol: cloroformo. Mezclar las dos fases mediante vórtex, centrifugar y transferir la capa superior a un nuevo microtubo nuevo. Repetir este paso dos veces más.
4. Extraer la fase acuosa hasta dos veces con 500 μL de cloroformo, transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga nuevo y añadir 25 μL de NaCl 5 M y 1 ml de etanol al 95 %. Mezclar por vórtex luego centrifugar durante 10 min a 4 °C.
5. Decantar el sobrenadante, y luego eliminar cuidadosamente el etanol residual con una micropipeta. Dejar el tubo abierto durante ~15 min para evaporar etanol.
6. Disolver la pastilla celular seca en 100 μL de TE (pH 8.0), añadir 5 μL de RNase A (1 mg/mL en TE, pH 8.0). Incubar la solución a 37 °C durante 30 min.
7. Añadir 40 μL de acetato de amonio 5 M y 250 μL de isopropanol. Agitar brevemente y mantener por 10 min a temperatura ambiente.
8. Recuperar el ADN por centrifugación (10 min a temperatura ambiente). Lavar la pastilla celular dos veces con etanol al 70 %. Decantar el sobrenadante, y luego eliminar cuidadosamente el etanol residual con una micropipeta. Evaporar, dejando el tubo abierto por 15 min.
9. Disolver pastilla celular en 100 μL de TE (pH 8.0).

Extracción de ARN total.

1. Se colectan las células de 1.5 mL de cultivo de 36 h de crecimiento, se centrifugan a 8,000 rpm por 10 min.
2. Se resuspende la pastilla celular en 50 μL de H_2O con DEPC 0.1 %, se adiciona 5 μL de DEPC 0.5 % y 400 μL de acetona helada, se mezcla manualmente y centrifuga a 10,000 rpm por 5 min. Se desecha el sobrenadante con cuidado.

3. Posteriormente se resuspende la pastilla en 50 μL de DEPC 0.1 %, se agregan 10 μL de lisozima (10 mg/mL) se incuba a 37 °C por 10 min.
4. Se agrega 1 μL de proteinasa K (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se incuba en hielo 10 min. Después, se adicionan 7 μL de DEPC 0.5 %, 600 μL de fenol (precalentado a 65 °C), dar vórtex 15 s.
5. Invertir el tubo varias veces y deja reposando a 65 °C por 5 min. Incubar la muestra a -20 °C durante 20 min. Posteriormente colocar a 65 °C durante 5 min.
6. Dar vórtex por 5 s y centrifugar a 14,000 rpm por 15 min. Tomar cuidadosamente 3 x 200 μL de la fase acuosa. Adicionar a un tubo nuevo.
7. Tomar 600 μL de fenol (precalentado a 65 °C) y adicionar al tubo nuevo, dar vórtex 15 s. Repetir los pasos 5 y 6, tomando ahora 3 x 160 μL de la fase acuosa.
8. Repetir el paso 7, tomando ahora 2 x 170 μL de la fase acuosa y pasarla a un tubo nuevo
9. Se agregan 150 μL de cloroformo, se mezcla por vórtex, se adicionan 120 μL de DEPC 0.1 % y se centrifuga a 12,000 rpm por 5 min.
10. Agregar la fase acuosa en un tubo nuevo y adicionar 25,6 μL de acetato de sodio pH 5.0 y 640 μL de etanol absoluto, se deja precipitando toda la noche a -20 °C.
11. Se recupera el ARN centrifugando a 12,000 rpm por 15 min, se desecha el sobrenadante, eliminar con ayuda de una pipeta el remanente de etanol y la pastilla se resuspende en 50 μL de DEPC 0.1 % y se guarda a -20 °C.

Consideraciones especiales: El fenol utilizado debe saturarse como se muestra a continuación: se funde el fenol a 65 °C, se añade un volumen igual de agua con DEPC al 0.1 %, se agita la mezcla por 3 h utilizando un agitador magnético, revisar la fase acuosa, si el pH está por debajo o superior a 4.5 añadir más agua con DEPC. Cuando el pH sea 4.5, conservar a 4 °C protegido de la luz.

RESULTADOS

Para la extracción de ADN de bacterias Gram-positivas termorresistente con este método la clave está en la ruptura total de las células y la solución que sugerimos es el adecuado. Para mejor integridad de las moléculas es recomendable la utilización de proteinasa K (10 mg/mL) y RNAasa (1 mg/mL). Se recomienda conservar el ADN en una solución TE pH 8.0 ya que almacenar sólo en agua es susceptible a hidrólisis. La integridad y concentración del ADN a partir de este método, es excelente. En la figura 1, se observan bandas de alto tamaño molecular, extraídas a partir de cultivos celulares de *Bacillus licheniformis* termorresistente en diferentes tiempos de crecimiento. La pureza se determinó por NanoDrop, indicando un índice de pureza A260/280 de 1.6, considerado como aceptable.

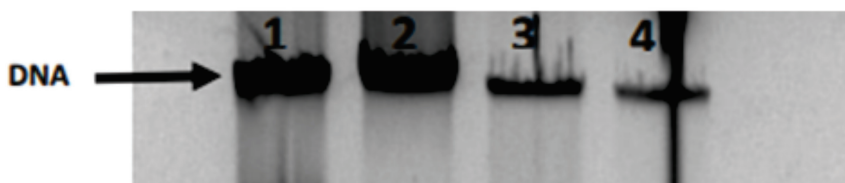


Figura 1. ADN extraído de cultivos bacterianos de *Bacillus licheniformis* M2-7. Carriles 1 y 2: 48 h de crecimiento. Carril 3 y 4: 12 h de crecimiento. Gel de agarosa al 1 % en buffer TAE 1X (Tris-Acetato 0.04 M y EDTA 1 mM, pH. 8) corrido en un campo de 120 volts.

Para la extracción de ARN total, la clave está en dos puntos fundamentales de la extracción. El primero es la utilización de fenol ácido, el cual nos ayuda a degradar el ADN de la muestra problema, permitiendo así la alta concentración de ARN total, y excelente pureza. El segundo paso importante en la extracción de ARN, son los múltiples lavados con fenol ácido, garantizando la eliminación gradual de ADN. En la figura 2, se observan bandas con alta concentración y buena integridad, representativas de los ARN ribosomal 23S y 16S. La pureza se determinó por NanoDrop, indicando un índice de pureza A260/280 de 1.8, considerado como aceptable.

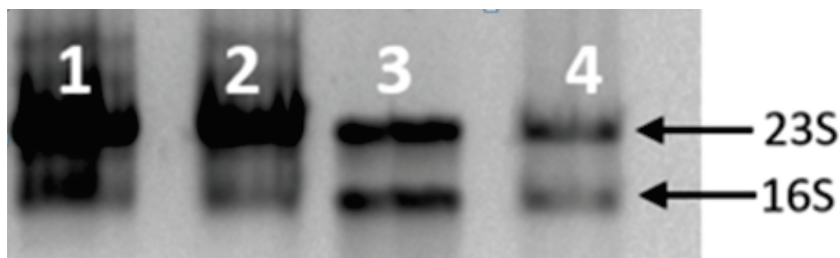


Figura 2. ARN extraído de *B. licheniformis* M2-7. Carriles 1 y 2: ARN de cultivos de 48 h de crecimiento, Carriles 3 y 4: 12 h de crecimiento. Gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (Tris-Acetato 0.04 M y EDTA 1 mM, pH. 8) corrido en un campo de 80 volts.

La implementación de estos métodos de purificación disminuye los costos dado que se evita el uso de Kits de purificación costosos, además, se asegura tener purezas y concentraciones óptimas para cualquier ensayo genómico.

REFERENCIAS

1. Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N. Y. 1989. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620300824>.
2. Koronakis V and Hughes C. (1988). Identification of the promoters directing in vivo expression of hemolysin genes in *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 213:99-104.
3. Damm K, Bach S, Müller KM, Klug G, Burenina OY, Kubareva EA, Grünweller A, Hartmann RK. (2015). Impact of RNA isolation protocols on RNA detection by Northern blotting. *Methods Mol Biol.*1296:29-38. doi: 10.1007/978-1-4939-2547-6_4. PMID: 25791588
4. Rojas-Aparicio A., Hernández-Eligio J. A., Toribio-Jiménez J., Rodríguez-Barrera M. Á., Castellanos-Escamilla M and Romero-Ramírez Y. (2018). Research Article Genetic expression of *pobA* and *fabHB* in *Bacillus licheniformis* M2-7 in the presence of benzo[a]pyrene. *Genet Mol Res* 17. <https://doi.org/10.4238/gmr16039916>.

5. Serrano-Ángel L. I., Segura D., Toribio-Jiménez J., Rodríguez-Barrera M.A., Ortuño Pineda C. and Romero-Ramírez Y. (2020). Carbon storage regulator A (csrA) gene regulates motility and growth of *Bacillus licheniformis* in the presence of hydrocarbons. *Microbiol Biotech Lett* 48(2), 185–192. <https://doi.org/10.4014/mb.1909.09014>.

CONTROL DE LA PUREZA EN EL ADN DE ACTINOBACTERIAS HALÓFILAS

Ninfa Ramírez Durán^{1*}, Horacio Sandoval Trujillo²

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

nramirezd@uaemex.mx

INTRODUCCIÓN

Las actinobacterias halófilas tienen su origen en 1975 con la descripción de la especie *Actinopolyspora halofila*, la cual fue aislada como contaminante de un medio de cultivo que contenía 25 % de NaCl (1). Las actinobacterias halófilas son importantes no solo por tener la capacidad de desarrollarse en ambientes con altas concentraciones de salinidad, sino también por su potencial para producir metabolitos secundarios utilizados en áreas como: medicina, farmacia, microbiología industrial y biotecnología, entre otros (2, 3). Actualmente, existen más de 80 especies descritas como actinobacterias halófilas. El avance en las técnicas de biología molecular y secuenciación genética permite conseguir una identificación precisa a nivel de especie de estos microorganismos, así como su ubicación taxonómica y los productos metabólicos que podemos obtener de ellos. Para llevar a cabo estos procesos, es necesario contar con el material genético (ADN) de la mejor calidad y sin contaminantes. En este capítulo presentamos una metodología que permite asegurar la pureza del ADN obtenido de actinobacterias halófilas antes de secuenciar uno o varios genes o bien su genoma completo.

La técnica está basada en el uso de un par de iniciadores específicos diseñados por Roller y cols. en 1992, mediante los cuales pudieron identificar, dentro del gen rRNA 23S de actinobacterias, la presencia de un “inserto específico” de 100 pares de bases (pb). Concluyeron que este inserto específico es característico de las bacterias Gram positivas con alto contenido de guanina-citocina (GC) (4).

1. Lab de Microbiología Médica y Ambiental. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Edo. Mex.
2. Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Ciudad de México. E-mail: hsandov@correo.xoc.uam.mx

Seguendo las bases de Roller y cols., adecuamos una metodología para la detección del “inserto específico” utilizado como un criterio de pureza del ADN de actinobacterias halófilas. El método propuesto ha sido empleado en la detección de la presencia de actinobacterias patógenas a partir de muestras clínicas y ambientales; en ambos casos ha sido exitoso (5, 6) (figura 1).

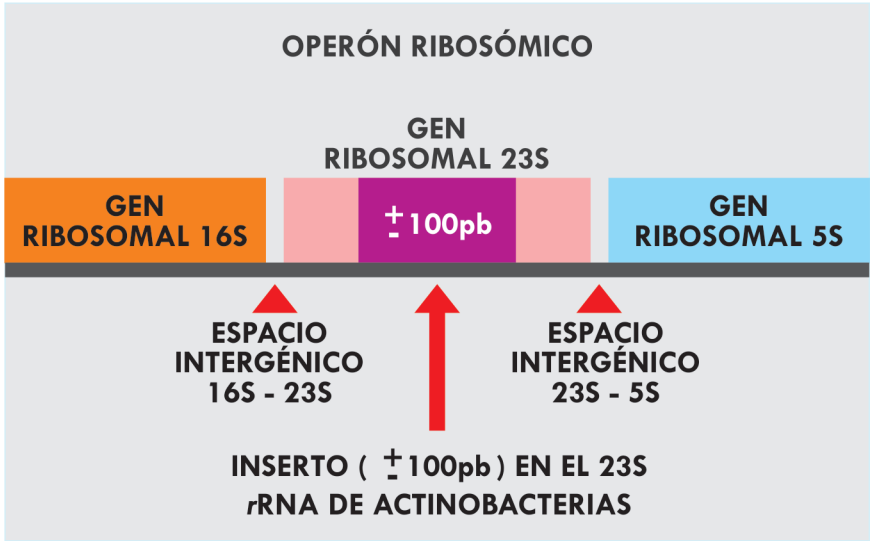


Figura 1. Inserto específico en el operón ribosómico de actinobacterias.

MATERIALES

El material y reactivos, que se utilizarán para la extracción del ADN y la amplificación del fragmento del rRNA 23S que incluye el “inserto específico” de ~ 100 pb presente en actinobacterias halófilas se muestran en las tablas 1 y 2.

REACTIVOS

NECESARIO

■ Un cultivo reciente de una cepa de actinobacteria halófila.	1
■ Kit para extracción de ADN “Promega Wizard® genomic”	1
■ Juego de iniciadores: 23Ins F: 5'-(AC)A(AGT)GCGTAG(AGCT)CGA(AT)GG-3' 23Ins R: 5'-GTG(AT)CGGTTT(AGCT)(GCT)GGTA-3'	1
■ Enzima Taq polimerasa	1
■ Agarosa	1
■ Marcador de tamaño molecular de 1,000 pb	1

Tabla 1. Materiales y reactivos requeridos para la extracción de ADN y amplificación del fragmento del rRNA 23S que incluye el inserto específico de actinobacterias halófilas.

EQUIPO

NECESARIO

■ Centrifuga y microcentrífuga	1
■ Termociclador	1
■ Fotodocumentador	1
■ Cámara de electroforesis horizontal	1

Tabla 2. Equipo necesario para la extracción de ADN y amplificación del fragmento del rRNA 23S que incluye el inserto específico de actinobacterias halófilas.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. Un cultivo puro en medio líquido de actinobacterias halófilas es utilizado para la obtención de biomasa por centrifugación. La biomasa se extrae por raspado de colonias que son recolectadas en un tubo Eppendorf o bien por centrifugación del cultivo a 10,000 rpm, respectivamente en condiciones de esterilidad.
2. Para la obtención de ADN a partir de la biomasa se recomienda el uso del Kit Promega Wizard® genomic”, siguiendo las indicaciones del proveedor.
Se lleva a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el fragmento del rRNA 23S que incluye el “inserto específico” utilizando como templado el ADN obtenido en el paso 2, así como los iniciadores 23Ins F y 23Ins R.
3. Desnaturalización a 94 °C por 45 s. Acoplamiento a 46 °C por 45 s. Elongación a 72 °C por 50 s en 29 ciclos. Un ciclo de post-elongación a 72 °C por 5 min.

4. Los productos de PCR obtenido se someten a una electroforesis en gel de agarosa al 2 %, para su visualización. Para corroborar el tamaño de los amplicones, se incluye un marcador de tamaño molecular de 100-1000 pb.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Las bandas obtenidas de 350 pb corresponden a cepas de actinobacterias halófilas.

Bandas de 250 pb corresponden a eubacterias e indican la ausencia del inserto específico, por lo tanto, indican ausencia de actinobacterias halófilas.

Banda de 350 pb y banda de 250 pb en la misma muestra indica que el ADN obtenido de una actinobacteria halófila está contaminado con la presencia de eubacterias. Se recomienda repetir el cultivo y realizar una nueva extracción de ADN (figura 1).

RESULTADOS

Una vez que se ha realizado la electroforesis en gel de agarosa, el resultado esperado es el que se presenta en la figura 2. La banda de 350 pb que se visualiza en los carriles 1 al 6 corresponde a los amplicones obtenidos del ADN extraído de cepas de actinobacterias halófilas. Las bandas de 250 pb (figura 2, carriles 7 y 8) corresponden a fragmentos amplificados con los oligonucleótidos 23Ins F y 23Ins R a partir de ADN de eubacterias, observándose claramente la ausencia del inserto específico de 100 pb, indicando que el ADN utilizado como molde no pertenece a actinobacterias halófilas (figura 2, carril 7). Mientras que en el carril 8 (figura 2), las bandas de 350 pb y de 250 pb en la misma muestra indica que el ADN obtenido de una actinobacteria halófila está contaminado con la presencia de eubacterias. Para asegurarnos de la pureza del material genético que se utilizará para ensayos moleculares, se recomienda repetir el cultivo y realizar una nueva extracción de ADN.

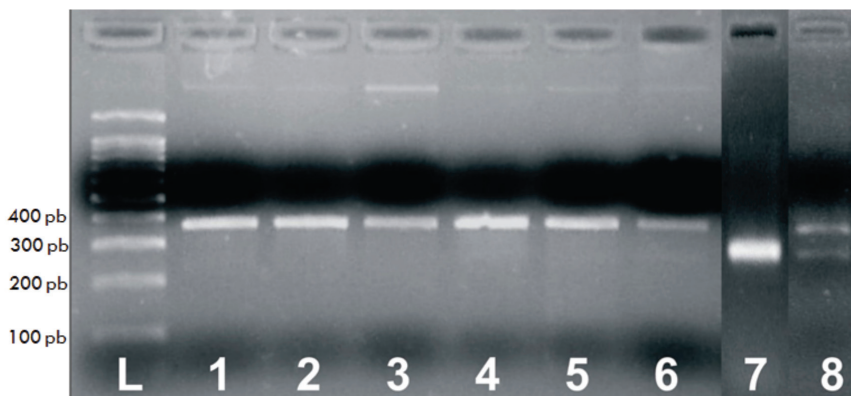


Figura 2. Amplificación del fragmento que contiene el “inserto específico del rRNA de actinobacterias halófilas. L: Marcador de tamaño molecular. 1-6: Amplificación de 360 pb en actinobacterias halófilas. 7: Amplificación de 250 pb de eubacteria. 8. ADN de actinobacteria halófila contaminado con ADN de eubacteria. (Electroforesis en gel de agarosa (2 %)).

APLICACIONES

El método propuesto, puede ser empleado para la detección de actinobacterias aisladas de distintos tipos de ambientes, incluidos los ambientes extremos. Se recomienda su aplicación para la detección de actinobacterias en muestras de ADN como un control de calidad antes de secuenciar genes o genomas a partir de dicho material.

REFERENCIAS

1. Gochnauer MB, Leppard GG, Komaratat P, Kates M, Novitsky T, Kushner DJ. (1975) Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. *Can J Microbiol.* 21(10):1500-11. doi: 10.1139/m75- 222. PMID: 1201505.
2. James R Doroghazi and William W Metcalf. (2013). Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. *BMC Genomics* 14:611. doi. org/10.1186/1471-2164-14-611.
3. Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65(8), 385. doi: 10.1038/ja.2012.27. Epub 2012 Apr 18.

4. RollerC, LudwigW, SchleiferK. (1992) Gram-positive bacteria with a high DNAG+C content are characterized by a common insertion within their23S rRNA genes. *J Gen Microbiol.* 138:1167-75.
5. N. Ramírez-Durán, H. Ramírez-Saad, L. M. Melgoza-Contreras, H. Sandoval. (2006) Amplification of the specific insertion in the rRNA 23S gene, as a criterion of purity in preparation of actinomycetes DNA. *Journal de Mycologie Médicale.* 16(1): 26-29. doi.org/10.1016/j.mycmed.2005.11.001.
6. Salgado, N. Ramírez, E. Sandoval, H. Sandoval. (2008) Fast method for DNA extraction in *Nocardia* and *Saccharomonospora*. *Journal de Mycologie Médicale.* 18(2): 100-102. doi.org/10.1016/j.mycmed.2008.04.005.

AISLAMIENTO DE DNA CROMOSÓMICO DE BACTERIAS TERMÓFILAS

Rosa María Oliart Ros¹, María Guadalupe Sánchez Otero²,
Rodolfo Quintana Castro^{3*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

roquintana@uv.mx

INTRODUCCIÓN

La extracción del material genético de los microorganismos es un punto crucial en el desarrollo de protocolos moleculares. La obtención de DNA en cantidad y calidad suficiente permite desarrollar técnicas como la identificación de bacterias a partir de secuencias conservadas, la clonación de genes y la expresión de sus proteínas en sistemas heterólogos. La recuperación de DNA de termófilos presenta dificultades debido a la constitución de sus paredes celulares, entre otros factores, por lo que los protocolos para mesófilos son poco eficientes. Este protocolo de extracción químico-enzimático muestra mejores rendimientos (1, 2). El presente protocolo ha sido utilizado con éxito para la extracción de DNA cromosómico de microorganismos del género *Bacillus*, con la suficiente pureza para ser utilizado como templado para reacciones de PCR.

1. Laboratorio de Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Veracruz. Av. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar, CP 91897 Veracruz, Ver.
2. Laboratorio de Química y Biotecnología, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana. Carmen Serdán s/n Col. Centro, CP 91000 Veracruz, Ver.
3. Laboratorio de Química Médica y Quimiogenómica, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana. Carmen Serdán s/n Col. Centro, CP 91000 Veracruz, Ver.

MATERIALES

MATERIALES	NECESARIO
■ Matraces Erlenmeyer de 25 mL	2
■ Pipetas automáticas de 1000 μ L, 200 μ L y 50 μ L	1 c/u
■ Microcentrífuga refrigerada	1
■ Incubadora con agitación	1
■ Termoblock	1
■ Microtubos estériles de 2 mL	Varios
■ Espectrofotómetro NanoDrop	1

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO	NECESARIO
■ Amortiguador de resuspensión celular (50 mM TRIS [pH. 8], 50 mM EDTA)	50 mL
■ Amortiguador de lisis 1 (250 mM TRIS [pH 8.0], lisozima 10 mg/mL)	50 mL
■ Amortiguador de lisis 2 (0.5 % SDS, 50 mM TRIS [pH 7.5], 0.4 M EDTA, 1 mg/mL de proteínas a K)	50 mL
■ Fenol equilibrado	50 mL
■ Acetato de sodio 3 M	20 mL
■ Isopropanol	50 mL
■ Etanol al 75 %	50 mL
■ Agua libre de nucleasas	10 mL
■ Cepa cultivada en medio líquido por 12 h	10 mL

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. Recuperar el paquete celular del cultivo en un microtubo por centrifugación a 16,000 g a 4 °C durante 10 min.
2. Resuspender el paquete celular con 800 μ L del amortiguador de resuspensión (50 mM TRIS pH. 8, 50 mM EDTA) incubándose a -10 °C durante 10 min.
3. Adicionar 100 μ L del amortiguador de lisis 1 (250 mM TRIS [pH 8.0], 10 mg/mL lisozima), mezclar e incubar en hielo durante 45 min.
4. Posteriormente adicionar 200 μ L de amortiguador de lisis 2 (0.5 % SDS, 50 mM TRIS [pH 7.5] 0.4 M EDTA, 1 mg/mL de proteinasa K), mezclar e incubar a 50 °C durante 1 h.
5. Adicionar 800 μ L de fenol equilibrado, mezclar por inversión suavemente y centrifugar a 10,000 g durante 15 min a 4 °C.

6. Transferir sobrenadante a un nuevo tubo y adicionar 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y mezclar por inversión suavemente.
7. Incubar en hielo por 10 min, centrifugar a 16,000g a 4 °C por 15 min y recuperar el sobrenadante.
8. Adicionar al sobrenadante 1 volumen de isopropanol e incubar a -20 °C por 1 h.
9. Recuperar el DNA precipitado por centrifugación a 13,000 g a 4 °C por 15 min.
10. Decantar el isopropanol y lavar el precipitado (DNA) con 500 µL etanol 75 % frío y agitar suavemente.
11. Recuperar el DNA lavado por centrifugación a 16,000g a 4 °C por 10 min, decantar y secar la muestra de DNA por evaporación a temperatura ambiente. Se recomienda cubrir la boca del tubo con Parafilm y hacer pequeñas perforaciones con una aguja para evitar contaminación por alguna partícula extraña.
12. Rehidratar el DNA con 30 µL de agua libre de nucleasas.
13. Leer la Absorbancia de la muestra en el NanoDrop.

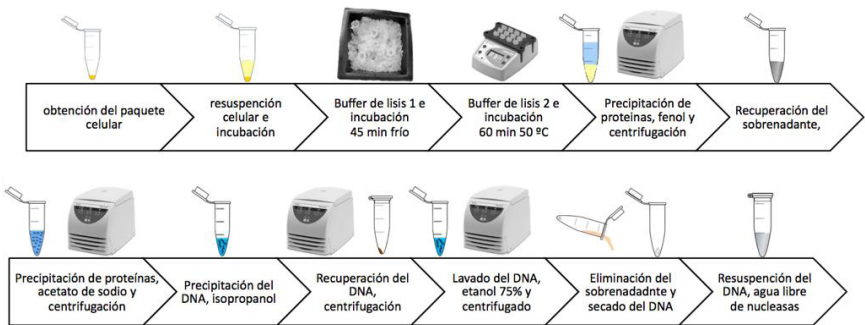


Figura 1. Esquema general para la de extracción de DNA.

RESULTADOS

La evaluación de la concentración y pureza del DNA en disolución se podrá realizar mediante la lectura de la Absorbancia en el equipo NanoDrop™ o en un espectrofotómetro convencional de luz UV, de acuerdo con la tabla 1.

LONGITUD DE ONDA	PARÁMETRO	CRITERIO
260/280	Pureza	≥1.8-2.1 Pureza óptima
		≥1.6-1.7 Pureza aceptable
		<1.6 Contaminación con fenol
		>2.1 Contaminación con RNA
260/230	Pureza	> 2.0-2.2 pureza óptima
		> 1.8 Pureza aceptable
		< 1.8 Contaminación con fenol, sales o carbohidratos
		< 1.5 Alta contaminación con fenol, sales o carbohidratos
260	Concentración	1.0 OD = 50 µg de DNA/mL

Tabla 1. Criterios de pureza y concentración de DNA.

Se recomienda hacer una tabla con las lecturas de Absorbancia a las distintas longitudes de onda y la cuantificación en ng/µL (tabla 2).

Muestra	Concentración	Abs. 260 nm	Abs. 280 nm	260/280	260/230

Tabla 2. Lecturas de absorbancia, cuantificación y cocientes de pureza del ADN.

También es conveniente realizar una electroforesis en gel de agarosa al 0.7-1.0 % y 95 V durante 60 min para verificar la presencia de DNA cromosómico, su integridad y la presencia o ausencia de RNA en la muestra (figura 2) (4).

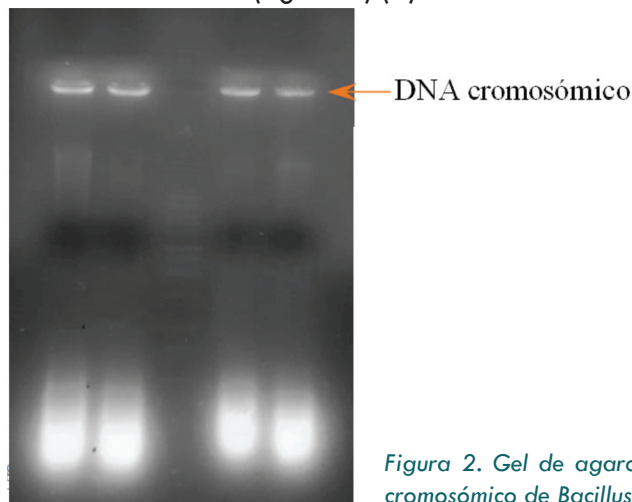


Figura 2. Gel de agarosa al 1.0 % de DNA cromosómico de *Bacillus licheniformis*.

El presente protocolo resulta útil para la recuperación de DNA cromosómico de microorganismos que pueden tener comportamiento como Gram-variable o microorganismos de vida libre cuya composición de la pared celular resulta un obstáculo para los protocolos convencionales de extracción de DNA.

1. König, H., Claus, H., & Akca, E. (2004). Cell wall structures of mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic Archaea. In *Origins* (pp. 281-298). Springer, Dordrecht.
2. Marchant, R., Banat, I. M., Rahman, T. J., yBerzano, M. (2002). The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environ Microbiol* 4(10):595-602.
3. Platform of the CIT Program (Carte d'Identité de Tumeurs)DNA/RNA extraction & Qualification. Quality Control. https://cit.ligue-cancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-%20QC%20PF%20Saint-Louis%207%20avril%2009.pdf.
4. Zumaya Hernández, Emmanuel Israel (2020). *Recuperación y caracterización del gen lipbluv de Bacillus licheniformis* (Tesis de pregrado). Universidad Veracruzana, Veracruz, México.

EXTRACCIÓN DE DNA METAGENÓMICO DEL AMBIENTE RUMINAL

Beatriz Elena Castro Valenzuela¹, Perla Lucía Ordóñez Baquera^{1*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

plordonez@uach.mx

INTRODUCCIÓN

La microbiota del rumen es una comunidad microbiana muy importante en el tracto gastrointestinal de los rumiantes (1). Un paso crítico para el análisis molecular de la microbiota de rumiales es partir de una preparación de DNA de buena calidad ya sea para secuenciación del gen 16S rRNA o para secuenciación Shotgun. Se han diseñado diferentes kits de extracción especializados para diferentes tipos de muestras, sin embargo, para muestras ruminales aún no se han desarrollado (2). Debido a lo anterior se estandarizó una técnica para extracción de DNA de buena calidad a partir de muestras de líquido ruminal utilizando un kit especializado para muestras de heces (3) que, de las opciones existentes, es la que tiene mayor parecido. Con las adecuaciones realizadas, este método ha sido implementado exitosamente para la obtención de DNA metagenómico, el cual presentó una calidad adecuada para realizar secuenciación de alta eficiencia tipo shotgun, y a partir del análisis bioinformático se han podido identificar diferentes tipos de microorganismos como bacterias, arqueas, levaduras e incluso virus.

El líquido ruminal es una matriz muy heterogénea y con un alto contenido de fibras por lo que se parte de un gran volumen inicial de muestra para tener la mayor cantidad de representación de la microbiota. Previo a la extracción de DNA, la muestra se debe centrifugar para precipitar el mayor contenido celular posible. A partir de ese concentrado se inicia la extracción por medio de lisis celular de bacterias, levaduras, protozoarios, arqueas e incluso virus presentes en la microbiota ruminal. Después del lisado los inhibidores de PCR así como las

1. Laboratorio de nutrición animal, Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua. Km 1 Perif. R. Almada Chihuahua, Chihuahua.

DNASas que puedan estar presentes en la muestra son adsorbidos en una matriz especializada y se separan del DNA por medio de centrifugación, finalmente el DNA se purifica por un sistema de filtros contenidos en microcolumnas.

MATERIALES Y EQUIPO

La extracción de DNA de la microbiota ruminal se realizó con un kit especial para extracción de DNA a partir de muestras de heces para humano (QIAamp® DNA Stool, QIAGEN). Se utilizó el aparato de extracción a partir de grandes volúmenes de muestras con ligeras modificaciones.

MATERIALES	NECESARIO
▪ Tubos cónicos de 15 mL	1
▪ Refrigerador 4 °C	1
▪ Centrífuga	1
▪ Balanza analítica	1
▪ Vórtex	1
▪ Microtubo de 2 mL	6
▪ Baño María	1
▪ Microcentrífuga	1
▪ Tijeras	1
▪ Juego de micropipetas	1
▪ Microtubo de 1.5 mL	3
▪ Columna spin QIAamp®	1
▪ Congelador -20 °C	1

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO

NECESARIO

■ Líquido ruminal (muestra a analizar)	15 mL
■ Amortiguador ASL (QIAamp®)	10 mL
■ Agua para baño María	5 L aprox
■ Tableta InhibitEx (QIAamp®)	1
■ Proteinasa K	30 µL
■ Amortiguador AL (QIAamp®)	400 µL
■ Amortiguador AW1 (QIAamp®)	500 µL
■ Amortiguador AW2 (QIAamp®)	500 µL
■ Etanol al 96 - 100 %	200 µL
■ Amortiguador AE (QIAamp®)	30 µL

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. Se recolectan aproximadamente 15 mL de líquido ruminal en un tubo cónico nuevo y estéril y se almacena a -20°C hasta el momento de realizar la extracción de DNA.
2. Colocar la muestra a 4°C durante 24 h antes de comenzar la extracción de DNA y una vez transcurrido este tiempo se pasa a temperatura ambiente.
3. Centrifugar la muestra a 3500 rpm a 4°C durante 15 min, se descarta el sobrenadante y se trabaja con el sedimento, que debe pesar aproximadamente un gramo.
4. Al sedimento obtenido de la muestra de líquido ruminal se le agregan diez volúmenes de amortiguador ASL (QIAamp®; 10 mL de amortiguador por un 1 g de líquido ruminal). Mezclar con agitador tipo vórtex vigorosamente durante un minuto o hasta que la muestra esté totalmente homogénea. NOTA: Es importante mezclar con vórtex a la muestra completamente homogénea. Esto ayuda a asegurar la obtención de la concentración máxima de DNA en el paso de elución.
5. Agregar 2 mL del lisado en un tubo nuevo y estéril de 2 mL. Se recomienda cortar la punta para manejar el material viscoso más fácilmente.
6. Calentar la suspensión a 95°C por 15 minutos en baño María que cubra todo el contenido del tubo.
7. Mezclar con agitador tipo vórtex por 15 s y centrifugar a velocidad máxima a temperatura ambiente durante 1 min.

8. Recuperar todo el sobrenadante, colocarlo en un tubo nuevo de 2 mL y descartar el precipitado.
9. Adicionar una tableta InhibitEx (QIAamp®) a la muestra y dar mezclar con agitador tipo vórtex inmediatamente hasta disolver completamente y durante 1 min o hasta que la tableta está completamente suspendida.
10. Incubar la suspensión a temperatura ambiente durante 1 min para permitir que los inhibidores se absorban en la matriz de la tableta InhibitEx (QIAamp®).
11. Centrifugar la muestra a velocidad máxima a temperatura ambiente por 3 min para permitir que las partículas de la pastilla del líquido ruminal y los inhibidores se unan a la matriz de la tableta.
12. Recuperar todo el sobrenadante dentro de un nuevo tubo de 1.5 mL y descartar el precipitado. Centrifugar la muestra a velocidad máxima a temperatura ambiente por 3 min.
13. Agregar 30 µL de proteinasa K en un tubo nuevo y estéril de 1.5 mL.
14. Agregar 400 µL del sobrenadante del paso 12 en el tubo con proteinasa.
15. Adicionar 400 µL de amortiguador AL (QIAamp®) y mezclar con agitador tipo vórtex durante 15 s. NOTA: La muestra y el amortiguador de AL (QIAamp®) se deben mezclar para formar una solución homogénea.
16. Incubar a 70 °C por 15 min.
17. Adicionar 200 µL de etanol (96 - 100 %) al lisado y mezclar con agitador tipo vórtex.
18. Centrifugar brevemente a temperatura ambiente para remover las gotas del interior de la tapa del tubo.
19. Colocar una columna spin QIAamp® en un tubo de 2 mL. Aplicar cuidadosamente el lisado completo del paso 17 a la columna. Cerrar la tapa y centrifugar a velocidad máxima a temperatura ambiente por 1 min. Colocar la columna en un tubo nuevo de colección y descartar el filtrado.
20. Cuidadosamente abrir la columna y adicionar 500 µL de amortiguador AW1 (QIAamp®). Cerrar la tapa y centrifugar a velocidad máxima a temperatura ambiente por 1 min. Colocar la columna QIAamp® en un nuevo tubo y descartar el filtrado.

21. Cuidadosamente abrir la columna y adicionar 500 μL de amortiguador AW2 (QIAamp®). Cerrar la tapa y centrifugar a velocidad máxima a temperatura ambiente durante 3 min. Descartar el tubo de colección que contiene el filtrado.
22. Se recomienda colocar la columna en un tubo de 2 mL nuevo y descartar el viejo con el filtrado. Centrifugar a velocidad máxima a temperatura ambiente durante 1 min.
23. Transferir la columna a un tubo nuevo de 1.5 mL. Cuidadosamente abrir la tapa y pipetear 30 μL de amortiguador AE (QIAamp®) directamente sobre la membrana del QIAamp®. Cerrar la tapa e incubar a temperatura ambiente 1 min. Centrifugar a velocidad máxima a temperatura ambiente durante 1 min para eluir el ADN.
24. Almacenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

RESULTADOS

La calidad del DNA extraído se puede observar en un gel de agarosa a 1 % sometido a electroforesis el cual podrá observarse de la siguiente manera:

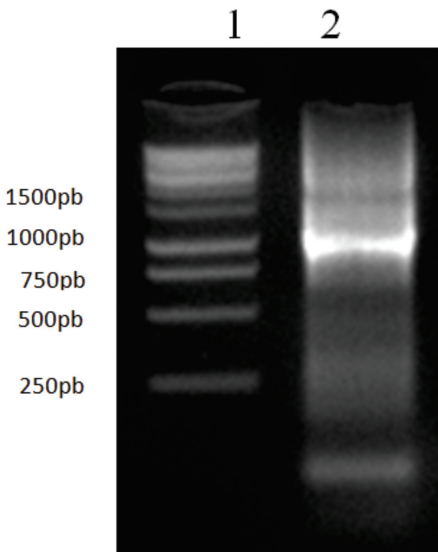


Figura 1. DNA extraído a partir de líquido ruminal en gel de agarosa al 1%. Columna 1 Marcadores de tamaño molecular. Columna 2 DNA total extraído, se observa la banda con mayor intensidad correspondiente al DNA total extraído.

Este método de extracción puede ser usado para estudios de metagenómica de cualquier especie rumiante e incluso para fermentación ruminal *in vitro* ya que la calidad de DNA obtenido permite que se puedan hacer secuenciaciones de alta eficiencia tipo shotgun o bien para la secuenciación y/o amplificación por PCR del gen rRNA 16S para la identificación de bacterias del ambiente ruminal.

REFERENCIAS

1. BiscariniF, PalazzoF, CastellaniF, MasettiG, GrottaL, et al. (2018). Rumen microbiome in dairy calves fed copper and grape-pomace dietary supplementations: Composition and predicted functional profile. PLOS ONE 13(11): e0205670.
2. Aphale D, Kulkarni A. (2018). Modifications and optimization of manual methods for polymerase chain reaction and 16S rRNA gene sequencing quality community DNA extraction from goat rumen digesta. Vet World 11(7):990-1000.doi:10.14202/vet-world.2018.990-1000.
3. QIAamp® DNA Stool Handbook For DNA purification from stool samples <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c8fe97e7-78cc-4275-bbac-72c9b7c3de38&lang=en> Consultado el 13 de febrero del 2021.

7 MÉTODOS DE CIENCIAS ÓMICAS: GENÓMICA,
TRANSCRIPTÓMICA, PROTEÓMICA.

MANUAL PARA LA PREPARACIÓN DE BIBLIOTECAS DEL GEN 16S ARNr PARA SECUENCIACIÓN ILLUMINA

Santiago Cadena¹, Abril M. Gamboa Muñoz¹, José Q. García Maldonado^{2*}

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

jose.garcia@cinvestav.mx

INTRODUCCIÓN

El gen 16S ARNr es el marcador molecular más utilizado en el estudio de comunidades microbianas (1). La secuenciación masiva del gen 16S ARNr es una herramienta poderosa que proporciona información relevante de los microorganismos procariontes hacia la comprensión del funcionamiento de los ecosistemas (2, 3). El proceso completo consiste en la extracción de ADN y amplificación mediante PCR de la muestra; preparación de bibliotecas; la secuenciación por sí misma y el análisis bioinformático (4). Independientemente del método de secuenciación utilizado, todas las tecnologías requieren de una elaboración de bibliotecas para secuenciación, las cuales son cargadas dentro del secuenciador. Así, la correcta preparación de bibliotecas es fundamental para la obtención de resultados de calidad (4, 5).

En general, los pasos clave en la preparación de bibliotecas son: 1) obtención de productos de PCR de calidad; 2) limpieza de los amplicones; 3) incorporación de índices; 4) cuantificación y normalización de la biblioteca; 5) desnaturalización de la biblioteca y 6) carga en el equipo (figura 1) (6). El objetivo de este manual es proveer una guía ordenada para la preparación de bibliotecas de amplicones del gen 16S ARNr, para su secuenciación en la plataforma MiSeq de Illumina. Este método ha sido ampliamente utilizado para la exploración de las comunidades microbianas en diferentes ecosistemas, principalmente marinos e hipersalinos.

1. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Recursos Del Mar, Unidad Mérida, Yucatán, México.
2. CONACYT-CINVESTAV, Departamento de Recursos Del Mar, Unidad Mérida, Yucatán, México.

La preparación de bibliotecas de secuenciación comienza con la obtención de productos de PCR del gen 16S ARNr de muestras ambientales. A continuación, se enlistan los materiales necesarios para la preparación de bibliotecas (tabla 1).

CONSUMIBLES Y EQUIPOS GENERALES	PCR	LIMPIEZA DE AMPLICONES	INCORPORACIÓN DE ÍNDICES	DESATURALIZACIÓN DE LA BIBLIOTECA
Micropipetas y puntas	2 × Phusion High-Fidelity Master Mix (Thermo Scientific)	Tris 10 mM pH 8.5	2 × Phusion High-Fidelity Master Mix (Thermo)	Buffer de resuspension (RSB) 610 mM Tris pH 8.5
Viales (250 y 1000 µl)	Primer F con adaptador Illumina	Perlas AMPure XP (Beckman Coulter)	Kit de índices Nextera XT (Illumina)	HT1 (Buffer de hibridación)
Termociclador	Primer R con adaptador Illumina	Etolol (EtOH) 80 % recién preparado	Agua grado molecular	NaOH 0.2 N fresco
Electroforesis capilar (QIAxcel, bioanalyzer, etc.)	Agua grado molecular	Soporte magnético	Gradilla TruSeq (opcional)	PhiX Control Kit v3
Fluorómetro (Qubit)				Cartucho MiSeq

Tabla 1. Lista de materiales, equipos y reactivos utilizados en los distintos pasos para la preparación de bibliotecas de secuenciación del gen 16S ARNr por Illumina.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Obtención de los productos de PCR y primera purificación

1. Realizar la amplificación del gen 16S ARNr con los cebadores 16S Forward/16S Reverse, que incluyen los adaptadores para secuenciación de Illumina (7). Cada reacción de PCR (20 µL) se realiza con 2 µL de ADN (~5ng/µL), 0.5 µL de cada cebador (10 µM) y 10 µL de 2×Phusion High-Fidelity Master Mix (Thermo Scientific). Para el caso de los cebadores 341F y 805R (7), la amplificación se realiza con una desnaturalización inicial a 95 °C – 3 min, con 25 ciclos de 95 °C – 30 s, 55 °C – 30 s, 72 °C – 30 s y una extensión final a 72 °C – 5 min, finalmente se verifica el tamaño del amplicón (~550pb) en el sistema QIAxcel Advanced o por geles de agarosa (1 %) (figura 2).
2. Para la purificación, se requiere transferir el producto de PCR (~25 µL) a un tubo de 1.5 mL, posteriormente agregar 20 µL de perlas AM PureXP (Beckman Coulter), y mezclar suavemente con la pipeta e incubar a temperatura ambiente por 5 min. Colocar

el tubo en un soporte magnético durante 2 min, transcurrido el tiempo retirar y desechar el sobrenadante, sin tocar las perlas adheridas al magneto.

3. Realizar dos lavados con 195 μL de etanol al 80 %, incubar en el soporte magnético durante 30 segundos, retirar el etanol y desechar el sobrenadante. Al final del segundo lavado, hay que asegurar que se retire el exceso de etanol. Dejar secar las perlas a temperatura ambiente durante 5 min, retirar el tubo del soporte magnético y añadir 52.5 μL de Tris 10 mM a pH 8.5. Posteriormente mezclar suavemente con la pipeta e incubar a temperatura ambiente durante 2 min. Colocar el tubo en el soporte magnético durante otros 2 min y transferir a un tubo limpio 50 μL del sobrenadante sin tocar las perlas.

Incorporación de índices (Segundo PCR) y segunda purificación

4. Utilizando el kit de índices NexteraXT (Illumina), se prepara una única combinación de índices 1N (i7) y 2S (i5) para cada muestra. La reacción de PCR (25 μL) se realiza con 5 μL del producto purificado, 2 μL de cada índice (N y S) previamente asignados a cada muestra y 12.5 μL de 2 \times Phusion Flash High-Fidelity MasterMix (Thermo Scientific). El programa del termociclador es el mismo que en la amplificación del gen 16S ARNr, pero con 8 ciclos.
5. Realizar la segunda purificación de la biblioteca como se describió anteriormente en la primera amplificación, usando 28 μL de perlas AMPure XP (Beckman Coulter) y 22.5 μL de Tris 10 mM a pH 8.5. Finalmente, validar la biblioteca con 1 μL del producto purificado en el sistema QIAxcel Advanced (QIAGEN), se esperan fragmentos de \sim 630 pb (figura 2).

Cuantificación y normalización de la biblioteca

6. Cuantificar cada biblioteca mediante el uso del fluorómetro Qubit 3.0 (Life Technology) y calcular la concentración de las bibliotecas (nM) (figura 3), basado en el tamaño medio de los amplicones (tabla 2) según lo determinado por el sistema QIAxcel Advanced (QIAGEN).

7. Diluir cada biblioteca a 4 nM con Tris 10 mM pH 8.5 y tomar alícuotas de 5 μ L para obtener un pool de la biblioteca final con índices únicos (tabla 2).

Desnaturalización y dilución de la biblioteca del pool 16S

8. Mezclar 5 μ L del pool 16S (4 nM) y 5 μ L de NaOH a una concentración 0.2 N. Posteriormente, incubar por 5 min a temperatura ambiente, adicionar 5 μ L de RSB para detener la desnaturalización y agregar 990 μ L de la solución HT1 para obtener una concentración final de 20 pM y mantener en hielo.
9. Mezclar 300 μ L del pool 16S desnaturalizado con 300 μ L de HT1 para obtener una concentración final de 10 pM y mantener en hielo. La concentración recomendada de la biblioteca es de 8-12 pM.

Desnaturalización y dilución del control PhiX

10. Mezclar 2 μ L de PhiX [10nM] con 3 μ L de Tris 10 mM a pH 8.5, para obtener una dilución de 4 nM, adicionar 5 μ L de NaOH a 0.2 N, incubar por 5 min a temperatura ambiente y agregar 990 μ L de la solución HT1 para obtener una concentración de 20 pM.
11. Diluir la solución del PhiX a la misma concentración que la biblioteca 16S [10pM], invertir varias veces el tubo, dar un pulso de centrifuga y mantener en hielo.

Combinación de la biblioteca del pool 16S y el control PhiX

12. Seleccionar el porcentaje deseado de PhiX, generalmente se utiliza 5 % de PhiX. Mezclar 570 μ L de la biblioteca 16S y 30 μ L PhiX, ambos a 10 pM y mantenerla mezcla en hielo, posteriormente incubar a 96 °C por 2 min, inmediatamente invertir el tubo y colocar en hielo por 5 min y finalmente cargar 600 μ L en el cartucho Illumina.
13. Una vez cargado el pool de bibliotecas en el cartucho Illumina, se introduce el cartucho en el secuenciador. La corrida de secuenciación puede durar entre 1-3 días y la secuenciación exitosa dependerá de una correcta preparación de las bibliotecas.

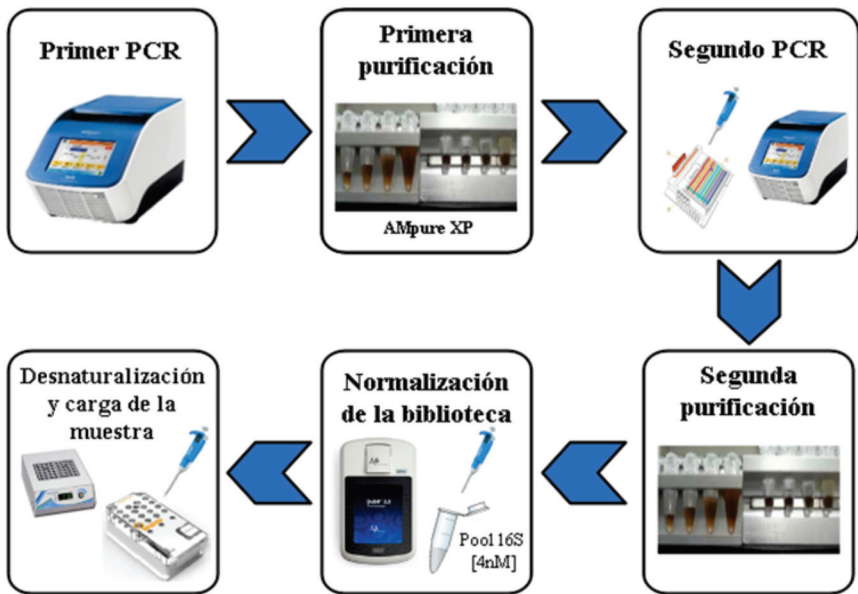


Figura 1. Esquema del proceso seguido para la preparación de bibliotecas a partir del gen 16S ARNr.

RESULTADOS

Visualización de los productos de PCR del gen 16S ARNr y la adición de índices para secuenciación Illumina.

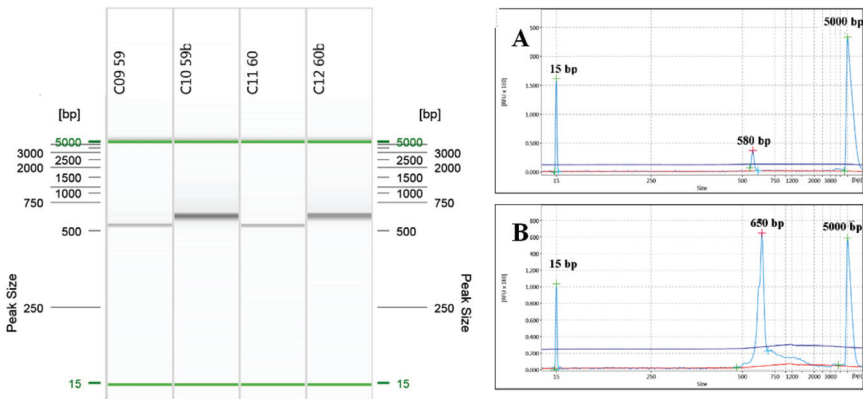


Figura 2. En la imagen de la izquierda se muestra el primer y segundo PCR del gen 16S ARNr en dos muestras ambientales, se aprecia la diferencia de tamaños entre ambas amplificaciones. En los electroferogramas (derecha) se distinguen bandas específicas de tamaño 580 pb en el primer PCR (A) y al incorporar los índices Nextera XT el amplicon presenta un tamaño de 650 pb (B).

$$[nM] = \frac{\left[\text{ADN} \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \right]}{\left(660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) (\text{tamaño medio de biblioteca})} \times 10$$

Fórmula para el cálculo de la concentración (nM) de la biblioteca (*).

Cantidad de muestra requerida para diluir a 4 nM. *Cantidad de Tris requerido para dilución.

No.	Muestra	Índice P5 (S)	Índice P7 (N)	ADN [ng/ul]	QUBIT [ng/ul] 2doPurificado	1er PCR (pb)	2o PCR Index (pb)	Molaridad (nM) *	ul/muestra (4 nM)**	ul Tris pH=8.5***
1	TO-M5	513	701	4.7	5.48	494	561	14.6	13.7	36.3
2	TO-M6	513	702	4.3	2.4	496	563	6.4	18.8	11.2
3	TO-M7	513	703	3.9	3.43	494	577	9.1	22.0	28.0
4	TO-M8	513	704	2.2	1.96	513	571	5.2	15.4	4.6
							568			
							promedio			

Tabla 2. Registro de datos necesarios en cada etapa para la preparación de bibliotecas.

Este protocolo ha sido de gran utilidad para la caracterización de comunidades microbianas en el Golfo de México y en ambientes hipersalinos de Baja California Sur y de la península de Yucatán. Sin embargo, se espera que este método sea implementado próximamente en otros laboratorios para incrementar el conocimiento de la diversidad microbiana y su contribución al funcionamiento de los ecosistemas, principalmente en arrecifes coralinos donde esta información es muy escasa.

REFERENCIAS

1. Case R. J., Boucher Y., Dahllöf I., (2007) Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* 73:278–288. <https://doi.org/10.1128/AEM.01177-06>
2. Pichler M., Coskun Ö. K., Ortega-Arbulú A. S., (2018) A 16S rRNA gene sequencing and analysis protocol for the Illumina MiniSeq platform. *Microbiology Open* 7:1–9. <https://doi.org/10.1002/mbo3.611>
3. Sanschagrín S., Yergeau E. (2014) Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. *J Vis Exp* 3–8. <https://doi.org/10.3791/51709>

4. Hess J. F., Kohl T. A., Kotrová M., (2020) Library preparation for next generation sequencing: A review of automation strategies. *Biotechnol Adv* 41:107537. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107537>
5. Head S. R., Kiyomi-Komori H., LaMere S. A., (2014) Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *Biotechniques* 56:61–77. <https://doi.org/10.2144/000114133>
6. Amplicon PCR, Clean-Up PCR, Index PCR (2013) 16S metagenomic sequencing library preparation, pp 1–28. <https://web.uri.edu/gsc/files/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf>
7. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöcker F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and nextgeneration sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 41(1):1–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>.

8

**MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS. SIMULACIÓN
MOLECULAR, MODELADO MOLECULAR**

PREDICCIÓN Y ANÁLISIS DE MODELOS DE PROTEÍNAS

Graciela Espinosa Luna^{1*}, Aarón Salvador Bustos Baena¹, Rosa María Oliart Ros¹

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

D14020001@veracruz.tecnm.mx

INTRODUCCIÓN

La predicción de un modelo de la estructura tridimensional de una proteína y el análisis *in silico* de la misma, constituyen herramientas muy útiles para la comprensión de su función molecular, su historia evolutiva, mejorar sus propiedades, hacer análisis de mutaciones y predecir la acción de ligandos. La estimación y análisis de las propiedades fisicoquímicas de una proteína puede ayudar en la elección del método de purificación y en su tratamiento, especialmente la selección del valor de pH más adecuado y la posibilidad del uso de aditivos, además de aplicaciones como el diseño racional de fármacos. Existen cada vez más servidores gratuitos basados en redes neuronales donde, a partir de diferentes combinaciones de las variables de plegamiento, se obtiene una estructura terciaria funcional de la proteína. Existen dos métodos para predecir el modelo, uno es *ab initio* y se basa en el uso de algoritmos para obtener el plegamiento de una proteína a partir únicamente de su secuencia, y el otro es por homología, donde se compara la secuencia de aminoácidos en bases de datos como PSI-BLAST del Protein Data Bank, se elige la de mayor identidad, y su modelo cristalográfico se utiliza como molde para definir las interacciones. Es importante señalar que la calidad del modelo obtenido es crucial para tener resultados confiables. El método de modelado aquí propuesto ha sido utilizado con éxito en la predicción de la estructura tridimensional de una carboxilesterasa (1) producida por el termófilo *Geobacillus thermoleovorans* CCR11,

1. Laboratorio de Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Veracruz. Av. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar, CP 91897 Veracruz, Ver.

para el reconocimiento de los dominios como la tapa, la cavidad hidrofóbica y el sitio activo, así como la identificación del plegamiento canónico α/β hidrolasa.

MATERIALES Y EQUIPO

MATERIALES	NECESARIO
▪ Computadora personal	1
▪ Software de visualización USFC ChimeraX instalado https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/	1
▪ Conexión a internet	1
▪ Cuenta de correo electrónico institucional	1
▪ Archivo en formato FASTA con la secuencia de aminoácidos de la proteína de estudio	1

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. Solicitar la predicción del modelo en tres servidores diferentes: RaptorX, Robetta y I-Tasser. La dirección de RaptorX es <http://raptorx.uchicago.edu> ahí seleccionar la opción RaptorXStructurePrediction (2). No es necesario registrarse en la página, se requiere un correo electrónico para recibir los resultados posteriormente. La dirección de Robetta es <https://robeta.bakerlab.org> y se requiere registro previo para obtener un nombre de usuario y contraseña. En la pestaña Structure Prediction y Submit, se rellena el formulario y se envía el trabajo. La dirección de I-Tasser es <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> y se requiere registro previo (3). La secuencia de aminoácidos de la proteína se copia y pega en formato FASTA, se escribe la contraseña y se envía el trabajo. La respuesta de los servidores puede tardar desde algunas horas hasta días o semanas.
2. Visualizar los modelos con USFC ChimeraX (4). Es posible resolver las dudas acerca del uso de ChimeraX con el tutorial (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/tutorials.html>). En ChimeraX cargar el archivo con File – Open; visualizar como superficie con Actions – Surface – Show; visualizar los parches hidrofóbicos en la superficie con Presets – Interactive 3; guardar el archivo como imagen.

3. Evaluar la calidad de los modelos obtenidos (pueden ser uno o hasta cinco según el servidor utilizado) con el servidor MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu>) cargando el archivo del modelo con extensión PDB desde la computadora (5).
4. Calcular los parámetros fisicoquímicos de la proteína en la página de ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) (6) con la secuencia de aminoácidos, así como en la página Protein Calculator (<http://protecalc.sourceforge.net>). Comparar la información obtenida de ambos servidores.

RESULTADOS

En las siguientes imágenes se muestra: (figura 1) un modelo en USFC ChimeraX y sus parches hidrofóbicos en naranja; (figura 2) los resultados del análisis de contactos y geometría del modelo generados por MolProbity; y (figura 3) la gráfica de Ramachandran del modelo.

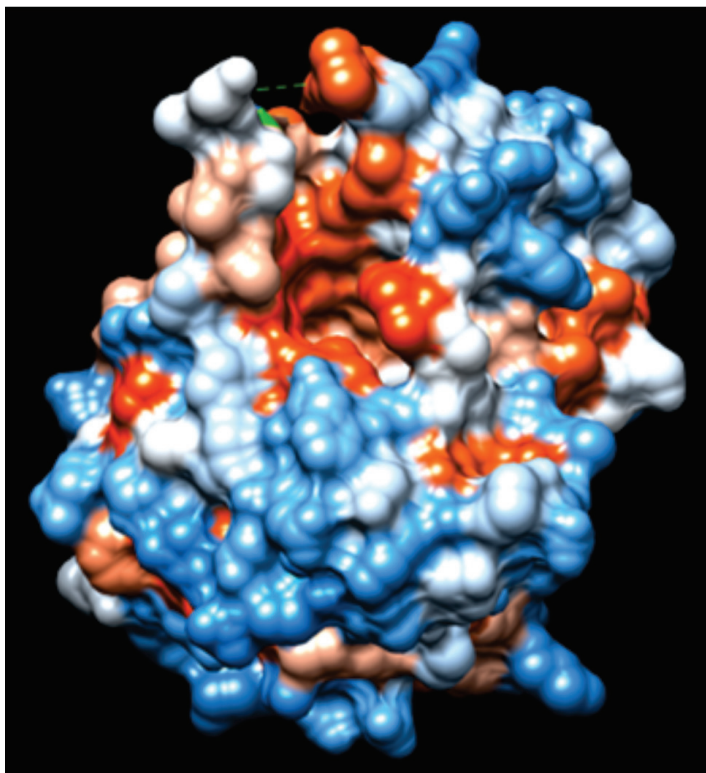


Figura 1. Modelo de superficie y parches hidrofóbicos por USFC ChimeraX.

Summary statistics

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	4.12	89 th percentile* (N=283, 1.20Å ± 0.25Å)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.		
Protein Geometry	Poor rotamers	1	0.48%
	Favored rotamers	206	98.56%
	Ramachandran outliers	0	0.00%
	Ramachandran favored	234	96.69%
	Rama distribution Z-score	-0.34 ± 0.46	Goal: abs(Z score) < 2
	MolProbity score [†]	1.39	84 th percentile [†] (N=1439, 1.20Å ± 0.25Å)
	Cβ deviations >0.25Å	0	0.00%
	Goal: 0		
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 16	0.00%
	Goal: 0%		
	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%		
	Additional validations	Chiral volume outliers	0/306
	Waters with clashes	2/234	0.85%
			See UnDowser table for details

In the two column results, the left column gives the raw count, right column gives the percentage.

* 100th percentile is the best among structures of comparable resolution; 0th percentile is the worst. For clashscore the comparative set of structures was selected in 2004, for MolProbity score in 2006.

[†] MolProbity score combines the clashscore, rotamer, and Ramachandran evaluations into a single score, normalized to be on the same scale as X-ray resolution.

Key to table colors and cutoffs here: [?](#)

Figura 2. Análisis de contactos y geometría del modelo, por MolProbity.

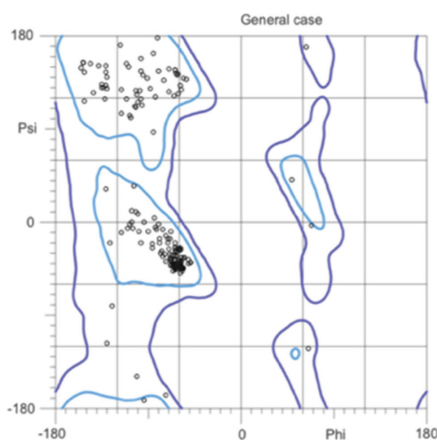


Figura 3. Gráfico de Ramachandran para el modelo predicho.

Además de estas imágenes, se puede elaborar una tabla comparativa de los parámetros fisicoquímicos obtenidos en los servidores ProtParam y ProtCalc. Pregunta de apoyo: ¿Cuáles son los ángulos Psi y Phi que se presentan en la gráfica de Ramachandran?

Los resultados obtenidos con la metodología propuesta sirven como punto de partida para explorar el acoplamiento molecular de uno o varios ligandos de interés con la proteína modelada, para tal fin se requiere el uso de otros servidores como AutoDock Vina, Molegro Virtual Docker y GOLD Protein Ligand Docking Software.

1. Espinosa-Luna, G., Sánchez-Otero, M. G., Quintana-Castro, R., Matus-Toledo, R. E., & Oliart-Ros, R. M. (2016). Gene cloning and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 carboxylesterase CaesCCR11, a new member of family XV. *Molecular biotechnology*, 58(1), 37-46.
2. Källberg M., Wang H., Wang S., Peng J., Wang Z., Lu H., Xu J. (2012) *Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server*; Nature Protocols. <http://raptorx.uchicago.edu>.
3. Yang J., Zhang Y. (2015) *I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions*; Nucl Ac Res. <https://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>.
4. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis; *JComput Chem*.<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>.
5. Williams C. J., Headd J. J., Moriarty N. W., Prisant M. G., Videau L. L., Deis L. N., ... & Richardson D. C.; (2018) *MolProbity: More and better reference data for improved all atom structure validation*; Protein Science. <http://molprobity.biochem.duke.edu>.
6. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D., Bairoch A. (2005). *Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server*; The Proteomics Protocols Handbook. <https://web.expasy.org/protparam/>.

9 ANEXOS. MÉTODOS GENERALES DE BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO

ANEXO 1

PREPARACIÓN DE MATERIAL, LIMPIEZA Y ESTERILIZACIÓN

Ma. Nieves Trujillo Tapia

INTRODUCCIÓN

Cualquier trabajo de investigación requiere de una buena preparación de material a utilizar, para garantizar la reproducibilidad y la reducción de errores durante el desarrollo de cualquier protocolo. El trabajo de identificación, aislamiento de microorganismos de cualquier tipo y/o función de las biomoléculas que producen requiere de medidas de limpieza y esterilización más estricta para garantizar resultados confiables.

Hasta el momento, existe una amplia variedad de limpiadores que remueven todo tipo de suciedad, que se incluyen ingredientes que pueden ser: solubles e insolubles en agua, orgánicos e inorgánicos.

Un producto limpiador debe de realizar alguno de los siguientes procesos:

Emulsificación de grasas: las grasas son suspendidas en el agua.

Saponificación de las grasas: las grasas se solubilizan en agua.

Surfactación: se reduce la tensión superficial del agua para permitir una mejor penetración en la suciedad.

Dispersión o defloculación: ruptura de los agregados de suciedad en pequeñas partículas.

Suspensión: mantener las partículas insolubles suspendidas en el agua.

Peptización: ruptura de proteínas.

1. LAVADO DEL MATERIAL DE VIDRIO (FRASCOS Y CAJAS DE PETRI)

2. Para el lavado del material de vidrio se recomienda el siguiente tren de limpieza:

- 1.1 Remojar toda la cristalería en una solución con algún producto limpiador, dependiendo del uso que tenga este material, y se sugiere un mínimo de 30 minutos. Para hacer después un prelavado de toda la cristalería con un detergente enzimático al 0.8 %, en agua corriente; preferentemente que no sea superior a 45 °C.

- 1.2 Lavar perfectamente con detergentes biodegradables, neutros y libres de fosfatos, que no dejen residuos para evitar interferencia en los resultados, utilizar un cepillo del tamaño adecuado, para limpiar bien el fondo y las paredes.
- 1.3 Enjuagar perfectamente con agua corriente varias veces y el ultimo enjuague se haga con agua destilada esterilizada y escurrir el material perfectamente.
- 1.4 Para acelerar el secado del material, se recomienda darle un enjuague con alcohol etílico al 96 ° y secar en la estufa a 60-70 °C por el tiempo necesario.
- 1.5 Inmediatamente después, es recomendable empaquetar el material limpio y seco para su posterior esterilización.

3. ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES.

El método más utilizado para la esterilización de material y soluciones es por calor húmedo (autoclave). Con este método se pueden esterilizar objetos de acero inoxidable, cristalería, y plásticos del tipo: polipropileno (PP), polimetilpenteno (PMP) o teflón (PTFE/PFA). Los laboratorios de investigación donde su principal actividad sea el aislamiento, manejo y manipulación de microorganismos, incluyendo los extremófilos se recomienda lo siguiente:

- 2.1 Seleccionar el empaque del material con base al método de esterilización a utilizar. Para la esterilización húmeda (autoclave): papel kraft, manila o papel crepado. Para la esterilización en seco: papel Kraft, manila o papel aluminio. El tamaño de los paquetes no debe de ser mayor a: 28 x 28 x 47 cm, si se utilizan paquetes de 25 x 25 x 20 cm, se puede disminuir el tiempo de exposición y el tiempo de secado.
- 2.2 El empaque de material de vidrio (pipetas, tubos de ensayo, cajas de Petri) se pueden envolver de manera individual o en grupos con papel Kraft y rotular la capacidad de cada uno de estos.
- 2.3 La esterilización del material a utilizar debe de hacerse de manera separada: cristalería (material seco) y líquidos.

4. DESINFECCIÓN DE MATERIALES.

Si se utiliza material que, por su naturaleza o ubicación, no es posible esterilizar con vapor caliente, pueden ser desinfectados. La desinfección del material puede ser físico o químico, para eliminar los microorganismos de formas vegetativas, pero no se puede asegurar la eliminación de esporas de bacterias.

La efectividad de la desinfección del material se puede incrementar si se considera la cantidad y ubicación de los microorganismos, la resistencia de los microorganismos a un determinado agente químico, su concentración y tiempo de exposición.

Los principales desinfectantes utilizados son:

- 3.1 Glutaraldehído: es un compuesto del aldehído y se presenta en soluciones acuosas, ácidas y alcalinas. Las soluciones alcalinas tienen un efecto esporocida. Tiene un pH alcalino, una vez que está activado tiene una caducidad de 14 días.
- 3.2 Cloro: está disponible en forma líquida como hipoclorito de sodio, o sólida como el hipoclorito de calcio (dicloroisocianurato de sodio), e inhibe las reacciones enzimáticas, desnaturalización de proteínas e inactivación de los ácidos nucleicos, teniendo un amplio espectro (viricida, fungicida, bactericida (microbactericida)). La concentración mínima para una eliminación efectiva de micobacterias es de 1000 ppm (0.1 %) durante 10 minutos. Debido a su corrosividad, no deben sumergirse los objetos por más de 30 minutos; posterior al remojo, se deben de enjuagar con abundante agua.
- 3.3 Formaldehído: es una solución acuosa que inactiva a los microorganismos por alquilación del grupo amino y sulfidrilo de proteínas y del anillo nitrogenado de bases púricas lo que altera la síntesis de los ácidos nucleicos. Es bactericida (microbactericida), fungicida, viricida y esporicida.
- 3.4 Peróxido de hidrógeno: es un agente oxidante que ejerce su acción microbicida por la producción de radicales libres que dañan las membranas lipídicas, el ADN y otros componentes celulares. Tiene un efecto bactericida (microbactericida), fungicida, viricida y esporocida en concentraciones del 6 % al 7 %
- 3.5 Ácido peroxiacético: es un oxidante similar al peróxido de hidrógeno, actúa principalmente desnaturalizando proteínas y

alterando la permeabilidad de la pared celular. En concentraciones bajas (0.1 al 0.2 %) de 10 a 15 minutos tiene una acción contra microorganismos, incluyendo a las esporas. Una vez preparada la solución tienen una duración de 14 días.

- 3.6 Fenoles: los derivados fenólicos encontrados como principio activo. En altas concentraciones, tienen acción sobre la pared celular, penetrando la célula y precipitando proteínas citoplasmáticas, a bajas concentraciones, causan la muerte de microorganismos por inactivación de las enzimas de la pared celular. Es bactericida, fungicida y viricida. No se recomienda su uso en materiales porosos, como el plástico, ya que se pueden almacenar residuos.

REFERENCIAS

Acosta-Gnass, S. I., de Andrade Stempliuk, V. (2008). Manual de esterilización para centros de salud. Organización Panamericana de la Salud. Pp 188. https://www1.paho.org/PAHO-USAID/dmdocuments/AMR-Manual_Esterilizacion_Centros_Salud_2008.pdf.

ANEXO 2

MANEJO DE RESIDUOS BIOLÓGICOS

Ma. Nieves Trujillo Tapia

INTRODUCCIÓN

El buen manejo de los residuos químicos y/o biológicos también garantiza la disminución de contaminación al ambiente. Por lo que es importante que todos los residuos generados en los laboratorios de investigación los dispongan de manera segura, eficiente, legal y con costos adecuados. De acuerdo con la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, “un microorganismo capaz de producir enfermedades” es considerado residuo peligroso biológico-infecciosos (RPBI) si se encuentra en una concentración suficiente (inóculo), en un ambiente propicio (supervivencia), en presencia de una vía de entrada, y en un hospedero susceptible.

Los cultivos de microorganismos considerados como agentes biológico-infecciosos son los que han sido generados en los diferentes procedimientos de diagnóstico o investigación, así como los que se generan en la producción y control de agentes biológico-infecciosos. Después de haber realizado las pruebas o experimentos, se generan desechos biológicos y los materiales que se utilizaron para realizar el cultivo de los microorganismos biológico-infecciosos, es necesario hacer la separación de ambos y seleccionar los residuos que pueden ser tratados inmediatamente después de haber terminado el cultivo y disminuir el riesgo de infección de aquellos que requieran de otro tipo de tratamiento para reducir el volumen.

Todos los utensilios desechables usados para contener, transferir, inocular y mezclar cultivos de agentes biológico-infecciosos deben ser envasados en bolsas de polietileno color rojo.

Los residuos de los cultivos de microorganismos potencialmente infecciosos se les debe aplicar un tratamiento al momento “in situ” y este puede ser por esterilización (calor húmedo) o desinfección química.

1. ESTERILIZACIÓN.

Es el tratamiento más utilizado y recomendado, elimina el 100 % de los microorganismos, incluyendo las esporas. El material utilizado/contaminado se debe de esterilizar en autoclave a 121 °C a 15 libras de presión, durante 60 minutos, antes de ser lavado. Para el caso de cajas Petri desechables, éstas deberán estar previamente empacadas en bolsas de polietileno y en caso de ser RPBI la bolsa debe ser roja. Después de la esterilización del material contaminado, deberá de vaciarse el líquido a un contenedor destinado para estos residuos.

2. DESINFECCIÓN QUÍMICA.

Este tratamiento, se utiliza para objetos sensibles al calor, se pueden tratar con etanol (EtOH) o peróxido de hidrógeno. Los esterilizantes químicos líquidos producen esterilidad de manera confiable solo si la limpieza precede al tratamiento y si se siguen las pautas adecuadas con respecto a la concentración, el tiempo de contacto, la temperatura y el pH.

Algunos de los desinfectantes químicos, clasificados como germicidas se incluyen formulaciones a base de:

Glutaraldehído $\geq 2,4$ %.

Glutaraldehído al 0,95 % con fenol / fenato al 1,64 %.

Peróxido de hidrógeno estabilizado al 7,5 %.

Peróxido de hidrógeno al 7,35 % con ácido peracético al 0,23 %.

Ácido peracético al 0,2 %.

Ácido peracético al 0,08 % con peróxido de hidrógeno al 1.0 %.

Es importante señalar que, no se deben de usar como método principal de desinfección de los RPBI, y el desecho de estos residuos químicos requiere de una inactivación previa a su desecho y dependerá del tipo de desinfectante utilizado.

3. CARACTERÍSTICAS DE LOS RECIPIENTES USADOS PARA LA DISPOSICIÓN DE RPBI.

Las bolsas y recipientes que se utilizan para envasar los RPBI deben de cumplir las disposiciones establecidas en la NOM-087-SEMAR-NAT-SSA1-2002, específicamente en el punto 6.2.1, inciso a), 6.2.2 y 6.2.3. dentro de las características se consideran: color, tipo de

material, resistencia a la tensión, elongación, resistencia al rasgado, resistencia a la penetración y marcado. Además de que todo el material utilizado para su envasado deberá estar marcado con el símbolo universal de riesgo biológico (figura 1) y la leyenda: “Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos” y no deberán ser mezclados con ningún otro tipo de recipientes de residuos.



Figura 1. Símbolo universal de riesgo biológico.

4. PASOS PARA LA REDUCCIÓN DE RESIDUOS POTENCIALMENTE TOXICOS O BIOLÓGICO-INFECIOSOS (RPBI).

4.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS RESIDUOS

Se deben de separar los objetos utilizados durante el seguimiento del experimento: los objetos reutilizables de acuerdo con el material de uso continuo (vidrio, metal) de los utensilios desechables utilizados para contener, transferir, inocular y mezclar cultivos de los microorganismos potencialmente infecciosos. Del mismo modo se deben de separar las cajas de Petri usadas para su esterilización, eliminación y disposición adecuada de los residuos.

4.2 PROCESAMIENTO Y ENVASADO DE LOS RESIDUOS GENERADOS

Después de haber sido identificados y separados los residuos de acuerdo con el tipo y estado físico, los residuos materiales que deben desecharse se dispondrán en recipientes rígidos de polipropileno ROJO o en bolsas de plástico ROJO, los cuales serán dispuestos en un almacén temporal de residuos que disponga la institución.

En caso de que se trabaje con cajas de Petri desechables, es recomendable ponerlas en bolsas de residuos biológicos/peligrosos (ROJA), para esterilizarlas por calor húmedo (autoclave) y separar los líquidos en contenedores especiales y los sólidos ponerlos en bolsas bien cerradas para su almacenamiento o incineración.

4.3 PROCESAMIENTO DE MATERIAL REUTILIZABLE

Todo el material que se utilizará nuevamente deberá de seguir el siguiente tren de tratamiento.

4.3.1 ESTERILIZACIÓN

4.3.2 LAVADO

4.3.3 SECADO

4.3.4 PREPARACIÓN

4.3.5 ESTERILIZACIÓN

4.3.6 ALMACENAMIENTO

REFERENCIAS

Castañeda Rosas, E. E., Jiménez Pérez, J., Urzúa García, A., Manzano Montaña R. E., Valentín Hernández J de J., Pérez García E. S., Cruz Pablo, S., Gálvez Ortiz, A. M. (2007). Guía de cumplimiento de la norma oficial mexicana. NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Secretaría de medio ambiente y recursos naturales.

CDC (2008). Rational Approach to Disinfection and Sterilization. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/introduction.html>

ANEXO 3

MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS

Ma. Nieves Trujillo Tapia

INTRODUCCIÓN

La generación de residuos químicos peligrosos en un laboratorio de microbiología, no solo se limita a las prácticas de biología molecular, por el uso de reactivos utilizados; es necesario darles un tratamiento antes de ser desechados o almacenados temporalmente.

Algunos de los residuos químicos:

1. ÁCIDOS INORGÁNICOS.

- 1.1 Generalmente se utilizan en soluciones diluidas (no mayores de 1N), las cuales se deben de neutralizar con hidróxido de sodio (sosa) y se diluyen con agua para desecharlas por el desagüe.
- 1.2 Si se tienen ácidos concentrados (concentraciones mayores a 1N), se deben de diluir con agua al 1:5 y neutralizar a pH 6.8 con soluciones de hidróxido de sodio. Antes de desechar al desagüe se vuelven a diluir al 1:10 con agua.
- 1.3 Bases inorgánicas, sales y diluciones básicas.
- 1.4 De la misma forma que los ácidos, las bases deben de neutralizarse antes de ser desechadas al desagüe. En este caso se deben de neutralizar con ácido sulfúrico diluido.
- 1.5 Las soluciones básicas concentradas se diluyen previamente con agua 1:5 y se neutralizan a pH 6.8, antes de ser desechadas se vuelven a diluir con agua 1:10.

2. FENOLES.

El fenol y sus derivados son compuestos orgánicos aromáticos, no se deben eliminar por el desagüe, aunque se diluyan. Por lo que serán separados en recipientes específicos para su almacenamiento temporal, hasta su transferencia al destino final.

3. ALDEHÍDOS, CETONAS Y DISOLVENTES ORGÁNICOS.

En el laboratorio de microbiología el formaldehído es el residuo generado en mayor cantidad e importancia, en menor cantidad se encuentran la acetona, cloroformo, xileno y otros derivados bencénicos. No es recomendable que ningún disolvente orgánico sea desechado al desagüe. Es conveniente que el laboratorio cuente con contenedores seguros para su almacenamiento temporal para su eliminación de manera controlada.

4. BROMURO DE ETIDIO (BrET).

El bromuro de etidio es un agente intercalante utilizado como marcador de ácidos nucleicos en técnicas de biología molecular. Es un mutágeno de tipo II de efecto acumulativo, el reactivo en forma de polvo es muy tóxico por inhalación y debe de ser debidamente etiquetado con el grado de toxicidad y almacenado aparte, para su uso debe de utilizar guantes, protección ocular y mascarilla.



Figura 1. Señalética que debe de tener las áreas de trabajo con BrET.

Después de su uso, es necesario que el material y equipo utilizado sea descontaminado con una solución de nitrito de sodio (NaNO_2) y ácido hipofosforoso (H_3PO_2).

La preparación de la solución deberá hacerse en envase de vidrio y disolver 4.2 g de NaNO_2 en 20 mL de H_3PO_2 al 50 % y enzararlo con 300 ml de agua destilada y ajustar el pH a 1.8 antes de utilizarlo.

Se debe de lavar la superficie donde se utilizó el reactivo, por lo menos 5 veces con la solución de nitrito de sodio, utilizando un paño diferente en cada limpieza. Los paños deben de remojarse por lo menos una hora en la solución de nitrito de sodio. Al finalizar el proceso de

descontaminación se neutraliza la solución descontaminante con bicarbonato de sodio y se verifica que el pH esté entre 5 y 9. Después de la limpieza verificar con una lámpara de luz ultravioleta que no hayan quedado residuos de BrET. Los residuos generados durante las prácticas de biología molecular (geles teñidos con bromuro de etidio), puntas, pipetas y materiales empleados en la descontaminación del equipo deben de almacenarse aparte.

Las disoluciones de bromuro de etidio sobrantes deben de ser filtradas con carbón activado antes de desecharse por el desagüe. El carbón activado utilizado, se almacenará con el resto de los residuos de BrET.

5. ACRILAMIDA.

Es un polvo blanco cristalino, utilizado como un agente de polimerización durante la cromatografía en gel y la electroforesis. El monómero de acrilamida es altamente tóxico inhalado y en contacto con la piel (dermatitis) y carcinogénico. Se reduce su toxicidad en forma polimerizada.

Para su manipulación es importante utilizar equipo de protección (mascarilla, caretas, guantes) su manejo (pesaje y polimerización) debe hacerse dentro de una campana de extracción. Su almacenamiento será en un lugar específico para este tipo de reactivos, y deberá contar con la señalética de la figura 1.

En caso de derrames o sobrantes líquidos no polimerizados no mayores de 25 mL/25 g deben de ser tratados con una solución reposada de persulfato de potasio al 1.6 % y metasulfito de sodio al 1.6 %. después de la limpieza, lavar con abundante agua.

Los residuos de acrilamida deben colocarse en recipientes destinados únicamente para estos residuos son considerados altamente peligrosos, por lo que deben de ser eliminados de acuerdo con los protocolos del comité de seguridad de cada institución.

6. COLORANTES UTILIZADOS EN LAS DIFERENTES TINCIONES.

La fijación y tinción de muestras microbiológicas son las preparaciones más frecuentes para facilitar la identificación de los microorganismos. Los colorantes utilizados para teñir microorganismos son numerosos y muy variados, ya que contienen grupos cromóforos, grupos con dobles enlaces

conjugados que dan al colorante su color y mediante enlaces iónicos, covalentes o cromóforos se unen con las células. Las características de los colorantes y las células teñidas convierten a la muestra en un RPBI, por lo que todo el proceso de tinción debe hacerse en contenedores especiales, con fin de facilitar su manejo y disposición temporal de estos residuos. Antes de la disposición de los cubre y portaobjetos, deben de ser inactivados, colocándolos en un envase de vidrio con una solución de hipoclorito de sodio al 5 %. Para el caso de los portaobjetos que contengan esporas de hongos o bacterias en un contenedor pequeño de plástico rígido de color rojo (especial de RPBI). Estos envases son de un único uso y cerrados hasta que estén llenos en su totalidad.

7. CLASIFICACIÓN DE RESIDUOS.

Es importante separar y envasar en contenedores clasificados para cada uno de los residuos peligrosos biológico-infecciosos de acuerdo con las características físicas y biológico infecciosas y realizar el tratamiento correspondiente (esterilización o desinfección química) antes de su disposición y almacenamiento temporal.

8. ALMACENAMIENTO DE RESIDUOS.

Los recipientes con residuos nunca se apilarán o se colocarán en zonas elevadas, tanto durante su almacenamiento intermedio como durante el transporte.

Los residuos que puedan originar tóxicos volátiles se almacenarán en un área bien ventilada.

Deberá evitarse la proximidad de los residuos inflamables a cualquier fuente de calor. Si, además, son volátiles, se almacenarán en una habitación bien ventilada.

El transporte fuera del laboratorio debería estar encomendado a personas con formación específica y con los medios adecuados, por lo general dentro del contexto de la gestión general de residuos de cada centro sanitario.

Hernández A. (2020). Procedimiento de operación para el manejo de acrilamida. Número 2. Instituto de Química, UNAM. https://www.iqumica.unam.mx/images/iqseguro/002_Manejo_de_acrilamida.pdf

Hernández A. (2020). Procedimiento de operación para el manejo de Bromuro de etidio. Número 4. Instituto de química, UNAM. https://www.iqumica.unam.mx/images/iqseguro/004_Manejo_de_bromuro_de_etidio.pdf

Instituto Nacional de Rehabilitación. Comité de seguridad, HDS, bromuro de etidio. 2013. Disponible en: https://www.google.com/search?source=hp&ei=Sw_9XvfnOYGIsQXGslmQBQ&q=hoja+de+seguridad+bromuro+de+etidio&oq=hoja+de+seguridad+bromuro+de+etidio&gs_lcp=CgZwc3ktYWlQAzICCAAyBggAEBYQHjIGCAAQFhAeMgYIABAWEB4yBggAEBYQHjoFCAAQgwE6BQgAELEDULMLWPY_YJICaABwAHgAgAGWAYgBvSGS_AQQwLjM1mAEAoAEBqgEHZ3dzLXdpeg&client=psyab&ved=0ahUKEwi3uaKVjq3qAhUBRKwKHUZYAIQ4dUDCAY&uact=5

González Meléndez R. C., Elizalde Cuevas B., Cortés Cruz, M. E., Orduña Sánchez M. (2020). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología: un enfoque gráfico. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

Millipore. Ficha de datos de seguridad. (2019). Disponible en: https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-DE-Site/de_DE/-/EUR/ShowDocumentFile?ProductSKU=MDA_CHEM100639&DocumentId=100639_SDS_ES_ES.PDF&DocumentType=MSD&Language=ES&Country=ES&Origin=PDP&Display=inline

Rutala, W. A., Weber, D. J. and the healthcare infection control practices advisory committee (HICPAC). (2019). Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008. University of North Carolina Health Care System <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/>



■ María Eugenia Hidalgo Lara

Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico
Nacional



■ Rosa María Camacho Ruiz

Centro de Investigación y Asistencia
en Tecnología y Diseño del Estado
de Jalisco



■ Ma. Nieves Trujillo Tapia

Universidad del Mar



■ Ramón Alberto Batista García

Universidad Autónoma del Estado
de Morelos



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

