



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

PROGRAMA DE POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA

## ANÁLISIS METAGENÓMICO DE DIVERSIDAD BACTERIANA EN DETRITOS DE *Atta mexicana*

JORGE VÍCTOR MAURICE LIRA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2018

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Jorge Víctor Maurice Lira, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Roberto Quintero Lizaola, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis

ANÁLISIS METAGENÓMICO DE DIVERSIDAD BACTERIANA EN DEIRITUS DE Atta mexicana

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 17 de enero de 2018



Firma del  
Alumno (a)



Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **ANÁLISIS METAGENÓMICO DE DIVERSIDAD BACTERIANA EN DETRITUS DE *Atta mexicana***, realizada por el alumno: **JORGE VÍCTOR MAURICE LIRA** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EDAFOLOGÍA**

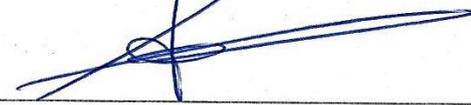
**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO (A)

  
\_\_\_\_\_

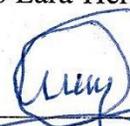
Dr. Roberto Quintero-Lizaola

ASESOR (A)

  
\_\_\_\_\_

Dr. Alfredo Lara-Herrera

ASESOR (A)

  
\_\_\_\_\_

Dr. Antonio Trinidad Santos

ASESOR (A)

  
\_\_\_\_\_

M. en C. Enrique Martínez-Villegas

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2017

*Para lograr lo que se propone, solo se necesita una cosa  
“disciplina”.*

- Jorge V. Maurice Moreno -

*Todo esfuerzo y dedicación a mi amado padre*



*Jorge Víctor Marice Moreno*

*(1943-2016)*

## RESUMEN

### ANÁLISIS METAGENÓMICO DE DIVERSIDAD BACTERIANA EN DETRITUS DE *Atta mexicana*.

Jorge Víctor Maurice Lira, MC

Colegio de Postgraduados 2018.

Se secuenciaron masivamente siete de las nueve regiones hipervariables del gen 16S rRNA mediante la plataforma Ion PGM™ de Ion Torrent (ThermoFisher Sci. Inc., USA) y se prepararon las bibliotecas mediante PCR en emulsión con microesferas con el sistema 16S™ Metagenomics (ThermoFisher Sci. Inc., USA) para tres muestras de vertederos de detritus de *Atta mexicana* (H1, H2 y V1) y dos suelos control (SH y SV) de dos ecosistemas mexicanos diferentes. Los objetivos fueron identificar las especies bacterianas dependientes del ecosistema donde se recolectaron los vertederos, así como, las especies que siempre se encontraron en los vertederos sin importar el ecosistema de recolección. Se obtuvieron 2,622,158 lecturas útiles con longitud promedio de 208 pb, se obtuvieron 2,227 OTUs con un total de 53,350 lecturas, las curvas de rarefacción indicaron que la mayor cantidad de OTUs se obtuvieron en los vertederos H2, H1 y V1, mientras que los suelos control SH y SV generaron menor cantidad de OTUs por secuencia. Lo que indica mayor diversidad en los vertederos y se comprobó con el índice de Shannon ya que las cinco muestras fueron megadiversas, pero mediante el índice de Simpson se mostró que las cinco muestras estaban dominadas por un bajo número de especies representativas. Los vertederos guardaron mayor similitud entre ellos respecto a los suelos, lo que indicó que los vertederos ejercen un efecto positivo en la diversidad bacteriana y las especies encontradas en todos los vertederos independientemente de los ecosistemas fueron *Weisella cibaria*, *Leifsonia aquatica*, *Pantoea cyripedii*, *Weisella confusa*, *Arthrobacter protophormiae*, *Bacillus* sp., *Streptomyces fradiae*, *Microbacterium* sp., *Salmonella entérica*, *Arthrobacter* sp., *Pantoea wallisii*, *Xylanimicrobium pachnodae*.

**Palabras clave:** *Atta mexicana*, microbioma, Ion Torrent, secuenciación masiva del gen 16S rRNA, diversidad microbiana.

## ABSTRACT

### METAGENOMIC ANALYSIS OF BACTERIAL DIVERSITY IN REFUSE DUMPS OF *Atta mexicana*.

Jorge Víctor Maurice Lira, MC

Colegio de Postgraduados 2018.

Was massively sequenced seven of nine hypervariable regions of 16S rRNA gene through the platform Ion PGM™ of Ion Torrent (ThermoFisher Sci. Inc., USA) and libraries was prepared through emulsion PCR with sphere particles using the 16S™ Metagenomics Kit (ThermoFisher Sci. Inc., USA) to three samples of refuse dumps of *Atta mexicana* (H1, H2 y V1) and two of control soils (SH y SV) from two different Mexican ecosystems. The aim was to identify the bacterial species which depend of the ecosystem where the refuse dumps was collected, as well as the species that always remained in refuse dumps independently of the ecosystems collected. There was obtained 2,622,158 usable reads with a mean length of 208 bp, was obtained 2,227 OTUs with 53,350 total reads. Rarefaction plots showed the highest amount of OTUs was obtained in refuse dumps H2, H1 y V1, while control soils SH y SV generated a low quantity of OTUs per sequence. That shows a highest diversity in refuse dumps and was probed through Shannon Index that all samples was megadiverse, but Simpson Index shows all five samples was dominated by a few representative species. The refuse dumps kept more similarity among themselves that within the control soils, this showed that the refuse dumps performed a positive effect upon the bacterial diversity and the species found in all refuse dumps independently of the ecosystem was *Weissella cibaria*, *Leifsonia aquatica*, *Pantoea cyripedii*, *Weissella confusa*, *Arthrobacter protophormiae*, *Bacillus* sp., *Streptomyces fradiae*, *Microbacterium* sp., *Salmonella entérica*, *Arthrobacter* sp., *Pantoea wallisii*, *Xylanimicrobium pachnodae*.

**Index words:** *Atta mexicana*, microbiome, Ion Torrent, massive secuenciación of 16S rRNA gene, microbial diversity.

## I. ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	v
I.ÍNDICE GENERAL.....	vi
II. LISTA DE FIGURAS.....	viii
III. LISTA DE CUADROS .....	xi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Generalidades de la Especie .....	3
2.2 Ecofisiología del microbioma.....	4
2.3 Gen 16S rRNA .....	5
2.4 Metagenómica aplicada a la diversidad microbiana.....	7
2.5 Plataforma de secuenciación Ion PGM™ de Ion Torrent™ .....	7
2.6 Ventajas de Ion PGM™ de Ion Torrent™ .....	11
3. HIPÓTESIS .....	14
4. OBJETIVOS .....	14
5.1. Objetivo General .....	14
5.2. Objetivos Particulares.....	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
6.1. Obtención de las muestras .....	15
6.2. Extracción y pruebas de integridad del DNA metagenómico .....	17
6.3. Pruebas de PCR .....	18
6.4. Construcción de bibliotecas.....	19
6.5. Purificación y cuantificación productos amplificados .....	19
6.6. Generación y purificación de extremos romos.....	20

6.7. Ligación de código de barras y adaptadores .....	20
6.8. Amplificación y purificación de bibliotecas .....	21
6.9. Cuantificación de la biblioteca y determinación del factor de dilución (TDF).....	22
6.10. Templado.....	23
6.11. Enriquecimiento .....	24
6.12. Limpieza del Ion PGM™ (Ion Torrent™, Life Technologies) .....	25
6.13. Inicialización del Personal Genome Machine Ion PGM™ (Ion Torrent™, Life Technologies) .....	25
6.14. Generación de corrida en Torrent server.....	26
6.15. Preparación de templado positivo .....	27
6.16. Chip check.....	27
6.17. Cargado del chip.....	27
6.18. Secuenciación.....	28
6.19. Análisis de resultados .....	28
6.20. Análisis de diversidad.....	29
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
6.1 Extracción de DNA metagenómico y construcción de bibliotecas.....	33
6.2 Análisis bioinformático .....	37
6.3 Análisis de diversidad.....	40
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>9. PERSPECTIVAS DE ESTUDIO .....</b>	<b>64</b>
<b>10. AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>65</b>
<b>11. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>66</b>

## II. LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Arriba: Regiones hipervariables (cuadros amarillos) y regiones conservadas (cuadros azules) del gen 16S rRNA. Ejemplo de un primer par de iniciadores para amplificación de la región hipervariable V1-V3 a partir de la región conservada. Tomado y modificado de: Del Chierico et al., 2015. Abajo: Mapa de iniciadores utilizados para cada región hipervariable, las regiones verdes son las regiones mejor informativas para análisis filogenéticos de phyla bacteriana. Tomada y modificada de: Yang et al., 2016..... 6
- Figura 2. PCR en emulsión para templar bibliotecas en las microesferas (arriba) tomado de Goodwin *et al.* (2016). Composición de una biblioteca templada en la microesfera (abajo). Tomado y modificado de Metzker (2010)..... 9
- Figura 3. (A) Chip semiconductor; (B) nanopozos del chip, en cada pozo se introduce una microesfera para su secuenciación; (C) flujo de nucleótidos inyectados a la solución del chip, donde se lleva a cabo la secuenciación por diferencial de pH y voltaje. Tomado y modificado de Del Chierico *et al.* (2015)..... 10
- Figura 4. Principio químico de la secuenciación de Ion PGM™ de Ion Torrent™. A) detección del cambio de pH en el chip electrodo por diferencial de voltaje; B) las señalizaciones del cambio de pH son medidas mediante la frecuencia de tiempo durante el flujo de inserción de los nucleótidos; C) cada incorporación de nucleótido es registrado y con base en la intensidad del cambio de pH se calcula la intensidad de incorporación. Tomado de Merriman *et al.* (2012)..... 10
- Figura 5. Ubicación geográfica donde se localizaron las muestras obtenidas..... 15
- Figura 6. DNA extraído por el método fenol cloroformo. A) persistencia de pigmentos en la extracción; B) la electroforesis indicó un DNA con poca integridad. El cuadro rojo señala los compuestos que hacen interferencia en la electroforesis.. 33
- Figura 7. DNA extraído por el sistema comercial. A) La extracción sin presencia de pigmentos; B) la electroforesis indicó un DNA íntegro. El cuadro amarillo indica las muestras de interés para el presente trabajo. El carril S3 corresponde a la SV..... 34
- Figura 8. Electroforesis de productos amplificados en dilución 1:100. Sin inhibidor de

inhibidores (pozo 3 al 6); con BSA (carril 7 al 10); con DMSO (carril 11 al 14); Marcador de 100pb; control positivo (carril 1); testigo negativo (carril 15); testigo negativo más BSA (pozo 16), testigo negativo más DMSO (carril 17).....	35
Figura 9. Electroforesis de productos amplificados en dilución 1:10 más BSA. Carril 1: marcador 100pb; carril 2: control positivo <i>E. coli</i> ; carril 3: testigo negativo; carril 4 testigo negativo más BSA; carril 5: SH; carril 7: SV; carril 8: H1; carril 9: H2; carril 11: V1. Los cuadros amarillos indican las muestras de interés para el presente trabajo.....	35
Figura 10. Electroforesis de los productos amplificados de las regiones hipervariables del gen 16S rRNA. Carriles 1 y 9) marcador 100 pb; carril 3) SH; carril 4) SV; carril 5) H1; carril 6) H2; carril 7) V1; carril 11) repetición de SH. Los cuadros amarillos indican las muestras de interés para el presente trabajo.....	36
Figura 11. Análisis primario generado por la plataforma Ion Browser Server. A) Porcentaje del cargado del chip; B) Indica porcentaje y calidad de lecturas, porcentaje de templado y enriquecido óptimo; C) Histograma de longitudes media, moda y mediana de las lecturas.....	39
Figura 12. Curvas de rarefacción e Índice de Chao1 para especies raras.....	41
Figura 13. Diversidad alfa: Índice de Shannon e índice de Simpson.....	43
Figura 14. Phylum a los que corresponde las 17 especies más representativas de la diversidad de 3 vertederos de detritus y 2 suelos control.....	44
Figura 15. Comparación del número de lecturas de las especies dominantes y no dominantes de manera general y en cada muestra.....	45
Figura 16. Distribución de la abundancia relativa general. Se puede observar que las 17 especies más representativas de manera general representan distinta distribución en cada muestra. V1 es la mejor representada por estas especies, mientras que SV es la menos representada.....	46
Figura 17. Distribución proporcional de las especies dominantes en el vertedero V1....	47
Figura 18. Distribución proporcional de las especies dominantes del vertedero H1.....	48
Figura 19. Distribución proporcional de las especies dominantes del vertedero H2.....	48
Figura 20. Distribución proporcional de las especies dominantes del suelo control SH...	49

Figura 21. Distribución proporcional de las especies dominantes del suelo control SV...	50
Figura 22. Especies de dominancia general ordenadas por dominancia individual en un mayor número de muestras.....	51
Figura 23. Análisis de componentes principales. (A) diversidad de los suelos control respecto a la diversidad de los vertederos de detritus; (B) diferente ángulo de los componentes principales.....	53
Figura 24. Diagrama de Venn para identificar las especies que se comparten entre el suelo de Hidalgo (SH) y el de Veracruz (SV). Las especies que se encuentran en el centro corresponden a aquellas que se encuentran en ambos suelos sin importar el ecosistema de recolecta. *Especies que mostraron dominancia en la abundancia relativa general.....	54
Figura 25. Diagrama de Venn para identificar la similitud de especies compartidas entre el suelo de Veracruz (SV) y el vertedero de Veracruz (V1). Las especies edáficas que encuentran un nicho ecológico en los vertederos de detritus son aquellas que se encuentran en el centro del diagrama. *Especies que mostraron dominancia en la abundancia relativa general.....	55
Figura 26. Diagrama de Venn para identificar la similitud de especies compartidas en Hidalgo entre el suelo (SH) y los vertederos (H1 y H2). *Especies que mostraron dominancia en la abundancia relativa general.....	56
Figura 27. Diagrama de Venn para identificar las especies que no dependen del ecosistema sino de las características del detritus de A. mexicana (localizadas en el centro del diagrama). *Especies que mostraron dominancia en la abundancia relativa general.....	58

### III. LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Nomenclatura de identificación de las muestras analizadas.....	15
Cuadro 2. Comparación de las condiciones ambientales entre los dos sitios de muestreo.....	16
Cuadro 3. Ciclos de temperaturas del termociclador para pruebas de PCR.....	18
Cuadro 4. Mezcla de reactivos para pruebas de PCR del DNA metagenómico.....	18
Cuadro 5. Reactivo del Kit Ion 16S™ Metagenomics utilizados para la construcción de bibliotecas del gen 16S rRNA.....	19
Cuadro 6. Programa de temperatura para amplificación de las siete regiones hipervariables del gen 16S.....	19
Cuadro 7. Mezcla para PCR en emulsión.....	23
Cuadro 8. Orden de colocación de los reactivos en la tira de pocillos para enriquecimiento.....	24
Cuadro 9. Programa del termociclador para la preparación del templado.....	27
Cuadro 10. Calculo de diluciones para obtener una concentración óptima para la mezcla de amplicones.....	37
Cuadro 11. Calculadora de TDF en programa Excel® Office™ Microsoft®. Las muestras amarillas de la parte superior son las de interés para el presente trabajo.....	38
Cuadro 12. Reporte por muestra generado mediante la plataforma Ion Browser Server (ThermoFisher Scientific Inc., USA).....	39
Cuadro 13. Resultados del análisis secundario reportados con la plataforma Ion Reporter (ThermoFisher Scientific Inc., USA).....	40
Cuadro 14. Especies dominantes en la distribución de abundancia proporcional general y sus proporciones por muestras. Los valores de color rojo representan las especies que son dominantes tanto de manera general como en la muestra individual.....	44

## 1. INTRODUCCIÓN

El detritus de hormiga es un desecho orgánico producido por las hormigas defoliadoras, de las cuales *Atta mexicana* Smith es la más distribuida en México. Estas hormigas utilizan las hojas defoliadas para crear un sustrato donde producen un hongo simbiote que funge como su alimento, el sustrato es sometido a condiciones de humedad, temperatura y actividad microbiana óptimas para la biodegradación del material que lo compone, posteriormente es desechado fuera del hormiguero, donde es sometido a las condiciones ambientales específicas de los ecosistemas donde se localizan. Estas condiciones pueden ser determinantes en la composición y estructura de la diversidad bacteriana que compone a los detritus.

En el presente trabajo se analizó la diversidad  $\alpha$  y  $\beta$  de tres vertederos de *A. mexicana* provenientes de dos ecosistemas diferentes de México, de igual modo se compararon con suelos control (sin presencia de vertederos) recolectados en los mismos ecosistemas de los vertederos. Sin embargo, los análisis se realizaron mediante secuenciación masiva del gen 16S rRNA mediante tecnología de secuenciación de nueva generación, estas técnicas de metagenómica han ampliado el campo de la diversidad microbiana ya que analizan el 100 % de los genomas bacterianos presentes en una muestra ambiental, a diferencia de la microbiología clásica que es capaz de analizar únicamente a las cepas cultivables *in vitro*, las cuales representan solo el 1 % de la diversidad microbiana.

El análisis del microbioma de las hormigas defoliadoras es un campo ampliamente estudiado, ya que guardan múltiples asociaciones bastante interesantes, sin embargo son pocos los análisis desarrollados con técnicas de metagenómica. Este es el primer trabajo de estudio metagenómico del vertedero de detritus de *A. mexicana* Smith en México que utiliza esta tecnología, así mismo, es el primero en comparar el efecto del ecosistema en la diversidad bacteriana de los vertederos, así como el intercambio de especies edáficas con el vertedero.

Los objetivos particulares del presente trabajo fueron: cuantificar el número de especies bacterianas presentes en los vertederos de detritus, identificar las poblaciones bacterianas

estructuralmente más representativas de los vertederos de detritus, identificar las poblaciones bacterianas propias de los vertederos de detritus y las dependientes de los ecosistemas donde se localizan y comparar la diversidad bacteriana de los vertederos de detritus y los de suelos control respecto a los ecosistemas donde se localizan. Bajo las hipótesis de que el microbioma de los vertederos estará constituido por especies bacterianas propias de los procesos biológicos del detritus, independientemente del ecosistema donde se localicen, así mismo estará compuesto por poblaciones microbianas propias del suelo y ecosistemas donde se localizan.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de la Especie

Se estima que en México existe el 8% de la diversidad de mirmecofauna mundial, es decir, aproximadamente 973 especies de más de 12,500 especies registradas hasta la fecha (Ríos-Casanova, 2014; Vásquez-Bolaños, 2011), Chiapas, Veracruz e Hidalgo son los estados con mayor diversidad de especies (Ríos-Casanova, 2014) y las subfamilias más diversas son Myrmicinae y Formicinae con 39 y 12 géneros respectivamente (Vásquez-Bolaños, 2011).

La especie más distribuida es *Atta mexicana*, presente en 22 de los 32 estados de la República Mexicana (Vásquez-Bolaños, 2011), por otra parte, esta especie ha sido objeto de múltiples estudios por sus interacciones con microorganismos presentes dentro de las galerías de sus hormigueros.

Las hormigas del género *Atta*, así como las del género *Acromyrmex* pertenecen a la tribu Attini, y son conocidas como hormigas defoliadoras o cultivadoras de hongos. Consideradas como las hormigas sociales más avanzadas por cultivar su propio alimento desde los últimos 50 millones de años (Currie *et al.*, 2003; Currie *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2015).

Las Attinis mayores (Currie *et al.*, 2006) elaboran un sustrato a base de materia orgánica fresca, donde inoculan y protegen su alimento, un basidiomiceto perteneciente a la familia Lepiotaceae de las especies *Leucocoprinus gongylophorus* (Bacci *et al.*, 1995; Currie, 2001b; Vo *et al.*, 2009), *Leucoagaricus gongylophora* (Currie 2001a; Vo *et al.*, 2009) y *Attamyces bromatificus* (Cherrett *et al.*, 1989). El inóculo de este hongo mutualista es portado por las hembras, previo al vuelo nupcial para después formar la nueva colonia y construir los nuevos jardines fúngicos. De esta forma, el inóculo del basidiomiceto simbiote ha seguido una transmisión horizontal durante miles de años (Mueller *et al.*, 2010)

Dentro del hormiguero, las obreras proveen de material orgánico que cumpla con las características nutrimentales necesarias para el óptimo crecimiento del hongo simbiote,

este material constituido principalmente por flores, semillas y hojas jóvenes, (Fernández *et al.*, 2015) es sometido a un proceso de masticado y mezclado con heces fecales, de esta manera microorganismos y enzimas de saliva y excremento inician el proceso de biodegradación del sustrato (Jaffé *et al.*, 1993; Currie, 2001b; Wirth *et al.*, 2003; Ronhede *et al.*, 2004) para facilitar la asimilación por parte del hongo mutualista.

El proceso de recolección de material vegetal, es el primer paso de gran importancia que influye en la composición de la diversidad del microbioma y la calidad del hongo mutualista (Bittleston *et al.*, 2011; Coblenz y Van Bael, 2013; Estrada *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2015).

## **2.2 Ecofisiología del microbioma**

Múltiples estudios se han enfocado a analizar la diversidad dentro del jardín fúngico, con el objetivo de conocer el rol de las diferentes poblaciones microbianas en las interacciones simbióticas, los cuales han demostrado que gran parte de las interacciones en el jardín fúngico facilitan la nutrición al basidiomiceto simbiote (Ortiz-Reyes *et al.*, 2016), ya que este sólo es capaz de asimilar polisacáridos de fácil asimilación (Gomes *et al.*, 1998; Abril y Bucher, 2002; Abril y Bucher, 2004).

En un principio se creía que el basidiomiceto simbiote era capaz de producir enzimas degradadoras de compuestos carbonados como celulosa (Bacci *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 1998; Freddie-Jeanne *et al.*, 2005), pero más tarde se demostró que no era así (Abril y Bucher, 2002; Abril y Bucher, 2004), y que otros microorganismos presentes en el jardín fúngico eran quienes degradaban la materia orgánica que lo componen (Shiøtt *et al.*, 2010; Abril, 2011; Ortiz-Reyes *et al.*, 2016), posteriormente el basidiomiceto mutualista aprovecha los derivados de las descomposiciones previas (Martín y Weber, 1969), por otra parte, otras bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> proveen tanto al hongo como a las hormigas del nutriente (Pinto-Tomas *et al.*, 2009; Sapountzis *et al.*, 2015).

También se han reportado especies patógenas como *Escovopsis weberi* (Currie, 2001b), *Escovopsis lentecrescens*, *Escovopsis microspora*, *Escovopsis moelleri* (Augustín *et al.*, 2013), *Escovopsis nivea* y *Escovopsis* sp. (Reis *et al.*, 2015) las cuales coevolucionaron en

el jardín fúngico y se especializaron en tacar al basidiomiceto simbiote (Currie, 2001a; Currie, 2001b; Currie *et al.*, 2003; Reynolds y Currie, 2004; Haeder *et al.*, 2009; Augustin *et al.*, 2013; Marfetán *et al.*, 2015). Sin embargo, las hormigas desarrollaron criptas en su exoesqueleto especializadas para alojar actinobacterias mutualistas del género *Pseudonocardia* (Poulsen *et al.*, 2005; Currie *et al.*, 2006) productoras de antibióticos como valinomicina, dentigerumicina, 9-methoxirrebeccamicina (Behie *et al.*, 2017), actinomicina (Shoenian *et al.*, 2011) y antimicina (Shoenian *et al.*, 2011), los cuales disminuyen el daño por *Escovopsis* y otros patógenos (Currie *et al.*, 2006; Fernández-Marín *et al.*, 2009; Meirelles *et al.*, 2014; Holmes *et al.*, 2016; Behie *et al.*, 2017).

No obstante, en las colonias de los géneros de *Atta* se han visto disminuidas las interacciones con *Pseudonocardia* ya que estas hormigas cuentan con una glándula exócrina metapleural (MG) (Fernández-Marín *et al.*, 2009) que segrega compuestos como ácido fenilacético y ácido hidroxidecanoico (mirmicina), los cuales fungen como control biológico contra bacterias y hongos respectivamente (Wirth *et al.*, 2003; Yek y Mueller, 2010).

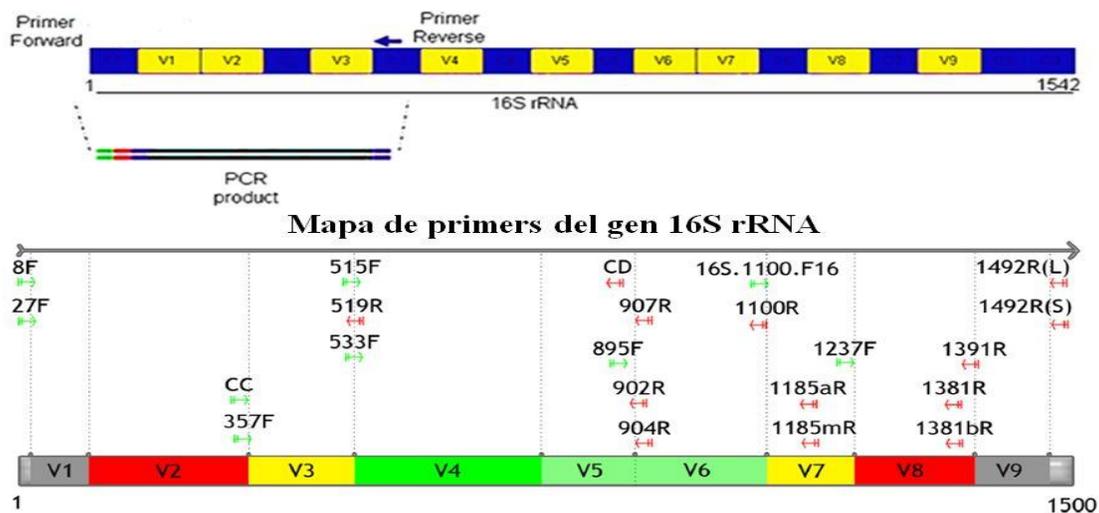
El uso de técnicas de metagenómica con NGS (secuenciación de nueva generación) para el estudio de la diversidad de los vertederos de detritus de las hormigas defoliadoras es un tópico nuevo, Lewin *et al.* (2016) ya realizaron el estudio de la composición microbiana en vertederos de *Atta colombica* en Costa Rica, no obstante, utilizaron una plataforma de secuenciación que hoy en día es poco utilizada. El presente trabajo utiliza Ion Torrent (ThermoFisher Sci. Inc., USA), una de las plataformas más representativas entre las NGS.

### **2.3 Gen 16S rRNA**

El gen 16S rRNA es el marcador molecular más utilizado en la actualidad para estudios de microbiomas (Case *et al.*, 2007; Del Chierico *et al.*, 2015; Gómez-Merino *et al.*, 2016), debido a que está constituido por regiones conservadas, presentes en todas las bacterias y archeas, así como de regiones hipervariables que brindan la información necesaria para clasificar diferentes unidades taxonómicamente operativas (OTUs) que permiten la identificación, distinción y conteo de copias de secuencias presentes, con la finalidad de clasificar microorganismos con iguales o diferentes OTUs, de este modo es posible ubicar

al organismo en cuestión dentro de un grupo taxonómico en particular (Wooley *et al.*, 2010; Patwardhan *et al.*, 2014), los OTUs también permiten evidenciar la transferencia horizontal de genes en la comunidad microbiana (Wooley *et al.*, 2010).

Una de las grandes ventajas del gen 16S rRNA es su talla molecular, ya que mide aproximadamente 1500 pb y es posible diseñar iniciadores específicos para sus regiones conservadas que permitan la amplificación de las regiones hipervariables (Figura 1) (Patwardhan *et al.*, 2014; Del Chierico *et al.*, 2015), de esta manera es posible dirigir el estudio a la caracterización de estas últimas regiones como estimadores para la reconstrucción filogenética en comunidades microbianas (Vos *et al.*, 2012), ya que se pueden obtener secuencias de aproximadamente 400 a 500 pb, lo que facilita su estudio (Del Chierico *et al.*, 2015). Por otra parte, el gen 16S rRNA puede repetirse un gran número de veces en el genoma de una sola bacteria (Vos *et al.*, 2012; Del Chierico *et al.*, 2015), lo que permite que el gen completo se localice en muestras con poco DNA o cuando este está parcialmente degradado.



**Figura 1. Arriba: Regiones hipervariables (cuadros amarillos) y regiones conservadas (cuadros azules) del gen 16S rRNA. Ejemplo de un par de iniciadores para amplificación de la región hipervariable V1-V3 a partir de la región conservada. Tomado y modificado de: Del Chierico *et al.*, 2015. Abajo: Mapa de iniciadores utilizados para cada región hipervariable, las regiones verdes son las regiones mejor informativas para análisis filogenéticos de phyla bacteriana. Tomada y modificada de: Yang *et al.*, 2016.**

## **2.4 Metagenómica aplicada a la diversidad microbiana**

La metagenómica se puede definir como la secuenciación del material genético (genes específicos o genomas completos) de todos los microorganismos presentes en una muestra (Cadena-Zamudio *et al.*, 2016; Gómez-Merino *et al.*, 2016). El análisis de diversidad microbiana es una herramienta que ha cobrado gran relevancia en la última década ya que con la microbiología clásica sólo es posible estudiar cepas cultivables en medios de cultivo artificiales, y hoy en día se sabe que más del 90% de microorganismos existentes no pueden ser cultivados *in vitro*, lo que resulta una gran limitante para la microbiología clásica (Cadena-Zamudio *et al.*, 2016; Gómez-Merino *et al.*, 2016).

Por otra parte, los estudios de diversidad microbiana mediante secuenciación masiva permiten evaluar tanto la composición como la estructura de la diversidad en una comunidad de microorganismos, así como entre diferentes comunidades (Cadena-Zamudio *et al.*, 2016; Gómez-Merino *et al.*, 2016).

La secuenciación masiva de genes específicos constituye una de las técnicas de la metagenómica más utilizadas; en la cual se amplifican genes diana, como es el gen 16S rRNA, el gen housekeeping (gen que siempre está presente en el genoma bacteriano) más utilizado, el cual fue utilizado por primera vez en la plataforma de Sanger como un marcador molecular para estudios de reconstrucción filogenética y taxonomía bacteriana (Del Chierico *et al.*, 2015). Posteriormente, las demás plataformas como 454 de Roche (mediante pirosecuenciación) continuaron con el gen 16S rRNA como gen diana para la asignación de identidad de los organismos procariontes presentes en una muestra ambiental (metagenómica).

## **2.5 Plataforma de secuenciación Ion PGM™ de Ion Torrent™**

Ion PGM de Ion Torrent™ (Thermo Fisher Sci. Inc., USA) es una de las plataformas NGS con la que se ha logrado obtener una gran cantidad de datos generados en poco tiempo, con un margen de error mínimo y a menor costo (Del Chierico *et al.*, 2015).

Esta plataforma al igual que las demás NGS, como Illumina y 454 de Roche, destaca por la amplificación de fragmentos cortos de DNA (Wooley *et al.*, 2010) para aumentar la

señalización de la reacción durante la secuenciación y su flujo de trabajo se rige bajo cuatro pasos principales: (1) obtención de las muestras, (2) extracción de DNA metagenómico, (3) preparación y templado de bibliotecas y (4) reacción de secuenciación (Del Chierico *et al.*, 2015; Cadena-Zamudio *et al.*, 2016).

1.- La obtención de la muestra debe contener las poblaciones microbianas representativas del medio; sin embargo, en microbiología no es posible determinar el número de especies al momento del muestreo, por lo que pueden generarse curvas de rarefacción que permitan calcular el número de especies esperadas por muestra, con base a el número de individuos (Moreno, 2001; Wooley *et al.*, 2010).

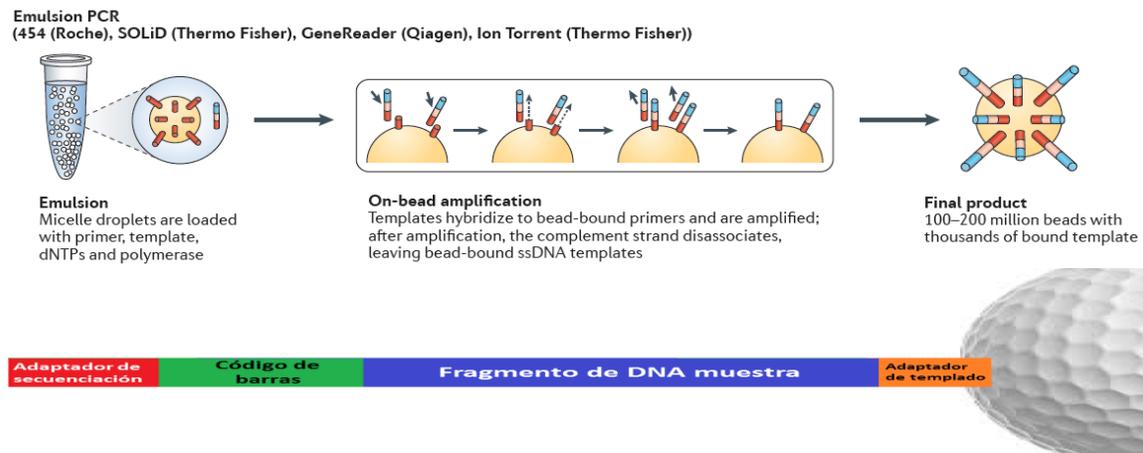
2.- La extracción de DNA metagenómico se puede realizar por varios métodos, así como utilizar sistemas comerciales con protocolos sencillos y rápidos, sin embargo, cada método está basado en diferentes principios y sus resultados no son los mismos, el método de extracción debe elegirse con base en el tipo de muestra, ya que difieren si es una muestra de suelo o una muestra de materia orgánica en descomposición (Alaeddini, 2012; Barbaric *et al.*, 2015). El método más utilizado es el de fenól-cloroformo, que utiliza diferentes solventes orgánicos como cloroformo-alcohol isoamílico y fenol frío (equilibrado pH 8) para precipitar lípidos, proteínas y otros compuestos (Baena *et al.*, 2013), pero este método es complejo y consta de muchos pasos, por lo que puede generar contaminación y bajos rendimientos en los DNA finales (Fraga *et al.*, 2004).

Uno de estos problemas es la persistencia de compuestos inhibidores de PCR, los cuales reaccionan con la polimerasa antes de que ésta actúe en el termociclador, o quelatan compuestos esenciales para la amplificación, por lo que se han desarrollado varios métodos para contrarrestar los inhibidores de PCR, como el uso de albúmina sérica de bovino (BSA), dimetil sulfóxido (DMSO), polivinilpolipirrolidona (PVPP), dilución de DNA, entre otros (Kovatsi *et al.*, 2009; Alaeddini, 2012; Lewin *et al.*, 2016).

3.- La preparación y templado de las bibliotecas

Las bibliotecas se preparan mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en emulsión de microesferas con nanopozos (Cadena-Zamudio *et al.*, 2016), es decir, se amplifican los fragmentos del gene mediante PCR y posteriormente se adhieren

adaptadores y códigos de barras a los extremos de los amplicones (Figura 2), los adaptadores están diseñados para ensamblar el fragmento de DNA muestra a cada pozo de las microesferas, mientras que los códigos de barras permitirán que los productos amplificados se diferencien de acuerdo con la muestra de procedencia (Del Chierico *et al.*, 2015). Posteriormente se depuran los pozos con más de un amplicón (policlonales) y se dejan únicamente los pozos con un sólo amplicón adherido (monoclonales) ya que son estos los que proveerán de secuencias limpias sin interferencias. Otras plataformas, como 454 de Roche® y SOLiD (ThermoFisher Sci. Inc., USA), utilizan este tipo de bibliotecas en emulsión con microesferas, mientras que Illumina usa PCR fluida en núcleos unidos a la superficie de una celda de flujo (Del Chierico *et al.*, 2015; Cadena-Zamudio *et al.*, 2016).

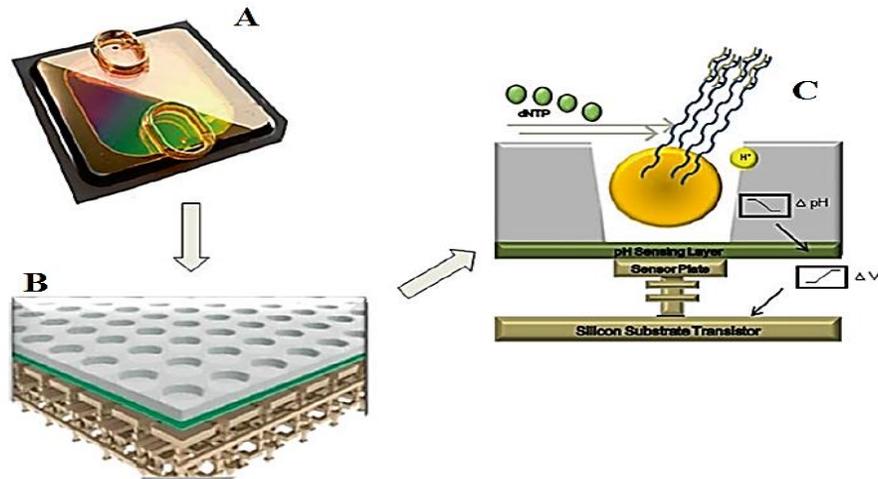


**Figura 2. PCR en emulsión para templat bibliotecas en las microesferas (arriba) tomado de Goodwin *et al.* (2016). Composición de una biblioteca templada en la microesfera (abajo). Tomado y modificado de Metzker (2010).**

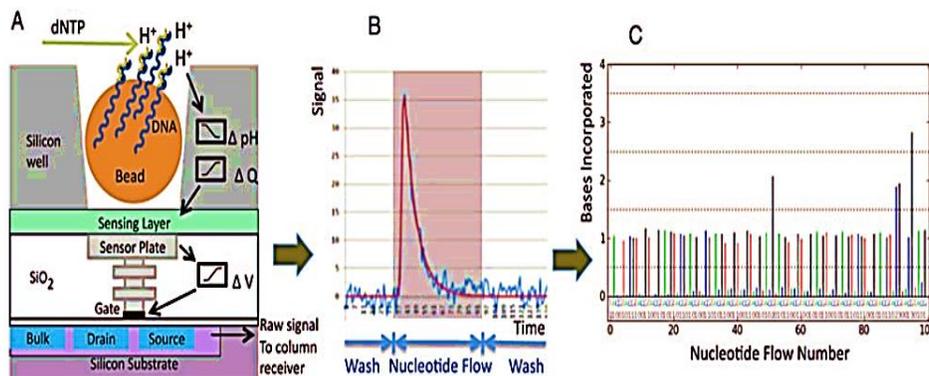
Posteriormente se mezclan todas las microesferas templadas y se vierten en un chip semiconductor (Figura 3) el cual será el portador de las bibliotecas durante la secuenciación.

4.- Secuenciación. Ion PGM™ Ion Torrent™ (ThermoFisher Sci. Inc., USA) utiliza tecnología de secuenciación por semiconducción que detecta diferenciales de voltaje (Liu *et al.*, 2012; Cadena-Zamudio *et al.*, 2016; Goodwin *et al.*, 2016), cada vez que la polimerasa incorpora un nucleótido a la hebra que se sintetiza (fragmento de DNA muestra) es liberado a la matriz un protón  $H^+$ , y al aumentar la concentración de  $H^+$  en la solución se

desencadena un diferencial de voltaje el cual es detectado por el PGM, que posteriormente se traduce en un diferencial de pH (Liu *et al.*, 2012; Merriman *et al.*, 2012; Del Chierico *et al.*, 2015; Goodwin *et al.*, 2016), de igual manera, cuando ningún nucleótido es incorporado no se produce la reacción (Figura 4).



**Figura 3.** (A) Chip semiconductor; (B) nanopozos del chip, en cada pozo se introduce una microesfera para su secuenciación; (C) flujo de nucleótidos inyectados a la solución del chip, donde se lleva a cabo la secuenciación por diferencial de pH y voltaje. Tomado y modificado de Del Chierico *et al.* (2015)



**Figura 4.** Principio químico de la secuenciación de Ion PGM™ de Ion Torrent™. A) detección del cambio de pH en el chip electrodo por diferencial de voltaje; B) las señalización del cambio de pH son medidas mediante la frecuencia de tiempo durante el flujo de inserción de los nucleótidos; C) Ionograma cada incorporación de nucleótido es registrado y con base en la intensidad del cambio de pH se calcula la intensidad de incorporación. Tomado de Merriman *et al.* (2012).

## 2.6 Ventajas de Ion PGM™ de Ion Torrent™

Es muy difícil comparar las diferentes plataformas de secuenciación, debido a que cada una cuenta con tecnologías y principios de secuenciado diferentes, por lo que es casi imposible compararlas bajo una misma escala (Liu *et al.*, 2012; Cadena-Zamudio *et al.*, 2016)

Ion PGM™ (Ion Torrent™, Life Technologies) es la primer plataforma en no utilizar un escáner óptico para la detección de fluorescencia (Goodwin *et al.*, 2016), como el 454 de Roche® (pirosecuenciación) y Hiseq de Illumina (secuenciación por síntesis) que utilizan luciferina y fluoróforos respectivamente para producir una señal luminosa cada vez que un nucleótido es incorporado y esta es detectada por un sensor óptico (Liu *et al.*, 2012; Del Chierico *et al.*, 2015). La ventaja Ion PGM™ (Ion Torrent™, Life Technologies) es que el diferencial de voltaje aumenta proporcionalmente al número de nucleótidos incorporados, mientras que la fluorescencia aumenta su probabilidad de error en regiones homopoliméricas, es decir, con incorporaciones de 6 a 8 pb del mismo nucleótido (Rizzi, 2015; Goodwin *et al.*, 2016).

Sin embargo, 454® de Roche® puede desarrollar lecturas muy largas de hasta 700 pb, sin embargo tiene un alto nivel de error por las regiones homopoliméricas (Rizzi, 2015; Goodwin *et al.*, 2016), mientras que Illumina tiene la ventaja de obtener hasta dos mil millones de lecturas (Del Chierico *et al.*, 2015), pero Ion Torrent tiene un buen rendimiento de lecturas con hasta 400 pb, lo cual brinda diversas aplicaciones dirigidas a secciones específicas del DNA (Goodwin *et al.*, 2016).

Otra de las ventajas de Ion Torren es que ofrece una amplia gama de chips, con rangos de ~50 Mb hasta 150 Gb, y cuenta con una velocidad de lectura de hasta 7 horas, convirtiéndose en una de las plataformas más veloces, no obstante el costo por lectura sigue siendo muy elevado (Goodwin *et al.*, 2016). Aunque no PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El detritus es el residuo del sustrato que las hormigas cultivadoras de hongos usan para producir su alimento (un basidiomiceto mutualista), este sustrato, denominado como “jardín fúngico”, ha sido objeto de múltiples estudios y hasta ahora se sabe que alberga múltiples

especies de bacterias y hongos que cumplen diversas funciones simbióticas, tanto parasíticas como mutualistas. Además de otras tantas cuya interacción aún no se conoce.

No obstante la mayoría de estudios se han enfocado en el aspecto microbiano y enzimático del jardín fúngico en el interior de las galerías especializadas, pero un pequeño número se han dedicado al entendimiento de lo que ocurre en los vertederos así como su importancia ecológica como un nicho para la microbioma edáfica y sobre todo, su uso como un promotor de actividad microbiana y enzimática con potencial biotecnológico de fácil acceso. Pero, ¿es posible que las comunidades microbianas del detritus sean las mismas en cualquier ecosistema que se recolecten, o acaso su composición microbiana se ve afectada por las condiciones climáticas y vegetales propias de su localización?

La apología central del presente estudio pretende resolver qué especies microbianas son propias del detritus y cuáles varían en cada ecosistema donde se localizan, por otra parte, es necesario saber qué efectos tienen los vertederos de detritus sobre la diversidad microbiana del suelo, al tomar como punto inicial que el jardín fúngico cuenta con una diversidad de microorganismos grande encargados de la biodegradación del material orgánico y que cada ecosistema proporciona diferentes especies vegetales como materia prima, es factible suponer que muchos de los microorganismos que se encuentran dentro del jardín fúngico son transmitidos a partir del material vegetal recolectado, y que muchas poblaciones permanecen en los detritus después de que son vertidos fuera del hormiguero.

Finalmente, al conocer la composición microbiana será factible vislumbrar el uso biotecnológico del detritus con base en sus características microbiológicas, ya que químicamente se ha demostrado en múltiples investigaciones que cuentan con concentraciones de N y P elevadas para tratarse de “desechos”, con un potencial como “composta de hormiga”, y este término podría verse sustentado con los estudios de Haines (1978), Farji y Silva (1995), Fortanelli y Servín (2002) y Maurice-Lira y Quintero-Lizaola (2015), aunado a esto, también se han reportado algunas localidades mexicanas donde ha sido utilizado de forma empírica como abono orgánico para la horticultura.

No obstante es necesario determinar si es factible vislumbrar al detritus (composta de hormiga) como un biofertilizante, siempre y cuando cuente con las poblaciones

microbianas ideales para la biotransformación de materia orgánica y el reciclaje de nutrientes, de igual manera, las bacterias fijadoras de nitrógeno y las productoras de antibióticos que han sido reportadas en el jardín fúngico y que podrían tener un valor biotecnológico si permanecen en los vertederos y fueran potencializados adecuadamente en biorreactores o compostas. Sin embargo, el primer paso es conocer la diversidad microbiana presente en los vertederos de detritus.

### **3. HIPÓTESIS**

- El microbioma de los vertederos está constituido por especies bacterianas propias de los procesos biológicos del detritus, independientemente del ecosistema donde se localicen.
- El microbioma del vertedero está compuesto por poblaciones microbianas propias del suelo y ecosistema donde se localizan.

### **4. OBJETIVOS**

#### **5.1. Objetivo General**

- Analizar la diversidad  $\alpha$  y  $\beta$  de los vertederos de detritus y suelos control de dos ecosistemas diferentes.

#### **5.2. Objetivos Particulares**

- Cuantificar el número de especies bacterianas presentes en los vertederos de detritus.
- Identificar las poblaciones bacterianas estructuralmente más representativas de los vertederos de detritus.
- Identificar las poblaciones bacterianas propias de los vertederos de detritus y las dependientes de los ecosistemas donde se localizan.
- Comparar la diversidad bacteriana de los vertederos de detritus y los de suelos control respecto a los ecosistemas donde se localizan.

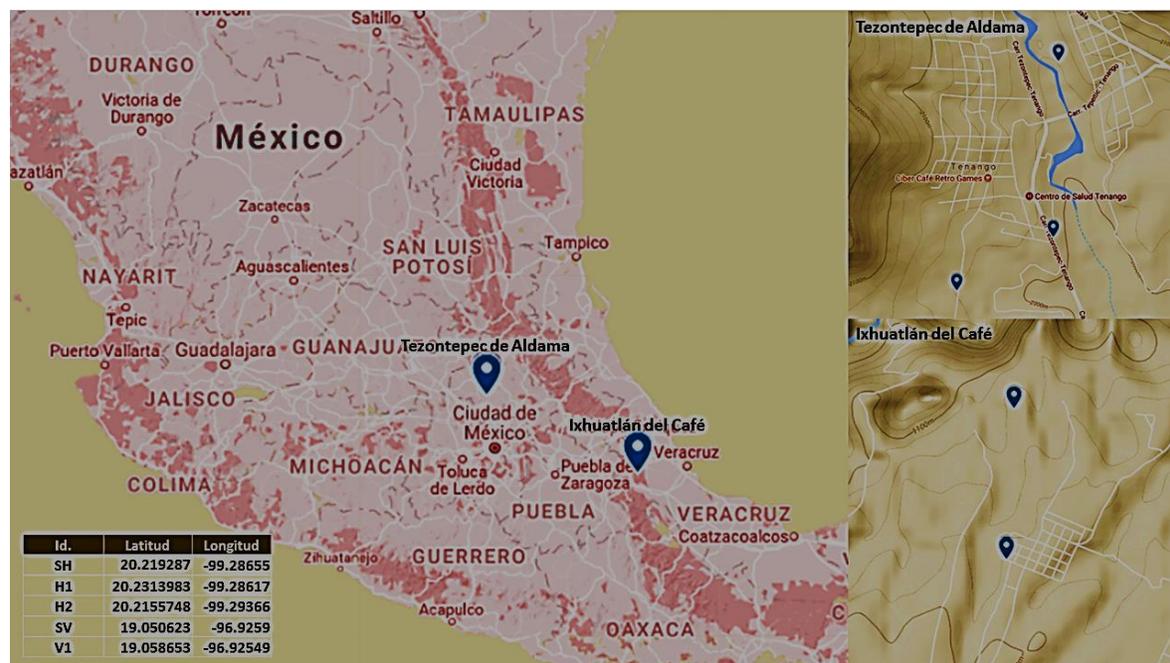
## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Obtención de las muestras

Para la realización de este trabajo se recolectaron cinco muestras (Cuadro 1): tres del municipio de Tezontepec de Aldama, Estado de Hidalgo, México y dos del municipio de Ixhuatlán del Café, Estado de Veracruz, México (Figura 5). Las recolecciones se realizaron en verano (junio-agosto) del 2016 y se mantuvieron congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

**Cuadro 1. Nomenclatura de identificación de las muestras analizadas.**

ID	Muestra
SH	Suelo control en Tezontepec de Aldama, Hidalgo.
SV	Suelo control en Ixhuatlán del café, Veracruz.
H1	Vertedero de detritus de <i>A. mexicana</i> muestreado en Tezontepec de Aldama, Hidalgo.
H2	Vertedero de detritus de <i>A. mexicana</i> muestreado en Tezontepec de Aldama, Hidalgo.
V1	Vertedero de detritus de <i>A. mexicana</i> muestreado en Ixhuatlán del café, Veracruz.



**Figura 5. Ubicación geográfica donde se localizaron las muestras obtenidas.**

Se eligieron estas zonas por sus ecosistemas contrastantes, con la finalidad de comparar e identificar las comunidades microbianas que no dependan de dichos ecosistemas, además de que Veracruz e Hidalgo son dos de los estados con mayor diversidad de hormigas del país, con 319 y 229 especies respectivamente (Ríos-Casanova, 2014), no obstante, ambos estados son muy diferentes en cuanto a sus condiciones ambientales (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Comparación de las condiciones ambientales entre los dos sitios de muestreo.**

<b>Características</b>	<b>Tezontepec de Aldama Estado de Hidalgo</b>	<b>Ixhuatlan del Café Estado de Veracruz</b>
Ubicación	Al suroeste del estado (Valle del mezquital). Entre los paralelos N 20°05' y 20° 16' W 99° 12' y 99°22' (INEGI, 2009b).	Entre los paralelos N 18°53'-19°03' W 96°56'-97°02' (Escamilla-Prado <i>et al.</i> , 2012).
Clima	Semiseco Templado (INEGI,2009b) (con canícula).	Semicálido húmedo a templado húmedo con abundantes lluvias todo el año (INEGI, 2009a)
Temperatura media anual	17 °C (INEGI, 2009b).	22 °C (INEGI, 2009a)
Precipitación media anual	600 mm (Hernández <i>et al.</i> , 2010).	2100 mm (INEGI, 2009a)
Grupo de referencia de suelo	Phaeozem (49.36 %) Leptosol (24.0 %) Vertisol (12.0 %) (INEGI, 2009b).	Leptosol (39 %) Andosol (32 %) Luvisol (27 %) (INEGI, 2009a)
Tipo de vegetación	8.0 % bosque 8.0 % pastizal 7.0 % matorral (INIEGI, 2009b).	3,688.36 ha de bosques mesófilos de montaña. 834.52 ha de bosques de encinos, 795.50 ha de bosques de pinos y bosque tropical caducifolio. (Márquez y Márquez, 2009)
Cultivos producidos	Principalmente hortalizas (Hernández-Fuentes <i>et al.</i> 2010), calabacita ( <i>Cucurbita pepo</i> ), jitomate ( <i>Lycopersicum esculentum</i> ), maíz ( <i>Zea mayz</i> ), durazno ( <i>Prunus pérsica</i> ) etc. (Fortanelli y Servín, 2002)	Café ( <i>Coffea arabica</i> ) (principal), plátano ( <i>Musa paradisiaca</i> ) y cítricos (Escamilla-Prado <i>et al.</i> , 2012)

<p>Especies vegetales forrajeadas por <i>Atta mexicana</i> de acuerdo</p>	<p>Pirú (<i>Schinus molle</i>), huizache (<i>Acacia pennatula</i>), mezquite (<i>Prosopis</i> sp.), maíz (<i>Zea mays</i>).</p>	<p>Café (<i>Coffea arabica</i>), naranja (<i>Citrus sinensis</i>.), vainillo (<i>Inga</i> sp.), Ixpepe (<i>Trema micrantha</i>), mango (<i>Mangifera indica</i>), zapote negro (<i>Diospyros digya</i>) y limón agrio (<i>Citrus aurantifolia</i>)</p>
<p>Importancia de la especie <i>A. mexicana</i></p>	<p>Es considerada una importante plaga.</p>	<p>Gastronómico y económico. La especie es conocida como “Chicatana” (Escamilla-Prado <i>et al.</i>, 2012)</p>

## 6.2. Extracción y pruebas de integridad del DNA metagenómico

La extracción de DNA metagenómico se realizó mediante dos métodos, por Fenol-Cloroformo (Wilson, 1990) modificado y por el sistema comercial ZR Fecal DNA MiniPrep™ (Zymo Research®, CA, USA).

### Extracción por Fenol-Cloroformo

Se utilizaron 150 mg de muestra, mezclados con 175 µL de TE (Tris y EDTA) 50:20 como buffer y 10 µL de proteinasa K más 40 µL de SDS 10%, la solución se incubó 2 h a 56 °C. Se realizaron dos extracciones de proteínas con 500 µL de fenol frío (equilibrado pH 8) y dos con 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), con centrifugaciones a 12,000 rpm a 4 °C en cada paso. Al sobrenadante final se le agregó 500 µL de isopropanol frío y se guardó a -20 °C toda la noche. Después se temperó y centrifugó, la pastilla de DNA se lavó con 1 µL de etanol frío 70% y se puso a secar a 65 °C durante 2 h, finalmente se rehidrató con 50 µL de agua tipo I destilada libre de nucleasas y se almacenó -20 °C.

### Extracción por Kit comercial.

Se utilizó el protocolo de manufactura del kit comercial ZR Fecal DNA MiniPrep™ (Zymo Research®, CA, USA) para materia fecal y suelos con una modificación, ya que las muestras fueron previamente maceradas en morteros estériles, además para suelo se requirió utilizar 250 mg de muestra (100 mg más de lo que marca el protocolo). Después de

cada extracción se realizó electroforesis en gel agarosa 1.0% durante 45 min a 90V, para verificar la integridad del DNA.

### 6.3. Pruebas de PCR

Se realizaron mediante la amplificación de una región parcial de ~400 pb del gen 16S rRNA con un termociclador SelectCycler (Select BioProducts© For Life Science Research, USA.) y se utilizó el programa 16S 5B y 3A (Cuadro 3) del laboratorio de Recursos Genéticos Microbianos del CNRG-INIFAP. Cada reacción PCR requirió la mezcla (Cuadro 4) de 2.5 µL 10X PCR Buffer, 1 µL 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 µL 100 mM dNTP set, 0.3 µL de Taq polimerasa recombinante, 2.5 µL de cada iniciador (5B forward 5'-TTG GAGAGTTTTGATCMTGG-3' y 3A reverse 3'-GTATTACCGCGGCTGCTG-5') y 2 µL de DNA metagenómico. Las pruebas de PCR consistieron en la aplicación de 1 µL de inhibidores de PCR: albúmina sérica de bovino (BSA) o dimetilsulfóxido (DMSO) directamente en el DNA extraído y diluido a 1:10, 1:100 y 1:1000. Las electroforesis para visualizar los productos amplificados fueron en gel de agarosa 1.5 % a 90 V 40 m.

**Cuadro 3. Ciclos de temperaturas del termociclador para pruebas de PCR.**

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización	95	600
25 Ciclos	95	30
	58	30
	72	20
	72	420
Extensión final	72	420
Almacenamiento	4	∞

**Cuadro 4. Mezcla de reactivos para pruebas de PCR del DNA metagenómico.**

Reactivo	1X reacción (µL)	10X reacciones (µL)
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	10.7	107
10X PCR Buffer (-MgCl <sub>2</sub> )	2.5	25
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1	10
100 mM dNTP set	2.5	25
Taq polimerasa recombinante	0.3	3
Iniciadores (5B y 3A)	2.5 c/primer	25
BSA	1	1 (directo al DNA)
DNA metagenómico	2	2 cada tubo

#### 6.4. Construcción de bibliotecas

Se llevó a cabo una PCR con el sistema 16S™ metagenomics Kit (Thermofisher Sci. Inc., USA), para la cual se requirió 3 µL de DNA de muestra por duplicado, ya que para cada muestra se realizaron dos reacciones, una para las regiones V2-4-8 y otra reacción para las V3-6-7-9. Se utilizó un control positivo (*E. coli*) y un testigo negativo (agua). En tubos de PCR de 200 µL se mezclaron las muestras con los reactivos (Cuadro 5) para dar un volumen total de 30 µL por reacción. Se mezclaron las reacciones que correspondían a la misma muestra, para obtener volumen final 60 µL por muestra.

**Cuadro 5. Reactivo del Kit Ion 16S™ Metagenomics utilizados para la construcción de bibliotecas del gen 16S rRNA.**

Componente	Cantidad por muestra	
	Reacción 1	Reacción 2
	16S PRIMERS SET 10X (V2-4-8) (µL)	16S PRIMERS SET 10X (V3-6-7-9) (µL)
2X ENVIROMENTAL MASTER MIX	15	15
16s PRIMERS SET 10X (V2-4-8)	3	0
16s PRIMERS SET 10X (V3-6-7-9)	0	3
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	9	9
TOTAL	15	15

**Cuadro 6. Programa de temperatura para amplificación de las siete regiones hipervariables del gen 16S rRNA.**

	Inicial		22 ciclos		Finalización	Almacenamiento
Temp.	95.0	95.0	58.0	72.0	72.0	4.0
Tiempo	0:35	0:30	0:30	0:30	7:00	∞

#### 6.5. Purificación y cuantificación productos amplificados

Se mezclaron aproximadamente 54 µL del producto amplificado con 96 µL de Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter Inc, USA) previamente temperado y homogeneizado con vórtex a máxima potencia durante 10 min. Las mezclas se colocaron en un rack magnético y se esperó a que la mezcla clareara, después se desechó el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet. Este último se lavó dos veces con etanol 70 % filtrado a 0.2 µm recién

preparado y temperado sin quitarlo del rack magnético, se secó el pellet a temperatura ambiente y se rehidrató con 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. En este último paso se homogenizó por pipeteo y se colocó nuevamente en el soporte magnético, cuando las muestras clarearon se recuperó el sobrenadante y el botón se desechó. Las muestras se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Se cuantificaron los productos amplificados mediante un NanoDrop 2000® Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), el cual se lavó con agua tipo 1 libre de nucleasas antes y después de su uso. Se agregó 1  $\mu\text{L}$  de cada muestra en el lector del NanoDrop 2000®. Las concentraciones se obtuvieron en  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  y se utilizó una hoja de cálculo Excel para calcular las diluciones necesarias para ajustar la concentración de productos amplificados a  $50\text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  en 79  $\mu\text{L}$  de agua tipo 1 libre de nucleasas. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\text{Vol. de la mezcla de amplicones} = \frac{50\text{ng}}{\text{Concentración de los productos de PCR en ng}/\mu\text{L}}$$

#### **6.6. Generación y purificación de extremos romos**

Para la generación de extremos romos se mezcló a cada muestra por pipeteo con 20  $\mu\text{L}$  de Ion Plus Fragment Library Kit 5X End Repair Buffer (ThermoFisher Scientific Inc., USA) y 1  $\mu\text{L}$  Ion Plus Fragment Library Kit End Repair Enzyme (ThermoFisher Scientific Inc., USA). Después se incubó 20 min a temperatura ambiente.

La purificación se realizó con 180  $\mu\text{L}$  de Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter Inc, USA) mediante el mismo procedimiento descrito en el punto 6.5 de materiales y métodos del presente trabajo, pero se dispersó las perlas y recuperó los productos con 25  $\mu\text{L}$  de Ion Plus Fragment Library Low Te (ThermoFisher Scientific Inc., USA). Se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **6.7. Ligación de código de barras y adaptadores**

Para la ligazón de los adaptadores y del código de barras se usaron los reactivos del Ion Plus library fragment Kit (ThermoFisher Scientific Inc., USA), en el que se utilizó 10  $\mu\text{L}$  de 10X ligasa buffer, 2  $\mu\text{L}$  dNTPs Mix,  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$  DNA ligasa y 8  $\mu\text{L}$  Nick-Repair polimerasa

para cada muestra. Se le adicionaron 2  $\mu\text{L}$  del código de barras (Ion Xpress Barcode). Se anotó el número de cada código de barras que se ligó a la muestra. Se adicionó 49  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas a cada muestra para obtener un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  por muestra.

Las muestras se colocaron en el termociclador con un programa de temperaturas que constó de tres etapas: 1) 25 °C 15 min; 2) 72°C 5 min y almacenamiento a 4 °C.

Las muestras se mantuvieron en hielo durante el tiempo que se temperó el Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter Inc, USA) y se utilizaron 140  $\mu\text{L}$  por muestra para realizar la purificación mediante el mismo procedimiento descrito en el punto 6.5 de materiales y métodos del presente trabajo, pero las perlas se dispersaron y se recuperaron los productos con 25  $\mu\text{L}$  de Ion Plus Fragment Library Low Te (Thermofisher Scientific Inc., USA). Se almacenó a -20 °C.

#### **6.8. Amplificación y purificación de bibliotecas**

La amplificación de las bibliotecas se llevó a cabo mediante PCR en la cual, cada reacción (25  $\mu\text{L}$  de bibliotecas sin amplificar) se mezcló con 100  $\mu\text{L}$  de Platinum PCR super mix high fidelity y 5  $\mu\text{L}$  de Library amplification primer mix de Ion Plus Fragment Library Low Te (Thermofisher Scientific Inc., USA) para obtener un volumen total de 135  $\mu\text{L}$  por muestra.

Cada reacción se dividió en dos tubos para PCR de 200  $\mu\text{L}$  por partes iguales, de modo que cada tubo contuvo 65  $\mu\text{L}$  de reacción.

El programa del termociclador constó de tres etapas: 1) 95°C por 5 minutos; 2) cinco ciclos de 95°C durante 15 s, 58°C durante 15 s y 70°C por 1 min; 3) mantenimiento a 4°C no más de 1 h. Se combinaron las muestras que fueron previamente divididas.

La purificación se llevó a cabo con 195  $\mu\text{L}$  de Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter Inc., USA), la purificación se realizó mediante el mismo procedimiento, descrito en el punto 6.5 de materiales y métodos del presente trabajo, pero las perlas se dispersaron y se

recuperaron los productos amplificados con 30  $\mu\text{L}$  de agua libres de nucleasas. Se almacenaron las muestras a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **6.9. Cuantificación de la biblioteca y determinación del factor de dilución (TDF)**

La cuantificación de las bibliotecas se determinó mediante el sistema High Sensitivity DNA Reagents (Agilent® technologies, CA, USA) y 2100 Bioanalyzer Instruments (Agilent® technologies, CA, USA) mediante el protocolo de manufactura, para el cual se preparó un gel-dye High Sensitivity DNA Reagents, del cual se colocaron 9  $\mu\text{L}$  en los tres pozos marcados con “G” para usarlo como matriz para los electrodos de lectura (chip negro), se colocó 5  $\mu\text{L}$  de High Sensitivity DNA Marker (Agilent® technologies, CA, USA) y al pozo de la escalera se agregó 1  $\mu\text{L}$  de High Sensitivity DNA Ladder (Agilent® technologies, CA, USA). Posteriormente se colocó 1  $\mu\text{L}$  de muestra en cada pozo diseñado con este fin y se mezclaron por vórtex a 2400 rpm durante 60 s. El electrodo de lectura se colocó en el lector del Agilent® 2100 Bioanalyzer (Agilent® technologies, CA, USA) y se cerró, inmediatamente comenzó la corrida. El Agilent® 2100 Bioanalyzer (Agilent® technologies, CA, USA) fue lavado antes y después de cada corrida mediante el electrodo de limpiado (chip blanco) con 350  $\mu\text{L}$  agua tipo 1.

La corrida proporcionó la concentración de las bibliotecas ( $\text{pg}/\mu\text{L}$ ) y se convirtió a  $\text{ng}/\text{mL}$  ( $\text{pg}/\mu\text{L} = \text{ng}/\text{mL}$ ) mediante la hoja de cálculo de Microsoft® Excel “Equimolaridad de amplicones”. Se determinó el factor de dilución para el manejo de las muestras con una concentración final de la mezcla de bibliotecas de 26 pM mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Factor de dilución (TDF)} = \frac{\text{Concentración de la biblioteca en pM}}{26 \text{ pM}}$$

## 6.10. Templado

Se utilizó un equipo OneTouch™ 2 (OT2) (ThermoFisher Sci. Inc., USA) para llevar a cabo el templado de las bibliotecas mediante una PCR en emulsión con el sistema ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit ((ThermoFisher Sci. Inc., USA). Para el cual se realizó una mezcla de los reactivos y 25 µL de la librería a 25 µL (Cuadro 7).

Se preparó el reactivo Ion PGM™ Hi-Q™ ISPs según el protocolo de manufactura y se mezcló con vórtex a máxima potencia por 1 min. Se agregó al tubo de tapadera morada del reactivo “Ion PGM™ Hi-Q” el cual contiene 800 µL de reactivo los siguientes componentes en el orden que se muestran en el siguiente cuadro:

**Cuadro 7. Mezcla para PCR en emulsión.**

Reactivo	Cantidad necesaria (µL)
Agua libre de nucleasas	375
Ion PGM™ HiQ™ Enzyme mix	500
Ion PGM™ Hi Q™ ISPs	100
Librería a 26 pM	25
TOTAL	1000

Después se mezcló la solución de amplificación preparada en el cuadro 7 y proceder de inmediato al llenado del filtro.

Los 1000 µL de la mezcla se transfirieron por el orificio de la cánula del filtro. Después se añadieron 850 µL de aceite Ion One Touch™ reaction oil por el mismo orificio, se cambió la punta y se agregó 850 µL de aceite. Se evitó mezclar la solución amplificada con el aceite.

Se colocó el filtro en la posición indicada por el OT2, se cerró la tapa de la centrífuga y se presionó la opción de inicio de corrida en la pantalla para comenzar con el templado el cual duró ~5 h. Después se siguieron las instrucciones solicitadas en la pantalla del OT2, terminado el templado se retiraron los tubos de recolección y se desechó el exceso de sobrenadante hasta dejar sólo 100 µL del mismo sin que se toque el Pellet.

Después se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de Ion OneTouch™ Wash Solution a cada tubo de recolección y se mezcló con vórtex a baja velocidad sin derramar, se pasó el contenido a tubos Eppendorf® LoBind® de 1.5  $\mu\text{L}$  y se removió el sobrenadante excepto 100  $\mu\text{L}$  de muestra y se almacenó a 4 °C. Se lavó el equipo OneTouch™ según el protocolo de manufactura.

### 6.11. Enriquecimiento

Se preparó la solución Melt-Off mediante la mezcla de 280  $\mu\text{L}$  de Tween®Soluti y 40  $\mu\text{L}$  de NaOH 1M y se llenaron los 8 pocillos de la tira.

Se prepararon las esferas con 13  $\mu\text{L}$  Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 en un tubo de microcentrífuga 1.5  $\mu\text{L}$  Eppendorf® LoBind®. El tubo se colocó en un rack magnético durante 2 min y se desechó el sobrenadante, se retiró el magneto y se agregó 130  $\mu\text{L}$  de MyOne™ Beads wash solution y se homogeneizó con ayuda de una micropipeta.

Se agregó la muestra y los reactivos en los pocillos de la canaleta conforme al orden establecido (Cuadro 8), después se colocó un tubo de PCR de 200  $\mu\text{L}$  abierto con 10  $\mu\text{L}$  de Neutralization solution en la base de recolección. La placa de pocillos se colocó en la canaleta con la orilla de terminación cuadrada girada al lado izquierdo y se oprimió el botón de inicio para comenzar el enriquecimiento. Al terminar se retiró el tubo de PCR con el templado enriquecido.

#### **Cuadro 8. Orden de colocación de los reactivos en la tira de pocillos para enriquecimiento.**

No. de pozo	Descripción
1	100 $\mu\text{L}$ de templado positivo
2	130 $\mu\text{L}$ Dynabeads MyOne™Streptavidin C1 Beads preparadas.
3	300 $\mu\text{L}$ Ion One Touch™ Wash Solution.
4	300 $\mu\text{L}$ Ion One Touch™ Wash Solution.
5	300 $\mu\text{L}$ Ion One Touch™ Wash Solution.
6	Vacío
7	300 $\mu\text{L}$ de solución Melt-Off.
8	Vacío

### **6.12. Limpieza del Ion PGM™ (Ion Torrent™, Life Technologies)**

Se realizó con hipoclorito para limpiar líneas. Se usó un stock de NaOH 1M preparado con agua tipo 1 de 18 MΩ en un tubo de 1.5 mL. Se preparó la solución de cloro con una pastilla de hipoclorito Ion OGM™ Cleaning Tablet en 1 L de agua tipo 1 y se agitó hasta que la pastilla se disolvió por completo. Se agregaron 1,000 µL de NaOH 1M en la botella con la solución de hipoclorito y se filtró al vacío con una membrana de 0.22 µm (Corning Incorporated, USA). Se lavó tres veces con 100 mL de agua tipo 1 18 MΩ cada botellas “wash 1 y 3” de 250 mL y “wash 2” de 2L. Después se agregaron 250 mL de la solución de hipoclorito filtrada en la botella W1 y se enjuagó el zipper de la posición W1, se colocó la botella de limpieza con el hipoclorito en el sitio indicado en el equipo. Lo mismo se realizó con las botellas W2 y W3, las cuales se colocaron en su respectivo lugar, se colocaron las bandejas para recolectar los desechos en la posición de los tubos de dNTPs y se eligió la opción “clean”. Se siguieron las instrucciones para realizar un lavado con cloro.

Al finalizar el lavado con hipoclorito, se retiró la botella W1 con la solución de hipoclorito, se enjuagó el zipper con agua tipo 1 y se colocó una nueva botella W1 250 mL con agua tipo 1. Se reinició el lavado para eliminar el exceso de hipoclorito en las líneas de PGM. Se retiraron todas las botellas y las bandejas de recolección.

### **6.13. Inicialización del Personal Genome Machine Ion PGM™ (Ion Torrent™, Life Technologies)**

Se inició el Ion PGM™ con el ajuste del pH, mientras tanto se colocó las soluciones stock de los dNTPs sobre hielo. Se verificó que la presión del tanque gas de Argón fuera > 500 psi. Se enjuagó tres veces las botellas W2 2000 mL con 200 mL de agua tipo 1 y se llenaron con agua tipo 1 limpia hasta el borde y se adicionó Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing W2 Solution (Ion Torrent™, Life Technologies). Se adicionaron 70 µL de NaOH 100 mM recién preparado a la botella W2 y se mezcló 5 veces por inversión. Se enjuagaron tres veces las botellas W1 y W3 con 100 mL de agua tipo 1 y añadieron 350 µL de NaOH 100mM recién preparado a W1 y 50 mL de Ion PGM™ Sequencing W3 Solution a la W3. Se comenzó la inicialización conforme a las instrucciones de la pantalla táctil del Ion PGM™ (Ion Torrent™, Life Technologies).

Después se prepararon los tubos de 50 mL con las soluciones madres de dNTPs durante el proceso de inicialización.

Los dNTPs se homogeneizaron con vórtex y siempre se mantuvieron en hielo. Después se etiquetaron los cuatro tubos con las etiquetas (dGTP, dCTP, dATP y dTTP). Se transfirieron 20  $\mu$ L de cada dNTP a su respectivo tubo y se insertaron nuevos zipper azules en cada puerto de dNTP, se evitó tocar la zona azul de los zipper. Cuando el equipo lo indicó se colocó cada tubo de reactivo al puerto dNTP correspondiente. Se siguieron las instrucciones de la pantalla táctil de PGM™ (Ion Torrent™, Life Technologies) para finalizar la inicialización. Para cada uno de los pasos se cambió de guantes.

#### **6.14. Generación de corrida en Torrent server**

Se creó un plan de corrida en la página de internet Torrent server mediante los siguientes pasos:

1. Seleccionar la opción “plan”.
2. Plan template run.
3. 16s target sequencing.
4. Plan new run.
5. Ion report: None.
6. Application: metagenomics.
7. Target technique: 16s targeted sequencing.
8. Library kit type: Ion plus fragment library kit.
9. Chip type: Ion 316™ chip V2.
10. Template kit; One touch.
11. Ion PGM template OT2 400 kit.
12. Monitoring: 30-30-30.
13. Reference: No aplica.
14. Plugins: FastQC.
15. Output: DANIEL\_MARTINEZ

### 6.15. Preparación de templado positivo

Se dio vórtex a las Ion sphere™ particles durante 5 s y spin durante 2 s, se adicionaron 5 µL de Ion sphere™ particles a los 200 µL del templado enriquecido, se homogenizó cinco veces con ayuda de una micropipeta y se centrifugó 15,500 xg 2 min. Se removió el sobrenadante y se dejó 15 µL en el tubo con cuidado de no tocar el botón. Se adicionaron 12 µL de sequencing primer y se completó el volumen final de 27 µL con annealing buffer y se mezcló por pipeteo sin tocar el pellet y se termocicló (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Programa del termociclador para la preparación del templado.**

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
95	2
37	2

### 6.16. Chip check

El chip check se utilizó para comprobar que el chip trabajara sin fugas y que la conductividad funcionara con la conductividad deseable. Primero se colocó un chip nuevo en la placa de conexión, se presionó “chip check” y se siguió las indicaciones de a pantalla táctil para comenzar el proceso. Se cargó la muestra.

### 6.17. Cargado del chip

Antes de cargar el chip se adicionó la polimerasa de secuenciación al ISPs, al terminar el análisis de secuenciación, se removió el ISPs del termociclador y se adicionaron 3 µL de Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Polymerase (Ion Torrent™, Life Technologies) para tener un volumen total de 30 µL, se homogeneizó por pipeteo e incubó 5 min a temperatura ambiente.

Para cargar el chip se retiró el anterior y se inclinó a un ángulo 45° para que el puerto de carga quedara hacia abajo, se insertó la punta de la pipeta en el puerto de carga y se eliminó la mayor cantidad de líquido. Se colocó el chip con el puerto de carga hacia abajo en el adaptador de la centrífuga (MiniFuge, VWR International, USA) y se centrifugó 3 s para vaciar completamente el chip.

La muestra se cargó en el chip y se tomaron 30  $\mu$ L de ISPs con una micropipeta (Hamilton Company, USA), y se insertó la punta firmemente en el puerto de carga y se colocó el chip a 45° con el puerto de carga hacia abajo, después se giró el émbolo de la micropipeta para depositar el templado lentamente para evitar que se formaran burbujas en el chip.

El chip se centrifugó 30 s y se colocó a 45° sin retirar la punta del puerto de carga, se pipeteó la muestra dentro y fuera del chip tres veces lentamente para evitar la formación de burbujas. Se volvió a centrifugar 30 s y de nuevo se colocó a 45° sin retirar la punta del puerto de carga, se mezcló nuevamente por pipeteo con cuidado de no formar burbujas. Después se centrifugó otra vez durante 30 s. Se extrajo la mayor cantidad de líquido con el chip a 45°, se desechó el líquido extraído y el chip se centrifugó 5 s para retirar el líquido restante con la micropipeta. Cada vez que se centrifugó se hizo con la pestaña hacia el centro de la centrífuga.

#### **6.18. Secuenciación**

El tipo de chip que se utilizó fue un Ion 316<sup>TM</sup>v2, cuyo tiempo de corrida va de 3 h aproximadamente para un promedio de 200 pb por lectura y puede obtener de 300 a 300 Mb (megabases), o hasta 1 Gb (Gigabases) si el tiempo se prolonga hasta 5 h con un promedio de 400 pb por lectura. Después de que se cargó el chip con las bibliotecas templadas se siguieron los pasos conforme a las indicaciones de la pantalla táctil del Ion PGM (Thermofisher Sci. Inc., USA). A partir de la secuenciación se generaron dos tipos de resultados, los primarios mediante la plataforma Ion Browser Server (Thermofisher Sci. Inc., USA) y los secundarios generados con la plataforma Ion Server, estos últimos corresponden a los análisis de diversidad.

#### **6.19. Análisis de resultados**

Los resultados primarios, generados mediante el servidor Ion Browser Server (Thermofisher Scientific Inc., USA), los cuales determinan la calidad y densidad del cargado del chip y muestra un resumen del número total de lecturas, lecturas con la calidad óptima ( $\geq$ Q20) para el análisis de datos, también resume la calidad del templado y enriquecido, con un porcentaje de esferas templadas, así como, clonales exitosas y policlonales eliminadas. A su vez se muestra un histograma que muestra la moda, media y

mediana de longitud de las lecturas obtenidas. También se obtiene un cuadro en el que se especifican las características por muestra con base en la cantidad de lecturas, las lecturas que alcanzan la calidad  $\geq Q20$ , el número de secuencias y la longitud media de las mismas.

## **6.20. Análisis de diversidad**

Los análisis secundarios generados por la plataforma Ion Reporter indican los parámetros utilizados para filtrar las lecturas útiles y realizar la identificación. Los parámetros fueron la longitud de lectura, porcentaje mínimo de cobertura de alineamiento, abundancia de lecturas, porcentaje de identidad para la asignación de un género, porcentaje de identidad para la asignación de una especie, lecturas mapeadas y no mapeadas en la muestra. Con base en estos resultados se obtuvieron los OTUs con los que se logró realizar la identificación hasta nivel de género y especie, para lo que se utilizaron las bases de datos MicroSEQ® 16S Referenced Library v2013.1 y Greengenes v13.5 (curada) conforme a estos parámetros se obtuvieron los análisis de diversidad alfa y beta.

Diversidad  $\alpha$ .

La diversidad alfa se refiere al estudio de la composición y estructura de una comunidad, es decir, a riqueza de especies y la homogeneidad en su distribución (Moreno, 2001).

Curvas de rarefacción:

La cual permite comparar las muestras sin importar si difieren en tamaño, este análisis está basado en el número de OTUs obtenidos por secuencia, de esta manera es posible determinar si las muestras son representativas del medio y permite saber si el esfuerzo de muestreo fue el adecuado.

Chao 1:

Es un modelo no paramétrico que estima la estructura de la comunidad, con base en el número de especies raras, es decir, aquellas representadas por sólo uno o dos individuos. Este es un estimador de abundancia.

Índice de Simpson:

Es uno de los índices de dominancia más utilizados, toma en cuenta a las especies con mayor importancia (dominancia) con base en su abundancia proporcional. La escala de este índice va de cero a uno, cuanto más se acerca a uno es más probable que la diversidad esté mayormente dominada por una especie.

Índice de Shannon:

Estima la diversidad específica. Está basado en el concepto de equidad o uniformidad de los valores de importancia de todas las especies. Indica 0 cuando sólo hay una especie, valores menores a 3 indican baja diversidad de especies en la muestra, cuando oscilan entre 3 y 5 son de alta diversidad, y valores superiores a 5 corresponden a muestras megadiversas. En microbiología es común encontrar valores superiores a 8 en suelos de bosques, donde las condiciones son óptimas para la actividad microbiana.

Abundancia proporcional:

Mediante el porcentaje se pueden observar aquellas especies bacterianas cuyo efecto es importante en el suelo, las especies con una abundancia proporcional mayor al 1.0 % son aquellas que generan el mayor impacto en la comunidad.

Diversidad  $\beta$ .

Es el grado de intercambio o remplazo de especies que existe entre dos o más comunidades divididas por algún gradiente como paisaje o en este caso ecosistema o vertedero/suelo.

Análisis de componentes principales (ACP):

Este es el método de ordenación más frecuente, permite agrupar las muestras en un biplano, con base en sus semejanzas, los grupos se encuentran más próximos cuando existe mayor similitud entre ellos. Se determinó mediante Ion Reporter™ y la plataforma Emperor (©The Emperor Development Team).

Diagramas de Venn:

Se usaron para esquematizar el intercambio de especies entre las muestras, y observar el efecto de los vertederos y ecosistema sobre la diversidad microbiana.

Con los datos de comparación en los diagramas se determinó el coeficiente de similitud de Ochiai-Barkman el cual indica que tan iguales o diferentes son las composiciones de las muestras comparadas en una escala de 0 a 1, donde 0 indica completa diferencia y 1 total similitud (Moreno, 2001). La fórmula fue la siguiente:

$$\text{Coeficiente de similitud (I}_{O-B}) = \frac{c}{\sqrt{(c+a)(c+b)}}$$

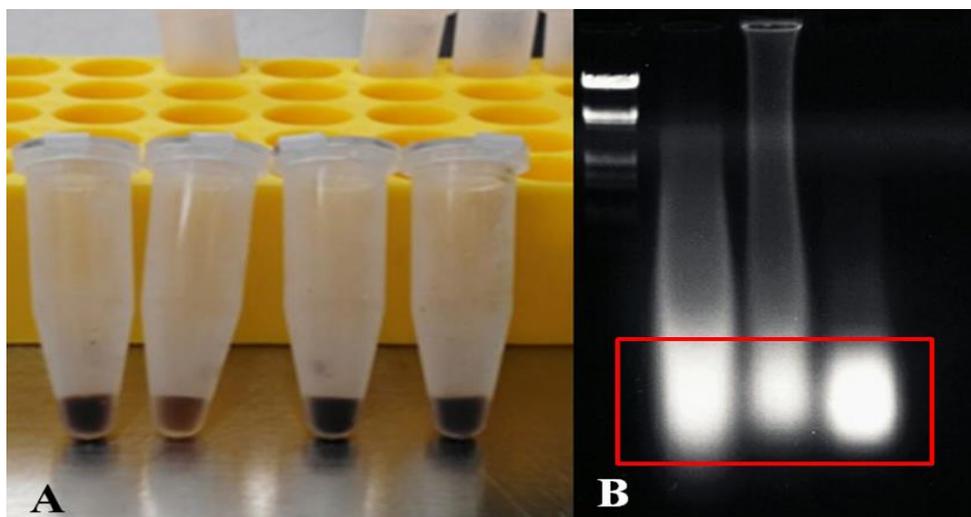
Donde a= Número de especies exclusivas del sitio A; b= Número de especies exclusivas del sitio B y c= Número de especies compartidas.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Extracción de DNA metagenómico y construcción de bibliotecas

#### Extracción de DNA.

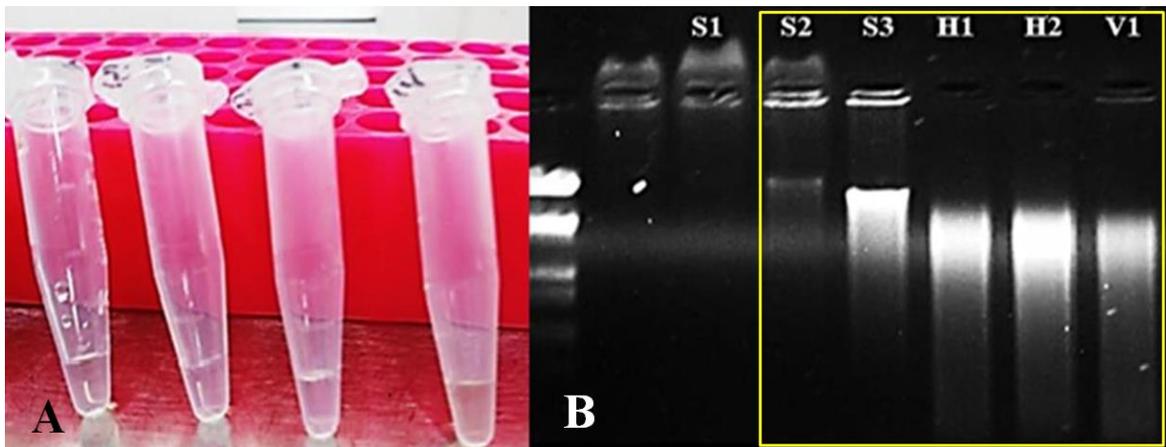
La extracción de DNA metagenómico realizada por el método Fenol-Cloroformo modificado mostró persistencia de pigmentos en el producto final (Figura 6A), estos pigmentos podrían indicar presencia de ácidos húmicos u otros compuestos que interfieran en la PCR (Mulero *et al.*, 2008), por lo que se comprobó la integridad del DNA extraído mediante electroforesis en gel agarosa 1.0 %. La electroforesis mostró poca integridad del DNA, así como la presencia de compuestos que interferían en la luminiscencia generada por los rayos UV (Figura 6B).



**Figura 6. DNA extraído por el método fenol cloroformo. A) persistencia de pigmentos en la extracción; B) la electroforesis indicó un DNA con poca integridad. El cuadro rojo señala los compuestos que hacen interferencia en la electroforesis.**

Se repitió la extracción por el método de manufactura del sistema comercial ZR Fecal DNA MiniPrep™ (Zymo Research®, CA, USA), con una ligera modificación, ya que las muestras se maceraron previamente con morteros estériles. Las muestras se observaron sin pigmentos (Figura 7A) y en la prueba de integridad se observó un DNA íntegro (Figura 7B), no obstante una muestra de suelo generó un patrón de bandas muy tenue. Para efectos de los análisis de secuenciación masiva del gene 16S rRNA no representa un inconveniente,

ya que se busca analizar fragmentos muy pequeños del genoma, por lo que no es necesario obtener bandas integras .

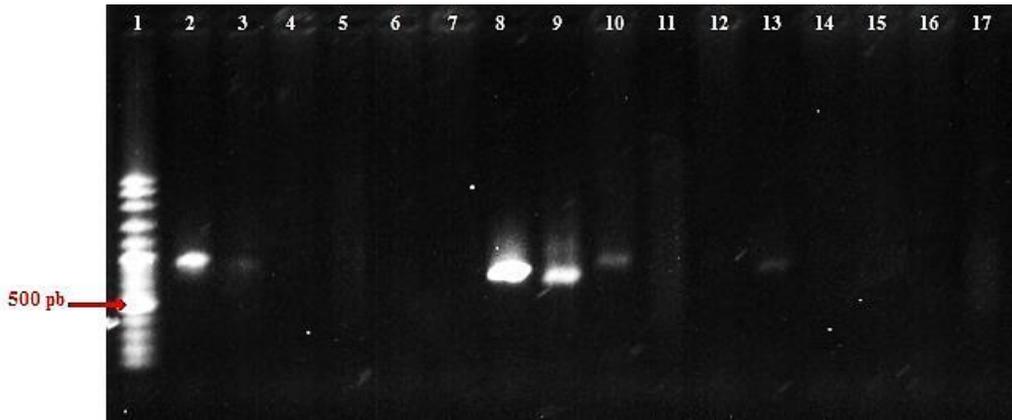


**Figura 7. DNA extraído por el sistema comercial. A) La extracción sin presencia de pigmentos; B) la electroforesis indicó un DNA íntegro. El cuadro amarillo indica las muestras de interés para el presente trabajo. El carril S3 corresponde a la SV.**

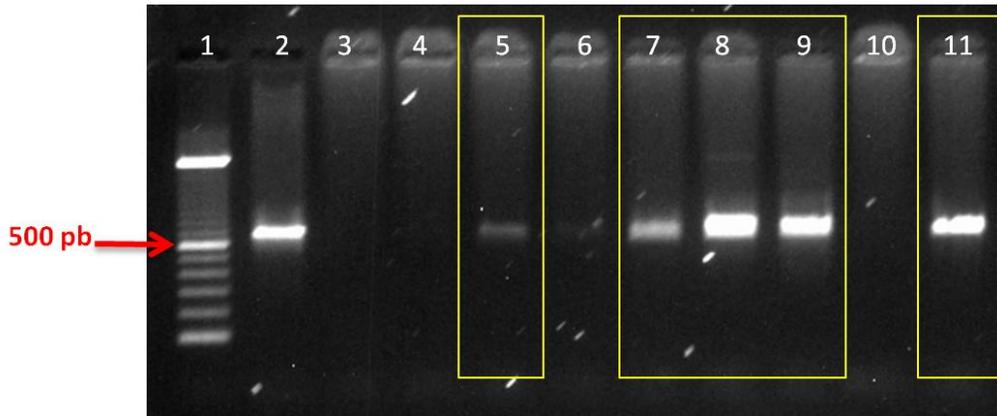
### **Pruebas de PCR.**

Se realizaron las pruebas con la finalidad de asegurar que las muestras eran funcionales para la construcción de las bibliotecas. Sin embargo, las muestras en stock no amplificaron, lo que indicó la presencia de inhibidores de PCR, por lo tanto se probaron diluciones 1:1000, 1:100 y 1:10 más 1  $\mu$ L de inhibidor de inhibidores (BSA o DMSO). Las diluciones 1:1000 no mostraron amplificación aún con la aplicación de los inhibidores de inhibidores, por lo tanto se redujo la dilución para aumentar la concentración de DNA, de este modo se observó un bandeo ligero en las muestras con inhibidores de inhibidores, pero las muestras con BSA mostraron mejor bandeo (Figura 8).

Se repitieron las PCR con aplicación de BSA, pero nuevamente se redujo la dilución, para aumentar más la concentración de DNA, esta vez se utilizó el DNA 1:10 más 1  $\mu$ L de BSA y se observó un buen bandeo (Figura 9), por lo que se continuó con la amplificación de las regiones hipervariables del gen 16S rRNA.



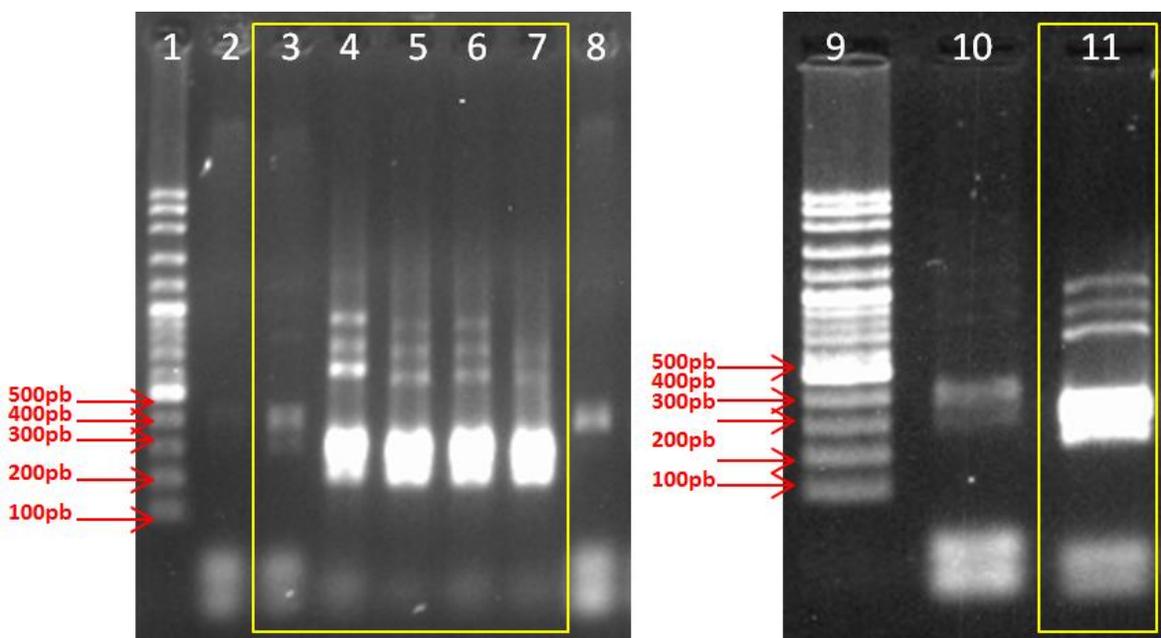
**Figura 8.** Electroforesis de productos amplificados en dilución 1:100. Sin inhibidor de inhibidores (pozo 3 al 6); con BSA (carril 7 al 10); con DMSO (carril 11 al 14); Marcador de 100pb; control positivo (carril 1); testigo negativo (carril 15); testigo negativo más BSA (pozo 16), testigo negativo más DMSO (carril 17).



**Figura 9.** Electroforesis de productos amplificados en dilución 1:10 más BSA. Carril 1: marcador 100pb; carril 2: control positivo *E. coli*; carril 3: testigo negativo; carril 4 testigo negativo más BSA; carril 5: SH; carril 7: SV; carril 8: H1; carril 9: H2; carril 11: V1. Los cuadros amarillos indican las muestras de interés para el presente trabajo.

### Amplificación de las regiones hipervariables.

El sistema 16S<sup>TM</sup> Metagenómics Kit (Thermofisher Sci. Inc., USA) utiliza dos sets de iniciadores, uno para las regiones V2-4-8 y otro para V3-6, 7-9, la electroforesis mostró una amplificación adecuada para cuatro de las cinco muestras, por lo que se repitió la amplificación para esa muestra, mediante una menor dilución, es decir, en lugar de ocupar la muestra SH 1:10, se utilizó la SH stock (Figura 10).



**Figura 10. Electroforesis de los productos amplificados de las regiones hipervariables del gen 16S rRNA. Carriles 1 y 9) marcador 100 pb; carril 3) SH; carril 4) SV; carril 5) H1; carril 6) H2; carril 7) V1; carril 11) repetición de SH. Los cuadros amarillos indican las muestras de interés para el presente trabajo.**

Se utilizó una calculadora diseñada en el programa Excel<sup>®</sup> Office<sup>™</sup> Microsoft<sup>®</sup> para estimar los requerimientos de productos amplificados leídos mediante un NanoDrop 2000<sup>®</sup> Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), con la finalidad de obtener una concentración final de 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  en 79  $\mu\text{L}$  de muestra, para lograr el volumen final se utilizó agua tipo 1 (cuadro 10).

**Cuadro 10. Calculo de diluciones para obtener una concentración óptima para la mezcla de amplicones.**

ID	Lectura (pg $\mu\text{L}^{-1}$ )	Conversión a (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	Vol. necesario para 50 ng ( $\mu\text{L}$ )	Vol. Agua para 70 $\mu\text{L}$ ( $\mu\text{L}$ )
SH	4640	4.64	10.8	68.2
SV	7500	7.5	6.7	72.3
H1	12210	12.21	4.1	74.9
H2	13230	13.23	3.8	75.2
V1	16210	16.21	3.1	75.9

A partir de las diluciones obtenidas, se generó y purificó los extremos romos (End-repair), se ligaron y purificaron los códigos de barras y adaptadores, posteriormente se amplificaron las bibliotecas y se procedió a calcular el factor de dilución (TDF) con base en las concentraciones leídas mediante un 2100 Bioanalyzer Instruments (Agilent® technologies, CA, USA) y el sistema High Sensitivity DNA Reagents (Agilent® technologies, CA, USA). El TDF obtenido fue de 27 (Cuadro 11), por lo tanto se mezcló 1  $\mu\text{L}$  de las bibliotecas mezcladas en 27  $\mu\text{L}$  de Low TE o  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas, para obtener una concentración de aproximadamente 26 pM.

Después de obtener el TDF se realizó el templado y enriquecido de las bibliotecas, posteriormente se cargó el chip y se realizó la corrida de secuenciación.

## 6.2 Análisis bioinformático

### Análisis primarios

Mediante la plataforma Ion Browser Server (Thermofisher Scientific Inc., USA) se generó un resumen donde se observa que el chip obtuvo un 65 % de cargado (Figura 11A), y un total de 4 101 114 secuencias leídas con un rango de 200 a 300 pb de longitud, sin embargo 2 410 962 lecturas contaron con la calidad necesaria para su análisis. El templado mostró 99 % de éxito y sólo el 1 % de las microesferas no fueron templadas y durante el enriquecimiento se depuraron las monoclonales de las microesferas, donde el 76 % de las esferas fueron clonales y el 24 % policlonales (Figura 11B). Se obtuvo una longitud media de 208 pb por lectura (Figura 11C)

**Cuadro 11. Calculadora de TDF en programa Excel® Office™ Microsoft®. Las muestras amarillas de la parte superior son las de interés para el presente trabajo.**

Muestra	Del BA longitud (pb)	Concentraciones máxicas				Molaridad menor 665.00	Mezclar		vol.total de mezcla a preparar (uL)	pg de DNA en la mezcla	Conc total de la mezcla equimol pg/uL	Conc total de la mezcla equimol pg/L	Concentración pM de mezcla equimolar	TDF
		Unidades BA (pg/uL)	Conversion conc (ng/uL)	Unidades Qubit (ng/mL)	Conversion conc (pg/L)	Unidades qPCR pmol/L	vol de muestra (uL)	vol agua (uL)						
SH	385	169.0	0.169	169	168970000	665.0	5.0	0.0	5	844.88				
SV	389	395.0	0.395	395	395030000	1538.6	2.2	2.8	5	853.66				
H1	391	1607.3	1.607	1607	1607340000	6228.6	0.5	4.5	5	858.05				
H2	391	1145.0	1.145	1145	1144990000	4436.9	0.7	4.3	5	858.05				
V1	393	2028.9	2.029	2029	2028870000	7822.0	0.4	4.6	5	862.44				
H1-1	390	1142.2	1.142	1142	1142170000	4437.3	0.7	4.3	5	855.86				
H1-3	388	1712.4	1.712	1712	1712350000	6686.8	0.5	4.5	5	851.47				
H1-5	383	976.0	0.976	976	975970000	3860.9	0.9	4.1	5	840.49				
H1-7	384	1655.2	1.655	1655	1655200000	6530.9	0.5	4.5	5	842.69				
H1-9	391	2136.5	2.137	2137	2136510000	8279.1	0.4	4.6	5	858.05				
H1-13	388	1872.6	1.873	1873	1872620000	7312.6	0.5	4.5	5	851.47				
H1-15	389	948.5	0.948	948	948460000	3694.2	0.9	4.1	5	853.66				
H1-17	382	694.4	0.694	694	694430000	2754.4	1.2	3.8	5	838.30				
H1-41	386	1214.2	1.214	1214	1214240000	4766.2	0.7	4.3	5	847.08				
H1-43	337	208.1	0.208	208	208110000	935.7	3.6	1.4	5	739.55				
H1-45	381	998.6	0.999	999	998570000	3971.1	0.8	4.2	5	836.10				
H1-47	384	1694.1	1.694	1694	1694080000	6684.3	0.5	4.5	5	842.69				
H1-49	346	473.9	0.474	474	473890000	2075.2	1.6	3.4	5	759.30				
H1-23	389	2323.6	2.324	2324	2323630000	9050.5	0.4	4.6	5	853.66				
H1-25	389	598.0	0.598	598	598030000	2329.3	1.4	3.6	5	853.66				
H1-27	389	845.3	0.845	845	845300000	3292.4	1.0	4.0	5	853.66				
H1-29	339	496.9	0.497	497	496910000	2220.9	1.5	3.5	5	743.94				
H1-33	391	617.0	0.617	617	617000000	2390.9	1.4	3.6	5	858.05				
H1-35	387	582.6	0.583	583	582590000	2280.9	1.5	3.5	5	849.27				
H1-39	396	1346.8	1.347	1347	1346840000	5153.2	0.6	4.4	5	869.02				
Average ->	382.3					Suma ->	29.4	95.6	125.0	20975.0	167.8	167800248.0	665.0	27

Molec Weight		
ssDNA (base)	330	pg/pmol ó g/mol ó ng/nmol
dsDNA (pb)	660	pg/pmol ó g/mol ó ng/nmol

1 ng =	1000	pg
1 mL =	1000	uL
1 L =	1000000	uL

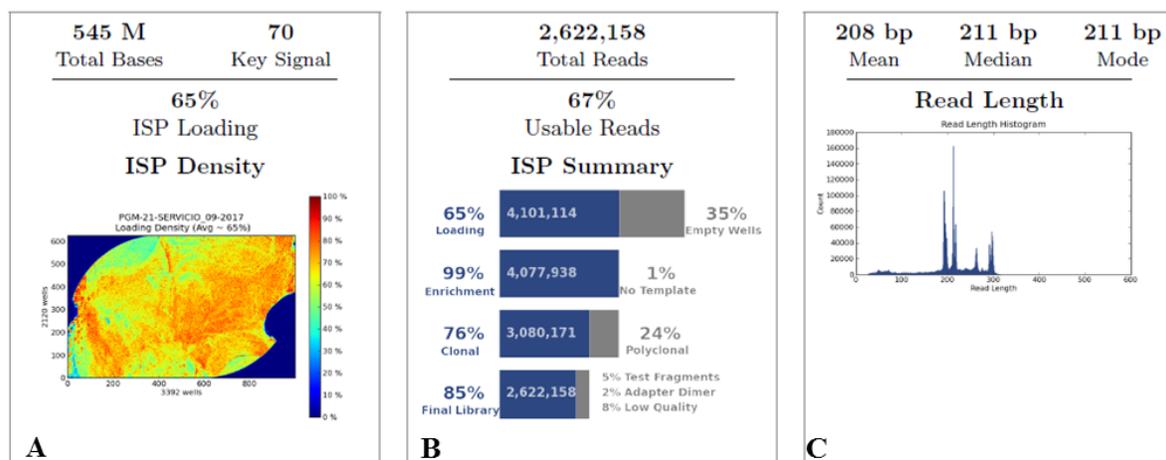
  

<b>pM Conc=(mass Conc/length)*(1/Molec Weight)</b>		
--	--	--

	pM	
Ampliseq	25	química OT2 - PGM utiliza 25 ul
RNASeq	32	

## Run Summary



**Figura 11. Análisis primario generado por la plataforma Ion Browser Server. A) Porcentaje del cargado del chip; B) Indica porcentaje y calidad de lecturas, porcentaje de templado y enriquecido óptimo; C) Histograma de longitudes media, moda y mediana de las lecturas.**

También se generaron los resultados de los análisis primarios por muestra (Cuadro 12), en el que se observa que las muestras H2 y V1 obtuvieron la mayor cantidad de bases leídas con 25,940,885 y 20,705,392 respectivamente, seguidos de H1, SV y SH con menos lecturas, también se muestra el número de lecturas que obtuvieron lograron el valor de calidad  $\geq Q20$  óptimo para continuar con los análisis secundarios, finalmente se observan las secuencias útiles, con un rango de 70,254 a 124,555, y la longitud va de 208 a 214 pb.

**Cuadro 12. Reporte por muestra generado mediante la plataforma Ion Browser Server (ThermoFisher Scientific Inc., USA).**

Muestra	Bases leídas	$\geq Q20$	Secuencias	Longitud promedio de secuencias
SH	14,727,477	13,244,050	70,254	210 pb
SV	18,172,648	16,224,543	86,995	209 pb
H1	19,919,006	17,911,721	93,074	214 pb
H2	25,940,885	23,094,246	124,555	208 pb
V1	20,705,392	18,595,611	96,037	216 pb

## Análisis secundarios

La plataforma Ion Reporter describió el número total de lecturas por muestra, así como las válidas según los parámetros establecidos. A partir de las lecturas válidas se obtuvieron las lecturas mapeadas con las que se realizaron los análisis de diversidad y la asignación de género y especie (Cuadro 13). Los parámetros que siguió el Ion Reporter para generar las asignaciones de géneros y especies se basó en un rango de alineamiento de 60 pb de las secuencias leídas por los primer (forward y reverse) y solamente se consideraron las lecturas con más de 50 pb. Se consideraron válidas todas aquellas lecturas que al menos fueron registradas una vez. El porcentaje de similitud mínimo requerido para validar la identificación de los géneros fue del 97.0 % y para asignar las especies se requirió por lo menos 99.0 % de similitud.

**Cuadro 13. Resultados del análisis secundario reportados con la plataforma Ion Reporter (Thermofisher Scientific Inc., USA).**

Parámetros	Muestras				
	SH	SV	H1	H2	V1
Lecturas totales.	70254	86995	93074	124555	96037
Lecturas válidas.	68863	85276	91209	121912	94183
Lecturas ignoradas.	0	0	0	0	0
Lecturas mapeadas en la muestra.	64167	84484	90771	121324	93993
Lecturas no mapeadas en la muestra.	4696	792	438	588	190

### 6.3 Análisis de diversidad

#### Diversidad $\alpha$ .

La riqueza de OTUs por secuencias obtenidas en cada muestra se determinó mediante las curvas de rarefacción muestra el número de OTUs (especies) observados por el número de lecturas obtenidas, este tipo de curvas permite determinar la posibilidad de encontrar nuevas especies con un mayor número de lecturas, sin embargo, conforme la curva de rarefacción se acerca a la asíntota, la probabilidad de encontrar nuevas especies disminuye.

Las muestras correspondientes a los vertederos (H2, H1 y V1) obtuvieron un mayor número de OTUs y la curva se muestra con tendencia a la asíntota, por lo que su proximidad a la

saturación indica baja la probabilidad de encontrar más OTUs si se aumenta el esfuerzo de muestreo. En el caso de las muestras SH y SV se obtuvieron menor número de OTUs, no obstante, muestran la misma tendencia que las otras curvas (Figura 12A).

El índice de Chao1 es un estimador no paramétrico que ajusta la curva de rarefacción para indicar el número de especies, con base en las representadas por un solo individuo (Figura 12B). Las curvas ajustadas muestran una tendencia a la asíntota similar a la Figura 12A, por lo tanto se aproximan a la saturación. Esto indica que el esfuerzo de muestreo fue adecuado para continuar con los análisis de diversidad.

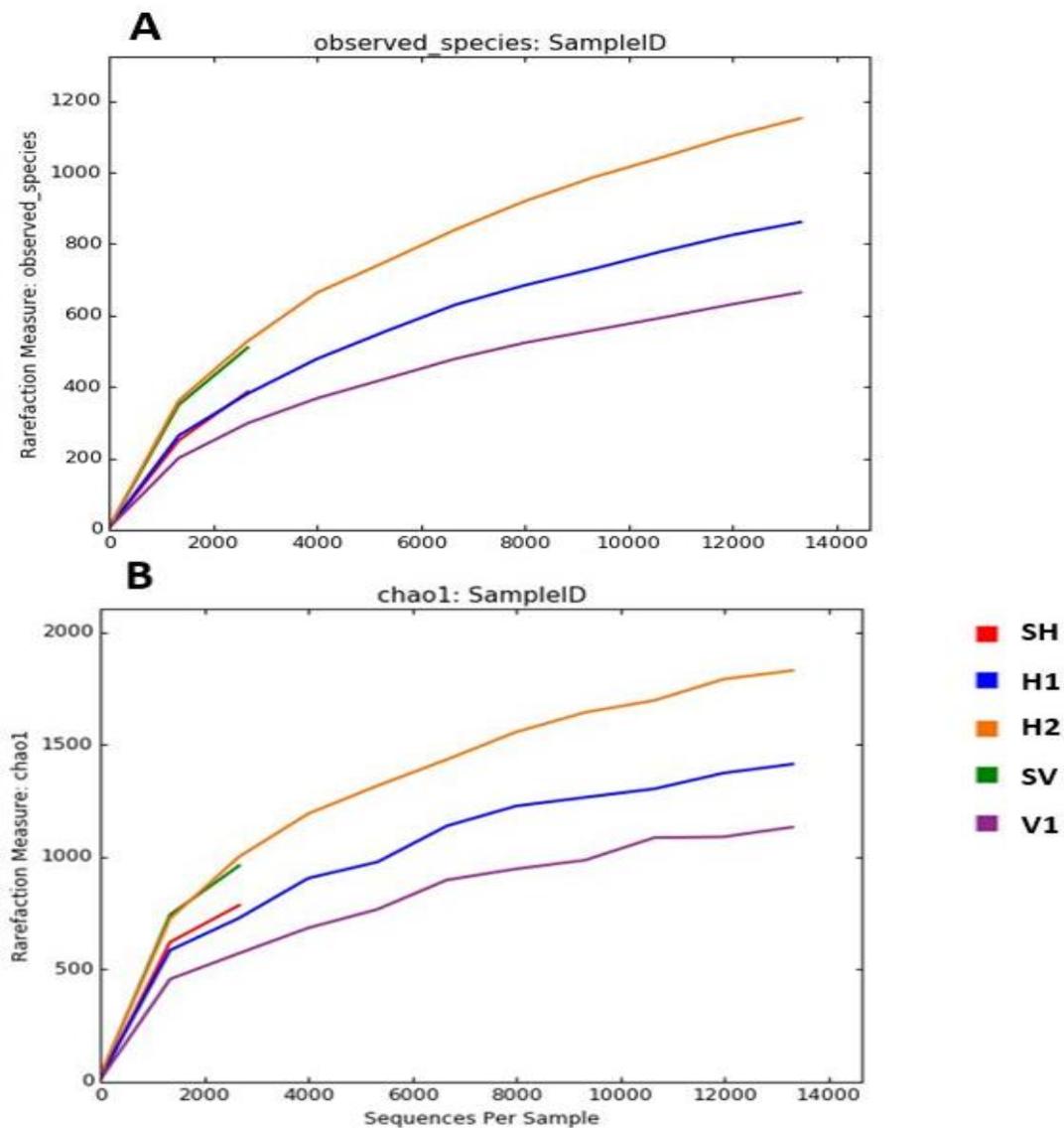


Figura 12. Curvas de rarefacción e Índice de Chao1 para especies raras.

La equidad en la estructura se analizó con el índice de Shannon, que estima la riqueza de especies con base en la uniformidad de las mismas. Las cinco muestras obtuvieron valores superiores a 5 por lo que cumplen con los parámetros que indican megadiversidad (Figura 13A), no obstante la menor diversidad se encontró en SH, que corresponde al suelo control de Tezontepec de Aldama, Hidalgo, cuyo ecosistema corresponde a una zona semiseca del valle del mezquital, mientras que la mayor diversidad se encontró en H2, que corresponde a un vertedero de detritus del mismo ecosistema, lo que podría ser un indicio del efecto de las condiciones ecosistémicas y la presencia de vertederos sobre la diversidad bacteriana.

Contrario al concepto de equidad, el índice de Simpson (Figura 13B) estima el grado de importancia de las especies con base en su abundancia proporcional, sin considerar el efecto de las demás especies de menor dominancia. Para efectos de este índice, cuanto más se acerca un valor a 1, la diversidad está más dominada por una sola especie. Las muestras H2, SV y V1 obtuvieron valores superiores a 0.9, mientras que H1 y SH obtuvieron valores superiores a 0.8, lo que indica que a las muestras son megadiversas, es decir que están compuestas por una gran cantidad de especies, sin embargo, su estructura está representada por un escaso número, consideradas como dominantes (Figura 13C).

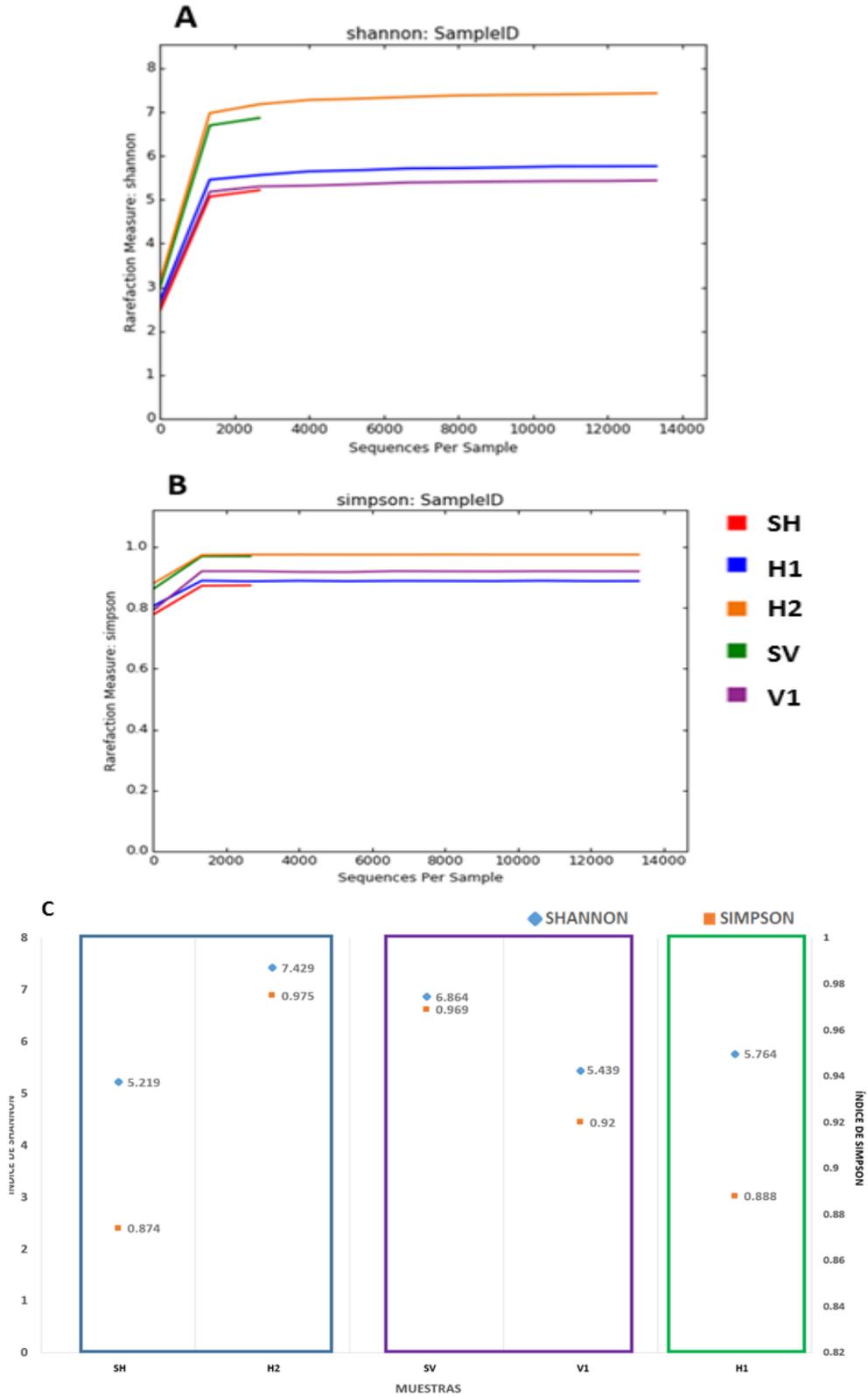
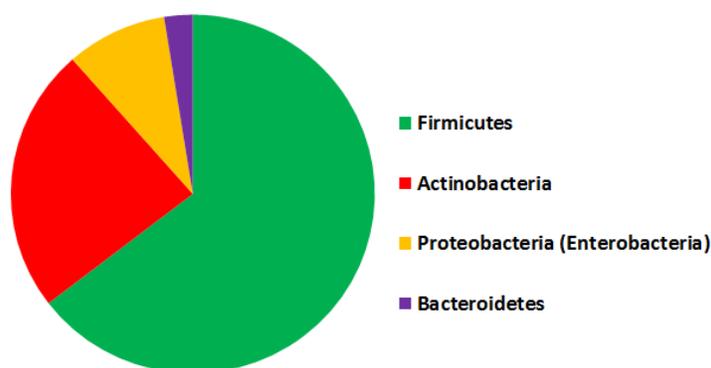


Figura 13. Diversidad alfa: Índice de Shannon e índice de Simpson.

Se obtuvieron 2,227 OTUs (especies) con un total de 53,350 lecturas obtenidas en la suma de todas las muestras, pero sólo se consideraron como dominantes a aquellos con más del 1.0 % de las lecturas totales (Cuadro 14), de este modo se obtuvieron 17 especies (OTUs) dominantes, pertenecientes a 4 *Phylum* (Figura 14) de los cuales, los firmicutes fueron más dominantes, seguidos por las actinobacterias.



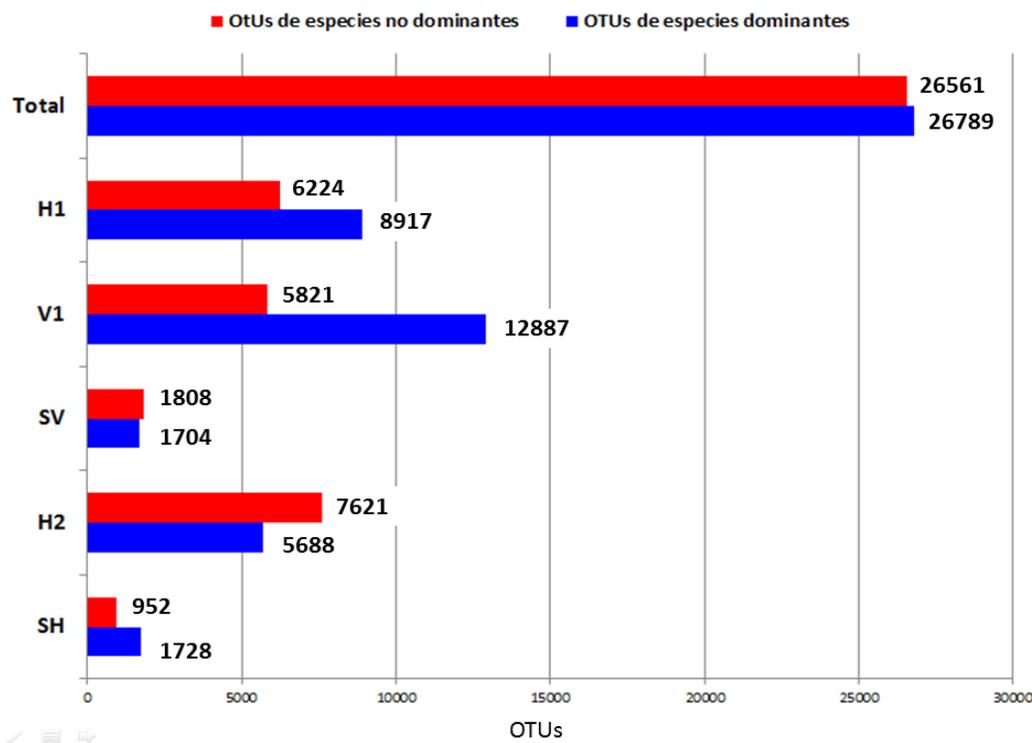
**Figura 14. *Phylum* a los que corresponde las 17 especies más representativas de la diversidad de 3 vertederos de detritus y 2 suelos control.**

**Cuadro 14. Especies dominantes en la distribución de abundancia proporcional general y sus proporciones por muestras. Los valores de color rojo representan las especies que son dominantes tanto de manera general como en la muestra individual.**

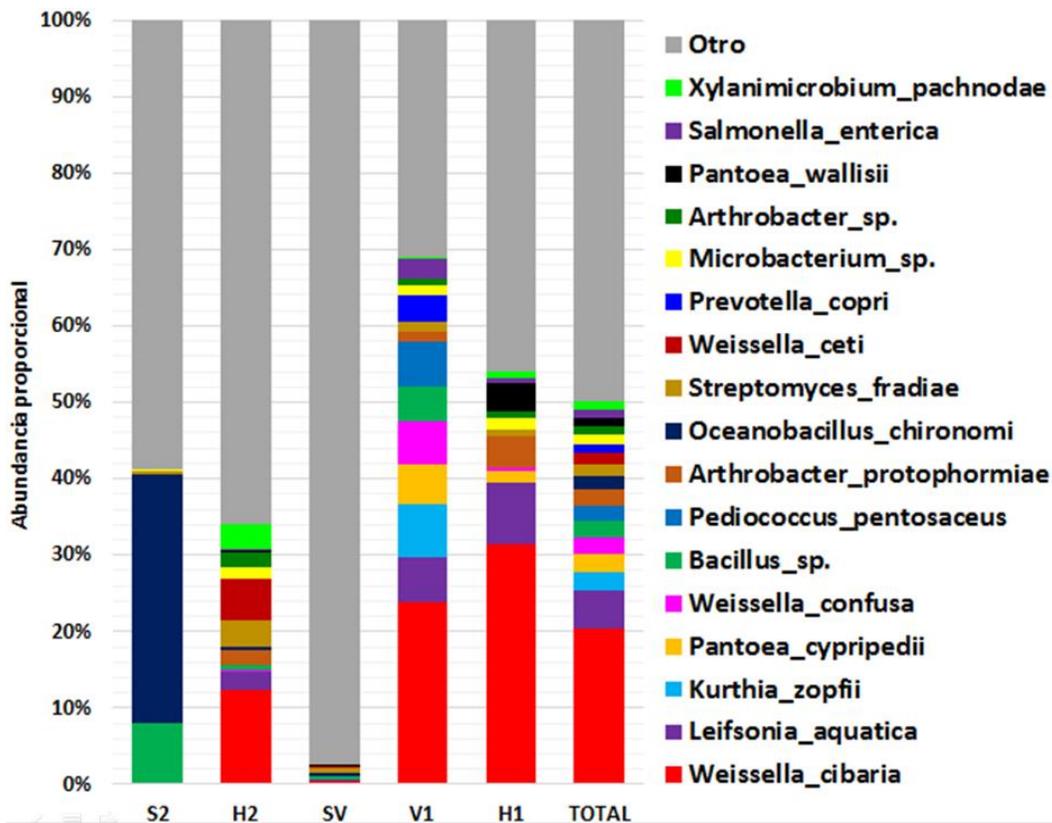
Especies (OTUs)	SH (%)	H2 (%)	SV (%)	V1 (%)	H1 (%)	Total (%)
<i>Weissella cibaria</i>	0.19	<b>12.28</b>	0.54	<b>23.88</b>	<b>31.46</b>	20.41
<i>Leifsonia aquatica</i>	0.07	<b>2.54</b>	0.14	<b>5.75</b>	<b>7.98</b>	4.93
<i>Kurthia zopfii</i>	-	-	-	<b>7.0</b>	-	2.46
<i>Pantoea cypripedii</i>	-	0.02	-	<b>5.24</b>	<b>1.49</b>	2.26
<i>Weissella confusa</i>	-	0.17	-	<b>5.68</b>	0.52	2.18
<i>Bacillus</i> sp.	<b>7.8</b>	0.57	0.34	<b>4.5</b>	0.05	2.15
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-	-	-	<b>5.9</b>	-	2.07
<i>Arthrobacter protophormiae</i>	0.04	<b>1.9</b>	-	<b>1.23</b>	<b>4.08</b>	2.06
<i>Oceanobacillus chironomi</i>	<b>32.39</b>	0.51	0.51	0.01	0.06	1.81
<i>Streptomyces fradiae</i>	0.6	<b>3.57</b>	0.71	<b>1.25</b>	0.77	1.63
<i>Weissella ceti</i>	-	<b>5.4</b>	0.03	-	0.01	1.35
<i>Prevotella copri</i>	-	-	-	<b>3.62</b>	0.01	1.27
<i>Microbacterium</i> sp.	-	<b>1.44</b>	0.06	<b>1.16</b>	<b>1.42</b>	1.17
<i>Arthrobacter</i> sp.	0.07	<b>2.07</b>	0.09	0.97	0.91	1.12
<i>Pantoea wallisii</i>	-	0.17	0.09	0.05	<b>3.7</b>	1.12
<i>Salmonella enterica</i>	-	0.06	-	<b>2.57</b>	0.72	1.12
<i>Xylanimicrobium pachnodae</i>	-	<b>3.39</b>	0.11	0.11	0.75	1.10
<b>Otros</b>	<b>58.84</b>	<b>65.92</b>	<b>97.38</b>	<b>31.09</b>	<b>46.07</b>	<b>49.79</b>

Las 17 especies (OTUs) dominantes sumaron un total de 26,789 lecturas (Figura 15), lo que corresponde al 50.21 % del total de lecturas obtenidos, sin embargo, estas 17 especies se encontraron de diferente forma en cada muestra (Figura 16), por ejemplo, la especie más representativa de manera general fue *Weissella cibaria* (20.41 %), pero de manera individual representó el 0.19 % en SH y 0.54 % en SV, por lo que no se consideraron dominantes para estas muestras, aunque fue la más dominante en H1 (31.46 %), V1 (23.88 %) y H2 (12.28 %).

Con base en estas observaciones se determinó la distribución proporcional por muestra, con el objetivo de identificar las especies más representativas de cada una.



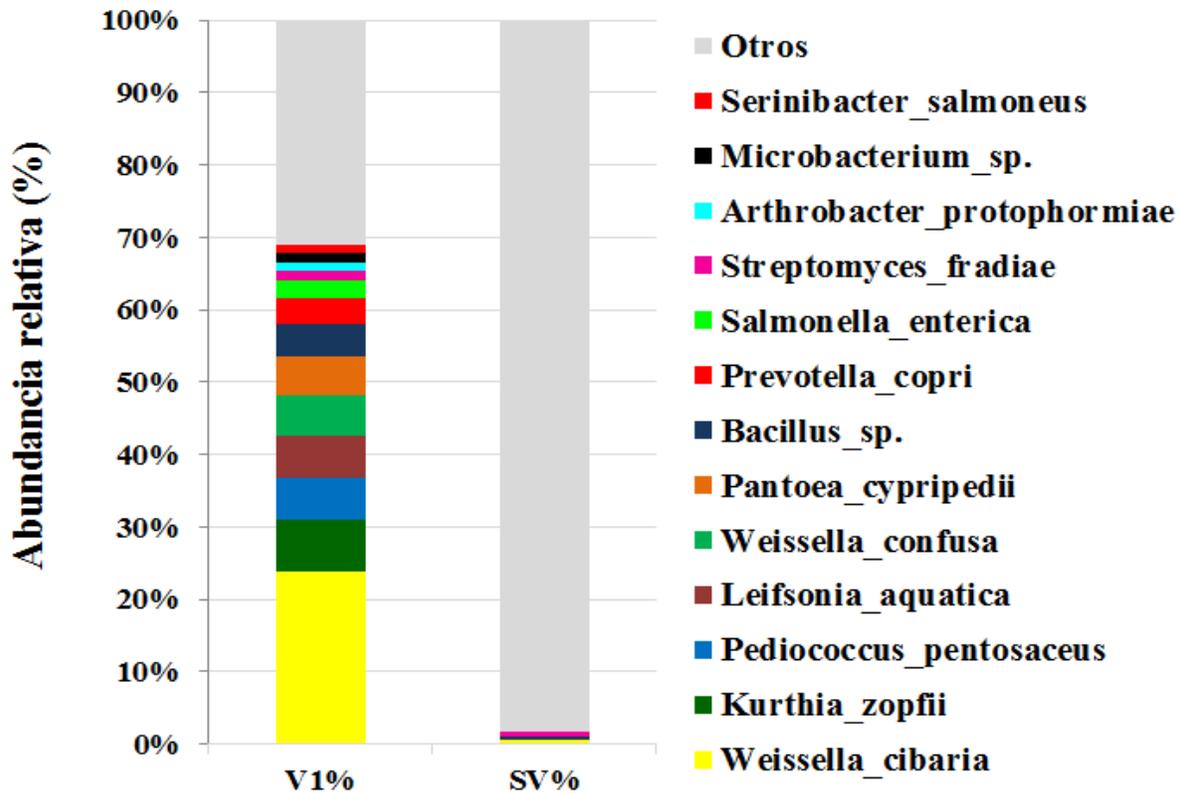
**Figura 15. Comparación del número de lecturas de las especies dominantes y no dominantes de manera general y en cada muestra.**



**Figura 16. Distribución de la abundancia relativa general. Se puede observar que las 17 especies más representativas de manera general representan distinta distribución en cada muestra. V1 es la mejor representada por estas especies, mientras que SV es la menos representada.**

Respecto a los vertederos de detritus estas fueron las especies y proporciones dominantes:

V1 obtuvo la mayor cantidad de lecturas, con un total de 18,708, de los cuales, el 68.88 % correspondieron a 13 especies dominantes (Figura 17), de las cuales 12 también dominaron en la distribución general. Sólo *Serinibacter salmoneus* representó el 1.11 % de manera individual y menos del 1.0 % general.



**Figura 17. Distribución proporcional de las especies dominantes en el vertedero V1.**

La segunda muestra mejor representada por la distribución proporcional general fue H1, la cual obtuvo 15,141 lecturas y 12 especies (OTUs) dominantes que representaron el 58.89 % (Figura 18), de las cuales seis pertenecen a las dominantes de manera general.

H2 obtuvo 13,309 lecturas de los cuales se obtuvieron 15 especies (OTUs) con dominancia que representaron el 41.9 % (Figura 19), pero sólo ocho se comparten con la proporción general.

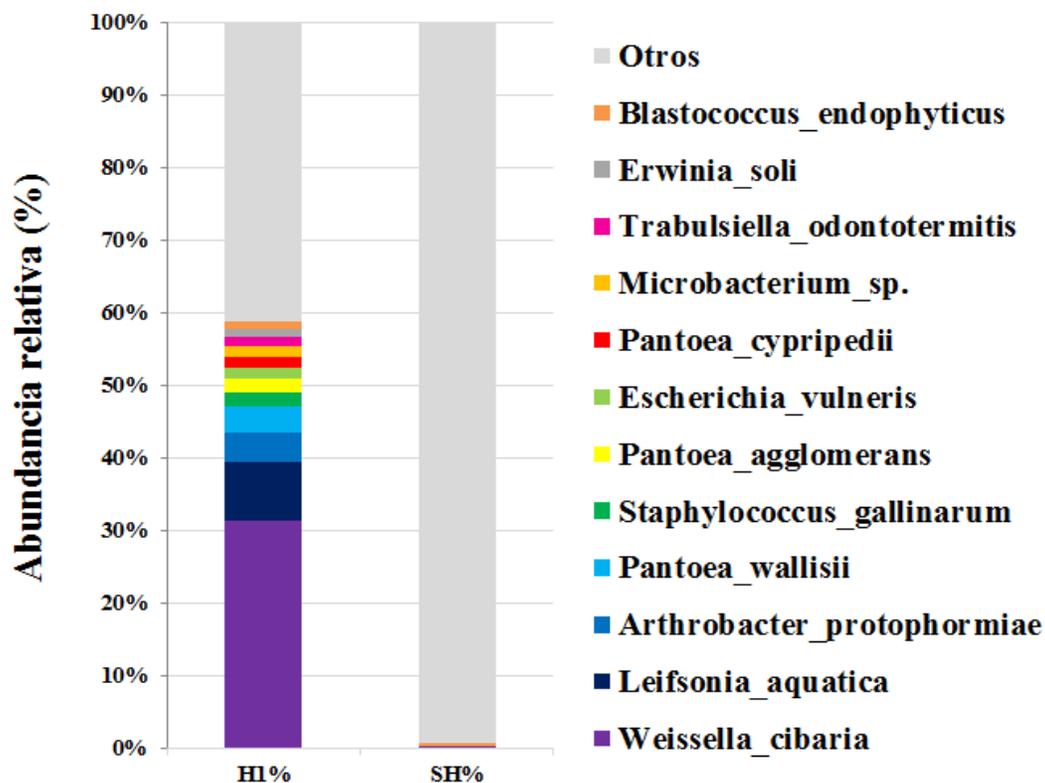


Figura 18. Distribución proporcional de las especies dominantes del vertedero H1.

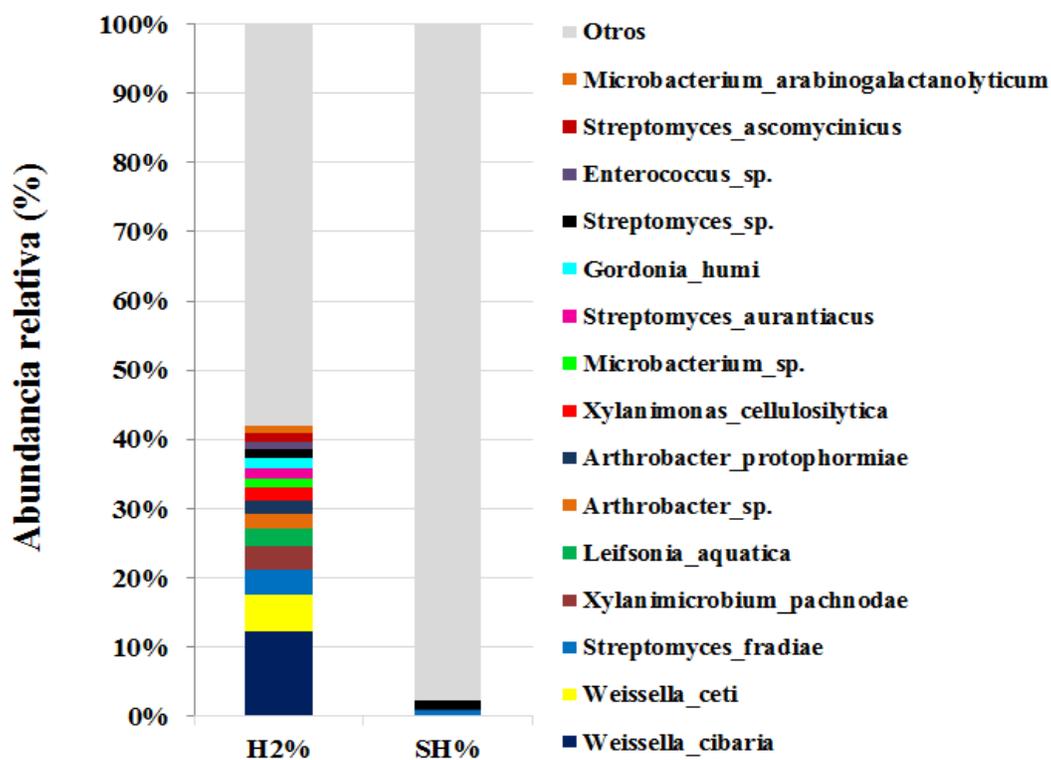


Figura 19. Distribución proporcional de las especies dominantes del vertedero H2.

Respecto a los suelos control, las especies y proporciones dominantes fueron las siguientes:

SH obtuvo 2,680 lecturas correspondientes al 64.47 % que fueron representados por 10 especies (OTUs) dominantes de manera individual (Figura 20), sin embargo, sólo dos se observaron en las dominantes generales. *Oceanobacillus chironomi* fue la más representativa de la muestra con un 32.39 %, y *Bacillus* sp. con el 7.8 %. Las ocho especies restantes, dominantes en SH no lo fueron de manera general.

SV fue la muestra menos representada por la distribución proporcional general. Obtuvo un total 3,512 lecturas y 14 especies (OTUS) dominantes (1704 lecturas) (Figura 21), de las cuales, ninguna representó dominancia en la distribución general.

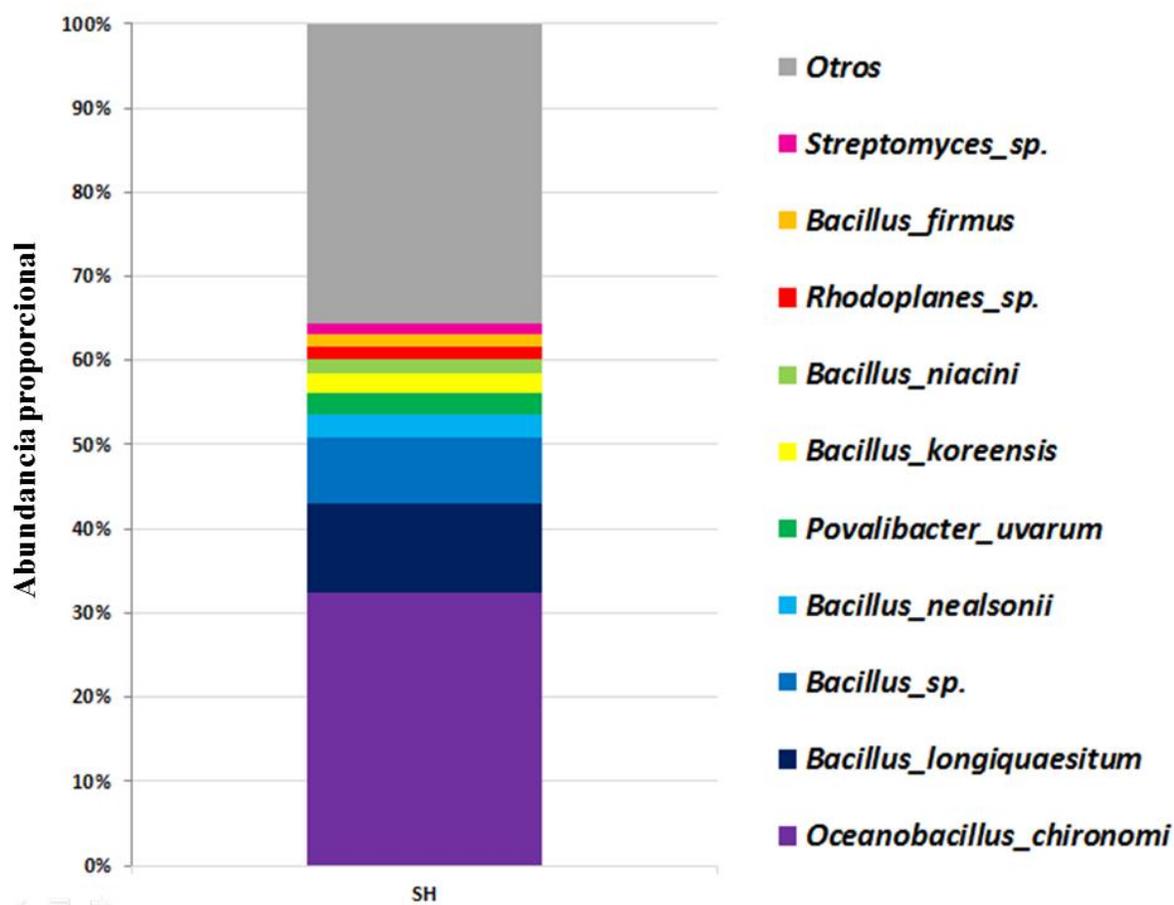
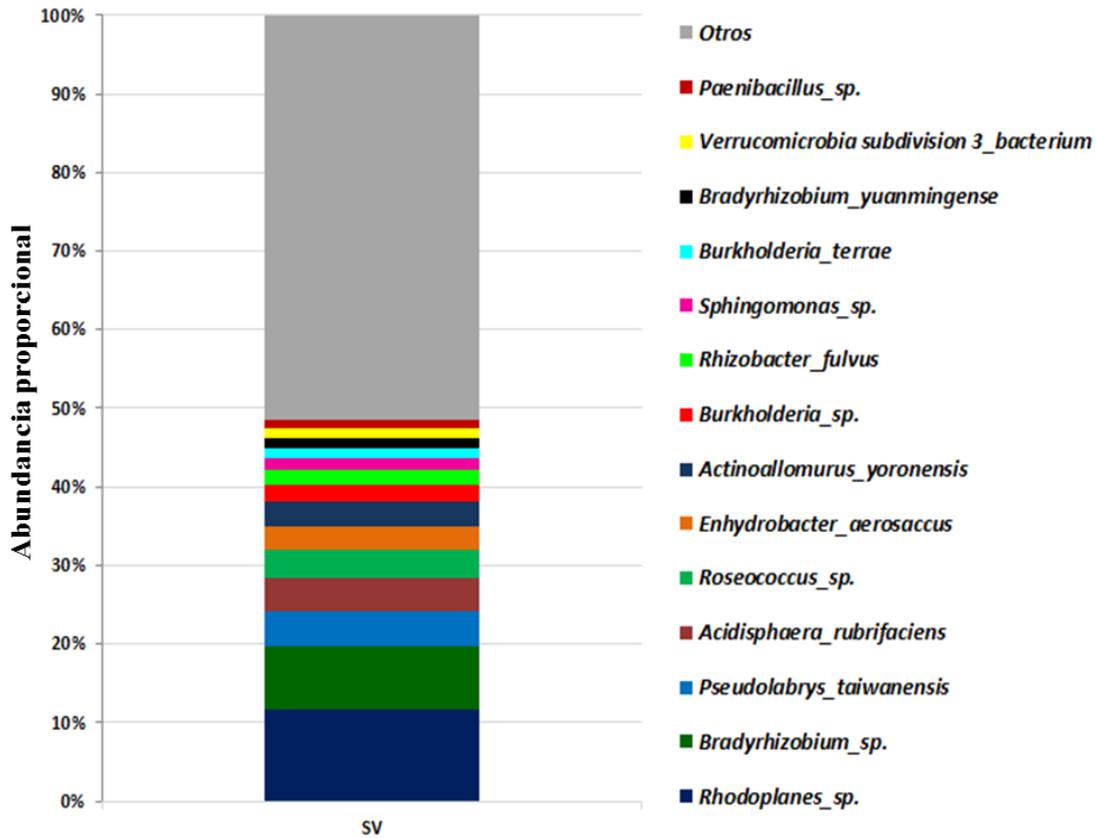


Figura 20. Distribución proporcional de las especies dominantes del suelo control SH.



**Figura 21. Distribución proporcional de las especies dominantes del suelo control SV.**

Se observaron diferencias en la abundancia proporcional de acuerdo a los sitios analizados. Esto indica un claro efecto de los ecosistemas sobre la diversidad bacteriana, aunado a esto, la presencia de los vertederos podrían ser un factor determinante sobre las especies bacterianas edáficas, ya que hubieron especies que se mantuvieron dominantes exclusivamente en los vertederos como *Weissella cibaria*, *Leifsonia aquatica*, *Microbacterium* sp., *Arthrobacter protophormiae*, *Streptomyces fradiae*, *Pantoea cypripedii*, *Arthrobacter* sp., *Pantoea wallisii*, *Xylanimicrobium pachnodae*, *Weissella ceti*, *Salmonella entérica*, *Prevotella copri*, *Kurthia zopfii*, *Weissella confusa*, *Pediococcus pentosaceus*.

Las muestras menos representadas por la distribución general fueron las de suelos control, esto indica que los vertederos de detritus sí ejercen un efecto sobre la diversidad microbiana, ya que algunas poblaciones microbianas se ven promovidas, sin embargo, SH

compartió dos especies con las dominantes generales, mientras que SV mostró una diversidad completamente diferente.

Se observó que existió diferencia entre la diversidad bacteriana de acuerdo al tipo de ecosistema, ya que algunas especies dominantes en los vertederos de Hidalgo no dominaron en el vertedero veracruzano.

### Diversidad $\beta$ .

Para comprender el efecto de los vertederos y ecosistemas sobre la abundancia relativa de las especies bacterianas, se ordenaron las 17 especies más representativas en la distribución general con base en tres niveles de dominancia: dominante (>1.0 %), no dominante (< 1.0 a > 0.0 %) y ausente (0 %) y se agruparon por número de muestras dominadas (Figura 22).

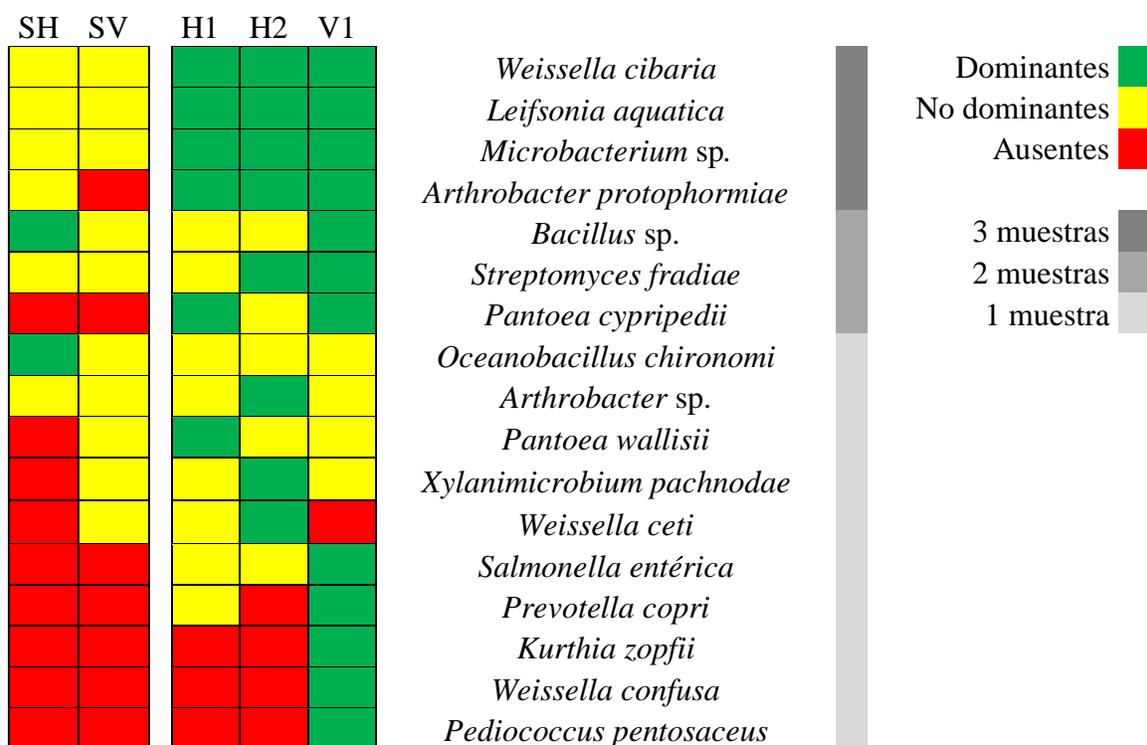


Figura 22. Especies de dominancia general ordenadas por dominancia individual en un mayor número de muestras.

Fue factible observar el efecto de los vertederos y las especies *Weissella cibaria*, *Leifsonia aquatica*, *Arthrobacter protophormiae* y *Microbacterium* sp, ya que mostraron el nivel de dominancia más elevado únicamente en los vertederos sin importar el ecosistema donde se obtuvieron, mientras que en los suelos también se encontraron pero con un porcentaje menor a 1.0 %. Con respecto a las especies *Streptomyces fradiae* y *Pantoea cypripedii* también se puede concluir que dependieron de los vertederos de detritus para obtener un mayor nivel de representatividad de los vertederos.

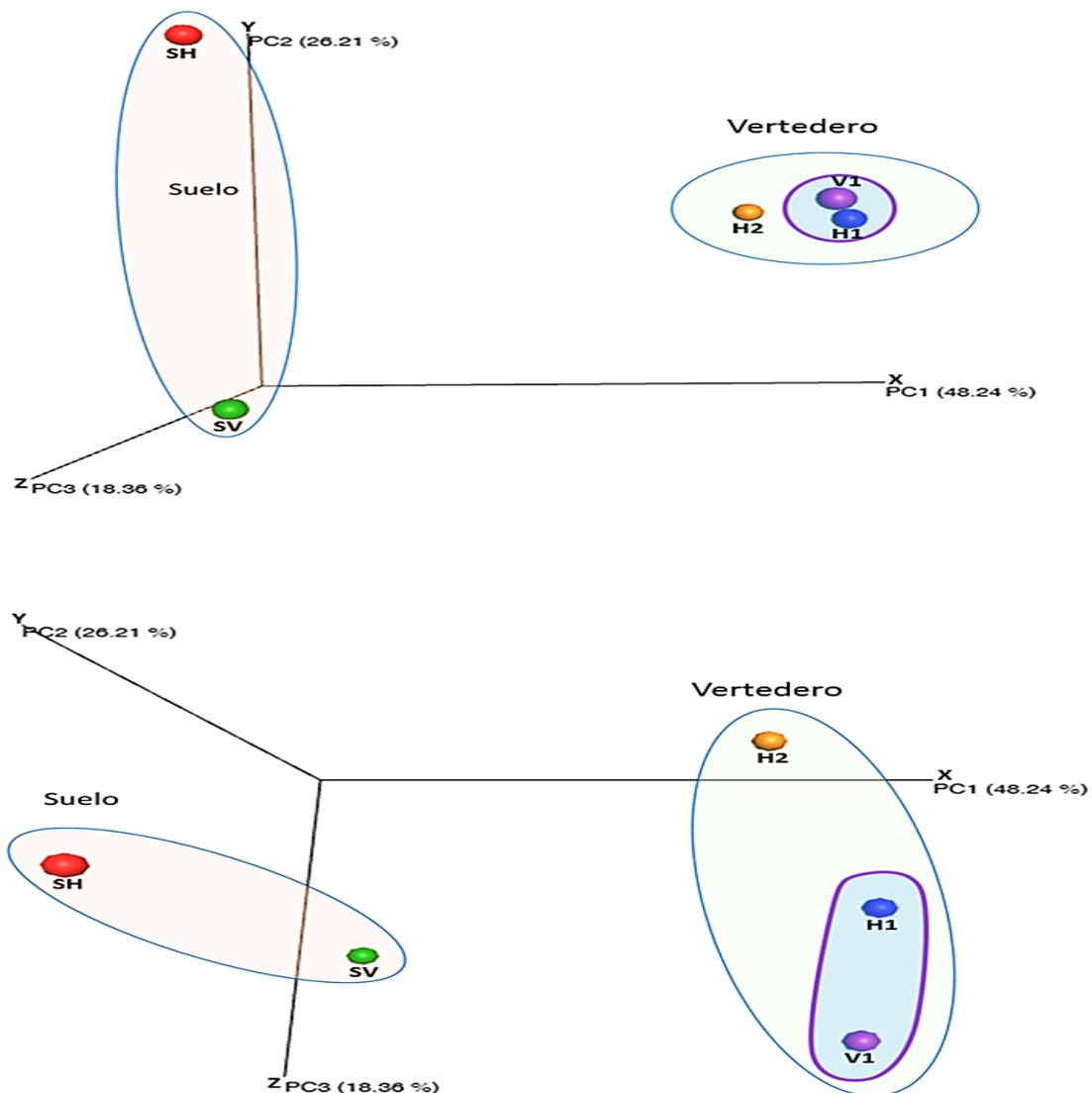
Las especies *Arthrobacter* sp., *Pantoea wallisii*, *Xylanimicrobium pachnoda* y *Weissella ceti* sólo fueron dominantes en los vertederos hidalgenses (H1 y H2), lo que podría indicar que los vertederos con condiciones ecosistémicas similares a las de H1 y H2 ejercen un efecto que promueve la actividad de estas especies, mientras que en el ecosistema de Veracruz se encontraron con porcentajes < 1.0 %.

Las especies *Salmonella entérica*, *Prevotella copri*, *Kurthia zopfii*, *Weissella confusa* y *Pediococcus pentosaceus* sólo estuvieron presentes y dominaron la distribución proporcional en V1, esto podría indicar que es una bacteria específica del detritus en un ecosistema como el veracruzano.

Para observar mejor el efecto de los vertederos sobre la diversidad bacteriana se utilizaron análisis de componentes principales (ACP) (Figura 23) en el que es posible percibir dos grupos, uno en el que se encuentran las dos muestras de suelos, y otro con las de los vertederos, estos grupos indican claramente que los vertederos ejercen un efecto sobre la diversidad bacteriana, lo que podría relacionarse con las características de los detritus, como la cantidad de MO, pH o nutrientes, etc. Aunado a esto, existe gran distancia entre las dos muestras de suelo, lo que indica diferencia en la diversidad de ambos suelos por efecto del ecosistema en que se encuentran.

Sin embargo, la diferencia de ecosistemas no es tan marcada entre los vertederos, ya que a pesar de que este grupo se divide en dos subgrupos se puede observar que H1 y V1 guardan mayor similitud que H1 con respecto a H2, sin embargo, este último está muy diferenciado de V1.

Estos subgrupos indican que el ecosistema sí genera diferencia entre la diversidad bacteriana de los detritus, sin embargo, aún es posible que cuenten con especies compartidas sin importar el ecosistema o suelo en el que se encuentran. Esto sugiere que existen especies propias de los vertederos independientes de la zona de colecta. Por otra parte, la distancia entre los suelos control (SH y SV) indican una clara diferencia entre su diversidad, lo que se relaciona directamente con las diferencias ecosistémicos de cada sitio de recolección. Lo cual indica que los ecosistemas sí influyen en la diversidad bacteriana.

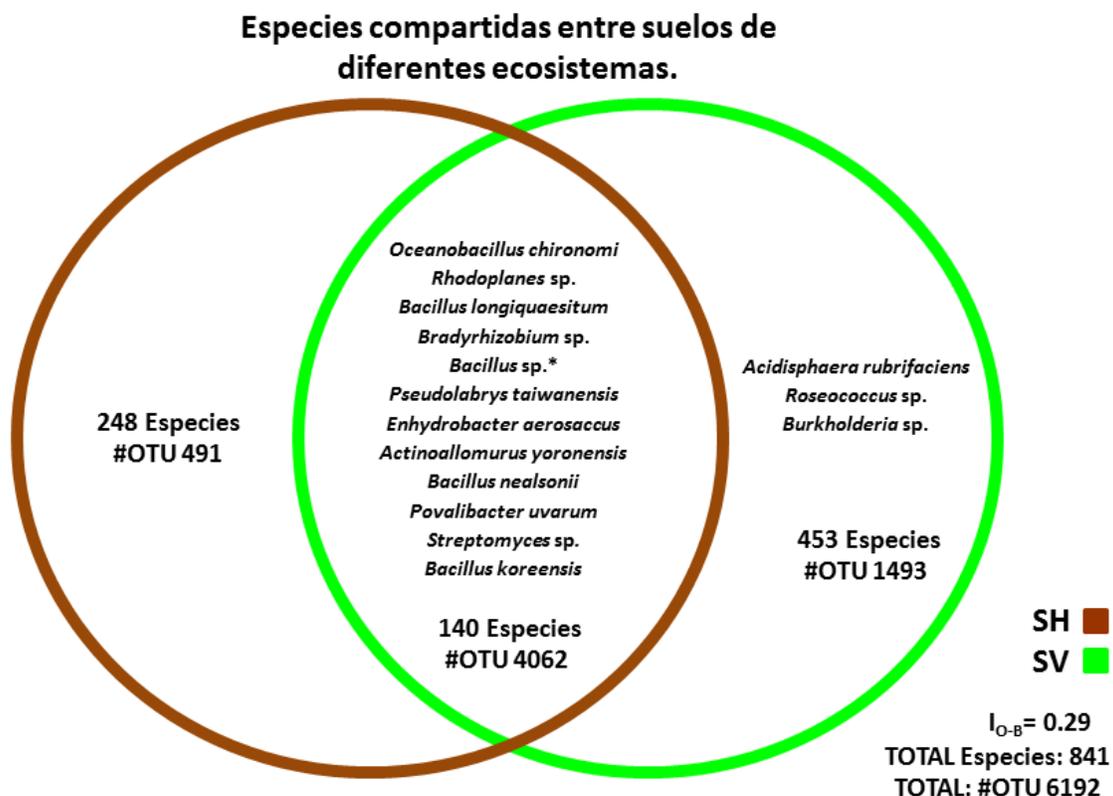


**Figura 23. Análisis de componentes principales. (A) diversidad de los suelos control respecto a la diversidad de los vertederos de detritus; (B) diferente ángulo de los componentes principales.**

Comparación de diversidad beta entre los suelos control SH vs SV.

Se realizaron cuatro diagramas de Venn para identificar las especies compartidas entre las muestras, para ello se tomaron todas las especies (con  $\geq 1$  lectura obtenida) de cada muestra a comparar. En cada diagrama se especifican las especies más dominantes ( $> 1.0\%$ ) conforme a las lecturas obtenidas únicamente en las muestras comparadas.

En el primer diagrama de Venn se compararon las muestras SH-SV (Figura 24), ambas muestras compartieron 140 especies de un total de 841. De acuerdo con el coeficiente de similitud las composiciones de la diversidad de ambas muestras son diferentes, sin embargo 12 de las 15 especies más representativas, se compartieron y las otras tres sólo se localizaron en SV.



**Figura 24.** Diagrama de Venn para identificar las especies que se comparten entre el suelo de Hidalgo (SH) y el de Veracruz (SV). Las especies que se encuentran en el centro corresponden a aquellas que se encuentran en ambos suelos sin importar el ecosistema de recolecta. \*Especies que mostraron dominancia en la abundancia relativa general.

Comparación de diversidad beta entre los vertederos de detritus de *A. mexicana*.

Se compararon las muestras de los vertederos con sus suelos control de cada ecosistema. El primero fue SV-V1 (Figura 25) el cual obtuvo 162 especies en común de un total de 1201 especies obtenidas, de acuerdo con el coeficiente de similitud existió mayor diferencia entre estas muestras, comparado con las de la Figura 24. Cuando se estimaron las especies con mayor dominancia en la distribución proporcional se obtuvieron 13 especies representativas, de las cuales cinco se compartieron entre las muestras, siete fueron exclusivas de V1 y una de SV. Lo que se relaciona con lo mencionado anteriormente en la Figura 22, el cual indica que los vertederos tienen mayor dominancia sobre la diversidad de los microbiomas.

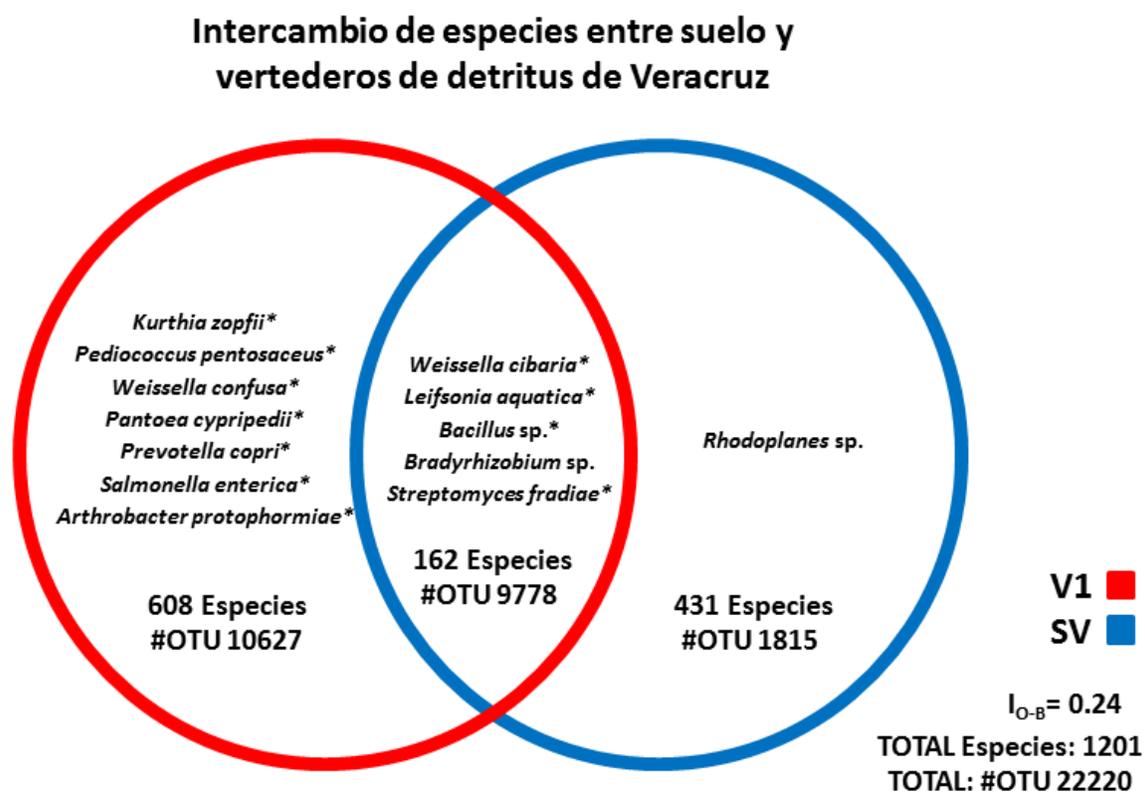
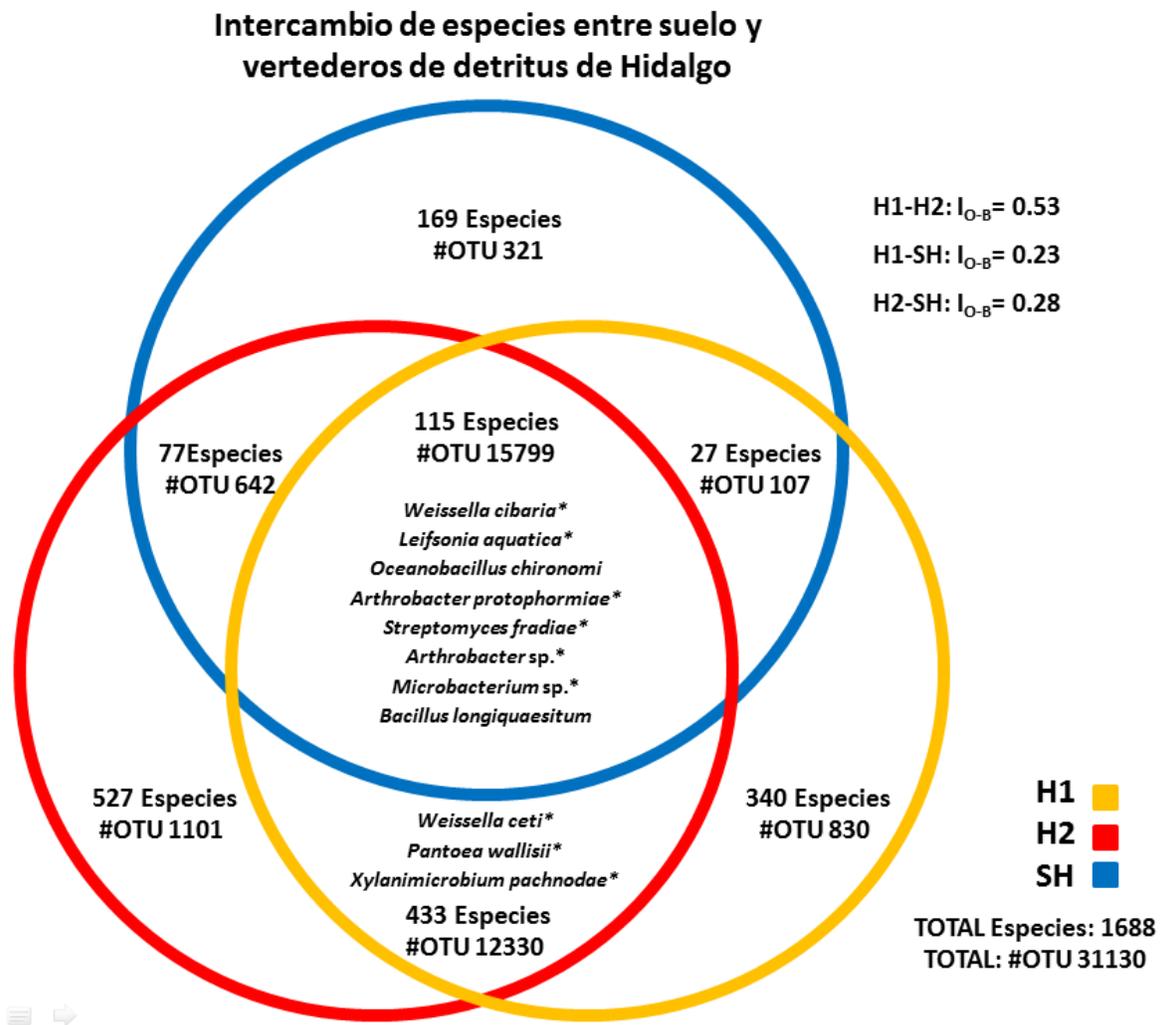


Figura 25. Diagrama de Venn para identificar la similitud de especies compartidas entre el suelo de Veracruz (SV) y el vertedero de Veracruz (V1). Las especies edáficas que encuentran un nicho ecológico en los vertederos de detritus son aquellas que se encuentran en el centro del diagrama. \*Especies que mostraron dominancia en la abundancia relativa general.

Conforme al diagrama que comparó las muestras SH-H1-H2 (Figura 26) se obtuvo un total de 1688 especies, de las cuales 27 se compartieron entre H1 y SH, 77 entre SH y H2, sin embargo entre H1 y H2 existieron 433 especies compartidas, lo que indica una mayor similitud entre estas dos últimas muestras, lo que se corroboró con el coeficiente de similitud. Esto indica un efecto positivo del detritus sobre las especies bacterianas edáficas.



**Figura 26. Diagrama de Venn para identificar la similitud de especies compartidas en Hidalgo entre el suelo (SH) y los vertederos (H1 y H2). \*Especies que mostraron dominancia en la abundancia relativa general.**

Conforme al coeficiente de similitud se observó que efectivamente H1 y H2 son más parecidos entre ellas que con respecto a SH. Esto se puede relacionar con el material que compone a los vertederos de detritus, ya que esta relación fue superior, incluso, que las

especies compartidas entre las tres muestras (115). No obstante las especies más representativas conforme a la abundancia relativa de las lecturas fueron ocho compartidos entre las tres muestras y tres compartidos únicamente entre H1 y H2.

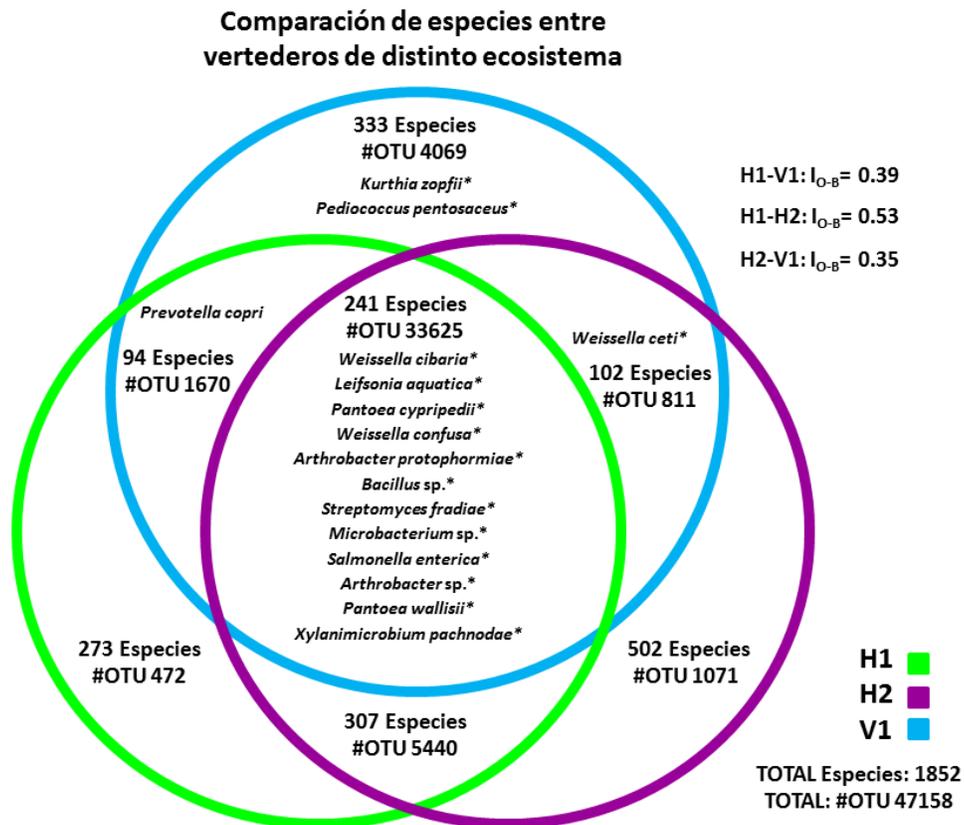
La finalidad de esquematizar el intercambio de especies entre los vertederos y los suelos control de cada ecosistema mediante las Figuras 24 y 25 fue conocer el efecto de los vertederos sobre la diversidad microbiana edáfica. Se observó el efecto que ejerce el detritus sobre la diversidad microbiana del suelo, ya que constituyen un nicho con una composición más diversa y una estructura menos equitativa, lo que sugiere que algunas especies son mayoritariamente promovidas (dominantes) por efecto del detritus.

En la Figura 27 se esquematizó el intercambio de especies entre los tres vertederos, así mismo, se observó la similitud de composición entre las tres muestras con la finalidad de comprender el efecto de los ecosistemas en la diversidad de la composición, ya que las especies que sean exclusivas de un solo vertedero serán aquellas que dependen del tipo de ecosistema, mientras que las especies en común, serán aquellas que no dependan de las condiciones climáticas, pero sí de las características de los detritus de *A. mexicana*, por lo que se esperaría encontrar dichas especies en cualquier vertedero de detritus sin importar el ecosistema donde sea recolectado.

En el diagrama H1-H2-V1 se obtuvieron 1,852 especies en total, y el mayor número de especies compartidas se encontró entre H1 y H2, lo que indica una mayor similitud entre ambas muestras ( $I_{O-B}=0.53$ ) lo que puede relacionarse con el efecto del ecosistema, ya que ambas muestras pertenecen a los sitios de recolección en Tezontepec de Aldama, Hidalgo. Aunado a esto, el coeficiente de semejanza entre H1-V1 fue muy parecido al coeficiente de semejanza H2-V1, ya que obtuvieron niveles de 0.39 y 0.35 respectivamente, lo que indica mayor diferencia entre los vertederos de Hidalgo y el de Veracruz, pero más marcado entre H2 y V1, lo que coincide con el ACP.

Finalmente, se obtuvieron 241 especies bacterianas que se encontraron en todos los vertederos, independientemente de los ecosistemas, lo que indica que son las especies propias del detritus y posiblemente de los jardines fúngicos en el interior del hormiguero.

Al estimarse las especies dominantes con base en la abundancia relativa de las lecturas obtenidos en estas tres muestras se observó que 12 Figuraron entre las compartidas por todos los vertederos y todas pertenecieron a las de dominancia general, lo que indica que la diversidad microbiana está fuertemente influenciada por los vertederos de detritus con respecto a los suelos control, dos especies dominantes se ubicaron exclusivamente en V1, una más se compartió entre V1 y H2, así mismo, otra especie dominante se compartió entre V1 y H1, lo que indica un total de 16 especies dominantes conforme a la abundancia relativa, todas se relacionaron con V1, lo que indica que esta muestra fue la que ejerció mayor efecto en la diversidad general. Las 12 especies en el centro del diagrama son aquellas que se esperarían encontrar en todos los vertederos de detritus sin importar el ecosistema.



**Figura 27.** Diagrama de Venn para identificar las especies que no dependen del ecosistema sino de las características del detritus de *A. mexicana* (localizadas en el centro del diagrama). \*Especies que mostraron dominancia en la abundancia relativa general.

## 7. DISCUSIÓN

### Extracción de DNA

Es imprescindible la obtención de un DNA íntegro y amplificable para los estudios de diversidad mediante técnicas de metagenómica. El método de extracción con Fenol-Cloroformo es uno de los más utilizados, sin embargo, su dificultad y duración aumenta el riesgo de contaminación de las muestras, mientras que múltiples sistemas comerciales ofrecen métodos sencillos con resultados de buena calidad, no obstante, su costo suele ser elevado (Fraga *et al.*, 2004; Farrugia *et al.*, 2010; Baena *et al.*, 2013).

Por otra parte, es común la presencia de inhibidores de PCR en las extracciones de DNA a partir de muestras de materia orgánica parcialmente biodegradada (Nechifor-Boilă *et al.*, 2015), por lo que el éxito de la PCR depende de metodologías para contrarrestar estos inhibidores (Del Valle *et al.*, 2004), una estrategia eficiente es la dilución de la muestra para reducir la concentración de inhibidores, así como el uso de albúmina sérica de bovino (BSA), la cual secuestra compuestos fenólicos que inhiben la actividad polimerasa (Ludes y Keyser, 2011; Alaeddini, 2012), otros métodos para contrarrestar los inhibidores de PCR pueden ser el uso de EDTA, aumentar la polimerasa o adicionar dimetil-sulfoxido (DMSO) al DNA extraído (Kovatsi *et al.*, 2009; Alaeddini, 2012) como en el trabajo de Lewin *et al.*, (2016), quienes agregaron 0.5  $\mu$ L a la muestra durante la amplificación del gen 16S rRNA en muestras de vertederos de detritus de *Atta colombica* de Costa Rica.

### Análisis Bioinformático.

La plataforma Ion Browser Server (ThermoFisher Scientific Inc., USA) estimó el rendimiento del cargado del chip en 65 % y el número de secuencias útiles fue de 2,410,962, con una longitud promedio de 208 pb y con base en los resultados secundarios estimados mediante Ion Reporter (ThermoFisher Scientific Inc., USA), las lecturas válidas por muestra fueron las siguientes: SH (68,863), SV (85,276), H1 (91,209), H2 (121,912) y V1 (94183), esto se puede relacionar al tipo de Chip utilizado, el cual fue Ion 316v2 para lecturas promedio de 200 pb, el cual puede obtener de 300 a 500 Mb.

El número de secuencias fue suficiente y de calidad ya que en el trabajo de Zhang *et al.* (2015) se utilizó un Chip Ion 314™ el cual es más pequeño y alcanza menos cantidad de

lecturas (30-50 Mb), ya que obtuvieron 327,994 secuencias útiles. En este estudio se comparó el uso del chip Ion 314™ y uno más grande, Ion 318™, lo que demostró que sus capacidades y resultados son aceptables comparados con otras plataformas de secuenciación.

Por lo tanto el uso del chip Ion 316™ para el presente trabajo cuenta con las características deseables para realizar los análisis de diversidad. Aunado a esto, Bell *et al.* (2013) utilizaron un chip Ion 314™ y obtuvieron un total de 138,968 secuencias útiles con un rango de 5,147 lecturas por muestra. Finalmente, Torres *et al.* (2014) utilizaron un chip Ion 316™ para realizar un análisis de transcriptómica en la glándula de veneno de la hormiga *Dinoponera quadriceps* y obtuvo 2,514, 767 lecturas útiles, con un promedio de 230 pb. Por lo tanto el número de lecturas por muestra generadas en el presente estudio fueron ideales para la realización de los estudios de diversidad.

#### Análisis de diversidad.

Múltiples estudios han reportado las asociaciones microbianas con especies de hormigas cultivadoras de hongos, sin embargo muy pocos se han enfocado al estudio de la diversidad microbiana de los vertederos de detritus mediante el uso de NGS (Aylward *et al.*, 2012b). Lewin *et al.* (2016) utilizaron la plataforma 454-Titanium (Roche 454 Sequencing, Madison, WI), la cual utiliza tecnología de pirosecuenciación. Esta plataforma ha sido una de las más utilizadas para estudiar la diversidad en el jardín fúngico (dentro del hormiguero) sin embargo, suele ser defectuosa durante la secuenciación de sitios homopoliméricos (Rizzi, 2015).

Aylward *et al.* (2012a) realizaron un análisis metagenómico y metaproteómico para estudiar la diversidad y fisiología del hongo simbionte de dos especies de hormigas del género *Atta*, en este estudio se ocupó la plataforma 454 FLX GS Titanium (Roche 454 Sequencing, Madison, WI) y los resultados indicaron que la diversidad bacteriana estaba dominada por la familia Enterobacteraceae, cuyos principales géneros encontrados fueron *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Escherichia*. Estos resultados son similares a los obtenidos, ya que las Enterobacteraceas fueron el tercer grupo más dominante encontrado en el presente estudio (Figura 14)

Suen *et al.* (2010) también utilizaron la plataforma 454 FLX GS Titanium (Roche 454 Sequencing, Madison, WI) para analizar el microbioma encargado de degradar la biomasa en el jardín fúngico de *Atta colombica*, sin embargo su estudio sólo llegó a nivel de clase, en el cual se concluyó que los jardines fúngicos están dominados por  $\alpha$ -proteobacterias,  $\beta$ -proteobacterias,  $\gamma$ -proteobacterias, actinobacterias y bacteroides.

Schiøtt *et al.* (2010) también utilizó pirosecuenciación con la misma plataforma para identificar las enzimas pectinasas de origen fúngico, presente en el excremento de las hormigas.

Torres *et al.* (2014) utilizaron la plataforma Ion Torrent para el análisis transcriptómico en la glándula de veneno de la hormiga *Dinoponera quadriceps*, sin embargo, no se ha utilizado esta plataforma para el análisis de diversidad microbiana dentro de los jardines fúngicos ni fuera del hormiguero en los vertederos de detritus de hormigas defoliadoras. Por lo tanto, el presente trabajo es el primero en analizar la diversidad microbiana de los detritus de hormiga *Atta mexicana* en México, mediante la plataforma Ion PGM™ de Ion Torrent (ThermoFisher Scientific Inc., USA).

Por otra parte, se observó una clara diferenciación entre los microbiomas de los tres vertederos respecto a los suelos control, lo que indica que las características de los detritus sí ejercen un efecto positivo en la diversidad microbiana. Aunado a esto, la diferencia de diversidad entre los tres vertederos demuestra que el ecosistema sí guarda efecto sobre su microbioma. Esto se relaciona con lo descrito por Reis *et al.* (2015) quienes describen más de 400 especies de hongos aislados de jardines fúngicos muestreados de dos agroecosistemas diferentes, donde las condiciones ambientales y de vegetación durante el muestreo son diferentes, por lo que concluyen que la materia prima del jardín fúngico y las condiciones ambientales pueden afectar en la diversidad microbiana. No obstante, en el presente trabajo se demostró que existe gran cantidad de bacterias que permanecen en los vertederos de detritus sin importar las condiciones del ecosistema.

Por otra parte, entre las bacterias dominantes de los vertederos de detritus se encontraron algunas con potencial biotecnológico por sus características como bacterias acidolácticas, tal es el caso de *Pediococcus pentosaceus* (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2011), una de las bacterias más utilizadas, mientras que las del género *Weissella* han sido descritas como

bacterias fermentadoras de gran potencial que aún no ha sido explotado (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2011; Lynch *et al.*, 2015; Fessard y Remize, 2017).

*Leifsonia aquatica* es una bacteria aerobia obligada, descrita como agente etiológico de enfermedades relacionadas a infecciones sanguíneas. Esta bacteria puede producir sulfuro de hidrógeno a partir de glucosa, sucrosa, fructosa, arabinosa, galactosa y manosa (Mühlhauser, 2016).

*Microbacterium* sp. sobresale por su capacidad como lumichromo, que es la capacidad de photodegradar productos de riboflavina en condiciones neutras y ácidas (Yamamoto y Asano, 2015).

Otras especies dominantes importantes en los ciclos biogeoquímicos fueron: *Oceanobacillus chironomi*, una bacteria aerobia facultativa gram-positiva halotolerante con capacidad desnitrificante al transformar  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$  a  $\text{N}_2$  (Raats y Halpern, 2007), no obstante *Pantoea* es un género descrito anteriormente en el interior del jardín fúngico, descrita como fijadora de  $\text{N}_2$  (Pinto-Tomás *et al.*, 2009), por otro lado, algunas especies de *Pantoea* han sido descritas como solubilizadores de fósforo (Kaur y Reddy, 2013a, b).

Por otra parte, se describió una gran cantidad de actinobacterias, las cuales podrían corresponder a las simbiotes del interior del jardín fúngico ya que cumplen la función de producir antibióticos que regulan la actividad microbiana dentro del hormiguero. En el jardín fúngico pueden haber múltiples especies de actinobacterias, sin embargo son pocas las dominantes en el interior del hormiguero (Poulsen *et al.*, 2005). *Streptomyces fradie* ha sido reportada como productora de neomicina, un antibiótico con aplicaciones médicas y agronómicas (Meng *et al.*, 2017) *Arthrobacter* sp., destacó por su capacidad de biodegradar compuestos aromáticos como propenilbencenos (Shimoni *et al.*, 2003).

Lo anterior sugiere que las bacterias dominantes tienen alguna función con relación a los diferentes ciclos biogeoquímicos que continúan la biodegradación los compuestos orgánicos del vertedero, y posiblemente algunas comunidades bacterianas persistan desde el interior del jardín fúngico, como las actinobacterias, las cuales podrían continuar la estabilización de la actividad microbiana mediante la producción de antibióticos. No

obstante la estructura de la diversidad se vea modificada por las condiciones ambientales del ecosistema.

Las especies más representativas de la estructura general cuentan con alguna característica que les permite continuar con algún ciclo biogeoquímico a partir de los compuestos orgánicos de los vertederos de detritus y la mayoría de las especies dominantes continúan con la biodegradación de los materiales orgánicos (Maurice-Lira y Quintero-Lizaola, 2015), por lo que podrían utilizarse como abono orgánico o bien como un enriquecedor de microorganismos biodegradadores para compostas u otros métodos biotecnológicos que permitan su uso como biofertilizante (Fortanelli y Servín, 2002)

## **8. CONCLUSIONES**

Con base en los resultados se comprobó que el ecosistema sí influye en la estructura de la diversidad microbiana de los vertederos de detritus, de igual manera, se comprobó que múltiples microorganismos representativos de los vertederos de detritus pertenecerán con dominancia independientemente del ecosistema en el que se encuentren, como fue el caso de *Weisella cibaria*, *Leifsonia aquatica*, *Pantoea cypripedii*, *Weisella confusa*, *Arthrobacter protophormiae*, *Bacillus* sp., *Streptomyces fradiae*, *Microbacterium* sp., *Salmonella entérica*, *Arthrobacter* sp., *Pantoea wallisii*, *Xylanimicrobium pachnodae*.

## 9. PERSPECTIVAS DE ESTUDIO

- Los resultados permiten vislumbrar el potencial de los vertederos en los ciclos biogeoquímicos, sin embargo, no se ha estudiado su potencial como biofertilizante con base en las poblaciones microbianas que los componen.
- Es importante estudiar el efecto de los vertederos de detritus sobre la vegetación circundante.
- Debido a que la mayoría de estudios de ecofisiología entre las hormigas defoliadoras y su microbioma se han realizado mediante microbiología clásica o con plataformas de secuenciación que hoy en día han quedado obsoletas, es importante realizar los análisis de diversidad dentro del jardín fúngico mediante NGS como Ion Torrent.
- Existe una gran cantidad de estudios enfocados al microbioma en el cuerpo y jardín fúngico de hormigas defoliadoras, sin embargo, este es el primer trabajo realizado en México con una especie mexicana mediante plataformas NGS, por lo tanto se debe continuar con esta línea de investigación para las especies mexicanas de gran valor ecológico y cultural.

## 10. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo del Dr. Ramón Ignacio Arteaga-Garibay y el gran equipo que conforma el Laboratorio de Recursos Genéticos Microbianos del Centro Nacional de Recursos Genéticos CNRG-INIFAP. Así mismo, agradezco al Ing. Juan Lara-Aguilera y al M.C. Marcos Daniel Martínez-Peña por su total apoyo y amistad.



**Instituto Nacional de Investigaciones  
Forestales, Agrícolas y Pecuarias**

## 11. LITERATURA CITADA

- Abril AB, Bucher EH. 2002. Evidence that the fungus cultured by leaf-cutting ants does not metabolize cellulose. *Ecology Letters* 5: 325-328.
- Abril AB, Bucher EH. 2004. Nutritional sources of the fungus by leaf-cutting ants. *Appl. Soil Ecol.* 26: 243–247.
- Abril AB. 2011. The Leaf-cutting Ant-plant Interaction From a Microbial Ecology Perspective. In: Seckbach J, Dubinsky Z, eds. *All Flesh is Grass Plant-Animal Interrelationships*. Springer Dordrecht heidelberg london New York. Springer. pp: 39-63.
- Alaeddini R. 2012. Forensic implications of PCR inhibition-A review. *Forensic Science International: Genetics* 6: 397-305.
- Augustin JO, Groenewald JZ, Nascimento RJ, Mizubuti ESG, Barreto RW, Elliot SL, Evans HC. 2013. Yet more "Weeds" in the garden: Fungal novelties from nest of leaf-cutting ants. *Plos One* 8. Num. 12: e82265. doi: 10.1371/journal.pone.0082265.
- Aylward FO, Burnum KE, Scott JJ, Suen G, Tringe SG, Adams SM, Barry KW, Nicora CD, Piehowski PD, Purvine SO, Starrett GJ, Lynne AG, Smith RD, Lipton MS, Currie CR. 2012a. Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. *The ISME Journal* 6: 1688-1701. doi: 10.1038/ismej.2012.10
- Aylward FO, Currie CR, Suen G. 2012b. The evolutionary innovation of nutritional symbioses in leaf-cutter ants. *Insects* 3: 41-61. doi: 10.3390/insects3010041
- Bacci M, Anversa MM, Pagnocca FC. 1995. Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultured by the leaf cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Antonie van Leeuwenhoek* 67: 385-386.
- Baena del VJA, Ramos MAJ, Gómez ACJ, Gómez, CDE. 2013. Comparación de métodos de extracción de ADN en tejidos parafinados y utilidad para amplificación por PCR. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 15(1): 172-179.
- Barbaric L, Bacic I, Grubic Z. 2015. Powdered activated carbon: An alternative approach to genomic DNA purification. *J Forensic Sci.* doi: 10.1111/1556-4029.12773

- Behie SW, Bonet B, Zacharia VM, McClung DJ, Traxler MF. 2017. Molecules to ecosystems: Actinomycete natural products In situ. *Front. Microbiol.* 7: 2149. doi: 10.3389/fmicb.2016.02149
- Bell TH, Yergeau E, Juck DF, Whyte LG, Greer CW. 2013. Alteration of microbial community structure affects diesel biodegradation in an arctic soil. *Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Ecology*: 1-11. doi: 10.1111/1574-6941.12102
- Bittleston LS, Wcislo W, Van Bael SA. 2011. Endophytic fungi reduce leaf-cutting ant damage to seedlings. *Biol. Lett.* 7: 30-32. doi: 10.1098/rsbl.2010.0456
- Cadena-Zamudio JD, Martínez-Peña MD, Guzmán-Rodríguez LF, Arteaga-Garibay RI. 2016. Aplicación de secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. *Agroproductividad* 9(2): 70-83.
- Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, Kjelleberg S. 2007. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology* 73(1): 278-288. doi: 10.1128/AEM.01177-06
- Cherrett JM, Powell RJ, Stradling DJ. 1989. The mutualism between Leaf-cutting ants and their fungus. In: Wilding N, Collins NM, Hamond PM, Webber JF, eds. *Insect-fungus interactions*. London: Department of Physics Lecture Theatre Imperial College, Academic Press, 93-120.
- Coblentz KE, Van Bael SA. 2013. Field colonies of leaf-cutting ants select plant materials containing low abundances of endophytic fungi. *Ecosphere* 4. Num. 5: 66. doi: 10.1890/ES13-00012.1
- Currie CR, Poulsen M, Mendenhall J, Boomsma JJ, Billen J. 2006. Coevolving Crypts and Exocrine Glands Support Mutualistic Bacteria in Fungus-Growing Ants. *Science* 311: 81-83
- Currie CR, Wong B, Stuart AE, Schultz TR, Rehner SA, Mueller UG, Sung GH, Spatafora JW, Straus NA. 2003. Ancient tripartite coevolution in the Attine Ant-microbe symbiosis. *Science* 299: 386-388 doi: 10.1126/science.1078155

- Currie CR. 2001a. A Community of Ants, Fungi, and Bacteria: A Multilateral Approach to Studying Symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 357-380.
- Currie CR. 2001b. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecología* 128: 99-106. doi: 10.1007/s004420100630
- Del Chierico F, Ancora M, Marcacci M, Cammà C, Putignani L, Conti S. 2015. Choice of Next-Generation Sequencing pipelines. In: Mengoni A, Galardini M, Fondi M. (Ed). *Bacterial Pangenomics Methods and Protocols*. Springer Science+Business Media New York: 31-47. doi: 10.1007/978-1-4939-1720-4
- Del Valle C, Rodríguez A, Espinoza M. 2004. Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos. *Revista de biología tropical* 52(3): 717-725.
- Escamilla-Prado E, Escamilla-Femat S, Gómez-Utrilla JM, Tuxtla-Andrade M, Ramos-Elorduy J, Pino-Moreno JM. 2012. Uso tradicional de tres especies de insectos comestibles en agroecosistemas cafetaleros del estado de Veracruz. *Tropiacal and Subtropical Agroecosystems* 15(2): S101-S109.
- Estrada C, Wcislo WT, Van Bael SA. 2013. Symbiotic fungi alter plant chemistry that discourages leaf-cutting ants. *New Phytologist* 198: 241-251. doi: 10.1111/nph.12140
- Farji BAG, Silva JF. 1995. Leaf-Cutting Ants and Forest Groves in a Tropical Parkland Savanna of Venezuela: Facilitated Succession?. *Journal of Tropical Ecology* 11. Núm. 4: 651-669.
- Farrugia A, Keyser C, Ludes B. 2010. Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Science International* 194: e25-e28. doi: 10.1016/j.forsciint.2009.09.004
- Fernández F, Castro-Huerta V, Serna F. 2015. Hormigas Cortadoras de Hojas de Colombia: *Acromyrmex & Atta* (Hymenoptera: Formicidae) Fauna de Colombia. Monografía No. 5. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D. C. 352 pp.
- Fernández-Marín H, Zimmerman JK, Nash DR, Boomsma JJ, Wcislo WT. 2009. Reduced biological control and enhanced chemical pest management in the evolution of fungus farming in ants. *Proceedings of the royal society B.*: 276. doi: 10.1098/rspb.2009.0184

- Fessard A, Remize F. 2017. Why are *Weissella* spp. Not used as as commercial starter cultures for food fermentation?. *Fermentation* 3: 38. doi: 10.3390/fermentation3030038
- Fortanelli MJ, Servín MME. 2002. Desechos de Hormiga Arriera (*Atta mexicana* Smith), Un Abono Orgánico Para La Producción Hortícola. *Terra Latinoamericana* 20. Num. 2: 153-160.
- Fraga NJ, Rodríguez J, Fuentes O, Castex M, Fernández-Calienes A. 2004. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de AND polimórfico amplificado al azar. *Rev. Cubana Med. Trop.* 56(3): 208-213.
- Freddie-Jeanne R, Philippe MCE, Corinne R. 2005. Digestive capacities of leaf-cutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material. *J Comp Physiol B* 175: 297-303. doi: 10.1007/s00360-005-0485-1
- Gomes DSC, Bacci JRM, Pagnocca FC, Correa BO, Aparecida HMJ. 1998. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the Leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Applied and enviromental microbiology* 64. Num. 12: 4820-4822
- Gómez-Merino FC, Trejo-Téllez LI, Velasco-Velasco J, Lara-Capistrán L. 2016. Herramientas moleculares para estudios ambientales de actividades agroindustriales. *Agroproductividad* 9(8): 3-9.
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie R. 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics* 17: 333-351. doi: 10.1038/nrg.2016.49
- Haeder S, Wirth R, Herz H, Spitteller D. 2009. Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. *PNAS* 106. No. 12: 4742-4746. doi: 10.1073 pnas.0812082106
- Haines BL. 1978. Element and energy flows through colonies of the leaf-cutting ant, *Atta colombica*, in Panama. *Biotopica* 10. Num.4: 270-277
- Holmes NA, Innocent TM, Heine D, Al Bassam M, Worsley SF, Trottmann F, Patrick EH, Yu DW, Murrell JC, Schiøtt M, Wilkinson B, Boomsma JJ, Hutchings MI. 2016. Genome analysis of two *Pseudonocardia phylotypes* associated with *Acromyrmex*

- leafcutter ants reveals their biosynthetic potential. *Frontiers in Microbiology* 7: 2073. doi: 10.3389/fmicb.2016.02073
- Jaffé CK, Lattke J, Pérez E. 1993. *El Mundo de las hormigas*. Equinoccio. Ediciones de la Universidad Simón Bolívar, Departamento Biología de Organismos, Valle de Sartenejas Baruta, Edo. Miranda. 190 pp.
- Kaur G, Reddy S. 2013a. Role of phosphate-solubilizing bacteria in improving the soil fertility and crop productivity in organic farming. *Archives of Agronomy and Soil Science*. Doi: 10.1080/03650340.2013.817667
- Kaur G, Reddy S. 2013b. Phosphate solubilizing rhizobacteria from an organic farm and their influence on the growth and yield of maize (*Zea mays* L.). *J. Gen. Appl. Microbiol* 59: 295-303. doi: 10.2323/jgam.59.295
- Kovatsi L, Nikou D, Triantaphyllou S, Njau SN, Voutsaki S, Kouidou S. 2009. DNA repair enables sex identification in genetic material from human teeth. *Hippokratia* 13(3): 165-168.
- Lewin GR, Johnson AL, Moreira SRD, Perry K, Book AJ, Horn HA, Pinto-Tomás AA, Currie CR. 2016. Cellulose-enriched microbial communities from leaf-cutter ant (*Atta colombica*) refuse dups vary in taxonomic composition and degradation ability. *PLoS ONE*: 11(3), e0151840.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*: Article ID 251364. doi:10.1155/2012/251364
- Ludes B, Keyser C. 2011. Avoiding errors and pitfalls in vidence sampling for forensic genetics. In: Nuno VD (Ed). *Forensic medicine-from old problems to new challenges*. InTech Open Access Publisher. Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia: 1-12. doi: 10.1007/978-1-4939-1720-4
- Lynch KM, Lucid A, Arendt EK, Sleator RD, Lucey B, Coffey A. 2015. Genomics of *Weissella cibaria* with an examination of its metabolic traits. *Microbiology* 161: 914-930. doi: 10.1099/mic.0.000053.
- Marfetán JA, Romero AI, Folgarait PJ. 2015. Pathogenic interaction between *Escovopsis weberi* and *Leucoagaricus* sp.: mechanisms involved an virulence levels. *Fungal ecology* 17:52-61.

- Martín M M, Weber NA. 1969. The cellulose-utilizing capability of the fungus cultured by the Attini ant *Atta colombica* tonsipes. Ann. Entomol. Soc. Am. 62: 1386-1387.
- Maurice-Lira JV, Quintero-Lizaola R. 2015. Detritus de hormiga arriera como bio-fertilizante. Memorias del XL Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo, San Luis Potosí, México: 857-861.
- Meirelles LA, Mendes TD, Solomon SE, Bueno OC, PagnoccaFC, Rodrigues A. 2014. Broad *Escovopsis*-inhibition activiti of *Pseudonocardia* associated with *Trachymyrmex* ants. Environmental microbiology 6(4):339-345. doi: 10.1111/1758-2229.12132
- Meng X, Wang W, Xie Z, Li P, Li Y, Guo Z, Lu Y, Yang J, Guan K, Lu Z, Tan H, Chen Y. 2017. Neomycin biosynthesis is regulated positively by AfsA-g and NeoR in *Streptomyces fradiae* CGMCC 4.7387. Sci. China Life Sci. 60. doi: 10.1007/s11427-017-9120-8
- Merriman B, Ion Torrent R&D Team, Rothberg JM. 2012. Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. Electrophoresis 33: 3397-3417.
- Metzker ML. 2010. Sequencing technologies-the next generation. Nature Reviews: Genetics 11(1): 31-46. doi: 10.1038/nrg2626.
- Moreno CE. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M&T-Manuales y Tesis SEA, vol. 1.Zaragoza, 84 pp.
- Mueller UG, Scott JJ, Ishak HD, Cooper M, Rodrigues A. 2010. Monoculture of leafcutter ant gardens. PLoS ONE 5(9): e12668. doi:10.1371/journal.pone.0012668
- Mühlhauser M. 2016. *Leifsonia aquatica*. Revista chilena de infectología 33(3): 313-314. doi: 10.4067/S0716-10182016000300011
- Mulero JJ, Chang CW, Lagacé RE, Wang DY, Bas JL, McMahon TP, Hennessy LK. 2008. Development and validation of the AmpFlSTR®MiniFiler™PCR Amplification Kit: A MiniSTR Multiplex for the analysis of degraded and/or PCR inhibited DNA.J Forensic Sci. 53(4): 838-852. doi: 10.1111/j.1556-4029.2008.00760.x
- Nechifor-Boilă AC, Loghin A, Vacariu V, Halațiu VB, Borda A. 2015. The storage period of the formalin-fixed paraffin-embedded tumor block does not influence the concentration and purity of the isolated DNA in a series of 83 renal and thyroid carcinomas. Romanian Journal of Morphology and Embryology 56(2): 759-763.

- Ortiz-Reyes A, Giraldo-Jaramillo TM, Moreno-Herrera CX. 2016. Análisis molecular de las bacterias asociadas a los depósitos de desechos de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Colombiana de Entomología* 42(2): 162-170.
- Patwardhan A, Ray S, Roy A. 2014. Molecular markers in phylogenetic studies - A review. *J Phylogen Evolution Biol* 2: 131. doi: 10.4172/2329-9002.1000131
- Pinto-Tomas AA, Anderson MA, Suen G, Stevenson DM, Chu FST, Cleland WW, Weimer PJ, Currie CR. 2009. Symbiotic Nitrogen Fixation in the Fungus Garden of Leaf-Cutter Ants. *Science* 326: 1120-1126. doi: 10.1126/science.1173036
- Poulsen M, Cafaro M, Boomsma JJ, Currie CR. 2005. Specificity of the mutualistic association between actinomycete bacteria and two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Molecular Ecology* 14: 3597-3604. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02695.x
- Raats D, Halpern M. 2007. *Oceanobacillus chironomi* sp. nov., a halotolerant and facultatively alkaliphilic species isolated from a chironomid egg mass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 255-259. doi: 10.1099/ijs.0.64502-0
- Ramírez-Ramírez JC, Rosas-Ulloa P, Velázquez-González MY, Arce-Romero F. 2011. Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente Año* 2(7): ISSN 2007-0713
- Reis BMS, Silva A, Alvarez MR, Oliveira TB, Rodrigues A. 2015. Fungal communities in gardens of the leafcutter ant *Atta cephalotes* in forest and cabruca agrosystems of southern Bahia State (Brazil). *Fungal Biology* 119: 1170-1178.
- Reynolds HT, Currie CR. 2004. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. *Mycologia* 96. Num. 5: 955-959.
- Ríos-Casanova L. 2014. Biodiversidad de hormigas en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: S392-S398. doi: 10.7550/rmb.32519
- Rizzi E. 2015. The pyrosequencing protocol for bacterial genomes. In: Mengoni A, Galardini M, Fondi M. (Ed). *Bacterial Pangenomics Methods and Protocols*. Springer Science+Business Media New York: 49-75. doi: 10.1007/978-1-4939-1720-4

- Ronhede S, Boomsma JJ, Rosendahl S. 2004. Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens. *Mycol. Res.* 108. Num. 1: 101-106. doi: 10.1017/S0953756203008931
- Sapountzis P, Zhukova M, Hansen LH, Sørensen SJ, Schiøtt M, Boomsma JJ. 2015. *Acromyrmex* leaf-cutting ants have simple gut microbiota with nitrogen-fixing potential. *Applied and Environmental Microbiology* 81:5527–5537. doi:10.1128/AEM.00961-15
- Shimoni E, Baasov T, Ravid U, Shoham Y. 2003. Biotransformations of propenylbenzenes by an *Arthrobacter* sp. and its t-anethole blocked mutants. *Journal of Biotechnology* 105: 61-70. doi: 10.1016/S0168-1656(03)00141-X
- Shiøtt M, Rogowska-Wrzesinska A, Roepstorff P, Boomsma JJ. 2010. Leaf-cutting ant fungi produce cell wall degrading pectinase complexes reminiscent of phytopathogenic fungi. *BMC Biology* 8: 156. doi: 10.1186/1741-7007-8-156
- Shoenian I, Spitteller M, Ghaste M, Wirth R, Herz H, Spitteller D. 2011. Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (5): 1955–1960. doi: 10.1073/pnas.1008441108
- Suen G, Scott JJ, Aylward FO, Adams SM, Tringe SG, Pinto-Tomás AA, Foster CE, Pauly M, Weimer PJ, Barry KW, Goodwin LA, Bouffard P, Li L, Osterberger J, Harkins TT, Slater SC, Donohue TJ, Currie CR. 2010. An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. *PLoS Genet* 6(9): e1001129. doi:10.1371/journal.pgen.1001129
- Torres AFC, Huang C, Chong C-M, Leung SW, Prieto-da-Silva ARB, Havt A, Quinet YP, Martins AMC, Lee SMY, Rádis-Baptista G. 2014. Transcriptome analysis in venom gland of the predatory giant ant *Dinoponera quadriceps*: Insights into the polypeptide toxin arsenal of hymenopterans. *PLoS ONE* 9(1): e87556. doi: 10.1371/journal.pone.0087556
- Vásquez-Bolaños M. 2011. Lista de especies de hormigas (Hymenóptera: Formicidae) para México. *Dugesiana* 18 (1): 95-133.
- Vo TL, Mueller UG, Mikheyev AS. 2009. Free-living fungal symbionts (Lepiotaceae) of fungus-growing ants (Attini: Formicidae). *Mycologia* 1001. No. 2: 206-210. doi: 10.3852/07-055

- Vos M, Quince C, Pijl AS, de Hollander M, Kowalchuk GA. 2012. A comparison of *spoB* and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. *PLoS ONE* 7(2):e30600. doi:10.1371/journal.pone.0030600
- Wilson, K. 1990. Preparation of genomic DNA from bacteria. *In: Current protocols in molecular biology*. Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A. and Struhl, K. (Eds.). Assoc. and Wiley Interscience. NY, USA. 241-245 pp
- Wirth R, Herz H, Ryel RJ, Beyschlag W, Hölldobler B. 2003. Herbivory of leaf-cutting ants: a case study on *Atta colombica* in the tropical rainforest of Panamá. *Ecological studies* 164. Berlin: Springer. doi: 10.1007/978-3-662-05259-4
- Wooley JC, Godzik A, Friedberg I. 2010. A primer on metagenomics. *PLoS Comput Biol* 6(2): e1000667. doi:10.1371/journal.pcbi.1000667
- Yamamoto K, Asano Y. 2015. Efficient production of lumichrome by *Microbacterium* sp. strain TPU 3598. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 7360-7367. doi: 10.1128/AEM.02166-15.
- Yang B, Wang Y, Quan PY. 2016. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BCM Bioinformatics* 17: 135. doi: 10.1186/s12859-016-0992-y
- Yek SH, Mueller UG. 2010. The metapleural Gland of Ants. *Biol. Rev.*18. doi: 10.1111/j.1469-185X.2010.00170.x
- Zhang B, Penton CR, Xue C, Wang Q, Zheng T, Tiedje JM. 2015. Evaluation of the Ion Torrent Personal Genome Machine for gene-targeted studies using amplicons of the nitrogenase gene *nifH*. *Applied and environmental microbiology* 81(13): 4536-4545. doi: 10.1128/AEM.00111-15