



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN

FACULTAD DE INGENIERÍA

UNIDAD DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“Implementación de la tecnología de ADN
de microarreglos para detectar
microorganismos patógenos en agua de una
planta de tratamiento por lodos activados”**

Tesis

PRESENTADA POR:

Biol. Fatima Jhoselyn Novelo Segura

EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRA EN INGENIERÍA

OPCIÓN AMBIENTAL

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2017

“Aunque este trabajo hubiera servido para EXAMEN DE GRADO y hubiere sido aprobado por el SÍNODO, solo su AUTOR es responsable de las doctrinas emitidas por el”

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

RESUMEN

Existe la necesidad de contar con técnicas que permitan establecer con precisión y rapidez la presencia de estos agentes etiológicos en muestras ambientales, como el caso de las aguas residuales, se propone la implementación de una herramienta de biología molecular como los microarreglos de ADN. El microchip detecta en muestras ambientales, 270 microorganismos capaces de producir enfermedades en zonas tropicales, específicamente en la Península de Yucatán. Se tomaron muestras de agua en 3 puntos (afluente, reactor y efluente) de una planta de tratamiento de aguas residuales por lodos activados, se realizó la caracterización fisicoquímica y microbiológica, posteriormente las muestras fueron centrifugadas y filtradas para después ser sometidos a un proceso de extracción de ADN, con la finalidad de obtener el material para hibridar los microarreglos de ADN. Los resultados obtenidos establecieron la presencia de 45 especies entre las 3 muestras pertenecientes a 5 grupos taxonómicos siendo el grupo de las bacterias el que tuvo un mayor porcentaje en presencia con 32 especies. Para el afluente, reactor y efluente se detectaron 29, 33 y 39 especies respectivamente, cabe resaltar la presencia de dos especies pertenecientes a géneros incluido dentro de los coliformes, como es el caso de *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae*. Otras especies detectadas fueron *A. hydrophila*, *C. perfringens*, *E. faecalis*, *Y. enterocolítica* y *P. aeruginosa*, también estuvieron presentes en 3 las muestras de agua residual, exceptuando a *C. perfringens*, que solo se detectó en la muestra de afluente y a *Y. enterocolítica* en el efluente. Se pudo concluir que la metodología resulto ser eficiente para la detección de los diversos grupos de organismos en el reactor y el efluente, ya que se logró identificar especies pertenecientes a los 5 diferentes taxones que se incluyen en el microarreglo y se trata de una aportación importante dado que no existe en el país un dispositivo parecido.

ABSTRACT

There is need for techniques to establish accurately and quickly the presence of these etiological agents in environmental samples, such as the case of wastewater, the implementation of a molecular biology tool as DNA microarrays is proposed. The microchip detects in environmental samples, 270 microorganisms capable of producing diseases in tropical zones, specifically in the Yucatan Peninsula. water samples at three points (influent, reactor effluent) of a treatment plant wastewater by activated sludge were taken, the physicochemical and microbiological characterization was performed, then the samples were centrifuged, filtered and then be subjected to a process of Extraction of DNA, in order to obtain the material to hybridize the DNA microarrays. The results obtained established the presence of 45 species among the 3 samples belonging to 5 taxonomic groups being the group of bacteria that had a higher percentage in presence with 32 species. For the influent, effluent and reactor 29, 33 and 39 respectively were detected species, it may highlight the presence of two species belonging to genera included within coliforms, as is the case of *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae*. Other species detected were *A. hydrophila*, *C. perfringens*, *E. faecalis*, *Y. enterocolitica* and *P. aeruginosa* were also present in 3 samples of wastewater, except for *C. perfringens*, which was only detected in the sample of influent And *Y. enterocolitic* in the effluent. It was concluded that the method proved to be efficient for detection of different groups of organisms in the reactor and the effluent as it was identified species belonging to the five different taxa included in the microarray and is an important contribution since there is no such device in the country.

Índice

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Preguntas de investigación	3
1.2.	Objetivo general	3
1.2.1	Objetivos específicos	3
II.	MARCO TEÓRICO	4
2.1.	Principales microorganismos patógenos encontrados en aguas residuales domiciliarias	4
2.2.	Problemática causada por microorganismos patógenos en agua	7
2.3.	Métodos tradicionales de identificación.....	8
2.4.	Métodos basados en tecnología de ADN	10
2.5.	Microarreglos	11
III.	METODOLOGÍA.....	13
3.1.	Sitio de muestreo	13
3.2.	Proceso de Filtración.....	14
3.3.	Extracción de ADN metagenómico	15
3.4.	Determinación de presencia de material genético	15
3.5.	Cuantificación por fluorometría	16
3.6.	Hibridación del microarreglo.....	17
3.7.	Validación del microarreglo	19
3.8.	Caracterización fisicoquímica.....	19
3.9.	Caracterización microbiológica	20
IV.	Resultados y discusión.....	21
4.1.	Parámetros fisicoquímicos (multiparamétrico) y microbiológicos	21
4.2.	Estandarización de la técnica de extracción de ADN metagenómico para agua residual domiciliaria.....	24
4.3.	Implementación de la técnica de microarreglo	27
4.4.	Hibridación de los microarreglos	28
4.4.1.	Microarreglos	30
4.5.	Comparación de patógenos en la entrada, reactor y salida del proceso de tratamiento	34
V.	CONCLUSIONES	39

V. BIBLIOGRAFÍA.....	41
VI. ANEXOS	48

Índice de tablas

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos a caracterizar con el método de determinación y norma correspondiente	19
Tabla 2. Análisis microbiológicos tradicionales con el método de determinación y norma correspondiente	19
Tabla 3. Resultados de los parámetros fisicoquímicos <i>in situ</i>	20
Tabla 4. Resultados de la caracterización fisicoquímica	20
Tabla 5. Resultados de la caracterización microbiológica	22
Tabla 6. Numero de filtros obtenidos de las diferentes muestras	25
Tabla 7. Cantidad de ADN por muestra	27
Tabla 8. Especies detectadas de patógenos pertenecientes a las bacterias	32
Tabla 9. Especies detectadas de patógenos pertenecientes a los protistas	34
Tabla 10. Especies detectadas de patógenos pertenecientes a los helmintos	35
Tabla 11. Especies detectadas de patógenos pertenecientes a los hongos	35
Tabla 12. Especies detectadas de patógenos pertenecientes a los virus	35

Índice de figuras

Figura 1. Ubicación del sitio de estudio	13
Figura 2. Tamaños relativos de microorganismos y células	15
Figura 3. Etapas de la técnica de electroforesis	16
Figura 4. Microarreglo	17
Figura 5. Esquema de hibridación	18
Figura 6. Fotografías de los generos <i>Necator</i> e <i>Uncinaria</i> identificados en las muestras	24
Figura 7. Diagramas de las modificaciones al proceso de extracción en la muestra reactor y salida respectivamente	26
Figura 8. Comparación del gel que confirma la presencia de ADN con un esquema de resultados esperados	28
Figura 9. Microarreglo entrada	29
Figura 10. Microarreglo reactor	29
Figura 11. Microarreglo salida	29
Figura 12. Distribución de las especies entre grupos taxonómicos	30
Figura 13. Grupos afectados por agentes etológicos (afluente)	35
Figura 14. Sistemas y aparatos afectados por agentes etológicos (afluente)	35
Figura 15. Grupos afectados por agentes etológicos (reactor)	36
Figura 16. Sistemas y aparatos afectados por agentes etológicos (reactor)	36
Figura 17. . Grupos afectados por agentes etológicos (efluente)	37
Figura 18. Sistemas y aparatos afectados por agentes etológicos (efluente)	38
Figura 19. Grafica de la distribución de los grupos taxonómicos entre las 3 muestras	38

I. INTRODUCCIÓN

Yucatán presenta alto riesgo de contaminación del manto acuífero, principal fuente de abastecimiento de agua para todas las actividades humanas desarrolladas en la zona. El riesgo de contaminación es debido a la superficialidad del manto freático aunado a las características de su suelo tipo kárstico, el cual presenta una estructura geológica fracturada y alta permeabilidad. Estas características del suelo permiten una rápida infiltración de contaminantes y potencializa el riesgo a la salud pública.

Múltiples estudios se han realizado en Yucatán para evaluar la contaminación que presenta el manto acuífero. Entre los contaminantes más encontrados habitualmente, están los coliformes fecales, cuya presencia indica una contaminación del agua subterránea por materia fecal y por ende, una probable presencia de microorganismos patógenos de origen fecal como los virus, bacterias, protozoos y huevos de helmintos. Esta contaminación está relacionada con el vertido de aguas residuales de origen doméstico e industrial como las aguas residuales porcícolas.

El control de la calidad microbiológica del agua de consumo y de desecho, requiere de análisis dirigidos a determinar la presencia de microorganismos patógenos involucrados en la transmisión por vía hídrica que pueden causar enfermedades con diferentes niveles de gravedad, desde gastroenteritis simple hasta casos fatales de diarrea, disentería, hepatitis o fiebre tifoidea. Entre los principales microorganismos que se han reportado en aguas residuales de Yucatán se encuentran: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Cronobacter sakazakii*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, virus de la hepatitis A y E, *Legionella*, *Leptospira*, *Salmonella typhi* y *paratyphi*, *Shygella spp.*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Legionella pneumophila*, *Enterococcus faecalis*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Ascaris lumbricoides*, *Entamoeba spp.*, *Enterovirus vermicularis*, entre muchos otros.

El diagnóstico individual de estos microorganismos, requiere laboratorios especializados y representa varios días de análisis y costos elevados. Por tal motivo es necesario contar con herramientas que permitan conocer la calidad microbiológica de la misma y que identifique en forma precisa los organismos patógenos que se encuentren presentes ya que será pieza clave a la hora de tomar decisiones en relación al control de vertidos, elección de sistemas de tratamiento de aguas y conservación de ecosistemas, evitando así el riesgo de contaminación de las personas y el ambiente.

Frente a estas dificultades y ante la necesidad de hacer una evaluación rápida y fiable de la presencia de microorganismos patógenos en el agua, en este estudio se propone el uso de una herramienta de biología molecular como los microarreglos de ADN para identificarlos. Primero se plantea la implementación de la técnica de extracción de ADN metagenómico de muestras de agua residual domiciliaria del afluente y efluente de una planta de tratamiento con proceso de lodos activados. El material genético obtenido se colocará en el microarreglo de Affymetrix para su hibridación y posterior lectura de resultados. Se espera obtener información sobre el espectro de microorganismos patógenos presentes así como la eficiencia de remoción de los mismos por la planta de tratamiento.

1.1. Preguntas de investigación

- a) ¿De acuerdo a la compleja composición del agua residual domiciliaria, se deben realizar adecuaciones a la técnica de extracción del metagenoma para no limitar el espectro de detección del microarreglo?
- b) ¿El microarreglo representa una ventaja para la oportuna detección de microorganismos patógenos en muestras de agua residual domiciliaria?
- c) ¿La implementación de tecnología de detección de microorganismos patógenos en muestras de agua residual domiciliaria representa una importante reducción de tiempo?

1.2. Objetivo general

Implementar el uso de microarreglos de ADN como método para la detección de microorganismos patógenos en agua residual domiciliaria.

1.2.1 Objetivos específicos

- Estandarizar la técnica de extracción de ADN metagenómico para agua residual domiciliaria.
- Aplicar la metodología de los microarreglos para la detección de microorganismos patógenos, helmintos, protozoos, bacterias, hongos y virus en una planta de tratamiento con proceso de lodos activados.
- Comparar la presencia de patógenos en afluente y efluente en la planta de tratamiento de aguas residuales domiciliarias por lodos activados.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Principales microorganismos patógenos encontrados en aguas residuales domiciliarias

Se ha estimado que aproximadamente 3.000 millones de personas en todo el mundo carecen de sistemas de saneamiento. El 95% de las aguas residuales domésticas son vertidas al medio sin ser tratadas. Como consecuencia de estas deficiencias sanitarias y de la falta de aguas potable, se ha estimado que cada año 3.500 millones de personas contraen alguna enfermedad de transmisión hídrica, y 3,3 millones de personas mueren anualmente de enfermedades entéricas. La razón principal de esta situación es el alto coste que supone la puesta a punto de procesos de tratamiento, y el mantenimiento infraestructuras apropiadas que permitan el control sanitario, de los que solamente se benefician el 6% de la población mundial (Niemczynowicz, 1997).

El acelerado crecimiento urbano de las grandes ciudades de la región (Península de Yucatán), representa una amenaza para los pozos de abastecimiento de agua de consumo. El crecimiento urbano es un foco importante de contaminación, puesto que la principal causa de contaminación del subsuelo son las descargas domésticas.

Este es el caso de la ciudad de Mérida donde, la mayor parte del agua residual domiciliar está siendo dispuesta directamente al subsuelo, a través de tanques sépticos, sumideros, letrinas y en algunos fraccionamientos existen redes de alcantarillado sanitario conectadas a pozos profundos. De las 267,663 viviendas registradas, solamente 28,187 viviendas disponen de sistema de tratamiento colectivo, donde las aguas residuales son colectadas a través de alcantarillado sanitario y destinadas para su depuración a una planta de tratamiento.

Dependiendo de su composición y concentración, las aguas residuales domésticas pueden contener una gran diversidad de microorganismos, incluyendo patógenos. A continuación se describen los principales grupos de microorganismos que se pueden encontrar en aguas residuales domiciliarias.

Virus. Proceden de la excreción, por parte de individuos infectados, ya sean humanos o animales. Poseen la capacidad de adsorberse a sólidos fecales y otras materias particuladas, favoreciendo de esta forma su supervivencia durante tiempos prolongados en las aguas residuales. Se pueden encontrar virus pertenecientes a distintos grupos: poliovirus, virus Echo, Coxsackie virus, virus de la hepatitis A y E, agente de Norwalk, rotavirus, reovirus, adenovirus y parvovirus. La gran supervivencia de los virus origina la resistencia a algunos tratamientos de aguas residuales, constituyendo un peligro para las aguas receptoras. Durante los tratamientos, hay que considerar que agentes como los virus se adsorben a la superficie de los flóculos y de esta forma son separados de las aguas residuales, pero no inactivados. Algunos quedan en el efluente, siendo un peligro para la salud, aunque el mayor riesgo lo constituyen aquellos que quedan en el lodo, en mayores cantidades, sobre todo si este lodo se utiliza como fertilizante sin tratamiento previo (Borrego, *et.al.* 1987).

Bacterias. Pueden ser de origen fecal o bacterias implicadas en procesos de biodegradación, tanto en la naturaleza como en las plantas de tratamiento. En las aguas residuales domiciliarias, predominan las especies pertenecientes a los siguientes géneros: *Escherichia*, *Salmonella*, *estreptococos fecales*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Flavohacterium*, *Nocardia*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Mycohacterium*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, etc. Las bacterias coliformes se utilizan como indicador de contaminación por materia fecal, ya que cada persona elimina diariamente de 100.000 a 400.000 millones de coliformes a través de las heces (Craun, *et. al.*1997).

Protozoos. Los que se encuentran más frecuentemente en las aguas residuales son amebas, flagelados y los ciliados libres y fijos. Estos organismos juegan un papel muy importante en los procesos de tratamiento biológico, especialmente en filtros percoladores y lodos activados. Pueden eliminar bacterias suspendidas en el agua, ya que estos no sedimentan, evitando la producción de efluentes con turbidez (Steiner, *et. al.* 1997), algunas especies patógenas que se pueden encontrar son *Cryptosporidium parvum*, *Balantidium coli*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia intestinalis*.

Hongos. La mayoría son aerobios estrictos, pueden tolerar valores de pH relativamente bajos, y tienen baja demanda de nitrógeno. Esto les hace desempeñar una función importante en el tratamiento de aguas residuales industriales. Los géneros que pueden encontrarse son: *Geotrichium*, *Mucor*, *Aureobasidium*, *Subbaromyces*, *Fusarium*, *Sepedonium* y *Sphaerotilus*, entre ellos algunas especies patógenas. En el tratamiento con lodos activados, los hongos, junto a bacterias filamentosas, pueden dar lugar a un problema conocido como “bulking”, debido a que su presencia dificulta la sedimentación de los lodos.

Helminetos. Los huevos de helminto son un grupo de organismos que incluye los nemátodos, trematodos y cestodos. Las características epidemiológicas que hacen de los helmintos patógenos entéricos causantes de infección por contacto con agua contaminada, son su alta persistencia en el medio ambiente, la mínima dosis infecciosa, la baja respuesta inmune y la capacidad de permanecer en el suelo por largos periodos de tiempo (Nelson, 2003), ejemplos de patógenos de este grupo son *Ascaris lumbricoides*, *Fasciola hepática*, *Enterobius vermicularis* y *Taenia solium*.

2.2. Problemática causada por microorganismos patógenos en agua

La evaluación del nivel de calidad microbiológica utiliza indicadores de contaminación fecal, que son aquellos microorganismos cuya presencia da clara evidencia que existe contaminación asociada con excretas humanas y de animales de sangre caliente, son organismos que normalmente viven en el tracto intestinal de los huéspedes y sirven como parámetro para evaluar la calidad microbiológica de las aguas residuales. Los análisis principalmente incluyen: coliformes totales, coliformes fecales y estreptococos fecales (OMS, 1989).

Debido a la dificultad para identificar y cuantificar a los microorganismos patógenos causantes de enfermedades, los ingenieros sanitarios y las autoridades de salud pública utilizan como microorganismo indicador de la contaminación del agua por materia fecal a los coliformes fecales (NOM-001-SEMARNAT-1996).

Casi siempre, los patógenos pertenecen al grupo de los microorganismos, que se transmiten en las heces excretadas por individuos infectados o por ciertos animales. De forma que estas enfermedades se suelen transmitir al ingerirlos en forma de agua o de alimentos, contaminados por esas heces (vía fecal-oral).

Estudios realizados en agua subterránea, cenotes y pozos de abastecimiento del estado de Yucatán reflejan frecuentemente la presencia de coliformes fecales lo que indica la probable presencia de microorganismos patógenos representando un potencial riesgo para la salud humana (Alcocer, *et al.* 1999, Cobos, 2014, Méndez, *et al.*, 2009).

De acuerdo a Pacheco *et al.* (2004) la calidad microbiológica del agua subterránea en el estado de Yucatán, utilizando como indicador los coliformes, se clasificó como aceptable en un 45%, contaminada en un 23%, peligrosa en un 18% y muy contaminada en un 14%. Una de las principales razones podría ser, el mal manejo de las aguas residuales que trae como consecuencia la propagación de

enfermedades bacterianas y víricas tales como las diarreas, la tifoidea, la paratifoidea, el cólera, la hepatitis infecciosa, la amebiasis, giardiasis, etc.

2.3. Métodos tradicionales de identificación

La presencia y extensión de contaminación fecal es un factor importante en la determinación de la calidad de un cuerpo de agua. Las heces contienen una variedad de microorganismos y formas de resistencia de los mismos, involucrando microorganismos patógenos, los cuales son un riesgo para la salud pública al estar en contacto con el ser humano.

Por tal motivo, es importante evaluar el riesgo microbiológico ambiental, ya que, por generarse a partir del tratamiento de aguas residuales domiciliarias e industriales, este material contiene patógenos, que pueden tener un efecto adverso significativo en los componentes de medio ambiente (suelo, agua, animales, cultivos, entre otros), (Vargas, 2000 y Kelly, 2007).

Los métodos usados para el aislamiento y el recuento de los microorganismos patógenos en agua, alimentos, etc. pueden no ser eficaces debido a que dichos microorganismos se encuentran en muy baja cantidad, sobre todo en presencia de números altos de otros microorganismos, o tienen una distribución irregular en la muestra. Aun cuando se cuenta con métodos sensibles, en general son largos y costosos; además, hay patógenos que no pueden determinarse en laboratorios no especializados, como, por ejemplo, el virus de la hepatitis A.

Estos contratiempos han hecho que se utilicen grupos de microorganismos de detección y cuantificación más fáciles y cuya presencia en cierto número se considera como una indicación de que la muestra estuvo expuesta a condiciones que pudieron determinar la llegada a la misma de microorganismos peligrosos o permitir la proliferación de especies patógenas. Estos grupos de microorganismos

se denominan “indicadores”. Éstos son organismos habitualmente asociados al tracto intestinal, cuya presencia en el agua indica que el agua ha recibido una contaminación de origen intestinal (CYTED, 1996).

De igual manera, se le realiza a las muestras de agua residual pruebas de identificación en el laboratorio, tienden a hacerse como un carril de pruebas estándar cualitativo del agua tales como coliformes, número más probable, *Salmonella*, Enterococos, aislamiento selectivo de microorganismos, tinción gram, huevos de helminto y muestras de microcultivo de hongos filamentosos.

Estos análisis son usados ya que son métodos que por su facilidad, economía y son los que a normatividad establece. Sin embargo algunos como el “número más probable” (NMP), es un método cuyo resultado no es exacto ya que sólo da la probable densidad de bacterias coliformes totales o fecales de una muestra determinada y no reflejan adecuadamente la presencia de patógenos no bacterianos, en efluentes de agua residual desinfectadas debido a su alta susceptibilidad a factores inactivadores (Payment, et al. 1993) y a la constante susceptibilidad de errores al correlacionar la presencia de parásitos no bacterianos como protozoos y virus (Bonadona, et al. 2002).

Para la identificación individual de patógenos los métodos microbiológicos clásicos implican, generalmente, el uso de un apropiado cultivo de preenriquecimiento y enriquecimiento, el aislamiento en medios selectivos y la posterior confirmación mediante pruebas bioquímicas morfológicas y serológicas. La obtención de resultados puede tomar días o semanas y presentan baja sensibilidad. Además, se ha demostrado que algunas células bacterianas pueden entrar en un estado viable pero no cultivable, lo que imposibilita el uso de los métodos de cultivo como herramienta de diagnóstico. Una serie de métodos de biología molecular alternativos, rápidos y sensibles para la detección, identificación y cuantificación de patógenos han sido desarrollados para superar estos inconvenientes (Prasad y Sharan, 2009).

2.4. Métodos basados en tecnología de ADN

Dados los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos, los métodos moleculares se han establecido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos.

Los primeros métodos de identificación molecular fueron la hibridación ADN-ADN, el análisis de secuencias del ADNr 16S, la hibridación con una sonda específica y el análisis RFLP o ribotipificación. En contraste con las características fisiológicas y bioquímicas, la identificación molecular se basa en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos más que en los productos de su expresión. Estos métodos moleculares se utilizan a menudo en asociación con la identificación microbiológica convencional (Foley y Grant, 2007 y Ward y Roy, 2005).

Algunos de estos métodos permiten establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias, como en los que se utilizan como marcadores en los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S y sus espacios intergénicos. En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada.

Los métodos moleculares de huellas genéticas (T-RFLP, RAPD, DGGE) surgieron como una herramienta biotecnológica que modificó el estudio de la diversidad microbiana en las muestras ambientales. Así mismo en los últimos años se han desarrollado equipos de secuenciación automatizada y se ha logrado un desarrollo importante en la bioinformática que han permitido el aumento exponencial en el número de trabajos científicos centrados en la secuenciación de genomas completos.

De la mano de toda esta información genómica se han desarrollado nuevas herramientas para su análisis, como la tecnología de microarreglos de ADN, que ha permitido el estudio de la homología del ADN o de la expresión génica para miles de genes en una sola prueba. Esta tecnología se ha usado durante los últimos años

para el estudio de perfiles transcripcionales y de variaciones en el genoma de gran variedad de microorganismos. Debido al incremento en el número de genomas microbianos secuenciados por completo, los microarreglos de ADN se están convirtiendo en una herramienta fundamental en las principales áreas de investigación (Aguado, 2007).

2.5. Microarreglos

En microbiología, el número de genomas de organismos microscópicos secuenciados por completo aumenta cada día, lo que abre las puertas de la investigación microbiológica molecular a escala genómica y del desarrollo de nuevas tecnologías, como es el caso de los Microarreglos de ADN.

Esta tecnología fue diseñada por Michael Eisen y Patrick Brown en 1999, que constituyen una nueva herramienta de la biología molecular y las ciencias genómicas. El arreglo de ADN consiste en un gran número de moléculas de ADN ordenadas sobre un sustrato sólido de manera que formen una matriz de secuencias de dos dimensiones. Estos fragmentos de material genético pueden ser secuencias cortas llamadas oligonucleótidos o de mayor tamaño como el cADN o bien productos de PCR. A los fragmentos de ADN de una sola hebra inmovilizados en el soporte, se les denomina a menudo sondas. A las muestras de ácidos nucleicos se les marca con métodos enzimáticos o fluorescentes, posteriormente se incuban sobre el panel de sondas dando lugar a la hibridación (reconocimiento y unión de moléculas complementarias) que sean homólogas. Durante la hibridación el material genético se unirá a sus complementarias inmovilizadas sobre el "chip" de ADN y de esa forma permiten su identificación y cuantificación en las muestras para que posteriormente con el apoyo de un escáner y herramientas informáticas se pueda analizar e interpretar los datos obtenidos (López, *et al.* 2002).

Los microarreglos son adoptados en múltiples investigaciones que van desde la biomedicina para tener perfiles diferenciales de expresión de los genes para poder determinar tratamientos, hasta investigaciones en el área de ingeniería ambiental y sanitaria ya es una herramienta analítica para la identificación de microorganismos patógenos que representan una gran amenaza a la salud humana y ambiente.

Recientemente este método de análisis del contenido genético por hibridación con microarreglos se ha utilizado como una herramienta para el genotipificación epidemiológica de microorganismos, así como para el diagnóstico y detección de microorganismos patógenos.

Un ejemplo de su aplicación en muestras de agua es un estudio realizado en el valle de Katmandú, Nepal donde presentaban contaminación microbiana en el agua subterránea de donde extraían agua para consumo humano con ayuda de pozos profundos, mediante la aplicación de análisis de microarreglos con el cual detectaron hasta 941 bacterias patógenas presentes en el agua analizada (Inoue, *et al* 2015).

En otro estudio se utilizaron los microarreglos para detectar simultáneamente bacterias indicadoras de contaminación fecal humana y patógena en muestras de agua provenientes de tomas domiciliarias en los estados de Connecticut, Missouri, y Massachusetts, USA (Brinkman, 2012).

cada tipo de muestra se colectó un aproximado de 13 litros, los cuales se almacenaron y transportaron de acuerdo a el STANDARD METHODS (APHA, 2005), para poder realizar posteriormente los diferentes análisis (DBO₅, DQO, nitrógeno total, fosforo, microbiológicos, etc.).

Conjuntamente se realizó la toma de parámetros fisicoquímicos en el momento de la toma de muestra (pH, temperatura, conductividad y oxígeno disuelto) con ayuda del equipo multiparamétrico portátil, para saber bajo qué condiciones se estaba realizando la toma de muestra y poder relacionar los resultados con el tipo y condiciones de operación de la planta.

Con el objetivo de estandarizar la técnica de extracción de ADN metagenómico, se tomó una muestra preliminar, la cual se utilizó para practicar la obtención del material genético necesario para poder hibridar el microarreglo. Se necesita un ADN sin degradar y una cantidad mínima de 20 µg/µl.

3.2. Proceso de filtración

Las muestras de agua fueron sometidas a un proceso de centrifugación, con la finalidad de separar el sedimento y de esta forma facilitar la filtración de las muestras, sin embargo, el sedimento se almacenó ya que ahí quedan retenidos microorganismos (huevos de helminto), y por lo tanto también fue sometido a proceso de extracción de material genético.

Para poder concentrar y tener retenido la mayor cantidad de microorganismos sobre un soporte se llevó a cabo un proceso de filtración, en el laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería. Se utilizaron 4 diferentes filtros con tamaños de poros variables (Sólidos, 0.45 µ, 0.22 µ y 0.025 µ), ya que de esta forma se pretende retener a la mayor cantidad de microorganismos pertenecientes a los grupos, presentes en los diferentes estratos de las muestras y que son de tamaños diversos (Figura 2).

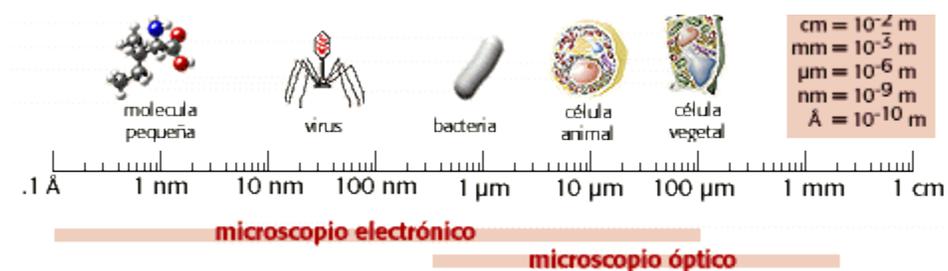


Figura 2. Tamaños relativos de microorganismos y células (Etayo, 2016).

3.3. Extracción de ADN metagenómico

Se llevó a cabo el proceso de extracción utilizando el protocolo de Rojas-Herrera (2008) para lodos y sedimentos, con modificaciones, ya que se utilizaron 4 tamaños diferentes de filtro, 2 muestras de sedimento centrifugado de muestras de agua del reactor y entrada al proceso en lugar de muestras directas, además que se disminuyó la cantidad de agua estéril (60 μl a 40 μl) para concentrar la cantidad de material genético y se realizó un paso extra de purificación de la muestras con una columna.

3.4. Determinación de presencia de material genético

Por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa, se realizó la confirmación, separando fragmentos del ácido desoxirribonucleico en el material extraído y así tener una estimación y grado de certeza de su concentración (Figura 3). El gel se elaboró utilizando 0.30 g de agarosa, 30 ml de solución TAE al 1X, se mezclaron con calor y se colocaron en un molde para placa de gel con peines por 20 minutos para que enfrié y solidifique. Posteriormente se elaboró los colorantes para gel, para ello se utilizó 2 μl de colorante UView por cada 10 μl de muestra más 2 μl de colorante de carga por cada 2 μl de muestra, teniendo en cuenta los 2 μl para el control (1K).

Cada pocillo de gel se cargó mezclando 2 μ l de los colorantes combinados más 2 μ l de muestra y se corrió en el equipo de electroforesis por 30 minutos a 90 volts, transcurrido el tiempo se retiró el gel del equipo de electroforesis y se colocó sobre la charola del documentador, se insertó en el equipo y se tomó una fotografía, con ayuda del *software* se visualizó y estableció la presencia e intensidad del material genético.

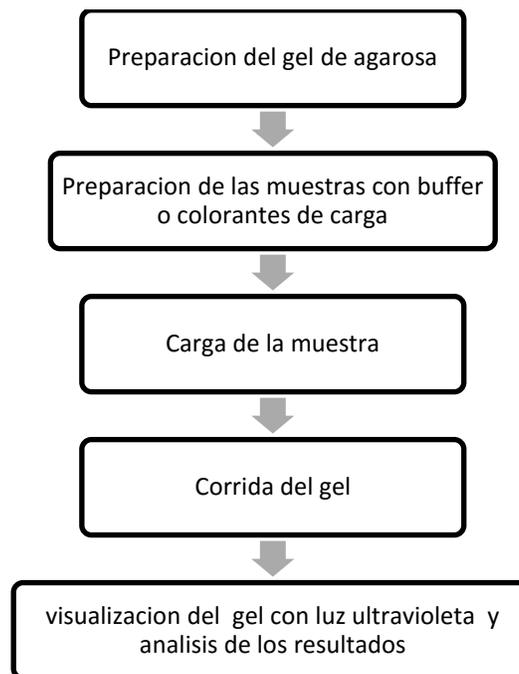


Figura 3. Etapas de la técnica de electroforesis.

3.5. Cuantificación por fluorometría

El proceso de cuantificación por fluorometría, consiste en un fluorómetro (Quantus flourometer de Promega) y *kits* que emplean colorantes selectivos que se tornan fluorescentes cuando se unen al ADN, estos son específicos a sus objetivos evitando contaminantes. Como resultado es una lectura de fluorescencia que refleja exactamente la cantidad de producto de interés a cuantificar.

La preparación de la muestra con los colorantes se realizó con el protocolo que da el fabricante que es específico para el equipo. Posteriormente, las muestras con los colorantes se agitaron y centrifugaron, posteriormente se colocaron tanto el blanco como las muestras 5 minutos en la oscuridad y seguidamente se procedió a leer en el fluorómetro. Primero se leyó el blanco ya que esa lectura estableció el rango mínimo detectable. Para luego colocar dentro del equipo cada vial y obtener la cantidad de material genético en cada muestra.

3.6. Hibridación del microarreglo

Como parte del proyecto “Diseño y construcción de una herramienta prototipo basada en tecnología de ADN de detección de agentes de riesgos para la salud en muestras ambientales y de alimentos”, se diseñó un microchip de la plataforma Affymetrix que detecta en el aire, el agua o el suelo, 270 microorganismos capaces de producir enfermedades en zonas tropicales, específicamente en la Península de Yucatán (Anexo 1).



Figura 4. Microarreglo

El ADN metagenómico de cada uno de cada una de las muestras de la planta de tratamiento, se hibridó de manera independiente en el microarreglo fabricado por la

empresa Affimetrix (Figura 4), aquellos agentes etológicos presentes en la muestra fueron detectados (Figura 5).

El protocolo otorgado por la empresa toma en cuenta los siguientes pasos (Anexo 2).

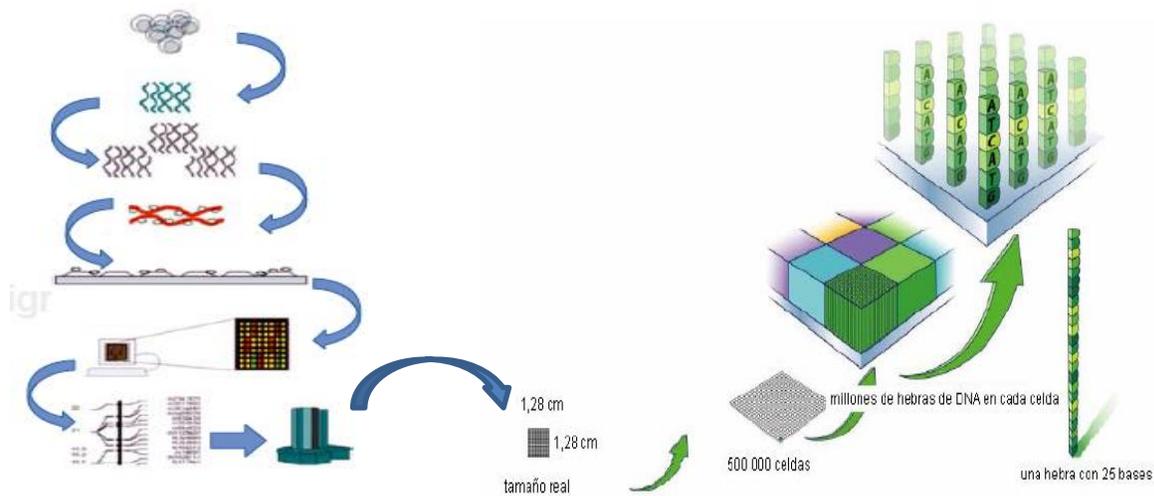


Figura 5. Esquema de hibridación (Medina-Torres, *et al.* 2009).

El análisis de los archivos que genera el lector del arreglo se realizó utilizando los programas incluidos en el paquete Bioconductor sobre la base operativa de R by CRAN (R Core Team, 2017), las librerías utilizadas fueron Makecdfenv la cual se utilizó para construir el ambiente de trabajo a partir del archivo tipo CDF. A cada uno de los arreglos de este trabajo, se le restó en este algoritmo los valores lumínicos que generó un microarreglo control hibridado sin ADN. Como control negativo. Adicionalmente por convención se le restó todos aquellos valores por debajo del 30% de intensidad luminosa para evitar falsos positivos.

3.7. Validación del microarreglo

Se realizó como parte del procedimiento a seguir, la validación del microarreglo Yucateco. Se organizó un equipo de trabajo compuesto por Médicos, Biólogos, Químicos, profesionistas en las ciencias de la salud, y de la computación, los cuales generaron una base de datos con las enfermedades que pueden ser transmitidas por agua, aire, o alimentos mal manejados. Posteriormente se generó una segunda base de datos con las secuencias candidatas a ser inmovilizadas en el arreglo, ya reportadas en la literatura, y en bases de datos, dichas sondas son especie específicas para identificar cada uno de los agentes etiológicos. Además de otros microorganismos que pueden ser informativos en estudios de genómica ambiental, como genes de resistencia a antibióticos, y una lista de especies de florecimientos algales nocivos (marea roja). Después se realizó una validación *in silico* por la empresa Affymetrix. El cual cuenta con 38,000 sondas, y puede detectar 270 agentes etiológicos, en los que se encuentran, bacterias, virus, hongos, protozoarios, dinoflagelados y nematodos.

El siguiente paso fue validar en el laboratorio, lo cual consistió en realiza un blanco positivo con una mezcla con diferentes concentraciones de ADN de patógenos conocidos provenientes de cepas de referencia. Y un blanco negativo que no contenga ADN, solamente agua estéril.

3.8. Caracterización fisicoquímica

Las muestras colectadas fueron sometidas a análisis *ex situ*, para realizar la caracterización fisicoquímica en el laboratorio (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos a caracterizar con el método de determinación y norma correspondiente.

Parámetro	Método de determinación	Norma
pH	Potenciómetro	NMX-AA-008-SCFI-2011
Temperatura	Termómetro	NMX-AA-007-SCFI-2013
Nitrógeno total	Método Kjeldahl	NMX-AA-026-SCFI-2001
Fosforo total	Método ácido vanadomolibdofosfórico	NMX-AA-029-SCFI-2001
Detergentes	SAAM	NMX-AA-039-SCFI-2001
Grasas y aceites	Tierra de diatomeas y hexano	NMX-AA-005-SCFI-2013
DQO	Método de tubo sellado a pequeña escala	NMX-AA-030/2-SCFI-2011
DBO5	Método electrométrico	NOM-AA-28-1981 y NMX-AA-028-SCFI-2001
COT		Sin norma

3.9. Caracterización microbiológica

El determinar el tipo de microorganismos patógenos presentes en el agua y su concentración mediante métodos tradicionales proporciona herramientas para realizar la comparación con los datos obtenidos con los microarreglos de ADN.

La Tabla 2 muestra los análisis microbiológicos tradicionales que se realizaran a las muestras de agua residual doméstica.

Tabla 2. Análisis microbiológicos tradicionales con el método de determinación y norma correspondiente.

Análisis	Método de prueba	Norma
Coliformes totales	Fermentación de tubos múltiples	NMX-AA-042-SCFI-2005
Coliformes fecales		
Coliformes totales <i>Salmonella</i>	Almohadilla (RIDA)	No normado
CT/EC		
Enterococos	Filtro de membrana	APHA 2005
Huevos de helminto	Centrifuga/Precipitación	NMX-AA-113-1999

IV. Resultados y discusión

4.1. Parámetros fisicoquímicos (multiparamétrico) y microbiológicos

Se tomaron *in situ*, parámetros fisicoquímicos con ayuda de un equipo multiparamétrico portátil (Tabla 3), con el objetivo de que los datos obtenidos tengan la menor variación o se modifiquen al tomarse en el laboratorio, además de que son medidas que determinan la calidad.

Tabla 3. Resultados de los parámetros fisicoquímicos *in situ*

Parámetro	Entrada	Reactor	Salida
pH	6.7	6.8	6.8
Conductividad	1.4 ms/cm	1.3 ms/cm	1.3 ms/cm
Oxígeno disuelto	8.2 mg/L	6.2 mg/L	6.3 mg/L
Temperatura	28 °C	27.8 °C	27.5 °C

En lo que se refiere al pH está dentro del rango de 5-9, ya que las muestras se encontraban entre 6.7 y 6.8. Por su parte la conductividad e las muestras estuvo entre 1.3 y 1.4 sc/cm y lo que se establece como normal es de 1-2 sc/cm lo que indica que esta en el rango normal. En lo que se refiere a temperatura y oxígeno disuelto podemos inferir que hay una buena relación entre los valores obtenidos debido a que a temperatura de 28 °C existe una cantidad de 8.2 mg/L de oxígeno disuelto lo que cumple lo establecido.

Los análisis fisicoquímicos ayudaron a caracterizar las muestras de los 3 puntos de muestreo en la planta de tratamiento, para tener una idea los parámetros en momento que se realizó la toma de las muestras (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de la caracterización fisicoquímica

Análisis	Cantidad final
Fosforo	8.32 mg/l
Nitrógeno	46.90 mg/l
DQO	18.96 mg/l
DBO5	6.33 mg/l
COT	8.4 mg/l
Grasas y aceites	7 mg/l
Detergentes	0.49 mg/l

En lo que respecta a los parámetros microbiológicos que se realizaron, establecieron la presencia o ausencia de microorganismos indicadores de contaminación y se relacionaron con los límites establecidos en la norma (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de los análisis microbiológicos

Método	Análisis	Norma o/y límite máximo	Entrada	Reactor	Salida
Número más probable (NMP) Tubos	Coliformes totales	NMX-AA-042-SCFI-2015	220 NMP/100 ml	17 NMP/100 ml	17 NMP/100 ml
	Coliformes fecales (<i>E. coli</i>)	NOM-003-ECOL-1997 y NMX-AA-042-SCFI-2015 240-1000 NML/100 ml	350 NMP/100 ml	17 NMP/100 ml	9 NMP/100 ml
Método de filtro de membrana	Coliformes totales		Incontable	Incontable	Incontable
	Coliformes fecales (<i>E. coli</i>)		Incontable	Incontable	Incontable
	Enterococos Agar bilis escualina		Positivo	Positivo	Positivo
	Enterococos caldo BHI		Negativo	Negativo	Negativo
	Enterococos caldo BHI 65% NaCl		Positivo	Positivo	Negativo
Almohadilla	Enterobacterias		36 UFC/ml	45 UFC/ml	122 UFC/ml
	<i>Salmonella</i>		220 UFC/ml	7 UFC/ml	7 UFC/ml
Por observación microscópica	Huevos de helmintos	NOM-003-ECOL-1997 ≤5 h/l	5 h/l	2 h/l	51 h/l

Se estableció que se cumple con la remoción y los límites establecidos por la norma NOM-003-ECOL-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público. Se pudo establecer que los valores en relación a los coliformes fecales del efluente se encuentran por debajo de los límites máximos establecidos (7 NMP/100 ml de 1000 NMP/100 ml). Por otra parte comparándolo con los parámetros de diseño del efluente de la planta se determinó que está muy por debajo de lo establecido (7 NMP/ 100 ml de 240 NMP/100 100 ml).

También se pudo observar la presencia (220 UFC/ml en afluyente, 7 UFC/ml en el reactor y 7 UFC/ml en efluente) para *Salmonella*. En el caso de los huevos de helminto el efluente no cumple con los límites de la norma (51 h/l de ≤ 5) y se lograron identificar la presencia de helmintos como *Hymenolepis* y *Uncinaria* (Figura 6).

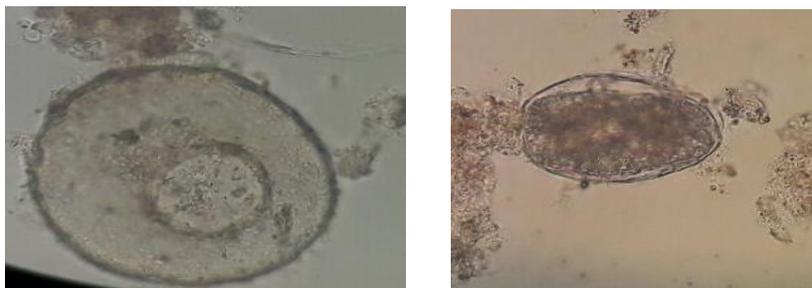


Figura 6. Fotografías de *Hymenolepis* e *Uncinaria* identificados en las muestras.

4.2. Estandarización de la técnica de extracción de ADN metagenómico para agua residual domiciliaria

Para poder realizar el siguiente proyecto de investigación fue necesaria la aplicación de métodos de extracción de ADN metagenómico de las muestras ambientales. Muchas veces es necesario el cultivo, sin embargo, tiene la desventaja de obtener sólo una proporción muy pequeña de la comunidad microbiana total, los microorganismos cultivables, dejando fuera los viales pero no cultivables. Los métodos de extracción de ADN también pueden ayudar a los investigadores a

comprender la aparición de determinados genes bacterianos *in situ* a través de las aplicaciones de la tecnología de ácidos nucleicos. Se han descrito varias técnicas para la detección y extracción directas de ADN de ambientes acuáticos (Somerville et al. 1989).

En el caso de muestras con alto contenido de materia orgánica, como las de suelo, aguas residuales o manglares, los protocolos reportados han sufrido modificaciones que consisten en hacer lavados con soluciones amortiguadoras para eliminar sustancias contaminantes. A pesar de ello, se han utilizado procesos subsecuentes de purificación. En el caso de ambientes típicamente ácidos, ricos en materia orgánica (Jian et al., 2011).

De cada una de las 3 muestras de agua residual, fueron centrifugados de acuerdo a lo establecido en la metodología, ya que es una operación utilizada para la separación de células en caldos biológicos, especialmente si será sometido a un posterior proceso de filtración (Wiesmann y Bider, 1982), como fue el caso de las muestras.

Al realizar el proceso de filtración se obtuvieron un total de 183 filtros provenientes de los 3 puntos de muestreo (Tabla 6). El agua de entrada fue la que obtuvo una mayor cantidad debido a que presentó mayor colmatación fue la muestra de entrada esto puede deberse a que es una mezcla de materiales orgánicos e inorgánicos, suspendidos o disueltos, cuya parte orgánica consiste en residuos alimenticios, heces, materia vegetal, sales minerales y materiales diversos como jabones y detergentes sintéticos (PNUMA-Titicaca, 2011). Este mismo proceso se realizó en el estudio elaborado por (Inoue, *et. al.*2015), donde utilizaron un filtro de 0.22 μm , para retener bacterias en muestras de agua subterránea en Nepal, India. Dicho proceso resulto de igual manera exitoso ya que lograron extraer al resuspender los filtros cantidad suficiente de material metagenómico para hibridar sus microarreglos.

Tabla 6. Numero de filtros obtenidos de las diferentes muestras.

Muestra	Solidos	0.45 μ	0.2 μ	0.025 μ
Entrada	22	21	16	20
Reactor	12	13	12	14
Salida	12	14	12	15

El siguiente paso que se realizó fue la extracción de ADN metagenómico, realizado con el protocolo descrito anteriormente en la Metodología, al que se le realizaron algunas modificaciones (Anexo 2). Sin embargo solo la muestra de entrada no necesito realizar pasos adicionales, como fue el caso del reactor y el efluente (Figura 7).

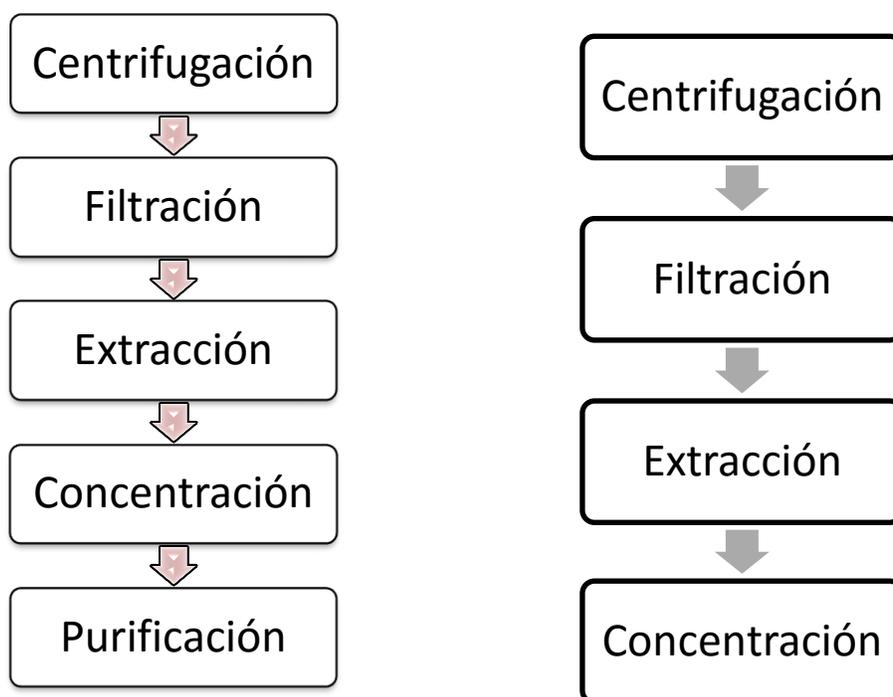


Figura 7. Diagramas de las modificaciones al proceso de extracción en la muestra reactor y salida respectivamente.

La muestra del reactor presentó interferencia en la amplificación por PCR antes de la hibridación, por lo que se tuvo que concentrar el material genético colectado, esto modificando la cantidad de agua estéril que se utilizó para re-suspender la pastilla

en donde se encontraba capturado el material genético (40 μ l en lugar de 60 μ para cada filtro), adicionalmente se le realizó una purificación con la ayuda de un *kit* (DNA clean and concentration de Zymo Research) que permite la remoción de enzimas, dNTPs libres, sales y alcoholes.

Por su parte la muestra del efluente también presentó interferencias pero únicamente necesitó aumentar el número de filtros a los que se les realizaría la extracción y concentrar el material genético colectado.

4.3. Implementación de la técnica de microarreglo

Posterior al proceso de extracción de ADN se procede a establecer la cantidad y estado de dicho material, por lo que se realizaron pruebas de flourometría (Tabla 7) y electroforesis para confirmar la presencia de ADN (Figura 8).

Tabla 7. Cantidad de ADN por muestra

<i>Flourometro</i>	
Entrada	18 ng/ml
Reactor	21 ng/ml
Salida	6.3 ng/ml

Los resultados reflejan una baja cantidad, sin embargo se consideró que era suficiente y esto se reflejó en la hibridación exitosa del microarreglo realizado posteriormente. Otra parte importante fue necesario obtener una imagen digital de la muestra de ADN total para ello se realizó un gel de agarosa 1% para validar la presencia e integridad del ADN metagenómico de cada muestra. El cual fue cargado con un marcador 1Kb DNA Ladder el cual es una combinación única de productos de PCR y plásmidos preparados con los enzimas adecuados de restricción para proporcionar 13 fragmentos que son ideales para usarse como marcador estándar para geles agarosa. El ADN incluye fragmentos 250-10,000 pares base. Las bandas 1K pares base tienen mayor intensidad para ser usadas como puntos de referencia. Se espera que la banda se encuentre por encima del

marcador y sin señales de que degradación, como fue el caso en el presente estudio (Figura 8), lo que confirma que el material extraído y que se usó para hibridar el microarreglo se encontraba en perfecto estado ya que no encontraba degradado.

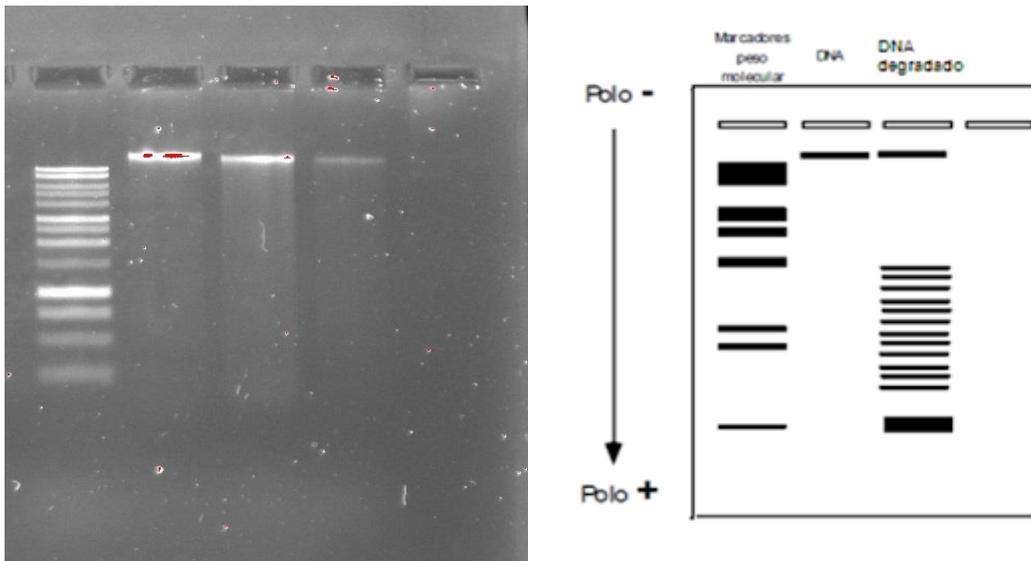


Figura 8. Comparación del gel que confirma la presencia de ADN con un esquema de resultados esperados.

4.4. Hibridación de los microarreglos

Una vez que se ha concluido la hibridación de microarreglos el paso siguiente consistió en obtener una imagen digital que representa las intensidades de expresión de cada uno de los puntos o spots (Figuras 9, 10 y 11). En todas las muestras se logró observar el blanco negativo que la empresa Affimetrix instala como controles de la correcta hibridación este es la leyenda AFFX-Yucateco que se ve en el extremo superior izquierdo de cada microarreglo al ser escaneado.

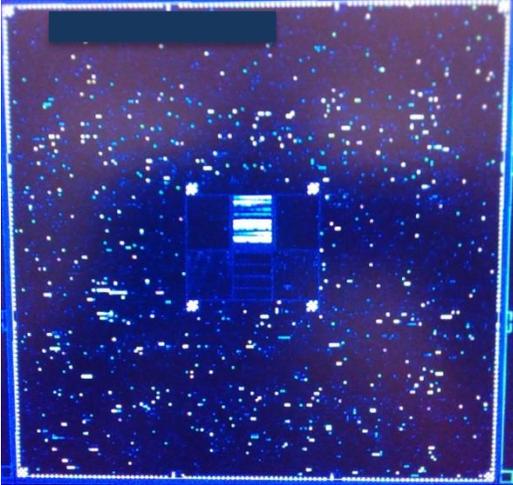


Figura 9. Microarreglo de entrada

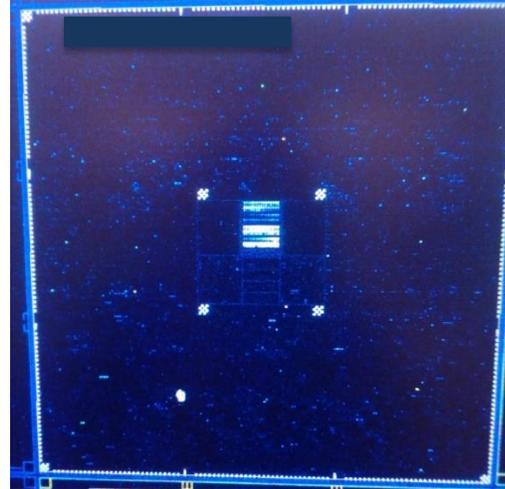


Figura 10. Microarreglo Reactor

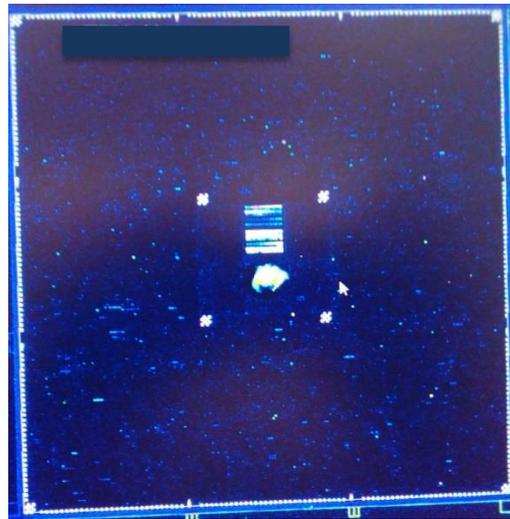


Figura11. Microarreglo salida

Los resultados que se obtuvieron al concluir dicho proceso en los chips que contenían las 3 muestras de agua fue el lograr detectar un total de 45 especies entre las tres muestras, donde el grupo de las bacterias obtuvo una mayor representación con un total de 32 especies.

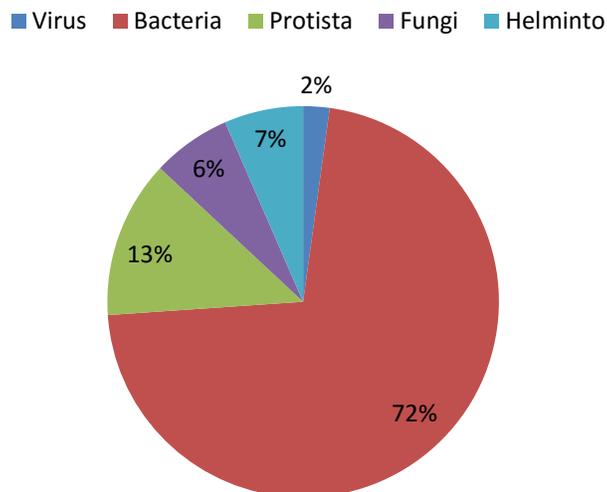


Figura 12. Distribución de las especies entre grupos taxonómicos

La figura 12, nos lustra la composición taxonómica de las 3 muestras en conjunto y establece la dominancia del grupo de las bacterias, lo que era de esperar ya que se ha reportado que los lodos activados están formados por una población heterogénea de microorganismos. Los microorganismos presentes son una variedad de bacterias, hongos, algas, protozoos y rotíferos, que cambian continuamente en función de la diversidad en la composición del agua residual y de las condiciones ambientales.

4.4.1. Microarreglos

Múltiples trabajos han reportado la existencia de varios tipos de formatos de microarreglos que se han diseñado para monitorear bacterias patógenas en alimentos (Sio, et al. 2010), clínicos (Yoo, et al. 2010), y en muestras ambientales (Maynard, et al. 2005); Sin embargo, los patógenos diana en esos arreglos se limitaron a varias decenas de patógenos problemáticos bien conocidos. En el caso específico del microarreglo Yucateco520795F se distingue de entre cualquier otro diseño, ya que es el único que tiene la capacidad de identificar diversos grupos taxonómicos en un solo ensayo, además de que los 270 organismos patógenos han sido reportados en la península de Yucatán.

En el microarreglo de entrada, las especies encontradas pertenecen a 2 grupos taxonómicos (Figura 19), los cuales son las bacterias y virus, en total se identificaron 29 especies (Anexo 3). De dichas especies identificadas positivamente poseen una importancia etiológica debido a que el 70 % afectan directamente al hombre (Figura 13), cuyas infecciones principalmente recaen en los aparatos respiratorio (30 %), urinario (22 %) digestivo (17 %), entre otros (Figura 14).

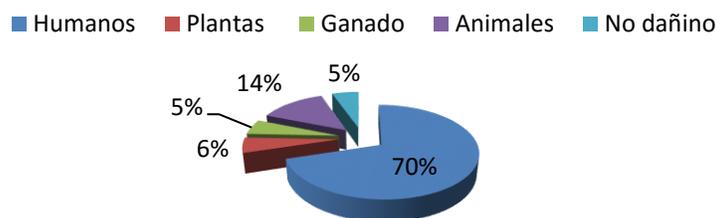


Figura 13. Grupos afectados por agentes etiológicos (afluente).

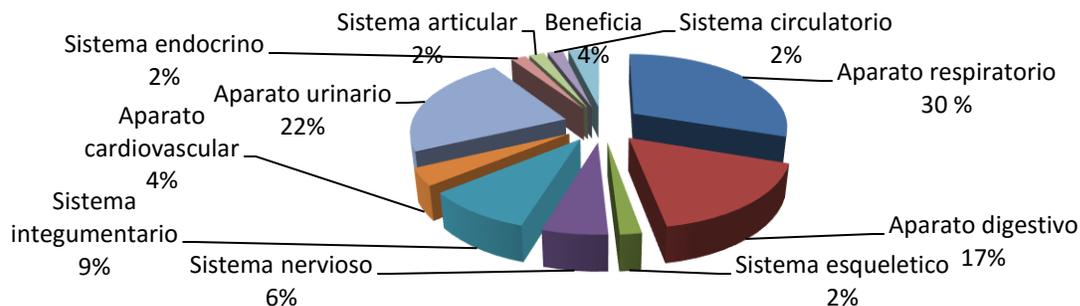


Figura 14. Sistemas y aparatos afectados por agentes etiológicos (afluente).

Por su parte, las especies encontradas en la muestra de reactor pertenecen a 5 grupos taxonómicos, los cuales son las bacterias, protistas, helmintos, hongos y virus (Figura 19), en total se identificaron 33 especies (Anexo 3). Se estableció que el 61 % de los microorganismos afectan directamente al ser humano (Figura 15), siendo los aparatos respiratorio (27%), digestivo (24%) y urinario (20%) los más afectados (Figura 16).

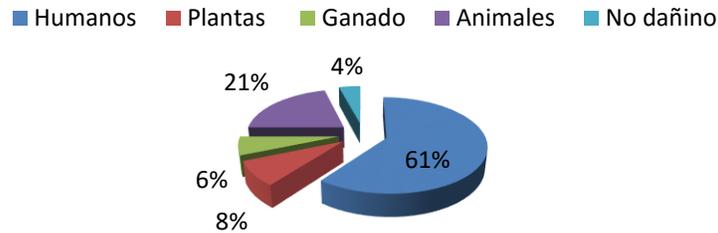


Figura 15. Grupos afectados por agentes etiológicos (reactor)

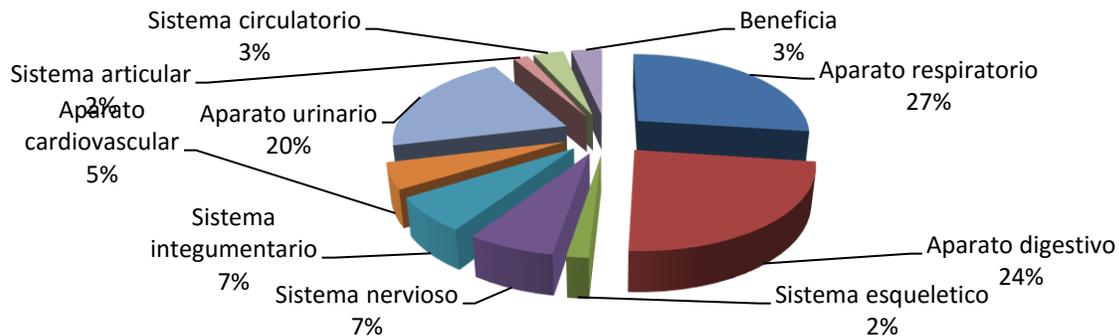


Figura 16. Sistemas y aparatos afectados por agentes etiológicos (reactor)

Las bacterias son las más importantes, responsables de la eliminación de la contaminación, por una parte, y de la formación de flóculos, por otra; encontrándose en todos los tipos de procesos de tratamiento biológico, las bacterias se agrupan en flóculos, en su mayor parte son heterótrofas (es decir, que requieren una fuente externa de materia orgánica); que utilizan la contaminación orgánica como nutrientes y para formar biomasa celular nueva al reproducirse. Otro grupo importante, junto a las bacterias, es el de los protozoos, que no afectan directamente en la contaminación orgánica sino que actúan como depredadores frente a la flora bacteriana.

Los protozoarios y otras formas superiores de vida constituyen el 5 % de la biomasa de los lodos activados y están representados por más de 200 especies. El rango total va de 100 a > 100,000/ml. Los protozoarios predominan, con 500 a varios miles/ml. Estos organismos realizan varias funciones importantes en los lodos activados, la más importante de ellas es la remoción de bacterias no floculantes del

agua residual, a través de sus actividades de alimentación, produciendo así un efluente clarificado (Jenkins, *et al*, 1993).

En la muestra de agua residual del efluente del sistema fueron encontrados 5 grupos taxonómicos (Figura 19), los cuales son las bacterias, hongos, helmintos, protistas y virus, en total se identificaron 39 especies (Anexo 3). La razón podría ser la homogeneidad de las muestras ya que del reactor únicamente pasa a un sedimentador y de ahí el sobrenadante es eliminado como el efluente. Lo que nos indica que la presencia de estos microorganismos es debido a la falta del tratamiento de desinfección. Lo que se refleja en la gran cantidad de enfermedades que producen. La figura 17 ilustra a los grupos que se ven directamente afectados, donde el humano es el mayor afectado con un 61% produciendo las mayoría de las infecciones (Figura 18), en los aparatos respiratorio (27%), digestivo (24%) y urinario (18%).

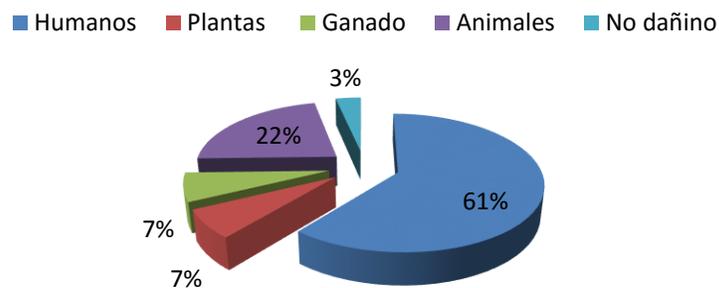


Figura 17. Grupos afectados por agentes etológicos (efluente)

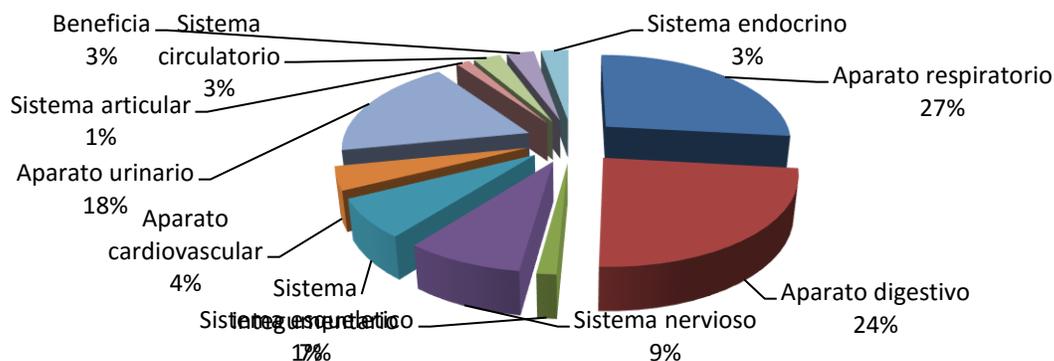


Figura 18. Sistemas y aparatos afectados por agentes etológicos (efluente)

En el microarreglo no solo hay sondas de agentes etiológicos, también se encuentran segmentos de especies de interés biotecnológico, en este estudio resaltó la presencia de dos especies de bacterias *Deinococcus radiodurans* y *Rhodobacter sphaeroides*. La primera se utiliza en la biorremediación de disolventes y metales pesados, la segunda tiene la capacidad de fijar nitrógeno.

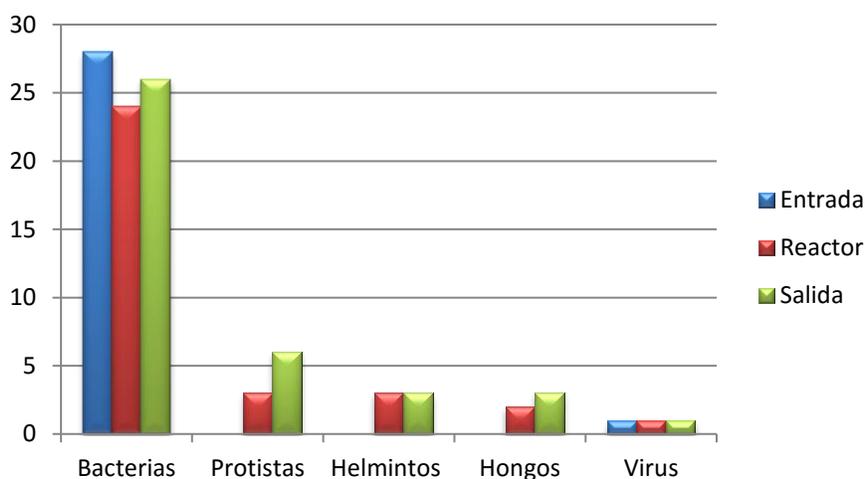


Figura 19. Grafica de la distribución de los grupos taxonómicos entre las 3 muestras.

4.5. Comparación de patógenos en la entrada, reactor y salida del proceso de tratamiento

Es una prioridad establecer las diferencias entre la diversidad de las comunidades de patógenos encontrados en cada uno de las muestras de agua. Es las tablas (8, 9, 10, 11 y 12). Se describen la comparación de registros y se relaciona su presencia con las enfermedades que producen.

Por otra parte, sobresale la diferencia que existe en la muestra de entrada que tiene una composición diferente comparándolo con reactor y salida que son muy similares, lo que se puede deber es que en el sistema de lodos activados se concentra una mayor diversidad de microorganismos que posteriormente pasan a un sedimentador que muchas veces se re-suspende y va hacia el efluente, que al

no tener un proceso de desinfección no elimina patógenos sensibles a dicho proceso.

Tabla 8. Especies detectadas de patógenos pertenecientes a los bacterias

Agente etiológico	Entrada	Reactor	Salida	Síntomas y enfermedades
<i>Aeromonas hydrophila</i>	✓	✓	✓	Infecciones respiratorias, gastrointestinales y cutáneas.
<i>Aeromonas caviae</i>	✓	✓	✓	Gastroenteritis e infecciones de heridas
<i>Burkholderia cepacia</i>			✓	Neumonía
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	✓	✓	✓	Melioidosis
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	✓	✓	✓	Infecciones en el tracto urinario, digestivo y respiratorio
<i>Raoultella planticola</i>		✓	✓	Infecciones en las vías urinarias y gastroenteritis
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	✓	✓	✓	Infecciones en vías respiratorias, urinarias y heridas
<i>Yersinia enterocolitica</i>			✓	Gastroenteritis, vómitos, diarreas.
<i>Clostridium perfringens</i>	✓			Dolor abdominal, vómitos diarreas
<i>Bordetella pertussis</i>		✓	✓	Tosferina
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	✓			Neumonía
<i>Legionella pneumophila</i>	✓	✓	✓	Legionelosis
<i>Enterococcus faecalis</i>	✓	✓	✓	Endocarditis, infección en las vías urinarias
<i>Ehrlichia canis</i>	✓	✓	✓	Fiebre, anorexia, adenomegalias
<i>Ehrlichia spp.</i>		✓	✓	Fiebre maculosa de las montañas rocosas y tífus.
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>		✓	✓	No afecta
<i>Deinococcus radiodurans</i>	✓	✓	✓	No afecta
<i>Enterobacter cloacae</i>	✓	✓	✓	Infecciones urinarias, bacteremia
<i>Proteus mirabilis</i>	✓	✓	✓	Infecciones en la vías urinarias
<i>Nocardia asteroides</i>	✓	✓	✓	Infecciones respiratorias y gastrointestinales
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	✓			Infecciones respiratorias y gastrointestinales
<i>Mycobacterium xenopi</i>	✓			Tos, fiebre, pérdida de peso
<i>Clostridium botulinum</i>	✓			Vómitos, cólicos, náuseas
<i>Cedecea lapagei</i>	✓	✓	✓	Neumonía e infecciones urinarias
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	✓	✓	✓	Fiebre, escalofríos
<i>Ewingella americana</i>	✓	✓	✓	Peritonitis y conjuntivitis
<i>Mannheimia haemolytica</i>	✓			Infecciones respiratorias
<i>Kocuria rosea</i>	✓	✓	✓	Fiebre, disnea
<i>Alcaligenes sp.</i>	✓	✓	✓	Infecciones respiratorias
<i>Haemophilus influenzae</i>	✓	✓	✓	Meningitis, neumonía
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	✓			Infección en pulmones, huesos, articulaciones.
<i>Coxiella burnetii</i>	✓	✓	✓	Cefaleas, escalofríos e infecciones respiratorias
<i>Coxiella endosymbiont</i>	✓	✓	✓	Fiebre e infecciones respiratorias

Se pudo confirmar en las 3 muestras la presencia de dos especies pertenecientes a géneros incluido dentro de los coliformes, como es el caso de *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae*, lo que ratifica lo hallado en los análisis microbiológicos de establecimiento de presencia de coliformes.

Tabla 9. Especies detectadas de patógenos pertenecientes a los protistas

Patógeno	Entrada	Reactor	Salida	Síntomas y enfermedades
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>			✓	Infecciones cutáneas y nasofaríngeas y queratitis
<i>Giardia intestinalis</i>		✓	✓	Giardiasis, diarreas
<i>Cystoisospora belli</i>			✓	Diarrea y pérdida de peso
<i>Trypanosoma cruzi</i>		✓	✓	Fiebre, malestar general y ojo hinchado
<i>Alexandrium tamarense</i>		✓	✓	Intoxicación por moluscos
<i>Alexandrium catenella</i>			✓	Intoxicación

Tabla 10. Especies detectadas de patógenos pertenecientes a los helmintos

Patógeno	Entrada	Reactor	Salida	Síntomas y enfermedades
<i>Taenia lynciscapreoli</i>		✓	✓	Nauseas, pérdida de apetito, dolor de cabeza
<i>Fasciola gigantica</i>		✓	✓	Dolor abdominal, náuseas, vómito
<i>Fasciola hepática</i>		✓	✓	Dolor abdominal, náuseas, vómito y diarrea.

Tabla 11. Especies detectadas de patógenos pertenecientes a los hongos

Patógeno	Entrada	Reactor	Salida	Síntomas y enfermedades
<i>Penicillium digitatum</i>			✓	Intoxicación
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>			✓	Infección pulmonar y úlceras en nariz, boca y tracto gastrointestinal
<i>Talaromyces variabilis</i>		✓	✓	Infecciones en piel y vías respiratorias

Tabla 12. Especies detectadas de patógenos pertenecientes a los virus

Patógeno	Entrada	Reactor	Salida	Síntomas y enfermedades
<i>Rubella virus</i>	✓	✓	✓	Erupción en la piel, inflamación en las glándulas, fiebre

En un estudio previo realizado por Lee, et al. (2008) en dos plantas de aguas residuales, lograron detectar bacterias patógenas, demostrando la efectividad del microarreglo de ADN como herramienta de alto rendimiento. Entre las especies identificadas para sus 2 sitios de estudio se encuentran *A. hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *C. perfringens*, *E. faecalis*, *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Salmonella spp.*, y *Y. enterocolítica*. Comparando nuestros resultados podemos observar que especies como *A. hydrophila*, *C. perfringens*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *Y. enterocolítica* y *P. aeruginosa*, también estuvieron presentes en 3 las muestras de agua residual, exceptuando a *C. perfringens*, que solo se detectó en la muestra de afluente y a *Y. enterocolítica* en el efluente, lo que sugiere que estos grupos bacterianos están comúnmente presentes en aguas residuales.

En ese mismo trabajo se mencionó a las algunas de las especies de bacterias que se encontraban por debajo del límite de detección de su microarreglo, pero que sin embargo son parte de la comunidad típica de un agua residual estas son *B. cepacia*, *Helicobacter pylori*, *L. pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Vibrio spp.* En este estudio también se identificaron especies por debajo del límite de detección algunas solamente en reactor y salida como *B. cereus*, *C. jejuni*, *Salmonella spp.*, *Vibrio cholerae*, *H. pylori* y *M. tuberculosis* y únicamente para las tres estuvieron los registros de *E. coli*.

En el caso de las especies *B. cepacia* y *L. pneumophila* el microarreglo Yucateco las determino como presentes para las 3 muestras d agua residual por el contrario en el trabajo de Lee, et. al. (2008) estuvieron por debajo del límite de detección. Lo que reafirma que a pesar de algunas diferencias en presencia o ausencia y los límites mínimos de detección algunas especies bacterianas son típicas de las aguas residuales por lo que se esperarías encontrarlas, aún por debajo de dichos límites.

La identificación de *E. coli* y *Salmonella spp.* Aunque estén por debajo de los límites, es congruente con los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos tradicionales ya que en ellos se reportó su presencia en las todas las muestras.

Entonces debido a la generación de información que se obtiene, los análisis de microarreglos de ADN son una herramienta prometedora para los estudios de monitoreo microbiano. Otros autores consideran que este método permite la detección simultánea y específica de múltiples genes en un único ensayo (Lu, et al. 2012). Y en los últimos años, los microarreglos de ADN se han aplicado con éxito al análisis de la diversidad microbiana, la composición y las funciones y sus variaciones en el medio ambiente.

V. CONCLUSIONES

El desarrollo de estudios de monitoreo de agentes etiologicos en el agua residual tratada proporciona evidencia oportuna y confiable sobre la presencia de contaminantes biológicos que se encuentren en los sitios de inyección o en el acuífero. De esta manera no solo se conoce la calidad microbiológica del agua tratada sino también los agentes etiológicos presentes y de esta forma obtener información asociada con el brote de diversas enfermedades que generan estos organismos en el estado, ya sea por contacto directo o indirecto de las aguas residuales tratadas.

El proceso de implementación de esta nueva tecnología fue exitoso, el microarreglo logro detectar la presencia de 45 patógenos en las 3 muestras, incluyendo la muestra con menor cantidad de material genético como fue el caso del agua de salida. Se trata de una aportación importante dado que no existe en el país un dispositivo parecido. Esto invita a utilizarlo en otros ámbitos de interés, ya sea ecológico o en salud como ambientes hospitalarios, e invita a seguir usándolo en los procesos de tratamientos de agua.

Se estableció la importancia de filtrar el agua antes de realizar el proceso de extracción ya que de esta forma se aseguró la mayor retención de microorganismo y de esa forma la obtención de material genético en cantidad y calidad.

Se observó que la muestra más compleja y que presentó mayor dificultad para la estandarización de la metodología de extracción del ADN metagenómico fue la del reactor debido a la gran cantidad de materia orgánica que contenía.

La metodología resulto ser eficiente para la detección de los diversos grupos de organismos en el reactor y el efluente, ya que se logró identificar especies pertenecientes a los 5 diferentes taxones que se incluyen en el microarreglo.

También se estableció la similitud entre la muestra de salida y la del reactor, debido a que las especies encontradas en cada una de ellas coincidían, lo que podría indicar el agua de la muestra de salida únicamente pasa por un sedimentador y no es sometido a un proceso de desinfección, lo que evita una reducción en los agentes etiológicos presentes en la última muestra. Por su parte en la muestra del afluente solo se logró identificar bacterias y un virus, lo que la hace la muestra con más diferencia en composición.

Algunas de las especies identificadas pertenecen al grupo de las Enterobacterias las cuales tienen una importancia desde el punto de vista clínico como *Klebsiella pneumoniae* que afecta a diferentes sistemas y órganos del cuerpo y que estuvo presente en las 3 muestras, como también es el caso de *Ewingella americana* y *Enterobacter cloacae*.

Por otra parte la cantidad de información que se genera y el grado de sensibilidad de la técnica ahorra mucho tiempo comparandola con los análisis que se realizan de manera tradicional, pues estos ultimos necesitan de años de trabajo a diferencia del microarreglo en el cual todo el proceso se puede realizar en unos cuantos días.

Este tipo de tecnología hace reflexionar sobre el peso que tienen las actuales normas oficiales mexicanas (NOM-001-ECOL-1996 NOM-003-ECOL-1997 y NOM-014-CONAGUA-2003), referentes al diagnóstico de la calidad del agua tratada, ya que ante el avance de la ciencia en lo referente a métodos de detección de contaminantes ya resultan ser obsoletas e insuficientes.

V. BIBLIOGRAFÍA

Aguado M. (2007). Microarrays de ADN en microbiología. "Revista complutense de ciencias veterinarias". 1,125-134.

Alcocer J., Lugo A., Sánchez M. y Sánchez M. (1999). Bacterioplankton from cenotes and anchialine caves of Quintana Roo, Yucatán Península, México. "Revista de biología tropical" 47(1), 19-25

Bonadonna L. Briancesco R. Ottaviani M. y Veschetti E. (2002). Ocurrence of Cryptosporidium oocysts in sewage effluents and correlation with microbial, chemical and physical water variables. "Environmental Monitoring and Assessment". 75, 241-252.

Borrego J., Moriño M., De Vicente A., Córna R. y Romero P. (1987). Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. Its relationship with indicator and pathogenic microorganisms. "Water Research". 21, 1473-1480.

Brinkman N., Francisco R., Nichols T., D. Robinson, Schaefer III F., Schaudies R. y Villegas E. (2012). Detection of multiple waterborne pathogens using microsequencing arrays. "Journal Applied Microbiology". 114, 564-573.

Call R., Borucki M. y Loge F. (2003). Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. "Journal of microbiological methods. 53, 235-243".

Cobos V., Barrientos R., Navarro J. y Réndon-Von Osten J. 2014. Plaguicidas organoclorados: contaminantes persistentes en cenotes de Yucatán. "Revista Bioagrociencias" 7, 24-27.

- CONAGUA y SEMARNAT. (2015). Estadísticas del Agua en México. México, D.F.
- Fernández A., García C., Saéz J. y Valdezate S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica. EIMC. España.
- CONEVAL. (2012). Evaluación de consistencia y resultados 2011-2012. "Programa de tratamiento de aguas residuales. Semarnat". México D.F.
- Core Team. (2017). R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Craun G., Berger P. y Calderón, R. (1997). Coliform bacteria and waterborne disease outbreaks. "J. Am. Water Works Ass". 89, 96-104.
- CYTED. (1996). Agua potable para las comunidades rurales, reúso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas. Ciencia y tecnología para el Desarrollo, Programa Iberoamericano de Cooperación Científico-tecnológica multilateral, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Foley S. y Grant K. (2005). Molecular techniques of detection and discrimination of foodborne pathogens and their toxins. En: Simjee S. Foodborne diseases. Totowa, NJ: Humana Press. p. 485-510.
- Girones R., Ferrus M., Alonso J., Rodríguez-Manzano J., Calgua B., Correa Ade A., Hundesa A., Carratala A. y Bofill-Mas S. (2010). Molecular detection of pathogens in water—The pros and cons of molecular techniques." Water Res." 44, 4325-4339.
- González-de la Cruz J., Delfin-González H., De la Cruz-Leyva M., Rojas-Herrera R. y Avelaar A. (1993). Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment. "ASM News". 59, 612-619.

Informe preventivo, Halcón internacional de proyectos ecológicos S.A. de C.V. (2006). Construcción y operación de la planta de tratamiento de aguas residuales domésticas para el fraccionamiento Pensiones II, Mérida, Yucatán.

Inoue D., Hinoura T., Suzuki N., Pang J., Malla R., Shrestha S., Chapagain S., Matsuzawa H., Nakamura T., Tanaka Y., Ike M., Nishida K. y Sei K. (2015). High-Throughput DNA Microarray Detection of Pathogenic Bacteria in Shallow Well Groundwater in the Kathmandu Valley, Nepal. "Current Microbiology". 70,43–50

Jenkins D., Richard M. y Daigger G. (1993) Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming, 2nd. Edition, Lewis publishers. U.S.A.

Jian, Y., Wu, J., Yu, K., Ai, C., Zou, F. y Zhou, H. (2011) "J. of Biosci and Bioeng". 111 (2) 153-157.

Jiménez C. (2001) La contaminación ambiental en México, causas efectos y tecnología apropiada. Editorial Limusa, México.

Kelly J. (2007). Assessment of soil microbial communities in surface applied mixtures of Illinois River sediments and biosolids, "Applied Soil Ecology", vol. 35, no. 2-3, pp. 176-183.

Lee D., Shannon K., Beaudette L. (2006). Detection of bacterial pathogens oligonucleotide microarray in municipal wastewater using an ind real-time quantitative PCR. "J Microbiol Methods". 65(3):453–67.

López M. Mallorquín P. y Vega M. (2002). Microarrays y Biochips de ADN. Informe de vigilancia tecnológica. Genoma España y Universidad Autónoma de Madrid. España.

Medina-Torres E. y Espinosa-Rosales F. (2009). Microarreglos: tecnología con aplicaciones en el campo de la salud humana. "Pediátricas". 13(2), 52-59.

Méndez R., Castillo E., Vázquez E., Briceño O., Coronado V, Pat R. y Garrido P. 2009. Estimación del potencial de contaminación de las granjas porcinas y avícolas del estado de Yucatán. "Revista Ingeniería" 13(2),13-21

Nelson K. (2003). Concentrations and inactivation of Ascaris eggs and pathogen indicator organisms in wastewater stabilization pond sludge. "Water Sci Technol". 48,89-95.

Niemczynowicz J. (1997). The water profession and Agenda 21. WQI, March/April 9-11.

NMX-AA-008-SCFI-2011. (2011). Determinación del ph - método de prueba. Diario oficial de la federación. México, D.F.

NMX-AA-007-SCFI-2013. (2013). Análisis de agua – medición de la temperatura en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba. Diario oficial de la federación. México, D.F.

NMX-AA-026-SCFI-2001. (2001). Análisis de agua - determinación de nitrógeno total Kjeldahl en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba. Diario oficial de la federación. México, D.F.

NMX-AA-029-SCFI-2001. (2001). Análisis de aguas - determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba. Diario oficial de la federación. México, D.F.

NMX-AA-039-SCFI-2001. (2001). Análisis de aguas - determinación de sustancias activas al azul de metileno (SAAM) en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas - método de prueba. Diario oficial de la federación. México, D.F.

NMX-AA-005-SCFI-2013. (2013). Análisis de agua – medición de grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – método de prueba .Diario oficial de la federación. México, D.F.

NMX-AA-042-SCFI-2005. (2005). Determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y *escherichia coli* presuntiva. Diario oficial de la federación. México, D.F.

NMX-AA-113-1999. (1999). Análisis de agua - determinación de huevos de helminto - método de prueba. Diario oficial de la federación. México, D.F.

NOM-001-SEMARNAT-1996. (2006). Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en agua y bienes nacionales. Diario oficial de la federación. México, D.F.

NOM-003-SEMARNAT-1997. (1997). Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público. Diario oficial de la federación. México, D.F.

OMS (1989) Health Guidelines for the Use of Wastewater In Agriculture and Aquaculture. Technical Report .Series No. 778. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Pacheco J., Cabrera A., y Pérez R. (2004). Diagnóstico de la calidad del agua subterránea en los sistemas municipales de abastecimiento en el Estado de Yucatán, México. "Ingeniería". 8-2:165-179

Payment P. Franco E. y Sieemiatticki. (1993). Absence of relationship between health due to tap water consumption and drinking water quality parameters. "Water Science and technology". 27, 137-143.

Prasad D. y Sharan A. (2009). DNA based methods used for characterization and detection of food borne bacterial pathogens with special consideration to recent rapid methods. "Afr Journal Biotechnol". 8(9):1768-75

Proyecto de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Proyecto PNUMA-Titicaca. (2011). Estudio de la caracterización de las aguas residuales afluentes al sistema de tratamiento de Puchukollo. La Paz. Bolivia.

Pruss-Ustun A., Kay D., Fewtrell L. y Bartram J. 2004. Comparative quantification of health risks, Global and Regional Burden of disease attributable to selected major risks factors. World health organization. Ed. Unsafe water, sanitation and higiene.

Rojas-Herrera R., Narváez-Zapata J., Zamudio-Maya M. y Mena-Martínez M. (2008). A Simple Silica-based Method for Metagenomic DNA Extraction from Soil and Sediments. "Molecular Biotechnology". 40: 13-17

Somerville C., Knight I., Straube W. y Colwell R. (1989). Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. "Appl. Environ. Microbiol". 55:548-554.

Steiner T., Thielman N. y Guerrant R. (1997). Protozoal agents. What are the dangers for the public water-supply. "Annu. Rev. Med". 48, 329-340.

Vargas C. (2000). Coliformes totales, termotolerantes y Escherichia coli por el método de filtración de membrana (FM), Lima: Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente.

Ward P. y Roy D. (2005). Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. Lait. 85:23-32.

Wiesmann U. y Binder H. (1982). Biomass separation from liquids by sedimentation and centrifugation. "Adv. Biochem. Eng." 24,119-171-

Zamudio-Maya M. (2011). Protocolo para la extracción de ADN metagenómico bacteriano del Langostino *Macrobrachium carcinus* L. "Tropical and Subtropical Agroecosystems". 14, 875-883.

Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente (libro electrónico)
<http://www1.ceit.es/asignaturas/ecologia/Hipertexto/00General/IndiceGral.html>
consultado el 13 de marzo del 2016.

http://www.seduma.yucatan.gob.mx/desarrollo-urbano/documentos/ZonaMetropolitana/2_6_Aguas_Residuales.pdf consultado el 19 de Junio del 2016

<https://allyouneedisbiology.wordpress.com/tag/tamano-microorganismos/>
consultado el 05 de Noviembre del 2016 (Etabo, 2016)

VI. ANEXOS

Anexo 1.- Listado de los microorganismos patógenos que identifica el microarreglo utilizado

Bacterias	<i>Microcystis</i> sp	<i>Haemophilus influenzae</i>	Protozoos	Helmintos
<i>Vibrio Cholerae</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Eustrongylides</i> sp.
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Paratyphi	<i>Francisella tularensis</i>	<i>Balantidium coli</i>	<i>Nanophyetus</i>
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	<i>Shigella</i> spp.	<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	<i>Diphyllobothrium</i> spp.
<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Anisakis</i>
<i>Vibrio furnissi</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>
<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Cystoisospora belli</i>	<i>Dracunculus medinensis</i>
<i>Vibrio splendidus</i>	<i>Rickettsia</i> spp.	<i>Borrelia recurrentis</i>	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Fasciola hepática</i>
<i>Grimontia hollisae</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>Borrelia mazzottii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Fasciola gigantica</i>
<i>Photobacterium damsela</i>	<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Enterobius vermicularis</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Peptococcus</i> sp	<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Cylindrotheca closterium</i>	<i>Taenia saginata</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Vibrio mimicus</i>		<i>Nitzschia longissima</i>	<i>Taenia solium</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Virus	<i>Nitzschia reversa</i>	<i>Ancylostoma</i> sp.
<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	Virus de la hepatitis A	<i>Pseudonitzschia delicatissima</i>	<i>Schistosoma</i> spp.
<i>Aeromonas dhakensis</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	Virus de la hepatitis B	<i>Akashiwo sanguinea</i>	<i>Trichuris trichiura</i>
<i>Aeromonas veronii</i> subsp. Sobria	<i>Enterobacter cloacae</i>	Virus de la hepatitis C	<i>Amphidinium</i> spp	<i>Onchocerca volvulus</i>
<i>Aeromonas schubertii</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Virus de la hepatitis E	<i>Amphidinium carterae</i>	<i>Taenia</i> sp.
<i>Aeromonas jandaei</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Herpes virus</i>	<i>Bysmatrum caponii</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Varicela zoster</i>	<i>Cabra reticulata aremorica</i>	Artropodo
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Burkholderia mallei</i>	<i>Rotavirus (grupos A-C)</i>	<i>Dinophysis caudata</i>	<i>Sarcoptes scabiei</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Pasteurella</i> sp.	<i>Orthoreovirus</i>	<i>Gambierdiscus caribaeus</i>	
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	<i>Adenovirus</i>	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Fungi
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Leptospira kirschneri</i>	<i>Poliovirus</i>	<i>Gonyaulax polygramma</i>	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Leptospira weilii</i>	<i>Coxsackievirus</i>	<i>Heterocapsa circularisquama</i>	<i>Encephalitozoon</i>
<i>Campylobacter laridis</i>	<i>Leptospira santarosai</i>	<i>Astrovirus</i>	<i>Karenia brevis</i>	<i>Nosema</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Leptospira noguchii</i>	<i>Norovirus</i>	<i>Ostreopsis heptagona</i>	<i>Pleistophora</i>
<i>Escherichia coli</i> (ECEH, ECET, ECEP, ECEI, ECEA, ECAD)	<i>Leptospira alexanderi</i>	<i>Sapovirus</i>	<i>Plagiodinium belizeanum</i>	<i>Vittaforma</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Virus de la influenza (Orthomyxoviridae)</i>	<i>Prorocentrum cf concavum</i>	<i>Trachipleistophora</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Viruela (Orthopoxvirus)</i>	<i>Prorocentrum cf foraminosum</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Mycobacterium xenopi</i>	<i>Parvovirus (Erythroparvovirus)</i>	<i>Prorocentrum hoffmanianum</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>Raoultella planticola</i>	<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Polyomavirus</i>	<i>Prorocentrum lima</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Papilomavirus</i>	<i>Prorocentrum mexicanum</i>	<i>Penicillium variabile</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Peptoclostridium difficile</i>	<i>Sarampión (Morbillivirus)</i>	<i>Prorocentrum sculptile</i>	<i>Penicillium digitatum</i>
<i>Tsukamurella</i>	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Rubeola (Rubivirus)</i>	<i>Prorocentrum cf sipadanensis</i>	<i>Alternaria</i> sp.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Trichodesmium erythraeum</i>	<i>Rubulavirus</i>	<i>Prorocentrum spp</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Filovirus</i>	<i>Scripsiella trochoidea</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Cedecea lapagei</i>	<i>Filovirus Marbug</i>	<i>Sinophysis microcephala</i>	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Filovirus Ebola</i>	<i>Togula</i> sp.	<i>Candida krusei</i>
<i>Corynebacterium afermentans</i>	<i>Ewingella americana</i>	<i>Arenavirus – Junin</i>	<i>Alexandrium spp</i>	<i>Candida kefyr</i> (
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	<i>Hantavirus</i>	<i>Pyrodinium bahamense compressum</i>	var. <i>Kluyveromyces marxianus</i>)
<i>Bordetella parapertusis</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>Coronavirus</i>	<i>Gymnodinium catenatum</i>	<i>Candida robusta</i> (
<i>Clostridium tetani</i>	<i>Pasteurella haemolytica</i> (<i>Human Rhinovirus (A y B)</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>)	<i>Human echovirus 30</i>	<i>Heterosigma akashiwo</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Miscellaneous enterics</i>	<i>Kocuria rosea</i>	<i>Chikungunya virus</i>	<i>Dinophysis spp</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Arthrobacter oxydans</i>	<i>Human Parainfluenza virus (type 1, 2, 3, 4)</i>	<i>Alexandrium catenella</i>	<i>Phoma exigua</i> (Boeremia exigua)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Arthrobacter tumbae</i>	<i>Human Parainfluenzavirus type 2</i>	<i>Alexandrium minutum</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
<i>Brucella melitensis</i> biovar Abortus	<i>Agromyces rhizosphaerae</i>	<i>Human Parainfluenza virus type 3</i>	<i>Chaetoceros</i> spp.	<i>Lacazia loboi</i>
<i>Leptospira interrogans</i>	<i>Croceobacterium ilecola</i>	<i>Human Parainfluenzavirus type 4</i>	<i>Dinophysis acuminata</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Apha virus</i>	<i>Pseudonitzschia calliantha</i>	<i>Coccidioides immitis</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Moraxella lacunata</i>	<i>Togavirus(arvovirus)</i>	<i>Pseudonitzschia cuspidata</i>	<i>Coccidioides posadasii</i>
<i>Aphanizomenon</i> sp	<i>Alcaligenes</i>	<i>flavivirus</i>	<i>Pseudonitzschia pungens</i>	<i>Coccidioides immitis</i>
<i>Anabaena</i> sp	<i>Cardiobacterium</i>		<i>Pseudonitzschia calliantha</i>	

Anexo 2.

Protocolo de microarreglos Affymetrix

1. Extracción del DNA

La extracción del DNA en muestras ambientales, incluyendo: sedimento, y agua se lleva a cabo con el método de absorción en sílice de Rojas et al. (2008).

1.1. Protocolo de extracción de ADN

- 1.- Agregar 1 ml de muestra o 1 colocar un filtro dentro de un vial de 2 ml
- 2.- Añadir 1 ml de Buffer Ten y darle agitación con Vortex por un minuto
- 3.- añadir 20 µl de lizosima
- 4.- Incubar a 37°C durante 1 hora, agitando cada 10 minutos por inversión.
- 5.- Incubar durante 10 minutos en baño hielo/alcohol y después 5 minutos en un baño maría a 65°C (repetir este paso 3 veces)
- 6.- Añadir 100 µl de SDS al 20i% (p/v) y agitar en el vortex durante 1 minuto.
- 7.- Incubar a baño maria durante 30 minutos a 30° C
- 8.- Centrifugar a 10,000 xg (rpm) a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 9.- Pasar el sobrenadante a un vial nuevo evitando tomar el material sedimentado y añadir 500 µl de acetato de potasio.
- 10.- Incubar durante 5 minutos a 65°C y luego a baño hielo/alcohol por 20 minutos.
- 11.- Centrifugar por 30 minutos a 12,000 xg (rpm) a 4°C
- 12.-Pasar el sobrenadante a nuevo vial y añadir 200 µl de SiO₂ (óxido de sílice) en 4% (p/v)
- 13.- Agitar por inversión 3 minutos
- 14.-Posteriormente centrifugar 2 minutos a 11,000 xg (rpm) a temperatura ambiente.
- 15.- Lavar la pastilla 2 veces en 1 ml de etanol al 70% (v/v) sin agitar, y centrifugar 2 minutos a 11,000 xg a temperatura ambiente
- 16.- Dejar evaporar el alcohol (10 minutos en estufa)
- 17.- Re-suspender la pastilla con 60 µl de agua destilada estéril (agitar en vortex).
- 18.-Incubar por 5 minutos a 55°C con agitación ocasional
- 19.- Centrifugar por 5 minutos a 10,000 xg a temperatura ambiente

20.- Pasar el sobrenadante a un nuevo vial de 1.5 ml, cuidando de no tomar Sílice.

21.- Guardar el vial en congelación (-20 o -80°C).

2. Amplificación de genoma completo (WGA)

Se realiza utilizando un estuche comercial basado en amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) como –REPLI-g single cell (QIAGEN), o GenomiPhi (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la amplificación se obtienen aproximadamente 40 µg de DNA por reacción.

3. Purificación y cuantificación

3.1 Purificación

Para purificar el DNA se utiliza precipitación con isopropanol, siguiendo el siguiente protocolo (qiagen.com):

- 1) Ajustar la concentración de sales con acetato de sodio a 0.3 M, pH 5.2 concentración final, o acetato de amonio a 2.0-2.5 M concentración final).
- 2) Añadir 0.6-0.7 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente a la solución de DNA y mezclar bien.
- 3) Centrifugar inmediatamente a 10,000 – 15,000 xg 15-30 min a 4 °C.
- 4) Decantar el sobrenadante con cuidado.
- 5) Lavar la pastilla de DNA con 1 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente.
- 6) Centrifugar a 10,000 – 15,000 xg por 5-15 min a 4 °C.
- 7) Decantar el sobrenadante.
- 8) Secar la pastilla por 5-20 min.
- 9) Redisolver el DNA en agua estéril a 55 °C por 1-2 h.

3.2 Cuantificación

La cuantificación se lleva a cabo con fluorómetro, utilizando un reactivo específico para DNA de doble cadena. Se requieren al menos 90 µg de DNA una vez hecha la amplificación y la purificación.

4. Fragmentación

Una vez hecha la amplificación y purificación se lleva a cabo la fragmentación. Si la muestra a procesar será utilizada para el arreglo Yucateco, el cual tiene formato

100, a partir de este paso se emplean los reactivos del estuche SNP 6.0 (P/N 901706). En este arreglo se analizará una mezcla compleja de materiales genéticos por lo que el presente protocolo es una adaptación del ensayo CytoScan. Para la reacción de fragmentación son importantes tres factores: cantidad de DNA, cantidad de enzima, y tiempo de reacción, de manera que podamos obtener un barrido de fragmentos distribuidos entre 20 y 200 bps en un gel de agarosa al 4%.

Cantidad de DNA: Se utilizan 90 μg de DNA obtenidos tras la reacción de WGA y la purificación resuspendidos en 24.5 μL de agua libre de nucleadas (3.673 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

La cantidad se calculó de la siguiente manera:

De acuerdo al protocolo de resecuenciación (Custom-seq) para un arreglo formato 49 se emplean 0.6 μg de producto de PCR para aplicar en el arreglo, mientras que para un formato 100 se aplican 0.4 μg de producto. En el caso del protocolo CytoScan partiendo de 135 μg de DNA se hibrida a un arreglo formato 49. El microarreglo Yucateco tiene un formato 100 (de tamaño más pequeño) por lo que en este caso se requiere hibridar 90 μg de DNA $(0.4 \times 135)/0.6 = 90$.

Cantidad de enzima: De acuerdo al protocolo de CytoScan, la reacción de fragmentación requiere 0.4 U DNAsa I por reacción para 135 μg de DNA, es decir $0.4 \text{ U}/135 \mu\text{g} = 0.00296 \text{ U}/\mu\text{g}$ de DNA. En el caso de las muestras para el arreglo Yucateco en cada reacción se estará fragmentando un promedio de 90 μg de DNA, por lo que se requieren $(0.00296 \text{ U}/\mu\text{g})(90 \mu\text{g}) = 0.2664 \text{ U}$ de enzima. Si consideramos una concentración del reactivo de fragmentación de 2.5 U/ μL , (es necesario revisar la actividad de cada nuevo tubo de reactivo de fragmentación y hacer el cálculo correspondiente) esto nos da: $0.2664 \text{ U}/2.5 = 0.10656 \mu\text{L}$ de enzima por reacción. Dada la dificultad de pipetear este volumen se recomienda preparar un exceso de mezcla maestra de fragmentación, para minimizar el error de pipeteo, y para fines de estandarización se utilizarán 2 μL de enzima para la mezcla maestra.

Entonces, en 2 μL de reactivo de fragmentación tendremos 5 U, es decir, en un volumen total de 125 μL de mezcla de fragmentación habrá una concentración de 0.04 U/ μL . Si agregamos 5.5 μL de esta mezcla de reacción, estamos agregando $(0.04 \text{ U}/\mu\text{L})(5.5 \mu\text{L}) = 0.22 \text{ U}$. Y si tenemos 90 μg de DNA, entonces tenemos que

$0.22 \text{ U}/90 \text{ } \mu\text{g} = 0.00244 \text{ U}/\mu\text{g}$, que es cercano a $0.00266 \text{ U}/\mu\text{g}$ calculado originalmente.

El volumen total de reacción de fragmentación es de 30 uL.

Estos volúmenes se calcularon en base a lo siguiente:

El volumen de hibridación para un formato 100 es 120 a 130 μL . Basándonos en el protocolo de CytoScan la mezcla de hibridación constituye 73% del volumen de reacción y el DNA fragmentado y marcado el restante 27%. Si consideramos 130 μL , esta proporción corresponde a 95 μL de mezcla de hibridación y 35 μL de DNA fragmentado y marcado. A su vez, de los 35 uL totales de la reacción de marcaje, la mezcla de marcaje constituye 27.6%, (9.66 μL), por lo que se requieren 25.34 μL del producto de la reacción de fragmentación. En este caso, la mezcla de fragmentación representa 18.18% del volumen total de reacción (5.5 μL), y el DNA purificado corresponde al 81.82% (24.5 ul), de un volumen total de 30 uL, de los cuales se tomarán 4 μL para un gel de control de calidad.

Tiempo de reacción: 37 °C durante 30 min de acuerdo al protocolo de CytoScan.

Recomendaciones generales:

a) Vórtex:

Reactivos: 3 pulsos de vórtex de 1 s cada uno.

Enzima: 1 pulso rápido, 1 s.

Mezclas maestras: 3 pulsos de vórtex de 1 s cada uno.

Después de mezclar con el vórtex dar un pulso de spin a cada tubo.

b) Cadena fría:

Mantener las enzimas dentro del congelador de -20 °C hasta el momento en que se vayan a usar, al sacar del congelador colocar inmediatamente en un contenedor a -20 °C.

Los reactivos se descongelan a temperatura ambiente y una vez descongelados deben mantenerse en hielo.

Los tubos en los que se preparan y dispensan las mezclas maestras deben ser colocados previamente en hielo.

La centrifuga refrigerada debe estar a una temperatura de 4 °C por lo que debe encenderse 15 a 20 min antes de usar.

Transportar en hielo los tubos a la centrifuga o al termociclador.

4.1 Procedimiento:

- 1) Descongelar a temperatura ambiente, e inmediatamente depositar en hielo, el agua libre de nucleasas, DNA y buffer de fragmentación (10X).
- 2) Marcar dos tubos Eppendorf de 1.5 mL, uno como "Frag MM", y otro como "Dil DNA". Enfriar en hielo los tubos en los que se prepararan la mezcla de fragmentación y el DNA.
- 3) Diluir 90 µg de DNA purificado en 24,5 µl de agua libre de nucleasas, a 4°C (3,67 µg/µl).
- 4) Al buffer de fragmentación dar tres pulsos de vortex de 1 segundo cada uno, y un spin en la minicentrífuga. Depositar en hielo nuevamente.
- 5) Al DNA dar un pulso de spin para bajar el total del volumen y depositar en hielo.
- 6) Adicionar en el tubo marcado como "Frag MM" que permanece en hielo.

Reactivo	µl
Agua	54.24
Buffer de fragmentación (10X)	68.76

7) Sacar el reactivo de fragmentación (enzima) del congelador de -20°C y transportarlo a la mesa de trabajo en un cooler a -20°C. Dar un breve spin, seguido de un pulso de vortex de 1 segundo y otro rápido spin. Regresar el reactivo al cooler (-20°C).

8) El reactivo de fragmentación es viscoso. Pipetear con cuidado 2 µl del reactivo de fragmentación usando una pipeta calibrada. Para evitar acarrear más reactivo del necesario, no sumergir la punta hasta el fondo del tubo, sólo tocar la superficie del líquido. Limpiar el exceso del reactivo del exterior de la punta con el tubo que lo contiene antes de agregarlo a la mezcla. Depositar a la mezcla de fragmentación sin tocarla directamente, usar la pared del tubo de la mezcla. No lavar la punta.

9) Retornar el reactivo de fragmentación al cooler (-20°C) y el tubo "Frag MM" al hielo.

10) Dar tres pulsos de vortex de 1 segundo cada uno, invirtiendo el tubo entre cada pulso, y un rápido spin a la mezcla de fragmentación. Regresar al hielo.

La mezcla de fragmentación tiene la siguiente composición final:

Mezcla de fragmentación	µl
Agua	54.24
Buffer de fragmentación (10X)	68.76
Reactivo de fragmentación (enzima)	2
Total	125

11) Agregar 5.5 µl de mezcla de fragmentación a cada muestra de DNA. Usar una punta nueva para cada adición. Colocar los tubos inmediatamente en hielo. Seguir los mismos cuidados mencionados al momento de pipetear.

12) A cada muestra dar tres pulsos de vortex de 1 segundo y un spin a 1,000 rpm en la centrífuga refrigerada a 4°C. Retornar las muestras al hielo. Transportar en frío hasta el termociclador.

13) Programar el termociclador: 37°C por 35 minutos; 95°C por 15 minutos; 4°C infinito (este programa está guardado como fragm Affy). Es recomendable iniciar el programa de fragmentación previamente, y una vez que el bloque ha alcanzado 37°C, dejar pausado el programa durante la preparación de la reacción de fragmentación. En cuanto los tubos entran al termociclador, se quita la pausa. Con esto logramos un tiempo de incubación preciso, evitando que los tubos pasen más tiempo fuera del hielo mientras el bloque del termociclador alcanza los 37°C.

14) Trasferir los tubos rápidamente al termociclador.

15) Sacar las muestras del termociclador y dar un spin. Regresar al hielo.

16) Extraer 4 µl de cada reacción para correr en gel de agarosa al 4%, usar marcador de 25 bps. Una adecuada reacción de fragmentación dará una distribución de fragmentos entre 20 y 200 bp. Se recomienda correr a 5 V/cm por 45 min o hasta

que se alcance al menos el 75% de la distancia del gel, para una cámara de electroforesis de 16 cm esto equivale a 80 V.

En caso de no continuar con la reacción de marcaje guardar las muestras a -20 °C.

5. Marcaje

En la reacción de marcaje se agregarán nucleótidos marcados con biotina al DNA fragmentado, utilizando una desoxitermialtransferasa (TdT).

- 1) Descongelar el TdT buffer 5X y el reactivo de marcaje de DNA 30mM y una vez descongelados, colocar en hielo.
- 2) Dar tres pulsos de vortex de 1 segundo cada uno y un spin. Retornar al hielo.
- 3) Marcar un tubo Eppendorf de 1.5 mL como "Labl MM" y colocarlo en hielo. Adicionar al tubo "Labl MM", que permanece en el hielo:

Reactivo para <u>1 muestra</u>	µl
TdT Buffer 5X	6.96
Reactivo de marcaje ADN 30mM	0.99

- 4) Sacar la enzima TdT del congelador de -20°C, transportar en cooler a -20°C a la mesa de trabajo.
- 5) Dar un breve spin, seguido de un pulso de vortex y otro rápido spin. Regresar la enzima al cooler (-20°C).
- 6) Adicionar al tubo "Labl MM" 1.74 uL de enzima TdT.
- 7) A la mezcla de marcaje dar tres pulsos de vortex y un spin. La mezcla tiene la siguiente composición por muestra, de acuerdo a la cantidad de muestras a analizar, multiplicar ese número de análisis por las cantidades establecidas para cada reactivo de marcaje por muestra, y adicionar un 20 % de exceso a cada uno por las pérdidas experimentales.

Mezcla de marcaje para <u>1 muestra</u>	µl
TdT Buffer 5X	6.96
Reactivo de marcaje ADN 30mM	0.99
TdT (enzima)	1.74
Total	9.69

- 8) Adicionar 9,69 μ l de la mezcla de marcaje a cada una de las muestras fragmentadas.
- 9) A cada muestra dar tres pulsos de vortex y un spin.
- 10) Ajustar el termociclador con el programa de marcaje: 37°C por 4 horas; 95°C por 15 minutos; 4°C infinito.
- 11) Introducir los tubos al termociclador y dar inicio.
- 12) Sacar las muestras del termociclador. Dar un spin y regresar al hielo.
- 13) Las muestras marcadas se pueden conservar a -20 °C.

6. Hibridación

Los controles de hibridación que se emplearán son los 123, 456, 789, ABC, los cuales se encuentran presentes en el kit de SNP 6.0, y corresponden a secuencias artificiales que no presentan riesgo de hibridación cruzada. Otro motivo para emplear el kit de SNP 6.0 es que los componentes del cocktail de hibridación funcionan mucho mejor con mezclas complejas de DNA, y que tienen mayor contenido de GC.

Recomendaciones:

Precalentar el horno de hibridación a 49 °C una hora antes de su uso.

- 1) Descongelar el Buffer Hyb parte 1, Buffer Hyb parte 2, Buffer Hyb parte 3 y Buffer Hyb parte 4.
- 2) Dar tres pulsos de vortex de 1 segundo cada uno. Depositar en hielo.
- 3) Descongelar el reactivo oligo control 0100.
- 4) Dar tres pulsos de vortex de 1 segundo cada uno y un spin. Introducir en hielo.
- 5) Marcar un tubo Eppendorf (o Falcon, según el volumen final) como "Hyb MM". Adicionar en el orden mencionado en la tabla los reactivos al tubo "Hyb MM", que permanece en el hielo. De acuerdo a la cantidad de muestras a analizar, multiplicar ese número de análisis por las cantidades establecidas para cada reactivo de hibridación por muestra, y adicionar un 20 % de exceso a cada uno por las pérdidas experimentales.

Mezcla de hibridación para <u>1 muestra</u>	µl
Buffer Hyb parte 1	82.5
Buffer Hyb parte 2	7.5
Buffer Hyb parte 3	3.50
Buffer Hyb parte 4	0.50
Reactivo oligo de control 0100	1
Total	95

- 6) A la mezcla dar tres pulsos de vortex de tres segundos cada uno, invirtiendo el tubo entre cada pulso para asegurar una mezcla perfectamente homogénea.
- 7) Adicionar 95 µl de la mezcla de hibridación a cada una de las muestras fragmentadas y marcadas.
- 8) Dar tres pulsos de vortex de un segundo cada uno y un spin.
- 9) Programar el termociclador para hacer la desnaturalización de las muestras: 95°C por 10 minutos; 49°C por 5 minutos; 49°C infinito.
- 10) Introducir los tubos al termociclador y dar inicio. Transcurridos al menos 5 minutos a 49°C, y con los tubos aún en el termociclador, destapar muestra por muestra, y mezclar por pipeteo 5 veces antes de inyectar estas a los arreglos en el septum inferior.
- 11) Previamente, registrar los arreglos en AGCC y prepararlos con una punta P200, para la ventilación, en el septum superior.
- 12) Inyectar la muestra a cada arreglo en el septum inferior sosteniéndolo con la mano en una inclinación de aproximadamente 45 °.
- 13) Poner los Tough Spots de ½" en ambas septas de los arreglos. Si hay líquido en la septa, limpiar el líquido antes de colocar los Tough Spots. Presionar firmemente hasta que se aprecie la forma de la septa a través del Tough Spot. Los arreglos cargados no deben permanecer a temperatura ambiente más de un minuto.

- 14) Colocar los arreglos en el horno precalentado a 49 °C e hibridar durante 16-18 h

Se sugiere hacer una curva de calibración de los tiempos de hibridación para establecer los tiempos en los que se manifiestan tanto los microorganismos que están en mayor (sondas muy brillantes con tiempos elevados) como en menor proporción (sondas poco brillantes con tiempos bajos). Se sugiere iniciar con 18 horas y continuar con 16, 14, 12 y 10.

7. Tinción/Lavado

Una vez llevada a cabo la hibridación los arreglos son muy sensibles a la temperatura, por lo que se recomienda inicializar la estación de fluidos con los amortiguadores de lavado apropiados 30 min antes de completarse el tiempo de hibridación.

- 1) En el programa AGCC Launcher ir a "Fluidics Control". En Fluidics Control seleccionar "List Maintenance Protocols Only", y del Menú desplegable "Protocol" seleccionar el protocolo "PRIME_450". Seleccionar los módulos de la estación de fluidos donde se realizará el protocolo, y dar click en el botón "Copy to Selected Modules".

- 2) Colocar Agua Desionizada, Wash A y Wash B en sus respectivas posiciones de la estación de Fluidos, y colocar las mangueras correspondientes dentro de cada botella.

- 3) En Fluidics Control dar click en el botón "Run All". Seguir las instrucciones en las pantallas LCD de los módulos de la Estación de Fluidos.

- 4) Preparar en tubos Ependorff de 1.5mL, de distintos colores:

800 ul de Array Holding Buffer (tubo azul) (Posición 3 en la Estación de Fluidos)

500 ul de Stain Buffer 2 (tubo transparente) (Posición 2 en la Estación de Fluidos)

500 ul de Stain Buffer 1 (tubo ámbar) (Posición 1 en la Estación de Fluidos)

5) Una vez concluido el protocolo PRIME_450, en “Step 1” de Fluidics Control seleccionar el tipo de arreglo del menú desplegable “Probe Array Type”. En “Step 2” dar click en “List Custom Protocols Only” y del menú desplegable “Protocol” seleccionar el protocolo “Flex450_002_ForSNP6”. Seleccionar los módulos de la estación de fluidos donde se realizará el protocolo, y dar click en el botón “Copy to Selected Modules”.

- 6) Iniciar el protocolo presionando el botón “Run” y seguir instrucciones en la pantalla LCD de la estación de fluidos.
- 7) Abrir el bloque de lavado (donde se colocará el arreglo) en la estación de fluidos y dejarlo abierto, levantar las palancas de las agujas y colocar los reactivos Stain 1, Stain 2 y Array holding buffer en sus posiciones respectivas en la estación de fluidos.
- 8) Sacar el microarreglo del horno, verificar que no hay formación de sales, quitar ambos Tough Spots. Insertar una punta P200 en el septum superior y extraer la muestra por el septum inferior, guardarla a -20°C por si se necesita rehibridarla.
- 9) Colocar el arreglo viendo hacia el frente dentro del bloque de lavado. Al cerrar el bloque de lavado y bajar las palancas de las agujas se iniciará el protocolo automáticamente.
- 10) Una vez concluido el protocolo de lavado y tinción retirar el arreglo de la estación de fluidos, verificar que no tenga burbujas, en caso de tener burbujas colocar nuevamente en la estación de fluidos y seguir las instrucciones.
- 11) Cubrir las septas del arreglo con Tough Spots de 3/8”. Limpiar la ventana de cristal del arreglo con un paño KimWipe para asegurarse de que no haya manchas ni polvo.

8. Escaneo

14) Encender el escáner presionando el botón que se encuentra al frente del mismo.

El escáner tarda aproximadamente 10 minutos en calentarse, una vez que esté listo se encenderá una luz verde.

15) Desde Affymetrix Launcher, abrir "Scan Control". Dar click en el botón "Start". En la ventana de diálogo, escribir el código de barras del arreglo o seleccionar el nombre de la muestra del menú desplegable. Dar click en el botón "Start/Load". Esperar a que se abra la compuerta en la parte superior del Scanner, y colocar el arreglo en la posición correcta (con el cristal mirando hacia la parte trasera del scanner). Dar click en el botón "Start".

Una vez terminado el escaneo, revisar los archivos .DAT, .CEL, y .JPG.

Exportar el archivo .CEL para análisis subsecuentes.

Antes de apagar la estación de fluidos llevar a cabo 3 protocolos "Shutdown" con agua desionizada, y uno más con aire.

Anexo 3

Patógenos presentes en microarreglo de entrada		
Especie	Registros	Filo
<i>Mycobacterium xenopi</i>	1	Bacteria
<i>Clostridium botulinum</i>	1	Bacteria
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	1	Bacteria
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1	Bacteria
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	1	Bacteria
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	Bacteria
<i>Rubella virus</i>	1	Virus
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	Bacteria
<i>Deinococcus radiodurans</i>	1	Bacteria
<i>Ewingella americana</i>	1	Bacteria
<i>Kocuria rosea</i>	1	Bacteria
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	Bacteria
<i>Proteus mirabilis</i>	1	Bacteria
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	Bacteria
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	Bacteria
<i>Coxiella burnetii</i>	1	Bacteria
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1	Bacteria
<i>Legionella pneumophila</i>	1	Bacteria
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	Bacteria
<i>Nocardia asteroides</i>	1	Bacteria
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	Bacteria
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1	Bacteria
<i>Ehrlichia canis</i>	1	Bacteria
<i>Cedecea lapagei</i>	1	Bacteria
<i>Aeromonas caviae</i>	1	Bacteria
<i>Clostridium perfringens</i>	1	Bacteria
<i>Alcaligenes sp.</i>	1	Bacteria
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	Bacteria
<i>Coxiella endosymbiont</i>	1	Bacteria

Patógenos presentes en microarreglo Reactor		
ESPECIES	Registros	Filo
<i>Trypanosoma cruzi</i>	2	Protista
<i>Ehrlichia sp.</i>	2	Bacteria
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	1	Bacteria
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	1	Bacteria
<i>Rubella virus</i>	1	Virus
<i>Deinococcus radiodurans</i>	1	Bacteria

<i>Ewingella americana</i>	1	Bacteria
<i>Kocuria rosea</i>	1	Bacteria
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	Bacteria
<i>Proteus mirabilis</i>	1	Bacteria
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	Bacteria
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	Bacteria
<i>Bordetella pertussis</i>	2	Bacteria
<i>Taenia lynciscapreoli</i>	1	Platelminto
<i>Alexandrium tamarense</i>	1	Protista
<i>Coxiella burnetii</i>	1	Bacteria
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1	Bacteria
<i>Raoultella planticola</i>	1	Bacteria
<i>Legionella pneumophila</i>	1	Bacteria
<i>Nocardia asteroides</i>	1	Bacteria
<i>Fasciola hepatica</i>	1	Platelminto
<i>Ehrlichia canis</i>	1	Bacteria
<i>Fasciola gigantica</i>	1	Platelminto
<i>Cedecea lapagei</i>	1	Bacteria
<i>Penicillium digitatum</i>	1	Fungi
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	Bacteria
<i>Aeromonas caviae</i>	1	Bacteria
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	Bacteria
<i>Giardia intestinalis</i>	1	Protista
<i>Alcaligenes sp.</i>	1	Bacteria
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	Bacteria
<i>Talaromyces variabilis</i>	1	Fungi
<i>Coxiella endosymbiont</i>	1	Bacteria

Patógenos presentes en microarreglo Salida		
ESPECIES	Registros	FILO
<i>Trypanosoma cruzi</i>	2	Protista
<i>Nocardia asteroides</i>	2	Bacteria
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	1	Protista
<i>Ehrlichia sp.</i>	1	Bacteria
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	2	Bacteria
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	1	Bacteria
<i>Rubella virus</i>	1	Virus
<i>Deinococcus radiodurans</i>	1	Bacteria

<i>Ewingella americana</i>	1	Bacteria
<i>Kocuria rosea</i>	1	Bacteria
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	Bacteria
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	Bacteria
<i>Proteus mirabilis</i>	1	Bacteria
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	Bacteria
<i>Alexandrium catenella</i>	1	Protista
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	Bacteria
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	Bacteria
<i>Bordetella pertussis</i>	2	Bacteria
<i>Taenia lynciscapreoli</i>	1	Platelminto
<i>Alexandrium tamarense</i>	1	Protista
<i>Cystoisospora belli</i>	1	Protista
<i>Coxiella burnetii</i>	1	Bacteria
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1	Bacteria
<i>Raoultella planticola</i>	1	Bacteria
<i>Legionella pneumophila</i>	1	Bacteria
<i>Fasciola hepatica</i>	1	Platelminto
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	1	Fungi
<i>Penicillium digitatum</i>	2	Fungi
<i>Ehrlichia canis</i>	1	Bacteria
<i>Fasciola gigantica</i>	1	Platelminto
<i>Cedecea lapagei</i>	1	Bacteria
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	Bacteria
<i>Aeromonas caviae</i>	1	Bacteria
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	Bacteria
<i>Giardia intestinalis</i>	1	Protista
<i>Alcaligenes sp.</i>	1	Bacteria
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	Bacteria
<i>Talaromyces variabilis</i>	1	Fungi
<i>Coxiella endosymbiont</i>	1	Bacteria