

ESTUDIO DE BIOSISTEMAS INVOLUCRADOS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMETANO

Felix Arias Karla Guadalupe (1), León Galván Ma. Fabiola (2)

1 [Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica del Centro] | [karlafelixarias28@gmail.com]

2 [Ingeniería de Alimentos, Ciencias de la Vida, Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [fabiola@ugto.mx]

RESUMEN

El biometano es producto de la depuración del biogás, el cual es obtenido mediante la digestión anaerobia, en ella participan diversos microorganismos los cuales producen esta energía renovable. Para esto se utilizaron técnicas moleculares para la identificación de los consorcios microbianos enfocándonos en el gen 16s ribosomal específico en células procariontes. Se aislaron 15 colonias diferentes las cuales dieron entre las 1500 pb correspondiente al gen 16S, se seleccionaron 7 muestras PCR para realizar el análisis de variabilidad genética por ARDRA para saber si se trataba de bacterias iguales o diferentes.

ABSTRACT

El biometano es producto de la depuración del biogás, el cual es obtenido mediante la digestión anaerobia, en ella participan diversos microorganismos los cuales producen esta energía renovable. Para esto se utilizaron técnicas moleculares para la identificación de los consorcios microbianos enfocándonos en el gen 16s ribosomal específico en células procariontes. Se aislaron 15 colonias diferentes las cuales dieron entre las 1500 pb correspondiente al gen 16S, se seleccionaron 7 muestras PCR para realizar el análisis de variabilidad genética por ARDRA para saber si se trataba de bacterias iguales o diferentes.

Palabras Clave

Biodigestión anaerobia., PCR., ARDRA., Metanogénesis

INTRODUCCIÓN

El biogás es una mezcla gaseosa formada principalmente de metano y dióxido de carbono, pero también contiene diversas impurezas [1]. La composición del biogás depende del material digerido y del funcionamiento del proceso.

Biodigestión anaerobia

Mediante el proceso de biodigestión anaeróbica es posible degradar gran cantidad de residuos, como, residuos vegetales, estiércoles y efluentes de la industria alimentaria en subproductos útiles, debido a que este proceso genera biogás, con alto contenido de metano. El metano es un hidrocarburo en forma de gas que se forma dentro de un biodigestor el cual es monitoreado tomando en cuenta los siguientes parámetros: temperatura, presión, tiempo de retención hidráulica, composición bioquímica del sustrato, pH, etc. [1]. [2].

La digestión anaerobia es un proceso en ausencia de oxígeno, en la cual diversos microorganismos anaerobios interactúan entre sí para degradar la materia orgánica en diversas etapas [3].

- *Etapas de la biodigestión anaerobia*

La digestión anaerobia consta de cuatro etapas.

La hidrólisis es la descomposición biológica de polímeros orgánicos en moléculas más pequeñas (monómeros y dímeros), se lleva a cabo por medio de enzimas denominadas hidrolasas, que son capaces de romper enlaces específicos [3].

Acidogénesis es la obtención de ácidos grasos, a partir de los productos de la hidrólisis que son convertidos a ácido acético, fórmico, propionico y butírico [4]. La mayoría de los microorganismos acidogénicos también participan de la hidrólisis, como el género *Clostridium*, *Paenibacillus* y *Ruminococcus* que están presentes las primeras etapas del proceso de fermentación, pero son dominantes en la fase acidogénica [1].

Acetogénesis, fase en la cual los ácidos grasos volátiles se convierten en ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno. El ácido acético puede ser producido por la homoacetogénesis, en la cual se

produce acetato (CH_3COO^-) como producto final de la reducción de dióxido de carbono (CO_2) más hidrogeno (H)[4].

Las bacterias que participan en esta etapa son anaerobios estrictos los cuales catalizan la formación de acetato [5]. Algunos de esos microorganismos son *Clostridium acetivum*, *Clostridium formicoaceticum* y *Acetobacterium woodii* [3]

En la última etapa, metanogénesis, actúan un amplio grupo de bacterias anaeróbicas estrictas. Las bacterias que participan en esta etapa corresponden al dominio *Archaea*, y, morfológicamente, pueden ser bacilos cortos o largos y son las principales productoras de metano[1][4]. Se han identificado alrededor de 90 especies metanogénicas mediante técnica molecular como: *Methanobacterium sp*, *Methanococcus sp*, *Methanospirillum sp*, *Methanobrevibacter sp*, *Methanomicrobium sp*. [3].

- *Técnicas moleculares*

Las técnicas empleadas para la caracterización de los microorganismos son PCR 16S, electroforesis, digestión y análisis de restricción (ARDRA).

Gen16S Ribosomal

Es una macromolécula específica en células procariontes, en las bacterias, este gen posee alrededor de 1,5 kilopares de bases (kbp). [6]

La amplificación del ADNr 16S se consigue en un termociclador, gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [7].

Reacción en Cadena Polimerasa

PCR es un método utilizado para amplificar o multiplicar, una sola hebra de ADN millones de veces para estudiar ciertas características [8]. Para esta técnica molecular se ocupan condiciones que interactúan durante el PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Además de elementos como son los desoxirribonucleótidos trifosforados (dNTP's: adenina, timina, citosina y guanina), buffer, cloruro de magnesio, taq polimerasa y oligonucleótidos. Los dNTP's son bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está

compuesta de Tris-HCL, El cloruro de magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción [9].

Los oligonucleótidos flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta [9].

Digestión

La digestión es la fase en la que las enzimas de restricción actúan cortando sobre sitios específicos del DNA [10].

- *Análisis de restricción*

Después de la digestión, se realiza el ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) en la cual se ejecuta una segunda electroforesis en gel de agarosa para realinear y separar las hebras de ADN para el análisis [5][10].

Las técnicas moleculares han sido factor trascendental para la identificación de diversos microorganismos que hoy en día son de suma importancia por la funcionalidad que desarrollan en el ecosistema. Por ello debido a la preocupación de los países industrializados por disminuir el impacto ambiental y las emisiones de gases de efecto invernadero, se ha enfocado en el aprovechamiento de la biomasa como fuente de energía renovable a través de la digestión anaerobia, cabe mencionar que el biometano es proveniente de la depuración del biogás, por lo que surge la necesidad de progresar sobre el proceso de metanización. Es por eso que se realizara el estudio de diferentes biosistemas de la digestión anaerobia para caracterizar las bacterias participes en la producción de biometano y que por ende ayuden a optimizar la producción de biogás.

MATERIALES Y MÉTODOS

- *Selección de cepas microbianas*

Las muestras fueron seleccionadas de cajas Petri con microorganismos previamente cultivados, tomados de tenerías, pollinazas, central de abasto, lirio y brócoli, las cuales se encontraban sembradas en agar verde brillante, Mac Gonkey, medio estándar, PDA Y LB (Luria- Bertani). Se procedió a identificar colonias diferentes y así aislarlas en los mismos tipos de agar selectivos. Se aislaron morfológicamente un total de 65

colonias las cuales tuvieron crecimientos circulares, puntiformes, bordes enteros o lobulados, elevación plana y convexa, superficie lisa y consistencia cremosa [10].

Los microorganismos aislados fueron incubados a 37°C, se observó el crecimiento de estos y se seleccionaron colonias diferentes para proceder con la técnica de PCR 16S ribosomal.

- *PCR colonia*

Posteriormente se hizo la solución colocando en cada tubo PCR los siguientes reactivos (tabla 1).

TABLA 1. Soluciones para PCR

Soluciones	Cantidad	Soluciones	Cantidad
H ₂ O	15.7 µL	Oligo UBF	0.5 µL
MgCl	3.0 µL	Oligo 1492R	0.5 µL
Buffer KCL 10x	2.5 µl	Taq polimerasa	0.3 µL
dNTP's	0.5 µL	DNA(colonia)	2.0

Se procedió a la realización del PCR, cada tubo PCR con capacidad de 25 µL. el primer paso fue introducir los tubos al termociclador siguiendo el siguiente protocolo: desnaturalización a 94°C/3 min, desnaturalización inicial 94°C/1 min, alineamiento a 57°C/1 min, extensión a 72°C/1:40min y extensión final a 12°C. cabe destacar que los oligonucleótidos usados fueron UBF y 1492R específicos para bacterias puesto que generan una banda de aproximadamente 1500 pb [6] cuyas secuencias son para UBF F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGAG-3' y 1492 R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3 [11].

- *Electroforesis en gel de agarosa*

Una vez finalizado el tiempo de PCR las muestras fueron corridas en electroforesis en agarosa al 1%, se colocó 2 µL de buffer, 5 µL de muestra y se introdujeron los carriles del gel, el primer carril fue llenado con 2.0 µL de marcador 1kb plus DNA ladder. Se corrieron a 75volts por 35 minutos. Por ultimo se colocó en la placa UV Tray BIO-RAD y se digitalizo en el fotodocumentador BIO-RAD para obtener visibilidad de los segmentos de DNA amplificados.

- **Conservación en glicerol**

Los PCR positivos (16 muestras) en la técnica de PCR se localizaron en las cajas Petri y se picaron para ser cultivadas en 3 μL de agar líquido LB, una vez crecidas, se conservaron en glicerol. Se tomaron 800 μL de medio con bacteria y 800 μL de glicerol al 70%, posteriormente fueron guardadas en el congelador.

- **Purificación de PCR**

Los 16 PCR fueron purificados para obtener las bandas más visibles, se agregó a otros tubos PCR nuevos, 2 μL de acetato de sodio a 3M con pH de 5.2, en 10 μL de muestra. Se añadió 40 μL de etanol absoluto frío y se incubó a -20°C por 30 minutos. Una vez pasado ese tiempo se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos, se vació el sobrenadante y se lavó con 500 μL de etanol al 70% y se mezcló en vortex, se volvió a centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm y se retiró el sobrenadante. Una vez hecho esto se dejó secar a 37°C por 10 minutos en la incubadora y por último se añadió 35 μL de agua destilada.

Posteriormente se analizaron por electroforesis.

- **Digestión y ARDRA**

Se procedió a la realización de digestión utilizando la metodología ARDRA, de los tubos purificados se tomó 5 μL de muestra, se le añadió 1 μL de buffer Smart, y se seleccionaron 3 enzimas fiables (XhoI, Eco R1-HF y NcoI) se añadió 0.1 μL de cada enzima y se aforo a 10 μL con agua destilada. Se incubaron a $37^{\circ}/25^{\circ}\text{C}$ a 300 rpm en el termoblock por dos horas. Se le hizo electroforesis y si vio en Image Lab.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de realizar la identificación morfológica, aislamiento de los microorganismos y los PCR 16S Se obtuvieron los siguientes resultados.

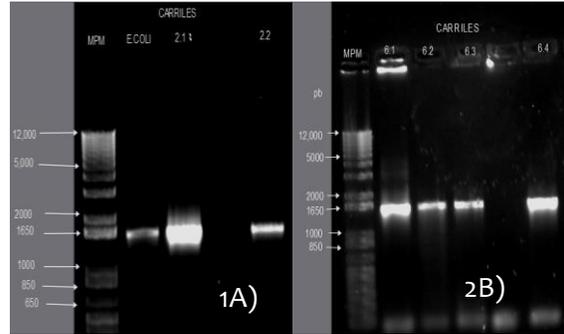
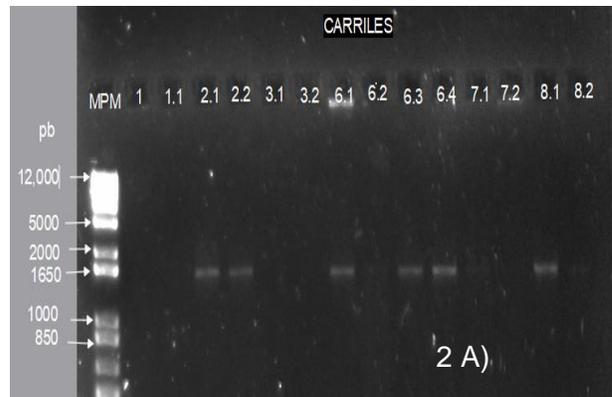


IMAGEN 1: Electroforesis en gel de agarosa. 1A) Carril 1 MPM, corridas de 4 muestras con un positivo (E.coli, carril 2) carril 2.1 (pollinaza) y 2.2 (central de abasto) amplificación del gen 16s. 1B) carril 6.1, 6.2 (lirio) 6.3 y 6.4 (brócoli) amplificación del gen 16s (1500 a 1600 pb)

En la imagen 1 (A) se muestran 3 amplificaciones de PCR, en la cual el carril 2 es un control positivo, el carril 2.1 y 2.3 son la amplificación de dos muestras tomadas del agar LB (pollinaza y central de abasto). En la imagen 1 (B) los PCR amplificados corresponden a bacterias con crecimiento en agar medio estándar y verde brillante (lirio, central y brócoli)

En los geles se observa el fragmento amplificado mediante una corrida electroforética, las bandas obtenidas presentaron un tamaño aproximado de 1500 pb correspondiente al gen 16S según lo reportado por Condor en el 2015.



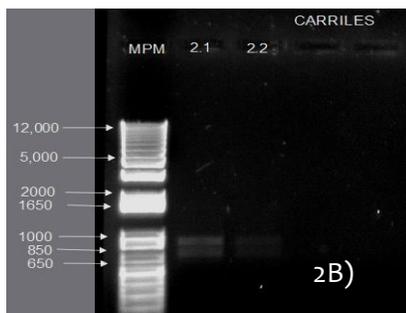


IMAGEN 2: Purificación y digestión 2 A) Carril 1 MPM, purificación de 14 muestras lirio (2.1, 2.2 y 6.1) central de abasto (6.3, 6.4) y pollinaza (8.1). 2 B) Digestión enzimática de 2 muestras purificadas. C) placa con microorganismo 2.1 y 2.1

Se logró amplificar 15 PCR de 35 colonias tomadas de las cajas Petri. Debido al exceso de sales o proteínas en las muestras, no se apreciaba definida las bandas amplificadas, por lo que se procedió a la purificación de las muestras, en la imagen 2 (A) solo se observa 6 bandas definidas debido a que los demás PCR fueron perdidas entre el lavado. En el análisis de restricción (ARDRA) se realizó la digestión enzimática de 2 muestras ver la imagen 2 (B).

Cabe destacar que el medio de cultivo con mayor crecimiento bacteriano fue el agar LB y medio estándar, en los cuales, las colonias crecidas en ellos fueron de la muestra de Lirio, tenería y pollinaza. Los medios con menor crecimiento fue el PDA, las PCR con mayor dificultad fue el verde brillante, hubo crecimiento de microorganismo pero debido a que se inhibió por exceso de DNA o por los componentes del medio, posible exceso de colorante, en el análisis en el fotodocumentador no se apreciaba amplificación de las muestras.[12]

CONCLUSIONES

Fue posible el aislamiento de bacterias obtenida de sustratos no convencionales.

Se logró la amplificación de 15 colonias por PCR16S

Se pudieron purificar la mitad de las muestras.

Fue posible el análisis de restricción para la identificación de bacterias iguales o distintas.

REFERENCIAS

- [1] D. Stanikova et al., "Melanocortin-4 receptor gene mutations in obese slovak children," *Physiol. Res.*, vol. 64, no. 6, pp. 883–890, 2015.
- [2] A. Rademacher et al., "Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 79, no. 3, pp. 785–799, 2012.
- [3] L. C. Corrales, D. Antolinez, J. Bohórquez, and A. Corredor, "Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta," *Nova*, vol. 13 (23), pp. 55–81, 2015.
- [4] G. de J. Gutiérrez Garcia, I. Mondaca Fernández, M. M. Meza Montenegro, A. Félix Fuentes, J. de J. Balderas Cortés, and P. Gortáres Moroyoqui, "Biogás: una alternativa ecológica para la producción de energía," *Ide@s CONCYTEG*, vol. 7, no. 85, pp. 881–894, 2012.
- [5] C. Zhang, H. Su, J. Baeyens, and T. Tan, "Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 38, pp. 383–392, 2014.
- [6] O. M. Vasek, E. M. Hebert, G. S. De Giori, R. Raya, and a J. V Fusco, "Secuencia parcial del gen 16S rRNA de cepas constituyentes de un fermento para la elaboración de Queso Artesanal de Corrientes.," no. 3400, pp. 12–15, 1992.
- [7] M. D. R. Rodicio and M. D. C. Mendoza, "Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 22, no. 4, pp. 238–245, 2004.
- [8] C. Martínez and E. Silva, "Metodos fisico quimicas en biotecnología," *Anal. Chem.*, vol. 62, no. 13, pp. 1202–1214, 2004.
- [9] L. Tamay de Dios, C. Ibarra, and C. Velasquillo, "Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 2, no. 5, pp. 70–78, 2013.
- [10] D. R. Tobergte and S. Curtis, "Manual De Prácticas De Laboratorio Microbiología General.," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, no. 9, pp. 1689–1699, 2013.
- [11] O. F. Hernández-Saldaña, N. M. de la Fuente-Salcido, M. Valencia-Posadas, and J. E. Barboza-Corona, "Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de péptidos antimicrobianos obtenidas a partir de leche de cabra," *Univ. Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, Lab. Biotecnol. y Microbiol. Mol. Investig. y Desarro. en Cienc. y Tecnol. Aliment.* Vol. 1, No.1, vol. 1, no. 1, pp. 429–435, 2016.
- [12] A. T. Real, "Guía de interpretación de resultados."