

CARAZTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS

Irving Oswaldo Velázquez Ríos (1), Ma. Fabiola León Galván (2)

¹ [Ingeniería Agroindustrial, Universidad Politécnica de Chiapas] | [irving.velazquez@hotmail.es]

² [Departamento de Alimentos-Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [fabiola@ugto.mx]

Resumen

La producción de biogás representa una alternativa como fuente de bioenergía mediante la fermentación anaerobia usando como sustrato residuos orgánicos provenientes de actividades domésticas, agrícolas e industriales. Una alternativa para optimizar el proceso es caracterizar los microorganismos que participan en el proceso de producción de biogás mediante métodos moleculares. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar molecularmente bacterias involucradas en la producción de biogás en un biodigestor flujo pistón operado con lodos de tenería. Para la identificación molecular de la población microbiana presente en el biodigestor se obtuvo el metagenoma de entrada y salida. Posteriormente se analizó la región V3 del gen 16S ribosomal universal en bacterias usando la técnica de PCR. Finalmente se obtuvo una amplificación de la región V3 en las muestras analizadas del biodigestor teniendo como resultado amplicones de aproximadamente 233 pb, con estos resultados se puede concluir que es posible la caracterización de las bacterias presentes en el biodigestor.

Abstract

The production of biogas is an alternative a source of bioenergy by anaerobic fermentation using as substrate organic waste from domestic, agricultural and industrial activities. An alternative process to optimize is characterize microorganisms involved in the process of biogas production by molecular methods. The aim of this study was characterize molecularly bacterias involved in the production of biogas in a plug flow biodigester operated with tannery sludge. For molecular identification of this microbial population in the biodigester the input and output metagenome was obtained. Subsequently the region V3 of the ribosomal gene 16S universal in bacteria using the PCR technique was analyzed. Finally was obtained an amplification of the region V3 in the samples analyzed of the digester, having as a result amplicons approximately 250 bp, with these results it can be concluded which is possible characterization of bacteria in the biodigester.

Palabras Clave

Biodigestor; Lodos de tenería; Metagenoma; PCR 16S-V3.

INTRODUCCIÓN

Energía y Biogás

La demanda de energía ha ido en aumento debido a la creciente población mundial provocando como reto satisfacer un alta demanda de energía, por lo que las reservas de combustibles fósiles con el paso del tiempo han disminuido, significando un incremento al costo de las misma. La generación de energía mediante residuos orgánicos a través de procesos biológicos representa una alternativa para la producción de bioenergía, otorgando valor agregado a residuos industriales, agrícolas y domésticos. La fermentación anaerobia es un proceso que se realiza en un sistema denominado biodigestor, en el que un grupo complejo de microorganismos transforma materia orgánica en dos principales productos: digestato usado como fertilizante y biogás como fuente de energía [1].

El biogás es una mezcla de gases compuesta principalmente por metano en una concentración de 55-70% (de esta cantidad depende la calidad del biogás), dióxido de carbono (35-40%), conteniendo también compuestos inorgánicos como el sulfuro de hidrogeno, composición que depende del sustrato y condiciones de fermentación [2,3].

El proceso de producción de biogás consta de cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis, y metanogénesis; en las primeras 3 etapas actúa un grupo de bacterias, mientras que la metanogénesis interviene otro grupo de bacterias denominadas metanogénicas que son las responsables de la producción de metano a partir de acetato o alternativamente de hidrogeno y CO₂ [4].

Los principales microorganismos que destacan por estar involucrados en el proceso de producción de biogás son: 1) en la fase de hidrólisis los géneros *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Propioni-bacterium*, *Sphingomonas*, *Sporobacterium*, *Megasphaera*, y *Bifidobacterium*; 2) en la acidogénesis participan principalmente el género *Clostridium*, *Paenibacillus* y *Ruminococcus*; 3) en la etapa de acetogénesis

participan principalmente los microorganismos *Syntrophomonas wolfei* y *Syntrophobacter wolini*. Las bacterias metanogénicas aparecen durante la segunda fase, sin embargo aumentan en la etapa metanogénica, los principales géneros de bacterias metanogénicas son: *Methanobacterium*, *Methanospirillum* y *Methanosarcina* [2,4].

Identificación de microorganismos involucrados en la producción de Biogás

A través de técnicas microbiológicas y moleculares de identificación, hoy en día es posible conocer la población microbiana presente en un biodigestor, mismas que participan en cada etapa de producción de biogás, esto con la finalidad de optimizar el proceso y de esta manera obtener mayores rendimientos en la degradación y producción de biogás producción, inoculando un biodigestor con microorganismos específicos productores de biogás [5].

La identificación microbiológica se realiza en medios de cultivos comerciales, teniendo como limitante que la mayoría de los microorganismos presentes en los biodigestores no son cultivables en medios estándares, por lo que se requieren medios de cultivos mejorados que simulen un ambiente en términos de nutrientes y condiciones fisicoquímicas como gradientes de oxígeno y pH implicando normalmente un medio de preenriquecimiento, enriquecimiento y uno selectivo, y posteriormente pruebas bioquímicas o serológicas, siendo un método complejo, tardado y presentando baja sensibilidad [6,7].

Por su parte las técnicas moleculares son rápidas, y presentan mayor sensibilidad en la identificación y cuantificación de microorganismos. Los primeros métodos de identificación molecular empleados fueron la hibridación ADN-ADN, análisis de secuencia de ADNr 16S y RFPL (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción). Más que los productos de expresión las técnicas moleculares consisten en la identificación de ácidos nucleicos [7].

Dentro de esas técnicas se encuentra la metagenómica la cual consiste en el estudio de genomas de una población determinada de microorganismos presentes una muestra ambiental, basado en la secuenciación mediante un análisis funcional y de o expresión [5].

- *Técnica del metagenoma*

La metodología para la caracterización del metagenoma de la población microbiana del biodigestor se fundamenta en el trabajo realizado por Hollibaugh, J. *et. al.*, en el 2001 [8].

Los pasos principales para realizar esta caracterización son:

Extracción de ADN: La cual consiste en el aislamiento y la purificación de las moléculas de ADN en una determinada muestra, basando se en sus características fisicoquímicas de la molécula [9].

Electroforesis: La técnica consiste en verificar el correcto aislamiento de ADN conociendo su integridad sometidas a un campo eléctrico en el cual las moléculas de ADN con carga negativa son desplazadas por atracción del campo eléctrico, esto a través de geles elaborados con polímeros como agarosa y en algunos casos acrilamida, conociendo así la cantidad y calidad de ADN [9,10].

PCR 16S: La técnica consiste en la amplificación de un fragmento específico de ADN obtenido de la muestra, el cual es la región variable (V3) del gen ribosomal 16S el cual se encuentra entre dos regiones del mismo gen conservadas universalmente en bacterias. El gen ribosomal 16S ha sido utilizado ampliamente para la identificación bacteriana así como para estudios taxonómicos. La región 16S contiene 9 regiones hipervariables dentro de ellas se encuentra la V3, de la cual se ha demostrado ampliamente la diversidad de esa secuencia distribuida en diferentes especies bacterianas, por lo que pueden ser utilizados para identificación de bacterias, las regiones hipervariables se encuentra por tramos conservados en bacterias lo que permite, lo que permite la amplificación por PCR para determinar la secuencia. Uno de los aspectos con los que se debe tener cuidado es el uso de cebadores (oligos o primers) que amplifiquen en particular esta región V3 del gen 16 S, para ello se utilizan los oligos específicos para dicha región los cuales son: Oligo 517r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), Oligo 356f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') [11,8].

El empleo de tales técnicas moleculares hacen efectiva la identificación de cierta población bacteriana presentes en una muestra. En función de lo descrito, objetivo del trabajo fue caracterizar

molecularmente bacterias involucradas en la producción de biogás.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de ADN

Se realizó un muestreo en la entrada y salida de un biodigestor mesofílico tipo flujo pistón operado a partir de lodos de tenería con una producción constante de biogás. El aislamiento del DNA se obtuvo a partir de 1.8 ml de muestra, siguiendo el protocolo del Kit de aislamiento de MO BIO Laboratorios, Inc "PowerSoil DNA Isolation Kit".

Electroforesis de metagenoma

Se preparó el gel de agarosa al 1%, preparado a partir de 100g agarosa en 100 ml de TAE 1X usando 3 µl de gel red tinción fluorescente para ADN.

Los pozos fueron cargados con 5µl de muestra y 2µl de buffer de carga, usando 1.3 µl de Marcador de peso molecular (MPM) 1 Kb Plus DNA Ladder. La cámara de electroforesis fue conectada a una fuente de voltaje de 80 Voltios con un tiempo de 35 minutos. Posteriormente se colocó en el transluminador BIO-RAD Gel Doc™ EZ Imagen y para observar las bandas se utilizó el software BIO RAD.

Reacción de cadena de Polimerasa (PCR) para 16S-V3

La mezcla de reacción para la PCR que amplificó la región V3 del gen ribosomal 16S se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, correspondientes a: 19.1 µl de agua destilada, 2.5 µl de Buffer enzima 10 X, 0.7 µl de Catalizador MgCl₂ (50mM), 0.5 µl dNTP's (10mM), 0.5 µl Oligo 517r (10 µM), 0.5 µl Oligo 356f (10 µM), 0.2 µl Taq Polimerasa recombinante (10,000U/ µl) y 1.0 µl de DNA-metagenoma (100ng/ µl).

Posteriormente la mezcla de reacción se colocó al equipo Termociclador BIO-RAD C1000 Thermal Cycler, bajo las siguientes condiciones: Un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C/4 min, seguido de 35 ciclos a 94°C/4 segundos, 57°/ 1 minuto, 72°C/1.25 minutos, y al finalizar los ciclos se programó una extensión final a 72° C/10 minutos.

Electroforesis de PCR 16S-V3

Se realizó electroforesis del PCR 16S de la región V3 para el análisis del tamaño molecular del fragmento amplificado (amplicón), esto realizado bajo las mismas condiciones de la electroforesis del metagenoma para corroborar la amplificación la correcta amplificación de la región V3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención del Metagenoma del Biodigestor

Se logró el aislamiento de metagenoma de las muestras de entrada y salida obteniendo todo el material genético presente en ambos puntos del biodigestor, teniendo como resultado bandas de 12,000 pares de bases (pb) que confirman la correcta extracción de metagenoma. Como se observa en la imagen 1 el metagenoma aislado a la entrada del biodigestor presenta menor intensidad de la banda respecto a la de salida, lo que indica que la cantidad de microorganismos presentes a la salida del biodigestor es mayor, después de pasar por el biodigestor y que dentro del sistema existe una actividad microbiológica alta.

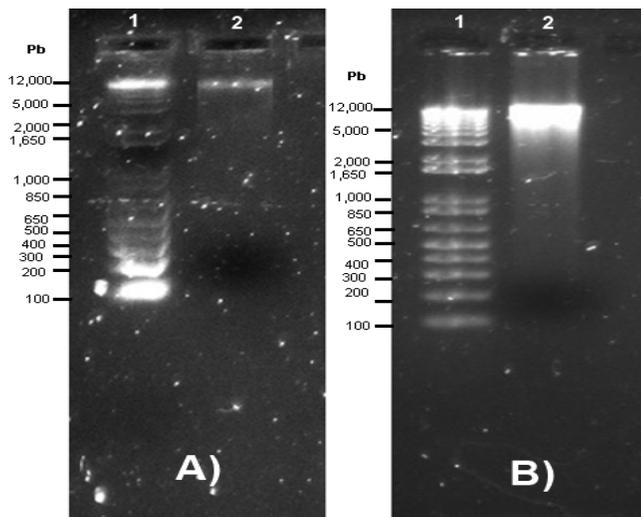
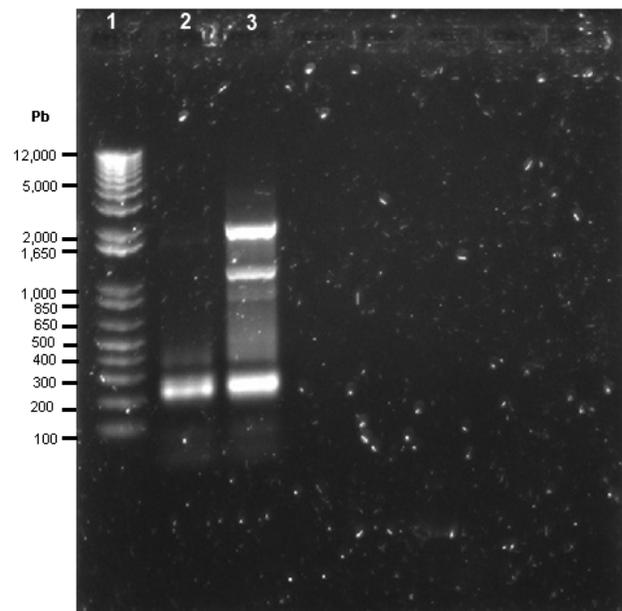


IMAGEN 1. Electroforesis en gel de agarosa. A): Electroforesis del Metagenoma de entrada, Carril1: MPM; Carril 2: Metagenoma aislado de la muestra de entrada. B): Electroforesis del Metagenoma de salida, Carril1: MPM; Carril 2: Metagenoma aislado de la muestra de salida.

Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S

Usando los oligos 517r y 356f específicos para la amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S en bacterias fue posible la amplificación por PCR únicamente de esta región, obteniendo las bandas esperadas de amplificación con un peso aproximado 233 pb tanto en la muestra de entrada como en la muestra de salida del biodigestor, correspondiente al resultado obtenido por Hollibaugh, J. T *et. al.* En el 2002 (Imagen 2).



MAGEN 2. Amplificación de 16S-V3 por PCR. Carril1: MPM; Carril 2: Región V3 del gen 16S amplificada de la muestra de entrada y Carril3: Región V3 del gen 16S amplificada de la muestra de salida.

A pesar de la presencia de bacterias en el sustrato de entrada del biodigestor, se puede observar que existe un incremento en la población bacteriana a la salida del sistema, por lo que se confirma que hay bacterias que se ven favorecidas por las condiciones dentro del reactor. Por lo tanto, el crecimiento bacteriano observado aunado a la producción de biogás favorecidas por las condiciones presentes durante las etapas del proceso, confirma la presencia de bacterias

involucradas directamente en el proceso de biodigestión anaerobia.

Durante la amplificación por PCR 16S se obtuvieron los fragmentos o bandas esperadas, pero en la muestra de salida se obtuvieron bandas aproximadamente de 1200 y 2000 pb que en teoría puede decirse que son inespecíficas porque no se esperaban, se infiere que las condiciones de amplificación son correctas dado que para la muestra de entrada solo amplifica el tamaño esperado y correspondiente a la región V3 del gen ribosomal 16S. Para tratar de evitar la amplificación de bandas inespecíficas se hizo una repetición modificando las condiciones y de forma particular se sustituyó la enzima por una *Taq Polimerasa Platinum*, que es una enzima de alta fidelidad, con lo que se logró una reducción en la intensidad de bandas inespecíficas, sin embargo, se obtuvo el mismo resultado. Esta situación se debe probablemente que durante alguna etapa del proceso de producción de biogás se producen microorganismos que tienen coincidencias de fragmentos de ADN con los oligos empleados para la amplificación de la región V3 del gen 16S, por lo que una bacteria puede tener diferente la región 16S o en su efecto ser un microorganismo diferente por ejemplo una arqueo bacteria que son los organismos filogenéticamente más cercanos a las bacterias, cabe resaltar que estos amplicones no se ha encontrado en las publicaciones consultadas hasta ahora, ya que solo el resultado pendiente de secuenciación indicará a que corresponde. Estos resultados fueron consistentes en las repeticiones realizadas, lo que descarta posibles errores de manipulación; esto resulta interesante, dado que en la entrada del biodigestor se obtiene lo esperado, un solo amplicón, pero quizá durante el proceso incrementa el número de cierto microorganismo (se especula que pudieran ser arqueo bacterias) y por eso aún cuando se emplea una enzima de alta fidelidad hay amplificación de esos fragmentos no esperados.

Hasta el momento se tiene propuesto realizar un análisis por DGGE (Electroforesis en Gel Gradiente Desnaturalizante) del PCR 16s V3 y a su vez un análisis de PCR colonia de microorganismos cultivados por métodos microbiológicos, para

posteriormente a partir de un análisis de los patrones electroforéticos del DGGE y secuenciación del PCR colonia enriquecer los resultados de caracterización e identificación de las bacterias que intervienen en la producción de biogás presentes en un biodigestor.

CONCLUSIONES

Es posible la amplificación de la región V3 del gen universal 16S en bacterias de un biodigestor operado con lodos de tenería utilizando los oligos 517r y 356f.

Existe un incremento de bacterias en la salida del biodigestor lo que confirma la presencia de bacterias que intervienen directamente en la biodigestión anaerobia.

Actualmente se continúa con el estudio para la obtención de resultados con mayor precisión.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dra. Fabiola León Galván por permitirme participar en este proyecto y por las atenciones y apoyo recibido durante la ejecución del proyecto. Así también al Ing. Iván Loera Mendoza, estudiante del Posgrado en Biociencias-DICIVA-UG por el apoyo técnico brindado durante la estancia de verano.

REFERENCIAS

- [1] Chi Liu, A., Yang Chou, C., Ling Chen, L. & Horng Kuo, C. (2015). Bacterial community dynamics in a swine wastewater anaerobic reactor revealed by 16S rDNA sequence analysis. *Journal of Biotechnology*, 194.
- [2] FAO, (2011). Fundamentos de la fermentación metanogénica. Manual de Biogás. Santiago de Chile: Proyecto CHI/00/G32.
- [3] Mussgnug, J., Klassen, V., Schlüter, A. & Kruse, O. (2010). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology*, 150, 51-56.
- [4] Yu, D., Kurota, J.M., Lähde, K., Kymäläinen, M., Sinkkonen, A. & Romantschuk, M. (2014). Biogas production and methanogenic archaeal community in mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion processes. *Journal of Biotechnology*, 143, 54-60.
- [5] Bonilla-Rosso, G., Souza, V. & Eguarte, L. E., (2008). Metagenómica, Genómica y Ecología Molecular: La Nueva Ecología en el Bicentenario de Darwin. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 11(1):41-51.

- [6] Rastogi, G. & Sani, R., (2011). Chapter 2- Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment. Department of Chemical and Biological Engineering, South Dakota School of Mines and Technology, Rapid City, SD 57701, USA.
- [7] Palomino Camargo C. & González Muñoz Y., (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2014; 31(3):535-46.
- [8] Hollibaugh, J. T, Bano, N. & Ducklow, H. W. (2002). Widespread Distribution in Polar Oceans of a 16S rRNA Gene Sequence with Affinity to *Nitrosospira*-Like Ammonia-Oxidizing Bacteria. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 68(3), 1478-1484.
- [9] Alejos, L.P., Aragón, M.C. & Cornejo, A. (s.a.). Extracción y Purificación de ADN.
- [10] Castagnino, J.M. (2000). Electroforesis Capilar. *Bioquímica*, 25(1), 13-22.
- [11] Chakravorty, S, Helb, D, Burday, M, Connell a, N & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, s 69, 330-339.