



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD FILOGENÉTICA
DE ARQUEAS METANOGÉNICAS EN TRES
REACTORES TIPO RALLFA OPERANDO A 45,
55 Y 65°C PARA EL TRATAMIENTO DE
VINAZAS**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA
DIANA TOSCANO PÉREZ

MÉXICO, D.F., 2012





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

| | |
|------------------|--|
| Presidente | E. en B. Marco Antonio Ortiz Jiménez |
| Vocal | M. en AI. Landy Irene Ramírez Burgos |
| Secretario | Dra. Marisela Bernal González |
| Primer suplente | Q.F.B. Verónica Domínguez Valdéz |
| Segundo Suplente | Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa |

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN

Laboratorios 301, 302 y 303 de Química Ambiental e Ingeniería Química Ambiental, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

Laboratorio de Ecología Molecular y Epigenética, Instituto de Ecología, UNAM

Unidad de Servicios Académicos e Investigación (USAI), Departamento de Microscopía, Facultad de Química, UNAM

Asesor

Dra. Marisela Bernal González

Supervisor Técnico

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

Sustentante

Toscano Pérez Diana

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por el invaluable tesoro que me ha otorgado, que es la educación, misma que me ha encaminado siempre a obtener lo mejor de mí misma con el deseo y la promesa de convertirme en una mejor ciudadana.

A la **Facultad de Química**, severa y minuciosa formación es la que me ha dado. En ella se respira aprendizaje y superación, en ella se abren numerosas puertas del saber y a su vez amplía ventanas por las cuales observamos al mundo. Gracias querida Facultad de Química.

A la **Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa**, por su constante y generoso apoyo desde el inicio hasta el final de mi estadía en los Laboratorios de **Química Ambiental e Ingeniería Química Ambiental**, por ser un ejemplo de dedicación y excelencia académica.

A la **Dra. Marisela Bernal González**, por la dirección de este trabajo de investigación, por compartir sus conocimientos conmigo, por su dedicación, su tiempo y ejemplo de constancia y firmeza. Le agradezco profundamente la confianza que depositó en mí de principio a fin.

Al **Instituto de Ecología de la UNAM**, laboratorio de **Ecología Molecular y Epigenética**, en donde se llevó a cabo parte de la experimentación. Al mismo tiempo un agradecimiento a todo su equipo de trabajo, en especial a la **Dra. Luisa Falcón Álvarez** y a la **Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández**, por su apoyo y colaboración en esta investigación, permitiéndonos hacer uso de las instalaciones de su laboratorio siempre con la mejor disposición.

Al comité tutorial por la revisión, corrección y aprobación de esta tesis

E. en B. Marco Antonio Ortiz Jiménez

Dra. Marisela Bernal González

M. en A.I. Landy Irene Ramírez Burbos

Q.F.B. Verónica Domínguez Valdéz

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

Esta investigación fue parcialmente financiada por el proyecto **PAPIIT clave 11811**, **“Programa de apoyo a la investigación e innovación tecnológica” DGAPA, UNAM**

Rocío Jetzabel Alcántara Hernández

Ro, te agradezco profundamente no solo por tu colaboración y guía en parte experimental y técnica del proyecto, sino también por sembrar en mí entusiasmo y amor por la investigación. Tu tenacidad, inteligencia y perseverancia son para mí ejemplos de vida que me motivan a superarme día con día y abatir el temor ante nuevos horizontes. Significa mucho para mí haber convivido y aprendido de ti tantas cosas a lo largo de este tiempo. Rocío, de la manera más sincera te vuelvo a decir muchas gracias.

Dedicatorias

A mis padres Tomás Baltazar Toscano Ortega y Martha Mireya Pérez Chávez

Papá, Mamá, no podría estar más orgullosa de tenerlos como padres, pues desde que era niña los recuerdo como gigantes, ahora que soy casi un adulto puedo decir que los veo aún más grandes. Papá y Mamá, dos palabras cortas pero de significado extenso. Gracias les doy por darme un hogar que siempre ha sido mi lugar favorito, gracias por ese abrazo firme y las caricias constantes, por enseñarme a ser libre y honesta, a no tener miedo. Ustedes padres, son mis guías y mis ángeles guardianes, son mi sol dador de energía, el viento que sana mi alma, el agua que hidrata mi cuerpo. Padres míos, los adoro y los respeto, los amo y los llevo dentro. Dedico a ustedes este trabajo como muestra de mi eterno agradecimiento.

A mis hermanos Oscar y Mireya Toscano Pérez

Por ser el regalo más grande y hermoso que mis padres me han dado. Sin ustedes mi sentido y forma de vida sería muy diferente, es por ello que agradezco el tenerlos a mi lado y poder compartir momentos que ustedes hacen especiales aunque sean triviales. Hermanos míos los adoro a cada momento.

A mis abuelos Pedro Pérez (*in memoriam*), Rosa Chávez y Graciela Ortega

Su dulzura y amor siempre son para mí ese extra necesario en el momento indicado, sus brazos son el lugar donde puedo renacer y sus palabras resultan como una melodía tierna y pausada que me dice "tú puedes". Gracias abuelos míos, segundos padres, amor constante, siempre los veneraré.

A mi familia

A todos mis tíos y primos que me han obsequiado momentos de felicidad y risas. Por formar un círculo lleno de comunión, entrega y ejemplo a seguir. Por ser el fuerte que siempre resiste los dolores pero a la vez festeja y comparte los logros. Por ser brújula si estoy perdida, por ser aliento que me llena de vida.

A mis amigos

Elizabeth y Ludwig, mis amigos desde la infancia. Indudablemente su amistad ha sido y será un gran motor en mi vida. Hoy, este pequeño logro es también por y para ustedes.

Gabriela y Thalía, dos hermosas mujeres con las que he compartido infinidad de sueños e ilusiones. Ustedes saben que éste es uno de ellos y por eso les dedico este breve espacio como muestra de mi agradecimiento y eterno cariño que les guardo.

Rebeca, Flor, Carmen, Guadalupe y Mariana, dedicada a ustedes por enseñarme a disfrutar y vivir con la mejor actitud posible, por enseñarme a ser sencilla y condescendiente, por esas risas tan puras y naturales que de ustedes emergen siempre. Adoradas todas, las quiero y querré hasta el final.

Clara Ferreira, Emilio González, Lizeth Campos y David Calderón, más que mis maestros de buceo han sido amigos y cómplices de aventuras en mar y tierra. Les agradezco infinitamente todas sus enseñanzas que si bien gran parte de ellas han sido en la alberca, todas son aplicables en el día a día de mi vida al entender que el buceo más que un pasatiempo, afición y deporte es un estilo de vida.

Karina, Mali, Miguel, Rubén y Juan Carlos, por vivir juntos la hermosa etapa universitaria, afrontando los fracasos y logros dentro y fuera del salón de clases, por las charlas y juegos en horas muertas, por el trabajo en equipo, por esa mano amiga en momentos definitorios que se tatúan en el alma.

A todos mi compañeros y amigos del laboratorio de Química Ambiental y Ecología Molecular. De todos ustedes admiro su trabajo, entrega y ganas de dar lo mejor. Sus consejos y observaciones son un tesoro invaluable, así como nuestras convivencias a nivel de trabajo y a nivel personal. Me considero afortunada por pasar mis días de trabajo a su lado pues el ambiente creado fue siempre clave del éxito y culminación de mi estancia en el laboratorio. A todos ustedes colegas y amigos los respeto y admiro esperando volver a verlos en un futuro.

A Ricardo Ramírez Nieto

Gran ser humano que me cobija con un manto de amor y esperanza, ilumina mi sendero con su luz, lo llena de sonrisas. Día a día despiertas nuevas alegrías que son como colores que me hacen sentir fuerte, valiente, capaz. Ricardo, sencillamente gracias por darme tanto y transmitirme esa paz que siempre necesito. Tú bien sabes lo que este trabajo significa para mí y es por eso que te lo comparto y dedico.

A mis maestros

Aquellas personas que desde iniciada mi vida escolar me han guiado hasta el umbral de mi propio conocimiento. A todos ustedes maestros, les reconozco su trabajo y hoy les dedico el mío.

A mi país

Dedico este trabajo a México, mi país de origen, mi tierra, mis raíces. Porque México es cada persona que en él habita y es por ustedes que siempre trataré de dar lo mejor Es para ti México querido porque no te abandono. Has confiado en mí y no te voy a defraudar.

A una fuerza y energía que está más allá de mi entender

No sabría como nombrarle, sin embargo sé que existe algo más poderoso y supremo que lo terrenal y universal, sin saber qué es, lo siento y lo respeto. Gracias a ti ente, energía o fuerza majestuosa porque nunca me has abandonado.

“El pájaro rompe el cascarón, el huevo es el mundo, el que quiere nacer tiene que romper un mundo...” (Herman Hesse, “Demian”)

Índice

| | Pág. |
|---|------|
| Resumen | 1 |
| CAPÍTULO 1 | |
| PROBLEMA | |
| 1.1. Introducción | 3 |
| 1.1.1. Planteamiento del problema | 4 |
| 1.1.2. Justificación del trabajo | 4 |
| 1.1.3. Hipótesis | 5 |
| 1.1.4. Objetivos | 5 |
| 1.1.4.1. Objetivo general | 5 |
| 1.1.4.2. Objetivos particulares | 5 |
| CAPÍTULO 2 | |
| ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO | |
| 2.1. Industria azucarera | 6 |
| 2.1.1. Panorama nacional e internacional | 7 |
| 2.1.2. Problemática de contaminación ambiental causada por la industria azucarera-alcoholera | 9 |
| 2.1.3. Vinazas | 9 |
| 2.2. Conceptos básicos de un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA) | 11 |
| 2.2.1. Generalidades de proceso anaerobio (digestión) | 12 |
| 2.2.2. Bioquímica y microbiología de la digestión | 13 |
| 2.2.2.1. Hidrólisis | 13 |
| 2.2.2.2. Acidogénesis | 14 |
| 2.2.2.3. Acetogénesis | 14 |
| 2.2.2.4. Metanogénesis | 15 |
| 2.3. Arqueas metanogénicas | 18 |
| 2.3.1. Taxonomía de las arqueas metanogénicas | 21 |
| 2.3.2. Principales sustratos utilizados por las metanogénicas | 21 |
| 2.3.3. Medios de cultivo y aislamiento | 24 |

| | |
|---|----|
| 2.3.4. Microscopía confocal espectral y electrónica de barrido | 26 |
| 2.4. Metagenómica: herramienta clave en el estudio de diversidad filogenética de muestras ambientales | 28 |
| 2.4.1. Extracción de <i>DNA</i> | 29 |
| 2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (<i>PCR</i>) | 30 |
| 2.4.3. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (<i>DGGE</i>) | 30 |
| 2.4.4. Secuenciación | 33 |
| CAPÍTULO 3 | |
| METODOLOGÍA | |
| 3.1. Diagrama de bloques | 36 |
| 3.2. Características de los reactores tipo RALLFA utilizados | 37 |
| 3.2.1. Toma de muestra | 38 |
| 3.3. Microscopía confocal espectral | 38 |
| 3.4. Microscopía electrónica de barrido | 38 |
| 3.4.1. Preparación de las muestras: fijación, deshidratación, secado a punto crítico y recubrimiento con oro | 38 |
| 3.5. Pruebas moleculares para el estudio de filogenia de arqueas metanogénicas en los RALLFA | 39 |
| 3.5.1. Extracción de <i>DNA</i> metagenómico | 39 |
| 3.5.2. Amplificación de <i>DNA</i> de arqueas metanogénicas mediante <i>PCR</i> , a partir del <i>DNA</i> metagenómico extraído | 40 |
| 3.5.2.1. Selección de <i>primers</i> | 40 |
| 3.5.2.2. Componentes de la <i>PCR</i> | 40 |
| 3.5.2.3. Ajuste de tiempos de amplificación en la <i>PCR</i> | 41 |
| 3.5.3.4. Elaboración de geles de agarosa para muestras de <i>DNA</i> amplificadas, electroforesis, tinción y revelado del gel | 42 |
| 3.5.3. Purificación de <i>amplicones</i> (producto de la <i>PCR</i>) | 44 |
| 3.5.4. <i>PCR</i> anidada | 45 |
| 3.5.5. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (<i>DGGE</i>) | 46 |

| | |
|---|----|
| 3.5.6. Reamplificación de bandas obtenidas en <i>DGGE</i> | 50 |
| 3.5.7. Secuenciación Sanger | 50 |
| 3.5.8. Alineamiento del <i>primer</i> A1032F-1434R con secuencias de arqueas metanogénicas | 51 |
| 3.5.9. Elaboración de árboles filogenéticos empleando secuencias parciales de 16S rDNA y <i>mcrA</i> | |
| CAPÍTULO 4 | |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | |
| 4.1. Microscopía confocal espectral y microscopía electrónica de barrido | 52 |
| 4.2. Extracción de <i>DNA</i> metagenómico y amplificación de <i>DNA</i> de arqueas metanogénicas | 54 |
| 4.3. <i>PCR</i> anidada | 56 |
| 4.4. <i>DGGE</i> y secuencias obtenidas | 56 |
| 4.5. Análisis bioinformático | 59 |
| 4.5.1. Alineamiento del <i>primer</i> A1032F-1434R con secuencias de arqueas metanogénicas | 59 |
| 4.5.2. Árboles filogenéticos de arqueas metanogénicas en cada RALLFA | 61 |
| CAPÍTULO 5 | |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | |
| 5.1. Conclusiones | 65 |
| 5.2. Recomendaciones | 67 |
| BIBLIOGRAFÍA | |
| BIBLIOGRAFÍA DE PÁGINAS WEB CONSULTADAS | |
| Anexo 1. Extracción de <i>DNA</i> utilizando el <i>Kit: Power Soil® DNA Isolation Kit- Mo Bio Laboratories</i> | 77 |
| | 79 |
| Anexo 2. Purificación de <i>DNA</i> amplificado mediante <i>PCR</i> , kit: UltraClean® <i>PCR Clean-Up Kit</i> | 80 |
| Anexo 3. Micrografías de microscopía confocal espectral | |
| Anexo 4. Micrografías de microscopía electrónica de barrido | 83 |
| Anexo 5. Secuencias nucleotídicas de filotipos obtenidos de <i>DGGE</i> | 86 |

| Índice de Tablas | | Página |
|-------------------------|--|---------------|
| Tabla 1. | Reacciones implicadas en la metanogénesis y sus respectivos valores energéticos en energía libre de Gibbs estándar (Whitman <i>et al.</i> , 2006) | 16 |
| Tabla 2. | Órdenes de arqueas metanogénicas, familias y géneros de las mismas (Boone <i>et al.</i> , 2011) | 23 |
| Tabla 3. | Características de las familias de arqueas metanogénicas (Whitman <i>et al.</i> , 2006) | 23 |
| Tabla 4. | Principales sustratos utilizados por arqueas metanogénicas (Whitman <i>et al.</i> , 2006) | 24 |
| Tabla 5. | Composición de (a) Medio de enriquecimiento para arqueas metanogénicas; (b) Solución de sales A; (c) Traza de elementos; (d) Solución de vitaminas (Balch <i>et al.</i> , 1979; Bryant <i>et al.</i> , 1971; DSMZ, 2011; Whitman <i>et al.</i> , 2006) | 25 |
| Tabla 6. | Uso de antibióticos para el aislamiento de arqueas metanogénicas (DSMZ, 2011; Patel, 1984; Touzel <i>et al.</i> , 1985; Zhao, <i>et al.</i> , 1989; Zinder y Mah, 1979) | 26 |
| Tabla 7. | Características de cada uno de los reactores | 38 |
| Tabla 8. | <i>Primers</i> utilizados a lo largo del experimento y sus características principales como nombre del gen, secuencia, tamaño de amplificación esperado y la referencia bibliográfica | 41 |
| Tabla 9. | Componentes y cantidades para cada reacción de <i>PCR</i> según el <i>primer</i> utilizado (<i>ME1/ME2</i> y <i>25F-1492R</i>) | 41 |

| | |
|--|----|
| Tabla 10. Temperaturas y tiempos asignados para la amplificación de <i>DNA</i> utilizando <i>primers ME1/ME2</i> y <i>25F-1492R</i> | 42 |
| Tabla 11. Componentes y cantidades para cada reacción de <i>PCR</i> anidada | 45 |
| Tabla 12. Tiempos asignados para la amplificación de <i>DNA</i> utilizando <i>primers ME1/ME2</i> y <i>A1032F-1434 R</i> | 46 |
| Tabla 13. Composición del gel con gradiente desnaturizante 50%-80% | 48 |
| Tabla 14. Composición de geles con diferente gradiente desnaturizante para <i>DGGE</i> | 49 |
| Tabla 15. Micrografías obtenidas de las muestras de cada RALLFA bajo dos diferentes técnicas de microscopia: confocal espectral y electrónica de barrido | 52 |
| Tabla 16. Bandas de <i>DNA</i> de arqueas metanogénicas procedentes de <i>DGGE</i> que fueron enviadas a secuenciar | 59 |
| Tabla 17. Características de las especies encontradas en la filogenia con <i>16S rDNA</i> y <i>mcrA</i> (ND: No determinado) | 65 |

| Índice de Figuras | | Página |
|-------------------|---|--------|
| Figura 1. | Proceso industrial de obtención de azúcar (Acondicionamiento Químico, 2011) | 7 |
| Figura 2. | Sesenta ingenios azucareros en México, de los cuales 27 formaron parte del acuerdo de expropiación (CEFP y Comité de la Agroindustria Azucarera, 2001) | 8 |
| Figura 3. | Generación de subproductos y principales derivados de la agroindustria de la caña de azúcar (Jiménez-Ambriz <i>et al.</i> , 1995) | 10 |
| Figura 4. | Diagrama del equilibrio del proceso anaerobio (Castro-González, 2004) | 13 |
| Figura 5. | Esquema general para la metanogénesis hidrogenófila. MF, metanofurano; MP, metanopterina; CoM, coenzima M; F ₄₂₀ , coenzima F ₄₂₀ reducida; F ₄₃₀ , coenzima F ₄₃₀ ; Co-B, coenzima B (Madigan <i>et al.</i> , 2003) | 17 |
| Figura 6. | Esquema general para la metanogénesis acetoclástica. CH ₃ -COS-CoA, acetil coenzima A; CODH, monóxido de carbono deshidrogenasa; Corr, C ₁ -portador de proteína corrinoide; CoM, coenzima M; CH ₃ -CoM, metil coenzima M (Madigan <i>et al.</i> , 2003) | 18 |
| Figura 7. | Esquema general de la metanogénesis a partir de compuestos metilados. MF, metanofurano; MP, metanopterina; CoM, coenzima M; Corr, C ₁ -portador de proteína corrinoide; CODH monóxido de carbono deshidrogenasa (Madigan <i>et al.</i> , 2003) | 19 |
| Figura 8. | Árbol filogenético en donde se muestra dominio y órdenes de las arqueas metanogénicas (Brochier-Armanet <i>et al.</i> , 2008) | 22 |
| Figura 9. | Diagrama general de la reacción de PCR | 31 |

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 10. | Principio de la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (<i>DGGE</i>). T_m indica la temperatura de fusión, sus siglas son del inglés “melting temperature” (Cariello y Skopek, 1993) | 32 |
| Figura 11. | Análisis de <i>DGGE</i> de tres muestras diferentes (A, B, C) bajo diferentes condiciones de tiempo de corrida (horas) y diferente voltaje (V) (Sigler, 2004) | 33 |
| Figura 12. | Diagrama general de experimentos llevados a cabo | 36 |
| Figura 13. | Reactor tipo RALLFA visto desde la cama de lodos, el enchaquetado y el recubrimiento con lámina de aluminio inoxidable. También se muestra la entrada de influente y la salida de efluente | 37 |
| Figura 14. | Elaboración de gel de agarosa 1.5% para llevar a cabo una electroforesis de muestras de <i>DNA</i> amplificadas | 43 |
| Figura 15. | Cámara de electroforesis conectada a una fuente de poder (Voltímetro) | 43 |
| Figura 16. | Introducción de muestras de <i>DNA</i> amplificado en cada pozo del gel de agarosa elaborado. La nomenclatura de la imagen es la siguiente. M: marcador; M1: <i>DNA</i> amplificado de reactor 45°C, <i>primer</i> 25F-1492R; M1': duplicado de M1; M2: <i>DNA</i> amplificado de reactor 55°C, <i>primer</i> 25F-1492R; M2': duplicado de M2; M3: <i>DNA</i> amplificado de reactor 65°C, <i>primer</i> 25F-1492R; M3': duplicado de M3; m1: <i>DNA</i> amplificado de reactor 45°C, <i>primer</i> ME1/ME2; m1': duplicado de m1; m2: <i>DNA</i> amplificado de reactor 55°C, <i>primer</i> ME1/ME2; m2': duplicado de m2; m3: <i>DNA</i> amplificado reactor 65°C, <i>primer</i> ME1/ME2; m3': duplicado de m3 | 44 |
| Figura 17. | <i>PCR</i> anidada a partir de un producto previamente amplificado por <i>PCR</i> | 46 |

| | |
|--|-----------|
| <p>Figura 18. Cámara de electroforesis para gel desnaturizante. Se observa el regulador de temperatura, la resistencia termoeléctrica para mantener constante la temperatura deseada y el voltímetro que provee la corriente eléctrica que dé paso a la electroforesis</p> | <p>48</p> |
| <p>Figura 19. Gel de agarosa que muestra la amplificación de <i>DNA</i> de arqueas metanogénicas proveniente de tres RALLFA operando a 45, 55 y 65°C. En el carril número 1 se encuentra el marcador de masa molecular que indica el tamaño de las muestras amplificadas por <i>PCR</i>. En los carriles 2, 3 y 4 se observan 3 bandas a 750 pares de bases, éstas corresponden al <i>DNA</i> de arqueas metanogénicas amplificado con los <i>primers ME1/ME2</i>. En los carriles 5, 6 y 7 se observan tres bandas a 1500 pares de bases las cuales corresponden a <i>DNA</i> de arqueas metanogénicas amplificado con el <i>primer 25F-1492R</i></p> | <p>55</p> |
| <p>Figura 20. <i>DGGE</i> con gradiente desnaturizante 50%-80%. A: se observan los tres carriles correspondientes a las muestras de <i>DNA</i> de cada RALLFA (45, 55 y 65°C), así como diferentes bandas en cada carril correspondientes a filotipos de arqueas metanogénicas. B: bandas cortadas del gel. C: esquema con el patrón de bandas obtenido</p> | <p>57</p> |
| <p>Figura 21. <i>DGGE</i> gradiente desnaturizante 40%-60%. A: gel teñido, en el primer carril del lado izquierdo se encuentra el marcador molecular, en los siguientes tres carriles el <i>DNA</i> de arqueas metanogénicas amplificado con el <i>primer A1032F-1434R-GC</i>; en los últimos tres carriles se encuentran las amplificaciones con los <i>primers ME1/ME2</i>. B: bandas definidas para cortar del gel. C: patrón de bandas obtenido</p> | <p>58</p> |

| | |
|--|-----------|
| <p>Figura 22. DGGE con gradiente desnaturizante 40%-70%. A: gel teñido, los primeros tres carriles muestran las bandas de DNA de arqueas metanogénicas amplificado con los primers ME1/ME2, en los siguientes tres se encuentran las amplificaciones con el primer A1032F-1434R-GC. B: bandas definidas en el gel. C: patrón de bandas</p> | <p>58</p> |
| <p>Figura 23. Alineamientos de primer A1032F-1434R. La Fig. a indica el alineamiento del forward o derecho del primer (1032F). La Fig. b indica alineamiento del reverse o reverso (1434R). Mbryantii: <i>Methanobacterium bryantii</i>; Mformicicu: <i>Methanobacterium formicicum</i>; Mbarkeri: <i>Methanosarcina barkeri</i>; Mvacuolata: <i>Methanosarcina vacuolata</i>; Mmazeii: <i>Methanosarcina mazeii</i>; Mlacustris: <i>Methanosarcina lacustris</i>; Mhoronoben: <i>Methanosarcina horonobensis</i>; Memeiae: <i>Methanosarcina semesiae</i>; Mthermoaut: <i>Methanosarcina thermoautotrophicum</i>; Mthermophi: <i>Methanosarcina thermophila</i>; Mcrinale: <i>Methanothermobacter crinale</i>; Mthermophi: <i>Methanothermobacter thermophilum</i>; Mpirillum: <i>Methanospirillum</i> sp.; Mhungatei: <i>Methanospirillum hungatei</i>; Msoehngeni: <i>Methanotherrix soehngeni</i>; Methanosae: <i>Methanosaeta</i> sp.; Marboriphi: <i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>; Msp: <i>Methanobrevibacter</i> sp.; Marbor: <i>Methanobrevibacter arboriphilus</i> SH4; Moralis: <i>Methanobrevibacter oralis</i>; Mlabreanum: <i>Methanocorpusculum labreanum</i></p> | <p>60</p> |

| | |
|---|----|
| <p>Figura 24. Relación filogenética entre secuencias de 16S rDNA y bandas de arqueas metanogénicas de reactores anaerobios tipo RALLFA, obtenidas mediante <i>DGGE</i>. El árbol fue construido con secuencias relacionadas a los géneros <i>Methanoculleus</i>, <i>Methanospirillum</i>, <i>Methanofollis</i> y <i>Methanocropusculum</i>, todos ellos pertenecen al orden Methanomicrobiales. Como grupo externo fue utilizado <i>Cenarchaeum symbiosum</i>. Seguido de cada nombre de microorganismo se encuentra su número de acceso en la base de datos “GenBank” de <i>NCBI</i>. Los números en las líneas de unión del árbol representan el porcentaje de “<i>resampling</i>” por “<i>bootstrap</i>” basado en 1000 árboles</p> | 62 |
| <p>Figura 25. Relación filogenética entre secuencias de <i>mcrA</i> (Coenzima M reductasa) y bandas de arqueas metanogénicas de reactores anaerobios tipo RALLFA, obtenidas mediante <i>DGGE</i>. El árbol fue construido con secuencias relacionadas a los géneros <i>Methanobacterium</i>, <i>Methanothermobacter</i>, que pertenecen al orden Methanobacteriales, y también los géneros <i>Methanoculleus</i> y <i>Methanospirillum</i> que pertenecen al orden Methanomicrobiales. Como grupo externo fue utilizado <i>Methanosaeta pelagica</i>. Seguido de cada nombre de microorganismo se encuentra su número de acceso en la base de datos “GenBank” de <i>NCBI</i>. Los números en las líneas de unión del árbol representan el porcentaje de “<i>resampling</i>” por “<i>bootstrap</i>” basado en 1000 árboles</p> | 64 |

GLOSARIO

| | |
|---|---|
| ΔG° | Energía libre de Gibbs estándar |
| <i>1032F-1434RGC</i> | <i>Primer</i> utilizado en la <i>PCR</i> anidada para el gen <i>16S RNAr</i> |
| <i>16S RNAr</i> | Secuencia empleada como marcador molecular en estudios filogenéticos |
| <i>25F-1492R</i> | <i>Primer</i> que amplifica 1500 pb de la región 16S rDNA de arqueas |
| AGV | Ácidos grasos volátiles |
| $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | Cloruro de aluminio hexahidratado |
| <i>Amplicon</i> | Es una pieza de <i>DNA</i> formada como el producto de eventos de amplificación natural o artificial |
| APS | Persulfato de amonio, en inglés |
| Arquea | Microorganismo que pertenece al dominio Arqueobacteria |
| Arqueas metanogénicas | Microorganismos generadores de metano como producto final de su metabolismo |
| Arquea | Dominio filogenético |
| <i>BLAST</i> | <i>Basic local alignment search tool</i> , en inglés |
| <i>bootstrap</i> | Estimador del nivel de confianza (robustez estadística) de las hipótesis filogenéticas. Consiste en generar pseudomuestras de secuencias cambiando al azar los nucleótidos de sitio en la muestra original, con reemplazamiento (el mismo sitio puede ser muestreado nuevamente con igual probabilidad) |
| <i>BSA</i> | Albúmina de suero bovino, en inglés |
| CaCl_2 | Cloruro de calcio |
| CH_4 | Metano |
| CO_2 | Dióxido de carbono |
| Co-B | Coenzima B |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | Cloruro de cobalto hexahidratado |
| CoM | Coenzima M |

| | |
|---|--|
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | Sulfato de cobre pentahidratado |
| <i>DGGE</i> | Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante, en inglés |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| <i>DNA</i> | Ácido desoxirribonucleico, en inglés |
| <i>DNA</i> metagenómico | <i>DNA</i> extraído de una muestra ambiental y que contiene el material genético de una gran diversidad de organismos y/o microorganismos |
| <i>dNTP</i> | desoxinucleótidos trifosfato, en inglés |
| DQO | Demanda química de oxígeno |
| F ₄₂₀ | Coenzima 420 |
| F ₄₃₀ | Coenzima 430 |
| $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ | Sulfato ferroso amoniacal |
| Formamida | Agente desnaturalizante del <i>DNA</i> |
| H_3BO_3 | Ácido bórico |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| K_2HPO_4 | Fosfato de potasio monobásico |
| kb | kilobase |
| KOH | Hidróxido de potasio |
| <i>mcrA</i> , <i>MCRA</i> | Gen relacionado con la subunidad alfa de la metil coenzima M reductasa. Se utiliza como marcador molecular para estudios de organismos metanogénicos |
| <i>ME1/ME2</i> | <i>Primer</i> que amplifica 750 pb de la subunidad alfa de la metil coenzima M reductasa (Co-M o <i>MCRA</i>) |
| MEB | Microscopía electrónica de barrido |
| Metagenómica | Estudio del conjunto de genomas de un determinado entorno |
| Metanogénesis | Ruta metabólica que implica la generación de metano como producto final. Es un proceso bioquímico característico de arqueas metanogénicas |

| | |
|--------------------------------------|---|
| MF | Metanofurano |
| MgCl ₂ | Cloruro de magnesio |
| MnSO ₄ ·2H ₂ O | Sulfato de manganeso dihidratado |
| MP | Metanopterina |
| Na ₂ SeO ₃ | Seleniuro de sodio |
| NaHCO ₃ | Bicarbonato de sodio |
| <i>NCBI</i> | <i>National Center for Biotechnology Information</i> , en inglés |
| NH ₄ Cl | Cloruro de amonio |
| NiCl ₂ ·6H ₂ O | Cloruro de níquel hexahidratado |
| pb | Pares de bases |
| <i>PCR</i> | Reacción en cadena de la polimerasa, en inglés |
| <i>PCR</i> anidada | <i>PCR</i> en donde se obtiene un nuevo amplicón a partir de uno previamente obtenido por un primer proceso de <i>PCR</i> |
| PIB | Producto interno bruto |
| <i>Primer</i> | Oligómero corto (en este caso de nucleótidos) a los que una enzima adiciona nuevas subunidades monoméricas |
| RALLFA | Reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente |
| <i>RNA</i> | Ácido ribonucleico, en inglés |
| SDS | Dodecilsulfato de sodio, en inglés |
| <i>TAE</i> | Tris-acetato- <i>EDTA</i> utilizado como amortiguador |
| <i>Taq</i> polimerasa | <i>DNA</i> polimerasa proveniente de <i>Thermophilus aquaticus</i> |
| <i>TEMED</i> | Tetrametiléndiamina, en inglés |
| Tm | Temperatura de fusión, en inglés |
| TRH | Tiempo de residencia hidráulica |
| <i>UASB</i> | <i>Upflow anaerobic sludge blanket</i> , en inglés |
| Urea | Agente desnaturalizante del <i>DNA</i> |
| UV | Ultravioleta |
| Vinaza | Residuo obtenido a partir de la destilación alcohólica |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | Sulfato de zinc heptahidratado |

RESUMEN

En esta investigación se dio a conocer la diversidad filogenética de arqueas metanogénicas presentes en tres reactores anaerobios de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA) operando a 45, 55 y 65°C. Dichos reactores se encargan de tratar un agua residual conocida como vinaza proveniente del proceso de destilación alcohólica. Las vinazas poseen un alto contenido de materia orgánica e inorgánica medida como demanda química de oxígeno (DQO) (80 a 120 g L⁻¹), sulfatos (4 a 6 g L⁻¹), potasio (6 a 8 g L⁻¹), nitrógeno total (446 g L⁻¹), ión amonio (730 g L⁻¹), entre otros. Dentro de cada RALLFA se lleva a cabo un proceso de degradación anaerobia o digestión, en donde participan diferentes microorganismos encargados de degradar los contaminantes. Las arqueas metanogénicas son capaces de llevar a cabo un proceso llamado metanogénesis, el cual es el último paso de la degradación anaerobia. El primer estudio llevado a cabo en esta investigación fue de microscopía confocal espectral, en donde la autofluorescencia de las arqueas metanogénicas a 420 nm determinó su presencia en muestras de lodo obtenidas de cada RALLFA. También se llevó a cabo un estudio de microscopía electrónica de barrido. En éste no se logra confirmar presencia de arqueas metanogénicas en la muestra de lodo pero sí dejó ver la morfología de los microorganismos presentes en la muestra ambiental y así se encontró que éstas son poco variadas. En cada muestra se observan morfologías semi-homogéneas, lo que puede ser un indicativo de poca diversidad microbiana en la muestra o bien la dominancia de cierto tipo de microorganismos. Para conocer los filotipos de arqueas metanogénicas presentes en cada RALLFA se desarrolló una metodología. En primer lugar, se extrajo el *DNA* (ácido desoxirribonucleico) metagenómico del lodo proveniente de cada reactor, empleando un kit de extracción de *DNA* llamado “*Power Soil® DNA Isolation Kit. Mo Bio Laboratories*”. Seguido de esto, se procedió a amplificar mediante *PCR* (reacción en cadena de la polimerasa, en inglés) el *DNA* de arqueas metanogénicas obtenido de cada RALLFA. Se utilizaron dos juegos de *primers*: *25F-1492R* y *ME1/ME2*. El primero amplifica 1.6 kilobases (kb) de la región *16S* del *rDNA* (ácido desoxirribonucleico) de arqueas, mientras que el segundo par de

primers amplifican 0.75 kb del gen *mcrA* que codifica para la subunidad alfa (α) de la metil coenzima M reductasa, conocida como *MCR* o Coenzima M (CoM), implicada en el último paso de la metanogénesis. Una vez amplificado el material genético de arqueas metanogénicas se procedió a realizar la técnica de *DGGE* (gel de gradiente con agente desnaturizante, en inglés) con la finalidad de obtener diferentes bandas correspondientes a filotipos de arqueas metanogénicas. Veintiocho bandas cortadas de los geles desnaturizantes fueron enviadas a secuenciar, de estas 28 secuencias fueron seleccionadas 16 y con ellas se elaboraron dos árboles filogenéticos. El primero con las secuencias relacionadas al gen *16S RNAr* y el segundo con las relacionadas al gen *mcrA*. El análisis filogenético mostró que dentro de los RALLFA existen dos órdenes de arqueas metanogénicas que predominan: se refiere al orden Methanomicrobiales y Methanobacteriales. El orden Methanomicrobiales mostró ser dominante y encontrarse en mayor proporción de los generos *Methanoculleus*, seguida de *Methanospirillum*, *Methanofollis* y *Methanocorpusculum*. Del orden Methanobacteriales los géneros presentes fueron *Methanobacterium* y *Methanothermobacter*. Las especies encontradas en la filogenia de los RALLFA correspondió mayoritariamente a arqueas metanogénicas hidrogenotróficas, esto significa que la formación de metano en los RALLFA es a partir de CO_2 e H_2 , dejando en una proporción muy pequeña la metanogénesis a partir de acetato y de compuestos metilados.

CAPÍTULO 1. PROBLEMÁTICA

1.1. Introducción

En la actualidad los problemas de índole ambiental se han convertido en un riesgo no solamente para el ambiente, sino también, para la población humana. Es por ello que hoy en día existen diversas propuestas y proyectos enfocados en la prevención y remediación de problemas por contaminación ambiental, uno de ellos es la biorremediación o biotransformación. Ésta es una estrategia utilizada para eliminar y/o degradar contaminantes de ambientes tanto de la atmósfera, hidrosfera, litosfera y geosfera, que han sido dañados por diversos agentes. Un proceso de biorremediación es un proceso espontáneo o estimulado, basado en el uso de microorganismos y las enzimas que ellos producen para degradar y eliminar agentes contaminantes ya sea de origen químico o biológico. Los organismos pueden ser nativos del sitio a remediar o adicionados al sistema (Illman, 2006). El diseño sistemático y aplicación de microorganismos para el tratamiento de agua residual tiene alrededor de cien años, sin embargo la biorremediación *in situ* (estimulada) se ha venido utilizando desde hace poco tiempo. Este avance logró solidez y aceptación una vez que se comprobó que bajo condiciones adecuadas ciertos microorganismos son capaces de degradar uno o varios componentes que suelen ser contaminantes.

En este trabajo de investigación se estudió un proceso de biorremediación en donde al utilizar tres reactores anaerobios de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA) operando a 45, 55 y 65°C respectivamente, ofrecen un tratamiento biológico a un agua residual proveniente de la industria azucarera-alcoholera conocido como vinaza, que es un efluente que se descarga a temperaturas entre 55 y 80°C. Las vinazas tratadas en el laboratorio provienen de un ingenio azucarero cooperante ubicado en el estado de Veracruz.

Por todo lo expuesto, el interés de este trabajo recae directamente en el estudio de las poblaciones de arqueas metanogénicas presentes en cada uno de los reactores tipo RALLFA.

1.1.1. Planteamiento del problema

Las vinazas contienen materia orgánica abundante que, a la fecha, no se ha determinado con exactitud puesto que ésta varía según el origen, el tipo de materia prima utilizada y las condiciones de operación de los procesos. En general, se sabe que contiene compuestos carbonosos que incluyen fenoles y polímeros naturales, más otros como amonio, sulfatos y potasio. Debido a que las vinazas provienen de un proceso de destilación, su temperatura de evacuación es entre 55 y 80°C que, al ser desechadas, incrementan la temperatura de los cuerpos receptores (cuerpos de agua o suelo) perdiendo su energía calorífica y disminuyendo la cantidad de oxígeno disuelto disponible. Por otro lado al poseer un pH de carácter ácido (entre 5 y 5.5) acidifican el cuerpo receptor, lo cual puede disolver algunos metales y volverlos biodisponibles (Bernal-González *et al.*, 2002). Todo esto ha llevado a desarrollar tratamientos anaerobios en biodigestores para degradar gran parte de los componentes de las vinazas y al mismo tiempo en estos procesos se obtiene biogás rico en metano que puede ser utilizado como energía para producir vapor de agua para el proceso de destilación del etanol, logrando así un ahorro de combustible que genera CO₂ contaminación ambiental.

1.1.2. Justificación del trabajo

Ya que las vinazas son generadas a temperaturas muy altas (55 a 80°C) se debe aplicar un tratamiento anaerobio termofílico en reactores tipo RALLFA que operen en dichas condiciones y en donde se encuentren consorcios microbianos de arqueas metanogénicas los cuales asumen un importante papel en el proceso de degradación anaerobia llevando a cabo la metanogénesis.

1.1.3. Hipótesis

En los reactores anaerobios o biodigestores tipo RALLFA, reactores anaerobios de lecho de lodos de flujo ascendente que operan a 45, 55 y 65°C, se encuentran consorcios de arqueas metanogénicas ocluidas en los lodos de cada reactor y, a su vez participan en la última etapa de la degradación anaerobia generando metano como producto final de su metabolismo.

1.1.4. Objetivos

1.1.4.1. Objetivo general

Estudiar la diversidad filogenética de arqueas metanogénicas presentes en tres reactores tipo RALLFA operando en condiciones termofílicas a 45, 55 y 65°C, encargados del tratamiento de aguas residuales conocidas como vinazas provenientes de la industria alcohólica.

1.1.4.2. Objetivos particulares

- Realizar un estudio de microscopía confocal espectral y microscopía electrónica de barrido de consorcios microbianos de arqueas metanogénicas.
- Extraer y purificar el *DNA* metagenómico a partir de los lodos presentes en cada uno de los RALLFA.
- Amplificar mediante *PCR* el *DNA* de arqueas metanogénicas utilizando dos *primers*: *25F-1492R* y *ME1/ME2*.
- Realizar un análisis por electroforesis en gel de gradiente con desnaturalización (*DGGE*) para estudiar la diversidad filogenética en cada RALLFA.
- Secuenciar los filotipos encontrados a partir del estudio de *DGGE* y obtener la secuencia nucleotídica de éstos.
- Hacer un análisis bioinformático de las secuencias obtenidas, elaborar árboles filogenéticos con el programa Seaview y la plataforma bioinformática *ATGC: Montpellier Bioinformatics platform*.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

2.1. Industria azucarera

La caña de azúcar (*Saccharum officinarium*) es uno de los cultivos más viejos en el mundo. Se cree que comenzó hace aproximadamente 3,000 años como un tipo de césped en la isla de Nueva Guinea y de ahí se extendió a Borneo, Sumatra e India. En el Atharvaveda, libro sagrado hindú escrito aproximadamente en el año 800 a.C., se describe una corona hecha de caña de azúcar. Tiempo después en el año 1493 Cristóbal Colón introduce la caña de azúcar en la Isla de La Española; sin embargo, las plantas no prosperaron. No fue sino hasta el año 1501, cuando la caña de azúcar se llevó y plantó en la ciudad de Santo Domingo de la hoy República Dominicana, que logró adaptarse al ecosistema y crecer adecuadamente. El éxito de su plantación en ese país logró que el cultivo se llevara a lo largo del Caribe y América del sur (Mora, 1998). Cortés la trajo a México y su cultivo en el hoy estado de Veracruz es muy extendido contando este estado con el mayor número de fábricas que la procesan. La industria azucarera tiene una tecnología con 450 años de antigüedad en promedio (Durán-de-Bazúa, 2007).

A lo largo de estos años, esta industria ha sido un ejemplo en donde se aplican técnicas de “costos conjuntos”, esto significa que en diferentes puntos del proceso se obtienen múltiples productos tales como azúcar, miel, bagazo, cachaza, entre otros. La producción de la industria azucarera puede considerarse compleja por la variedad de productos y subproductos que en ella se obtienen, así como por las múltiples operaciones que constituyen la cadena productiva principal y auxiliar (Fiandor-Rosario, 2008). La industria azucarera representa una parte muy importante de la economía los países que la poseen. Sin embargo, en los últimos años, en el mercado azucarero no se han logrado precios competitivos, mientras que los de la energía y otros productos han ido en aumento. En la Fig. 1 se muestra el proceso de obtención de azúcar y otros productos; se puede observar que es un proceso largo y complejo y consta de varias etapas.

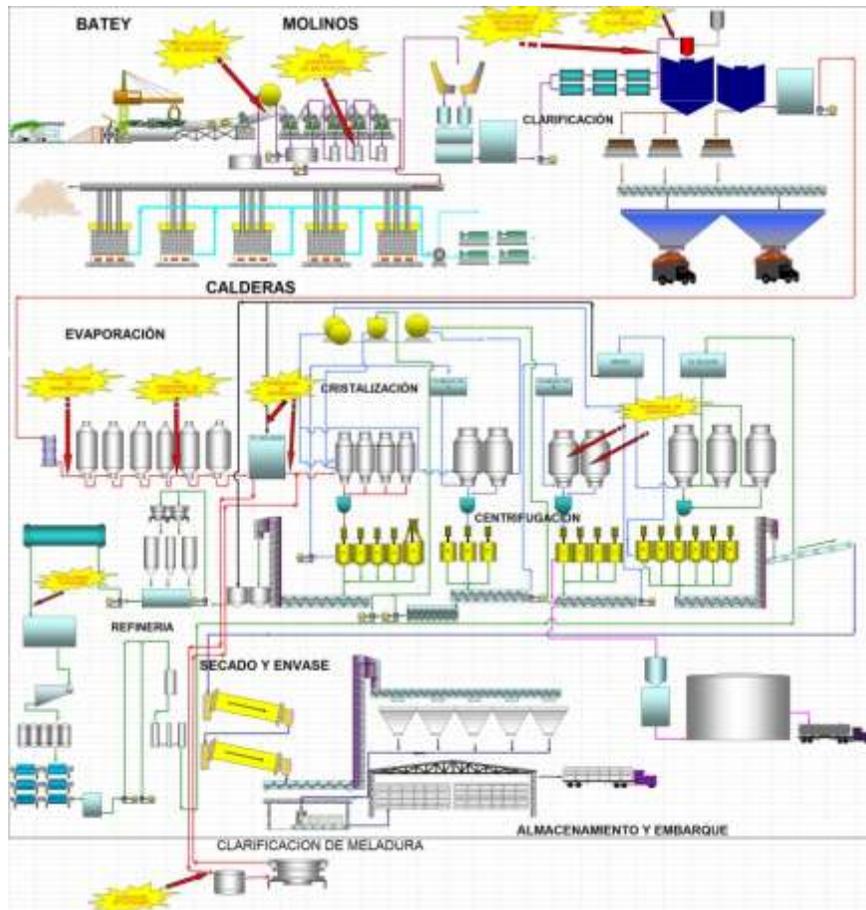


Fig. 1. Proceso industrial de obtención de azúcar (Acondicionamiento Químico, 2011)

2.1.1. Panorama nacional e internacional

En el continente americano, los principales países productores de azúcar se encuentran en América Latina y en la región del Caribe. Entre ellos se encuentran México, Cuba, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Nicaragua, Brasil, República Dominicana. Estos países constituyen la principal región azucarera del mundo, con más del 30% de producción de azúcar y el 45% de las exportaciones mundiales de ese producto, destinándose para cada región alrededor de 7 millones de hectáreas para el cultivo de caña de azúcar (CEFP y Comité de la Agroindustria Azucarera, 2001).

Otro país con gran producción de azúcar es Australia, que cuenta con 27 ingenios azucareros y 7 puertos de embarque de azúcar a granel; la producción de azúcar

equivale al 3.5% del PIB agrícola del país y es la quinta industria rural después de la carne de res, trigo, lana y productos lácteos. Mundialmente produce el 4.5% de azúcar y participa con el 15% del mercado libre mundial de azúcar (PROCAÑA, 2005).

A partir de la entrada en vigor del TLC-AN en enero de 1994, México acordó la exportación a Estados Unidos de 25 mil toneladas de azúcar durante los primeros 6 años de operación del tratado, exportando sin límite la sobre-producción de azúcar a ese país. Sin embargo, en el año 2000 Estados Unidos anunció que la cuota máxima de exportación de azúcar originaria de México sería de 116 mil toneladas, violando los acuerdos firmados. Nada ha pasado sin embargo, ya que los gobiernos mexicanos no han cancelado el tratado, a pesar de las múltiples violaciones por parte de los EEUU. En el año 2001 el mercado de azúcar enfrentó problemas originados por la apertura comercial, puesto que el costo de producción de una tonelada de azúcar estándar o refinada en México estaba entre 400 y 500 dólares, mientras que en el mercado internacional el promedio era de 194 dólares. Por consecuencia, en ese mismo año la industria azucarera enfrentó problemas de financiamiento y de pagos a cañeros, por lo que el gobierno federal tomó la decisión de privatizar 27 de los 60 ingenios que funcionaban en el país (Fig. 2).

| Ingenio | % | Ingenio | % |
|---|-------|--|-------|
| NACIONAL (PONDERADO) | | | |
| 1 ATENCINGO | 13.02 | 31 MOTZORONGO | 11.07 |
| 2 PABLO MACHADO (La Margarita) | 12.63 | 32 EL MANTE | 11.04 |
| 3 ADOLFO LOPEZ MATEOS | 12.52 | 33 EL REFUGIO | 11.03 |
| 4 PLAN DE SAN LUIS | 12.47 | 34 CONSTANCIA | 11.00 |
| 5 LAZARO CARDENAS | 12.31 | 35 AARON SAENZ (XICO) | 10.98 |
| 6 EL MOLINO | 12.26 | 36 SAN RAFAEL DE PUCTE | 10.92 |
| 7 PUJILITIC | 12.15 | 37 POTE BENITO JUAREZ | 10.91 |
| 8 MELCHOR OCAMPO | 12.14 | 38 PEDERNALES | 10.91 |
| 9 TAMAZULA | 12.09 | 39 EL CARMEN | 10.81 |
| 10 TRES VALLES | 12.05 | 40 JOSE MARIA MARTINEZ (TALA) | 10.75 |
| 11 MAHUITLAN | 12.05 | 41 SANTA CLARA | 10.74 |
| 12 ALIANZA POPULAR | 11.99 | 42 CASASANO | 10.74 |
| 13 LA GLORIA | 11.92 | 43 QUESERIA | 10.66 |
| 14 SAN JOSE DE ABAJO | 11.79 | 44 SAN FRANCISCO EL NARANJAL | 10.60 |
| 15 SN MIGUEL DEL NARANJO | 11.76 | 45 SANTA ROSALIA (Azucarera de la Chontalpa) | 10.58 |
| 16 CENTRAL PROGRESO | 11.70 | 46 LA CONCEPCION | 10.40 |
| 17 PUGA | 11.73 | 47 SAN GABRIEL | 10.34 |
| 18 EL MODELO | 11.66 | 48 AZSUREMEX-TENOSIQUE | 10.34 |
| 19 ZAPOCAPITA (Fomento Azucarero del Golfo) | 11.61 | 49 SANTO DOMINGO | 10.28 |
| 20 SAN NICOLAS | 11.59 | 50 SAN CRISTOBAL (impulsora de la Cuenca del Papaloapan) | 10.20 |
| 21 BELLAVISTA | 11.51 | 51 LA JOYA | 10.14 |
| 22 PLAN DE AYALA | 11.49 | 52 CALIPAM | 10.04 |
| 23 JOSE MARIA MORELOS | 11.48 | 53 SAN PEDRO | 9.91 |
| 24 LA PROVIDENCIA | 11.37 | 54 ELTORADO | 9.68 |
| 25 EMLIANO ZAPATA | 11.32 | 55 HUIXTLA | 9.44 |
| 26 SAN MIGUELITO | 11.29 | 56 CUATOTOLAPAM (Industrial Azucarera) | 8.38 |
| 27 EL HIGO | 11.21 | 57 LOS MOCHIS | 9.05 |
| 28 SAN SEBASTIAN | 11.16 | 58 LA PRIMAVERA | 8.14 |
| 29 EL POTRERO | 11.13 | 59 INDEPENDENCIA | 7.88 |
| 30 SAN FRANCISCO AMECA | 11.09 | 60 DOS PATRIAS | 7.07 |

Fig. 2. Sesenta ingenios azucareros en México, de los cuales 27 formaron parte del acuerdo de expropiación (CEFP y Comité de la Agroindustria Azucarera, 2001)

2.1.2. Problemática de contaminación ambiental causada por la industria azucarera-alcoholera

Una vez que la caña de azúcar es cortada se destina a su procesamiento, del cual se obtienen diferentes productos como se observa en la Fig. 3. Un producto de gran interés mundial es el etanol. Según datos estadísticos, el 46% del etanol generado a nivel mundial se obtiene del azúcar y el 54% restante de granos como maíz (INE, 1997). La cifra promedio de producción de etanol anualmente es de 50 mil millones de litros, mostrando como principales productores de etanol a Estados Unidos, Brasil, China e India. Sin embargo, como en todo proceso industrial existe generación de residuos, en este caso el residuo generado lleva el nombre de vinaza. Al inicio del proceso el medio de cultivo debe ser acidulado hasta valores de pH de 3.0 para reducir la actividad de organismos que compitan con las levaduras para consumir la fuente de carbono (generalmente se hace con ácido sulfúrico), después de 24 horas de fermentación, el alcohol etílico obtenido en el mosto fermentado o vino, debe ser concentrado mediante una destilación, desde 10 o 12 hasta 96% v/v. En este proceso se generan entre 12 y 14 litros de aguas residuales por litro de alcohol destilado, estas aguas residuales son conocidas como vinazas (Castro-González *et al.*, 2004; 2001).

2.1.3. Vinazas

Las vinazas se caracterizan por tener un pH ácido entre 3 y 4, un elevado contenido de materia orgánica e inorgánica disuelta, coloidal y en suspensión (medida como demanda química de oxígeno: 80-120 g DQO L⁻¹), sulfatos: 4-6 g L⁻¹, potasio: 6-8 g L⁻¹, sólidos totales: 80-120 g ST L⁻¹ y temperatura de evacuación superior a 55 a 80°C. La disposición que se le da a esta agua residual resulta ser en suelo o cuerpos de agua, de manera que la disposición más común es el riego de las plantaciones de caña con vinazas, ya sean diluidas con agua de riego o con otras aguas de proceso o, incluso, “crudas”. También suelen ser desechadas directamente en cualquier cuerpo de agua ya sea río o mar.

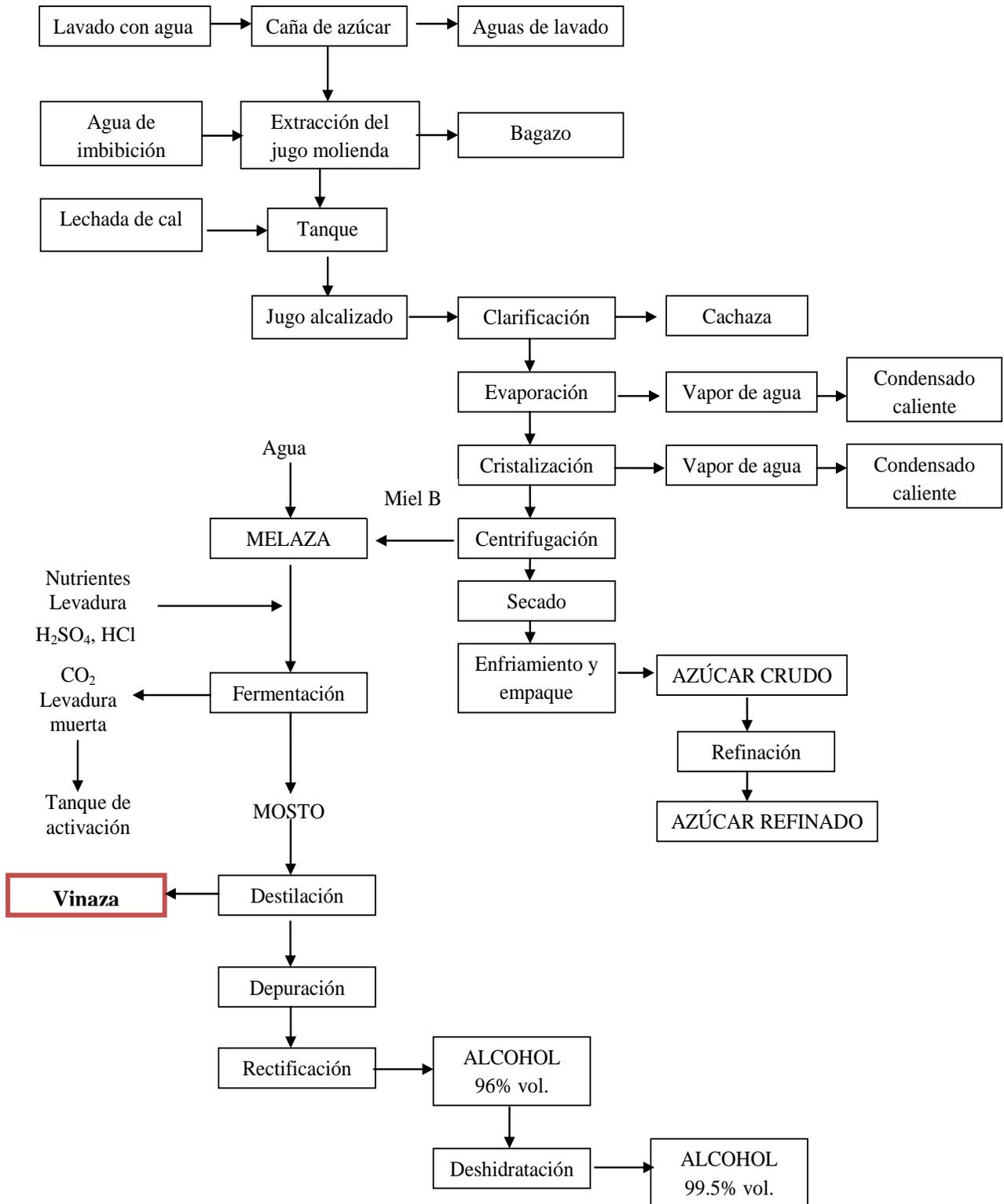


Fig. 3. Generación de subproductos y principales derivados de la agroindustria de la caña de azúcar (Jiménez-Ambriz *et al.*, 1995)

Una vez desechadas las vinazas, existe la posibilidad de que los microorganismos presentes logren degradar los compuestos mediante procesos anaerobios y/o aerobios, sin embargo la mayoría de los microorganismos son mesofílicos, es decir, su temperatura óptima de proliferación y trabajo es entre los 30 a 37°C y las vinazas son desechadas a temperaturas mayores a los 55 a 80°C de tal suerte que no sólo no permite que los microorganismos no degraden los compuestos sino que también provoca la muerte de gran parte de éstos, puesto que son sometidos a un estrés fisiológico y ambiental. Con el paso del tiempo, la salinidad y acidez en el cuerpo receptor se altera y se desestabiliza, además de que la cantidad de oxígeno disuelto disminuye considerablemente (Castro-González *et al.*, 2004, 2001). En consecuencia, los suelos de buena calidad agrícola se convierten en suelos infértiles, la disminución de pH en un cuerpo acuífero afecta directamente a la flora y fauna de dicho ecosistema. El impacto consecuente al proceso de contaminación y degradación ambiental por la inadecuada disposición de vinazas obliga a plantear una alternativa que dé solución a esta problemática a manera de que los efectos negativos disminuyan y se mejore la calidad de suelo, agua y ambiente en general.

2.2. Conceptos básicos de un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA)

Como propuesta para el tratamiento de las vinazas se ha sugerido el uso de un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente mejor conocido como RALLFA o *UASB* (por sus siglas en inglés *upflow anaerobic sludge blanket*). El proceso de tratamiento anaerobio es reconocido y utilizado como uno de los principales métodos y tecnologías para protección y preservación del ambiente, además de que representa un método sustentable que se ha venido utilizando principalmente en países del continente europeo, Asia y América. Como principales ventajas de los reactores tipo RALLFA se encuentra que su diseño es simple y resultan ser muy eficientes removiendo contaminantes. Además, la energía de consumo en el sistema es baja y el uso de equipo sofisticado es

mínimo. Todas estas características son de suma importancia, considerando que a nivel industrial no solamente importa la eficiencia sino también los costos (Seghezzo *et al.*, 1998).

Los reactores RALLFA fueron desarrollados para el tratamiento de aguas residuales industriales o bien efluentes domésticos con una concentración de materia orgánica media y elevada. De manera resumida se puede decir que es un tanque en el cual las aguas residuales son introducidas en la parte inferior y salen por la parte superior, estableciendo un flujo ascendente, siendo la mezcla del sistema promovida por la turbulencia que genera el flujo ascendente del fluido y por las burbujas de gas. Constan de tres partes principales:

1. Sistema hidráulico. En este proceso el agua residual entra al digester por el fondo y fluye hacia arriba a través de un lecho de lodos granulares relativamente denso y de un manto de partículas de lodo floculado. Dentro de esta zona se efectúa principalmente la conversión de materia orgánica a metano y dióxido de carbono
2. Lecho de lodos granulares, es la parte bioquímicamente activa del reactor gracias a los consorcios microbianos aquí presentes y
3. Una cámara superior de acumulación de gas (Díaz *et al.*, 2002).

2.2.1. Generalidades de proceso anaerobio (digestión)

La digestión o degradación anaerobia es el proceso metabólico a través del cual la materia orgánica se degrada hasta moléculas sencillas por la actividad simultánea o secuencial de bacterias anaerobias facultativas o estrictas. En la naturaleza ocurre en las zonas de bajo o nulo contenido de oxígeno, como el rumen de los herbívoros, lagos eutróficos, pantanos y fondos marinos. En forma controlada, la tecnología ambiental ha logrado obtener ventajas de las relaciones de interdependencia que existen entre las bacterias, las cuales forman el consorcio microbiano anaerobio (Zehnder, 1988). El proceso de digestión consta de múltiples fases o subprocesos en donde se llevan a cabo reacciones en serie, en la Fig. 4 se ilustran claramente las fases principales que componen al proceso.

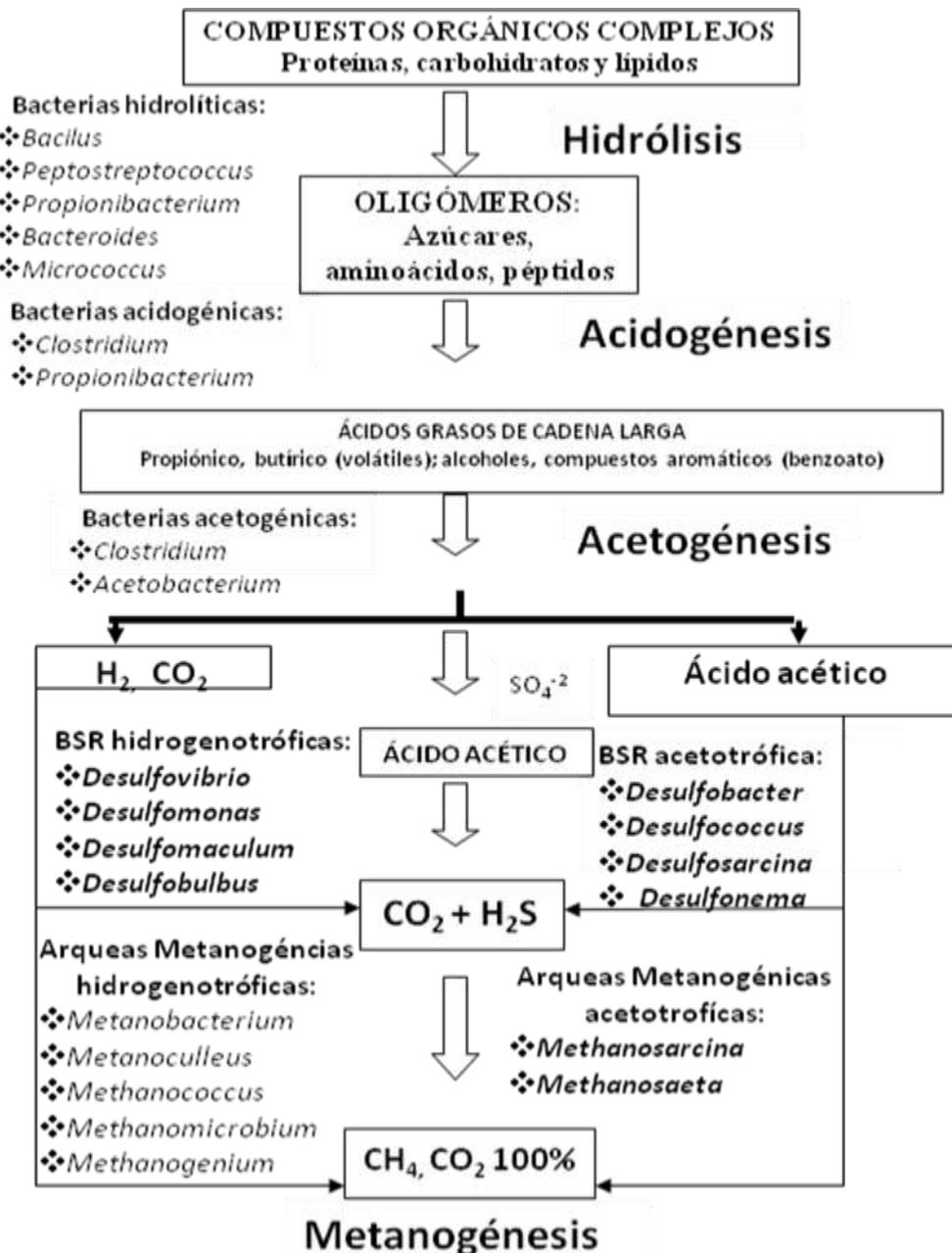


Fig. 4. Diagrama del equilibrio del proceso anaerobio (Castro-González et al., 2004)

2.2.2. Bioquímica y microbiología de la digestión

2.2.2.1. Hidrólisis

Es el paso inicial de la degradación anaerobia, consiste principalmente en la ruptura de polímeros complejos (lípidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos) hasta oligómeros (péptidos, oligosacáridos, etc.) y monómeros (ácidos grasos, aminoácidos, monosacáridos y bases nitrogenadas), como resultado de la

actividad de las exoenzimas (e.g. celulasas, amilasas, proteasas y lipasas) de las bacterias hidrolíticas. En esta etapa se encuentran bacterias anaerobias estrictas y facultativas como el género *Bacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Micrococcus*, etc.

Esta etapa es muy importante ya que constituye un paso limitante para el proceso de digestión o degradación anaerobia, sobre todo cuando se trata de residuos con alto contenido de sólidos y da inicio a la transferencia de masa interespecie al solubilizar los polímeros complejos que se encuentran en el medio circundante (Madigan *et al.*, 2003).

2.2.2.2. Acidogénesis

Debido a la biodegradación de los monómeros obtenidos en la etapa anterior, se producen ácidos grasos volátiles de cadena corta y larga, como ácido propiónico, butírico, n-valérico y caproico. El grupo fisiológico de bacterias que lleva a cabo este proceso está conformado por anaerobias estrictas, y los productos originados varían con el tipo de bacterias, sustratos y las condiciones de cultivo, principalmente temperatura, pH y potencial redox (Bitton, 1994). Algunas de las especies capaces de llevar a cabo esta función son *Acetovibrio cellulolyticum*, *Butyrivibrio* sp., *Clostridium* sp., *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Escherichia* sp., *Micrococcus* sp., *Propionibacterium* sp., *Ruminococcus* sp. y *Bacteroides* sp.

2.2.2.3. Acetogénesis

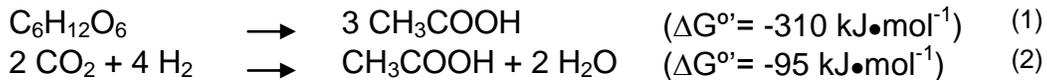
Durante esta etapa se genera ácido acético como uno de los principales productos finales de la misma, así como formiato, CO₂ y H₂. Existen dos vías para la acetogénesis:

- Vía homoacetogénica: transformación solamente en acetato a partir de alcoholes, ácidos grasos volátiles (AGV) o dióxido de carbono (CO₂) e hidrógeno (H₂), esto se conoce como acetogénesis por hidrogenación e

intervienen microorganismos como *Clostridium aceticum* y *Acetobacterium woodii* (Madigan *et al.*, 2003).

- Vía heterodegradadora: producción principalmente de acetato a partir de CO₂ y H₂ (acetogénesis por deshidrogenación), principalmente por actividad de la enzima carbono monóxido deshidrogenasa (Madigan *et al.*, 2003).

Las estequiometrías para ambas vías se ejemplifican con las siguientes reacciones 1 y 2:



2.2.2.4. Metanogénesis

Es la etapa final del proceso de digestión o degradación anaerobia, en ésta se “mineraliza” la materia orgánica hasta metano y dióxido de carbono gracias a la actividad de las arqueas metanogénicas que toman como sustrato al acetato, CO₂, formato, metanol y algunas metilaminas. La metanogénesis tiene lugar a través de tres vías: metanogénesis hidrogenófila, metanogénesis acetoclástica y metanogénesis a partir de compuestos metilados. Cada una de estas vías implica un cambio energético de reacción medido en ΔG° . En la Tabla 1 se describen algunas de las principales reacciones llevadas a cabo en la metanogénesis.

a) Metanogénesis hidrogenófila

Es una vía autotrófica en donde participan bacterias metanógenas hidrogenófilas como *Methanospirillum sp.*, *Methanobacterium sp.*, *Methanococcus sp.* y *Methanopyrus sp.* Por esta vía, a partir de la reducción de dióxido de carbono, se genera metano.

La reducción de CO₂ a CH₄ se realiza a través de la ruta de coenzimas portadoras de compuestos de un átomo de carbono (C₁). En la Fig. 5 se muestra la vía de la metanogénesis a partir de CO₂ y la participación de las coenzimas involucradas en esta vía.

Tabla 1. Reacciones implicadas en la metanogénesis y sus respectivos valores energéticos en energía libre de Gibbs estándar (Whitman *et al.*, 2006)

| Reacción | ΔG° (kJ mol ⁻¹ metano) |
|---|---|
| 4 H ₂ + CO ₂ → CH ₄ + 2 H ₂ O | -135.6 |
| 4 Formato → CH ₄ + 3 CO ₂ + 2 H ₂ O | -130.1 |
| 4 2-Propanol + CO ₂ → CH ₄ + 4 Acetona + 2 H ₂ O | -36.5 |
| 2 Etanol + CO ₂ → CH ₄ + 2 Acetato | -116.3 |
| Metanol + H ₂ → CH ₄ + H ₂ O | -112.5 |
| 4 Metanol → 3CH ₄ + CO ₂ + 2 H ₂ O | -104.9 |
| 4 Metilamina + 2 H ₂ O → 3CH ₄ + CO ₂ + 4 NH ₄ ⁺ | -75.0 |
| 2 Dimetilamina + 2 H ₂ O → 3CH ₄ + CO ₂ + 2NH ₄ ⁺ | -73.2 |
| 4 Trimetilamina + 6H ₂ O → 9CH ₄ + 3CO ₂ + 4NH ₄ ⁺ | -74.3 |
| 2 Dimetilsulfito + 2H ₂ O → 3CH ₄ + CO ₂ + H ₂ S | -73.8 |
| Acetato → CH ₄ + CO ₂ | -31.0 |

b) Metanogénesis acetoclástica

Es una vía acetotrófica, es decir, a partir de la reducción de acetato se genera como producto final metano. Esta vía es muy importante en ambientes naturales, ya que aproximadamente el 70% del metano producido proviene de ésta puesto que el acetato está presente en muchos ambientes. El más común es en ambientes anóxicos en agua dulce, en donde el catabolismo del acetato por otros anaerobios es limitado por la disponibilidad de aceptores de electrones alternativos como el sulfato o nitrato.

Las bacterias que llevan a cabo este proceso son bacterias acetoclásticas que se ubican en el grupo de las bacterias quimioorganótrofas puesto que obtienen su energía y fuente de carbono a partir de compuestos orgánicos. Dos de los géneros característicos son: *Methanosarcina* sp. y *Methanosaeta* sp. (Whitman *et al.*, 2006).

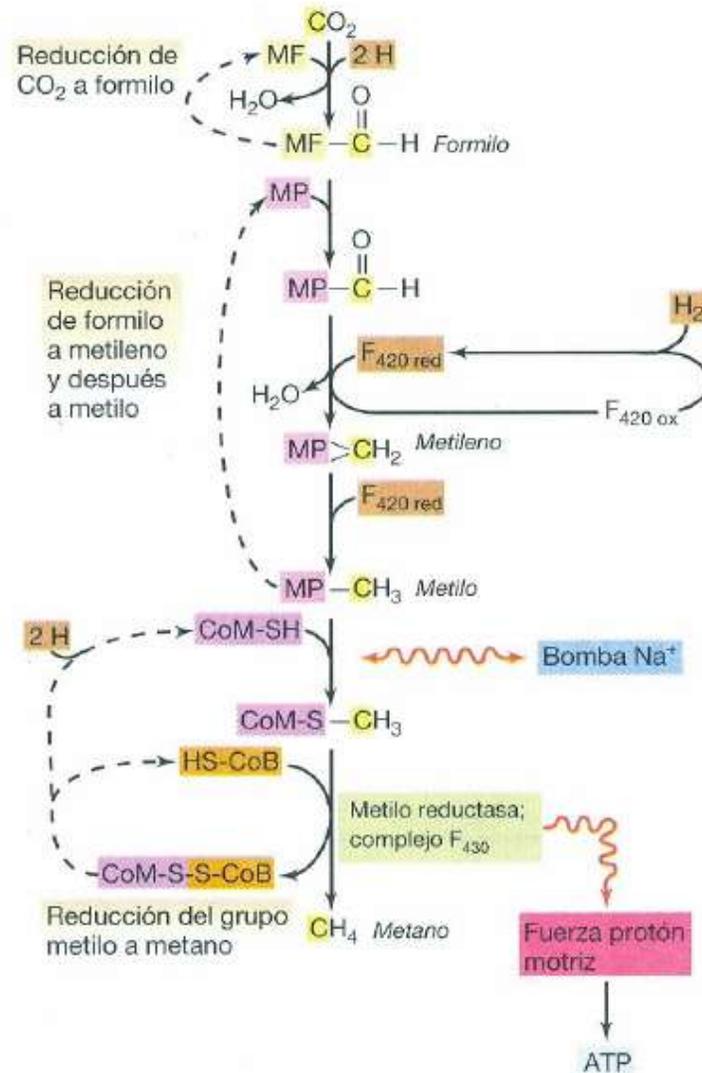


Fig. 5. Esquema general para la metanogénesis hidrogenófila. MF, metanofurano; MP, metanopterina; CoM, coenzima M; F₄₂₀, coenzima F₄₂₀ reducida; F₄₃₀, coenzima F₄₃₀; Co-B, coenzima B (Madigan *et al.*, 2003)

Realizan la metanogénesis mediante la oxidación del grupo carboxilo del ácido acético hasta dióxido de carbono y la reducción del grupo metilo hasta metano.

El acetato se activa como acetil-CoA por catálisis de la acetil-CoA sintetasa. El complejo CODH cataliza la ruptura del acetil-CoA; este complejo posee un componente hierro-cobre y otro hierro-azufre, los cuales le permiten tener niveles de oxidación adecuados. También se utiliza para sintetizar compuestos carbonosos a partir de CO₂ (Fig. 6) (Madigan *et al.*, 2003).

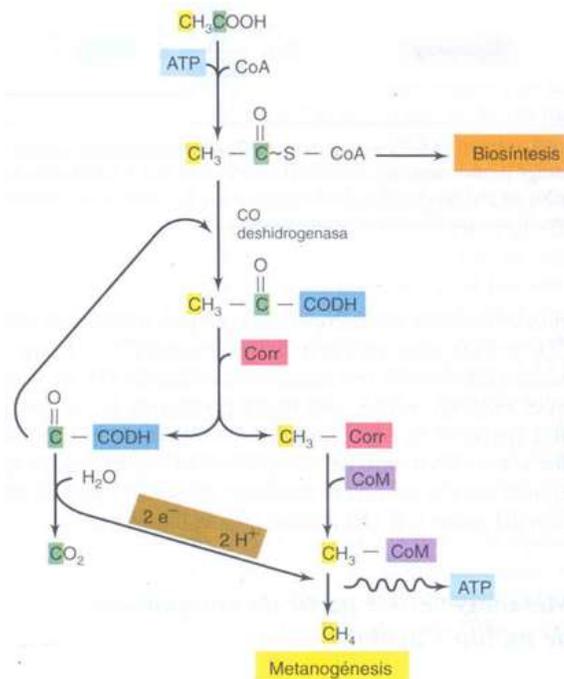


Fig. 6. Esquema general para la metanogénesis acetoclástica. $\text{CH}_3\text{-COS-CoA}$, acetil coenzima A; CODH, monóxido de carbono deshidrogenasa; Corr, C_1 -portador de proteína corrinoide; CoM, coenzima M; $\text{CH}_3\text{-CoM}$, metil coenzima M (Madigan *et al.*, 2003)

c) Metanogénesis a partir de compuestos metilados

Estos compuestos, como el metanol, son catabolizados pasando grupos metilo a una proteína corrinoide, formando $\text{CH}_3\text{-corrinoide}$. Este complejo cede el grupo metilo a la CoM, dando $\text{CH}_3\text{-CoM}$ y a partir de éste se forma metano de la misma manera que en el paso final de la reducción de CO_2 en la metanogénesis hidrogenófila.

2.3. Arqueas metanogénicas

Si bien es importante saber que la metanogénesis es la última etapa del proceso de degradación anaerobia, también es importante conocer quiénes son los encargados de llevar a cabo este proceso. Es así como se llega a las arqueas metanogénicas, las cuales producen metano como uno de los productos finales de su metabolismo energético (Fig. 7).

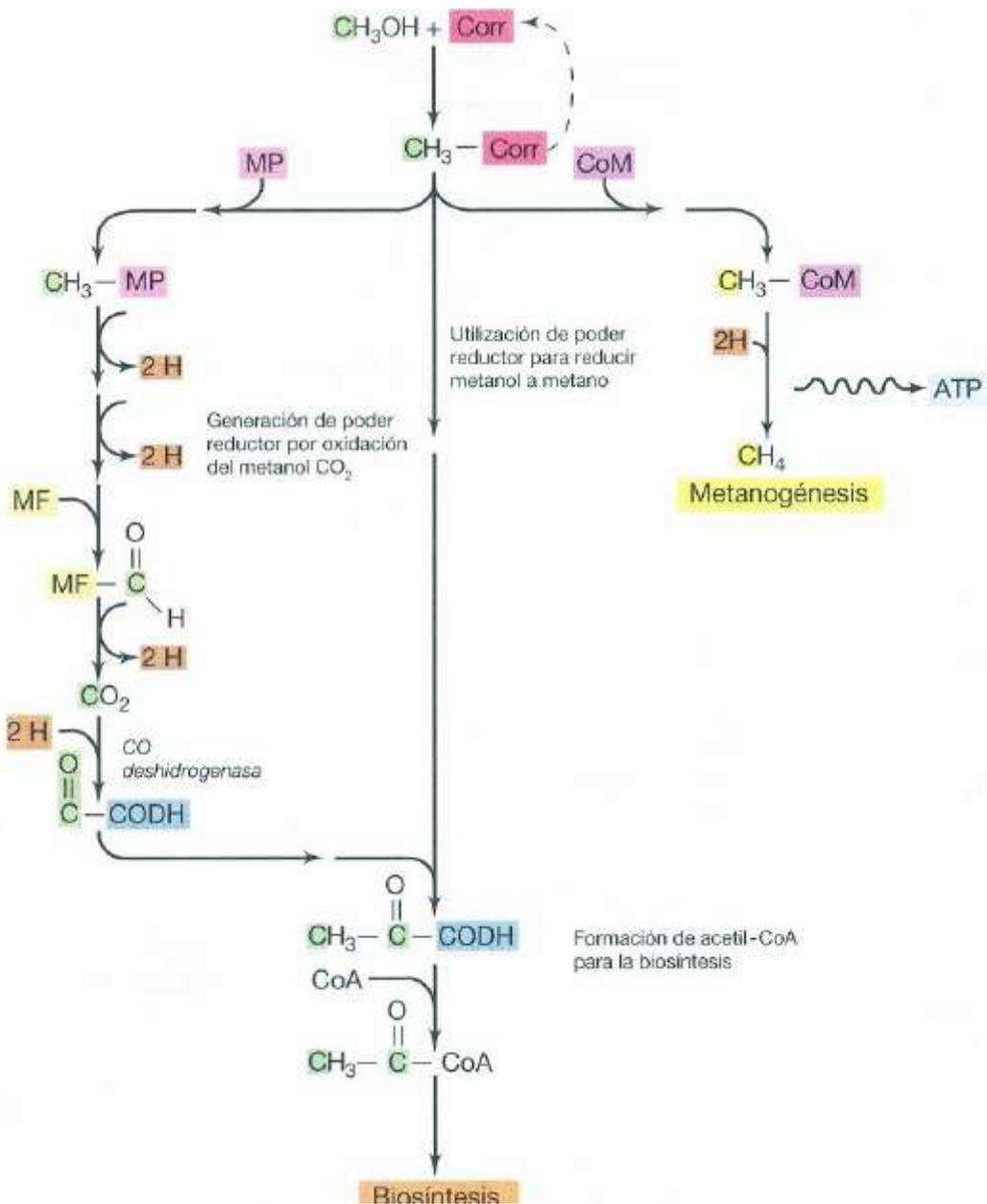


Fig. 7. Esquema general de la metanogénesis a partir de compuestos metilados. MF, metanofurano; MP, metanopterina; CoM, coenzima M; Corr, C₁-portador de proteína corrinóide; CODH monóxido de carbono deshidrogenasa (Madigan *et al.*, 2003)

El hábitat de los metanógenos suele ser sedimentos anóxicos como fangos pantanosos, sedimentos de lagos o bien suelos saturados con alta humedad. Por otra parte también pueden encontrarse en tractos digestivos de animales como vacas, ovejas, camellos, ciervos e insectos celulolíticos. Se llegan a encontrar en humedales, biodigestores y en fuentes hidrotermales submarinas aunque esta última fuente ha sido la menos estudiada (Whitman *et al.*, 2006).

Las arqueas metanogénicas pertenecen al dominio Arquea o Arqueobacteria, sin embargo no siempre se clasificaron dentro de este dominio. En un principio se les consideraba parte del dominio Bacteria. Para el año de 1972 existía el reporte de al menos 6 organismos metanogénicos: *Methanococcus vanniellii*, *Methanobacterium ruminantium*, *Methanobacterium mobilis*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanosarcina barkeri* y *Methanobacterium thermoautotrophicus*. Sin embargo estos microorganismos reportados presentaban características no convencionales de bacteria. Fue hasta el año de 1977 que Carl R. Woese junto con George E. Fox, realizaron un estudio de secuenciación de *RNA* ribosomal de diferentes microorganismos, entre ellos el de metanógenos aislados anteriormente. Este estudio filogenético reveló que existen tres líneas de descendencia: eubacteria que comprende todas las bacterias típicas, arqueobacteria que contiene metanógenos y urcariontes, representado por el componente de citoplasma de las células eucariotas (Woese y Fox, 1977).

Entre las principales características del dominio Arquea que lo distinguen de Bacteria, se encuentran las siguientes (Whitman *et al.*, 2006):

- Capacidad de habitar en ambientes extremos, generalmente termófilos.
- Lípidos compuestos de éteres de glicerol, isoprenoides y tetraéteres
- La estereoquímica lipídica es 2,3-sn glicerol
- La pared celular está compuesta por proteína, glicoproteína o pseudomureína
- La sensibilidad a antibióticos es muy diferente a la de eubacteria
- Formas de metabolismo energético únicas, tales como la metanogénesis, así como presencia de la proteína bacteriorodopsina característica de Halobacteria en donde actúa como bomba de protones.

2.3.1. Taxonomía de las arqueas metanogénicas

Las arqueas metanógenas se clasifican dentro del dominio de las Arqueobacterias. Las Archaeobacterias poseen un ancestro común con las bacterias, sin embargo las arqueas conservan la capacidad de vivir en las condiciones reductoras que prevalecieron en la Tierra primitiva: una atmósfera rica en dióxido de carbono, con poco hidrógeno y sin oxígeno libre. En consecuencia, las arqueas son frecuentes en ambientes extremos tal como se mencionó anteriormente (García, 1990; Woese, 1987).

Las arqueas metanogénicas actualmente se dividen en cinco órdenes: *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* y *Methanopyrales*. En la Fig. 8 se muestra esta división filogenética en cuanto a dominio y órdenes (Brochier-Armanet *et al.*, 2008), en tanto que en la Tabla 2 se muestra también familias y géneros de este dominio.

Por su parte la Tabla 3 menciona algunas de las características morfológicas de familias de arqueas metanogénicas.

2.3.2. Principales sustratos utilizados por las arqueas metanogénicas

Las arqueas metanogénicas obtienen su energía de proliferación a partir de la conversión de diferentes sustratos, los principales son H_2+CO_2 , formato, acetato y en menor frecuencia trimetilamina, dimetilsulfuro, alcoholes (metanol, isopropanol, isobutanol, ciclopentanol y etanol). Todos estos sustratos son convertidos por alguna de las vías de la metanogénesis, descritas en la sección 2.2.2.4, en metano. En la Tabla 4 se describen las reacciones implicadas en la metanogénesis resultando el sustrato utilizado y sus respectivos valores energéticos (Whitman *et al.*, 2006).

Tabla 2. Órdenes de arqueas metanogénicas, familias y géneros de las mismas (Boone et al., 2001)

| CLASE | ORDEN | FAMILIA | GÉNERO |
|-----------------|--------------------|-----------------------|---|
| Methanobacteria | Methanobacteriales | Methanobacteriaceae | <i>Methanobacterium</i> , <i>Methanosphaera</i> |
| | | | <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanothermobacter</i> |
| | | Methanothermaceae | <i>Methanothermus</i> |
| Methanococci | Methanococcales | Methanococcaceae | <i>Methanococcus</i> , <i>Methanothermococcus</i> |
| | | Methanocaldococcaceae | <i>Methanocaldococcus</i> , <i>Methanotorris</i> |
| | Methanomicrobiales | Methanomicrobiaceae | <i>Methanomicrobium</i> , <i>Methanoculleus</i> |
| | | | <i>Methanogenium</i> , <i>Methanolacinia</i> |
| | | | <i>Methanofollis</i> , <i>Methanoplanus</i> |
| | | Methanocorpusculaceae | <i>Methanocorpusculum</i> |
| | | Methanospirillaceae | <i>Methanospirillum</i> |
| | | | <i>Genera incertae sedis</i> <i>Methanocalculus</i> |
| | Methanosarcinales | Methanosarcinaceae | <i>Methanosarcina</i> , <i>Methanococcoides</i> |
| | | | <i>Methanolobus</i> , <i>Methanohalophilus</i> |
| | | | <i>Methanohalobium</i> , <i>Methanosalsum</i> , <i>Methanomicrococcus</i> |
| | | Methanosaetaceae | <i>Methanosaeta</i> |
| | | Methanopyraceae | <i>Methanopyrus</i> |
| Methanopyri | Methanopyrales | | |

Tabla 3. Características de las familias de arqueas metanogénicas (Whitman et al., 2006)

| Familia | Características |
|------------------------------|---|
| Methanobacteriaceae | Bacilos largos y cortos. Sustratos para metanogénesis: H ₂ +CO ₂ , formato o alcoholes. Gram positivo, contienen pseudomureína |
| Methanothermaceae | Bacilos. Sustrato para metanogénesis: H ₂ +CO ₂ . Gram positivo, contienen pseudomureína. Termófilas extremas |
| Methanococcaceae | Cocos irregulares. Sustrato para metanogénesis: H ₂ +CO ₂ y formato |
| Methanomicrobiaceae | Cocos irregulares, bacilos. Sustrato para metanogénesis: H ₂ +CO ₂ y en algunos casos formato y alcoholes. Gram negativo |
| Methanocorpusculaceae | Cocos pequeños e irregulares. Sustrato para metanogénesis: H ₂ +CO ₂ , en algunos casos formato y alcoholes |
| Methanosarcinaceae | Cocos irregulares, bacilos cortos. Sustrato para metanogénesis: H ₂ +CO ₂ , acetato, compuestos metilados. Gram positivo y negativo |

Tabla 4. Principales sustratos utilizados por arqueas metanogénicas (Tabla 1 modificada) (Whitman *et al.*, 2006; ATCC, 2011)

| Sustrato | Reacción | ΔG° (kJ mol ⁻¹ metano) |
|---------------------------------|---|---|
| H ₂ +CO ₂ | 4 H ₂ + CO ₂ → CH ₄ + 2H ₂ O | -135.6 |
| Formato | 4 Formato → CH ₄ + 3CO ₂ + 2H ₂ O | -130.1 |
| Propanol | 4 2-Propanol + CO ₂ → CH ₄ + 4 Acetona + 2 H ₂ O | -36.5 |
| Etanol | 2 Etanol + CO ₂ → CH ₄ + 2Acetato | -116.3 |
| Metanol | Metanol + H ₂ → CH ₄ + H ₂ O | -112.5 |
| Metanol | 4 Metanol → 3CH ₄ + CO ₂ + 2 H ₂ O | -104.9 |
| Metilamina | 4 Metilamina + 2 H ₂ O → 3CH ₄ + CO ₂ + 4 NH ₄ ⁺ | -75.0 |
| Dimetilamina | 2 Dimetilamina + 2 H ₂ O → 3CH ₄ + CO ₂ + 2NH ₄ ⁺ | -73.2 |
| Trimetilamina | 4 Trimetilamina + 6H ₂ O → 9CH ₄ + 3CO ₂ + 4NH ₄ ⁺ | -74.3 |
| Dimetilsulfito | 2 Dimetilsulfito + 2H ₂ O → 3CH ₄ + CO ₂ + H ₂ S | -73.8 |
| Acetato | Acetato → CH ₄ + CO ₂ | -31.0 |

2.3.3. Medios de cultivo y aislamiento

Por ser anaerobias estrictas, las arqueas metanogénicas son extremadamente sensibles al oxígeno. Esto hace que su aislamiento sea más complicado y riguroso. Cuando se desea aislar arqueas metanogénicas es muy recomendable usar de inicio un medio de enriquecimiento (Tabla 5), es decir, aquel que posee varias fuentes de carbono o sustratos ya conocidos para las metanogénicas. Lo que permite utilizar dichos medios es que muy pocos son los microorganismos capaces de aprovechar los sustratos para arqueas metanogénicas en condiciones anaerobias. Se sabe que algunas de las bacterias capaces de aprovechar estos mismos sustratos son las bacterias sulfato-reductoras, desnitrificadoras y fotosintéticas, sin embargo éstas pueden ser excluidas si se omite adicionar al medio sulfatos, sulfuros y nitratos, así como mantener la incubación en condiciones de obscuridad (Whitman *et al.*, 2006). Todo lo que se ha descrito es crucial para la proliferación de arqueas metanogénicas, es el primer paso para aumentar la biomasa de los microorganismos y una vez que se logra esto se puede proceder al empleo de medios de cultivo específicos y selectivos en donde al reducir los tipos de fuentes de carbono o sustratos se va reduciendo la diversidad de metanogénicas presentes hasta aislar un género o especie determinado.

Tabla 5. Composición de (a) Medio de enriquecimiento para arqueas metanogénicas; (b) Solución de sales A; (c) Elementos traza; (d) Solución de vitaminas (Balch *et al.*, 1979; Bryant *et al.*, 1971; DSMZ, 2011; Whitman *et al.*, 2006)

| (a) Medio de enriquecimiento | |
|---|--------------------------|
| Componente | Cantidad |
| Extrato de levadura | 2 g |
| Tripticasa | 2 g |
| Solución de sales A | 10 mL |
| Solución de fosfatos (200 g L ⁻¹ K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O) | 2 mL |
| Solución de resarzurina (0.5 g L ⁻¹ en agua) | 2 mL |
| Solución de acetato de sodio (136 g L ⁻¹ de acetato de sodio. 3H ₂ O) | 10 mL |
| Traza de elementos | 10 mL |
| Solución de vitaminas | 10 mL |
| NaHCO ₃ | 5 g |
| Hidrocloruro de cisteína | 0.5 g |
| Sulfuro de sodio | 0.001g |
| (b) Solución de sales A (Ajustar a pH 4 con HCl) | |
| Componente | Cantidad (g en 1000 mL) |
| NH ₄ Cl | 100 |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 100 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 40 |
| (c) Elementos traza (Ajustar pH 6.5 o 7 con KOH) | |
| Componente | Cantidad (g en 1000 mL) |
| Ácido nitrilotriacético | 1.5 |
| Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O | 0.2 |
| Na ₂ SeO ₃ | 0.2 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.1 |
| MnSO ₄ ·2H ₂ O | 0.1 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.1 |
| Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O | 0.1 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.1 |
| AlCl ₃ ·6H ₂ O | 0.04 |
| NiCl ₂ ·6H ₂ O | 0.025 |
| H ₃ BO ₃ | 0.01 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.01 |
| (d) Solución de vitaminas | |
| Componente | Cantidad (mg en 1000 mL) |
| Ácido <i>p</i> -Aminobenzoico | 10 |
| Ácido nicotínico | 10 |
| Pantotenato de calcio | 10 |
| Piridoxina (hidrocloruro) | 10 |
| Riboflavina | 10 |
| Tiamina (hidrocloruro) | 10 |
| Biotina | 5 |
| fólico | 5 |
| Ácido α-Lipoico | 5 |
| Vitamina B12 | 5 |

La segunda técnica corresponde al uso de antibióticos dirigidos hacia determinados grupos o familias de bacterias. Se puede hacer uso de antibióticos debido a que los sistemas enzimáticos de las metanogénicas no se ven afectados por éstos, evitando así el riesgo de perder al microorganismo deseado que, en este caso, son arqueas metanogénicas. La Tabla 6 enlista algunos de los antibióticos comúnmente utilizados en cultivos para metanogénicas.

Tabla 6. Uso de antibióticos para el aislamiento de arqueas metanogénicas (DSMZ, 2011; Patel, 1984; Touzel et al., 1985; Zhao et al., 1989; Zinder y Mah, 1979)

| Antibiótico | ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Arquea metanogénica aislada |
|---|---------------------------|-----------------------------------|
| Vancomicina | 200 | <i>Methanosarcina</i> sp. |
| Vancomicina | 500 | <i>M. mazei</i> |
| Cicloserina penicilina G | 100 2000 | <i>Methanosarcina thermophila</i> |
| Penicilina G | 2000 | <i>Methanobacterium</i> sp. |
| Kanamicina | 100 | <i>Methanosaeta concilii</i> |
| Vancomicina Penicilina Kanamicina Tetraciclina | 150 150 150 100 | <i>Methanoplanus limicola</i> |

En cualquier técnica de aislamiento microbiológico se debe tener presente que el medio de cultivo tiene que simular la fuente o el medio de donde se obtuvo la muestra (nicho ecológico). Es por esto que resulta indispensable tomar en cuenta no solo los sustratos o nutrientes adicionados, sino también deben ser considerados otros parámetros como la concentración de sales, pH y temperatura.

2.3.4. Microscopía confocal espectral y microscopía electrónica de barrido

La microscopía confocal consta de una fuente de iluminación puntual que ilumina una región del objeto y el detector recibe la radiación de esta área-objeto. La imagen se construye por el barrido sincronizado de la fuente y el detector. La calidad de las imágenes resultantes es mejor que la de microscopía confocal. Esto se debe a la omisión de toda la información óptica fuera de foco. La microscopía confocal permite obtener secciones ópticas en profundidad que generan imágenes tridimensionales de la morfología de una muestra. Particularmente, en la

microscopía confocal espectral un haz de luz incide directamente en la muestra y, a su vez, la luz que ésta emite es separada en bandas espectrales de modo que puedan ser detectadas en forma de fluorescencia. Algunas células poseen sustancias fluorescentes naturales, dando como resultado un fenómeno de autofluorescencia (Doddema y Vogels, 1978). Dadas las características de las arqueas metanogénicas la microscopía confocal es una técnica útil para detectar la presencia de éstas en un cultivo puro y/o en una muestra ambiental (arqueas sin previo aislamiento). La propiedad de autofluorescencia en metanogénicas es debida a la abundancia de la coenzima F_{420} , implicada en su metabolismo (metanogénesis). La coenzima F_{420} es derivada de la flavina que participa en el proceso de transporte de electrones en el citoplasma de las arqueas. Fue aislada en el año de 1972 a partir de arqueas metanogénicas y su estructura química fue establecida 6 años más tarde. Esta coenzima debe su nombre gracias a la absorción de luz UV a una longitud de onda de 420 nm. Es por ello que para obtener una fluorescencia exitosa de las arqueas metanogénicas la longitud de onda de excitación debe ajustarse entre 350 y 420 nm. Bajo estas condiciones las arqueas metanogénicas logran autofluorescer observándose en el microscopio de fluorescencia con color verde o azul (Madigan *et al.*, 2003).

Cuando en una muestra sólo se pretenden estudiar las estructuras externas de un organismo y no son necesarios los cortes finos se puede utilizar el microscopio electrónico de barrido. A diferencia de la microscopía de fluorescencia en este caso la muestra sí requiere un tratamiento para ser observada; en primer lugar debe ser fijada utilizando alcohol y acetona en diferentes concentraciones, enseguida la muestra ya fijada se recubre con una fina capa de un metal pesado que en este caso es oro. El haz de electrones del microscopio electrónico de barrido barre la superficie de la muestra y los electrones desviados por la capa de metal son recogidos y proyectados sobre una pantalla que produce una imagen. En esta técnica únicamente se puede observar la superficie de los objetos, sin embargo una gran ventaja que existe es el amplio intervalo de aumentos, desde 15 hasta 100 000 veces. Las imágenes obtenidas a partir de esta técnica se denominan micrografías electrónicas (Madigan *et al.*, 2003). Estas técnicas siguen

siendo herramientas muy valiosas en la microbiología, sin embargo en la actualidad el uso de las técnicas moleculares arroja resultados más precisos en cuanto a la identificación de microorganismos como se describirá en el siguiente apartado.

2.4. Metagenómica: herramienta clave en el estudio de diversidad filogenética de muestras ambientales

Sin duda los inicios de la microbiología están asociados a la invención del microscopio. A su vez, la necesidad de observar y estudiar a los microorganismos desarrolló la técnica de cultivo y obtención de colonias puras. Con el paso del tiempo los investigadores notaron que no todos los microorganismos podían ser cultivables en el laboratorio, sobre todo aquellos que provenían de nichos en condiciones extremas ya sea de temperatura, presión o pH. De esta manera los investigadores comenzaron a dividir los microorganismos en cultivables y no cultivables, dando prioridad de estudio a los primeros, valiéndose de diversas técnicas de microscopía que a la par fueron avanzando. Pronto se dieron cuenta de que la obtención de cultivos puros no era suficiente para el estudio completo de la microbiología, en especial de la microbiología ambiental, es así como al surgir la necesidad y el interés de estudiar los microorganismos clasificados como no cultivables, inicia una etapa de lo que hoy se conoce como microbiología moderna (Handelsman, 2004).

La metagenómica o genómica de comunidades es una disciplina que busca de manera rápida entender los sistemas microbianos estudiando el contenido genómico de los microorganismos constituyentes de una comunidad natural. Esta disciplina proporciona herramientas muy útiles e importantes puesto que se sabe que solamente el 1% de los microorganismos existentes en diferentes ambientes naturales son cultivables en el laboratorio, lo cual limita su estudio. La metagenómica permite conocer el tipo de microorganismos presentes en un ambiente natural sin la necesidad de cultivarlos y aislarlos. Esto se ha logrado mediante una serie de técnicas conocidas como técnicas independientes de

cultivo. De manera simple lo que se lleva a cabo en un estudio metagenómico es: 1) extracción del material genético de una muestra colectada a partir de un ambiente natural, 2) purificación y amplificación de dicho material genético y 3) secuenciación. La información que se arroja es de dos tipos, la primera taxonómica: ¿Quiénes están presentes? y la segunda de contenido funcional: ¿Qué es lo que hacen? (Dell'Anno *et al.*, 2002).

2.4.1. Extracción de *DNA*

Varios son los métodos empleados para la extracción de *DNA*, se puede recurrir al uso de agentes detergentes, lisis enzimática, extracción con solventes o agitaciones múltiples. En cualquiera de los casos lo que se busca es alterar el estado natural de la célula para generar una ruptura y, finalmente, obtener el material genético inmerso en ella. Hoy en día estas técnicas se han mejorado, inclusive en la extracción de *DNA* proveniente de muestras de suelo en donde anteriormente la presencia de compuestos inhibidores tales como los ácidos húmicos y minerales de arcilla, resultaban ser un problema en el procedimiento. Dentro de las técnicas de extracción se deben considerar dos puntos muy importantes, el primero es la lisis celular en donde se hace uso de enzimas o agentes disruptores capaces de lisar la célula. Entre los más comunes se pueden encontrar el dodecilsulfato de sodio, *SDS*, proteinasa K, enzima lisozima. El *SDS*, por ejemplo, es un detergente de naturaleza aniónica que logra romper los ácidos grasos y lípidos asociados a la membrana celular de tal forma que la desestabiliza y, finalmente, se rompe. El segundo punto es la precipitación del *DNA* utilizando disolventes químicos como fenol y cloroformo. Este paso es muy importante ya que se logra reducir la contaminación de agentes orgánicos e inorgánicos que puedan alterar la pureza del *DNA* de interés. La importancia de llevar a cabo una buena extracción de *DNA* es asegurar el siguiente paso que será la amplificación del material genético (*DNA*) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) (Griffiths *et al.*, 2000).

2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es un método utilizado para amplificar una secuencia específica de *DNA in vitro* por repetidos ciclos de síntesis específicos utilizando cebadores y *DNA* polimerasa. Se fundamenta en el mecanismo de replicación natural del *DNA* de las bacterias y esto permite obtener una elevada cantidad del fragmento o fragmentos deseados. El tamaño de los fragmentos amplificados está determinado por la distancia entre las posiciones que ocupan los cebadores o “*primers*” sobre la molécula de *DNA*, siendo la secuencia de estos cebadores conocida y complementaria al gen o a la región que se pretende amplificar. La *PCR* permite una detección altamente sensible del gen considerado, incluso en muestras heterogéneas de *DNA* como son el lodo o el suelo. Las etapas de amplificación del *DNA* en la *PCR* son las siguientes: 1) desnaturalización de las cadenas de *DNA*, 2) alineamiento de los cebadores con las cadenas diana y 3) síntesis de las cadenas complementarias por medio de la enzima *DNA* polimerasa termoestable. Los componentes principales en la mezcla de reacción de *PCR* son la *DNA* polimerasa (por ejemplo, Taq Polimerasa, de *Thermophilus aquaticus*), los *primers* (oligómero corto de nucleótidos a los que una enzima adiciona nuevas unidades monoméricas) específicos, los desoxirribonucleótidos trifosfato libres (*dNTP*), el *DNA* molde e iones de magnesio (Mg^{2+}). Es importante mencionar que, en la *PCR*, cada ciclo duplica el contenido original de *DNA* diana o molde. En la práctica suelen hacerse de 20 a 30 ciclos, lográndose incrementar entre 10^6 y 10^9 veces el material genético. La Fig. 9 muestra un diagrama general de la *PCR* (Madigan *et al.*, 2003; Mullis *et al.*, 1994).

2.4.3. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (*DGGE*, en inglés) hace uso de una de las propiedades del *DNA* la cual implica su organización en los dominios de fusión de alta y baja temperatura. Si una molécula de *DNA* es sometida a un incremento de temperatura o a determinada concentración de un

agente desnaturizante, el dominio de fusión de baja temperatura se convertirá en una sola cadena a una temperatura específica o a una concentración de desnaturizante. Las condiciones de desnaturización en las que un dominio se fusiona son totalmente dependientes de la secuencia, de tal manera que una sustitución de un solo par de bases alterará el punto en el cual la transición del estado de fusión ocurre, es así como un fragmento de *DNA* de la misma longitud pero diferente secuencia de pares de bases puede ser separado en un gel con un gradiente de desnaturización (Muyzer *et al.*, 1993). La *DGGE* generalmente emplea un gradiente lineal de urea/formamida (agentes desnaturizantes) en un gel de poliacrilamida; de esta manera, el *DNA* migra en una concentración creciente de desnaturizante. La molécula de *DNA* entra al gel en forma helicoidal y viajará a través de éste conservando dicha forma hasta que encuentre la concentración de desnaturizante a la cual el dominio de fusión de baja temperatura se convierta en una cadena sencilla y así el *DNA* adquirirá una forma lineal. La Fig. 10, muestra el principio de la *DGGE* (Cariello y Skopek, 1993).

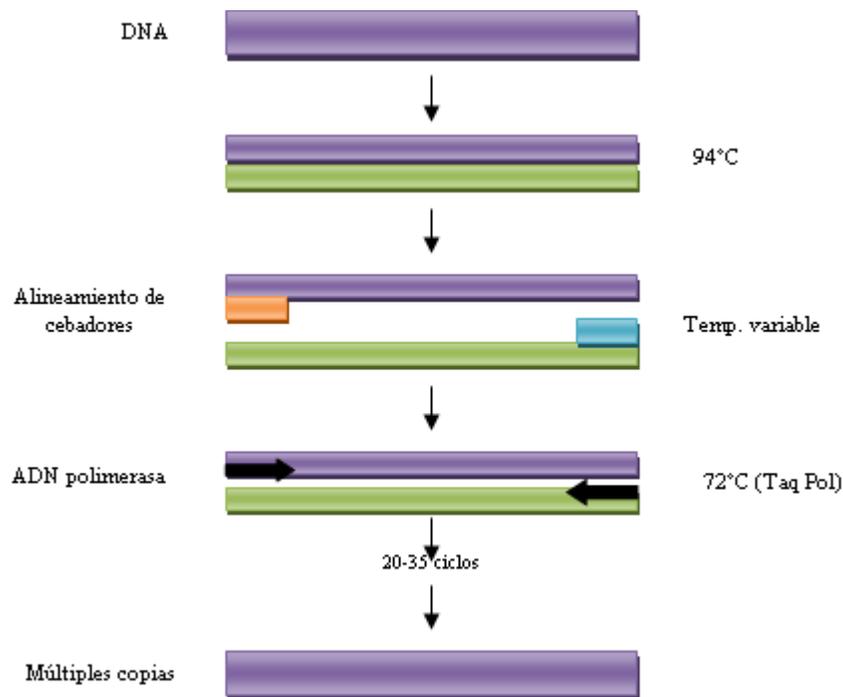


Fig. 9. Diagrama general de la reacción de *PCR* (Madigan *et al.*, 2003)

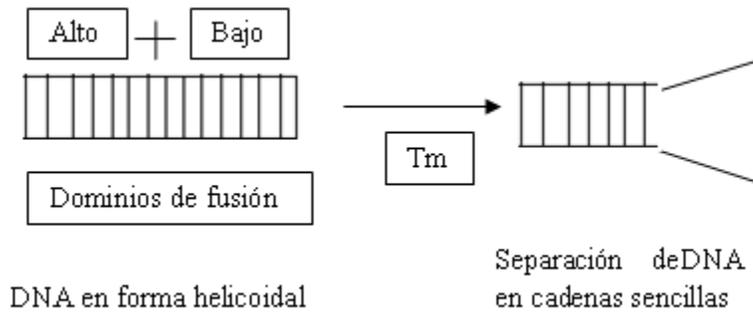


Fig. 10. Principio de la electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE). T_m indica la temperatura de fusión, sus siglas son del inglés "melting temperature" (Cariello y Skopek, 1993)

Hoy en día la técnica de *DGGE* es muy útil para evaluar la composición de comunidades microbianas en muestras ambientales. Como ya se describió anteriormente, el principio de la *DGGE* es el cambio conformacional del *DNA* al someterlo a un gradiente de desnaturalización; este cambio provoca la disminución de la migración del *DNA* dentro del gel, haciendo que éste se quede en un solo sitio dentro del gel. Luego de una electroforesis de 20 a 24 horas con un voltaje de 120 V a 60°C, el gel puede revelarse y posteriormente observarse bajo luz UV. Al analizar las imágenes del gel se pueden observar una serie de bandas que corresponden al *DNA* que sufrió cambios conformacionales según su secuencia debido al agente desnaturante. De esta manera se presume que cada banda corresponde a un filotipo diferente, es decir, diferentes microorganismos. El análisis de bandas en el gel de *DGGE* puede ser más detallado con la finalidad de distinguir la similitud, diferencia y abundancia de los patrones de bandas en éste, otorgando una detección rápida de especies y cambios en la composición microbiana de la muestra extraída de un ambiente natural. La Fig. 11 muestra imágenes de *DGGE* bajo diferentes combinaciones de tiempo de corrida y voltaje a las que fueron sometidos. Esto permite apreciar la resolución de las bandas según dichos parámetros así como la aparición de diferentes bandas en cada gel siendo la misma muestra analizada (A, B y C) (Sigler *et al.*, 2004).

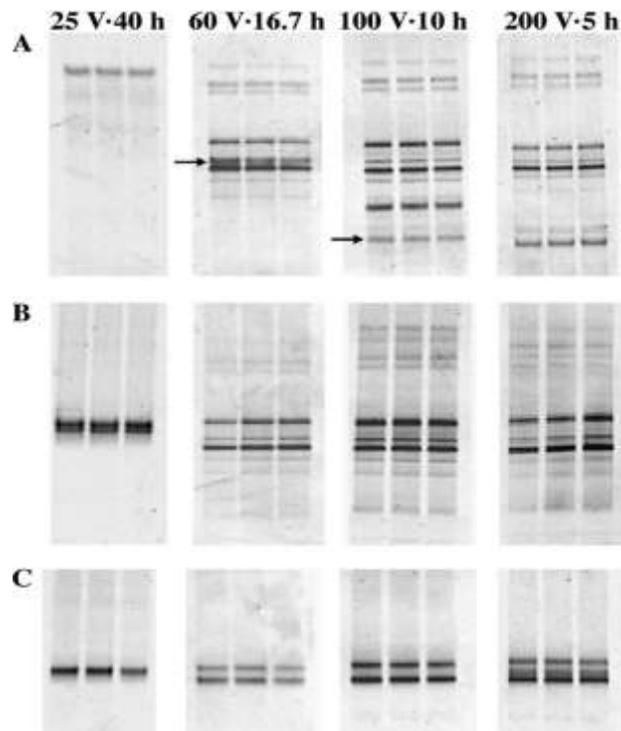


Fig. 11. Análisis de *DGGE* de tres muestras diferentes (A, B, C) bajo diferentes condiciones de tiempo de corrida (horas) y diferente voltaje (V) (Sigler *et al.*, 2004)

2.4.4. Secuenciación

Entre los métodos de secuenciación existen dos que son los más utilizados. Ambos fueron desarrollados casi a la par; sin embargo, su fundamento es diferente. Son conocidos como: a) Método de degradación química y b) Método enzimático.

a) Método de degradación química (De Necochea y Canul, 2004)

En 1977, Allan Maxam y Walter Gilbert dieron a conocer el método de degradación química. En este método, un fragmento de *DNA* de cadena doble o sencilla se marca en los extremos 5' o 3' de una o ambas hebras con Fósforo 32 (^{32}P). Posteriormente, la muestra de *DNA* se divide en cuatro alícuotas y se fragmenta en cuatro reacciones químicas distintas. Los fragmentos de *DNA* generados pueden ser separados por electroforesis en cuatro carriles distintos con base en su tamaño. Conociendo el nucleótido en el que se realizaron los cortes, se puede inferir la secuencia de la molécula original. Las reacciones químicas que se utilizan para fragmentar la molécula de *DNA* son las siguientes:

1. Corte de las purinas. Las purinas adenina y guanina se metilan con dimetil sulfato (*DMS*). La reacción es tratada en condiciones alcalinas; la molécula de *DNA* se fragmenta en las purinas metiladas; como resultado se obtiene una serie de bandas oscuras que corresponden a las guaninas (las cuales se metilan 5 veces más rápido), y bandas claras que corresponden a las adeninas
2. Corte de adeninas. En esta reacción las purinas metiladas se tratan inicialmente con un ácido diluido, lo que favorece el corte de las adeninas metiladas. Posterior a un tratamiento alcalino las guaninas también son cortadas. Este tratamiento genera una serie de bandas oscuras y claras que también corresponden a las adeninas y guaninas, respectivamente
3. Corte de pirimidinas. Esta reacción utiliza hidracina, encargada de cortar las bases citosina y timina
4. Corte de citosina. La presencia de NaCl 2M inhibe la reacción de hidracina con tiamina, y el tratamiento posterior con piperidina, produce solamente fragmentos que terminan en citosina.

b) **Método enzimático** (Sanger *et al.*, 1977)

En el mismo año en que Maxam y Gilbert publicaron su trabajo de secuenciación por degradación química, Frederick Sanger y su grupo de trabajo dieron a conocer otro método de secuenciación basado en reacciones enzimáticas. El método de Sanger se basa en el uso de la *DNA* polimerasa para sintetizar cadenas de *DNA* con una terminación específica. Con este método se generan fragmentos de *DNA* de todos los tamaños posibles que se puedan distinguir entre sí, por el tipo de marcaje que llevan o por la incorporación de un terminador específico. La *DNA* polimerasa es una enzima que requiere de un templado de *DNA* de cadena sencilla y de esta forma, logra realizar la síntesis de la hebra complementaria extendiéndola a partir de un iniciador en dirección 5' a 3'. Entre los componentes de la reacción se incluyen nucleótidos que no tienen un grupo hidroxilo en su extremo 3' (*dNTP*) para poder obtener una terminación específica en las cadenas.

Una vez que el *dNTP* se incorpora como el residuo terminal, evita que la cadena de *DNA* sintetizada continúe extendiéndose. La incorporación de los *dNTP* es al azar, de tal forma que se obtienen fragmentos de todos los tamaños posibles que terminan en un residuo específico.

En el método de Sanger la estrategia es hacer cuatro reacciones diferentes de síntesis de *DNA*, utilizando un *dNTP* distinto en cada tubo. Con la mezcla del nucleótido normal (*dNTP*) y su terminador (*dNTP*), se pueden generar fragmentos complementarios de diferentes tamaños que terminan en el mismo nucleótido. Posteriormente, estos fragmentos se pueden separar en un gel de electroforesis con cuatro carriles distintos, para determinar la secuencia del templado.

El método de Sanger tiene varias ventajas sobre el método de Maxam-Gilbert. Las reacciones de secuenciación del método enzimático se pueden realizar en unas horas, en cambio las del método de Maxam-Gilbert tardan al menos un día. Las reacciones del método de Sanger son más puras, con menos contaminantes que puedan afectar la resolución del gel. Hoy en día, el método más utilizado para la secuenciación de ácidos nucleicos es el método de Sanger, sin embargo, debe mencionarse que el método de Maxam-Gilbert es el más adecuado para determinar la secuencia de fragmentos cortos de *DNA* debido a que puede determinar la secuencia desde la primera base. En cambio, el método de Sanger sólo permite la lectura a partir de la base 10-20. En la actualidad el método Sanger ha mejorado gracias a avances en técnicas de biología molecular tales como la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*), la polimerasa termoestable para el procedimiento de *PCR*, el marcaje de *DNA* y el desarrollo de secuenciadores automáticos con la capacidad de determinar la secuencia de miles de pares de bases por día (De Necochea y Canul, 2004).

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1 Diagrama de bloques

El diagrama de la Fig. 12 muestra la metodología empleada en este trabajo de investigación.

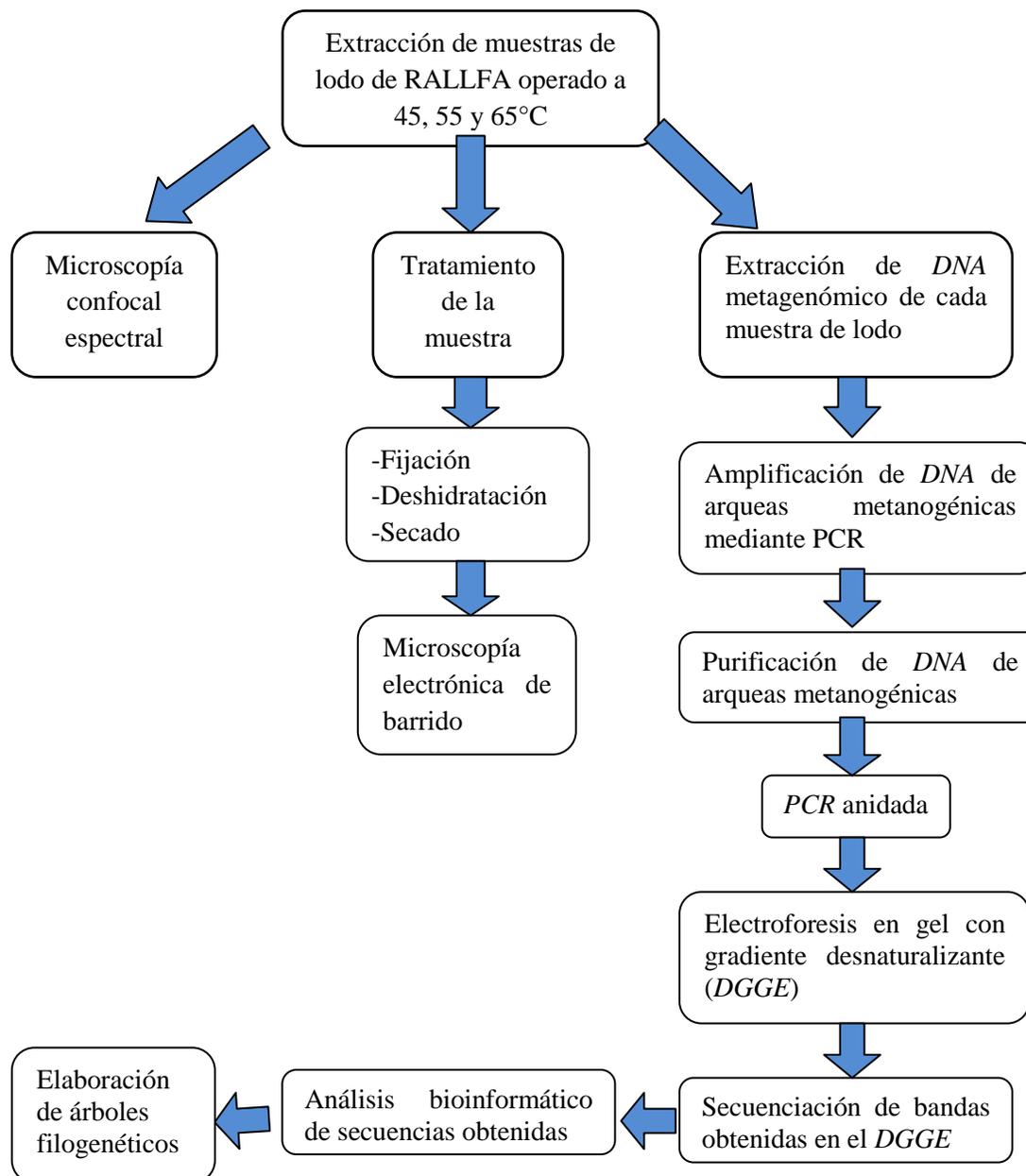


Fig. 12. Diagrama general de experimentos llevados a cabo

3.2. Características de los reactores tipo RALLFA utilizados

Es importante dar a conocer las características fundamentales de los reactores tipo RALLFA utilizados en esta investigación. Para ello se pueden enumerar tres sistemas principales con los que cuentan:

1. **Sistema hidráulico.** El agua residual a tratar (en este caso vinaza) entra al digester por la parte inferior. Ésta fluye hacia arriba a través de un lecho de lodos granulares denso y un lecho de lodo floculado.
2. **Lecho de lodos.** Es en esta zona en donde se encuentran los consorcios microbianos encargados de llevar a cabo los procesos bioquímicos de la degradación anaerobia.
3. **Cámara superior de acumulación de biogás.** Es un sistema que pretende recapturar el metano generado al final del proceso de degradación anaerobia. Una vez que se recaptura se puede cuantificar y/o aprovechar energéticamente.

La Fig. 13 muestra tres imágenes de uno de los reactores que operan en el laboratorio y de donde fueron tomadas las muestras de lodo para los diversos análisis microbiológicos. Mientras tanto, en la Tabla 7 se enlistan las características de cada reactor operando en el laboratorio (45, 55 y 65°C).

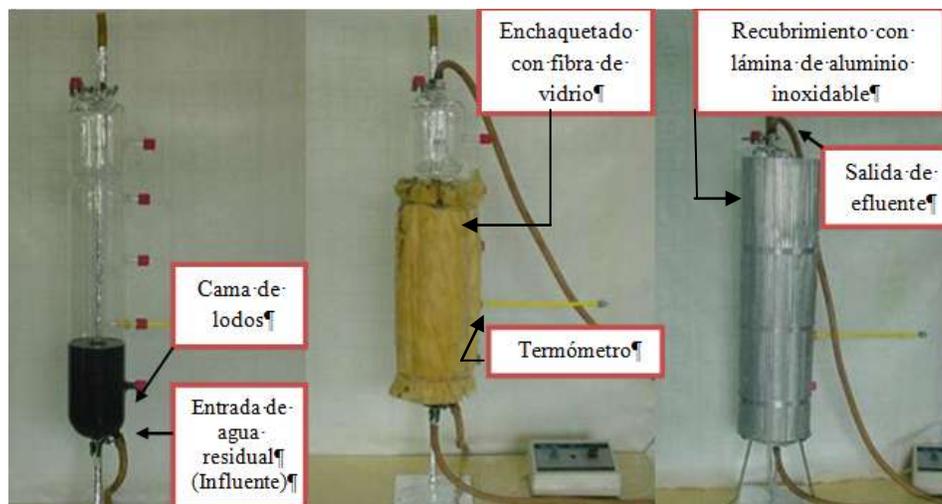


Fig. 13. Reactor tipo RALLFA visto desde la cama de lodos, el enchafetado y el recubrimiento con lámina de aluminio inoxidable. También se muestra la entrada de influente y la salida de efluente

Tabla 7. Características de cada uno de los reactores

| Parámetro | Dimensión |
|--------------------------------------|------------------|
| Volumen de trabajo (m ³) | 0.0016 |
| Diámetro interno (cm) | 10.1 |
| Espesor de la pared (mm) | 2 |
| Altura (cm) | 35 |
| Altura de la chaqueta (cm) | 35 |
| Diámetro interno de la chaqueta (cm) | 20 |

3.2.1 Toma de muestra

1. Colectar en un tubo Falcon estéril un aproximado de 3 a 5 mL de lodo de cada uno de los tres reactores
2. Cerrar correctamente el tubo y recubrirlo con papel aluminio
3. Congelar la muestra a -20°C hasta que sea utilizada.

3.3. Microscopía confocal espectral

Se obtienen muestras de lodo de cada RALLFA que opera a 45, 55 y 65°C. Bajo condiciones estériles se coloca una asada de la muestra de lodo en un portaobjetos y sobre éste un cubreobjetos. Colocar cada muestra en el microscopio Confocal FluoView[®]1000 OLYMPUS, ajustado previamente a una longitud de onda de 420 nanómetros (nm). Observar las muestras y obtener las micrografías correspondientes.

3.4. Microscopía electrónica de barrido

3.4.1. Preparación de las muestras: fijación, deshidratación, secado a punto crítico y recubrimiento con oro

Fijar la muestra con glutaraldehído al 3% y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos. Desechar el sobrenadante y conservar la pastilla obtenida. Posteriormente, lavar 3 veces con solución amortiguadora (*buffer*, en inglés) de fosfatos y centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos entre cada lavado. Desechar el

sobrenadante de cada centrifugación y conservar la pastilla. A continuación, colocar sobre la pastilla etanol al 30% y dejar reposar durante 10 minutos. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos y desechar el sobrenadante. Adicionar etanol al 50% y dejar reposar 10 minutos. Finalmente, centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos y desechar el sobrenadante. Repetir este procedimiento con etanol al 70% y al 100%. Terminados los lavados la muestra es secada a punto crítico utilizando el equipo SPI#13218-AB Modelo CPD 7501. El último paso es el recubrimiento con oro, en el cual la muestra se monta en un porta-objetos sobre un disco de acero de 10 mm de diámetro, ésta se recubre por evaporación con una capa de oro de 20 nm utilizando un metalizador tipo Balzers SCD. La muestra ya está lista para observarse en el microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-5800 con un sistema de microanálisis OXFORD modelo ISIS 486. Este procedimiento se repite con cada una de las muestras.

3.5. Pruebas moleculares para el estudio de filogenia de arqueas metanogénicas en los RALLFA

3.5.1. Extracción de *DNA* metagenómico

El *DNA* extraído de las muestras provenientes de cada reactor se denomina *DNA* metagenómico ya que se obtiene el material genético de diversos grupos microbianos que se encuentran ocluidos en los lodos. Para extraer el *DNA* metagenómico se utilizó un kit de extracción denominado “*Power Soil® DNA Isolation Kit. Mo Bio Laboratories*”. La metodología detallada se encuentra descrita en el Anexo 1 de este documento.

Al finalizar este proceso se obtendrán tres muestras de *DNA* metagenómico, cada uno correspondiente a un RALLFA operando a 45, 55 y 65°C.

Hacer 4 alícuotas de 25 µL y cada una colocarla en un tubo Eppendorf de 1500 µL para rcongelarlas a -20°C.

3.5.2. Amplificación de *DNA* de arqueas metanogénicas mediante *PCR*, a partir del *DNA* metagenómico extraído

El *DNA* metagenómico extraído corresponde a diversos tipos de microorganismos presentes en la muestra obtenida del reactor anaerobio, tanto del dominio bacteria como del dominio arquea; sin embargo, el *DNA* que desea amplificarse es de arqueas metanogénicas. Esto se logra seleccionando *primers* específicos que nos permiten la región de interés. El punto 3.5.2.1. describe detalladamente las características de los *primers* así como las condiciones de la reacción de *PCR*.

3.5.2.1. Selección de *primers*

Para la amplificación de *DNA* de arqueas metanogénicas fueron utilizados dos tipos de *primers*.

1) *25F-1492R* (16S *rRNA* arquea)

Amplifica 1.5 kilobases (kb) de la secuencias 16S *rRNA* de arqueas.

2) *ME1* y *ME2*

Designados para amplificar 0.76 kb de la subunidad α del gen que codifica para la metil coenzima M reductasa, conocida como *MCR* o Coenzima M (CoM) implicada en la metanogénesis.

En la Tabla 8 se muestran los *primers* utilizados en todo el experimento, así como algunas de sus características tales como tamaño, nombre del gen, secuencia y la referencia de donde fueron reportados por primera vez.

3.5.2.2. Componentes de la *PCR*

Debido a que se utilizan dos diferentes *primers* para arqueas metanogénicas, se deben formular dos reacciones diferentes, en donde los componentes de *PCR* y las cantidades de éstos cambian. La Tabla 9 los enlista.

Tabla 8. Primers utilizados a lo largo del experimento y sus características principales como nombre del gen, secuencia, tamaño de amplificación esperado y la referencia bibliográfica

| Gen | Nombre del primer | Loc ¹ | Secuencia 5' → 3' | Tamaño esperado (pb) | T _m ² (°C) | Referencia |
|-------------------------------------|-------------------|------------------|---------------------------------------|----------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 16S <i>rDNA</i> <i>Arquea</i> | A1032F | Fw ³ | GGR AAC GAG CGA GAC CY | 400 | 55 | Valenzuela <i>et al.</i> , 2008 |
| | A1098F | | Modificado: GGC AAC GAG CGM GAC CC | | | |
| | A1434R | Rv ⁴ | GGT TAC CTT GTT ACG ACT T | | | Turner <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>mcrA</i> | ME1 | Fw | GCMATGCARATHGGWATGTC | 760 | 55 | Hales <i>et al.</i> , 1996 |
| | ME2 | Rv | TCATKGCRTAGTTDGGRTAGT | | | Hales <i>et al.</i> , 1996 |

1: Localización o dirección de alineamiento del primer; 2: Temperatura de fusión; 3: Forward (derecho); 4: Reverse (reverso); pb: pares de bases; °C: grados Celsius

Tabla 9. Componentes y cantidades para cada reacción de PCR según el primer utilizado (ME1/ME2 y 25F-1492R)

| Componente | Primer | |
|--|---------|-----------|
| | ME1/ME2 | 25F-1492R |
| Cantidad (µL) | | |
| PCR Buffer (10X) | 2.50 | 2.50 |
| MgCl ₂ (50mM) | 0.75 | 1.25 |
| Primers (10 µM) | 3.20 | 1.00 |
| DMSO (5%) | -- | 1.25 |
| BSA (10 mg ml ⁻¹) | 3.00 | 3.00 |
| dNTPs (10 mM) | 0.50 | 0.50 |
| Taq polimerasa (5 U µl ⁻¹) | 0.15 | 0.15 |
| DNA molde | 2.00 | 2.00 |
| H ₂ O | 15.1 | 13.35 |
| Total | 25.0 | 25.0 |

3.5.2.3. Ajuste de tiempos de amplificación en la PCR

Para llevar a cabo este procedimiento se hace uso de un termociclador marca ESCO. En este equipo se llevará a cabo la reacción en cadena de la polimerasa, con la ventaja que se pueden establecer el número de ciclos así como el tiempo y temperatura de cada etapa de amplificación. En la Tabla 10 se muestran las características de cada etapa de amplificación.

Tabla 10. Temperaturas y tiempos asignados para la amplificación de *DNA* utilizando *primers* ME1/ME2 y 25F-1492R

| Etapa de amplificación | Primers | | | |
|---|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | ME1/ME2 | | 25F-1492R | |
| | Temperatura (°C) | Tiempo (segundos) | Temperatura (°C) | Tiempo (segundos) |
| Desnaturalización de las cadenas de <i>DNA</i> | 96 | 25 | 94 | 30 |
| Alineamiento de los cebadores con las cadenas diana | 50 | 45 | 55 | 30 |
| Síntesis de las cadenas complementarias por medio de Taq polimerasa | 72 | 60 | 72 | 90 |
| Tiempo de cada ciclo | 2 min 10 s | | 2 min 30 s | |
| Total de ciclos | 35 | | 35 | |
| Tiempo total | 1h 16 min | | 1h 27 min | |

Una vez terminada la reacción de *PCR* se habrá obtenido un fragmento amplificado de *DNA* de arqueas metanogénicas gracias a la especificidad de los *primers* utilizados. En el caso de los *primers* ME1/ME2 se espera obtener un fragmento de 0.75 kilobases (kb), mientras que en el caso del *primer* 25F-1492R se obtendrá un fragmento de 1.5 kb. Para comprobar que el *DNA* de arqueas metanogénicas fue amplificado en la reacción de *PCR* con el tamaño esperado se debe realizar una electroforesis en gel de agarosa como se describe en el siguiente punto.

3.5.2.4. Elaboración de geles de agarosa para muestras de *DNA* amplificadas, electroforesis, tinción y revelado del gel

Para preparar agarosa al 1.5% pesar 1.5 gramos de agarosa y aforar a 100 mL con agua destilada. Agregar 4 mL de *Buffer TAE 25X* (1M Tris acetato, 25 mM *EDTA*). Calentar y agitar la solución hasta que el agarosa se disuelva por completo. Dejar enfriar la solución aproximadamente 5 minutos y posteriormente verterla en un molde con peine para marcar los pozos en donde posteriormente se introducirá cada muestra. Dejar enfriar de 20 a 30 minutos hasta que se forme un gel. La Figura 14 resume este procedimiento a manera de esquemas.

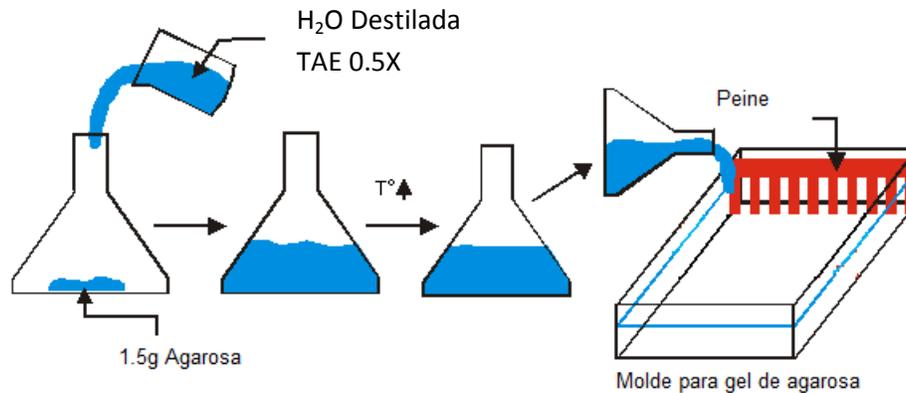


Fig. 14. Elaboración de gel de agarosa 1.5% para llevar a cabo una electroforesis de muestras de *DNA* amplificadas

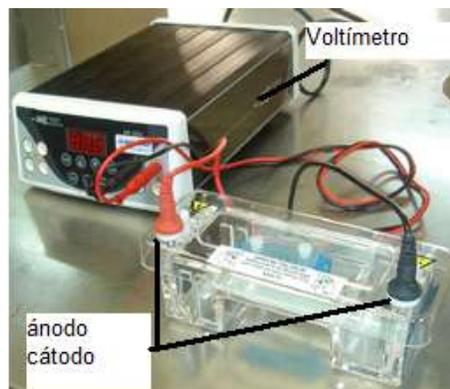


Fig. 15. Cámara de electroforesis conectada a una fuente de poder (Voltímetro)

Una vez formado el gel de agarosa en el molde éste se introduce a la cámara de electroforesis (Fig. 14). Se adiciona *buffer* de corrida TAE 0.5X hasta la marca que indica la cámara. A continuación se procede a introducir las muestras en cada pozo del gel de agarosa. Con la ayuda de una micropipeta tomar 2 μL de la muestra, mezclarla con 2 μL de *buffer* de carga¹. Introducir la punta de la micropipeta en uno de los pozos y colocar la muestra en él. Se lleva a cabo el mismo procedimiento para cada una de las muestras por duplicado. En total serán 12 muestras las que se introducirán en el gel y además un marcador de masa molecular de 3000 a 100 pares de bases para tener una referencia del tamaño de los fragmentos por separar e identificar. La Figura 16 esquematiza el procedimiento descrito.

¹El *buffer* de carga contiene sacarosa o glicerol que proporciona masa a la muestra para que el *DNA* se precipite al fondo de los pozos del gel y también posee un colorante (azul de bromofenol, cilen xilanol, naranja de acridina) que permite identificar la muestra una vez que está dentro del gel durante el proceso de electroforesis o corrida (Devlin, 1992)

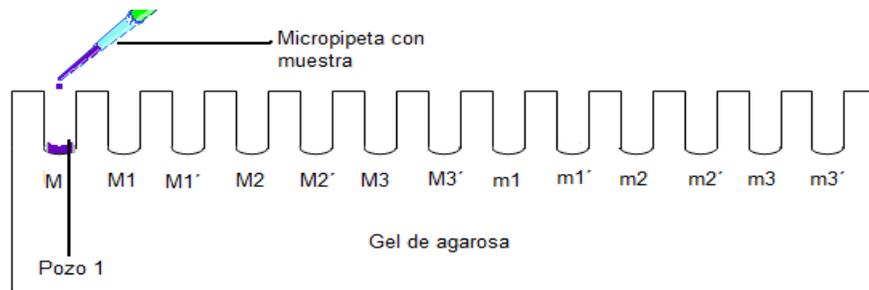


Fig. 16. Introducción de muestras de *DNA* amplificado en cada pozo del gel de agarosa elaborado. La nomenclatura de la imagen es la siguiente. M: marcador; M1: *DNA* amplificado de reactor 45°C, *primer* 25F-1492R; M1': duplicado de M1; M2: *DNA* amplificado de reactor 55°C, *primer* 25F-1492R; M2': duplicado de M2; M3: *DNA* amplificado de reactor 65°C, *primer* 25F-1492R; M3': duplicado de M3; m1: *DNA* amplificado de reactor 45°C, *primer* ME1/ME2; m1': duplicado de m1; m2: *DNA* amplificado de reactor 55°C, *primer* ME1/ME2; m2': duplicado de m2; m3: *DNA* amplificado reactor 65°C, *primer* ME1/ME2; m3': duplicado de m3

Una vez que se introducen las muestras en el gel se conecta la cámara electroforética a un voltímetro (Fig. 15) ajustando la corriente eléctrica a 110 volts (V). El proceso de electroforesis se detiene hasta que las muestras migren a lo largo de todo el gel (aproximadamente 30 minutos). Posteriormente, el gel debe ser teñido con solución bromuro de etidio² y se observa bajo una lámpara de luz UV en un fotodocumentador. En la imagen obtenida se podrán observar bandas correspondientes a los fragmentos de *DNA* de arqueas metanogénicas amplificados por *PCR* al utilizar dos diferentes *primers*: ME1/ME2 y 25F-1492R. Una vez comprobada la presencia de *DNA* de arqueas metanogénicas el *DNA* amplificado debe ser purificado.

3.5.3. Purificación de *amplicones* (producto de la *PCR*)

Después de someter el *DNA* a un proceso de amplificación mediante *PCR*, los productos implicados en dicha reacción (enzimas, *primers* o *dNTPs*) deben ser eliminados. Existen sustancias encargadas de remover estos componentes y así purificar el *DNA*. En este caso se utilizó un *kit* de purificación denominado

² El bromuro de etidio se utiliza para “colorear” moléculas de *DNA* o *RNA*, esto es posible debido a que se intercala entre las cadenas complementarias de la doble hélice o en las regiones de estructuras secundarias del *DNA* de cadena sencilla o del *RNA*. Emite color naranja ante luz UV. Cabe señalar que es un producto altamente tóxico por su carácter mutagénico, es por ello que al realizar un procedimiento de laboratorio en donde se tendrá contacto con él se deben utilizar guantes de seguridad (Devlin, 1992)

“UltraClean® PCR Clean-Up Kit Mo Bio Laboratories”. En el Anexo 2 se describe detalladamente la metodología de purificación de *DNA*. Se lleva a cabo la purificación de las seis muestras de *DNA* de arqueas metanogénicas amplificadas. Debe recordarse que son tres las muestras procedentes de los reactores tipo RALLFA operando a 45, 55 y 65°C, y de cada muestra se llevaron a cabo dos amplificaciones, una de ellas utilizando el *primer* 25F-1492R y la otra utilizando el par de *primers* ME1/ME2.

3.5.4. PCR anidada

En esta técnica se utiliza el producto amplificado y purificado previamente obtenido como molde para realizar una segunda amplificación. Tal como se muestra en la Fig. 17, el *primer amplicon* (obtenido en el punto 3.3.4), que es una pieza de *DNA* formada como el producto de eventos de amplificación natural o artificial, será el *DNA* molde para la *PCR* anidada. Los *primers* por utilizar son los mismos en el caso de la amplificación con ME1 y ME2, pero para el caso de los *amplicones* de 25F-1492R se utiliza el *primer* A1032F-1434R-GC. La Tabla 11 enlista los componentes y cantidades para cada reacción de *PCR* anidada, mientras que la Tabla 12 describe las características de cada etapa de amplificación.

Tabla 11. Componentes y cantidades para cada reacción de *PCR* anidada

| Componente | <i>Primer</i> | |
|--|---------------|--------------------|
| | ME1/ME2 | A1032F -1434 R- GC |
| | Cantidad (µL) | |
| <i>PCR Buffer</i> 10X | 3.0 | 3.0 |
| MgCl ₂ 50mM | 0.9 | 1.5 |
| <i>Primer</i> (10µM) | 3.8 | 1.2 |
| DMSO | -- | 1.5 |
| BSA (10 mg mL ⁻¹) | 3.6 | 3.6 |
| dNTPs (10mM) | 0.6 | 0.6 |
| Taq polimerasa (5 U mL ⁻¹) | 0.18 | 0.18 |
| <i>DNA</i> molde | 1.0 | 1.0 |
| H ₂ O | 16.8 | 17.4 |
| Total | 30 | 30 |

Tabla 12. Tiempos asignados para la amplificación de *DNA* utilizando *primers* ME1/ME2 y A1032F-1434 R

| Etapa de amplificación | Primers | | | |
|--|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | ME1/ME2 | | A1032F -1434 R- GC | |
| | Temperatura (°C) | Tiempo (segundos) | Temperatura (°C) | Tiempo (segundos) |
| Desnaturalización de las cadenas de <i>DNA</i> | 96 | 25 | 94 | 30 |
| Alineamiento de los cebadores con las cadenas diana | 50 | 45 | 55 | 30 |
| Síntesis de las cadenas complementarias por medio de taq polimeras | 72 | 60 | 72 | 30 |
| Tiempo de cada ciclo | 2 min 10s | | 1 min 30 s | |
| Total de ciclos | 35 | | 35 | |
| Tiempo total | 1 h 16 min | | 52 min 30 s | |

Finalmente, luego de obtener los productos anidados éstos deben purificarse tal como se describe en el punto 3.5.3. Una vez que se obtiene el *DNA* anidado purificado, éste debe ser almacenado a -20°C hasta que su uso sea necesario.

3.5.5. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (*DGGE*)

Fueron elaborados cuatro geles con gradiente desnaturalizante para llevar a cabo la *DGGE*. Sin embargo, fueron utilizadas tres concentraciones diferentes de agentes desnaturalizantes (se considera 100% de agentes desnaturalizantes a una solución con formamida 40% y urea 7M), de tal suerte que la composición de cada gel fue distinta. A continuación se describe detalladamente el procedimiento para la técnica de *DGGE* aplicada.

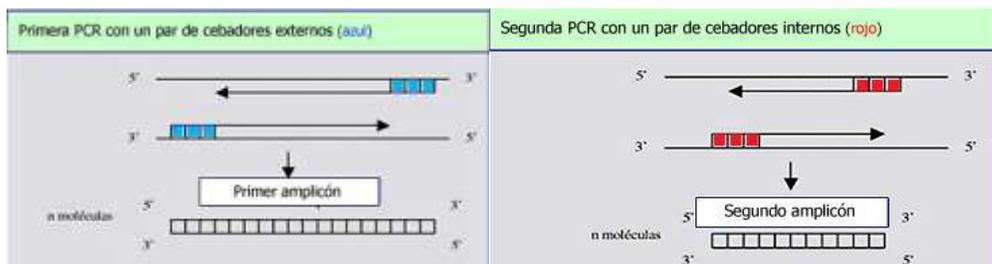


Fig. 17. PCR anidada a partir de un producto previamente amplificado por PCR

a) Preparación de gel con gradiente desnaturizante (formamida y urea)

Se prepararon tres tipos de gradientes desnaturizantes: a) 50%-80%, b) 40%-60% y c) 40%-70%. Para elaborar el gel con gradiente 50%-80% se etiquetan dos tubos Falcon de 50 mL. En el primer tubo, que contendrá la solución desnaturizante al 50%, se adicionan 4.62 g de urea, 4.4 mL de formamida, 5.86 mL de acrilamida:bisacrilamida (37.5:1) al 30%. y 0.88 mL de TAE 25X, Tris acetato EDTA (Tabla 13). Agitar la solución por 3 segundos en el “vórtex” para, posteriormente, adicionar agua estéril (SIGMA) hasta la marca de 25 mL del tubo. En el segundo tubo Falcon (que contendrá la solución desnaturizante al 80%) adicionar 7.4 g de urea, 7.04 mL de formamida, 5.86 mL de acrilamida:bisacrilamida (37.5:1) al 30% y 0.88 mL de TAE 25X (Tabla 13). Agitar durante 3 segundos en el “vórtex” y, posteriormente, aforar con agua estéril (SIGMA) hasta la marca de 25 mL del tubo Falcon. Finalmente, adicionar 80 μL de persulfato de amonio, APS (100 mg mL^{-1}), en inglés y 10 μL de tetrametiléndiamina, TEMED, en inglés, a cada tubo. Agitar las soluciones e inmediatamente verterlas en una cámara dispensadora la cual conducirá la solución con gradiente desnaturizante hacia el molde³ para formar el gel. Después de dos horas se prepara un segundo gel que se encontrará en la parte superior para formar los pozos. Agregar 1.75 mL de acrilamida al 30% en un tubo Falcon, aforar con agua estéril SIGMA hasta la marca de 7 mL del tubo, agitar la solución y finalmente agregar 7.5 μL de TEMED y 100 μL de APS. Agitar la solución rápidamente e introducirla en el mismo molde donde se encuentra todavía el primer gel. Insertar el peine para formar los pozos en los que posteriormente se introducirá cada muestra. Después de 20 minutos retirar cuidadosamente el peine del gel.

³ El molde debe ser armado previamente a la preparación de las soluciones, asegurándose de que esté bien sellado para así evitar fugas una vez que se introduce la solución desnaturizante

Tabla 13. Composición del gel con gradiente desnaturalizante 50% formamida-80% urea

| Componente | Concentración (%) | | |
|------------------|-------------------|---------|---------|
| | 100% | 50% | 80% |
| Formamida | 8.8 mL | 4.4 mL | 7.04 mL |
| Urea | 9.25 g | 4.62 g | 7.4 g |
| TAE 25X | 0.88 mL | 0.88 mL | 0.88 mL |
| Acrilamida 30% | 5.86 mL | 5.86 mL | 5.86 mL |
| 10 μ L TEMED | | | |
| 80 μ L APS | | | |

TAE=Tris-acetato-EDTA; TEMED=Tetrametiléndiamina; APS=Persulfato de amonio

b) Introducción de gel para *DGGE* en cámara electroforética y adición de muestras

Ya que el gel está terminado se introduce en la cámara electroforética (Fig. 18) la cual contiene como solución amortiguadora (*buffer*) de corrida 20 litros de agua destilada y 400 mL de TAE 25X a una temperatura de 60°C que se mantiene constante durante todo el proceso de electroforesis. Una vez que el gel está dentro de la cámara se introducen las muestras en cada uno de los pozos. Las muestras a introducir corresponden al *DNA* de arqueas metanogénicas anidado y purificado obtenido en el punto 3.5.4. Con la ayuda de una micropipeta mezclar 5 μ L de *buffer* de carga y 15 μ L de la muestra de *DNA*. Estos 20 μ L se introducen en uno de los pozos del gel. Realizar el mismo procedimiento con el resto de las muestras. Una vez que éstas han sido colocadas en cada pozo del gel se da inicio a la electroforesis utilizando un voltaje de 60 V a 60°C durante 20 horas.

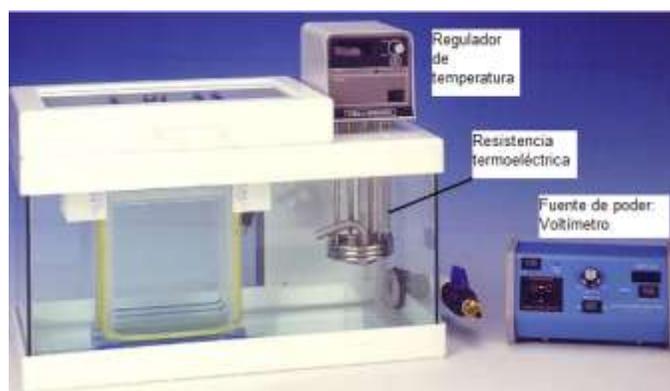


Fig. 18. Cámara de electroforesis para gel desnaturalizante. Se observa el regulador de temperatura, la resistencia termoelectrónica para mantener constante la temperatura deseada y el voltímetro que provee la corriente eléctrica que dé paso a la electroforesis

c) Tinción y revelado de gel desnaturalizante

Terminadas las 20 horas de electroforesis el gel debe ser sacado de la cámara y del molde para teñirlo y posteriormente revelarlo. La solución de tinte contiene 300 mL de agua destilada, 6 mL de *TAE 25X* y 30 μ L del reactivo *SYBR green*⁴ 10000X. La tinción del gel tiene una duración de aproximadamente 30 minutos. Pasado este tiempo el gel se observa sobre una lámpara de luz UV en donde se identifican las bandas correspondientes a fragmentos de *DNA* de diferentes arqueas metanogénicas. Las bandas son cortadas con navajas estériles, cada una se coloca en un tubo Eppendorf estéril previamente etiquetado y se le agregan 40 μ L de agua destilada. Los tubos son almacenados a -20 °C hasta que las muestras sean enviadas a secuenciar. En total se elaboraron 3 geles desnaturalizantes, el primero ya descrito, con un gradiente de 50%-80%, el segundo con un gradiente de 40%-60% y el tercero con gradiente 40%-70%. La Tabla 14 muestra las cantidades a utilizar de los componentes para cada gel con su respectivo gradiente. El procedimiento para elaborar cada gel es el mismo descrito en el punto 3.5.5.

Tabla 14. Composición de geles con diferente gradiente desnaturalizante para DGGE

| Componente | Concentración (%) | | | | | | |
|-------------------------|-------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 100% | 50% | 80% | 40% | 60% | 40% | 70% |
| Formamida | 8.8 mL | 4.4 mL | 7.04 mL | 3.52 mL | 5.28 mL | 3.52 mL | 6.16 mL |
| Urea | 9.25 g | 4.62 g | 7.4 g | 3.70 g | 5.55 g | 3.70 g | 6.48 g |
| <i>TAE 25X</i> | 0.88 mL | 0.88 mL | 0.88 mL | 0.88 mL | 0.88 mL | 0.88 mL | 0.88 mL |
| Acilamida 30% | 5.86 mL | 5.86 mL | 5.86 mL | 5.86 mL | 5.86 mL | 5.86 mL | 5.86 mL |
| 10 μ L <i>TEMED</i> | | | | | | | |
| 80 μ L <i>APS</i> | | | | | | | |

TAE=Tris-acetato-EDTA; TEMED=Tetrametiléndiamina; APS=Persulfato de amonio

⁴ Al igual que el bromuro de etidio, el reactivo *SYBR green* es un agente intercalante que se utiliza en la tinción de *DNA* para análisis por electroforesis de *PCR*. Es hasta 100 veces más sensible que el bromuro de etidio; sin embargo, también es un agente sumamente tóxico. Para su manejo se deben utilizar guantes

3.5.6. Reamplificación de bandas obtenidas en DGGE

Antes de enviar a secuenciar las bandas de *DNA* obtenidas de cada *DGGE* éstas deben ser reamplificadas mediante *PCR* para verificar las condiciones en las que el *DNA* se encuentra. El protocolo de amplificación es el mismo que el establecido en el punto 3.5.2.

3.5.7. Secuenciación Sanger

Las bandas obtenidas de cada *DGGE* corresponden a un filotipo de arqueas metanogénicas, una vez que éstas se han reamplificado son enviadas al secuenciador de la Universidad de Washington con la finalidad de obtener la secuencia nucleotídica de cada una y, posteriormente, realizar un análisis filogenético de las secuencias.

3.5.8. Alineamiento del primer A1032F-1434R con secuencias de arqueas metanogénicas

Se llevó a cabo un alineamiento del primer *A1032F-1434R* con 21 secuencias de diferentes géneros y especies de arqueas metanogénicas. El alineamiento se llevó a cabo con el software *Seaview* y las secuencias nucleotídicas de metanogénicas fueron obtenidas de la base de datos de *NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2012)*. Las secuencias de arqueas metanogénicas utilizadas para el análisis fueron las siguientes: *Methanobacterium bryantii*, *Methanobacterium formicum*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina vacuolata*, *Methanosarcina mazeii*, *Methanosarcina lacustris*, *Methanosarcina horonobensis*, *Methanosarcina semesiae*, *Methanosarcina thermoautotrophicum*, *Methanosarcina thermophila*, *Methanothermobacter crinale*, *Methanothermobacter thermophilum*, *Methanospirillum* sp., *Methanospirillum hungatei*, *Methanotherrix soehngenii*, *Methanosaeta* sp., *Methanobrevibacter arboriphilus*, *Methanobrevibacter* sp., *Methanobrevibacter arboriphilus* SH4, *Methanobrevibacter oralis*, *Methanocorpusculum labreanum*.

3.5.9. Elaboración de árboles filogenéticos empleando secuencias parciales 16S rDNA y *mcrA*

Una vez que se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de cada banda de *DGGE* seleccionada, se utilizó el programa *BLAST* (*basic local alignment search tool*), encargado de encontrar regiones similares entre secuencias de nucleótidos o proteínas con secuencias que se encuentran en una base de datos. Además, calcula estadísticamente la coincidencia significativa entre ellas (BLAST, 2012) y con esto se puede conocer la identidad de las bandas en estudio. Con base en los parámetros estadísticos de coincidencia se eligieron secuencias de arqueas metanogénicas y se elaboraron dos árboles filogenéticos uno correspondiente a secuencias nucleotídicas de arqueas metanogénicas relacionadas con la secuencia *16S de RNA* ribosomal y otro con secuencias proteínicas de arqueas metanogénicas relacionadas con *McrA* o Coenzima M.

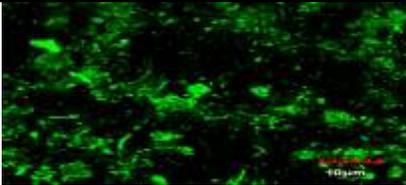
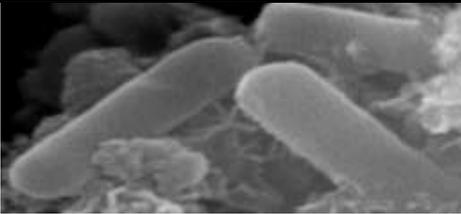
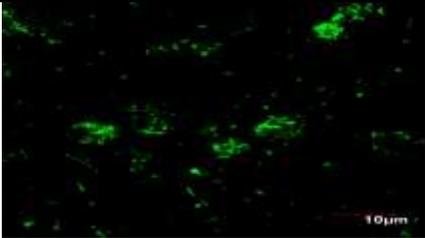
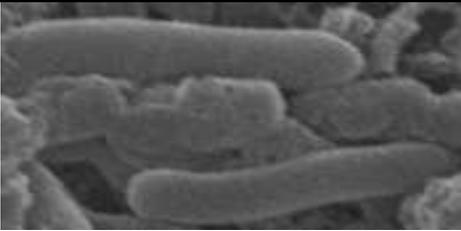
Para la elaboración de los árboles preliminares se utilizó el programa *Seaview* en la modalidad *PhyML*. Los dos árboles definitivos se obtuvieron por *PhyML* con el servicio de una plataforma bioinformática de Francia llamada *ATGC* (2012): *Montpellier Bioinformatics platform*. Esta base de datos proporciona análisis de genética de poblaciones, evolución molecular, dinámica genómica, genómica comparativa y funcional y análisis filogenético (ATGC, 2012). Por último, para la edición de los árboles se utilizó el programa *FigTree* versión 1.3.1.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Microscopía confocal espectral y microscopía electrónica de barrido

La Tabla 15 muestra las micrográficas obtenidas en las técnicas de microscopía utilizadas en las muestras provenientes de cada RALLFA operando a 45, 55 y 65°C.

Tabla 15. Micrográficas obtenidas de las muestras de cada RALLFA bajo dos diferentes técnicas de microscopía: confocal espectral y electrónica de barrido

| | Microscopía confocal espectral | Microscopía electrónica de barrido |
|--------------------|--|--|
| 45°C |  |  |
| Descripción | En la parte inferior de la micrografía se pueden observar algunas estructuras en forma de bacilos largos. No se observa una agrupación definida ya que por tratarse de una muestra ambiental las arqueas metanogénicas se encuentran ocluidas en lodo. | Bacilos cortos y anchos con extremos regulares bien definidos. Medidas: 3µm largo, 0.5 µm ancho |
| 55°C |  |  |
| Descripción | No se observan estructuras ni agrupaciones definidas. La fluorescencia emitida es menor que en la muestra del RALLFA 45°C, esto puede deberse a que la densidad de metanogénicas es menor en esta muestra o bien se presentó un proceso de muerte celular. | Bacilos cortos y delgados con extremos muy bien definidos. Medidas: 5µm largo, 0.5 µm ancho |
| 65°C |  |  |
| Descripción | Estructuras y agrupaciones indefinidas e irregulares. La densidad microbiana o cantidad de metanogénicas es menor que la observada en la primer imagen. | Bacilos largos con extremos irregulares. Medidas: 6µm largo, 0.4 µm ancho |

Las micrografías mostradas en la Tabla 15 presentan la autofluorescencia de arqueas metanogénicas encontradas en cada RALLFA. Dadas las características de las arqueas metanogénicas la microscopía confocal es una técnica útil para detectar la presencia de éstas en un cultivo (arqueas aisladas) y/o en una muestra ambiental (arqueas sin previo aislamiento). En este caso se realizó el estudio de una muestra ambiental. La propiedad de autofluorescencia en metanogénicas es debida a la abundancia de la coenzima F_{420} , implicada en la metanogénesis. La coenzima F_{420} es la derivada de la flavina que participa en el proceso de transporte de electrones en el citoplasma de las arqueas, esta coenzima debe su nombre gracias a la absorción de luz UV a una longitud de onda de 420 nm. En las imágenes presentadas se pueden observar series de manchas o puntos verdes los cuales corresponden a arqueas metanogénicas presentes en la muestra de lodo de cada RALLFA.

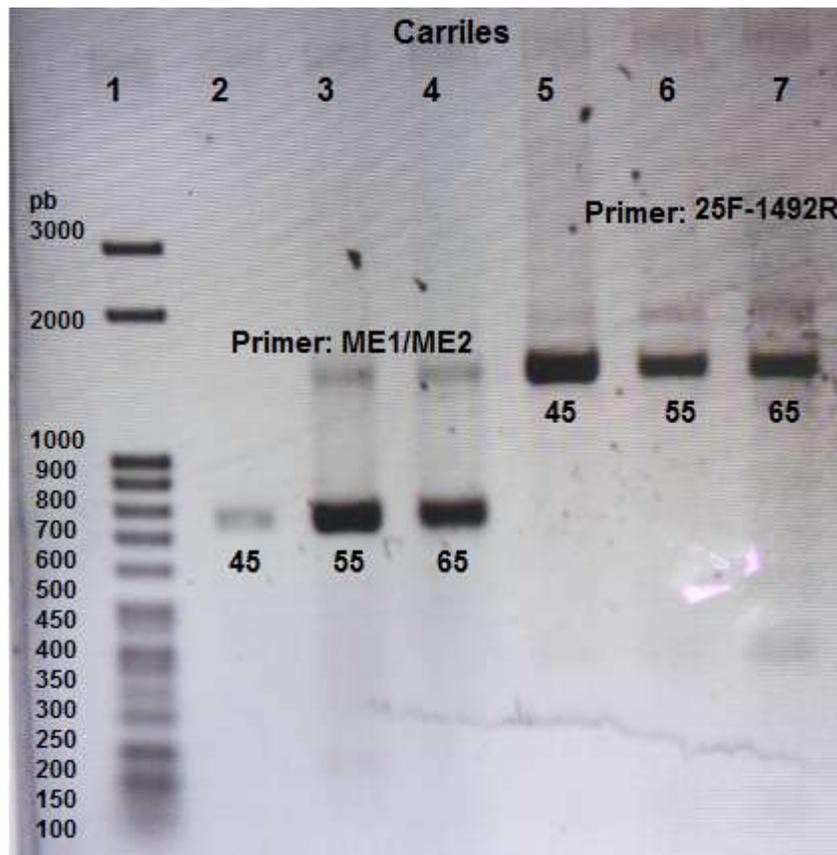
Por su parte la microscopía electrónica de barrido es empleada cuando en una muestra sólo se pretenden estudiar las estructuras externas de un organismo y no son necesarios los cortes finos. Es por ello que en este caso la muestra sí requiere un tratamiento para ser observada. En esta técnica se aprecia la morfología de los microorganismos; sin embargo, no se puede asegurar que se trate de arqueas metanogénicas puesto que en la muestra se pudieran encontrar muchos otros microorganismos. Es interesante destacar que a pesar de no ser un cultivo puro sí existe una regularidad en cuanto a morfología. Este hecho puede indicar que la diversidad microbiana es poca o bien que existen grupos microbianos dominantes como puede ser el caso de bacterias sulfato-reductoras, que son anaerobias estrictas y se encuentran ocluidas en los lodos. Además, se encuentran en constante competencia con las arqueas metanogénicas (Rabus *et al.*, 2006).

En los Anexos 3 y 4 se encuentra el resto de las micrografías obtenidas por las técnicas de microscopía utilizadas ya que en este capítulo únicamente se presentaron las imágenes más representativas de cada técnica.

4.2. Extracción de *DNA* metagenómico y amplificación de *DNA* de arqueas metanogénicas

Como se describió en el capítulo 3, la obtención de *DNA* metagenómico de cada lodo proveniente de los RALLFA operando a 45, 55 y 65°C, se realizó con un kit de extracción. Hasta este punto no se puede estar seguro de haber realizado una correcta extracción de *DNA* y tampoco de que éste pudiera ser amplificado con los *primers* seleccionados. Seguido de esto se procedió a amplificar el *DNA* de arqueas metanogénicas utilizando dos tipos de *primers*: ME1/ME2 y 25F-1492R. Para corroborar estos resultados se realizó una electroforesis en gel de agarosa con las muestras de *DNA* amplificado. La electroforesis en gel de agarosa es un método estándar utilizado para separar y/o identificar fragmentos de *DNA*. El glúcido agarosa extraído de las algas es un polímero lineal compuesto básicamente por D y L- galactosa. Este glúcido forma una matriz que actúa como un cedazo molecular para separar fragmentos de *DNA* de diferentes tamaños. El tamaño de los fragmentos analizados está en el intervalo de los 150 pares de bases a 2500 pb. La Fig. 19 muestra los resultados obtenidos en la amplificación de *DNA* de arqueas metanogénicas. En esta figura se observa claramente que el *DNA* extraído del lodo de cada uno de los reactores RALLFA sí logró ser amplificado con los *primers* seleccionados. El *primer* 25F-1492R amplifica selectivamente 1.5 kilobases de la región 16S rDNA de arqueas, dado que los metanogénicos pertenecen a este dominio, el *primer* 25F-1492R logrará amplificar la región que codifica la sección 16S de RNA ribosomal. El análisis del gen 16S de RNA ribosomal (16S rRNA) ha sido utilizado para estudiar la diversidad de comunidades bacterianas y de arqueas que se encuentran en ambientes extremos de pH, temperatura y concentración de sales. El interés de estudio de estos ambientes recae principalmente en conocer la diversidad microbiana de éstos, así como identificar nuevos microorganismos y entender el funcionamiento del sistema (Valenzuela-Encinas *et al.*, 2008).

Por su parte los *primers* ME1 y ME2 fueron utilizados debido a que amplifican 0.75 kilobases de la subunidad α de la metil coenzima M reductasa (McrA), conocida como MCR o Coenzima M (CoM). Está implicada en el último paso de la metanogénesis a partir de compuestos metilados, en donde una molécula de metilo (CH_3) forma una molécula de metano (CH_4). La Coenzima M se encuentra en un dominio conservado de las arqueas metanogénicas ya que es una enzima clave en la metanogénesis. Todo esto justifica el uso de los *primers* ME1/ME2.



4.3. PCR anidada

En la *PCR* anidada, el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación utilizando *primers* que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada, es decir, cuando se tiene el primer *amplicon* se pueden unir los *primers* y así obtener una nueva amplificación dentro del *amplicon* inicial. Este tipo de *PCR* tiene la ventaja de brindar alta sensibilidad y especificidad evitando posibles hibridaciones inespecíficas de los *primers*. Para el anidado de las secuencias amplificadas con el *primer 25F-1492R* se utilizó el *primer A1032F-1434R-GC*. Por su parte para el anidado de las secuencias amplificadas con los *primers ME1/ME2* se utilizaron éstos mismos.

Luego de realizar la *PCR* anidada y la electroforesis de estos productos se observaron bandas a 750 pb utilizando *ME1* y *ME2* y 450 pb utilizando *primer A1032F-1434R-GC*.

4.4. DGGE y secuencias obtenidas

a) Gradiente 50% - 80%

Amplicones primer A1032F-1434R-GC

b) Gradiente 40% - 60%

Amplicones primer A1032F-1434R-GC y Amplicones primer ME1/ME2

c) Gradiente 40% - 70%

Amplicones primer A1032F-1434R-GC y Amplicones primer ME1/ME2

En los geles mostrados se observan diferentes bandas que corresponden a secuencias particulares de arqueas metanogénicas. En el gel de la Figura 20 se definieron pocas bandas en cada carril ya que no hubo una resolución adecuada. Además, en la parte final de cada uno se observan bandas gruesas e intensas que pueden resolverse con un gradiente desnaturalizante diferente. Es por ello que se elaboró un segundo gel (Fig. 21) con gradiente 40% - 60%. En este gel se obtuvo una mayor cantidad de bandas definidas tanto para el *DNA* amplificado por *A1032F-1434R-GC* y por *ME1/ME2*. El tercer gel elaborado con gradiente 40% -

70% (Fig. 22) muestra un patrón de bandas muy similar al del segundo gel, por ello no se cortó ninguna banda de éste. La Tabla 16 indica las bandas seleccionadas de cada *DGGE* enviadas a secuenciar, así como la procedencia y nombre de cada una. De esas 28 bandas se obtuvo su secuencia nucleotídica, mismas que se encuentran en el Anexo 5 de este documento.

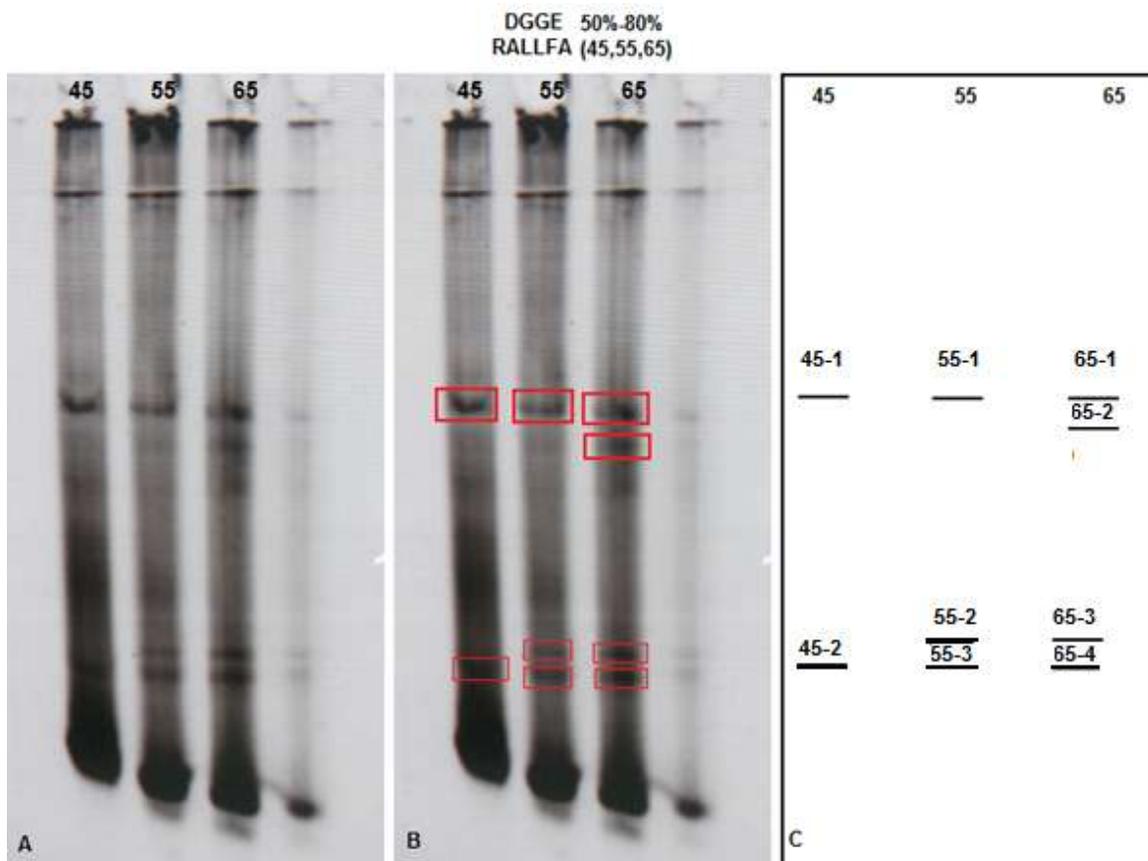


Fig. 20. *DGGE* con gradiente desnaturizante 50% - 80% . A: se observan los tres carriles correspondientes a las muestras de *DNA* de cada RALLFA (45, 55 y 65), así como diferentes bandas en cada carril correspondientes a filotipos de arqueas metanogénicas. B: bandas cortadas del gel. C: esquema con el patrón de bandas obtenido

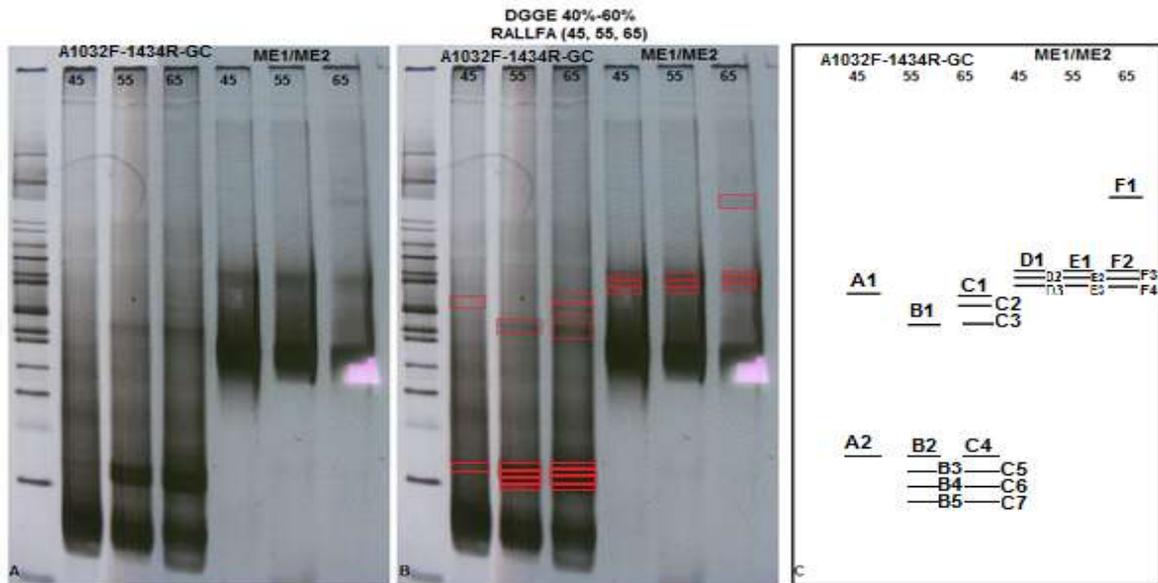


Fig. 21. *DGGE* gradiente desnaturalizante 40%-60%. A: gel teñido, en el primer carril del lado izquierdo se encuentra el marcador molecular, en los siguientes tres carriles el *DNA* de arqueas metanogénicas amplificado con el *primer* A1032F-1434R-GC; en los últimos tres carriles se encuentran las amplificaciones con los *primers* ME1/ME2. B: bandas definidas para cortar del gel. C: patrón de bandas obtenido

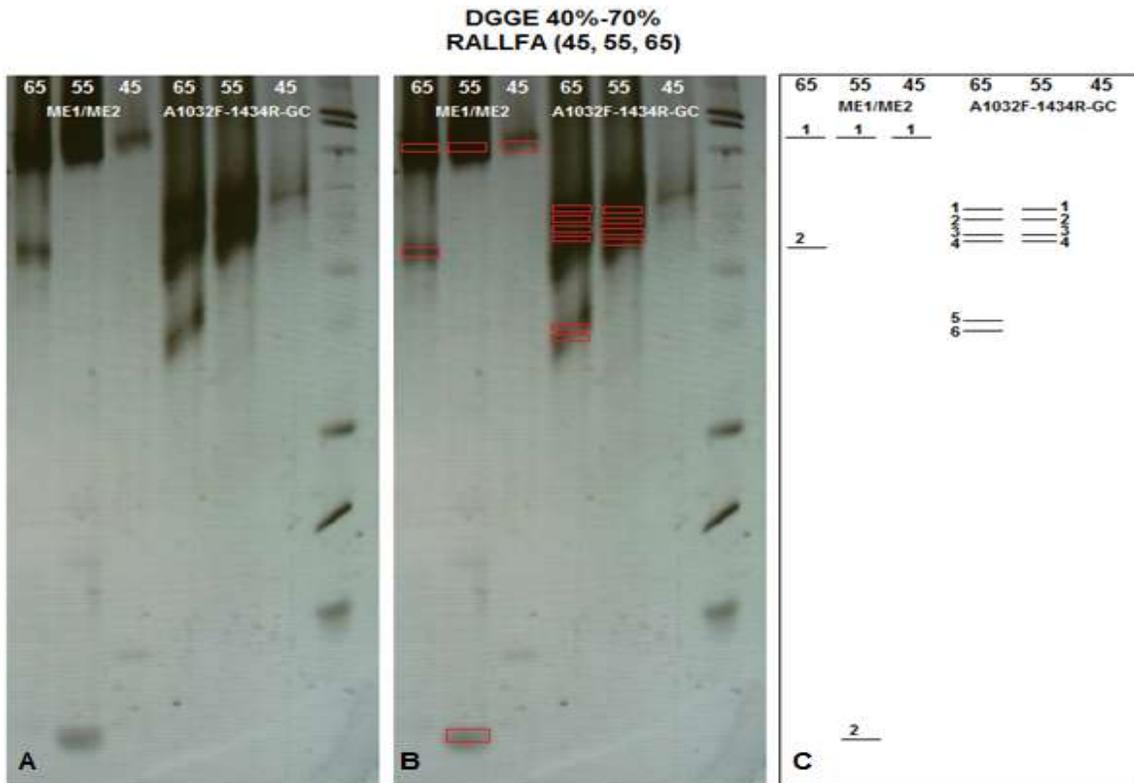


Fig. 22. *DGGE* con gradiente desnaturalizante 40%-70%. A: gel teñido, los primeros tres carriles muestran las bandas de *DNA* de arqueas metanogénicas amplificado con los *primers* ME1/ME2, en los siguientes tres se encuentran las amplificaciones con el *primer* A1032F-1434R-GC. B: bandas definidas en el gel. C: patrón de bandas

Tabla 16. Bandas de *DNA* de arqueas metanogénicas procedentes de *DGGE* que fueron enviadas a secuenciar

| <i>DGGE</i> | RALLFA | <i>Primer</i> | Nombre de la banda | |
|-------------|--------|------------------------|--------------------|----|
| 50-80% | 45°C | <i>A1032F-1434R-GC</i> | 45-1 | |
| | | | 45-2 | |
| | 55°C | | 55-1 | |
| | | | 55-2 | |
| | 65°C | | 65-2 | |
| | | | 65-3 | |
| | | | 65-4 | |
| 40-60% | 45°C | <i>A1032F-1434R-GC</i> | A1 | |
| | | | A2 | |
| | B1 | | | |
| | B2 | | | |
| | B3 | | | |
| | B4 | | | |
| | C1 | | | |
| | 65°C | C2 | | |
| | | C3 | | |
| | | C4 | | |
| | 45°C | <i>ME1/ME2</i> | C5 | |
| | | | C7 | |
| | | | D1 | |
| | | | D2 | |
| | | | D3 | |
| | | | 55°C | E1 |
| | | | | E2 |
| 65°C | E3 | | | |
| | F1 | | | |
| | F2 | | | |
| | | | F3 | |

4.5. Análisis bioinformático

4.5.1. Alineamiento del *primer A1032F-1434R* con secuencias de arqueas metanogénicas

El objetivo fue justificar el uso de este *primer* en la amplificación de *DNA* de arqueas metanogénicas. Se sabe que éste amplifica la región *16S de RNA* ribosomal de arqueas, siendo ésta, una región estructural. Por su parte el *primer ME1/ME2* amplifica una región funcional que corresponde a la subunidad alfa de la metil coenzima M reductasa (*McrA*) implicada en la metanogénesis. Podría pensarse que el *primer* funcional posee mayor especificidad y fidelidad en la amplificación de metanogénicas que el *primer* estructural; sin embargo, los alineamientos mostrados en la Fig. 23 a, b confirman que sí es posible amplificar

la región 16S RNAr de arqueas que son metanogénicas. Es así como se justifica el uso del *primer A1032F-1434R* en esta investigación.

a)

```

Mbryantii : cgtcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccacgccccttagttaccagc : 50
Mformicicu : cgtcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccacgccccttagttaccagc : 50
Mbarkeri : catcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccgtgcccaactgttaccagc : 50
Mvacuolata : catcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccgtgcccaactgttaccagc : 50
Mmazeii : catcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccgtgcccaactgttaccagc : 50
Mlacustris : catcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccgtgcccaactgttaccagc : 50
Mhoronoben : catcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccgtgcccaactgttaccagc : 50
Msemesiae : catcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccgtgcccaactgttaccagc : 50
Mthermoaut : cgtcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccacgccccttagttaccagc : 50
Mcrinale : cgtcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccacgccccttagttaccagc : 50
Mthermofle : cgtcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccacgccccttagttaccagc : 50
Mthermophi : cgtcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccacgccccttagttaccagc : 50
Mpirillum : catcctgtttagtcaggcaacgagcggagaccccacgccccttagttaccagc : 50
Mhungatei : catcctgtttagtcaggcaacgagcggagaccccacgccccttagttaccagc : 50
Msoehngeni : catcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccacgccccttagttaccagc : 50
Methanosae : catcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccacgccccttagttaccagc : 49
Marboriphi : cgtcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccacgccccttagttaccagc : 50
Msp : cgtcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccacgccccttagttaccagc : 50
Marbor : cgtcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccacgccccttagttaccagc : 50
Moralis : cgtcctgttaagtcaggcaacgagcggagaccccacgccccttagttaccagc : 50
Mlabreanum : CATCCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCACGCCGACAATTGCCAGC : 50
Primer_103 : -----GGRAACGAGCGAGACCY----- : 17
Primer_143 : ----- : -

```

b)

```

Mbryantii : ttgaggagggcggaagtcgtaaacaggtagccgtaggggga : 434
Mformicicu : ttgaggagggcggaagtcgtaaacaggtagccgtaggggga : 434
Mbarkeri : gcaagggggggttaagtcgtaaacaggtagccgtaggggga : 435
Mvacuolata : gcaagggggggttaagtcgtaaacaggtagccgtaggggga : 435
Mmazeii : gcaagggggggttaagtcgtaaacaggtagccgtaggggga : 435
Mlacustris : gcaagggggggttaagtcgtaaacaggtagccgta----- : 430
Mhoronoben : gcaagggggggttaagtcgta----- : 416
Msemesiae : gcaagggggggttaagtcgtaaacaggtagccgtaggggga : 435
Mthermoaut : ttgaggagggcggaagtcgtaaacaggtagccgtaggggga : 436
Mcrinale : ttgaggagggcggaagtcgtaaacaggtagcc----- : 429
Mthermofle : ttgaggagggcggaagtcgtaaacaggtagccgtaggggga : 435
Mthermophi : ttgaggagggcggaagtcgtaaacaggtagccgta-gggga : 435
Mpirillum : gcaagggggggttaagtcgtaaacaggtagccgtaggggga : 432
Mhungatei : gcaagggggggttaagtcgtaaacaggtagccgtaggggga : 432
Msoehngeni : gcaagggggggttaagtcgtaaacaggtagccgtaggggga : 434
Methanosae : gcaagggggggttaagtcgtaaacaggtagccgtaggggga : 433
Marboriphi : ttgaggagggcggaagtcgtaaacaggtagccgtaggggga : 436
Msp : ttgaggaggggtgaagtcgtaaacaggga----- : 422
Marbor : ttgaggagggcggaagtcgtaaacaggtagcc----- : 428
Moralis : ttaaggagggcggaagtcgtaaacaggtagccgtaggggga : 439
Mlabreanum : GTGAGGAGGGTTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGA : 433
Primer_103 : ----- : -
Primer_143 : -----AAGTCGTAACAAGGTAACC----- : 19

```

Fig. 23. Alineamientos de *primer A1032F-1434R*. La Fig. 23 a indica el alineamiento del *forward* o derecho del *primer* (1032F). La Fig. 23 b indica alineamiento del *reverse* o reverso (1434R). Mbryantii: *Methanobacterium bryantii*; Mformicicu: *Methanobacterium formicicum*; Mbarkeri: *Methanosarcina barkeri*; Mvacuolata: *Methanosarcina vacuolata*; Mmazeii: *Methanosarcina mazeii*; Mlacustris: *Methanosarcina lacustris*; Mhoronoben: *Methanosarcina horonobensis*; Memeiae: *Methanosarcina semesiae*; Mthermoaut: *Methanosarcina thermoautotrophicum*; Mthermophi: *Methanosarcina thermophila*; Mcrinale: *Methanothermobacter crinale*; Mthermophi: *Methanothermobacter thermophilum*; Mpirillum: *Methanospirillum* sp.; Mhungatei: *Methanospirillum hungatei*; Msoehngeni: *Methanotherx soehngeni*; Methanosae: *Methanosaeta* sp.; Marboriphi: *Methanobrevibacter arboriphilus*; Msp: *Methanobrevibacter* sp.; Marbor: *Methanobrevibacter arboriphilus* SH4; Moralis: *Methanobrevibacter oralis*; Mlabreanum: *Methanocorpusculum labreanum*

4.5.2. Árboles filogenéticos de arqueas metanogénicas en cada RALLFA

De las 28 secuencias obtenidas fueron seleccionadas 16. Esta selección se realizó tomando en cuenta la calidad de la secuencia.

En el primer árbol (Fig. 24), se analiza la filogenia de las secuencias relacionadas con la subunidad 16S del rRNA de arqueas metanogénicas. Los géneros de metanogénicas más cercanas y con mayor coincidencia a las secuencias analizadas son *Methanoculleus*, *Methanospirillum*, *Methanofollis* y *Methanocropusculum*, todos ellos pertenecen al orden Methanomicrobiales. Se puede apreciar en el árbol que las secuencias 45_1, 55_2, B3, B4, C4 y C7 se encuentran más cercanas al género *Methanoculleus*, de las cuales sus especies predominan en el árbol. Por su parte las secuencias C1, C2 y C3 de este mismo árbol se encuentran cercanas a arqueones pertenecientes al orden Methanomicrobiales que hasta la fecha no han sido cultivados pero se han encontrado en sedimentos y/o biodigestores.

Los géneros pertenecientes al orden Methanomicrobiales son arqueas metanogénicas hidrogenotróficas. Esto significa que son capaces de reducir CO₂ a CH₄ utilizando H₂ como donador de electrones. Esta ruta metabólica inicia con la formación de N-carboximethanofurano que proviene de CO₂ y de metanofurano el cual es inmediatamente reducido a formil-metnofurano. Esta reacción es gracias al cofactor F₄₂₀ (8-hdroxi-5-deazaflavina) y enzimas hidrogenasas (Deppenmeier *et al.*, 1996). Según Kudo *et al.* (1997), los reactores anaerobios así como los lodos activados son los hábitats más comunes de géneros y especies pertenecientes al orden Metanomicrobiales, especialmente de *Methanoculleus*, *Methanofollis*, *Methanocropusculum*, *Methanospirillum* y *Methanomicrobium*. Según la literatura muchas de las especies pertenecientes a dichos órdenes han sido aisladas de estos hábitats (Liu, 2010).

Por su parte, McrA es un marcador molecular funcional ya que codifica para la subunidad alfa de la metil coenzima M reductasa, enzima clave en la metanogénesis. Es por ello que en esta investigación también se utilizó este marcador molecular filogenético. Las secuencias obtenidas a partir de éste son las que se muestran en la filogenia de la Fig. 25. En este árbol se observa que D1, D2, D3, E1, E2 y F2 son secuencias relacionadas con especies de los géneros *Methanobacterium* y *Methanothermobacter*, que a su vez pertenecen al orden Methanobacteriales. En la filogenia se muestran las especies *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanothermobacter marburgensis*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Methanobacterium alcophilum* y *Methanothermobacter wolfeii* (Tabla 17). Según la literatura, estas especies poseen un metabolismo hidrogenotrófico (tal como especies del orden Methanomicrobiales), y su temperatura óptima de proliferación se encuentra en un intervalo termofílico de 40 hasta 65°C (Smith *et al.*, 1997). El aislamiento de especies de estos géneros ha sido mayoritariamente de reactores anaerobios, seguido de campos petroleros, sedimentos marinos y tractos gastrointestinales de rumiantes. La secuencia F1 se encuentra en el orden de Methanomicrobiales, cercana a los géneros *Methanoculleus* y *Methanospirillum*, ésta ha coincidido con los resultados de la filogenia de 16S *rRNA* (Fig. 24).

Este estudio ha mostrado que los órdenes Methanobacteriales y Methanomicrobiales corresponden a los metanógenos más abundantes en cada RALLFA. Esto, a su vez, indica que son las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas las que predominan en la producción de metano dentro de cada reactor. Las temperaturas óptimas de proliferación de las especies encontradas coinciden con la temperatura de trabajo de cada reactor anaerobio en estudio (45, 55 y 65°C respectivamente) (Tabla 17).

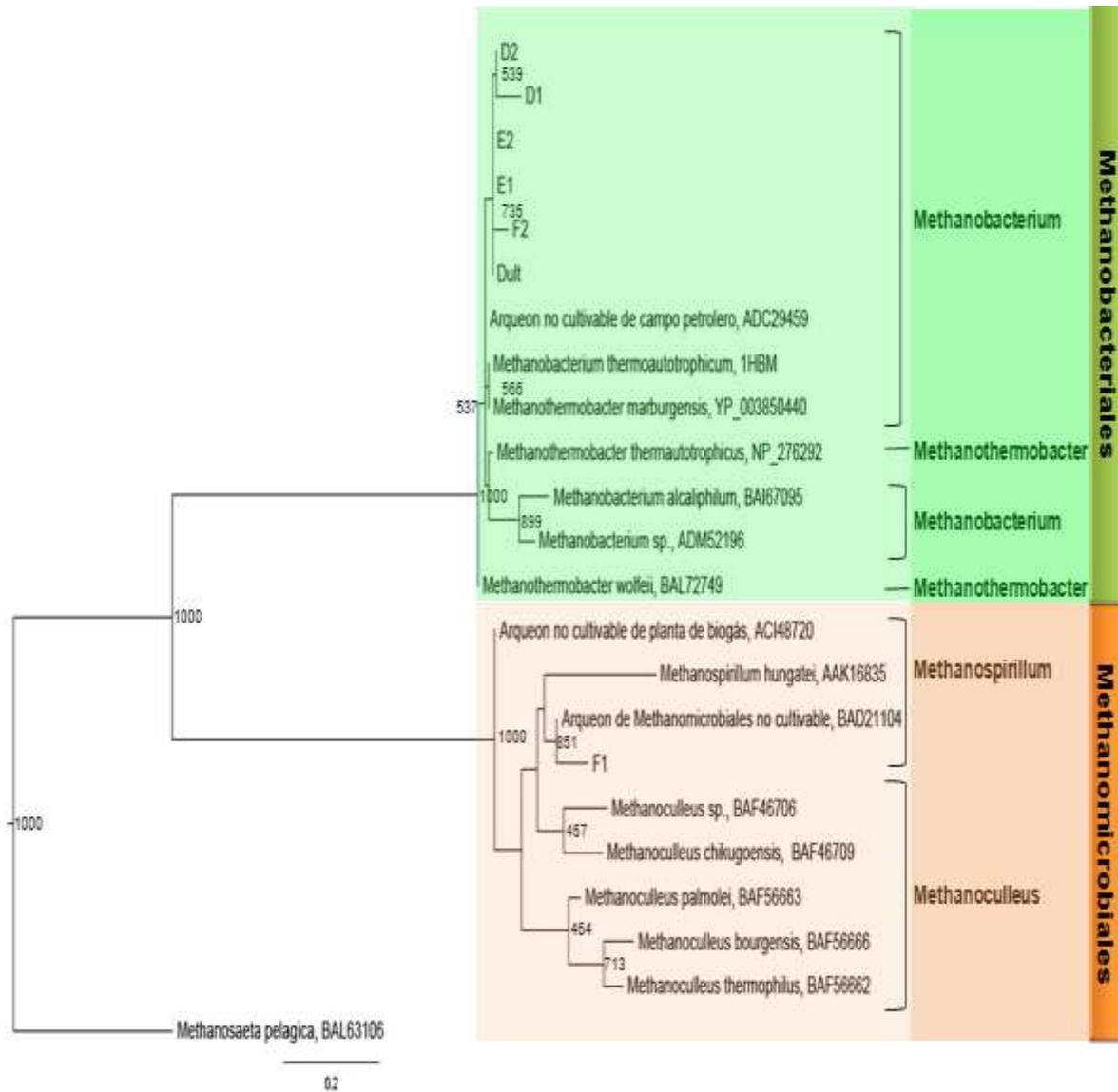


Figura 25. Relación filogenética entre secuencias de *McrA* (Coenzima M reductasa) y bandas de arqueas metanogénicas de reactores anaerobios tipo RALLFA, obtenidas mediante DGGE. El árbol fue construido con secuencias relacionadas a los géneros *Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, que pertenecen al orden Methanobacteriales, y también, los géneros *Methanoculleus* y *Methanospirillum* que pertenecen al orden Methanomicrobiales. Como grupo externo fue utilizado *Methanosaeta pelagica*. Seguido de cada nombre de microorganismo se encuentra su número de acceso en la base de datos "GenBank" de NCBI. Los números en los nodos del árbol representan el valor del bootstrap en porcentaje. La barra inferior muestra una escala correspondiente a 4% de divergencia

Tabla 17. Características de las especies encontradas en la filogenia con 16S rDNA y *McrA* (ND: No determinado)

| Arquea metanogénica (número de acceso en <i>GenBank</i>) | Dimensiones (µm) | Fuente de aislamiento | Sustratos para metanogénesis | Temperatura de proliferación (óptima) (°C) | pH (óptimo) | Referencia |
|---|------------------|---------------------------------|--|--|-------------------|---------------------------------|
| <i>Methanoculleus receptaculi</i> (NR_043961) | 0.8-1.7 | Campo petrolero | H ₂ + CO ₂ , isobutanol, butanol | (50-55) | 7.5-7.8 | Cheng <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Methanoculleus bourgensis</i> (NR_042786) | 1-2 | Biodigestor (reactor anaerobio) | H ₂ + CO ₂ , formato | 37-45 (35-40) | 5.5-8.0 (6.7) | Liu, 2010 |
| <i>Methanoculleus marisnigri</i> (AF028253) | 1.3 | Sedimento marino | H ₂ + CO ₂ , formato, 2-propanol, 2-butanol | 10-45 (20-25) | 5.8-7.6 (6.2-6.6) | Liu, 2010 |
| <i>Methanoculleus chikugoensis</i> (BAF46709) | 1-2 | Suelos de cultivo de arroz | H ₂ + CO ₂ , formato, 2-propanol, 2-butanol, ciclopentanol | 15-40 (25-30) | 6.7-8.0 (6.7-7.2) | Liu, 2010 |
| <i>Methanoculleus thermophilus</i> (BAF56662) | 0.6-1.8 | Sedimento de planta nuclear | H ₂ + CO ₂ , formato | 37-65 (55-60) | 6.2-7.8 (6.5-7.2) | Liu, 2010 |
| <i>Methanoculleus palmolei</i> (NR_028253) | 1.25-2 | Biodigestor (reactor anaerobio) | H ₂ + CO ₂ , formato, 2-propanol, 2-butanol, ciclopentanol | 22-50 (40) | 6.5-8.9 (6.9-7.5) | Liu, 2010 |
| <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> (1HBM) | 1-2 | ND | H ₂ + CO ₂ | >65 | (6.5-7.5) | Pihl <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>Methanobacterium alcaliphilum</i> (BAI67095) | 2 | Sedimento lacustre | H ₂ + CO ₂ | 35-45 (37) | 7.8-9.2 (8.4) | Worakit <i>et al.</i> , 1986 |
| <i>Methanobacterium</i> sp.(ADM52196) | 0.3-0.5x2-5 | Sedimento lacustre | H ₂ + CO ₂ , formato | 35-45 (37) | 6.9-7.5 | Zhu <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Methanothermobacter thermotrophicus</i> (NP_276292) | 1-2 | ND | H ₂ + CO ₂ | >65 | (6.5-7.5) | Pihl <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>Methanothermobacter wolfeii</i> (BAL72749) | 1-2 | Sedimento de río | H ₂ + CO ₂ | 55-65 | 6.5-7.9 (6.9-7.5) | Winter <i>et al.</i> , 1985 |
| <i>Methanospirillum hungatei</i> (AAK16835) | 0.4-0.5 | Lodos activados | H ₂ + CO ₂ , formato | (30-37) | (6.6-7.4) | Liu, 2010 |
| <i>Methanofollis ethanolicus</i> (NR_041669) | 2-3 | Campo de loto | H ₂ + CO ₂ , formato, 1-propanol, 1-butanol | 15-40 (37) | 6.5-7.5 (7.0) | Imachi <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Methanocorpusculum labreanum</i> (NC_008942) | 0.4-2-0 | Sedimento lacustre | H ₂ + CO ₂ , formato | <45 (37) | 6.5-7.5 (7.0) | Liu, 2010 |
| <i>Methanomassilicoccus luminyensis</i> (HQ896499) | ND | Heces humanas | H ₂ + CO ₂ , metanol | (37) | (7.6) | Dridi <i>et al.</i> , 2012 |
| Arqueón no cultivable (JX101965) | ND | Biodigestor (reactor anaerobio) | H ₂ + CO ₂ | (35) | (7.0) | Cardinali <i>et al.</i> , 2012 |
| Arqueón no cultivable (AB598075) | ND | Sedimento marino | H ₂ + CO ₂ | (10) | (7.0) | Imachi <i>et al.</i> , 2011 |
| Arqueón no cultivable (AJ576219) | ND | Lixiviados | H ₂ + CO ₂ | ND | 8.0-8.4 (8.2) | Huang <i>et al.</i> , 2003 |
| Arqueón no cultivable (FJ205782) | ND | Planta de biogas | H ₂ + CO ₂ , alcoholes no determinados y acetato | (40) | ND | Kröber, 2009 |
| Arqueón no cultivable (ADC29459) | ND | Campo petrolero | H ₂ + CO ₂ , alcoholes no determinados | (55) | ND | Gieg <i>et al.</i> , 2010 |
| Arqueón no cultivable (BAD21104) | ND | Reactor anaerobio | Acetato | (37) | (7.4) | Shigematsu <i>et al.</i> , 2004 |

Tomando en consideración estos resultados se deja ver que la población de metanogénicas dentro de cada RALLFA es poco diversa ya que sólo se encontraron especies de 2 de los 5 órdenes de arqueas metanogénicas. Sin embargo, se debe tomar en consideración que la composición microbiana depende de varios factores tales como el o los tipo(s) de sustrato(s) presentes en el medio, la temperatura, pH, tipo de mezclado y geometría del biodigestor (Chenguang *et al.*, 2011; Nettmann *et al.*, 2008). En esta investigación, por tratarse de reactores anaerobios tipo RALLFA termofílicos, la diversidad es reducida pues son pocas las especies capaces de subsistir a altas temperaturas. Una vez que se conoce la organización y el comportamiento de las múltiples comunidades, se puede optimizar y/o estabilizar el proceso de degradación anaerobia que se está llevando dentro del biodigestor (Wirth *et al.*, 2012).

Los filotipos encontrados en los tres reactores anaerobios tipo RALLFA pertenecen a arqueas metanogénicas hidrogenotróficas, esto implica que la formación de metano en cada reactor es mayoritariamente a partir de H₂ y CO₂, dejando en menor proporción la formación de metano a partir de acetato (metanogénesis acetoclástica) y de compuestos metilados.

A pesar de que no se encontraron especies que lleven a cabo metanogénesis acetoclástica ni de compuestos metilados, no significa que no existan especies de este tipo dentro de los RALLFA. Debe recordarse que hubo una serie de bandas que no lograron ser resueltas ni vistas en los *DGGE*, éstas podrían tratarse de filotipos distintos a los encontrados. Al mismo tiempo, no todas las secuencias obtenidas fueron utilizadas puesto que de las 28 secuencias solo se recuperaron 16, el resto fueron omitidas debido al ruido y poca confiabilidad que se observó en el análisis bioinformático.

CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Basándose en el objetivo principal que fue estudiar la diversidad filogenética de arqueas metanogénicas presentes en tres reactores tipo RALLFA operando en condiciones termofílicas a 45, 55 y 65°C, encargados del tratamiento de un agua residual conocida como vinazas provenientes de la industria alcohólica, se puede concluir lo siguiente:

- Mediante la microscopía confocal, ajustando el haz de luz a una longitud de onda de 420 nm, se lograron detectar arqueas metanogénicas en muestras de lodo de cada RALLFA. No se observaron estructuras definidas ni morfología de las arqueas pero la autofluorescencia al ser característica de las metanogénicas comprueba su presencia en los tres reactores tipo RALLFA
- La microscopía de barrido no es una técnica que en este caso logre identificar arqueas metanogénicas puesto que se partió de un cultivo impuro; sin embargo, se conoció la morfología de microorganismos ocluidos en los lodos de cada reactor. En cada muestra se observaron morfologías casi homogéneas, lo que puede representar poca diversidad microbiana o bien la presencia de familias de microorganismos con población dominante en los RALLFA. En este caso puede tratarse de bacterias sulfato-reductoras, que son anaerobias estrictas y se encuentran en constante competencia con las arqueas metanogénicas
- Se logró extraer *DNA* metagenómico de los lodos de cada reactor anaerobio en estudio utilizando el *Kit Power Soil® DNA Isolation Kit. Mo Bio Laboratories*. A partir de este *DNA*, se amplificó el *DNA* de arqueas

metanogénicas utilizando dos tipos de *primers*: 25F-1492R y ME1/ME2. Los protocolos de amplificación propuestos por Valenzuela-Encinas *et al.* (2008) y Hales *et al.* (1996) fueron los adecuados para esta investigación, obteniendo amplicones de 750 y 1500 pb, respectivamente

- Los amplicones obtenidos se sometieron a un proceso de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (*DGGE*). Los mejores gradientes para obtener bandas resueltas de *DNA* de metanogénicas fueron 50%-80% y 40%-60%
- Se obtuvieron las secuencias de 28 bandas cortadas de dos *DGGE*. De estas 28, 16 fueron sometidas a un análisis bioinformático y filogenético; las secuencias fueron: 45_1, 55_2, B3, B4, C1, C2, C3, C4, C7, D1, D2, D3, E1, E2, F1 y F2. Se elaboraron dos árboles filogenéticos, el primero con las secuencias relacionadas con el gen *16S rRNA* y el segundo con las secuencias relacionadas al gen *mcrA*
- Del estudio filogenético se encontró que las familias y géneros de los órdenes Methanomicrobiales y Methanobacteriales son dominantes en la población de arqueas metanogénicas dentro de cada RALLFA. Los géneros con mayor porcentaje de coincidencia fueron *Methanoculleus*, *Methanospirillum*, *Methanofollis* y *Methanocorpusculum*. Los géneros pertenecientes al orden Methanobacteriales fueron *Methanobacterium* y *Methanothermobacter*. Los filotipos pertenecen a arqueas metanogénicas hidrogenotróficas y esto indica que en los RALLFA predomina la formación de metano a partir de H₂ y CO₂.

Este estudio reporta por primera vez un análisis molecular de los filotipos de arqueas metanogénicas presentes en tres reactores anaerobios tipo RALLFA que operan a 45, 55 y 65°C encargados de tratar vinazas. En trabajos previos se desarrolló una metodología para el aislamiento arqueas metanogénicas partiendo de siembras en medio general, específico y selectivo, así como tinciones de Gram

(Vergara-Salgado, 2010), mientras que en la presente investigación se utilizaron técnicas moleculares independientes de cultivo, en donde a partir de una muestra ambiental se estudió la composición de determinados consorcios microbianos con la ayuda de marcadores moleculares *16S rRNA* y *mcrA* característicos de arqueas metanogénicas.

Este trabajo logra complementar satisfactoriamente los anteriores y deja paso para nuevas investigaciones en relación a este tema.

5.2. Recomendaciones

1. Debido a que en la técnica de *DGGE* no se lograron resolver algunas de las bandas en los geles, se recomienda estudiar las concentraciones adecuadas de agentes desnaturizantes para amplicones *16S rRNA* y otra concentración para amplicones del gen *mcrA*.
2. Aplicar otras técnicas moleculares independientes de cultivo, como la clonación-secuenciación, para profundizar en la identificación de los filotipos de arqueas metanogénicas en los RALLFA.
3. Aislar las arqueas metanogénicas, para la obtención de cultivos puros y estudiar sus características fisiológicas y metabólicas, para su futuro empleo en la inoculación de los RALLFA, como una manera de mejorar la eficiencia del proceso.
4. Estudiar la interacción entre arqueas metanogénicas y bacterias sulfato-reductoras dentro de los RALLFA, ya que éstas se encuentran en constante competencia y de esto depende la formación de metano o de ácido sulfhídrico (H_2S) como producto final de la degradación anaerobia.

BIBLIOGRAFÍA

- Acondicionamiento Químico (2011). Diagrama de puntos de dosificación de aditivos del proceso azucarero. Comunicación personal. México D. F. México. P. 1.
- Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R., Wolfe, R. S. (1979). Methanogens: Reevaluation of a Unique Biological Group. *Microbiological Reviews*. 43(2):260-296.
- Bernal-González, M., Bribiesca-Rangel, C., Hernández-Martínez, Y., Castro-González, A., Durán-de-Bazúa, M. C. (2002). Efecto de la temperatura en tres reactores de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA) sobre la remoción de materia orgánica y la producción de metano utilizando agua residual (vinaza). En FEMISCA XII CONGRESO NACIONAL DE INGENIERÍA SANITARIA Y CIENCIAS AMBIENTALES. Guanajuato, Gto., México. Abril 17-20, 2002 (*R, documento inédito: 10 pags.).
- Bitton, G. (1994). *Wastewater Microbiology*. Ed. Wiley – Liss. Nueva York, NY. EEUU. P. 245.
- Boone, D., Castenholz, R. Garrity, G. (2001). Volume one. The archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed. Springer Verlag. Nueva York, NY. EEUU. P. 721.
- Brochier-Armanet, A.C., Boussau, B., Gribaldo, S., Forterre, P. (2008). Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum the Traumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology*. 6:225-252.
- Bryant, M., Tzeng, S., Robinson, I, M., y Joyner, A. E. (1971). Nutrient requirements of methanogenic bacteria. *Advances in Chemistry Series*. American Chemical Society. Washington, D.C. EEUU. 105:23-40.
- Cardinali, R.J., Colturato, L., Colturato, T., Chartone, S.E., *et al.* (2012) Prokaryotic diversity and dynamics in a full-scale municipal solid waste anaerobic reactor from start-up to steady-state conditions. *Bioresource Technology*. 199:373-383.
- Cariello, N.F., Skopek, R.T. (1993). Mutational analysis using denaturing gradient gel electrophoresis and *PCR*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 288(1):103-112.

- Castro-González, A., Enríquez-Poy, M., Durán-de-Bazúa, C. (2001). Design, construction and starting-up of an anaerobic reactor for the stabilization, handling and disposal of excess biological sludge generated in a wastewater treatment plant. *Anaerobe Biotechnology*. 7:143:149.
- Castro-González A., Bernal-González M., Durán-de-Bazúa C. (2004). Tratamiento de vinazas de plantas destiladoras de alcohol usando consorcios microbianos anaerobios. *Bebidas Mexicanas*. 13(3):12-14, 16-20, 22-25.
- CEFP y Comité de la Agroindustria Azucarera. (2001). La agroindustria azucarera en México. Centro de Estudios de las Finanzas Públicas. México D.F. México. Pp. 5-27.
- Cheng, L., Qiu, T., Li, X., Wang, D.W., *et al.* (2008). Isolation and characterization of *Methanoculleus receptaculi* sp. Nov. from Shengli oil field, China. *FEMS Microbiol. Lett.* 285(1):65-71.
- Chenguang, Z., Zhang, J., Tang, Y., Xu, Z., Song, R. (2011). Diversity of methanogenic archaea in a biogas reactor fed with swine feces as the mono-substrate by *mcrA* analysis. *Microbiology Research*. 166:27-35.
- Dell'Anno, A., Bompadre, S., Danovaro, R. (2002). Quantification, base composition, and fate of extracellular *DNA* in marine sediments. *Limnol. Oceanogr.* 47(3):899-905.
- De Necochea, C.R., Canul, T.J. (2004). Secuenciación de ácidos nucleicos. Instituto de Biotecnología. UNAM. Cuernavaca, Mor. México.
- Deppenmeier, U., Müller, V., Gottschalk, G. (1996). Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Arch. Microbiol.* 165:149-163.
- Devlin, T. (1992). *Biochemistry*. Ed. Willey-Liss. Nueva York, NY. EEUU. Pp. 768-773.
- Díaz-Báez, M., Espitia, V. S., Molina, P. F. (2002). Digestión "anaerobia": una aproximación a la tecnología. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Primera Edición. Bogotá, Colombia. Pp. 168.

- Doddema, J.H., Vogels, D.G. (1978). Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 36(5):752-754.
- Dridi, B., Fardeau, M.L., Ollivier, B., Raoult, D., Drancourt, M. (2012). *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62(8):1902-1907.
- DSMZ. 2011. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. (<http://www.dsmz.de/>). Fecha de consulta: Abril 2011-Noviembre 2011.
- Durán-de-Bazúa, M.C. (2007). Estudios recientes sobre la sacarosa. Conferencia especial. Asamblea General Ordinaria de la Unión Nacional de Cañeros, A.C. y Seminarios de Capacitación y Actualización para Dirigentes Cañeros. Junio 6, México D.F. México.
- Fiandor-Rosario, H. (2008). Costos conjuntos y su utilización en la industria azucarera. Sistema de costos para la agroindustria azucarera. México D.F. México. Pp 3-6.
- García, J.L. (1990). Taxonomy and ecology of methanogens. *FEMS, Microbiology Reviews*. 87:297-308.
- Gieg, L.M., Davidova, I.A., Duncan, K.E., Suflita, J.M. (2010). Methanogenesis, sulfate reduction and crude oil biodegradation in hot Alaskan oilfields. *Environmental Microbiology*. 12(11):3074-3086.
- Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G., Bailey, M.J. (2000). Rapid method for coextraction of *DNA* and RNA from natural environments for analysis of ribosomal *DNA* and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5488-5491.
- Hales, A.B., Edwards, C., Ritchie, A.D., Hall, G., Pickup, R.W., Saunders, J.R. (1996). Isolation and identification of methanogen-specific *DNA* from blanket bog peat by *PCR* amplification and sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(2):668-675.

- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(4): 669-685.
- Huang, L.N., Chen, Y.Q., Zhou, H., Luo, S., Lan, C.Y., Qu, L.H. (2003). Characterization of methanogenic Archaea in the leachate of a closed municipal solid waste landfill. *FEMS Microbiology Ecology*. 46(2):171-177.
- Illman, W. (2006). Bioremediation and natural attenuation of groundwater contaminants: process fundamentals and mathematical models. Ed. John Wiley & Sons. 1a. ed. Nueva York, NY. EEUU. Pp. 7-18, 49-55, 68-82.
- Imachi, H., Sakai, S., Nagai, H., Yamaguchi, T., Takai, K. (2009). *Methanofollis ethanolicus* sp. nov., an ethanol-utilizing methanogen isolated from a lotus field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59(4):800-805.
- Imachi, H., Aoi, K., Tasumi, E., Saito, Y., Yamanaka, Y., Saito, Y., Yamaguchi, T., Tomaru, H., Takeuchi, R., Morono, Y., Inagaki, F., Takai, K. (2011). Cultivation of methanogenic community from subseafloor sediments using a continuous-flow bioreactor. *The ISME Journal, Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 5(12):1913-1925.
- INE. (1997). Sistema Integrado de Regulación Directo y Gestión Ambiental de la Industria (SIRG). Instituto Nacional de Ecología, Segunda edición, Semarnap/INE, México D.F. México. Pp. 355.
- Jiménez-Ambriz, R.M., Martínez-Garza, M.A. (1995). Instalación y arranque de un reactor anaerobio en un tren anaerobio-aerobio de una planta piloto de tratamiento de vinazas. Tesis de Licenciatura Ingeniero Químico, UNAM. Facultad de Química. México D.F. México. Pp.160.
- Kröber, M., Bekel, T., Diaz, N.N., Goesmann, A., Jaenicke, S., Krause, L., Miller, D., Runte, K.J., Viehöver, P., Pühler, A., Schlüter, A. (2009). Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *Journal of Biotechnology*. 142(1):38-49.
- Kudo, Y., Nakajima, T., Miyaki, T., Oyaizu, H. (1997). Methanogen flora of paddy soils in Japan. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22:39-48.

- Liu, Y. (2010). Methanomicrobiales. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_45.
- Madigan, T. M., Martinko M. J., Parker J. (2003). En: Biología de los microorganismos, Brock. Pearson Prentice Hall. 10ª ed. Madrid. España. Pp. 395-397, 448-452, 575-579.
- Mora, C.J. (1998). Apuntes sobre el origen de la caña e historia del gremio panelero. En: Manual de caña de azúcar para la producción de panela. Corpoica, Sena. Bucaramanga, Colombia.
- Mullis, K.B., Ferré, F., Gibbs, R.A. (1994). The polymerase chain reaction. Ed. Birkhäuser. Boston, MA. EEUU. Pp. 3-4.
- Muyzer, G., De Waal, C.E., Uitterlinden, G.A. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. 59(3):695-700.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Linke, B., Klocke, M. (2008). Archaea diversity with in a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and *mcrA* analysis. Journal of Applied Microbiology. 105:1835–1850.
- Patel, G. B. (1984). Characterization and nutritional properties of *Methanotherx concilii* sp. nov., a mesophilic, acetoclastic methanogen. Can. J. Microbiol. 30:1383-1396.
- Pihl, D.T., Sharma, S., Reeve, N.J. (1994). Growth phase-dependent transcription of the genes that encode the two methyl Coenzyme M reductase Isoenzymes and N-Methyltetrahydromethanopterin: Coenzyme M methyltransferasa in *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH. Journal of Bacteriology. 176(20):6384-6391.
- PROCAÑA. (2005). Industria azucarera australiana: (<http://www.ias-multimedia.com/webpages/procana/hica0002.htm>). Fecha de consulta: Marzo 2012.

- Rabus, R., Hansen, A.T., Widdel, F. (2006). Dissimilatory sulfate and sulfur reducing prokaryotes. En "Prokaryotes". Capítulo 1.22. Springer. New York. NY. EEUU. Pp. 2:659-768.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (*DNA* polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). *Biochemistry*. 74(12):5463-5467.
- Seghezze, L., Zeeman, G., Hamelers, M. (1998). A review: The anaerobic treatments of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology*. 65:175-190.
- Shigematsu, T., Tang, Y., Tsutomu, K., Kawaguchi, H., Morimura, S., Kida, K. (2004). Effect of dilution rate on metabolic pathway shift between acetoclastic and nonacetoclastic methanogenesis in chemostat cultivation. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(7):4048-4052.
- Sigler, V.W., Miniaci, C., Zeyer, J. (2004). Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. *Journal of Microbiological Methods*. 57:17-22.
- Smith, R.D., Stamm, D.L., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicaire, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., Reeve, J.N. (1997). Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* Δ H: functional analysis and comparative genomics. *Journal of Bacteriology*. 179(22):7135-7155.
- Touzel, J. P., Petroff, D., Albagnac, G. (1985). Isolation and characterization of a new thermophilic *Methanosarcina*, the strain CHTI 55. *Syst. Appl. Microbiol.* 6:66–71.
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., Palmer, J.D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 46:327-338.

- Valenzuela-Encinas, C., Neria-González, I., Alcántara-Hernández, R., Enríquez-Aragón, A., Estrada-Alvarado, I., Hernández-Rodríguez, C., Dendooven, L., Marsch, R. (2008). Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles*. 12:247-254.
- Vergara-Salgado, S. (2010). Identificación de bacterias metanogénicas y sulfato-reductoras en tres reactores de lecho de lodo de flujo ascendente (RALLFA) operando a 45, 55 y 65°C. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Laboratorios de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental. México D.F. México. Pp 13-19, 27-30, 74-76.
- Whitman, W.B., Bowen, T.L., Boone, D.R. (2006). The Methanogenic Bacteria. En "Prokaryotes". Capítulo 9. Springer, New York. NY. EEUU. Pp. 3: 165-207.
- Winter, J., Lerp, C., Zabel, h.p., Wildenauer, F.X., König, H., Schindler, F. (1984). *Methanobacterium wolfeii*, sp. nov., a new tungstenrequiring, thermophilic, autotrophic methanogen. *Systematic Applied Microbiology*. 5:457-466.
- Wirth, R., W., Kovács, E., Gergely, M., Bagi, Z., Rákhely, G., Kovács, L.K. (2012). Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnology for Biofuels*. 5:41-56.
- Woese, C.R., Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74(11):5088-5090.
- Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution, *Microbiological Review*. 51:221-271.
- Worakit, S., Boone, R.D., Mah, A.R., Abdel, S.M., El-Halwagi, M.M. (1986). *Methanobacterium alcaliphilum* sp. nov., an H₂-utilizing methanogen that grows at high pH values. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 36(3):380-382.
- Zehnder, A. (1988). *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley and Sons. Nueva York, NY. EEUU. Pp. 872.

- Zhao, Y., Boone, D.R., Mah, R.A., Boone, J.E., Xun, L. (1989). Isolation and characterization of *Methanocorpusculum labreanum* sp. nov. from the LaBrea tar pits. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:10-13.
- Zhu, J., Liu, X., Dong, X. (2011). *Methanobacterium movens* sp. nov. and *Methanobacterium flexile* sp. nov., isolated from lake sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 61:2974-2978.
- Zinder, S. H., Mah, R. A. (1979). Isolation and characterization of a thermophilic strain of *Methanosarcina* unable to use H₂-CO₂ for methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:996-1008.

BIBLIOGRAFÍA DE PÁGINAS WEB CONSULTADAS

- ATCC. (2011). American Type Culture Collection: The Global Bioresource. <http://www.atcc.org/> Periodo de consulta: 2011- 2012
- ATGC: Montpellier Bioinformatics Platform (2012). (<http://www.atgc-montpellier.fr/>) Periodo de consulta: Agosto-Octubre 2012
- BLAST. (2012). Basic local alignment search tool: (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Fecha de consulta: Mayo 2012-Septiembre 2012
- DSMZ. (2011). Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. (<http://www.dsmz.de/>). Fecha de consulta: Abril 2011-Noviembre 2011
- NCBI. (2012). National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Fecha de consulta: Mayo 2012-Septiembre 2012
- PROCAÑA. (2005). Industria azucarera australiana: (<http://www.jas-multimedia.com/webpages/procana/hica0002.htm>). Fecha de consulta: Marzo 2012

ANEXO 1

Extracción de *DNA* utilizando el *Kit: Power Soil® DNA Isolation Kit- Mo Bio Laboratories*

1. Colocar aproximadamente 0.25 g de la muestra en un tubo que contiene “perlas” (que se encargan de lisar la muestra) y una solución amortiguadora que dispersa las partículas de suelo, disuelve los ácidos húmicos y protege los ácidos nucleicos de degradación
2. Agitar los tubos ligeramente para homogeneizar
3. Agregar 60 μL de la solución C1 (*SDS* y agentes disruptores que promueven la lisis celular)
4. Colocar los tubos de manera horizontal en un “vórtex”, fijarlos a éste con cinta adhesiva y agitarlos durante 10 minutos a la máxima velocidad posible del aparato
5. Centrifugar los tubos a 10,000 rpm 1 minuto
6. Transferir el sobrenadante a un tubo colector limpio de 2 mL (Tubo *Eppendorf*)
7. Agregar 250 μL de la solución C2, la cual contiene agentes que precipitan agentes orgánicos e inorgánicos, ácidos húmicos y proteínas presentes en la muestra. Agitar en “vórtex” por 5 segundos e incubar a 4°C durante 5 minutos
8. Centrifugar los tubos durante 1 minuto a 10,000 rpm
9. Desechar el “*pellet*” y transferir aproximadamente 600 μL del sobrenadante a un tubo *Eppendorf* limpio de 2 mL
10. Agregar 200 μL de la solución C3 la cual es un segundo agente que precipita contaminación orgánica e inorgánica que puede existir todavía en la muestra. Esta solución logra incrementar la pureza del *DNA* que se pretende extraer
11. Centrifugar los tubos durante 1 minuto a 10,000 rpm
12. Transferir no más de 750 μL de sobrenadante en un nuevo tubo *Eppendorf* sin acarrear precipitado

13. Agregar 1200 μL de la solución C4 y agitar en “vórtex” 5 segundos. La solución C4 es una solución concentrada de sales que permite que las moléculas *DNA* casi puro se unan entre sí dejando de lado material orgánico e inorgánico que pueda seguir presente en el medio
14. De la solución anterior transferir aproximadamente 675 μL en un tubo *Eppendorf* con filtro (*spin filter*) y centrifugar por 1 minuto a 10,000 rpm. Descartar el líquido y agregar nuevamente 675 μL de la solución del punto 13, centrifugar 1 minuto a 10,000 rpm. Colocar lo que resta de la solución del punto 13 nuevamente en el tubo con filtro para centrifugar 1 minuto a 10,000 rpm
15. Agregar 500 μL de solución C5 que actúa como solución limpiadora, tiene base en etanol y prácticamente se encarga de remover sales residuales, ácidos húmicos o cualquier otro tipo de contaminante remanente. Centrifugar 30 segundos a 10,00 rpm
16. Descartar el líquido obtenido y centrifugar nuevamente 1 minuto a 10,000 rpm para remover residuos de etanol de la columna
17. Transferir el filtro a un nuevo tubo *Eppendorf* y agregar 100 μL de la solución C6 (*buffer* de elución)
18. Centrifugar durante 30 segundos a 10,000 rpm
19. Desechar el filtro del tubo. El *DNA* se encuentra en la fase líquida del tubo *Eppendorf*.

Nota final: Hacer alícuotas de 25 μL del *DNA* extraído y almacenarlas a -20°C .

ANEXO 2

Purificación de *DNA* amplificado mediante *PCR*

Kit: UltraClean® PCR Clean-Up Kit

1. Agregar 5 volúmenes de la solución "*SpinBind*" al producto de *PCR* que se posee (por ejemplo, si se tienen 30 μL de un producto amplificado por la reacción de *PCR* se adicionarán 150 μL de la solución "*SpinBind*")
2. Mezclar correctamente con la pipeta
3. Transferir la mezcla a un tubo *Eppendorf* con filtro, centrifugar de 10 a 30 segundos a 10,000 rpm
4. Remover el filtro del tubo para poder desechar el líquido
5. Colocar nuevamente el filtro en el mismo tubo y adicionar 300 μL de la solución "*SpinClena Buffer*"
6. Centrifugar de 10 a 30 segundos a 10,000 rpm
7. Remover el filtro del tubo y desechar el líquido. Colocar nuevamente el filtro en el tubo y centrifugar de 10 a 30 segundos a 10,000 rpm
8. Transferir el filtro a un nuevo tubo de 2 mL
9. Adicionar 50 μL de *Buffer* de elución (Tris 10 mM). Asegurarse de colocarlo en el centro de la membrana del filtro
10. Centrifugar de 30 a 60 segundos a 10,000 rpm
11. Desechar el filtro del tubo. El *DNA* purificado se encuentra ahora en los 2 mL en el tubo colector. El *DNA* estará libre de enzimas, sales, dNTPs.

Nota final: Hacer 4 alícuotas de 500 μL cada una y refrigerarlas a -20°C .

ANEXO 3

Tabla A3.1. Micrografías de microscopía confocal espectral

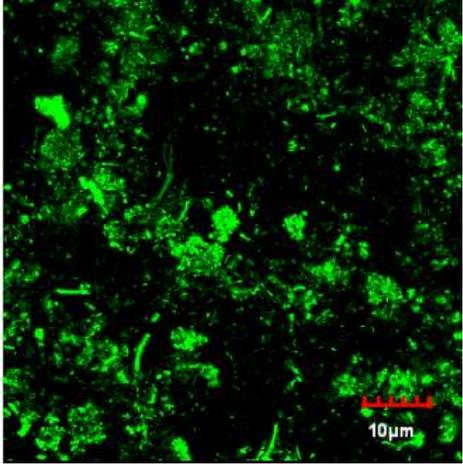
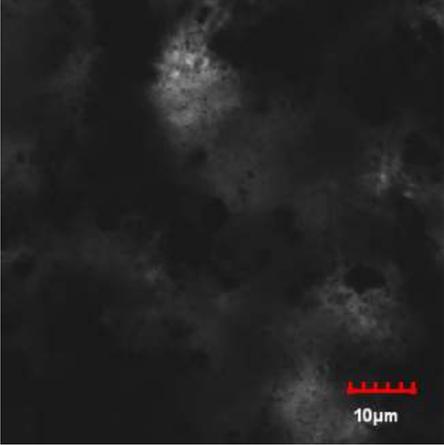
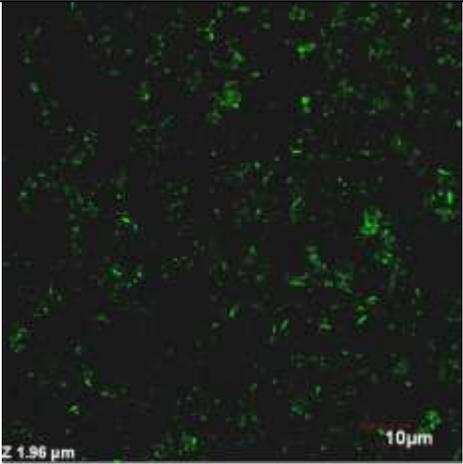
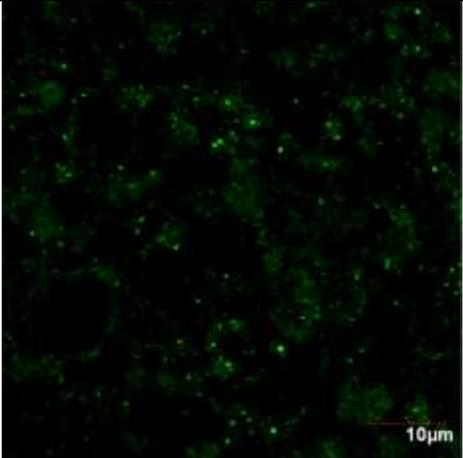
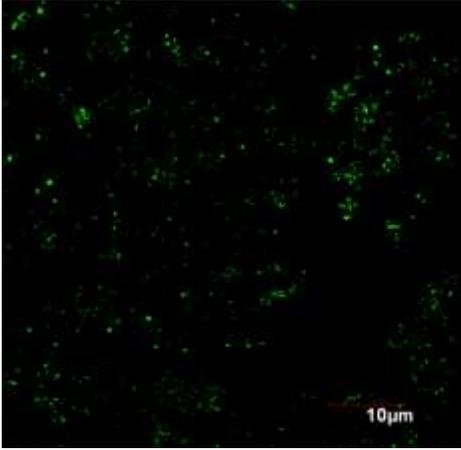
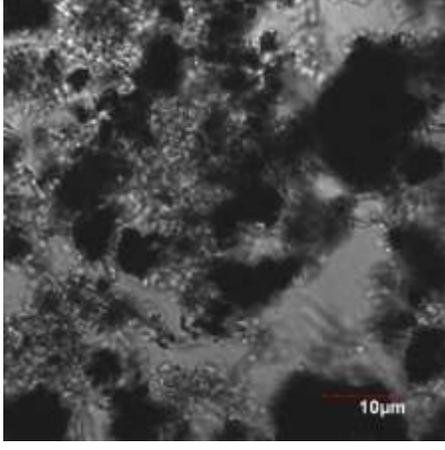
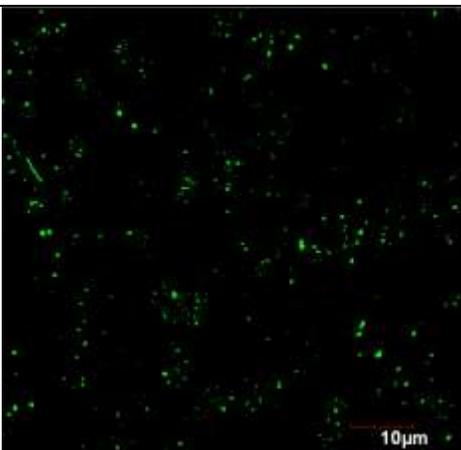
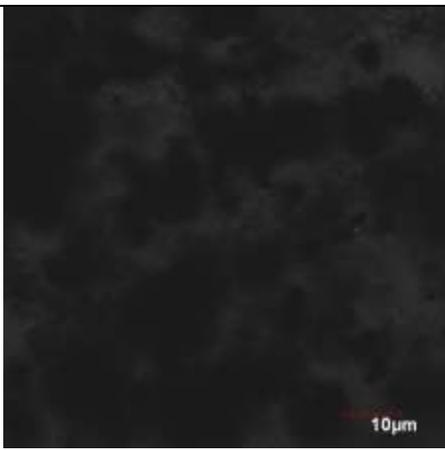
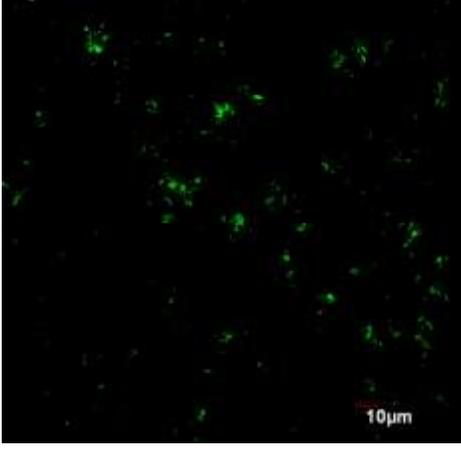
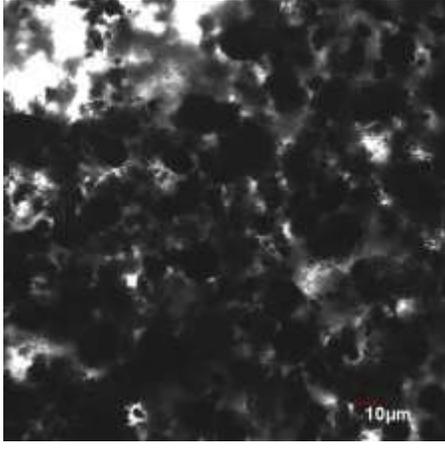
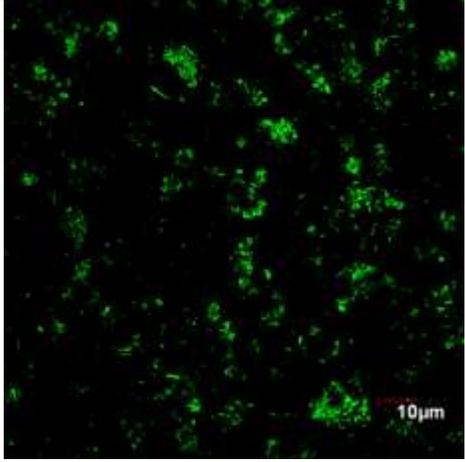
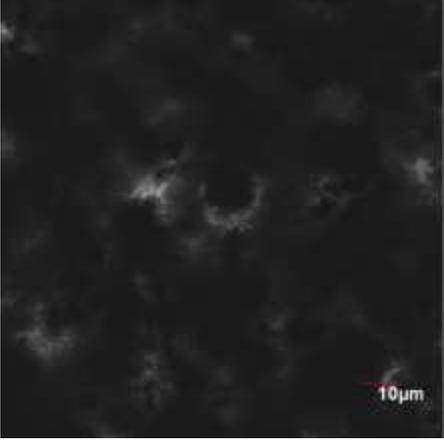
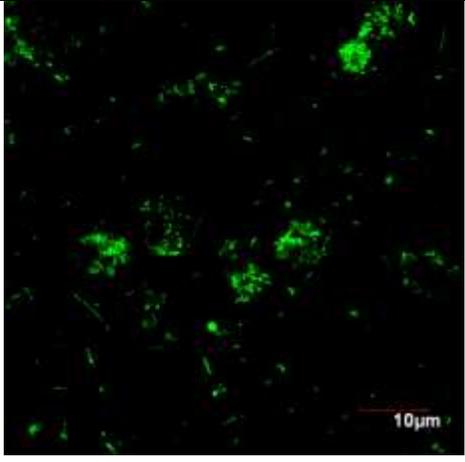
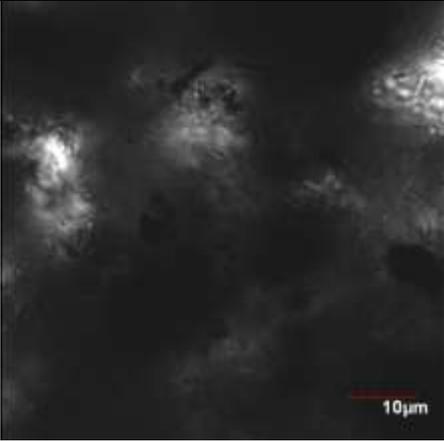
| Procedencia de la muestra | Micrografía | |
|---------------------------|---|--|
| | Positivo | Negativo |
| RALLFA 45° |  |  |
| |  |  |
| RALLFA 55°C |  |  |

Tabla A3.1. Micrografías de microscopía confocal espectral (Continúa...)

| | | |
|----------------|---|--|
| RALLFA 55°C |  |  |
| |  |  |
| RALLFA 65°C |  |  |

| Tabla A3.1. Micrografías de microscopía confocal espectral (Continúa...) | | | | |
|--|--|---|--|--|
| RALLFA 65°C |  |  | | |
| |  |  | | |

ANEXO 4

Tabla A4.1. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (RALLFA 45°C)

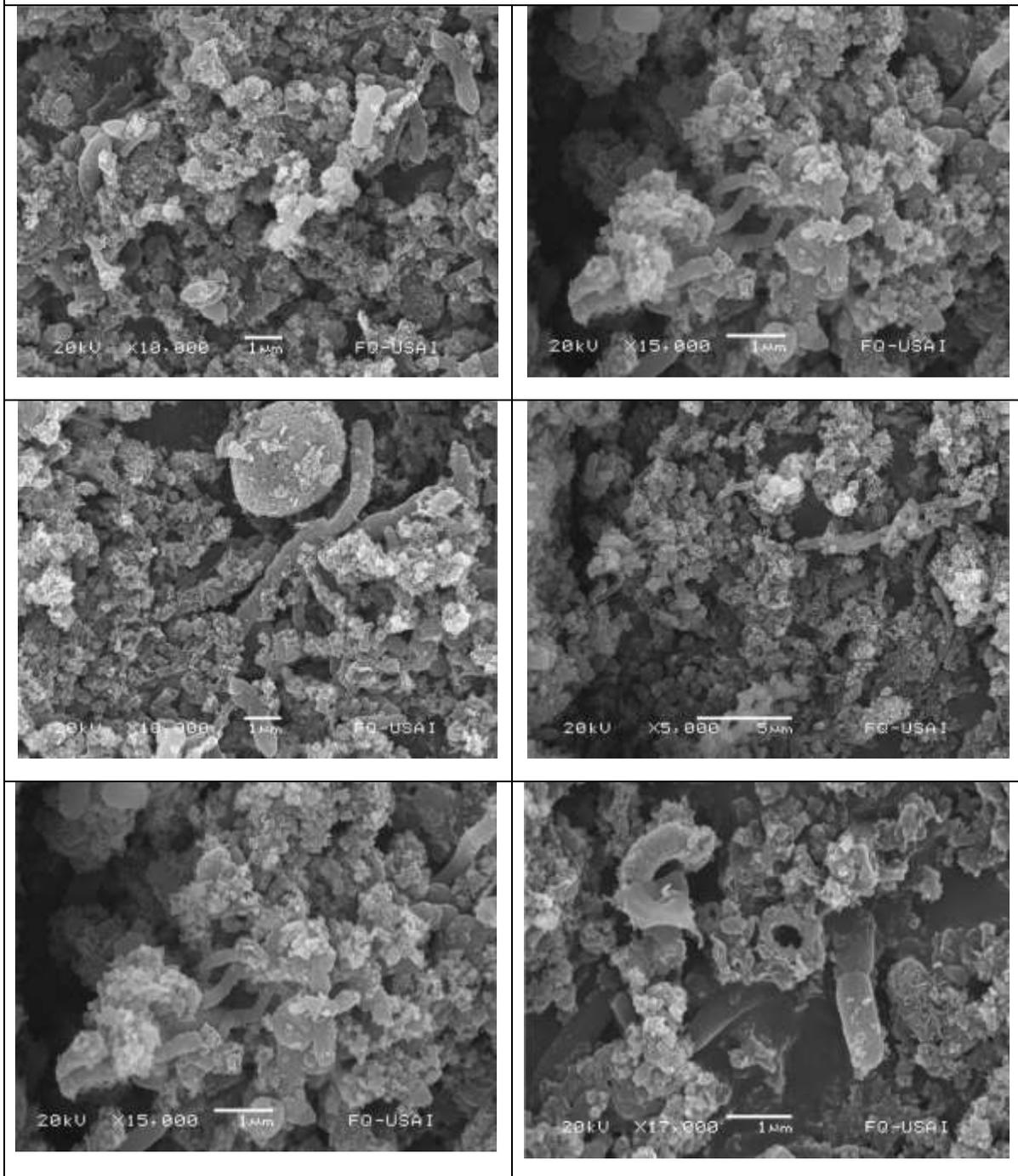


Tabla A4.2. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (RALLFA 55°C)

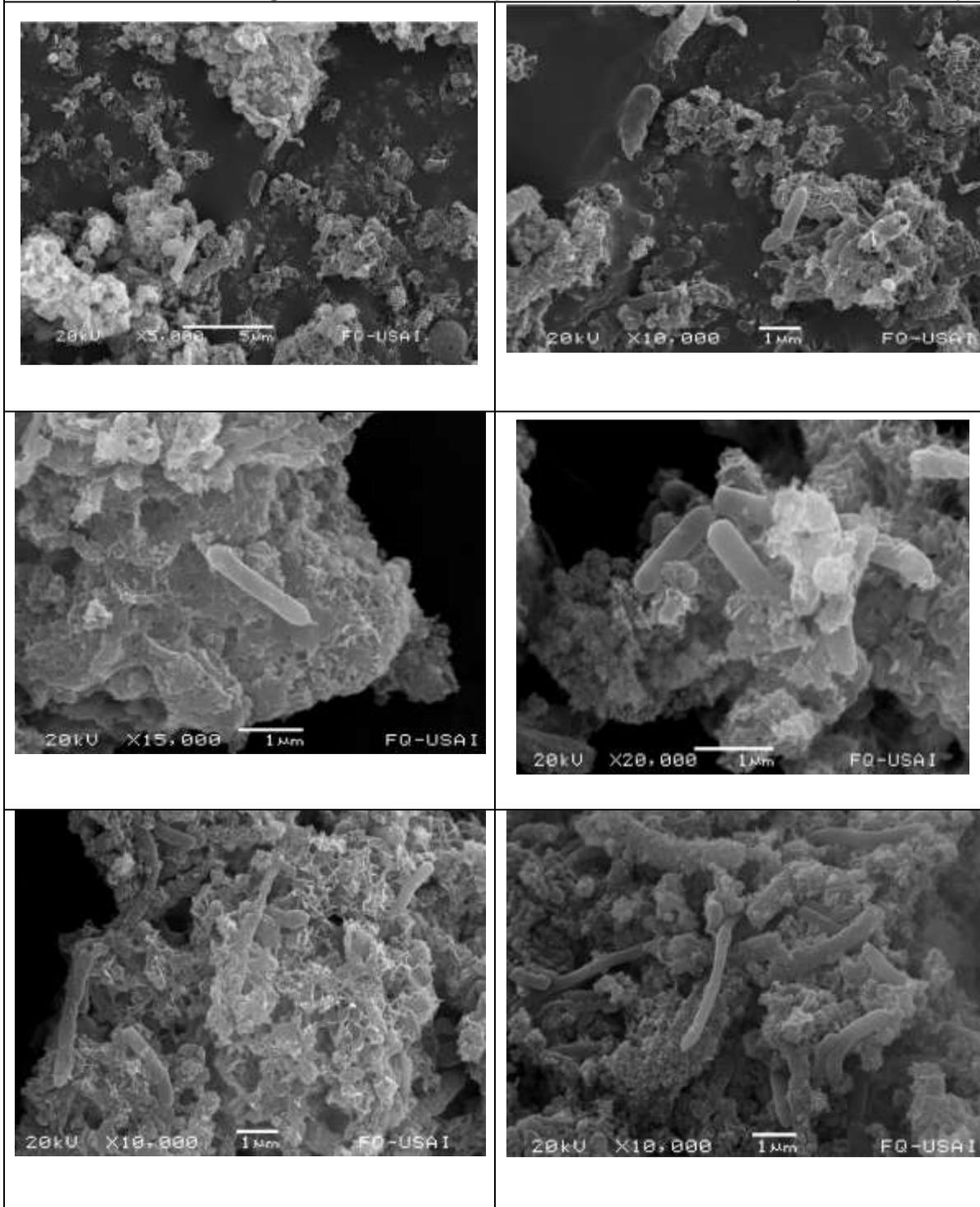
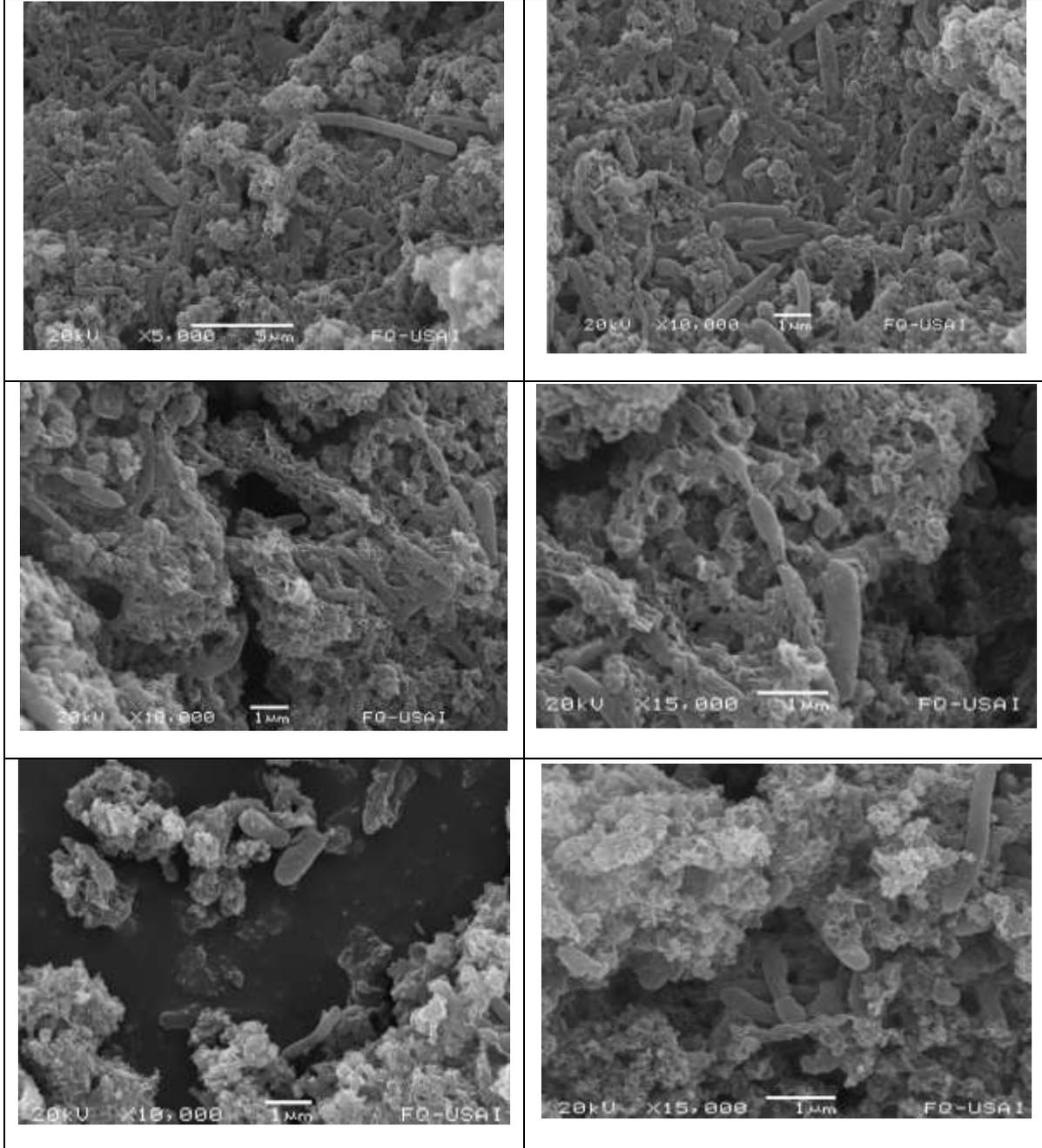
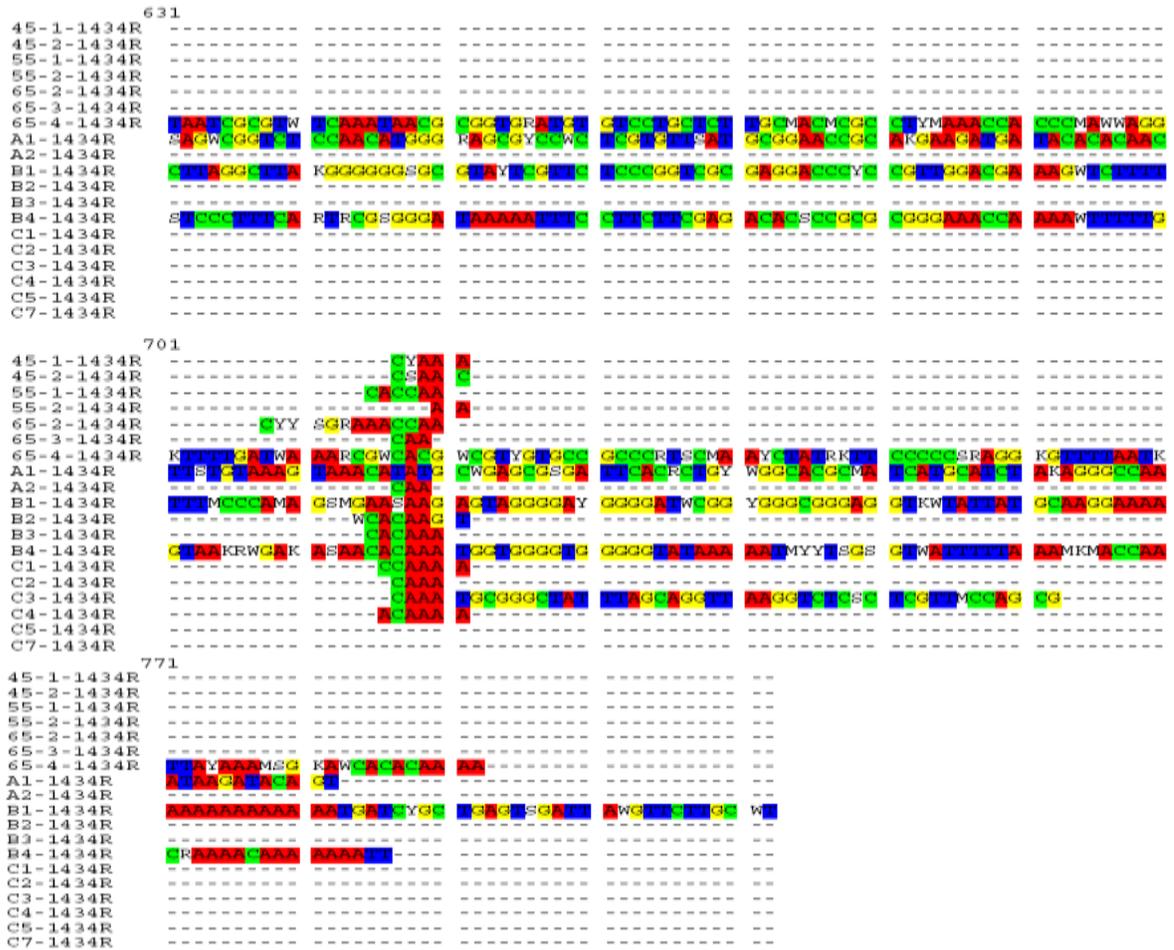


Tabla A4.3. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (RALLFA 65°C)





B. Secuencias relacionadas al gen *mcrA*

