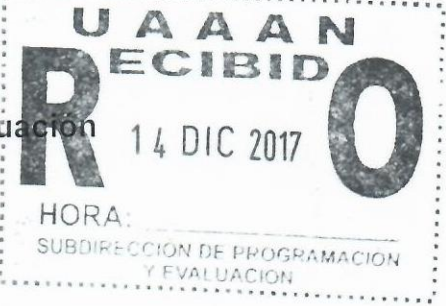




Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Botánica
Tema estratégico (ANA/PEP):	Biotecnología				
Línea de investigación:	Biotecnología ambiental				
Título del proyecto:	Identificación microbiológica de la biomasa contenida en reactores de lecho fijo empleados en el tratamiento de aguas residuales municipales				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	\$30,000	El proyecto es:	Nuevo	<input checked="" type="checkbox"/>	Continuación
Tipo de investigación:	Básica	<input checked="" type="checkbox"/>	Aplicada	<input type="checkbox"/>	Tecnológica
Vinculación:	Si	<input checked="" type="checkbox"/>	No	Fondos concurrentes:	Equipo y material
Cooperante(s):	Universidad Autónoma de San Luis Potosí (C.O.A.R.A.)				
Entidad (es):	Coahuila	Municipio (s):	Saltillo		
Localidades:	Saltillo				
A realizar durante el(los) año(s):	2018-2019				
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma	
Responsable	Dra. Iveth Dalila Antonio Carmona	Botánica (3614)	4173	<i>[Firma]</i>	
Colaborador:	Dra. Silvia Yudith Martínez Amador	Botánica (3614)	3796	<i>[Firma]</i>	
Colaborador:	Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez	Botánica (3614)	4104	<i>[Firma]</i>	
Colaborador:	Dra. Érika Nohemí Rivas Martínez	Botánica (3614)	3923	<i>[Firma]</i>	
Colaborador:	Dra. Elsa Cervantes González	COARA-UASLP			
Colaborador:					
		Grado por obtener	Matrícula	Firma	
Tesista:					
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
	Vo. Bo.		Autoriza		
Firma y sello	<i>[Firma]</i>		<i>[Firma]</i>		
Nombre	Dra. Silvia Judith Martínez Amador Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación		

- Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo.

Depto. de Botánica

1.-Titulo del proyecto

Presupuesto solicitado:

Identificación microbiológica de la biomasa contenida en reactores de lecho fijo empleados en el tratamiento de aguas residuales municipales.	\$30,000
---	----------

2.- Introducción

La estabilidad funcional es una de las principales preocupaciones en el diseño de un bioreactor, especialmente cuando el sistema es operado bajo ciertas condiciones a gran escala (Cabrol, L., y cols, 2012). Las biopelículas son comunidades microbianas estructuradas, formadas por grupos de células suspendidas en una matriz polimérica de densidad variable, y juegan un papel importante en el tratamiento de aguas residuales al ser la base de diversos reactores anaerobios y aerobios (filtros percoladores, contactores biológicos rotativos, etc.) y se caracterizan por su viabilidad y eficiencia (Fernández, N., y cols., 2008).

Los reactores anaeróbicos de lecho fijo se han utilizado cada vez más para tratar las aguas residuales domésticas en los últimos años. La configuración del filtro anaeróbico convencional se ha mejorado continuamente con configuraciones innovadoras de reactores que proporcionan un buen rendimiento y estabilidad, cuyos principales factores que contribuyen son largos tiempos de retención celular y altas concentraciones de biomasa. En este sentido, el soporte utilizado para inmovilizar la biomasa juega un papel esencial en estos sistemas, y se asocia directamente con el tiempo de retención celular, la concentración de biomasa y la diversidad microbiana (Lima, C. A. A., y cols., 2005). Se sabe que la velocidad de carga de estos sistemas depende de la cantidad de biomasa activa presente en el reactor. La capacidad de los reactores de lecho de flujo ascendente para acumular grandes cantidades de biomasa se debe a la adhesión de las células bacterianas entre sí y poder desarrollar la biopelícula (MacLeod, F. A., y cols., 1990). Los microorganismos presentes en las plantas de lodo activado siempre han sido de interés central para los microbiólogos. Numerosos estudios basados en el cultivo se han realizado para aislar e identificar bacterias de plantas de lodo activado. Ellos proporcionaron interesantes perspectivas sobre la diversidad microbiana. Sin embargo, se ha apreciado cada vez más que las técnicas siempre son selectivas y, por lo tanto, no pueden proporcionar suficiente documentación de la verdadera estructura de la comunidad. En consecuencia, en la última década, se han realizado varios intentos para analizar la estructura bacteriana de la comunidad de lodo activado por métodos directos (Snaird, J., y cols., 1997)

Las técnicas microbiológicas convencionales dependientes del cultivo no proporcionan una indicación de la biodiversidad (aproximadamente el 99% de las células bacterianas en las biopelículas no se pueden cultivar en medios estándares) o la estructura de una biopelícula. En los últimos 15 años, las técnicas moleculares se han empleado exitosamente en la investigación microbiana para el estudio de estos ecosistemas (Fernández, N., 2008). En el presente trabajo, se busca identificar la diversidad microbiana de las biopelículas formadas en dos reactores: uno anaerobio y otro aerobio, ambos de lecho fijo, empleados en el tratamiento de aguas residuales municipales, para conocer la contribución de las poblaciones en estos sistemas.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL:

Conocer la población microbiológica de la biopelícula formada en el soporte de dos reactores, uno anaerobio y otro aerobio, de lecho fijo, empleados en el tratamiento de aguas residuales municipales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Extraer y cuantificar los ácidos nucleicos a partir de la biopelícula formada en el soporte de los reactores.
- 2) Caracterizar los ácidos nucleicos totales extraídos.
- 3) Realizar el análisis taxonómico de la biopelícula formada en el soporte de los reactores.
- 4) Elaborar el secuenciamiento y análisis bioinformático, empleando el software QIIME

Hipótesis

- La identificación microbiana de las biopelículas formadas en los dos reactores nos permitirá conocer la contribución de las poblaciones en estos sistemas.

La investigación de los vínculos entre los cambios ambientales y la estructura de la comunidad microbiana es uno de los problemas más desafiantes en los entornos naturales. Una mejor comprensión de estas interacciones puede contribuir a mejorar la estabilidad del sistema al proporcionar herramientas de diagnóstico, control y predicción para la operación del reactor (Briones y Raskin, 2003). La mayor parte de la información que cuestiona la estabilidad microbiana en bioreactores se refieren a sistemas de tratamientos de aguas residuales, en los que se puede acceder a la fracción no cultivable de diversidad microbiana gracias al desarrollo de genes moleculares (Daims y cols., 2006). De acuerdo con la especificidad operativa de los sistemas, el resultado de la dinámica microbiana es desigual debido a la heterogeneidad de estabilidad, cálculos de índices y herramientas disponibles para estudiar las comunidades microbianas (Yue y cols., 2005). Las comunidades microbianas altamente dinámicas pueden mantener una función estable (Fernández y cols., 1999), mientras que en otros casos la estabilidad funcional se relaciona con comunidades microbianas estables (Gentile y cols., 2006). Los biofiltros se pueden considerar ecosistemas modelo donde las entradas y salidas se controlan y supervisan. Por lo tanto, son herramientas relevantes para abordar cuestiones ecológicas, como la relación entre la diversidad y el funcionamiento. Además, antes de la caracterización molecular de las comunidades microbianas, se debe realizar una evaluación y optimización prudente de los diversos pasos metodológicos, como la extracción de ADN (Cabrol y cols., 2010) o la amplificación por PCR (Von Wintzingerode y cols., 1997).

La aclimatación de las comunidades microbianas al entorno del biorreactor es un período crítico que influye en el funcionamiento a largo plazo de los biorreactores. Como tal, ha sido ampliamente estudiado en sistemas de tratamiento de aguas residuales y aguas residuales (Tresse y cols., 2002). La aclimatación suele ser extremadamente dinámica, ya que corresponde a la selección de las poblaciones más adecuadas que emergen del propio material de embalaje (cuando es orgánico) así como del inóculo. La determinación de la influencia de los orígenes de los diferentes elementos microbianos es, por lo tanto, un primer paso crucial en la prospección de la caracterización posterior de la dinámica microbiana espacial y temporal.

Los digestores anaerobios son usados en el tratamiento de aguas residuales municipales e industriales, siendo los más empleados los sistemas de flujo ascendente. El reactor de lecho fluidos de flujo ascendente fue desarrollado por Lettinga y colaboradores (1980); una variación es el producido por Guiot y van den Berg (1985) y se conoce como sistema de filtro de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente. Una gran ventaja de éstos sistemas, es que permite una mayor cantidad de biomasa activa en comparación con otros reactores anaerobios. La velocidad de carga de un sistema de tratamiento de aguas residuales anaerobias depende de la cantidad de biomasa activa presente en el reactor, por lo tanto, pueden acomodar tasas de carga orgánica varias veces más altas que las de otros digestores anaerobios (Lettinga y cols., 1983).

La capacidad de los reactores de flujo ascendente para acumular grandes cantidades de biomasa se debe a la adhesión de las células bacterianas entre sí. Las bacterias adheridas forman gránulos de biomasa que pueden tener varios milímetros de diámetro. La adhesión de las bacterias a las superficies inertes y el posterior desarrollo de la biopelícula han recibido una atención considerable (Costerton, 1985; Kjelleberg, S. 1984; Paerl, H. W. 1980). En ambientes acuáticos, se cree que la adhesión a una superficie proporciona a los organismos colonizadores un suministro de nutrientes, ya que los nutrientes inorgánicos y orgánicos se concentran en esta interfaz. Además, una vez que se adhieren a una superficie que está en contacto con el flujo de agua, las bacterias están expuestas a una alta concentración de nutrientes debido a un efecto de filtración. La adhesión también funciona para mantener los microorganismos en un entorno nutricionalmente favorable en manta de lodo anaeróbico de flujo ascendente y lecho de lodo anaeróbico de flujo ascendente y reactores de filtro en los que no hay sustratos inertes disponibles (excluidas las paredes del reactor) (Geesey y cols., 1978; Henrici, A. T. 1933).

La degradación de sustratos complejos en metano y dióxido de carbono durante la digestión anaerobia implica la interacción de al menos tres grupos metabólicos (Jones., 1984; McInerney, M. J. 1986):

- El primer grupo de bacterias fermentativas, los acidógenos, conduce a la degradación inicial de biopolímeros.
- Los ácidos y alcoholes así producidos son utilizados por un segundo grupo de organismos llamados bacterias acetogénicas.
- El tercer grupo de bacterias son los metanógenos.

Ubicados al final de la cascada de nutrientes, los metanógenos convierten el CO₂ y el H₂, el acetato y algunos otros compuestos simples en metano. Claramente, la estrecha asociación de los miembros de estos tres grupos en una estructura granular en capas aseguraría un alto nivel de actividad metabólica.

El tratamiento de aguas residuales municipales mediante técnicas convencionales, como el proceso de lodos activados o filtros percoladores, tiene éxito en la reducción del contenido de carbono orgánico en hasta 95-98%. Si se combinan diferentes pasos de tratamiento, incluso la eliminación de nitrógeno y fósforo puede ser eficientemente logrado mediante procesos biológicos. Sin embargo, todavía hay mejoras adicionales que se deben realizar con respecto a la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes y la calidad higiénica del agua tratada (Witzig y cols, 2002). Se sabe desde hace tiempo que las capacidades de degradación de los sistemas de tratamiento de lodos activados son limitadas ya que, por ejemplo, los colorantes de la industria textil son bien conocidos por pasar plantas de tratamiento en tales concentraciones que los cuerpos de agua receptores están completamente coloreados. La detección de residuos farmacéuticos en aguas superficiales e incluso en aguas subterráneas ha demostrado que una gran variedad de compuestos químicos puede pasar los sistemas de lodos activados sin degradación, lo que da como resultado su liberación al medio ambiente (Ternes TA., 1988). Como uno de los enfoques más innovadores para restringir la liberación de patógenos de las plantas de tratamiento de aguas residuales, se ha recomendado el uso de membranas de microfiltración (Krauth y Staab, 1993). Estas membranas pueden usarse como paso final de clarificación después del paso del clarificador secundario o integrarse directamente en el tanque de lodo activado.

Fernández y cols. (2008) analizaron la composición microbiana de la biopelícula formada en un sistema anaerobio, encontrando la clase de alfa-Proteobacteria (*Oleomonas*, *Azospirillum*), como predominante. Las proteobacterias beta, gamma, delta (tanto sintrofobacterias y reductoras de sulfato) como épsilon (*Arcobacter* sp.) fueron también observadas. Archaea apareció por primera vez durante el período de consolidación. Se detectó un metanógeno similar a *Methanospirillum* después de 36 h, y esto fue seguido por la detección de *Methanosarcina*, después de 4 días de desarrollo de la biopelícula. El biofilm maduro mostró una topografía de colinas y valles con células incrustadas en una matriz de exopolímeros donde la distribución espacial de los microorganismos se estableció bien. En comparación con las fases anteriores, la biodiversidad había aumentado considerablemente. Aunque las alfa-Proteobacteria se mantuvieron como predominantes, también se detectaron los miembros del filo Firmicutes, Bacteroidete y Thermotogae. Dentro del dominio Archaea, el metanógeno acetoclástico *Methanosaeta concilii* se vuelve dominante.

Snaird y cols. (1997) analizaron e identificaron la composición microbiana de muestra de lodo activado, encontrando una alta diversidad genética del grupo de Proteobacterias (*Hydrogenophaga*, *Comamonas*, y *Acidovorax*), *Acinetobacter*, *Arcobacter*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, y *Enterobacteriaceae*.

La importancia de caracterizar el consorcio microbiano radica en evaluar la viabilidad del mismo en el tratamiento de agua residual municipal, así como relacionar las funciones de la población dentro del sistema.

4.- Procedimiento Experimental

La muestra biológica a analizar, se obtendrá a partir de dos reactores de lecho fijo, uno anaerobio y otro aerobio, los cuales se emplean en el tratamiento de aguas residuales municipales.

- Extracción de ácidos nucleicos totales

La extracción del DNA total de cada se realizara mediante la técnica de fenol-cloroformo.

- Cuantificación de ácidos nucleicos totales extraídos

El DNA total extraído de cada sistema se cuantificara mediante el uso del equipo NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo-Scientific) y se determinara la pureza del DNA

- Caracterización de los ácidos nucleicos totales extraídos por fraccionamiento en gel de agarosa

Se realizara una electroforesis en el de agarosa y se observara el gel en un fotodocumetador BIO-RAD XR+.

- Construcción de librerías del 16S rDNA

Se llevará a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) con el fin de obtener un amplicon de cada muestra de 263 pb, el cual incluye la región polimórfica V3 del gen 16S rDNA para llevar a cabo un análisis taxonómico de la microbiota en cada sistema.

- Secuenciamiento mediante Ion Torrent

Con las muestras obtenidas en la amplificación, se llevara a cabo la preparación para el análisis por la tecnología Ion Torrent PGM.

- Análisis bioinformático

Se utilizara el software de Ion Torrent PGM (Torrent Suite v4. 0.2) para decodificar las secuencias obtenidas de acuerdo al barcode asignado a cada muestra y para eliminar las lecturas de baja calidad. Después mediante el software QIIME (Caporaso, J. G., y cols., 2010) se analizarán las secuencias decodificadas y se determinarán las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) de acuerdo a un nivel de similitud

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Extracción de ácidos nucleicos totales	x	x	x									
Cuantificación de ácidos nucleicos totales extraídos				x	x	x						
Caracterización de ácidos nucleicos							x	x	x	x		
Construcción de librerías del 16S rDNA										x	x	x
Reporte parcial												x

Cronograma de Actividades para el 2019 (cont.)

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Construcción de librerías del 16S rDNA	x	x										
Secuenciamiento mediante Ion Torren			x	x	x	x						
Análisis bioinformático						x	x	x				
Elaboración de artículo científico					x	x	x	x	x	x	x	
Reporte final												x

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Extracción de ácidos nucleicos totales	x	x	x									
Cuantificación de ácidos nucleicos totales extraídos				x	x	x						
Caracterización de ácidos nucleicos							x	x	x	x		
Construcción de librerías del 16S rDNA										x	x	x

Cronograma de Actividades para el 2019 (cont.)

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Secuenciamiento mediante Ion Torren			x	x	x	x						
Análisis bioinformático						x	x	x				

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2018	Año estimado de conclusión	2019
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

- Obtención de una tesis de licenciatura
- Presentación del trabajo en 1 Congreso relacionado con el área de Investigación.

- Enviar un artículo para su publicación en una revista incluida en el *Journal Citation Reports del International Scientific Index (ISI)* o en el *Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnológica del CONACYT*.

6.-Literatura Citada

- Briones A & Raskin L (2003) Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Curr Opin Biotechnol* 14: 270–276.
- Cabrol L, Malhautier L, Poly F, Lepeuple AS & Fanlo JL (2010) Assessing the bias linked to DNA recovery from biofiltration woodchips for microbial community investigation by fingerprinting. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 779–790.
- Cabrol, L., Malhautier, L., Poly, F., Lepeuple, A. S., & Fanlo, J. L. (2012). Bacterial dynamics in steady-state biofilters: beyond functional stability. *FEMS microbiology ecology*, 79(1), 260-271.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... & Huttley, G. A. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335-336.
- Costerton, J. W., T. J. Marrie, and K.-J. Cheng. 1985. Phenomena of bacterial adhesion, p. 3-43. In D. C. Savage and M. Fletcher (ed.), *Bacterial adhesion, mechanisms and physiological significance*. Plenum Publishing Corp., New York.
- Daims H, Taylor MW & Wagner M (2006) Wastewater treatment: a model system for microbial ecology. *Trends Biotechnol* 24: 483–489.
- Fernandez A, Huang S, Seston S, Xing J, Hickey R, Criddle C & Tiedje J (1999) How stable is stable? Function versus community composition. *Appl Environ Microbiol* 65: 3697–3704.
- Fernández, N., Díaz, E. E., Amils, R., & Sanz, J. L. (2008). Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor. *Microbial Ecology*, 56(1), 121-132.
- Geesey, G. G., R. Mutch, J. W. Costerton, and R. B. Green. 1978. Sessile bacteria: an important component of the microbial population in small mountain streams. *Limnol. Oceanogr.* 23: 1214-1223.
- Gentile M, Yan T, Tiquia SM, Fields MW, Nyman J, Zhou J & Criddle CS (2006) Stability in a denitrifying fluidized bed reactor. *Microb Ecol* 52: 311–321.
- Guiot, S. R., and L. van den Berg. 1985. Performance of an upflow anaerobic reactor combining a sludge blanket and a filter treating sugar waste. *Biotechnol. Bioeng.* 27:800-806.
- Henrici, A. T. 1933. Studies of freshwater bacteria. I. A direct microscopic technique. *J. Bacteriol.* 25:277-286.
- Jones, W. J., J.-P. Guyot, and R. S. Wolfe. 1984. Methanogenesis from sucrose by defined immobilized consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1-6.
- Kjelleberg, S. 1984. Adhesion to inanimate surfaces, p. 71-84. In K. C. Marshall (ed.), *Microbial adhesion and aggregation*. Springer-Verlag KG, Berlin.
- Krauth K-H, Staab KF. 1993. Pressurized bioreactor with membrane filtration for wastewater treatment. *Water Res.* 27:405–11.
- Lettinga, G., A. F. M. van Velsen, W. Hobma, W. J. de Zeeuw, and A. Klapwijk. 1980. Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological waste water treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 22:699-734.
- Lettinga, G., P. Huishoff, W. Wiegant, W. de Zeeuw, S. W. Hobma, P. Grin, R. Roersma, S. Sayed, and A. F. M. van Velsen. 1983. Upflow sludge blanket processes, p. 139-158. In R. L. Wentworth (ed.), *Proceedings of the Third International Symposium on Anaerobic Digestion*. Evans and Faulkner, Inc., Watertown, Mass.
- Lima, C. A. A., Ribeiro, R., Foresti, E., & Zaiat, M. (2005). Morphological study of biomass during the start-up period of a fixed-bed anaerobic reactor treating domestic sewage. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(5), 841-849.
- MacLeod, F. A., Guiot, S. R., & Costerton, J. W. (1990). Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1598-1607.
- McInerney, M. J. 1986. Transient and persistent associations among prokaryotes, p. 293-338. In J. S. Poindexter and E. R. Leadbetter (ed.), *Bacteria in nature*, vol. 2. Plenum Publishing Corp., New York.
- Paerl, H. W. 1980. Attachment of microorganisms to living and detrital surfaces in freshwater systems, p. 375-402. In G. Bitton and K. C. Marshall (ed.), *Adsorption of microorganisms to surfaces*. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1997). Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2884-2896.

- Ternes TA. 1988. Occurrence of drugs in German sewage plants and rivers. *Water Res.* 32:3245–60.
- Tresse O, Lorrain MJ & Rho D (2002) Population dynamics of free-floating and attached bacteria in a styrene-degrading biotrickling filter analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 585–590.
- Von Wintzingerode F, Göbel UB & Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 21: 213–229.
- Witzig, R., Manz, W., Rosenberger, S., Krüger, U., Kraume, M., & Szewzyk, U. (2002). Microbiological aspects of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater. *Water Research*, 36(2), 394–402.
- Yue TX, Liu JY, Li ZQ, Chen SQ, Ma SN, Tian YZ & Ge F (2005) Considerable effects of diversity indices and spatial scales on conclusions relating to ecological diversity. *Ecol Modell* 188: 418–431.