

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEL CARBÓN MEDIANTE ANÁLISIS DE  
SECUENCIAS DEL GEN RIBOSOMAL 16S**

**EDGAR PEDRAZA LEGUIZAMO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2016**

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEL CARBÓN MEDIANTE ANÁLISIS DE  
SECUENCIAS DEL GEN RIBOSOMAL 16S**

**EDGAR PEDRAZA LEGUIZAMO**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de**

**Biólogo**

**TUTOR:**

**JORGE LUIS FUENTES LORENZO, MICROBIÓLOGO, M.Sc., Ph. D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**BUCARAMANGA**

**2016**

# CONTENIDO

pág.

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
2.1 <i>Extracción de ADN genómico de cultivos enriquecidos. ....</i>	<i>19</i>
2.2 <i>Amplificación del gen rRNA 16S mediante PCR a partir de ADN genómico de cultivos enriquecidos.....</i>	<i>19</i>
2.3 <i>Clonación, amplificación y secuenciación de productos amplificados.....</i>	<i>21</i>
2.4 <i>Identificación molecular de las clonas obtenidas .....</i>	<i>21</i>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
<b>4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>29</b>
4.1 <i>Extracción de ADN y PCR.....</i>	<i>29</i>
4.2 <i>Sobre los Cebadores.....</i>	<i>29</i>
4.3 <i>Análisis de secuencias.....</i>	<i>31</i>
<b>5. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>33</b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u> .....</b>	<b>34</b>

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Gradiente de temperatura Bacteria .....	23
<b>Figura 2.</b> Gradiente temperatura Archaea.....	24
<b>Figura 3.</b> Gradiente temperatura Metanobacteria.....	24
<b>Figura 4.</b> Estructura secundaria del RNA ribosomal Bacterias metanogénicas el gen 16S rRNA.....	30

## LISTA DE TABLAS

pág.

<b>Tabla 1.</b> Estudios de poblaciones microbianas asociados a diferentes formaciones con mantos de carbón con base en el análisis de secuencias de la subunidad 16S del gen ribosomal .....	16
<b>Tabla 2.</b> Características de los cebadores usados en el estudio.....	20
<b>Tabla 3.</b> Estimaciones y Resultados obtenidos con los set de cebador reportados en la literatura.....	25
<b>Tabla 4.</b> Productos Clonados.....	25
<b>Tabla 5.</b> Resultados obtenidos con cultivos enriquecidos de carbón usando RCM como medios de cultivo.....	27

## ANEXOS

<b>ANEXO A.</b> Estandarizacion del Proceso de clonación y extracción de ADN plasmidico... ..	40
--	----

## TITULO: IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEL CARBÓN MEDIANTE ANÁLISIS DE SECUENCIAS DEL GEN RIBOSOMAL 16S\*

**AUTOR:** Edgar Pedraza Leguizamo\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Metagenómica, bacterias, mantos de carbón, identificación molecular

### RESUMEN:

El proyecto tuvo como objetivo conocer la composición microbiana de mantos de carbón de la formación geológica Guadas y la complementariedad de los métodos microbiológicos con los métodos moleculares. Se desarrollaron muestreos en las minas de carbón localizadas en la sección denominada “El Triunfo” en el municipio Ubaté (Cundinamarca, Colombia), estas muestras fueron caracterizadas físico-químicamente (Mayorga, 2012) para determinar la presencia de gas metano. Las muestras que presentaron sesgos de metano fueron cultivadas en medios enriquecidos, y caracterizados visualmente a través de la captura de gas en tubos Durham. Se realizó la identificación molecular del cultivo al que se extrajo el ADN del metagenoma y se amplificó usando como marcador de selección el gen ribosomal 16S mediante el uso de cebadores específicos para Bacterias, Arqueobacterias y metanobacterias. Usando el sistema de clonación “Clone JET™PCR Cloning Kit” que contiene el vector pJET1.2/blunt el cual expresa selección a través del gen Killer (Eco47IR) que permite que solo células recombinantes expresen resistencia a la ampicilina; como huésped se usa *Escherichia coli* JM101 (ATCC®33876™). Se seleccionaron las colonias recombinantes, que fueron aisladas y cultivadas en un medio enriquecido. Los cultivos fueron usados para la extracción de ADN plásmidico, el cual fue amplificado con los cebadores específicos del vector pJET1.2/blunt y secuenciados para identificar molecularmente las bacterias presentes. Se obtuvieron 169 clones de los cuales 18 arrojaron un índice de identidad del 87-95% para el género *Gracilibacter sp* y las restantes 151 un índice de identidad para *Escherichia coli* del 90-99%. Las bacterias del género *Gracilibacter sp* son anaerobias estrictas además de fermentadores facultativos o estrictos que generan productos como el acetato, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> usados por bacterias metanogénicas acetoclasticas. Con el método molecular y microbiológico se logró aumentar el número de especies identificadas dentro del cultivo enriquecido, lo cual demuestra que son complementarios.

---

\* Proyecto de grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo (M.Sc, Ph.D.).

# **TITLE: IDENTIFICATION OF COAL BACTERIA BY SEQUENCES ANALYSIS OF THE 16S GENE RIBOSOMAL \***

**AUTHOR:** Edgar Pedraza Leguizamo\*\*

**KEY WORDS:** Metanogenomic, bacteria, coal beds, molecular identification.

## **ABSTRACT:**

The project aimed to know the microbial composition of coal seams of the geological formation Guadas and complementarity of microbiological methods with molecular methods. Samples were developed in the coal mines located in the section called "El Triunfo" in the municipality Ubaté (Cundinamarca, Colombia), these samples were characterized physico-chemically (Mayorga, 2012) to determine the presence of methane gas. Samples showing bias methane were grown in rich media, and visually characterized by capturing gas in Durham tubes. Molecular identification of the crop to which the DNA was extracted and amplified using metagenome as selection marker the 16S ribosomal gene using primers specific for bacteria, Archaeobacteria and metanobacterias performed. Using the cloning system "Clone JET™ PCR Cloning Kit" containing the pJET1.2 / blunt vector which expresses selection through Killer (Eco47IR) gene which allows cells to express recombinant single ampicillin resistance; as host *Escherichia coli* JM101 used (ATCC®33876™). Recombinant colonies, which were isolated and cultured in an enriched media were selected. The cultures were used for extraction of plasmid DNA, which was amplified with vector specific primers pJET1.2 / blunt and sequenced to molecularly identify the bacteria present. 169 clones of which 18 showed a rate of 87-95% identity to gender *Gracilibacter* sp and the remaining 151 index for *Escherichia coli* identity of 90-99% were obtained. *Gracilibacter* genus bacteria are strictly anaerobic sp fermenters addition facultative or strict generating products such as acetate, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> used by methanogenic bacteria acetoclasticas. With the molecular and microbiological method succeeded in increasing the number of species identified in the enriched culture, which shows that they are

---

\* Research

\*\* Faculty of Science. Program of Biology. Advisor: Jorge Luis Fuentes Lorenzo (M.Sc, PhD.).

## INTRODUCCIÓN

Entre las fuentes no convencionales de gas conocidas, se encuentran los reservorios de metano asociado a formaciones geológicas con mantos de carbón (Longwell *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 1995; Beaton *et al.*, 2006). El interés por la explotación de fuentes de gas no convencionales que permitan compensar la creciente demanda energética se encuentra en aumento. En Colombia, las reservas de gas metano son actualmente de  $17.5 \times 10^{12}$  pies cúbicos de gas (17.5 TCF) y su consumo de  $7 \times 10^9$  TCF por día. Se estima que con el ritmo de consumo actual, estas reservas de gas se agotarán en los próximos 10 años (García-González, 2010).

Recientemente, mediante un estudio de la composición isotópica ( $^{13}\text{C}$  y Deuterio) del carbón (Martínez, 2009), se evidenció el origen biogénico de los reservorios de gas metano en las formaciones de Cerrejón y de Ubaté (cucunuba) en Colombia. Es por ello, que es esencial conocer la composición y diversidad de los consorcios microbianos asociados a los mantos de carbón, así como, establecer las condiciones óptimas para su cultivo para fines biotecnológicos. Dichos estudios, permitirán una mejor comprensión de los procesos de generación de gas biogénico en el subsuelo que permitan desarrollar nuevas tecnologías más eficientes para la producción de gas metano a partir de carbón mineral. Este hallazgo, abriría nuevas oportunidades para el desarrollo de biotecnologías que incrementen los volúmenes de producción de gas metano; las cuales son de particular importancia para Colombia, el país que posee las mayores reservas de carbón en Suramérica. El uso de herramientas moleculares como las firmas genéticas, tales como el gen ribosomal 16S ha permitido conocer la composición de consorcios microbianos involucrados en la producción de gas metano en

mantos de carbón de diferentes formaciones geológicas; además, estas firmas genéticas constituyen una herramienta efectiva para medir las proporciones de Eubacterias y metanógenos, bajo condiciones de laboratorio (Johnson *et al.*, 1994; Gupta y Birendra, 2000; Case *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2008); soportando así tecnologías *ex situ* para producción de metano a partir de carbón bituminoso de baja calidad comercial.

Se han venido desarrollando estudios dirigidos a conocer consorcios microbianos involucrados en la producción de gas metano en mantos de carbón de la formación Guadas en Colombia. En dicho proyecto usando métodos microbiológicos convencionales se logró aislar e identificar un grupo de especies microbianas potencialmente involucradas en la biodegradación. Sin embargo se conoce que estos métodos convencionales de microbiología no permiten determinar toda la diversidad presente en estos ambientes (Friedrich *et al.*, 1997). En tal sentido durante la presente pasantía me propuse usar métodos de ecología molecular (Análisis ribosomal 16S) con el fin de identificar microorganismos no detectados en los mencionados consorcios a partir de cultivos enriquecidos productores de metano.

La presente pasantía tiene como hipótesis que el uso combinado de métodos microbiológicos y moleculares pueden ser complementarios en la identificación de consorcios bacterianos presentes en mantos de carbón.

La pasantía se desarrolló en el marco del proyecto: VIE-UIS 5187, Estudio de las poblaciones microbianas asociadas con mantos de carbón de la formación Guadas en Colombia. El objetivo principal de la pasantía fue Identificar bacterias presentes en un cultivo enriquecido a partir de carbón de minas productoras de metano usando el análisis de secuencia del gen ribosomal 16S en bacterias. Son objetivos específicos: i) Construcción de una librería genética a partir de un cultivo

enriquecido productor de metano. ii) Comparar las anotaciones derivadas de la librería con las obtenidas para una colección de aislados microbianos del carbón disponibles en el laboratorio LMMA.

## 1. MARCO TEÓRICO

El gas metano asociado a mantos de carbón puede categorizarse en dos tipos principales: gas termogénico y gas biogénico. El primero se forma durante el proceso de carbonificación de la materia orgánica (turba) y se conoce, es consecuencia de las altas presiones y temperaturas que caracterizan estos procesos primarios de formación del carbón. El gas biogénico se sub-divide en dos tipos principales: gas primario y gas secundario. El primero, es generado por actividad microbiana en las primeras fases de formación de carbón a partir de la materia orgánica contenida en él. El segundo, es consecuencia también de la actividad microbiana pero ocurre a partir de la actividad metabólica de los microorganismos introducidos desde aguas meteóricas y/o subterráneas, que se filtra en los mantos de carbón o por rocas permeables adyacentes ricas en materia orgánica (Scott *et al.*, 1995).

Dado que el origen del gas metano en los mantos de carbón puede ser biogénico, el desarrollo de biotecnologías dirigidas a incrementar la producción de gas metano a partir de carbón, cobran cada día mayor relieve al ser una nueva opción para convertirse en una importante fuente renovable de este hidrocarburo (Polman *et al.*, 1995; Flores, 2008; Elshahed, 2010; Wang *et al.*, 2010).

La generación de metano biogénico a partir de carbón podría convertirse en una fuente renovable de gas metano como lo sugieren algunos autores (Faiz and Hendry, 2006; Kotarba, 2001; Thielemann *et al.*, 2004). Scott *et al.* (1994), fueron los primeros que introdujeron el concepto de metano de mantos de carbón microbiológicamente incrementado. Ellos propusieron la inyección de consorcios bacterianos y nutrientes en los mantos de carbón, con el fin de incrementar la cantidad de metano en el manto y facilitar su extracción. Otros investigadores

plantean que la inyección de nutrientes que estimulen la actividad de producción de metano de los microorganismos nativos del manto de carbón, puede ser más efectiva que la introducción de nuevas estirpes microbianas (Wang *et al.*, 2010).

Bajo condiciones de laboratorio, se ha demostrado que se puede producir metano usando consorcios microbianos y carbón de diferente origen (Johnson *et al.*, 1994; Gupta y Birendra, 2000; Green *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2008); soportando además la factibilidad de tecnologías *ex situ* para producción de metano a partir de carbón bituminoso de baja calidad comercial.

La adopción de herramientas moleculares en estudios de ecología microbiana, ha ampliado nuestro conocimiento en cuanto a la abundancia, diversidad y función de los organismos procarióticos (Woese, 1987; Case *et al.*, 2007). Para explorar la importancia ecológica de las bacterias metanogénicas en ecosistemas naturales son indispensables ciertas técnicas de identificación y cuantificación para los diferentes grupos que las componen. Para ese propósito se han utilizado análisis de lípidos de membrana (Weijers *et al.*, 2004; Strapoc *et al.*, 2008), la auto fluorescencia (Mochimaru *et al.*, 2007), la medición de diferentes tipos de actividad metabólica (Weijers *et al.*, 2004) y el perfil inmunoenzimático (Sorensen y Ahring, 1997). Además de los métodos mencionados anteriormente, se han adoptado técnicas cultivo-independientes basados en el análisis de ADN utilizando cebadores o sondas, tales como hibridación de membrana, hibridación *in situ* fluorescente (FISH por sus siglas en inglés), la clonación de genes como el RNA ribosomal 16S, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), y métodos de escisión con enzimas de restricción.

La mayor parte de los estudios efectuados para la caracterización de las poblaciones de metanobacterias en mantos de carbón han empleado la amplificación directa del gen RNA ribosomal 16S (Green *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Shimizu *et al.*, 2007; Strapoc *et al.*, 2008). Características tales como:

tamaño, función esencial, ubicuidad y propiedades evolutivas; así como, la disponibilidad de sus secuencias génicas en bases de datos gratuitas y accesibles, han permitido que este gen sea el marcador molecular más utilizado (Case *et al.*, 2007).

Existe un limitado número de estudios sobre la composición y diversidad de los consorcios microbianos asociados en la producción de metano en los mantos de carbón (Tabla 1). Los resultados mostraron diferencias en la composición de los consorcios microbianos de las formaciones geológicas estudiadas, pero son muy frecuentes representantes bacterianos de las cinco clases (Alpha, Beta, Delta, Gamma y Épsilon) de Proteobacteria, así como, de las clases Clostridia y Flavobacteria. Las clases de Arqueobacteria mayormente representadas fueron: Methanomicrobia, Methanobacteria y Methanococci. Todos los estudios indicados en la Tabla 1, con una sola excepción (Li *et al.*, 2008), evidenciaron la presencia de representantes de las clases metanogénicas de Archaea. Sin embargo, en las poblaciones estudiadas estas clases metanogénicas se encontraron siempre en menor proporción que las clases bacterianas con metabolismo anaerobio fermentativo; indicando la importancia del conocimiento sobre la composición de los consorcios microbianos de estos microambientes para una mejor comprensión del proceso de producción de metano.

**Tabla 1.** Estudios de poblaciones microbianas asociados a diferentes formaciones con mantos de carbón con base en el análisis de secuencias de la subunidad 16S del gen ribosomal.

Formación geológica	Taxa (clase) microbiana	Referencia
Cuenca Rio Polvo (Montana-Wyoming, USA)	<b>Bacteria:</b> <i>Clostridia</i> , <i>Mollicutes</i> , <i>Spirochaetes</i> , <i>Deltaproteobacteria</i>	Green <i>et al.</i> (2008)
	<b>Archaea:</b> <i>Methanomicrobia</i> , <i>Methanobacteria</i> , <i>Methanococci</i>	Klein <i>et al.</i> (2008)

---

Cuenca Sureste Illinois (Illinois-Indiana-Kentucky, USA)	<b>Bacteria:</b> <i>Clostridia</i> , <i>Alphaproteobacteria</i> , <i>Flavobacteria</i> , <i>Spirochaetes</i>	Strapoć et al. (2008)
	<b>Archaea:</b> <i>Methanomicrobia</i>	
Llanos de Alberta, (Alberta, Canada)	<b>Bacteria:</b> <i>Clostridia</i> , <i>Bacilli</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Alphaproteobacteria</i> , <i>Betaproteobacteria</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> , <i>Gammaproteobacteria</i>	Penner et al. (2010)
	<b>Archaea:</b> <i>Methanomicrobia</i> , <i>Methanobacteria</i>	
Cuencas Bowen, Sydney y Surat (Australia)	<b>Bacteria:</b> <i>Clostridia</i> , <i>Bacilli</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Alphaproteobacteria</i> , <i>Betaproteobacteria</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> , <i>Epsilonproteobacteria</i> , <i>Flavobacteria</i>	Li et al. (2008)
	<b>Archaea:</b> <i>Thermoprotei</i> , <i>Archaeoglobi</i> , <i>Halobacteria</i> , <i>Thermococci</i>	
Cuenca Witwatersrand (Sur Africa)	<b>Archaea:</b> <i>Methanomicrobia</i>	Ward et al. (2004)
Formación Ishikari (Hokkaido, Japón)	<b>Bacteria:</b> <i>Clostridia</i> , <i>Alphaproteobacteriam</i> , <i>Betaproteobacteria</i> , <i>Deltaproteobacteria</i> , <i>Gammaproteobacteria</i>	Shimizu et al. (2007)
	<b>Archaea:</b> <i>Methanomicrobia</i> , <i>Methanobacteria</i>	

---

Todos los metanógenos aislados y caracterizado hasta la fecha se clasifican en el *Phylum Euryarchaeota* dentro del dominio *Archaea* (Garrity et al., 2007). Estos se asignan a 33 géneros pertenecientes a las clases *Methanomicrobia*, *Methanobacteria*, *Methanococci* y *Methanopyri*.

*Methanomicrobia* es la clase más diversa filogenética y fisiológicamente. Esta contiene tres órdenes (*Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* y *Methanocellales*) con 7 familias y 23 géneros. Dentro del orden *Methanosarcinales* encontramos los géneros *Methanosarcina* y *Methanosaeta* que juegan un papel clave en la conversión de acetato en metano en diversos ambientes anaeróbicos, y los otros géneros restantes, son conocidos para metabolizar un amplios rangos de sustratos, tales como: hidrógeno, metanol y metilaminas (Garrity y Holt, 2001). Los miembros conocidos del orden *Methanomicrobiales* son todos hidrogenótrofos y

algunos de ellos se observan a menudo en ambientes anaeróbicos como eliminadores de hidrógeno importantes (Liu y Whitman, 2008).

La clase *Methanobacteria* contiene a las familias *Methanobacteriaceae* y *Methanothermaceae*; las cuales son mayormente hidrogenótroficas. Por su parte, la clase *Methanococci* incluyen las familias *Methanococcaceae* y *Methanocaldococcaceae* que están ampliamente distribuidos en ecosistemas naturales tales como: sedimentos marinos y de aguas geotérmicas del subsuelo profundo (Liu y Whitman, 2008). Por último, la clase *Methanopyri* contiene un solo género, *Methanopyrus*; cuyas especies son metanógenos hipertermófilos que también habitan aguas geotérmicas del subsuelo profundo (Takai *et al.*, 2008).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE CULTIVOS ENRIQUECIDOS

Se usan dos medios de cultivo, RCM (Reinforced Clostridial medium) y caldo acetato de sodio (Hirsch *et al.*, 1954; De Man *et al.*, 1960). con dos variantes de temperatura (37°C y 60 C°); el medio de cultivo fue previamente carbonatado y esterilizado, y posteriormente inoculado con la muestra de carbón. Se realizó la extracción de ADN genómico a la muestra con medio RCM en 37°C que presentó la mayor tasa de crecimiento exponencial y la mejor cinética de gas. La tasa de crecimiento fue determinada visualmente al igual que la producción de gas, a través de la captura de gas en tubos Durham.

Los cultivos enriquecidos previamente caracterizados para la producción de gas metano, centrifugados y conservados a -80°C (Mayorga, 2012), serán usados para la extracción del ADN total. El ADN (metagenoma) de los cultivos enriquecidos fue obtenido siguiendo el método de extracción fenol/cloroformo (Maniatis *et al.* 1989) con las modificaciones propuestas por Liu (2009). Para comprobar el estado de pureza del ADN, se midió su absorbancia a 280nm y se calculó la relación de DO260/280. Se consideró como criterio de pureza valores DO260/280 entre 1.8 y 2.0.

### 2.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN rRNA 16S MEDIANTE PCR A PARTIR DE ADN GENÓMICO DE CULTIVOS ENRIQUECIDOS

La amplificación del gen rRNA 16S a partir del metagenoma del cultivo enriquecido se desarrolló mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos para tres grupos de microorganismos: Bacteria, Arqueobacterias descritos por Wani *et al.* (2006) y metanobacterias los cebadores descritos por Marchesi *et al.* 2001 (Tabla 2).

**Tabla 2.** Características de los cebadores usados en el estudio.

Autor	Nombre*	Secuencia	Longitud (pb)	GC%	TM (°C)
Wani <i>et al.</i> (2006)	530F	(5'-GTCCCAGCMGCCGCGG-3')	16	84.4	63
	1490R	(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')	19	42.1	42.8
Wani <i>et al.</i> (2006)	S-DArch-0021-a-A-20	(5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3')	20	60.0	62.5
	S-DArch-0958-a-A-19	(5'-YCCGGCGGTTGAMTCCAATT-3')	19	57.9	59.5
Marchesi <i>et al.</i> (2001)	146F	(5'-GGSATAACCCYCGGAAAC-3')	18	55.6	56.1
	1324R	(5'-GCGAGTTACAGCCWCRA-3')	18	55.6	56.1

La mezcla de reacción (25 µl) consistió 2.5 µl de buffer 10x, 6.2 µl de DNTPs (2mM), 0.4 µl del cebador forward y 0.4 µl de cebador reverse (100 µM), 0.4 µl de Dream Taq™ DNA Polymerase (Fermentas, USA), 10.1 µl de agua grado molecular y 5 µl del ADN molde (5 ng/µL). La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador MasterCycler® Pro-Realplex4 (Eppendorf, Alemania). Se realiza un gradiente de temperatura para cada cebador: **cebador Bacteria** 94°C/3min seguido de 35 ciclos de 94°C/45s, rango de 50-55°C/1min , 72°C/1min y una fase de extensión final de 72°C/5min, **cebador Archaea** 94°C/3min seguido de 35 ciclos de 94°C/45s, rango de 40–50°C 45°C/1min, 72°C/1min y una fase de extensión final de 72°C/5min y **cebador Metano** 94°C/3min seguido de 35 ciclos de 94°C/45s, rango de 40-55°C/1min, 72°C/1min y una fase de extensión final de 72°C/5min. Como control negativo para los cebadores de metanobacteria y Arqueobacteria se usa la cepa C600 de *E. coli* ATCC® 23724™.

Los fragmentos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% usando 1X TBE como buffer de corrida. Como marcador se usa el colorante fluorescente EZVISION (Amresco, USA) y documentados usando un Sistema para Análisis de Geles (Syngene, USA).

### 2.3 CLONACIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Usando el sistema de clonación “Clone JET™PCR Cloning Kit” (Thermo Scientific, USA), se desarrollaron tres genotecas: una a partir de productos amplificados de bacterias, arqueobacterias y otra a partir de amplicones de metanobacteria (Genoteca A, B y C respectivamente). Los productos de la PCR fueron clonados en el vector de clonación pJET1.2/blunt siguiendo las indicaciones del fabricante. Las clonas recombinantes obtenidas de la ligazón fueron transformadas en células competentes de la cepa *Escherichia coli* JM101 (ATCC®33876™). Dado que el vector pJET1.2/blunt no recombinantes son letal para *E. coli* (dado que expresan una enzima de restricción letal, gen *eco47IR*); después de la transformación fueron colectadas las colonias que crecían sobre las placas de cultivo. Cada colonia fue cultivada en medio LB (Tryptona 10g/L, Cloruro de Sodio 10g/L, Extracto de Levadura 5g/L, pH 7.0) suplementado con ampicilina (100 µg/mL) durante 24h a 37°C en tubos de microcentrifuga con agitación (Anexos). Los cultivos fueron usados para la extracción de plásmidos recombinantes según lo indicado por (Maniatis *et al.* 1989). Los plásmidos fueron usados para amplificar las clonas del gen rRNA 16S con los mismos cebadores indicados en el acápite 2.2. Los productos amplificados con el tamaño esperado, fueron purificados y secuenciados usando el servicio SSiGmol del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá, Colombia).

### 2.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CLONAS OBTENIDAS

Las clonas con secuencias del gen rRNA 16S obtenidas en el acápite 2.3, fueron comparadas con secuencias para bacterias disponibles en la base de datos NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) mediante el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990) contrastando las secuencias más próximas para así poder identificar la filiación de

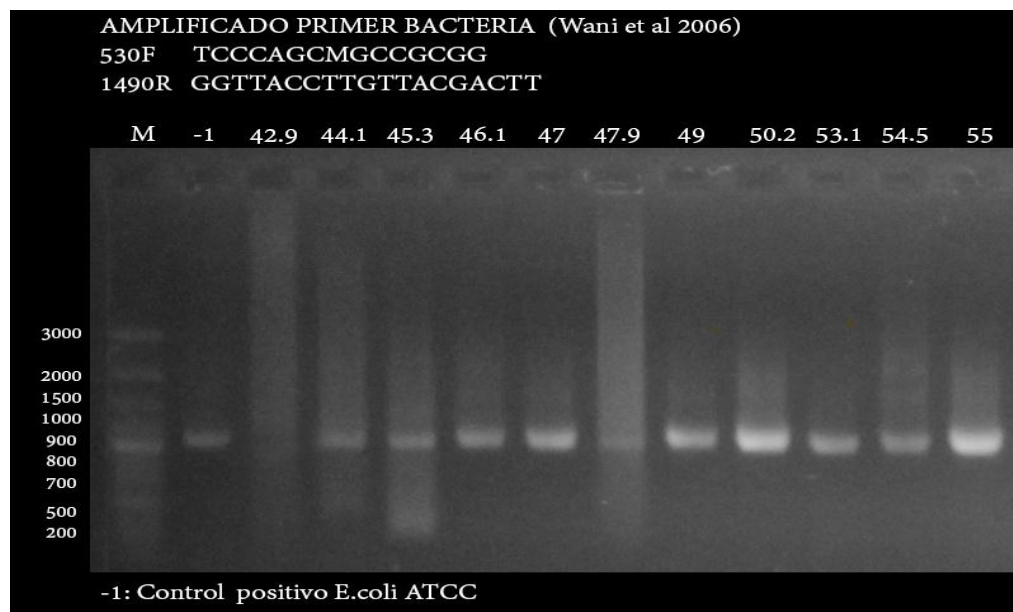
la clona. La asignación de secuencias de la colección se llevo a cabo considerando un mínimo de identidad del 97%; y luego se depositaron en la mencionada base de datos NCBI. Una unidad taxonómica operacional (OTU, de sus siglas en inglés) se conformo con secuencias del gen rRNA 16S compartiendo 100% de identidad (haplotipos). Las secuencias de cada haplotipo, de aislados bacterianos obtenidos del mismo biorreactor (Base de datos del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental) y de la base de datos NCBI más próximas; fueron alineadas usando el algoritmo CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994).

### 3. RESULTADOS

En general el rango de temperatura estudiado en cada caso mostro productos amplificados; se escogió la mayor temperatura que mostro una robusta amplificación del fragmento amplificado como sigue: Bacteria (55°C), Arqueobacteria (45°C) y Metanobacteria (50°C).

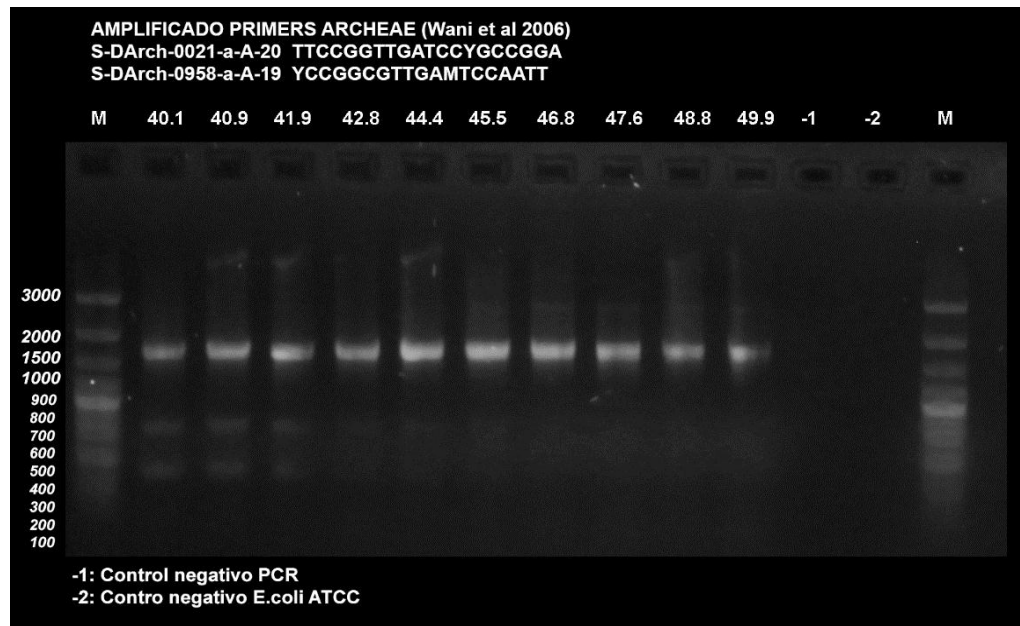
Los resultados del estudio de la mejor temperatura de amplificación, son presentados en la figura 1,2 y 3 respectivamente:

**Figura 1.** Gradiente temperatura Bacteria.



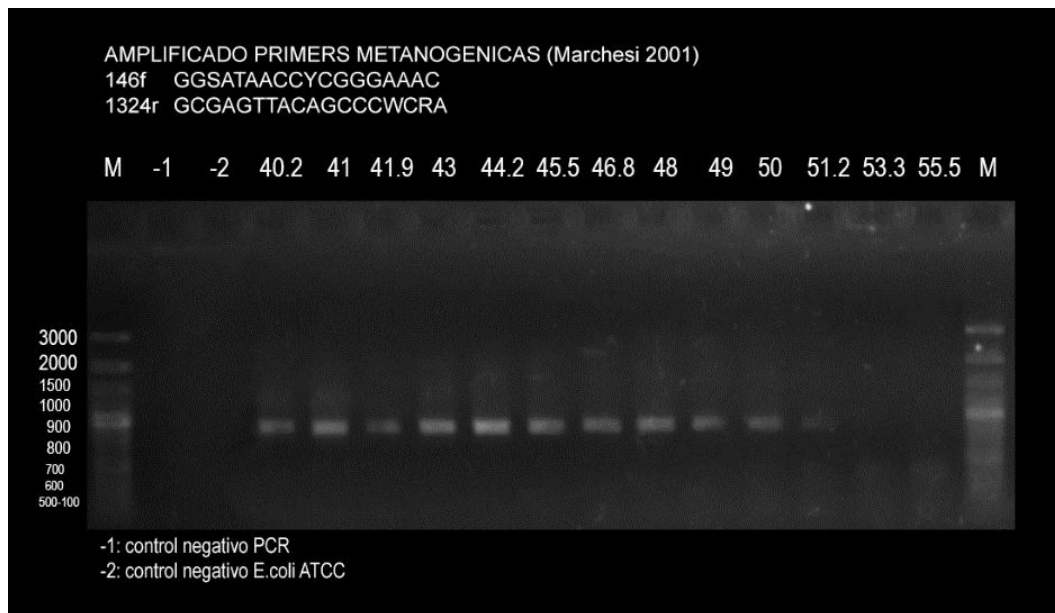
Usando el siguiente programa: 94°C/3min seguido de 35 ciclos de 94°C/45s, 50 – 55 °C/1min, 72°C/1min y una fase de extensión final de 72°C/5min.

**Figura 2.** Gradiente temperatura Archaea.



Usando el siguiente programa: 94°C/3min seguido de 35 ciclos de 94°C/45s, 40-50 °C/1min, 72°C/1min y una fase de extensión final de 72°C/5min.

**Figura 3.** Gradiente temperatura Metanobacterias.



Usando tales temperaturas se logró amplificar en cada caso fragmentos amplificados con tamaños como sigue: Bacteria 900pb, en Arqueobacteria 500-1800pb y metanobacteria 900-1000pb. En estos dos últimos casos los fragmentos amplificados no coinciden con los tamaños esperados indicando inespecificidad durante la reacción de amplificación (Tabla 3).

**Tabla 3.** Estimaciones y Resultados obtenidos con el set de primer reportados en la literatura.

Autor	Nombre*	Tamaño esperado	Tamaño observado	Regiones hipervariables flanqueadas
Wani <i>et al.</i> (2006)	530F	900	900	V5 – v8
	1490R			
Wani <i>et al.</i> (2006)	S-DArch-0021-a-A-20	900	500-1800	V1 – v5
	S-DArch-0958-a-A-19			
Marchesi <i>et al.</i> (2001)	146F	1200	900-1000	V2 - V8
	1324R			

Como se indicó en materiales y métodos en el presente trabajo se generaron tres genotecas a partir de los productos amplificados: genoteca A para Bacterias, genoteca B para Arqueobacteria y genoteca C para Metanobacterias. En la tabla 4 se presenta los resultados obtenidos con el sistema de clonación usado.

**Tabla 4.** Productos Clonados.

CODIGO	Total de colonias repicadas	Crecimiento positivo	Crecimiento Negativo
Genoteca A	170	169	1
Genoteca B	50	27	23
Genoteca C	50	20	30
Control	10	10	0
<b>TOTAL</b>	280	226	54

El total de potenciales colonias recombinantes colectadas fue como sigue: genoteca A 170, genoteca B 50 y genoteca C 50. El re cultivo de estas colonias

para con el fin de purificar los plásmidos recombinantes no fue muy efectivo en el caso de Arqueobacterias y Metanobacterias, donde se logró crecer solo el 40% (20 colonias) y 54% (27 colonias) respectivamente. Esto indica que aunque el proceso de clonación fue claramente efectivo (99.4%) en el caso de Bacterias, para el caso de Arqueobacterias y Metanobacterias no lo fue así.

Los plásmidos recombinantes que se recuperaron a partir de las colonias crecidas fueron usados para amplificar los fragmentos clonados y enviados para su secuenciación al SSiGmol del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá, Colombia).

Un total de 169 secuencias de la genoteca A, y 15 secuencias de la genoteca C, fueron secuenciadas exitosamente. El resto de las secuencias de los productos amplificados de Arqueobacterias y 5 de Metanobacteria no tuvieron la calidad y la concentración adecuada para la secuenciación.

Las secuencias disponibles fueron usadas para identificar las especies microbianas presentes en el metagenoma del cultivo enriquecido usando las herramientas bioinformáticas disponibles en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

La genoteca A (Bacteria) identifico 18 secuencias con alto nivel de identidad (87-95%) con secuencias del genero *Gracilibacter sp*; sin embargo 151 secuencias mostraron alto nivel de identidad (90-99%) con la especie *Escherichia Coli* (Tabla 5).

**Tabla 5.** Resultados obtenidos en cultivos enriquecidos de carbón del manto usando RCM como medio de cultivo.

Medio RCM	Crecimiento	Producción de gas	No. de clonas aisladas	Filiación <sup>†</sup>	Identidad <sup>‡</sup>
Colección de Aislados	+	+	5	<i>Bacillus licheniformis</i>	87-98%
			<b>Total = 5</b>		
Genoteca de clonas de Bacteria	+	+	18	<i>Gracilibacter</i> spp.	87-95%
			151		
			<b>Total = 169</b>		
Genoteca de clonas de Metanógenos	+	+	14	<i>Bacillus licheniformis</i>	84-99%
			1		
			<b>Total = 15</b>		

RCM: Reinforced Clostridium Medium.

La producción de gas se determinó visualmente mediante la captura de gas en tubos Durham.

†: El mejor solapamiento de las secuencias encontrado en la base de datos del Genbank.

La alta tasa de identidad para la especie *E. coli* sugiere que bajo nuestras condiciones experimentales usadas en este estudio, el sistema de clonación con la expresión del gen Killer en el sistema de clonación “Clone JET™ PCR Cloning Kit” (Thermo Scientific, USA), no fue totalmente eficiente. Una posible explicación es que cuando fallo este sistema “Killer” las colonias clonaron las secuencias del gen ribosomal de la bacteria hospedera.

Las secuencias obtenidas de la genoteca C (Metanobacteria) no indicaron en ningún caso identidad con secuencias de metagenos presentes en la base de datos. Por el contrario 14 de las secuencias mostraron alta identidad (84-99%) con la especie *Bacillus licheniformis* y una secuencia demostro alta identidad (99%) con secuencias de *Bacillus subtilis*, estos datos demuestran la inefectividad, al menos para nuestras condiciones de las secuencias cebadoras usadas en el caso

de Metanogenos. Posiblemente esto se debio a que las bandas clonadas y posteriormente secuenciadas fueron bandas inespecificas.

## 4. DISCUSION

El crecimiento de *Gracilibacter sp en medios de cultivo* puede oscilar entre 25° - 54°C (Lee *et al*, 2006); además Lee (2006) indica que no hay crecimiento de *Gracilibacter sp* o puede verse afectado en medios con presencia de acetato, a esto se debe la mejor tasa de crecimiento en medio RCM y no en caldo de acetato de sodio. Siendo RCM el mejor medio de cultivo ya que favorecen el crecimiento de bacterias anaerobias. Además el mecanismo de biodegradación de la materia orgánica por parte de *Gracilibacter* por medio de la fermentación aporta como productos finales acetato, lactato y etanol (Lee *et al* 2006). Compuesto usados en su mayoría para la producción de metano por parte de las metanobacterias acetoclasticas.

### 4.1 EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR

Es resaltante, ya que se ha demostrado que los co-cultivos de carbón contienen usualmente contaminantes, los cuales interfieren con las subsecuentes manipulaciones moleculares (Yates *et al*. 1998).

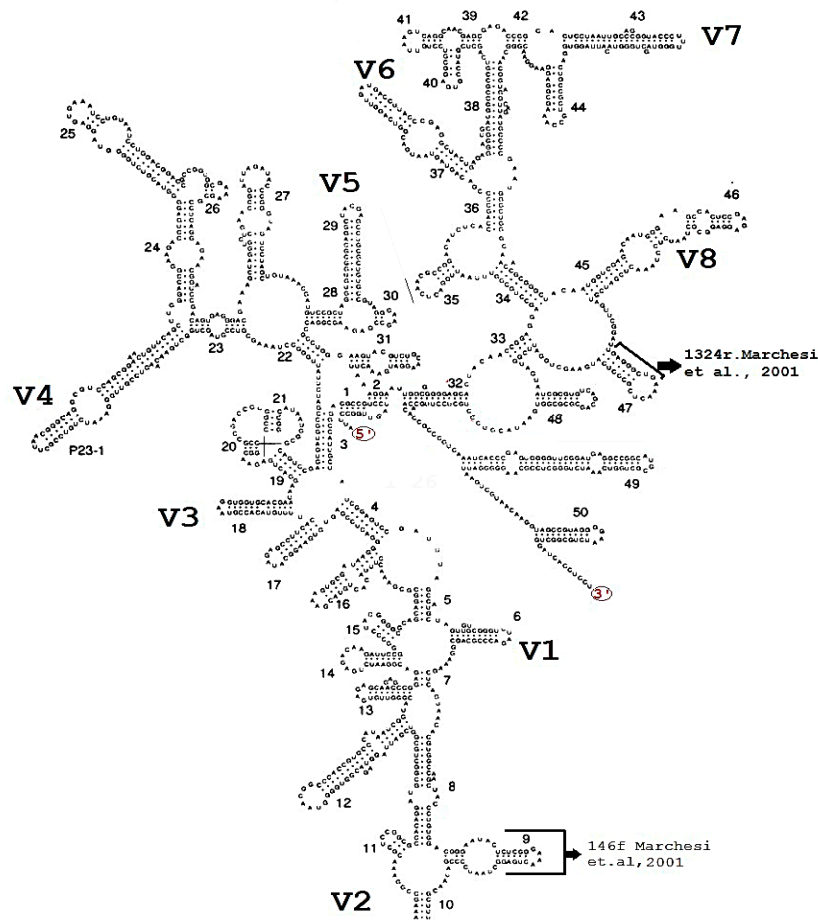
### 4.2 SOBRE LOS CEBADORES

La elección del primer es fundamental y quizá uno de los puntos flacos de la investigación; Se obtuvieron amplificaciones inespecíficas con los primers seleccionados para Archaea y metano, esto se puede visualizar en los gradientes de temperatura obteniéndose más de una banda con estos primers (Figura 2 y 3). Las regiones hipervariables del gen 16s se caracterizan por altas tasas mutacionales en relación a las regiones conservadas, esto y la alta tasa de recombinación de *E. Coli* no permitió ampliar el rango de filotipos obtenidos como complemento al método microbiológico (Cole *et al*, 2009).

Por ello al solapar un primer en la estructura del gen ribosomal 16S sobre las regiones hipervariables, se incrementa la probabilidad de apareamientos erróneos. Por ende, obteniendo falsos negativos durante la detección de metanógenos. Por tal, lo ideal es el uso de cebadores para regiones conservadas.

En la estructura secundaria del RNA ribosomal para metanógenos se ha ubicado el primer usado para metanobacterias en este estudio, señalado con flechas negras. Las regiones hipervariables están marcadas de V1- V9. Los tallos están numerados del 1 al 50 (**Figura 4**).

**Figura 4.** Estructura secundaria del RNA ribosomal Bacterias metanogénicas (Neefs *et al.*, 1993).



Los cebadores utilizados para la amplificación flanquean las regiones hipervariables V1 - V8. Los resultados de la amplificación muestran que la calidad del ADN usado es óptima para manipulaciones moleculares, y que al menos un juego de cebadores es adecuado para la detección de bacterias en co-cultivos de carbón.

Se ha encontrado que los cebadores reportados por Marchesi *et al.* (2001), flanquean la región hipervariable V2. Esta situación generaría la posible amplificación del gen rRNA 16S para algunas metanobacterias, sin embargo también podría omitir la detección de familias como *Methanospirillaceae*, *Methanocorpuaceae* y excluir miembros de las grandes familias como las *Methanomicrobiaceae* y las *Methanosarcinales* (Mora, 2014).

La subunidad 16s del gen Ribosomal posee un alto contenido de GC lo que podría estar dificultando la secuenciación (Frey *et al.*, 2008), y los cebadores seleccionados en el proyecto tienden a solaparse en las regiones hipervariables, lo que conllevaría a una menor posibilidad de detección de metanógenos y otras bacterias.

#### 4.3 ANÁLISIS DE SECUENCIAS

De las 169 clonas, el 89.34% de las muestras secuenciadas presentan un 90% de identidad para Enterobacteriáceas (*E. Coli*) esto se deba quizá a la alta capacidad recombinante de la *E. Coli* ATCC JM101 al verse sometida a altos niveles de estrés y a la presencia del gen “killer” del vector de clonación.

De las 169 muestras enviadas a secuenciar se obtienen 18 secuencias que tiene un porcentaje del 87-95% de identidad para *Gracilibacter sp*; bacteria anaerobia estricta.

A pesar de que no se logra dilucidar de forma concreta la bacteria metanogénica debido al resultado de la secuenciación, podemos inferir una posible asociación entre *Gracilibacter sp* y esta, ya que las clostridiales suelen ser fermentadores facultativos o estrictos que pueden producir sustratos metanogénicos tales como acetato, CO<sub>2</sub>, y H<sub>2</sub> de variedad de sustratos orgánicos (Wiegel *et al.*, 2006).

Las bacterias son las que facilitan los precursores de la metanogénesis, realizando modificaciones sobre el material orgánico del ambiente, así permitiendo la conversión de la materia a nutrientes para la producción de metano. Y es justamente esto lo que se logra descubriendo cada uno de los participantes de este consorcio, ya con ello podremos conocer cuáles son los posibles pasos metabólicos que siguen para llegar a la producción de metano. Sin bacterias no habría metano, he aquí la importancia de encontrar este anaerobio estricto.

Al comparar las bacterias identificadas en nuestro estudio de la genoteca A con los aislados recuperados del cultivo enriquecido previamente en nuestro laboratorio encontramos, que estas son especies diferentes (*Gracilibacter spp* vs *Bacillus licheniformis*), esto nos indica la importancia de usar métodos complementarios (métodos microbiológicos y moleculares) durante la identificación de bacterias presentes en consorcios microbianos. Resulta interesante que la mayor parte de las secuencias recuperadas de la genoteca C correspondan a la misma especie de los aislados obtenidos de los cultivos enriquecidos (*Bacillus licheniformis*), esto nos confirma que tanto *Bacillus licheniformis* como *Gracilibacter sp* deben constituir miembros importantes del consorcio productor de metano crecido en los cultivos. El uso de método por aislamiento microbiológico y el primer 16s RNA son complementarios permitiendo tener un mayor criterio de análisis sobre lo encontrado en muestras de carbón y posiblemente en cualquier análisis de metagenoma.



## 5. RECOMENDACIONES

Realizar el proceso de clonación con otro huésped, como la *Escherichia coli* JM109 recomendada por los fabricantes del kit Clone JET™PCR Cloning Kit” (Thermo Scientific, USA), ya que este huésped posee característica que evitan o minimizan la recombinación (es recA- y endA-) mientras la *E. Coli* JM101 tiende a generar factores de recombinación entre el plásmido y su propio sistema recA+ conllevando a la pérdida del gen de interés

Probar con el método de clonación clásico de visualización blue/White (Messing *et al.*, 1977).

Continuar con la búsqueda de un primer que se adecuen más a las necesidades del trabajo, que abarque un mayor número microorganismos y tenga en cuenta la fuente u origen del material genético con el que se trabajara (mantos de carbón).

## BIBLIOGRAFIA

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.

Baskaran, N., et al. Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. *Genome Res.* 6, 633-638 (1996).

Beaton A, Langenberg W, Pană C. 2006. Coalbed methane resources and reservoir characteristics from the Alberta Plains, Canada. *International Journal of Coal Geology* 65:93-113.

Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmstrom C, Doolittle WF, Kjelleberg S. 2007. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:278–8

Cole, J. R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R. J. Farris, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, T. Marsh, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.*37 (Database issue): D141-145; doi: 10.1093/nar/gkn879] [PMID: 19004872].

Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W., Baird, R.M. 2003. *Handbook of Culture Media for Food Microbiology*, volume 37, Elsevier Science.

Dahllöf, I. 2002. Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol* 13: 213–217.

De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1960). A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23 (1), 130.

Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., Dveksler, G. S. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl.* 3, S30-S37 (1993).

Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792-1797.

Elshahed MS. 2010. Microbiological aspects of biofuel production: Current status and future directions. *Journal of Advanced Research* 1:103-111.

Erllich, H. A., Gelfand, D., Sninsky, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science.* 252, 1643-1651 (1991).

- Faiz M, Hendry P. 2006. Significance of microbial activity in Australian coal bed methane reservoirs - A review. *Bulletin of Canadian Petroleum Geology* 54:261-272.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Felsenstein J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package. *Cladistics* 5:164-166.
- Flores RM, Rice CA, Stricker GD, Warden A, Ellis MS. 2008. Methanogenic pathways of coal-bed gas in the Powder River Basin, United States: the geologic factor. *International Journal of Coal Geology* 76:52-75.
- Flores RM. 2008. Microbes, methanogenesis, and microbial gas in coal. *International Journal of Coal Geology* 76:1-2.
- Frey, U. H., Bachmann, H. S., Peters, J., Siffert, W. PCR-amplification of GC-rich regions: 'slowdown PCR. *Nat. Protoc.* 3, 1312-1317 (2008).
- Friedrich v. Wintzingerode, Ulf B. Göbel, Erko Stackebrandt. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21 (1997). p 213-229.
- García-González M. 2010. Coalbed Methane Resources in Colombia. In: AAPG International Convention and Exhibition, *Frontiers of Unconventional Thinking*, Calgary, Alberta, Canada.
- Garcia, Lynne Shore; Isenberg, Henry D. 3rd ed. *Clinical microbiology procedures handbook*. American Society for Microbiology, Washington, DC: ASM Press, c2010. NLM D: 101528193.
- Garrity GM, Holt JG. 2001b. Phylum All. Euryarchaeota phy. nov. In: Boone DR, Castenholz RW, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edition. New York: Springer. p 211– 355.
- Green MS, Flanagan KC, Gilcrease PC. 2008. Characterization of a methanogenic consortium enriched from a coalbed methane well in the Powder River Basin, U.S.A. *International Journal of Coal Geology* 76:34-45.
- Guido N, Starostina E, Leake D, Saaem I (2016) Improved PCR Amplification of Broad Spectrum GC DNA Templates. *PLoS ONE* 11(6): e0156478. doi:10.1371/journal.pone.0156478

Gupta A, Birendra K. 2000. Biogasification of coal using different sources of micro-organisms. *Fuel* 79:103-105.

Harris SH, Smith RL, Barker CE. 2008. Microbial and chemical factors influencing methane production in laboratory incubations of low-rank subsurface coals. *International Journal of Coal Geology* 76:46-51.

Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D., Loening, S. A. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 25, 3957-3958 (1997).

Hirsch, A., and E. Grinstead. 1954. Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore formers from cheese, with observations on the effect of nisin. *J. Dairy Res.* 21:101-110.

Johnson ER, Klasson K, Basu R, Volkwein C J, Clausen EC, Gaddy JL. 1994. Microbial Conversion of High-Rank Coals to Methane. *AppUed Biochemistry and Blotechnology.* 45/46 (1): 329-338.

Jones EJP, Voytek MA, Warwick PD, Corum MD, Cohn A, Bunnell JE, Clark AC, Orem WH. 2008. Bioassay for estimating the biogenic methano-generating potential of coal samples. *International Journal of Coal Geology* 76:138-150.

Kotarba MJ, Rice DD. 2001. Composition and origen of coalbed gases in the Lower Silesian basin, southwest Poland. *Applied Geochemistry* 16:895-910.

Lee, Y.J, Romanek, C.S, Mills,G.L, Richard, D.C, Whitman, W.B, Wiegel, J. 2006. *Gracilibacter thermotolerans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermotolerant bacterium from a constructed wetland receiving acid sulfate water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 2089-2093. DOI 10.1099/ijs.0.64040-0.

Liu D. (2009). Purification of Nucleic Acids from Bacteria. In: *Handbook of Nucleic Acid Purification.* Liu D. (Ed.), Taylor & Francis CRC Press, Cap. 5.

Longwell JP, Rubint ES, Wilson J. 1995. Coal: energy for the future. *Progress in Energy and Combustion Science* 21:269-360.

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1989) *Molecular cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Martínez YA. 2009. Determinación de la composición de los gases asociados a mantos de carbón en las áreas de Ubatè y Cerrejón por medio de cromatografía de gases. Tesis de grado. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander (UIS).

Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ Dymock D, Wade WG. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64, 795 - 799.

Mochimaru, H., Yoshioka, H., Tamaki, H., Nakamura, K., Kaneko, N., Sakata, S. 2007. Microbial diversity and methanogenic potential in a high temperature natural gas field in Japan. *Extremophiles* 11: 453–461.

Narihiro T, Sekiguchi Y. 2011. Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic Archaea. *Microbial biotechnology* 4 (5), 585-602

Neefs JM, Van de Peer Y, De Rijk P, Chapelle S, De Wachter R. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. 1993. *Nucleic Acids Res.* Jul 1; 21(13):3025–3049.

Ovreås L, Forney L, Daae FL, Torsvik V. 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63:3367-3373.

Polman JK, Breckenridge CR, Stoner DL, Andrews GF. 1995. Biologically Derived Value-Added Products from Coal. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 54: 249-255.

Scott AR, Zhou N, Levine JR. 1995. A Modified Approach to Estimating Coal and Coal Gas Resources: Example from the Sand Wash Basin, Colorado. *The American Association of Petroleum Geologists.* 79(9): 1320-1336.

Shimizu S, Akiyama M, Naganuma T, Fujioka M, Nako M, Ishijima Y. 2007. Molecular characterization of microbial communities in deep coal seam groundwater of northern Japan. *Geobiology* 5:423-433.

Sorensen, A.H., and Ahring, B.K. 1997. An improved enzyme-linked immunosorbent assay for whole-cell determination of methanogens in samples from anaerobic reactors. *Appl Environ Microbiol* 63: 2001–2006.

Strapoc D, Mastalerz M, Eble C, Schimmelmann A. 2007. Characterization of the origin of coalbed gases in southeastern Illinois Basin by compound-specific carbon and hydrogen stable isotope ratios. *Organic Geochemistry* 38:267-287.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Thielemann, T., Cramer, B., Schippers, A. 2004. Coalbed methane in the Ruhr Basin, Germany: a renewable energy resource? *Organic Geochemistry* 35, 1537–1549.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
- Wang A, Qin Y, Wu Y, Wan B. 2010. Status of research on biogenic coalbed gas generation mechanisms. *Mining Science and Technology* 20:271-275.
- Wani, A.A., Surakasi, V.P., Siddharth, J., Raghavan, R.G., Patole, M.S., Ranade, D., Shouche, Y.S., 2006. Molecular analyses of microbial diversity associated with the Lonar soda lake in India: an impact crater in a basalt area. *Research In Microbiology* 57, 928–937.
- Weijers, J.W.H., Schouten, S., van der Linden, M., van Geel, B., and Damste, J.S.S. 2004. Water table related variations in the abundance of intact archaeal membrane lipids in a Swedish peat bog. *FEMS Microbiol Lett* 239: 51–56.
- Woese CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221–271.

## ANEXOS

## **ANEXO A. Estandarización del Proceso de clonación y extracción de ADN plásmidico**

### **1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN**

Procedimiento laborioso y caro. Por ello, existen diversas estrategias para seleccionar antes de la secuenciación aquellos plásmidos recombinantes que porten insertos cuya secuencia y tamaño sea el esperado. Tradicionalmente, esta preselección se ha llevado a cabo realizando análisis de restricción de dichas construcciones. Actualmente, esta metodología puede complementarse con la amplificación mediante PCR con cebadores específicos del inserto o que flanqueen al mismo, comprobando después en un gel de agarosa el tamaño de los amplicones producidos. Éstos pueden ser posteriormente sometidos a un análisis de restricción.

### **2. MINIPREPARACIONES**

El procedimiento de desnaturalización alcalina, descrito por Birnboim & Doly constituye la base de varios protocolos de extracción de DNA plásmidico. El principio de la técnica es que las condiciones alcalinas (pH 12-12,5) desnaturalizan por completo las moléculas lineales de DNA, pero no las moléculas CCC (las cuales sufren una desnaturalización parcial). De esta manera como el DNA cromosómico por ser tan grande estará en forma fragmentada (múltiples moléculas lineales) y el plásmido al ser tan pequeño se mantendrá cerrado, se desnaturalizarán solo las primeras. Cuando el extracto celular es neutralizado con una alta concentración salina el DNA cromosomal precipita; esto posiblemente obedezca a que la re asociación de largas cadenas de moléculas de DNA simple cadena ocurre en múltiples sitios formando una masa insoluble. La mayor parte del RNA también precipita, al igual que las proteínas debido a que la reacción se realiza en presencia de SDS y alta fuerza iónica.

La exposición de suspensiones bacterianas a detergentes anionicos y alto pH genera aberturas en la pared celular, desnaturaliza el DNA cromosómico y proteínas, y libera el DNA plásmidico dentro del sobrenadante. Aunque la solución alcalina separa completamente el apareamiento de bases nitrogenadas, las cadenas de ADN plásmidico circular no son capaces de separarse una de otra ya que topológicamente están entrelazadas. Siempre y cuando la intensidad y la duración de la exposición a OH<sup>-</sup> no sea demasiado grande, las dos cadenas de DNA plásmidico caen una vez dentro del registro cuando el pH retorna a la neutralidad.

Durante la lisis, las proteínas bacterianas, los fragmentos de la pared celular, y el DNA cromosómico desnaturalizado son embebidos en grandes complejos que están recubiertos con dodecil sulfato. Estos complejos son precipitados eficientemente de la solución cuando los iones de sodio son reemplazados por iones de potasio (Ish-Horowicz

and Burke, 1981). El material desnaturalizado es removido por centrifugación, y los plásmidos pueden ser recuperados del sobrenadante.

La lisis alcalina en presencia de SDS es una técnica flexible que trabaja bien con cepas de *E. coli* y con cultivos bacterianos que poseen volúmenes de 1 mL a > 500 mL. Los plásmidos recuperados del lisado pueden ser purificados de diversas formas.

### 3. PROTOCOLO MINIPREPARACIONES

La cantidad de plásmidos varía entre 100 ng y 5 µg, dependiendo del número de copias del plásmidos por célula. Los resultados de la mini preparación pueden ser visualizados por electroforesis o digestión por endonucleasas de restricción. La purificación es necesaria antes de la secuenciación (purificación por precipitación PEG)

*Preparación de las células:*

1. Picar una colonia de células transformantes e inocular 1.5 mL de medio LB broth conteniendo ampicilina 50 µg/mL incubar a 37°C con agitación (200-250 ciclos/min.) durante 24 h.

**Nota:** Asegurarse que el cultivo esta adecuadamente airado (los tubos deben estar incubados en constante agitación, estar tapados sin apretar totalmente, y bien sellados con parafilm)

2. Centrifugar a 13.000 rpm a 4°C durante 5 min, descartar con cuidado el sobrenadante (remover el medio por aspiración, dejando el pellet lo más seco posible).

**Nota:** el inconveniente de no remover todo rastro de medio de cultivo del pellet bacteriano, permite a los plásmidos ser resistentes a la escisión por enzimas de restricción. Esto es causado por componentes de la pared celular que en medios de cultivo inhiben la acción de muchas enzimas de restricción.

Este problema se puede evitar con la resuspensión del pellet bacteriano en cualquiera de estas dos soluciones (STET o TE):

-Agregar 350 µL de STE frio (25% del volumen del cultivo bacteriano, en nuestro caso agregar 350 µL) y centrifugar nuevamente.

-Agregar 150 µL de TE, resuspender el pellet centrifugar por 5 min y eliminar el sobrenadante.

3. Resuspender el pellet en 150 µL de TE, agitar en un vortex por 30 s o más hasta que la solución sea homogénea, centrifugar a 7.000 rpm por 5min y descartar sobrenadante. Repetir dos veces.

4. Resuspender el pellet en 150  $\mu$ L de solución de lisis alcalina I fría, agitar vigorosamente en un vórtex, e incube durante 5 min a temperatura ambiente.  
**Nota:** La presencia de grumos indica falta de homogenización en la suspensión del pellet en el buffer. El uso de lisozima (asiste en la disociación de la pared celular) es omitido cuando se trata cultivos con volúmenes menores a 10 mL.
5. Agregar 200  $\mu$ L de solución de lisis alcalina II recién preparada. Mezclar por inversión suavemente hasta que la solución obtenga una coloración transparente o levemente amarilla (es recomendado mezclar dos a cinco veces). Mantener en temperatura ambiente por 2 min.  
**Nota:** No usar vórtex ya que ello conllevaría al rompimiento del ADN genómico que podría contaminar la preparación de plásmidos. El detergente SDS solubiliza los componentes fosfolípidos y proteicos de la envuelta celular y el NaOH desnatura el cromosoma bacteriano y proteínas.
6. Adicionar 150  $\mu$ L de solución de lisis alcalina III fría. Mezclar por inversión, incubar en temperatura ambiente por 2 min.  
**Nota:** La solución de lisis alcalina III neutraliza el NaOH usado en el paso anterior, precipitando el ADN genómico y el SDS en un precipitado blanco, insoluble y de apariencia gomosa.
7. Adicionar un volumen igual de fenol: cloroformo: isoamialcohol (25:20:5) según la cantidad de sobrenadante recuperado. Mezclar por inversión suavemente, centrifugar la emulsión durante 10 min a 8.000 rpm y 4 °C y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.  
**Nota:** El propósito de la extracción con cloroformo es remover los residuos de fenol de la fase acuosa. El fenol es levemente soluble en agua, pero puede ser desplazado dentro de la fase orgánica por el cloroformo. La eliminación de este paso puede dar como resultado que el DNA sea resistente a las enzimas de restricción

*Recuperación del plásmido:*

8. Agregar 600  $\mu$ L de isopropanol frío y 1  $\mu$ L de NaCl 5M, para precipitar los ácidos nucleicos, agitar e incubar en -20°C por 10min.
9. Centrifugar 15 min a 15.000 rpm y 2 °C.
10. Descartar el sobrenadante y secar sobre una toalla de papel durante 10 min en posición invertida. (opcional)

11. Disolver los ácidos nucleicos en 20  $\mu\text{L}$  de TE (pH 8.0), resuspender con la micropipeta, dejar 5 min a temperatura ambiente antes de montar en el gel electroforético o guardar la solución de DNA  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Cargar un 1  $\mu\text{L}$  de la extracción de ADN plásmidico y 0.5  $\mu\text{L}$  de EZ-vision e hidratar antes de cargar en los pozos, esto puede hacerse con 1 – 2  $\mu\text{L}$  de agua o TBE, dejar correr por 60 min, dependiendo del tamaño de la cámara electroforética graduar el voltaje (5 voltios por cada centímetro; si la cámara tiene 30 cm graduar a 150 V, en cajas pequeñas graduarlo a 100 V).

## **SECUENCIACION**

### **Entrega de resultados**

En la página de cada usuario se notifica el punto del proceso en el que se encuentran sus muestras. Una vez generados los resultados, estos son revisados manualmente por nuestro equipo para identificar problemas específicos de las muestras que hayan podido afectar la secuenciación, y de esta manera sugerir al Usuario medidas para mejorar sus resultados. Luego estos son subidos a la cuenta de cada Usuario.

Los resultados en SSigMol se disponen como cromatogramas (\*.ab1), archivos que se puede leer con programas como BioEdit Sequence Alignment Editor y Chromas (para Windows), Geospiza FinchTV (para MAC o Windows), estos programas corresponden a software libre.

### **SSigMol OR MACROGEN:**

1. Prepare un gel con las muestras a enviar, cargue un microlitro de la muestra de ADN de interés, use un ladder. Tome una fotografía clara y con buena resolución, rotule cada pozo.
2. Etiquete las muestras en orden, creando una lista donde especifique el tipo de primer que desea enviar (Forward or Reverse; junto con las especificaciones del oligo).
3. A cada tubo agregue 3  $\mu\text{L}$  de primer (solo uno: Forward o Reverse)

NOTA: Una de las posibles causas de que la secuenciación empeore es debido:

1. Presencia de una zona rica en GT, GA o polímeros G. Estas son zonas son difíciles de secuenciar debido al tipo de composición nucleotídica. Una de las posibles formas de solucionar este problema es realizar la secuenciación con la cadena complementaria, aunque en algunos casos el resultado mejora si se repite la secuenciación con el Kit BigDye Terminator dGTP de Applied Biosystems.
2. Regiones ricas en GC. El contenido de G y C varía entre un 25% y 75% en todos los organismos Guido *et al.*, 2016). Por tanto existen zonas especialmente ricas en G y C, zonas superiores a un porcentaje superior al 62% resultan difíciles de secuenciar. Para mejorar los resultados se recomienda añadir a la reacción estándar un 5% de DMSO (Dimetil Sulfoxido).

Otras modificaciones posibles serian:

-Añadir a la reacción de PCR entre un 5% y un 10% de formamida, o entre un 5%-10% de glicerol.

-Aumentar la temperatura de desnaturalización a 98°C (al Secuenciar).

3. Zonas ricas en AT. La secuenciación no es tan problemática como en el caso de regiones ricas en GC. Debe revisarse las características del primer, este no debe presentar zonas ricas en AT, en caso de que las presente, una posible solución es aumentar la longitud del primer o usar primer marcados.

Regiones con estructuras secundarias. Los moldes con estructuras secundarias, del tipo de, repeticiones invertidas o palíndromas evitan una correcta secuenciación. Observándose en el cromatograma, una reducción rápida de la intensidad de la señal, lo que indica que la enzima no ha sido capaz de continuar más allá de esta región. Este problema aumenta el nivel de dificultad al secuenciar, cuando además en el ADN molde hay zonas ricas en G y C. Se pueden aplicar las soluciones descritas para las zonas ricas en GC (Baskaran *et al.*, 1996, Frey, U. H *et al.*, 2008).