



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



Estandarización de un método de extracción de DNA para muestras de Lodos activados

L. R. Evaristo Vázquez^a, J. Pérez Vargas^a, J. Jan Roblero^b, R. Aguilar López^c, M. I. Neria González^a.

^a División de Ingeniería Química y Bioquímica, TESE, Ecatepec, Edo. de México, CP 55120.

^b Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. D.F. México

^c Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, D.F. México. E-mail: ibineria@hotmail.com.

Palabras clave: Lodos activados, estandarización, DNA metagenómico.

Introducción. Los lodos activados (LA) ayudan a la eliminación de los nutrientes en las plantas de tratamiento de aguas residuales mediante la actividad metabólica microbiana; la acetogénesis, metanogénesis y la producción de H₂, son ejemplos de ésta ⁽²⁾. En la búsqueda de procesos que permitan obtener combustibles limpios como el H₂, los LA son una opción, pero no es tarea fácil el desarrollo de estos procesos, debido a las condiciones ambientales y de operación de los reactores de LA. Sin embargo, una alternativa que puede ayudar es el análisis de la diversidad filogenética microbiana del lodo, requiriéndose de la extracción eficiente del DNA metagenómico para realizar las técnicas moleculares a *doc* a este fin. El conocimiento de la diversidad filogenética contribuye a la identificación de los microorganismos idóneos y a establecer las condiciones ambientales y operacionales, sin requerir de experimentos de prueba y error. Los LA se conforman de microgránulos formados de capas microbianas embebidos en la materia orgánica como proteínas, lípidos, carbohidratos, y materia soluble e insoluble, la cual afecta la eficiencia de la extracción del DNA, en su integridad y pureza. Así que, el objetivo del trabajo fue estandarizar un método de extracción de DNA de LA.

Metodología. Una muestra de 1 L de lodos fue dividida en submuestras de 10mL en tubos de 50 mL y almacenados en refrigeración. Las submuestras se usaron para la caracterización fisicoquímica del LA y otras fueron tratadas previamente con sonicación y vórtex para disgregar los gránulos combinado lavados con soluciones EDTA diferentes antes de la extracción de del DNA ⁽²⁾. Las muestras fueron digerida con proteinasa K por 1 h seguido del una etapa de lisis celular. La lisis celular se realizó combinando lizosima, SDS, choque térmico y lisis mecánica usando ballotines de sílica y vórtex. La proteína celular se eliminó con diferentes compuestos: fonol, acetato de amonio, CTAB y combinaciones de éstos. El DNA fue precipitado con etanol o isopropanol y diferentes lavados con etanol al 70% fueron realizados para la purificación. En cada etapa descrita se realizaron centrifugaciones a 13 000 rpm para recuperar las fracciones de interés. También, el Ulta Clean soil DNA Kit fue empleado en la extracción del DNA. Los diferentes extractos fueron evaluados por electroforesis y se utilizaron en la amplificación del los genes ribosomales 16S rDNA vía PCR.

Resultados.

Tabla 1. Caracterización de lodos activados.

Parámetro	Concentración (g/L)
ST	34.5
SV	27
Sólidos fijos	7.5
S. S.F.	6
SST	32.75
SSV	26.75
DQO total	61.5
DQO soluble	4.05
Carbohidratos totales	33.83
Carbohidratos solubles	0.93
Proteínas totales	5.21
Proteínas solubles	0.19
AGV	0.37
pH	6.6

Planta de tratamiento de aguas residuales de la UNAM. Campus Cd. Universitaria, México, D.F.

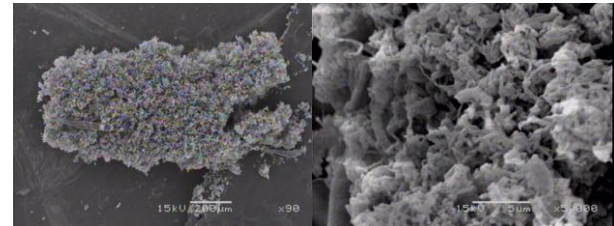


Figura1. Las imágenes muestran la estructura del lodo activado antes del tratamiento de disgregación y lavados.

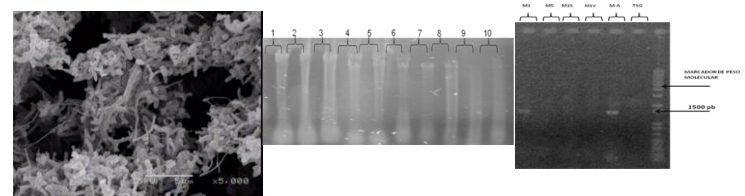


Figura2. Las imágenes muestran el resultado de tratamiento de LA, los extractos DNA y el producto de PCR para el gen 16S rDNA.

Conclusiones. La disgregación de los gránulos es importante en la liberación de las células y los lavados ayudan a eliminar agentes que afectan la eficiencia de extracción del DNA e inhibición de la PCR.

Agradecimiento. Se agradece el apoyo de CONACYT al proyecto "Análisis y caracterización de la comunidad microbiana presente en lodos estabilizados: identificación de bacterias y arqueas productores de hidrógeno"

Bibliografía. (1) Bourrain M, Achouak W, Urbain V, Heulin T, (1999), *Current Microbiology* (38): 315–319. (2) Fortin N, Beaumier D, Lee K, Greer CW, (2004). *Journal of Microbiological Methods* (56): 181– 191.