**Análisis bioinformático de las comunidades microbianas provenientes de una muestra de bosque andino empleadas en la construcción de un consorcio con actividad lignocelulolítica.**

1Díaz-Rodríguez Carlos Andrés, 2 León David, 3 Patiño Cesar

*1Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. Colombia*

*2Ingeniería de sistemas, Facultad de Ingeniería, Universidad de los Andes. Colombia*

*3Maestría en Biología Computacional, Facultad de Ingeniería, Universidad de los Andes. Colombia*

**INTRODUCCIÓN**

La transición energética desde fuentes no renovables hacia fuentes amigables con el medio ambiente es de vital importancia para todos los países en el mundo. Numerosos acuerdos han sido implementados a lo largo de los últimos 30 años. Este cambio ha sido apalancado gracias a la implementación de una economía verde también llamada bioeconomía. Esta nueva economía la cual, entre otras, busca el aprovechamiento de los residuos vegetales, puesto que estos permiten la síntesis de gran variedad de productos tales como, combustibles de tercera generación (Arpia et al., 2021); compuestos base para reacciones de polimerización para productos químicos de gran complejidad (Li et al., 2020; Kohli et al., 2019); compuestos para la industria alimenticia (Mahro & Timm, 2007; Muscat et al., 2020); entre otras múltiples aplicaciones que todavía presentan algunos retos importantes (Singhvi et al., 2019). Específicamente para el caso colombiano, la implementación de este tipo de tecnologías impulsará la industria biotecnológica en el país, pues permite un mejor aprovechamiento de los residuos agroindustriales que, de acuerdo con Peñaranda González y colaboradores (2017), no ha logrado superar el 17% de eficiencia. Actualmente existen diversas estrategias para el aprovechamiento de residuos, como por ejemplo procesos de gasificación para la producción de syngas (Ren et al., 2019); procesos de digestión anaerobia (Ahmed et al., 2019); pretratamiento térmico de residuos para la producción de biohidrógeno (Eskicioglu et al., 2017); así como diversos tipos de fermentación, tanto en estado sólido como fermentaciones sumergidas para la producción de compuestos de alto valor agregado (Cerda et al., 2019; Rahmati et al., 2020).

Dentro de los métodos anteriormente descritos destacan las fermentaciones sumergidas para la conversión de biomasa vegetal. Dichas fermentaciones pueden ser llevadas a cabo por cultivos puros de organismos relativamente sencillos como bacterias (Ju et al., 2020; Sadhukhan et al., 2016) o por organismos más complejos como levaduras (Diethard et al., 2016; Li et al., 2007), además del uso de otras plataformas en las que se emplea la búsqueda de un organismo que presenta la actividad deseada, la optimización de su producción y la posterior recuperación de la enzima, esto se logra comúnmente clonando su gen en una plataforma celular de expresión apropiada. (Alcalde et al., 2006; Green et al., 2006; Tyson et al., 2005).

En este punto es muy importante resaltar que las fermentaciones realizadas por cultivos puros de microorganismos presentan limitaciones con respecto a los cultivos mixtos. Por ejemplo, los cultivos mixtos presentan una mayor resistencia a cambios bruscos en el medio de cultivo o contaminaciones con otros microorganismos del ambiente que afecten negativamente el proceso (Pandey et al., 2020). Por lo cual, el uso de cultivos mixtos de comunidades microbianas estables, capaces de degradar material vegetal complejo, ha sido ampliamente investigado en una gran variedad de sustratos. El resultado de dichos estudios indican altos porcentajes en las transformaciones de los sustratos. Por tal razón, es de vital importancia la caracterización de esas comunidades microbianas o consorcios debido al gran potencial metabólico que presentan. Para investigar dicho potencial, conocido comúnmente como bioprospección, la comunidad científica e industrial ha empleado una gran variedad de técnicas modernas, por ejemplo el uso de análisis de metatranscriptómica para las comunidades microbianas, con el fin de evaluar los perfiles de expresión de enzimas relacionadas con la degradación de material vegetal, y así poder generar cocteles enzimáticos que permitan desde la liberación de monómeros más sencillos, que puedan ser fácilmente aprovechados por microorganismos con un metabolismo menos complejo (Simmons et al., 2014; Lopes, Ferreira Filho & Moreira, 2018) hasta técnicas más conservadas y ampliamente utilizadas como la anotación funcional de los metagenomas de los consorcios microbianos (Jia, Ng, Lu, Cai & Lee, 2018).

Dada la importancia del estudio de comunidades de microorganismos también llamados consorcios microbianos, diferentes estrategias para el ensamblaje de comunidades han sido propuestas, concretamente este trabajo utiliza los datos de los metagenomas generados al realizar un análisis de enriquecimiento a partir de un enfoque top-down para la creación de un consorcio mínimo efectivo MELMC por sus siglas en inglés, el cual es un consorcio formado por el menor número de especies necesarias para lograr una degradación efectiva de material lignocelulósico reportado por Díaz-García et al., (2020), en donde al usar el marcador filogenético del gen ribosomal 16S secuenciados mediante Illumina, se observa que la riqueza de las muestras oscila entre 10 y 50 especies, mayoritariamente *Sphingobacteriaceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae,* y *Paenibacillaceae,* concretamente se utilizarán los datos de la extracción de ADN de dos muestras correspondientes a la transferencia 6, de ahora en adelante denominada T6 y al análisis de perturbación de ahora en adelante denominado C1E.

Este trabajo tiene como principal objetivo el ensamblaje de los genomas de algunas de las especies más abundantes a partir de los metagenomas provenientes de las dos muestras descritas anteriormente, para lograr esto, se realiza una extracción de ADN de las muestras y se emplea la estrategia *shotgun metagenomics* (Quince et al., 2017) usando la plataforma de última generación PacBio, empleando algunos de los ensambladores reportados para secuencias de última generación como CANU (Koren et al., 2017) o FLYER (Kolmogorov et al., 2020) o estrategias alternativas como las reportadas por Sieber et al., (2018). Además, una vez los genomas estén ensamblados, se pretende realizar una anotación funcional de los genomas de las especies con mayor abundancia con el fin de caracterizar, al menos parcialmente, su potencial metabólico usando una plataforma de anotación de genes involucrados en la degradación de biomasa vegetal, empleando la base de datos CAZymes tal y como se describe en Jiménez et al., (2015) o ejecutando total o parcialmente pipelines específicos como los reportados en Dong & Strous, (2019); Tamames et al., (2019).

En cuanto a las características de estos datos de secuenciación, estos fueron proporcionados por el profesor Diego Jiménez, asociado al departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de los Andes, y fueron secuenciados en el Instituto Leibniz DSMZ Colección de microorganismos y cultivos celulares, en Alemania.

Algunas de las características más importantes de los datos de secuenciación son:

**Tabla 1.** *Características de los datos secuenciación de metagenomas obtenidos por PacBio*

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nombre de la muestra** | **Tamaño del archivo** | **Tamaño del Inserto** | **Subread más largo** | **N50 del Subread más largo** | **Longitud media del read** | **Media del valor de calidad Q** |
| Metagenom Jimenez **C1E** | 7,6 GB | 8100 | 10640 | 14401 | 6188 | Q43 |
| Metagenom Jimenez **12D** | 11,2 GB | 8200 | 10018 | 11185 | 6126 | Q42 |

**REFERENCIAS**

1. Díaz-García, L., Huang, S., Spröer, C., Sierra-Ramírez, R., Bunk, B., Overmann, J., & Jiménez, D. (2020). Dilution-to-Stimulation/Extinction Method: a Combination Enrichment Strategy To Develop a Minimal and Versatile Lignocellulolytic Bacterial Consortium. Applied And Environmental Microbiology, 87(2). <https://doi.org/10.1128/aem.02427-20>
2. Kolmogorov, M., Bickhart, D., Behsaz, B., Gurevich, A., Rayko, M., & Shin, S. et al. (2020). metaFlye: scalable long-read metagenome assembly using repeat graphs. Nature Methods, 17(11), 1103-1110. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-00971-x>
3. Singhvi, M., & Gokhale, D. (2019). Lignocellulosic biomass: Hurdles and challenges in its valorization. Applied Microbiology And Biotechnology, 103(23-24), 9305-9320. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10212-7>
4. Lopes, A., Ferreira Filho, E., & Moreira, L. (2018). An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. Journal Of Applied Microbiology, 125(3), 632-645. <https://doi.org/10.1111/jam.13923>
5. Zhu, N., Yang, J., Ji, L., Liu, J., Yang, Y., & Yuan, H. (2016). Metagenomic and metaproteomic analyses of a corn stover-adapted microbial consortium EMSD5 reveal its taxonomic and enzymatic basis for degrading lignocellulose. Biotechnology For Biofuels, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0658-z>
6. Koren, S., Walenz, B., Berlin, K., Miller, J., Bergman, N., & Phillippy, A. (2017). Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptivek-mer weighting and repeat separation. Genome Research, 27(5), 722-736. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>
7. Sieber, C., Probst, A., Sharrar, A., Thomas, B., Hess, M., Tringe, S., & Banfield, J. (2018). Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy. Nature Microbiology, 3(7), 836-843. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0171-1>
8. Dong, X., & Strous, M. (2019). An Integrated Pipeline for Annotation and Visualization of Metagenomic Contigs. Frontiers In Genetics, 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00999>
9. Tamames, J., Cobo-Simón, M., & Puente-Sánchez, F. (2019). Assessing the performance of different approaches for functional and taxonomic annotation of metagenomes. BMC Genomics, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6289-6>.
10. Shah, N., Tang, H., Doak, T., & Ye, Y. (2010). Comparing bacterial communities inferred from 16s rrna gene sequencing and shotgun metagenomics. Biocomputing 2011, 165-176. <https://doi.org/10.1142/9789814335058_0018>
11. Quince, C., Walker, A., Simpson, J., Loman, N., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. Nature Biotechnology, 35(9), 833-844. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>
12. Jiménez, D., Chaves-Moreno, D., & van Elsas, J. (2015). Unveiling the metabolic potential of two soil-derived microbial consortia selected on wheat straw. Scientific Reports, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep13845>
13. Peñaranda Gonzalez, L., Montenegro Gómez, S., & Giraldo Abad, P. (2017). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia. Revista De Investigación Agraria Y Ambiental, 8(2), 141-150. https://doi: 10.22490/21456453.2040
14. Ren, J., Cao, J., Zhao, X., Yang, F., & Wei, X. (2019). Recent advances in syngas production from biomass catalytic gasification: A critical review on reactors, catalysts, catalytic mechanisms and mathematical models. Renewable And Sustainable Energy Reviews, 116, 109426. https://doi: 10.1016/j.rser.2019.109426
15. Arpia, A., Chen, W., Lam, S., Rousset, P., & de Luna, M. (2021). Sustainable biofuel and bioenergy production from biomass waste residues using microwave-assisted heating: A comprehensive review. *Chemical Engineering Journal*, *403*, 126233. https://doi: 10.1016/j.cej.2020.126233
16. Mahro, B., & Timm, M. (2007). Potential of Biowaste from the Food Industry as a Biomass Resource. *Engineering In Life Sciences*, *7*(5), 457-468. https://doi: 10.1002/elsc.200620206
17. Muscat, A., de Olde, E., de Boer, I., & Ripoll-Bosch, R. (2020). The battle for biomass: A systematic review of food-feed-fuel competition. *Global Food Security*, *25*, 100330. https:// doi: 10.1016/j.gfs.2019.100330
18. Li, H., Liang, Y., Li, P., & He, C. (2020). Conversion of biomass lignin to high-value polyurethane: A review. *Journal Of Bioresources And Bioproducts*, *5*(3), 163-179. https:// doi: 10.1016/j.jobab.2020.07.002
19. Cerda, A., Artola, A., Barrena, R., Font, X., Gea, T., & Sánchez, A. (2019). Innovative Production of Bioproducts From Organic Waste Through Solid-State Fermentation. *Frontiers In Sustainable Food Systems*, *3*. https://doi: 10.3389/fsufs.2019.00063
20. Eskicioglu, C., Monlau, F., Barakat, A., Ferrer, I., Kaparaju, P., Trably, E., & Carrère, H. (2017). Assessment of hydrothermal pretreatment of various lignocellulosic biomass with CO 2 catalyst for enhanced methane and hydrogen production. *Water Research*, *120*, 32-42. https://doi: 10.1016/j.watres.2017.04.068
21. Rahmati, S., Doherty, W., Dubal, D., Atanda, L., Moghaddam, L., & Sonar, P. et al. (2020). Pretreatment and fermentation of lignocellulosic biomass: reaction mechanisms and process engineering. *Reaction Chemistry & Engineering*, *5*(11), 2017-2047. https://doi: 10.1039/d0re00241k
22. Ju, J., Wang, D., Heo, S., Kim, M., Seo, J., & Kim, Y. et al. (2020). Enhancement of 1,3-propanediol production from industrial by-product by *Lactobacillus reuteri* CH53. *Microbial Cell Factories*, *19*(1). https://doi: 10.1186/s12934-019-1275-x
23. Sadhukhan, S., Villa, R., & Sarkar, U. (2016). Microbial production of succinic acid using crude and purified glycerol from a *Crotalaria juncea* based biorefinery. *Biotechnology Reports*, *10*, 84-93. https://doi: 10.1016/j.btre.2016.03.008
24. Li, P., Anumanthan, A., Gao, X., Ilangovan, K., Suzara, V., Düzgüneş, N., & Renugopalakrishnan, V. (2007). Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, *142*(2), 105-124. https://doi: 10.1007/s12010-007-0003-x
25. Diethard, M., Gasser, B., Egermeier, M., Marx, H., & Sauer, M. (2016). Industrial Microorganisms:*Saccharomyces cerevisiae* and other Yeasts. *Industrial Biotechnology*, 673-686. https://doi: 10.1002/9783527807796.ch18
26. Pandey, S., Singh, N., Yadav, T., Bansal, A., Thanki, A., Yadav, M., & Nayak, J. (2020). Metabolic Products of Mixed Culture Fermentation. *Engineering Of Microbial Biosynthetic Pathways*, 75-92. https://doi: 10.1007/978-981-15-2604-6\_5
27. Simmons, C., Reddy, A., D’haeseleer, P., Khudyakov, J., Billis, K., & Pati, A. et al. (2014). Metatranscriptomic analysis of lignocellulolytic microbial communities involved in high-solids decomposition of rice straw. *Biotechnology For Biofuels*, *7*(1). https://doi: 10.1186/s13068-014-0180-0
28. Jia, Y., Ng, S., Lu, H., Cai, M., & Lee, P. (2018). Genome-centric metatranscriptomes and ecological roles of the active microbial populations during cellulosic biomass anaerobic digestion. *Biotechnology For Biofuels*, *11*(1). https://doi: 10.1186/s13068-018-1121-0
29. Alcalde M, Ferrer M, Plou FJ, Ballesteros A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. Trends Biotechnol. 2006 Jun;24(6):281-7. https://doi: 10.1016/j.tibtech.2006.04.002.
30. Green BD, Keller M. Capturing the uncultivated majority. Curr Opin Biotechnol. 2006 Jun;17(3):236-40. https://doi: 10.1016/j.copbio.2006.05.004.
31. Tyson GW, Banfield JF. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. Trends Microbiol. 2005 Sep;13(9):411-5. https://doi: 10.1016/j.tim.2005.07.003.