

## Replicabilidad de poblaciones bacterianas dominantes en reactores de barros activados a escala de laboratorio suplementados con detergentes no iónicos

Lozada, M.<sup>(i)</sup>; Figuerola, E.<sup>(i)</sup>; Erijman, L.<sup>(i)</sup>; Luppi, L. I.<sup>(ii)</sup>; Itria, R. F.<sup>(ii)</sup>

<sup>(i)</sup>Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET)

<sup>(ii)</sup>INTI-Ingeniería Ambiental

### Introducción

El primer paso hacia el logro de la estabilidad de ambientes manejados con ingeniería es el entendimiento del nexo entre la diversidad bacteriana y la estabilidad funcional. Las técnicas de análisis de estructura de comunidades bacterianas independientes de cultivos han revelado comunidades extremadamente complejas en bio-reactores de tratamiento de efluentes líquidos<sup>[1]</sup>.

En un trabajo anterior evaluamos cambios significativos en la composición de reactores de barros activados a escala de laboratorio donde se observó replicabilidad en la estructura de las comunidades a nivel general de grupos mediante sondas específicas de oligonucleótidos de la subunidad pequeña de ARN ribosomal<sup>[2]</sup>.

En el presente estudio fue monitoreado el mismo sistema evaluando la variabilidad de comunidades bacterianas mediante el uso de electroforesis en geles de gradientes desnaturizantes (DGGE), análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA), secuenciación parcial de clones de subunidad pequeña de ARNr, hibridación de sondas de oligonucleótidos y PCR en tiempo real

### Objetivo

Comparar la replicabilidad de la estructura de comunidades bacterianas en suspensión sujetas a perturbaciones controladas.

### Metodología / Descripción experimental

Se utilizaron biorreactores<sup>[2]</sup>, consistentes en cuatro unidades alimentadas en forma semicontinua<sup>[3]</sup>. Dos fueron suplementados con 0,1 % de detergente no iónico nonil fenol etoxilado con 10 moles de óxido de etileno en promedio (NPEO<sub>10</sub>).

Se extrajo ADN genómico de la biomasa de los biorreactores y se amplificó por PCR la región

correspondiente a la casi totalidad del gen de ARN ribosomal 16S. Los productos fueron insertados en plásmidos y clonados en células competentes de *E. coli* DH10B.

Para el análisis de DGGE se amplificaron los genes de la subunidad pequeña del ARNr 16S mediante PCR anidada, utilizando como molde para esta segunda ronda de PCR el producto de amplificación mencionado más arriba. Los geles de poliacrilamida se hicieron con un gradiente desnaturizante de 30 % a 70 % y teñidos con SYBR green I. Los datos se analizaron utilizando el algoritmo de pares no ponderados usando medias aritméticas (UPGMA) con el que se llevó a cabo un análisis de agrupamientos jerárquicos presentados en forma de dendrograma.

Las bandas de interés fueron recortadas de los geles y el ADN amplificado por PCR y secuenciado.

Con el programa BLAST se realizaron búsquedas en la base de datos GeneBank. Las secuencias de ADNr 16S rDNA de los clones de la genoteca y de DGGE fueron alineados utilizando el software ClustalW, versión 1.7 con secuencias obtenidas de la base de datos. Se construyeron los árboles filogenéticos con los métodos *maximum likelihood*, *neighbour joining* y máxima parsimonia (PHYLIP package, versión 3.5) y visualizados con el software Tree View, v.1.6.6.

Con el software package ARB se diseñaron sondas específicas denominadas **UGP** (*Uncultured Gamma Proteobacteria*) y **AcG4-1282** (*Acidobacteria*), para los clones dominantes en la genoteca y la banda dominante de DGGE.

Se desarrollaron dos ensayos separados de *real-time PCR* para cuantificar bacterias totales y abundancia de miembros UGP. Se construyeron

curvas de calibración luego de la amplificación por *real-time PCR* con 5 concentraciones de ADN diferentes por triplicado. Se obtuvieron valores de  $r^2 > 0,989$  para ambos ensayos. El número relativo de moléculas de ADN del *blanco* se determinó dividiendo el número de copias de ARNr- UGP por el número total de moléculas de ARNr bacteriano.

## Resultados

El análisis de ARDRA sobre las comunidades bacterianas mostró que todos los clones analizados en las genotecas de reactores control comprendieron unidades taxonómicas operacionales (OTU's) observadas sólo una o dos veces en cada muestra. En contraste, los clones de reactores tratados con NPEO se caracterizaron por una proporción significativa de un OTU único dominante (SCAS1), con una frecuencia del 27 % y dos OTU's dominantes (SCAS3), con frecuencias del 18 % y 10%.

Se seleccionaron clones representativos de los tipos dominantes en el ARDRA de las genotecas de ADN para análisis de secuencia. Los clones S1A3, S3A1 y S3D1, pertenecientes reactores con NPEO exhibieron una similitud de secuencia >99 % y se observó su relación filogenética con clones ambientales aún no cultivados pertenecientes a la división *Proteobacteria*. Las secuencias relacionadas a los clones dominantes de los reactores suplementados que se utilizaron para el diseño de sondas, (empleadas en ensayos de *real-time PCR*) confirmaron el carácter dominante de este filotipo. El análisis de DGGE se utilizó para trazar el perfil de la comunidad bacteriana por un período de un año (ver Fig. 1).

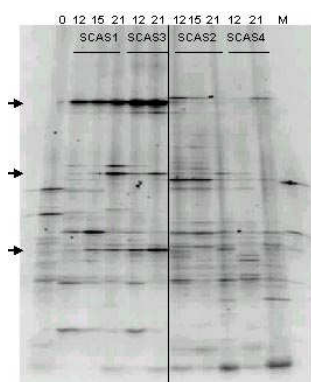


Fig. 1: DGGE de reactores suplementados c/NPEO 10 (SCAS 1 y 3) y control (SCAS 2 y 4) Los números en la parte superior indican el tiempo en meses. M: marcador.

Los reactores suplementados y los controles evolucionaron en grupos separados. Análisis de similitud de pares para cuantificar las coincidencias entre "fingerprints" de reactores réplica indicaron que los cambios más grandes en

el fingerprint de la comunidad ocurrieron en ambos tipos de reactores. Similitudes entre las réplicas suplementadas con NPEO fueron relativamente altas (0,60 a 0,69) en comparación con los controles (0,28 a 0,40)

Otro grupo bacteriano abundante en ambos reactores suplementados está relacionado con bacterias aún no cultivadas de la nueva división *Acidobacteria*. Con la sonda específica diseñada se confirmó su abundancia por hibridación en membranas (ver Fig. 2).

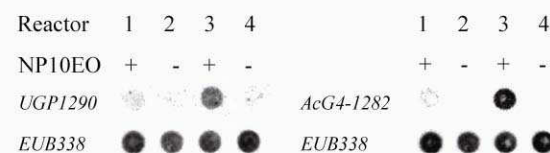


Fig. 2: Dot blot: se hibridó el ARN total extraído de cada reactor con las sondas diseñadas UGP1290 (a partir de clon no cultivable perteneciente al grupo gamma) y AcG4-1282 (*Acidobacteria*). EUB338: sonda universal para el dominio *Bacteria*.

Esto también se observó mediante FISH (hibridación *in situ* fluorescente) (ver Fig. 3).

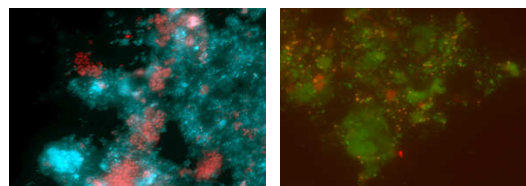


Fig. 3: Hibridación fluorescente *in situ* "FISH". La figura de la izquierda corresponde a *Betaproteobacteria* y la de la derecha a *Acidobacteria*.

## Conclusiones

Bajo un régimen de alimentación selectiva existen poblaciones distintivas que se replican dentro de complejas comunidades en sistemas aeróbicos de biomasa suspendida. La factibilidad del análisis de poblaciones aún no cultivadas permitiría la realización de estudios detallados de organismos altamente especializados de interés biotecnológico.

## Referencias

- [1] A. M. Wagner & E. T. Cloete, "16S rRNA sequence analysis of bacteria present in foaming activated sludge." *Systematic & Applied Microbiology* 25(3): 434-439, 2002.
- [2] M. Lozada, R. F. Itria, et al., "Bacterial community shifts in nonylphenol polyethoxylates-enriched activated sludge." *Water Research* 38(8): 2077-2086, 2004.
- [3] ISO, "ISO 9887 - Water quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium - Semi-continuous activated sludge method (SCAS)." International Organization for Standardization. Switzerland, 1992.

Para mayor información contactarse con:  
Lic Raúl Fabio Itria - [rfitria@inti.gov.ar](mailto:rfitria@inti.gov.ar)