



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“ECOLOGÍA DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN
BARROS ACTIVADOS QUE DEGRADAN NONILFENOL
POLIETOXILADO”**

**Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el Área de Ciencias Biológicas**

Lic. Mariana Lozada

Director: Dr. Leonardo Erijman

**Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología
Molecular INGEBI-CONICET**

Buenos Aires, 2005.

Página de los Jurados

**“ECOLOGÍA DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN
BARROS ACTIVADOS QUE DEGRADAN NONILFENOL
POLIETOXILADO”**

“ECOLOGÍA DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN BARROS ACTIVADOS QUE DEGRADAN NONILFENOL POLIETOXILADO”

Resumen

El nonilfenol polietoxilado (NPEO₁₀) es un detergente no iónico muy utilizado en procesos industriales. Sus productos de degradación primaria son tóxicos y estrogénicos, y se encuentran tanto en el barro activado de las plantas de tratamiento como en los efluentes tratados, liberándose al medio ambiente con los consecuentes riesgos para la vida acuática y el ecosistema. En este trabajo se estudiaron las características microbiológicas y ecológicas de las comunidades bacterianas asociadas a la biodegradación del NPEO₁₀ en barros activados, mediante la utilización de bioreactores a escala de laboratorio. Se construyeron 4 reactores réplica alimentados con efluente sintético, 2 de los cuales fueron adicionados con NPEO₁₀. Los reactores fueron operados de forma estable durante un período de más de 21 meses. Por métodos moleculares independientes de cultivo (amplificación de genes ribosomales, electroforesis en geles de gradiente desnaturante, clonado de secuencias específicas, hibridación en membrana e hibridación *in situ* fluorescente) se estudiaron las comunidades bacterianas de los reactores. Mientras que los controles resultaron altamente variables y dinámicos en sus comunidades bacterianas, las comunidades de los reactores alimentados con NPEO₁₀ resultaron más reproducibles. La presencia del detergente seleccionó microorganismos dominantes, persistentes y distintivos. Estas poblaciones presentaron indicios de estrategias de especialización típicas de especies de sucesión avanzada. Los microorganismos seleccionados por la presencia del NPEO₁₀ en estas comunidades fueron caracterizados filogenéticamente y cuantificados *in situ*. Resultaron pertenecer a los phyla *Acidobacteria* y *Proteobacteria* (clases *Alfa*, *Beta* y *Gammaproteobacteria*), sin similitud alguna con los microorganismos aislados hasta el momento en cultivo tradicional con NPEO₁₀ como única fuente de carbono. En los sistemas de barros activados estudiados, estas poblaciones constituyeron más de un 50% de las células totales de las comunidades de los 2 reactores réplica alimentados con NPEO₁₀, con

mínimas diferencias en sus abundancias relativas, lo cual confirma la hipótesis de que poseen ventajas adaptativas específicas bajo la presión de selección que constituye el NPEO₁₀ en el medio de alimentación, y las posiciona como candidatas para futuros estudios que apunten a identificar los responsables de la biodegradación de este detergente en barros activados.

Palabras claves

Nonilfenol polietoxilado – barros activados - comunidades bacterianas – biodegradación - técnicas independientes del cultivo - sucesión

“ECOLOGY OF BACTERIAL COMMUNITIES IN NONYL PHENOL POLYETHOXYLATE DEGRADING ACTIVATED SLUDGE”

Abstract

Nonylphenol polyethoxylate (NPEO₁₀) is a nonionic surfactant widely used in industrial processes. Its biodegradation occurs mainly in wastewater treatment plants. Its primary degradation products have toxic and estrogenic properties, are found in activated sludge and treated effluents, and are liberated into the environment with the associated risks to aquatic life and the ecosystem. In this work we have studied microbiological and ecological aspects of bacterial communities associated to NPEO₁₀ degradation in activated sludge. We have used laboratory scale reactors, operated in a semi-continuous mode. Four replicate reactors were built, 2 of them receiving NPEO₁₀ additionally in their feeding medium. The reactors were stably operated for a period of more than 21 months. We have used molecular culture independent methods including ribosomal genes amplification, denaturing gradient gel electrophoresis, cloning of specific sequences, ribosomal RNA membrane hybridization and fluorescent *in situ* hybridization, to study the structuring process of the bacterial communities under different feeding regimes in these reactors. A succession process driven by NPEO₁₀ presence in the feeding medium was found in these communities. This process tended to select distinct, dominant and persistent bacterial populations, highly replicated in both NPEO₁₀ amended reactors. Control reactors were highly variable and did not show a clear temporal pattern in their bacterial community structure. These populations showed characteristics which are associated to specialization strategies typical of late succession stages in the ecosystem. The microorganisms selected by long term NPEO₁₀ exposure were identified and quantified *in situ*. They were found to belong to various phylogenetic groups, and showed no relation with organisms previously found in culture dependent approaches with NPEO₁₀ as a sole carbon source. In both NPEO₁₀ amended reactors, these populations accounted for more than 50% of all cells, showing minimal differences in their relative abundances in both replicates. This finding confirms the hypothesis that these populations

are specifically adapted to the environment developed under the selective pressure imposed by NPEO₁₀ in the feeding medium, and places them as candidates for future studies aiming to identify the microorganisms responsible of NPEO₁₀ degradation in activated sludge.

Trabajos a los que contribuyeron los resultados presentados en esta tesis:

Lozada, M., R. F. Itria, E. L. M. Figuerola, P. A. Babay, R. T. Gettar, L. A. de Tullio, and L. Erijman. 2004. Bacterial community shifts in nonylphenol polyethoxylates-enriched activated sludge. *Water Research* **38**:2077-2086.

Lozada, M., R. F. Itria, E. L. M. Figuerola, and L. Erijman. 2005. Replicability of dominant bacterial populations after long-term surfactant enrichment in lab-scale activated sludge. *Environmental Microbiology*, doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00939.x.

Lozada, M., and L. Erijman. 2006. Succession of bacterial communities driven by nonionic surfactant in activated sludge. *Microbial Ecology*, **enviado**.

Agradecimientos

A Gregorio, por compartir conmigo la vida y apoyarme siempre, con su alegría incansable (divertido, sino no es ciencia!!!).

A mi madre por enseñarme a que no importa lo que haga, lo importante es disfrutarlo.

A mi padre por inculcarme desde chica el asombro y la curiosidad por la naturaleza, gracias a que me transmitió esto hoy soy bióloga.

A mi hermano por estar en los momentos difíciles.

A Raúl Itria, porque sin su colaboración en la operación y análisis químicos de los reactores esta tesis no se hubiera llevado a cabo. Por las ricas discusiones de donde salieron varias ideas, y por la amistad generada.

A mis compañeros de laboratorio, a Gaby por compartir cursos y hasta una historia de amor en ellos! a Diego, por ser siempre tan alegre y ayudarme con las figuras, a Eva por los experimentos de real time y sus consejos químicos, a Laura, Tamara y Nadia por los momentos compartidos. A Laura Cabanas por las cervezas compartidas *afterhour*. A Maxi por sus consejos prácticos y la ayuda con las figuras. A todos los otros compañeros del laboratorio y el INGEBI, a los que me despejaron dudas, prestaron y hasta regalaron cosas!

Al Dr. Leonardo Erijman, por su compromiso con la dirección de esta tesis.

Al Dr. Torres y al INGEBI, por darme el espacio para la realización de esta tesis. A la Dra. Mirta Flawiá por sus consejos con la presentación a becas, sus cartas de recomendación y su interés en general. Al Dr. Pablo Penchaszadeh, por su apoyo constante en lo académico y lo personal.

A Cristina Pavetto por sus consejos académicos. A Guillermo Alonso por leer desinteresadamente versiones preliminares de esta tesis y darme su opinión.

A Sergio Valente por la valiente secuenciación de muchas muestras .

A Paola Babay por los experimentos de electroforesis capilar.

En general a todas las personas que me ayudaron y apoyaron durante estos años.

Índice general

Resumen.....	3
Abstract.....	5
Introducción.....	1
1 La biodegradación del detergente nonilfenol polietoxilado	1
1.1 Los alquilfenol polietoxilados y su utilización.....	1
1.2 Estructura molecular del nonilfenol polietoxilado	1
1.3 Ocurrencia en el ambiente del detergente nonilfenol polietoxilado y sus productos de degradación.....	2
1.4 Problemas ambientales asociados la utilización del nonilfenol polietoxilado	4
1.5 Mecanismo de degradación del nonilfenol polietoxilado	6
2 Degradación de contaminantes orgánicos en efluentes líquidos por sistemas bacterianos	7
2.1 Sistemas de barros activados	9
2.2 Las comunidades microbianas de los sistemas de barros activados.....	11

3 Modelos de estudio de procesos microbianos a escala de laboratorio.....	14
4 Ecología de comunidades microbianas	16
4.1 Parámetros ecológicos de una comunidad.....	16
4.2 Procesos temporales en una comunidad	17
4.3 Los microorganismos no cultivados en los ecosistemas naturales...20	
5 Estudio de comunidades microbianas mediante técnicas independientes del cultivo de microorganismos.....	22
5.1 Identificación filogenética de microorganismos por métodos moleculares	22
5.1.1 El ARN ribosomal.....	22
5.1.2 Filogenia basada en el gen para la subunidad pequeña del ARN ribosomal 16S.....	26
5.2 La reacción en cadena de la polimerasa aplicada al estudio de comunidades microbianas.....	28
5.3 El ciclo del ARN ribosomal completo	31
Materiales y métodos.....	34
6 Soluciones generales.....	34
7 Medios de cultivo	36

8	Cepas de bacterias	37
9	Vectores	38
10	Oligonucleótidos utilizados	39
11	Diseño experimental	42
11.1	Construcción de los reactores a escala de laboratorio	42
11.2	Diseño de réplicas	44
12	Análisis químicos	44
12.1	Demanda química y bioquímica de oxígeno (DQO y DBO)	44
12.1.1	Demanda química de oxígeno	44
12.1.2	Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)	45
12.2	Medición de sólidos suspendidos totales	45
12.3	Medición de sólidos suspendidos volátiles	46
12.4	Cálculo del tiempo de residencia de sólidos	46
12.5	Ensayos de biodegradabilidad	46
12.6	Electroforesis capilar	47
13	Cultivo de microorganismos	47
14	Análisis moleculares	49

14.1	Extracciones de ácidos nucleicos	49
14.1.1	Extracción de ADN genómico.....	49
14.1.2	Minipreparación de ADN plasmídico	50
14.1.3	Extracción de ARN.....	50
14.2	Transcripción reversa.....	51
14.3	Reacción en cadena de la polimerasa.....	51
14.3.1	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	54
14.4	Electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (DGGE) 54	
14.4.1	Principio	54
14.4.2	Electroforesis.....	56
14.4.3	Recorte y reamplificación de bandas del DGGE	56
14.5	Clonado	57
14.5.1	Ligación de fragmentos a clonar	57
14.5.2	Preparación de células termocompetentes	57
14.5.3	Transformación de Escherichia coli DH10B.....	58
14.6	Secuenciación.....	58
14.7	Hibridaciones de ácidos nucleicos	58
14.7.1	Marcación de sondas con fósforo radioactivo.....	58

14.7.2 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	59
14.7.2.1 Fijación de células	59
14.7.2.2 Preparación de portaobjetos.....	59
14.7.2.3 Hibridación <i>in situ</i>	59
14.7.2.4 Tinción con DAPI.....	60
14.7.3 Hibridación en membrana con sondas radioactivas	60
14.7.3.1 Transferencia de ARN a membrana para dot blot	60
14.7.3.2 Transferencia a membrana a partir de DGGE	61
14.7.3.3 Hibridación en membrana	61
14.7.3.4 Estimación del porcentaje de ARNr 16S de cada grupo con respecto al ARNr 16S total	62
15 Analisis de datos	62
15.1 Analisis filogenéticos.....	62
15.2 Diseño de sondas de oligonucleótidos.....	63
15.3 Análisis de similitud entre perfiles de DGGE	63
15.3.1 Cálculo de índices de similitud	63
15.3.2 Análisis de ordenamiento multidimensional	64
15.3.3 Análisis de agrupamiento con <i>bootstrap</i>	64
15.4 Cálculo de índices de diversidad.....	65

15.5	Análisis estadísticos.....	65
15.5.1	Análisis estadístico de las medias de los índices de similitud.....	65
15.5.2	Análisis estadístico de los índices de diversidad	66
15.5.3	Análisis estadístico de conteos de células al microscopio.....	66
	Resultados.....	67
16	Degradación del nonilfenol polietoxilado en los reactores	67
16.1	Operación de los reactores	67
16.2	Degradación de materia orgánica oxidable en los reactores	68
16.3	Aclimatación de los barros de los reactores al NPEO ₁₀	71
16.4	Cinética de degradación del NPEO ₁₀	71
17	Análisis comparativos de las comunidades bacterianas los reactores	73
17.1	Perfiles de las comunidades bacterianas obtenidos mediante electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (DGGE)	74
17.2	Análisis de similitud entre perfiles de DGGE	76
17.2.1	Análisis de ordenamiento multidimensional	77
17.2.2	Análisis de agrupamiento.....	78
17.2.3	Análisis estadístico de índices de similitud	79

17.3 Comparación entre las comunidades bacterianas de los reactores y las seleccionadas en cultivo	80
17.4 Análisis comparativo de la diversidad de las comunidades bacterianas.....	84
18 Identificación y cuantificación de poblaciones dominantes en los reactores alimentados con NPEO₁₀	85
18.1 Composición de las comunidades bacterianas de los reactores.	85
18.2 Identificación y cuantificación de las poblaciones distintivas de la alimentación con NPEO₁₀.....	87
18.2.1 Identificación y cuantificación del filotipo A	92
18.2.2 Identificación y cuantificación del filotipo B.....	96
18.2.3 Identificación y cuantificación del filotipo C	101
18.2.4 Identificación y cuantificación del filotipo D	105
18.2.5 Proporción de células pertenecientes a las poblaciones distintivas de la alimentación con NPEO ₁₀	112
18.3 Cultivabilidad de los filotipos distintivos de la alimentación con NPEO₁₀.....	113

Discusión.....	115
Conclusiones.....	125
Referencias.....	127

Índice de Tablas y Figuras

Tablas

Tabla 1. Cultivabilidad de bacterias para distintos ambientes.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados.

Tabla 3. Condiciones de hibridación para las sondas utilizadas.

Tabla 4. A- Características y B- condiciones de las PCR llevadas a cabo en este trabajo.

Tabla 5. Parámetros operativos de los reactores.

Tabla 6. Parámetros de la cinética de degradación de materia orgánica en los reactores.

Figuras

Figura 1. Estructura molecular del detergente nonilfenol polietoxilado.

Figura 2. Algunos productos de degradación del nonilfenol polietoxilado.

Figura 3. Efectos de metabolitos derivados de alquilfenol polietoxilados en el crecimiento de células de cáncer de mama ZR-75, comparados con el 17β -estradiol.

Figura 4. Mecanismo de degradación propuesto para el nonilfenol polietoxilado en *Pseudomonas putida*.

Figura 5. Sistema de barros activados para el tratamiento de efluentes.

Figura 6. Estructura de un *floc* en un sistema de barros activados y microorganismos observados comúnmente en los *flocs*.

Figura 7. Estructura del operón ribosomal en bacterias.

Figura 8. Estructura del ribosoma 70S de *Escherichia coli*.

Figura 9. Estructura secundaria de la subunidad pequeña del ARN ribosomal 16S de *Escherichia coli*.

Figura 10. Árbol filogenético universal basado en secuencias de ARN ribosomal 16S.

Figura 11. Diagrama del ciclo del ARN ribosomal completo.

Figura 12. Sistema semicontinuo de barros activados.

Figura 13. Diseño experimental.

Figura 14. Esquema de la separación de moléculas de ADN por electroforesis en geles de gradiente desnaturizante.

Figura 15. Cinética de degradación de la materia orgánica en los reactores.

Figura 16. Distribución de los productos de degradación del NPEO₁₀ a lo largo del tiempo en los reactores.

Figura 17. Degradación del NPEO₁₀ por barros activados de los reactores.

Figura 18. Cinética de degradación del NPEO₁₀.

Figura 19. Microfotografías de contraste de fase de los barros activados de los reactores.

Figura 20. Amplificación de tipo anidado de fragmentos del gen ADN_r 16S para realizar DGGE.

Figura 21. Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) de fragmentos del gen ADN_r 16S amplificados a partir de los reactores a 12 y 21 meses de operación.

Figura 22. Ordenamiento multidimensional (MDS) a partir de los índices de similitud entre perfiles de DGGE de las comunidades bacterianas de los reactores.

Figura 23. Análisis de agrupamiento a partir de perfiles DGGE de las comunidades bacterianas de los reactores.

Figura 24. Análisis estadístico de medias de los índices de similitud entre las comunidades bacterianas de los reactores.

Figura 25. Estimación del porcentaje de ARN ribosomal de grupos generales dentro del dominio *Bacteria* en los reactores y sus correspondientes cultivos en medio LB.

Figura 26. Ordenamiento multidimensional de las comunidades bacterianas de los reactores alimentados con NPEO₁₀ y de sus cultivos en diferentes medios.

Figura 27. Índices de diversidad de comunidades bacterianas de los reactores durante el tiempo de operación.

Figura 28. Número de bandas y valores de dominancia de comunidades bacterianas de los reactores a lo largo del tiempo de operación.

Figura 29. Porcentaje del ARN ribosomal total de grupos generales dentro del dominio *Bacteria* en las comunidades de los reactores.

Figura 30. Porcentaje de células estimado para grupos generales dentro del dominio *Bacteria* en barros activados de los reactores.

Figura 31. Esquema de la estrategia utilizada para la identificación y cuantificación *in situ* de las poblaciones bacterianas distintivas del tratamiento con NPEO₁₀

Figura 32. DGGE de amplificadas de las regiones V3 y V6-V8 del gen ADNr 16S, a partir de ADN genómico ó ADN copia de los reactores.

Figura 33. Permanencia en el tiempo de bandas dominantes en DGGE de amplificadas de la región V3 del gen ADNr 16S.

Figura 34. Lista de filotipos conteniendo la secuencia del cebador *S*-*-*AcG3-1282-a-A-18*.

Figura 35. Amplificación y clonado con cebadores *3If* y *S*-*-*AcG3-1282-a-A-18*.

Figura 36. Dendrograma mostrando la posición filogenética del filotipo A, y secuencias relacionadas en el *phylum Acidobacteria*.

Figura 37. Microfotografías de hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*) con la sonda *S*-*-*OTU45-0720-a-A-20*.

Figura 38. Porcentaje de células que hibridan con la sonda *S*-*-*OTU45-0720-a-A-20* en los barros activados de los reactores.

Figura 39. Amplificación a partir de ADN genómico del reactor N3 con cebadores *F8* y *Bet948β*.

Figura 40. Dendrograma mostrando la posición filogenética del filotipo B y secuencias relacionadas pertenecientes a la clase *Betaproteobacteria*.

Figura 41. Lista de secuencias pertenecientes a la clase *Betaproteobacteria* que contienen la secuencia de la sonda *S*-*-*LARI-0470-a-A-18*.

Figura 42. Microfotografías de hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*) con las sondas *S*-*-*LARI-0470-a-A-18*, y *Bet42a*.

Figura 43. Porcentaje de células que hibridan con la sonda *S*-*-*LARI-0470-a-A-18*.

Figura 44. DGGE de amplificadas de las comunidades del reactor N1 y clones de las bibliotecas de ADNr 16S.

Figura 45. Dendrograma mostrando la posición filogenética del filotipo C y secuencias relacionadas en la clase *Alfaproteobacteria*.

Figura 46. Microfotografías de hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*) con las sondas *Sph492* y *Alf1b*.

Figura 47. Porcentaje de células que hibridan con la sonda *Sph492*.

Figura 48. Dendrograma mostrando la posición filogenética del filotipo D, y secuencias relacionadas en la clase *Gammaproteobacteria*.

Figura 49. Lista de secuencias que contienen la secuencia de la sonda *S*-*-*UGP-1230-a-A-18* y *S*-*-*UGP-1281-a-A-18*.

Figura 50. Análisis de secuencia de la zona de hibridación de la sonda *Gam42a* y *Bet42a* mediante clonado específico del filotipo D.

Figura 51. Cuantificación de filotipo D mediante PCR en tiempo real.

Figura 52. Porcentaje de células totales abarcado por las poblaciones dominantes cuantificadas en barros de los reactores alimentados con NPEO₁₀.

Figura 53. Modelo de equilibrio basado en la teoría de biogeografía de islas.

Introducción

1 La biodegradación del detergente nonilfenol polietoxilado

1.1 Los alquilfenol polietoxilados y su utilización

Los alquilfenol polietoxilados (APE) son un grupo de detergentes no iónicos ampliamente utilizados en una variedad de procesos industriales (Renner, 1997). La gran difusión de este tipo de compuestos radica en su efectividad, bajo costo y facilidad de síntesis y manipulación. La producción mundial ha sido estimada en alrededor de 500.000 toneladas anuales, de las cuales unas 1500 son consumidas en Argentina. De los alquilfenol polietoxilados, el nonilfenol y octilfenol polietoxilado son los más comúnmente utilizados, constituyendo el nonilfenol polietoxilado aproximadamente un 80% del mercado global (Sabik et al., 2003).

1.2 Estructura molecular del nonilfenol polietoxilado

La molécula de nonilfenol polietoxilado contiene un núcleo fenólico sustituido con una cadena hidrofóbica ramificada y una cadena hidrofílica etoxilada unida por un puente éter al oxígeno fenólico. La cadena etoxilada es de longitud variable en las preparaciones comerciales, típicamente entre 4 y 20 unidades de etilenglicol (**Figura 1**). Esta variación se refleja en la notación como NPEO_x, donde NP indica nonilfenol y el subíndice x se refiere al número promedio de unidades de etilenglicol (EO) en la molécula. La cadena lateral alquímica puede adoptar varias configuraciones estructurales diferentes una de las cuales se muestra en la **Figura 1**.

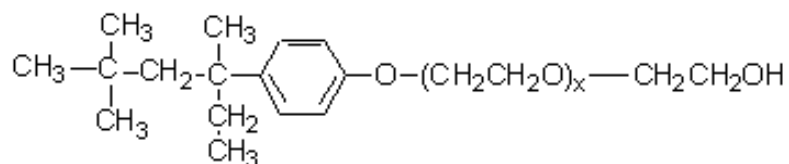


Figura 1. Estructura molecular del detergente nonilfenol polietoxilado. X corresponde al número variable de grupos etoxilados.

1.3 Ocurrencia en el ambiente del detergente nonilfenol polietoxilado y sus productos de degradación

El nonilfenol polietoxilado es descargado hacia las plantas de tratamiento industriales y municipales, donde se produce su degradación. Los productos mayoritarios de degradación de este compuesto son el nonilfenol mono y dietoxilado (NPEO₁ y NPEO₂) (**Figura 2A**), los cuales son más hidrofóbicos que el compuesto original.

Estos metabolitos son recalcitrantes a la degradación en condiciones aeróbicas, por lo cual no siempre se produce la mineralización completa del detergente durante el tratamiento aeróbico (Giger et al., 1984).

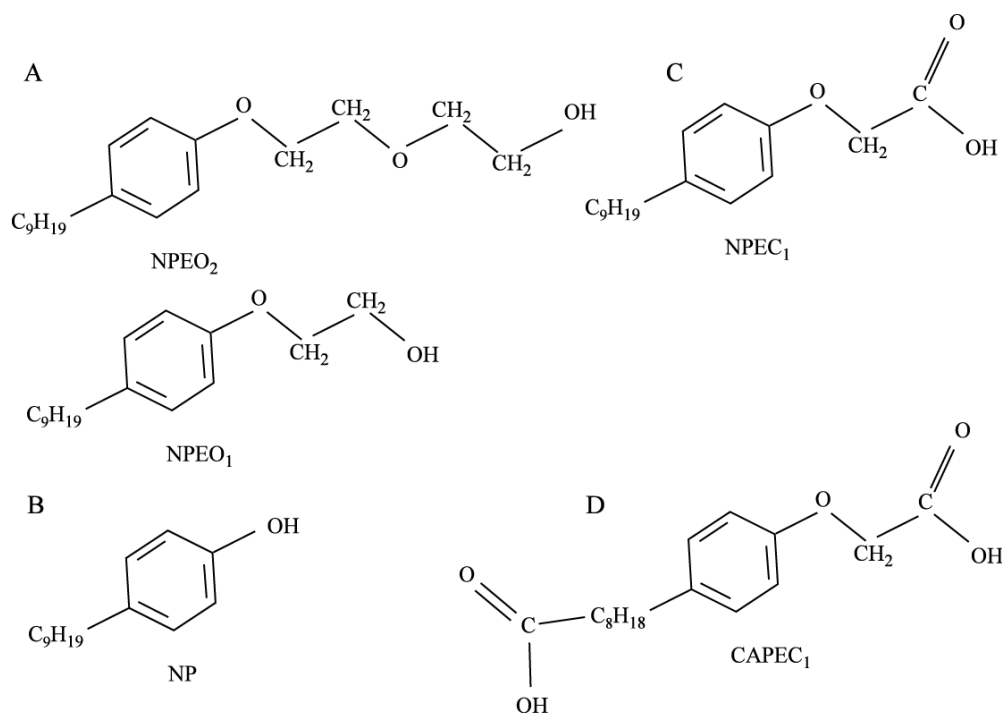


Figura 2. Algunos productos de degradación del nonilfenol polietoxilado. **A-** nonilfenolmono y dietoxilado. **B-** nonilfenol. **C-** ácido nonilfenoxi acético. **D-** ácido carboxi nonilfenoxi acético.

En condiciones anaeróbicas se produce un paso más en la degradación de los NPEO₁ y NPEO₂: éstos pierden completamente su cadena etoxilada y se produce nonilfenol (NP) (**Figura 2B**).

Los productos de degradación del NPEO se acumulan tanto en los efluentes como en los barros activados de las plantas de tratamiento, siendo la abundancia de cada metabolito particular dependiente de las condiciones de tratamiento (Ahel et al., 1994). Trabajos realizados sobre efluentes en plantas de tratamiento indican también la presencia de derivados carboxílicos productos de la degradación del NPEO tales como el ácido nonilfenoxi acético (NPEC₁) (**Figura 2C**) (Field y Reed, 1996). También se han hallados los análogos carboxílicos con ambas cadenas oxidadas (**Figura 2D**) (Di Corcia et al., 2000).

Los productos de degradación del NPEO han sido encontrados en ambientes naturales. Estos compuestos se encontraron en sedimentos (Bennett y Metcalfe, 2000), y agua de ríos

de Europa (Ahel *et al.*, 1996) y Estados Unidos (Field y Reed, 1996). Los productos de degradación del NPEO₁₀ se han encontrado en aguas subterráneas (Ahel *et al.*, 1996), en moluscos resultado de bioacumulación (Bennett y Metcalfe, 2000), y en lluvia y nieve de zonas urbanas y suburbanas (Friesa y Puttmann, 2004).

1.4 Problemas ambientales asociados la utilización del nonilfenol polietoxilado

Los compuestos resultantes de la degradación del nonilfenol polietoxilado son más perjudiciales para el medio ambiente que el detergente original. Los niveles de toxicidad del nonilfenol están en el orden de 0,13-0,3 mg/L para peces y crustáceos, similares a los de algunos metales pesados, por ejemplo el cadmio (0,35 mg/L).

Se ha demostrado que el NPEO₁, NP y el NPEC₁ tienen propiedades estrogénicas a concentraciones menores que las concentraciones tóxicas (Staples *et al.*, 2004). Estas concentraciones están en el orden de 10^{-5} moles/L (2 µg/L). Se han reportado efectos estrogénicos del NP, NPEO₂ y NPEC₁ en cultivos celulares. Estos efectos incluyen la expresión génica de vitelogenina en hepatocitos de peces, transcripción génica en células transfectadas, y estimulación de la proliferación de células de cáncer de mama (White *et al.*, 1994). En la **Figura 3** se muestran los efectos de la exposición a metabolitos derivados de alquilfenol polietoxilados en cultivos células de cáncer de mama. Tanto la hormona natural 17β estradiol como los productos de degradación de alquilfenol polietoxilados provocan un aumento en la tasa de proliferación de las células, siendo mayores los efectos en el caso del NPEC₁ y el octilfenol.

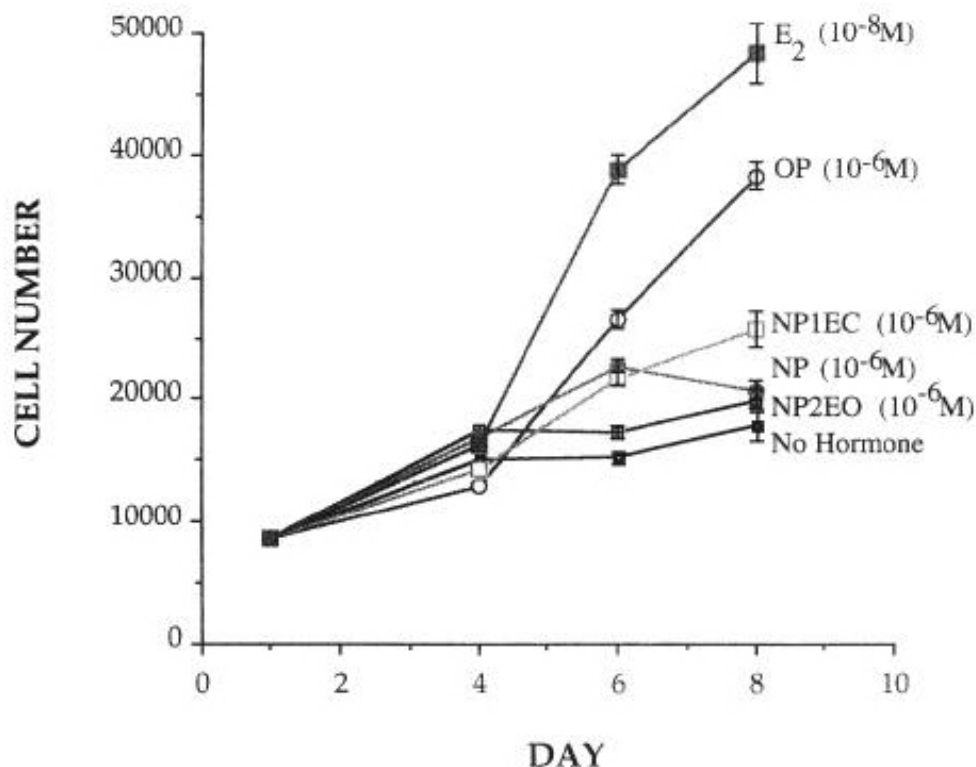


Figura 3. Efectos de metabolitos derivados de alquilfenol polietoxilados en el crecimiento de células de cáncer de mama ZR-75, comparados con el 17β-estradiol. E₂: estradiol, OP: octilfenol, NP₁EC: ácido nonilfenoxiacético, NP: nonilfenol, NP₂EO: nonilfenol dietoxilado, No hormone: control sin hormona. Referencia: White et al., 1994.

Los efectos estrogénicos de estos compuestos están mediados por los receptores de estrógeno, ya que se demostró que compiten por los receptores del 17β-estradiol (White et al., 1994).

Los efectos *in vivo* incluyen estrogenicidad en peces (Pedersen *et al.*, 1999; Tanaka y Grizzle, 2002; Van den Belt *et al.*, 2003), e inducción de malformaciones en larvas de invertebrados bentónicos (Meregalli et al., 2001).

1.5 Mecanismo de degradación del nonilfenol polietoxilado

Estudios utilizando nonilfenol polietoxilado como única fuente de carbono con un cultivo puro de *Pseudomonas putida* demostraron que la remoción sucesiva de unidades glicólicas de la cadena etoxilada (*exoescisión*) es el principal mecanismo de degradación de este compuesto (John y White, 1998). La escisión en el enlace éter ocurre mediada por una transferencia del oxígeno terminal disponible, produciendo hemiacetal. Éste es altamente inestable y se descompone liberando acetaldehído, quedando la molécula original del detergente con una unidad glicólica menos (**Figura 4**).

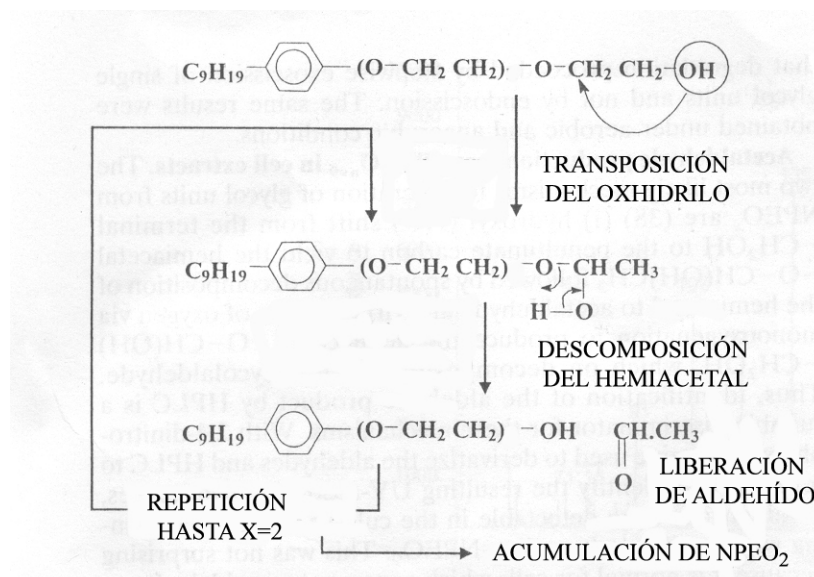


Figura 4. Mecanismo de degradación propuesto para el nonilfenol polietoxilado en *Pseudomonas putida*. Modificado de John and White, 1998 .

Este mecanismo ya ha sido observado en bacterias que degradan polietilenglicol a acetaldehído en condiciones anaeróbicas (Frings et al., 1992). Sin embargo la enzima que degrada los APEs parece ser diferente de éstas, ya que la cepa utilizada no posee capacidad de degradar polietilenglicol.

La degradación por *Pseudomonas putida* produce mayoritariamente NPEO₁ y NPEO₂. No fueron observados NP, NPEC ni derivados dicarboxilados como productos en estos

ensayos. En ensayos experimentales con agua de río se observó NPEO₂ como el principal metabolito, el cual es oxidado ulteriormente a NPEC₂ y NPEC₁ (Manzano et al., 1999).

Teniendo en cuenta la variedad de productos de degradación que han sido observados en las plantas de tratamiento y en el medio ambiente en general, los cuales no están representados por lo observado en cultivos puros, surge la hipótesis de que más de un microorganismo debe estar participando en la biodegradación del NPEO₁₀ en la naturaleza.

2 Degradación de contaminantes orgánicos en efluentes líquidos por sistemas bacterianos

Los desechos líquidos son producidos constantemente por actividades humanas tales como descargas a nivel doméstico, procesos industriales y agropecuarios. En última instancia, estos desechos llegarán a cursos de agua naturales: ríos, lagos y el océano. También pueden percolar hacia las capas freáticas. Dada la gran cantidad de usos que se les da a estos cursos de agua, es de vital importancia mantener la calidad de los efluentes líquidos que allí se descargan.

Las fuentes de contaminación de los efluentes líquidos están constituidas por nutrientes orgánicos e inorgánicos, sustancias tóxicas, y organismos tales como virus, bacterias patógenas y protozoos parásitos intestinales.

Los compuestos orgánicos en los efluentes líquidos contaminan los cursos y cuerpos de agua al producir crecimientos desmesurados de los microorganismos que de ellos se alimentan, llevando a disminuciones del oxígeno presente en el agua, y provocando la mortandad de los otros organismos asociados al ecosistema acuático. La anoxia y la materia orgánica en descomposición agravan la situación por estimular aún más la proliferación de los descomponedores, creando condiciones sépticas que favorecen el desarrollo de olores e incluso de patógenos. Si existen altos niveles de nutrientes inorgánicos en los efluentes (nitratos y fosfatos) se producen crecimientos en masa de algas, las cuales al morir también

se transforman en fuente de materia orgánica para los descomponedores. A este fenómeno se lo llama *eutroficación* (Margalef, 1983).

Los compuestos orgánicos producidos por el hombre se pueden clasificar por la manera en que afectan directamente a los seres vivos. Éstos pueden ser inocuos (no afectan a los seres vivos), tóxicos (afectan en mayor o menor medida el operación celular), mutagénicos (provocan mutaciones en el ADN), teratogénicos (provocan mutaciones que afectan las gametas) o disruptores endocrinos (afectan el sistema reproductivo provocando disminución en la fertilidad).

A pesar de que muchos de los compuestos orgánicos que se liberan en el medio ambiente son degradados por los microorganismos por ser similares a algún compuesto natural, otros son recalcitrantes a la degradación y persisten en el ambiente durante largo tiempo. Este tipo de compuestos generalmente también son perjudiciales para los seres vivos con los que entran en contacto, aumentando así el impacto producido en el ecosistema. Los compuestos recalcitrantes pueden ser productos directos de los procesos industriales pero también pueden producirse indirectamente por la degradación incompleta de compuestos originales.

La remoción de materia orgánica de los efluentes líquidos se realiza en *plantas de tratamiento de efluentes*. Éstas constituyen ecosistemas manipulados mediante ingeniería donde comunidades microbianas degradadoras, principalmente bacterianas, convierten la mayor parte de la materia orgánica presente en el afluente líquido a sustancias inorgánicas y biomasa, la cual puede ser separada del efluente líquido clarificado. Éste está en condiciones entonces de ser liberado en el ambiente acuático sin ejercer los efectos perjudiciales mencionados anteriormente.

En un principio el objetivo principal en el tratamiento de efluentes líquidos fue la remoción eficiente de la materia orgánica, pero actualmente la transformación de nutrientes inorgánicos y la remoción de moléculas recalcitrantes o tóxicas, son temas que acaparan el principal interés.

2.1 Sistemas de barros activados

El tratamiento de efluentes puede ser aeróbico o anaeróbico. Existen una variedad de configuraciones adaptadas al objetivo particular de cada situación. El *sistema de barros activados* (**Figura 5**) es el tipo de tratamiento de efluentes más utilizado.

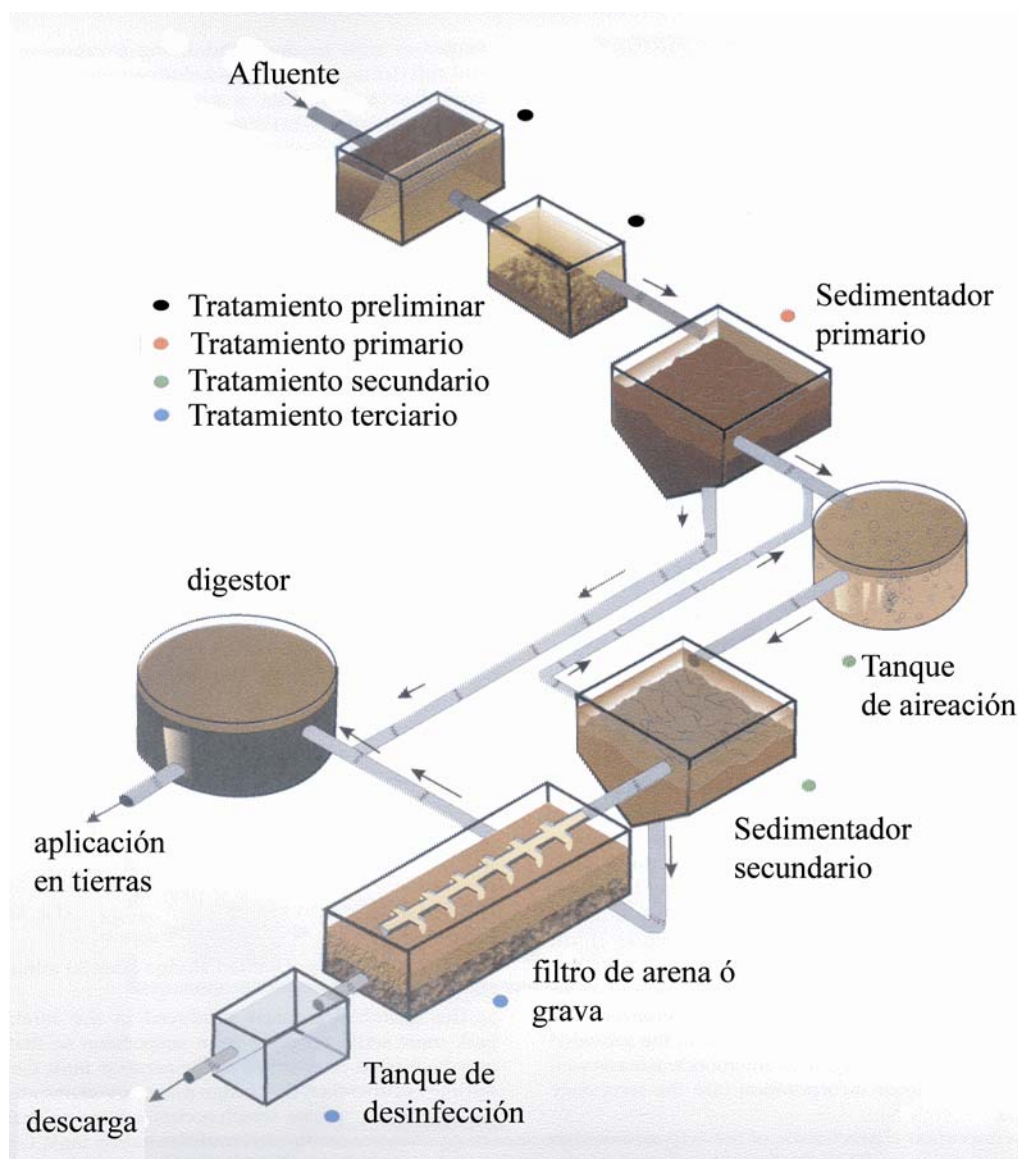


Figura 5. Sistema de barros activados para el tratamiento de efluentes. Modificado de Gerba et al., 2000.

El tratamiento de efluentes completo se puede dividir en 4 pasos: tratamiento preliminar,

primario, secundario y terciario. En el tratamiento preliminar (marcado con negro en la **Figura 5**) se separan físicamente los sólidos gruesos del efluente líquido. Esto se realiza primero mediante retención de objetos grandes tales como ramas, botellas, *etc.*, luego con la separación de arena y grava. El tratamiento primario (marcado con rojo en la **Figura 5**) implica la sedimentación de alrededor de la mitad de los sólidos suspendidos en el tanque de sedimentación primaria. Éstos son llamados *sólidos primarios*.

Durante el tratamiento secundario (marcado en verde en la **Figura 5**) ocurre la degradación biológica de la materia orgánica. En el sistema de barros activados, el tratamiento secundario consiste en una degradación aeróbica. Ésta es llevada a cabo por el barro conteniendo microorganismos, principalmente bacterias. La aireación se mantiene mediante inyección de aire u oxígeno. Luego la mezcla pasa a un tanque de sedimentación secundario, donde el barro decanta y el efluente tratado es liberado desde la superficie hacia el tratamiento terciario. El barro decantado es removido desde el fondo del tanque. La mayor parte de este barro es recirculado hacia el tanque de aireación y una parte es removida, la cual constituye el *barro secundario*. Otro tipo de tratamientos secundario constituyen los *reactores secuenciales en batch*. En este caso la aireación y la sedimentación ocurren en el mismo compartimento, y el proceso se resuelve temporalmente por medio de ciclos de llenado, aireación, sedimentación y purga. Generalmente 2 ó más compartimentos en paralelo cumplen esta función.

Una característica importante del sistema de barros activados es el reciclado de gran parte del barro. La consecuencia es la utilización de una alta proporción de microorganismos que oxidan materia orgánica en un tiempo relativamente corto. El tratamiento de barros activados debe ser controlado a nivel del barro que retorna al tanque de aireación para mantener una relación adecuada de materia orgánica a microorganismos, de manera de no exceder la capacidad de degradación del sistema.

Otros parámetros que controlan la operación de un proceso de barros activados son las tasas de descarga de materia orgánica, la disponibilidad de oxígeno, y el control del sedimentador secundario. La buena sedimentación del barro es esencial para el proceso de

separación y el reciclado hacia el tanque de aireación.

El tratamiento terciario (marcado en azul en la **Figura 5**) comprende una serie de pasos adicionales con el objetivo de reducir más la cantidad de materia orgánica, nitrógeno, fósforo, metales y patógenos. Esto se realiza mediante filtración, adsorción y desinfección. El tratamiento terciario es utilizado cuando el efluente va a ser reutilizado con fines de irrigación, de recreación o para consumo indirecto.

Los excedentes sólidos de las 3 primeras fases del tratamiento son dirigidas hacia un *digestor*, el cual puede ser aeróbico o anaeróbico. En el digestor se produce una cierta degradación de la materia orgánica de la biomasa y la reducción del contenido de agua. Este tratamiento previene la generación de olores y disminuye la cantidad de microorganismos patógenos. En el caso de utilizarse un digestor anaeróbico, la materia orgánica es degradada en una serie de procesos que llevan a la formación de metano el cual es utilizado como combustible. Los sólidos remanentes de este proceso se concentran y secan para su disposición final.

2.2 Las comunidades microbianas de los sistemas de barros activados

El barro activado presenta una estructura en *floc*, una forma agregada de microorganismos de alta densidad que permite la sedimentación. Además de los microorganismos que constituyen un 20 a 30% de la materia orgánica, los *flocs* contienen sustancias poliméricas extracelulares (EPS), fibras orgánicas, partículas orgánicas adsorbidas del líquido residual, y componentes inorgánicos (Wilén et al., 2000) (**Figura 6A**).

Los EPS forman y llenan el espacio entre las células. Son responsables de la estabilidad, la morfología, la carga neta superficial y la hidratación de la matriz tridimensional. Los componentes de los EPS pueden ser proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos (Hoa, 2002). Están cargados negativamente y se unen entre sí por medio de cationes divalentes (Jenkins et al., 2004) (**Figura 6A**).

La estabilidad del *floc* es importante en el proceso de separación de fases en el tratamiento de efluentes. Una estabilidad reducida lleva a la defloculación, aumentando la turbidez por causa de las bacterias suspendidas y por lo tanto la cantidad de materia orgánica en el efluente tratado, con la consecuente disminución en su calidad. Es por eso que se considera la estabilidad de los *flocs* como un requisito para un tratamiento eficiente de los efluentes (Wilén et al., 2000).

De los microorganismos formadores de *floc*, los organismos filamentosos contribuyen a proveer una red o esqueleto para la formación del agregado (**Figura 6B**). Estas redes dirigen el crecimiento del *floc* hacia formas irregulares y permiten un mayor tamaño de los agregados. Debido a que la resistencia del agregado depende de la integridad de las uniones de los EPS, los *flocs* pueden ser también estables sin filamentos (Jenkins et al., 2004)

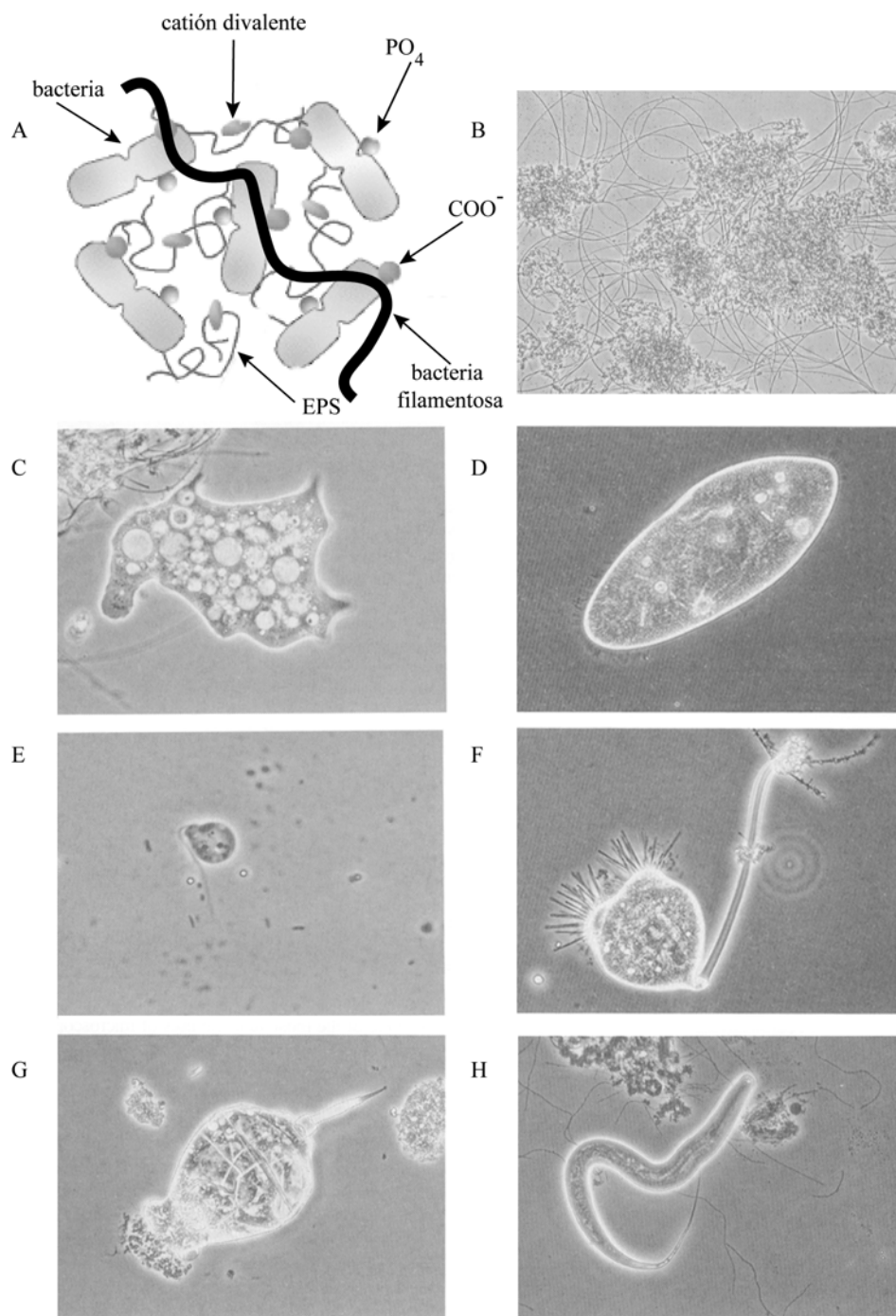


Figura 6. A- Esquema y B- microfotografía de la estructura de un *floc* en un sistema de barros activados (100X). C- ameba (*Polychaos sp.*), 400X. D- ciliado móvil (*Paramecium sp.*), 200X. E- flagelado (*Bodo sp.*), 1000X. F- ciliado sésil (*Podophyra sp.*), 200X. G- rotífero, 100X H- nematode, 200X. Referencias: Hoa, 2002; Jenkins et. al., 2004.

A pesar de que la mayor proporción del *floc* corresponde a las bacterias, y que éstas son las principales responsables de los procesos degradativos que allí ocurren, los protozoos, rotíferos y nematodos (**Figura 6C-H**) llevan a cabo funciones necesarias en el proceso de barros activados. Agregan peso a las partículas de *floc* y con ello mejoran la capacidad de sedimentación. Liberan secreciones que ayudan a la adsorción de sólidos y contribuyen al reciclado del nitrógeno y fósforo con la depredación de bacterias (y en el caso de rotíferos y nematodos, de protozoos también) (Gerardi, 2002).

3 Modelos de estudio de procesos microbianos a escala de laboratorio

Para poder estudiar procesos en los que participan comunidades microbianas complejas, sin perder la posibilidad de manipularlos experimentalmente, se utilizan los llamados *microecosistemas* (Atlas y Bart, 1998).

Los microecosistemas han sido utilizados para examinar hipótesis ecológicas a nivel microbiano. Ejemplos interesantes constituyeron las contrastaciones experimentales de dos hipótesis surgidas del área de macroecología: la “hipótesis de la perturbación intermedia” (Connell, 1978; Huston, 1994), que propone un pico máximo en la diversidad de un ecosistema a frecuencias intermedias de perturbación, y la “hipótesis de la productividad intermedia” (Abramsky y Rosenzweig, 1984; Tilman y Pacala, 1993), que predice la misma relación unimodal entre la diversidad y la productividad de un ecosistema. Ambas hipótesis pudieron ser comprobadas utilizando sistemas muy simples en donde coexistían poblaciones diferentes de *Pseudomonas fluorescens* (Buckling et al., 2000; Kassen et al., 2000).

También se utilizan los microecosistemas cuando se quiere estudiar un determinado proceso ambiental. Para esto se toman inóculos provenientes del ambiente particular en donde ocurre el proceso en cuestión, se trasladan a condiciones experimentales controladas intentando simular las condiciones del ecosistema original, y se incuban por tiempos

relativamente prolongados. De esta manera se puede lograr un enriquecimiento en las poblaciones responsables del proceso a estudiar. Este tipo de enfoque es muy utilizado para lograr el enriquecimiento en poblaciones degradadoras de compuestos orgánicos tóxicos o recalcitrantes: algunos ejemplos constituyen los enriquecimientos en bacterias degradadoras de bifenilo provenientes de sedimentos (Wagner-Dobler et al., 1998), de 2,4,6-triclorofenol (Maltseva y Oriel, 1997), o de bifenilos policlorados (Watts et al., 2001). Sin embargo, si se utiliza el compuesto en cuestión como una única fuente de carbono, el sistema puede no representar la heterogeneidad ambiental que existe en el ecosistema original.

Cuando el proceso a representar es la degradación aeróbica de un compuesto orgánico en una planta de tratamiento de efluentes líquidos, el modelo experimental debe acercarse a la dinámica de un reactor: un sistema de cultivo aeróbico con un inóculo adecuado (por ejemplo proveniente de una planta en gran escala) que periódicamente recibe flujos de materia orgánica de origen variado donde se encuentra el compuesto a estudiar. La biomasa se separa por sedimentación del barro y se elimina el efluente tratado. La gran complejidad que este tipo de sistemas trae aparejado un problema de análisis de las comunidades que allí habitan. En primera instancia, estos sistemas reciben más de una fuente de carbono. Si bien esto constituye un acercamiento a la complejidad del sistema original, también supone una fuente de variabilidad: otras poblaciones además de las que degradan el compuesto en estudio son también seleccionadas e interfieren en la identificación de las poblaciones de interés. Por otro lado, existe una restricción inherente a todo sistema complejo: la variabilidad intrínseca del proceso de estructuración de las comunidades microbianas. En barros activados a escala de laboratorio, se han observado reactores funcionalmente estables que son capaces de sostener comunidades bacterianas altamente dinámicas y variables, de manera que dos reactores operados igualmente y con comunidades provenientes de un mismo inóculo presentaban comunidades bacterianas muy diferentes entre sí (Kaewpipat y Grady, 2002).

Para tener en cuenta esta variabilidad en el diseño experimental de un ecosistema a escala de laboratorio, se puede aplicar el concepto de *réplicas independientes*. Las réplicas independientes, o verdaderas réplicas en el sentido estadístico, son sistemas análogos

sometidos a las mismas condiciones experimentales pero que no guardan ninguna relación entre sí. El sistema de réplicas confiere validez estadística a estos modelos experimentales, ya que permite separar los componentes de la variabilidad de los parámetros medidos como provenientes del tratamiento o la condición a evaluar, o por el contrario como variabilidad intrínseca de las réplicas dentro de cada tratamiento (Zar, 1999).

4 Ecología de comunidades microbianas

4.1 Parámetros ecológicos de una comunidad

La definición más simple de comunidad es un *conjunto funcional* de poblaciones de organismos vivos que se desarrollan en un hábitat. De tal forma, la comunidad no es un agrupamiento de organismos sino una unidad biológica con características propias de su nivel de organización. La comunidad es la unidad biológica más alta en la jerarquía ecológica, por lo tanto es la que presenta mayor complejidad en sus interrelaciones.

La comunidad posee una *estructura*: una suma de atributos que no residen en cada una de las especies que la componen, sino en el conjunto. Los atributos son llamados *parámetros*.

Los parámetros de una comunidad son:

La *abundancia* de sus individuos

La *composición* de especies (la identidad de cada una de las especies presentes)

La *diversidad* de especies, un concepto que tiene en cuenta tanto la *riqueza* (el número de especies presentes) como la *equitatividad* ó *dominancia* en la distribución de sus abundancias relativas.

Cuando se estudian comunidades compuestas en gran parte por microorganismos, surge el problema de la definición de especie. La búsqueda de un concepto unificado para la clasificación de los organismos ha llevado a numerosas definiciones de especies (de

Queiroz, 1999). Dado que la definición biológica de especies, que se basa en el aislamiento reproductivo de grupos genéticos cerrados en poblaciones mendelianas, es inadecuada para clasificar organismos que se reproducen asexualmente, se han buscado soluciones taxonómicas que se basan en criterios *fenéticos* o de distancia, tales como la similitud en caracteres fenotípicos, y la similitud estimada por el porcentaje de reasociación de DNA:DNA (Wayne et al., 1987) así como *filogenéticos* o de parentesco, como ser la filogenia derivada de genes que codifican para el ARN ribosomal (Olsen y Woese, 1993; Woese, 1987; Woese et al., 1990). Estos dos criterios se funden en el llamado enfoque polifásico de la clasificación taxonómica de bacterias (Vandamme et al., 1996). Este enfoque es posible de aplicar solamente a microorganismos cultivados, ya que la similitud en caracteres fenotípicos es un requisito fundamental para la clasificación.

Cuando se trabaja con organismos no disponibles en cultivo, la única información utilizable en el análisis filogenético es la de sus secuencias de ADN. Las secuencias se agrupan en filotipos o *unidades taxonómicas operativas* (OTUs, (Li, 1997)) basados en un concepto de distancia genética. Los OTUs entonces pueden ser definidos con el criterio de distancia que se elija. Cuando se utiliza el OTU como aproximación de especie se definen las secuencias que poseen una similitud de más de 97% en el gen para la subunidad 16S del ARN ribosomal como pertenecientes al mismo OTU, ya que una similitud menor implicaría que las secuencias estarían derivadas de microorganismos pertenecientes a diferentes especies (Stackebrandt y Goebel, 1994). Esto no deja de ser una *aproximación* ya que una similitud mayor a 97% no implica necesariamente que los organismos pertenezcan a la misma especie (Forney et al., 2004; Stackebrandt y Goebel, 1994).

4.2 Procesos temporales en una comunidad

Una comunidad no es una organización estática; como toda unidad biológica está sujeta a cambios temporales. Si los cambios temporales en el ecosistema no son consecuencia de eventos catastróficos, la comunidad puede evolucionar de acuerdo a un proceso de sucesión. Sin embargo en los ecosistemas ocurren periódicamente perturbaciones que afectan la estructura total de la comunidad y así el sistema vuelve a comenzar, aunque desde otro punto, con el proceso de sucesión. Incluso hay algunos ecosistemas en donde

las perturbaciones son tan importantes, o poseen tan poca diversidad, que la deriva es el factor fundamental que dirige los cambios, y las comunidades muestran patrones temporales completamente aleatorios (Margalef, 1983).

Cada población miembro de la comunidad posee un rol funcional específico llamado *nicho*. La definición de nicho es: un espacio ecológico multidimensional determinado por la combinación de cierto número de variables, tanto ambientales como funcionales, que precisa un organismo dado para sobrevivir. Cuáles son las variables que determinan en mayor medida el nicho de las especies dependerá del ecosistema y de las poblaciones en particular. En la práctica se pueden calcular los componentes de variabilidad que aportan cada una de ellas y sustituir el primer esquema definido por muchas variables por un número más pequeño de variables representativas (Margalef, 1983).

Los nichos son ocupados por las poblaciones indígenas de la comunidad, pero esto no es una situación estática, sino que está sujeta a competencia por la llegada de nuevos organismos que colonizan el área. A su vez los nichos no son siempre los mismos, ya que las poblaciones que ocupan los nichos van creando condiciones ambientales nuevas, como consecuencia de los procesos en que intervienen en el ecosistema, y la sucesión de poblaciones refleja estos cambios de condiciones más que la competencia en sí. Como consecuencia la estructura de la comunidad evoluciona también con el tiempo.

Una manera de visualizar estos cambios en el proceso de sucesión es la propuesta por Andrews (Andrews y Hall, 1986), la cual clasifica los organismos en *estrategas r* y *K* de acuerdo a estrategias evolutivas divergentes de utilización de la energía.

Las especies *estrategas r* derivan la energía mayoritariamente a la *reproducción*, por lo tanto tienden a seleccionarse en situaciones de alta disponibilidad de nutrientes y donde las altas tasas de reproducción pesan más que otras adaptaciones competitivas. Son generalistas en sus requerimientos fisiológicos, pueden calificarse de oportunistas, ya que se adaptan con facilidad a cambios ambientales bruscos. Las poblaciones de *estrategas r* están sujetas a fluctuaciones. Cuando los recursos escasean, consecuencia natural de su propia explosión demográfica, las condiciones se tornan desfavorables para ellas y las poblaciones colapsan.

Muchas veces se forman estructuras de resistencia y dispersión y cuando las perturbaciones o la colonización colocan de nuevo a estos microorganismos en condiciones favorables, se repite el ciclo. Los estrategas *K*, por el contrario, poseen menor tasa reproductiva y crecimiento más lento, porque invierten la energía en el mantenimiento. Dependen de adaptaciones fisiológicas específicas a los recursos ambientales, por ejemplo a una baja concentración de nutrientes (oligotrofia). Entre las bacterias marinas existen numerosos ejemplos de esta estrategia (Button *et al.*, 1998; Cho y Giovannoni, 2004; Simu y Hagstrom, 2004). Los estrategas *K* poseen alto grado de interrelación con otros miembros de la comunidad: por ejemplo pueden alimentarse de productos de degradación específica de otros microorganismos. Por esto es que estas estrategias prevalecen finalmente y son los miembros más estables de una comunidad en etapas tardías de sucesión, hasta que las perturbaciones ambientales vuelven a favorecer a los estrategas *r*, oportunistas por naturaleza.

Las denominaciones *r* y *K* derivan de la ecuación de crecimiento de una población (Andrews y Hall, 1986):

$$dx/dt * 1/x = r - (r/K * x)$$

Donde $dx/dt * 1/x$ es la tasa específica de incremento de la población, *r* es la tasa de reproducción por individuo, *K* es la capacidad de campo del ambiente (la densidad máxima de población que puede soportar el ecosistema en cuestión) y *x* es la densidad de población en un momento dado.

Esta ecuación describe el crecimiento de la población en distintas condiciones de limitación de nutrientes. La tasa máxima de crecimiento se da cuando la densidad de población *x* tiende a cero, ya que no hay limitación de nutrientes. Cuando *x* es alto, la tasa de crecimiento se ve limitada por la capacidad de campo del ambiente, esto es por la cantidad de recursos disponibles (*K*). Cuando *x* y *K* son iguales, esto es, cuando la densidad de población llega a la capacidad de campo, la tasa de incremento es igual a cero y la población deja de crecer: su tasa de reproducción es igual a su tasa de mortalidad.

De aquí que las especies que desarrollaron una estrategia basada en la reproducción sean exitosas cuando no hay limitación de nutrientes y cuando el número de individuos es bajo, esto es en las primeras etapas de una sucesión. Por el contrario, las especies adaptadas a la óptima utilización de recursos son exitosas cuando el ecosistema llega a su capacidad de campo, en etapas tardías, cuando los recursos escasean y gran número de individuos coexisten en un mismo hábitat.

Esta clasificación supone un orden relativo: ningún microorganismo es específicamente r ó K . Este tipo de clasificación es válida en relación a una situación y un ecosistema dados, y con respecto a otros microorganismos.

La sucesión opera sobre muy diversas escalas de tiempo. No es igual la velocidad de la sucesión en las aguas de un charco que en un bosque luego de un incendio. Esto se relaciona con la vida media de las especies de la comunidad. En días o meses ocurren en el plancton o en ecosistemas microbianos cambios que son equivalentes a los que requieren siglos para manifestarse en un ecosistema de bosque. Por esta razón utilizando las comunidades microbianas en el estudio de procesos ecológico-evolutivos, es posible contrastar las hipótesis planteadas para macroecosistemas.

4.3 Los microorganismos no cultivados en los ecosistemas naturales

En contraste con los organismos superiores, la morfología de los microorganismos es en general muy simple para servir de base para el estudio y la clasificación de éstos. Por lo tanto, hasta muy recientemente, la identificación de microorganismos requería el aislamiento de cultivos puros, para poder caracterizarlos por sus rasgos fisiológicos y bioquímicos. La cuantificación de células activas en muestras ambientales se llevaba a cabo mediante las técnicas de conteo de células viables en placas, o técnicas de número más probable. Sin embargo, un fenómeno muy conocido a partir de estas técnicas es que, para algunos ambientes, las estimaciones realizadas por conteos en microscopio exceden por muchos órdenes de magnitud a las realizadas por los métodos mencionados (**Tabla 1**).

Tabla 1. Cultivabilidad en distintos ambientes, determinada como la relación entre el número de bacterias cultivables y el número de células totales determinadas por conteo al microscopio. Modificada de Amann et al., 1995.

Hábitat	Cultivabilidad (%)
Agua de mar	0,001-0,1
Ríos	0,25
Lagos mesotróficos	0,1-1
Estuarios	0,1-3
Barros activados	1-15
Sedimentos	0,25
Suelos	0,3

Las especies cultivadas de microorganismos sólo constituyen una fracción menor de la diversidad microbiana existente. El *Approved List of Bacterial Names* (<http://www.bacterio.cict.fr/alintro.html>) (Euzéby y Tindall, 2002) contiene hasta el momento unas 7200 especies. Sin embargo, mediante estudios de reasociación de ADN-ADN se han estimado alrededor de 13.000 especies en una única muestra consistente en 1 g de suelo, utilizando una definición de genoespecies en base a más de un 70% de similitud en sus genomas (Torsvik et al., 1990).

Estos fenómenos podrían explicarse de la siguiente manera: las condiciones de cultivo no reflejan la heterogeneidad de nichos que se da en un ambiente natural, por lo tanto necesariamente restringirá a la mayoría de los microorganismos que se encontraba originalmente en una muestra dada, prevaleciendo solamente aquellos que se adapten al medio de cultivo particular. También existe la posibilidad de que algunos miembros de la comunidad estén en un estado no cultivable. Los microorganismos que habitan el intestino de los rumiantes, especializados en degradar celulosa, son distinguibles morfológicamente pero en su mayoría no cultivados (Wolin, 1979). También microorganismos de vida libre como los organismos magnetotácticos son desde hace tiempo conocidos pero sólo algunos

de ellos cultivados (DeLong et al., 1993). En los casos mencionados algún rasgo característico contribuyó a su detección, pero la inconspicua morfología de muchos microorganismos contribuye a enmascarar la diversidad existente en los ecosistemas naturales.

A partir de estos antecedentes se puede concluir que las técnicas de estudio de comunidades microbianas basadas sólo en el cultivo de microorganismos no garantizan la representatividad con respecto a la estructura original de la comunidad.

5 Estudio de comunidades microbianas mediante técnicas independientes del cultivo de microorganismos

5.1 Identificación filogenética de microorganismos por métodos moleculares

Una revolución en el estudio de la ecología microbiana la constituyó el advenimiento de las técnicas de biología molecular. Durante las últimas dos décadas los estudios ecológicos se han extendido hacia la caracterización de la estructura de comunidades microbianas tanto en ambientes naturales como manipulados por el hombre. Los estudios realizados en diferentes ambientes tales como suelos (Nogales *et al.*, 2001; O'Donnell y Gorres, 1999) sedimentos marinos (Bowman y McCuaig, 2003; Braker *et al.*, 2001) o agua de mar (Venter et al., 2004) han proporcionado una gran cantidad de información genética sobre microorganismos no cultivados hasta el momento y cuyas potencialidades son aun desconocidas.

5.1.1 El ARN ribosomal

Una de las moléculas utilizadas para caracterizar filogenéticamente los microorganismos es el gen para la subunidad pequeña del ARN ribosomal 16S (Woese et al., 1990). Las

moléculas de ARN ribosomal se encuentran en todas las formas de vida. Los ribosomas bacterianos consisten en tres moléculas de ARN ribosomal y alrededor de 50 proteínas. Están constituidos por dos subunidades: la subunidad mayor 50S y la subunidad menor 30S. La primera está formada por el ARNr 5S (aproximadamente 120 nucleótidos), el ARNr 23S (aproximadamente 2900 nucleótidos) y 30 proteínas. La subunidad menor se compone del ARNr 16S (aproximadamente 1540 nucleótidos) y 20 proteínas.

En las bacterias, el operón que codifica para el ARN ribosomal está constituido de 5' a 3' por el gen para la subunidad 16S, el espacio intergénico, el gen para la subunidad 23S, y el gen para la subunidad 5S. Uno o dos genes para el ARN de transferencia (ARNt) pueden estar ubicados en el espacio intergénico. A veces también se encuentran genes para ARNt *downstream* del 5S (Brosius et al., 1980). Un ejemplo de operón ribosomal en *Escherichia coli* se muestra en la **Figura 7**.



Figura 7. Mapa de la organización de genes del operón ribosomal *rrnB* en *Escherichia coli*. Las barras negras corresponden a los genes y las barras blancas a los espacios intergénicos. Los números bajo las barras corresponden a los largos en pares de bases de las regiones indicadas. Modificado de Brosius et. al., 1980.

La estructura general del ribosoma se esquematiza en la **Figura 8**. Existe una cavidad entre ambas subunidades formada casi exclusivamente por ARNr, abierta en ambos extremos, donde se encuentran tres sitios capaces que albergan a los ARNt, llamados sitio A (*aminoacil-ARNt*), que es el sitio decodificador; sitio P (*peptidil-ARNt*), donde se halla el centro peptidil-transferasa que cataliza la formación de la unión peptídica, y sitio E (*exit*, de salida), desde donde el ARNt abandona el ribosoma.

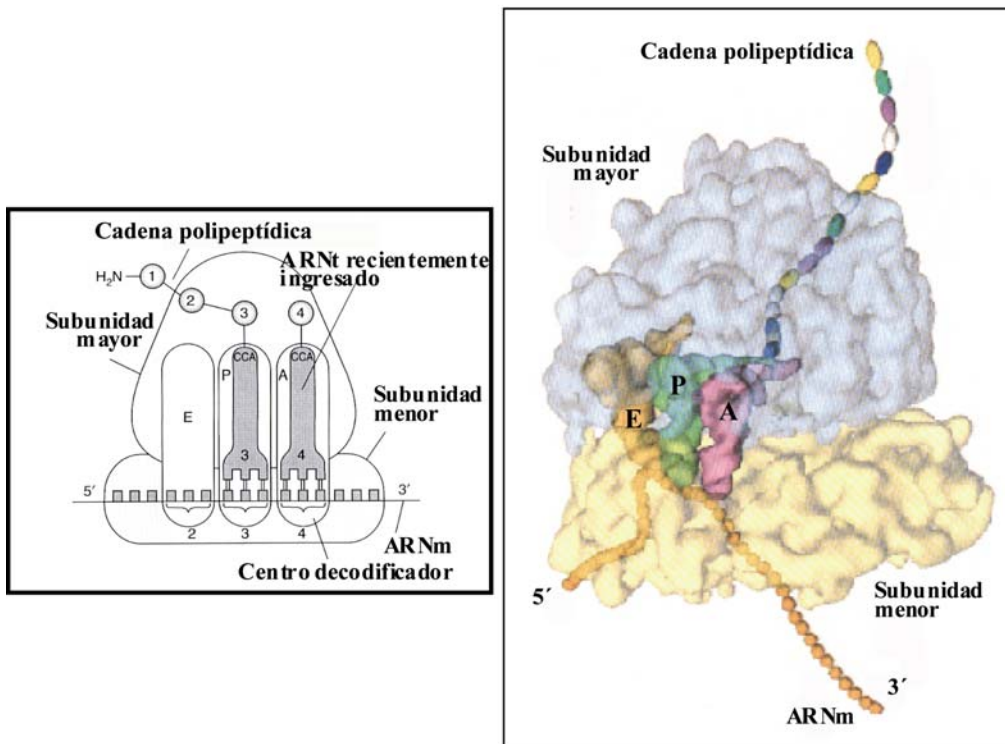


Figura 8. A- Esquema de la estructura del ribosoma. Se observan ambas subunidades y los tres sitios de unión a los ARNt. Referencia: Frank, 2003. B- Estructura del ribosoma 70S de *E. coli*. Se muestran separadas las densidades correspondientes a la subunidad menor (amarillo) y mayor (azul). Se muestran también los sitios A, P y E de unión a ARNt, los lugares de entrada y salida del ARNm y el túnel de salida de la cadena polipeptídica. Modificado de Frank, 2001.

En la mayor parte de la secuencia que codifica para el ARN ribosomal, el cambio evolutivo está altamente restringido dado que el mecanismo de la traducción es complejo y preciso; éste funciona con una frecuencia de un error cada mil codones traducidos (Olsen y Woese, 1993). Es por eso que la zona de la molécula de ARN que participa directamente de este mecanismo está definida y ha permanecido estrictamente homóloga a lo largo de la evolución, mientras que otras partes de la molécula poseen mayor variabilidad. Como consecuencia, las moléculas de ARN contienen secuencias con distinto grado de conservación a lo largo de la evolución (Gutell et al., 1994; Vandepier et al., 1996), que van desde secuencias conservadas universalmente hasta secuencias específicas de grupos con distintos niveles de resolución filogenética. También hay zonas llamadas

hipervariables, que varían a nivel de especie o cepa. Las zonas hipervariables de la molécula de la subunidad del 16S de *Escherichia coli* se muestran en la **Figura 9**.

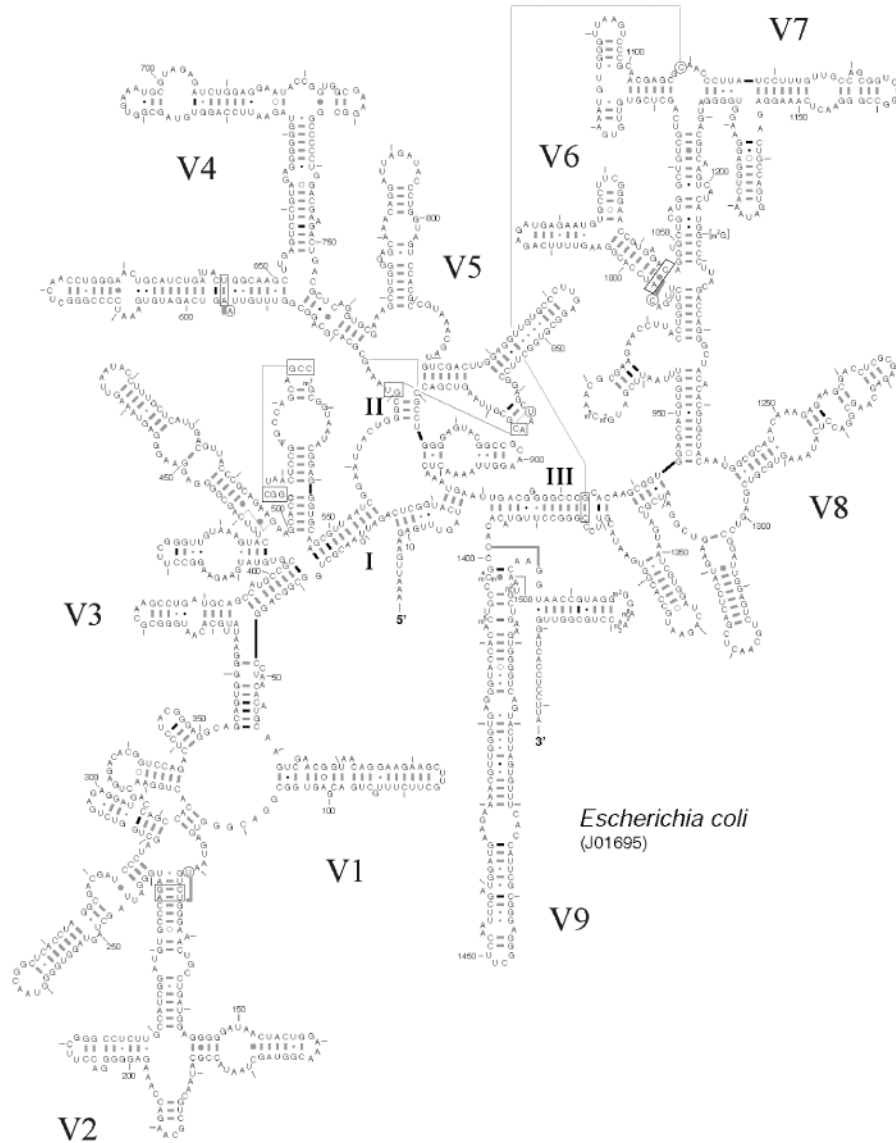


Figura 9. Estructura secundaria de la subunidad pequeña del ARN ribosomal 16S de *Escherichia coli*. V1 a V9: zonas hipervariables. Modificado del sitio Comparative RNA website (www.rna.icmb.utexas.edu).

5.1.2 Filogenia basada en el gen para la subunidad pequeña del ARN ribosomal 16S

Los trabajos pioneros de Carl Woese y colaboradores demostraron que los linajes fundamentales de la vida estaban dominados por formas microbianas (**Figura 10**). El análisis comparativo de secuencias ribosomales indicó que todos seres vivos pertenecían a alguno de los 3 dominios: *Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya* (Woese et al., 1990).

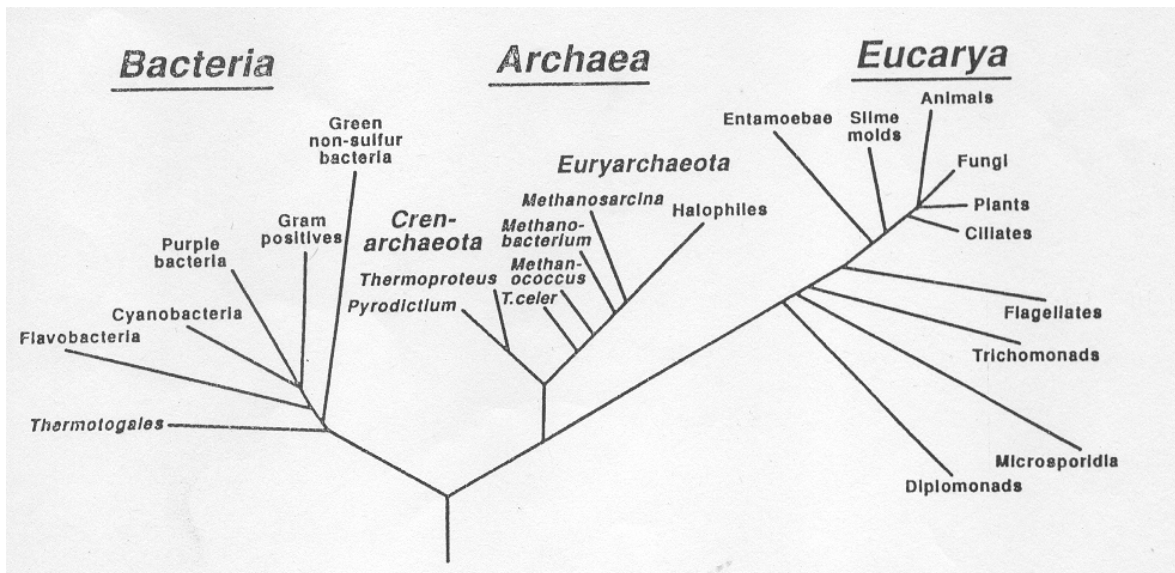


Figura 10. Árbol filogenético universal basado en secuencias de ARN ribosomal 16S mostrando los tres dominios *Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya*. Referencia: Olsen and Woese, 1993.

La filogenia inferida de las secuencias del gen para la subunidad pequeña del ARNr trajo varias sorpresas: la primera fue que demostró que el término “procariotas” no es un taxón válido filogenéticamente, sino que cubre dos grupos (dominios) dispares de organismos que están tan relacionados entre sí como con los eucariotas (**Figura 10**). A pesar de esta separación que los tres dominios se unen en un árbol filogenético universal.

La segunda sorpresa surgió del análisis del dominio *Bacteria* y su comparación con la taxonomía derivada de caracteres fenotípicos (Woese et al., 1990). En contraste con el ordenamiento clásico que agrupaba todos los fotoautótrofos, estos organismos se encontraron a lo largo de todo el árbol salvo en las ramas más ancestrales. Otra

característica fenotípica utilizada para agrupar microorganismos, la movilidad por arrastre (*gliding motility*) también resultó filogenéticamente dispersa, demostrando su poca significancia taxonómica. Muchos patógenos (micoplasmas, rickettsias, etc.) habían sido clasificados en grupos distintivos que luego resultaron estar intercalados entre una variedad de pequeños grupos junto con otros organismos no patógenos. Por último estos análisis sugirieron ciertas características generales de la evolución bacteriana. Las bacterias, como las arqueas, tienen un origen termofílico: la termofilia está presente en todas las ramas más profundas del árbol. Y la fototrofia es un carácter ancestral que surgió probablemente en el linaje previo a la separación de los grupos, demostrado por su dispersión a lo largo del árbol (Woese, 1987).

De estos trabajos resultó que, en el nivel molecular, la historia de los microorganismos es tan evidente y tan informativa como puede serlo para las formas de vida más complejas. De allí en más la filogenia de los microorganismos pasó a ser dependiente de la generación de datos moleculares. Hoy en día se ha construido una enorme base de datos conteniendo secuencias de una gran cantidad de microorganismos, de las cuales las secuencias para la subunidad pequeña del gen para el ARN ribosomal 16S son las más utilizadas (<http://rdp.cme.msu.edu>).

Sin embargo, una pregunta que surge de aquí es: puede un solo gen representar la posición filogenética de un organismo? Dada la cantidad de ejemplos de contribuciones de material genético extraño el genoma es visto hoy en día básicamente como quimérico (Gogarten y Townsend, 2005). Sin embargo, algunos genes que codifican para funciones centrales de la célula pueden ser examinados bajo la hipótesis de que están asociados al origen mismo del organismo como tal. Es así como se encontró que los genes que codifican para el ARN ribosomal, ARN polimerasas, factores de elongación G, ATPasas y otros sugieren similares reconstrucciones del pasado (Cammarano *et al.*, 1992; Philippe y Douady, 2003; Puhler *et al.*, 1989). En base a estos resultados se pueden tomar los genes que codifican para el ARN ribosomal como estimadores confiables de la filogenia de los organismos.

5.2 La reacción en cadena de la polimerasa aplicada al estudio de comunidades microbianas

Los primeros análisis de comunidades microbianas a partir del ARN ribosomal se realizaron en base a la extracción directa del ARN 5S, su separación electroforética y análisis de secuencias (Lane et al., 1985; Stahl et al., 1984; Stahl et al., 1985). Sin embargo, el pequeño tamaño del ARN 5S y la necesidad de separación electroforética llevaron a utilizar finalmente los genes para la subunidad 16S. El método utilizado era la extracción directa del ADN y clonado en bibliotecas de fagos, búsqueda de los clones de interés con sondas específicas para el 16S, para luego analizar y comparar las secuencias obtenidas (Schmidt et al., 1991).

El campo de la ecología microbiana se vio muy beneficiado con el advenimiento de la *reacción en cadena de la polimerasa (PCR)* (Saiki et al., 1988), ya que permitió la amplificación de genes ribosomales a partir de ADN extraído directamente de muestras ambientales, ahorrando tiempo y aumentando rápidamente la disposición de secuencias para formar una base de datos con fines comparativos.

Una gran ventaja de este método de amplificación de genes ribosomales es que requiere sólo unos pocos nanogramos de ADN para la obtención de las secuencias amplificadas. La otra gran ventaja es que a partir de cebadores conservados (“universales”), se puede obtener una aproximación a la diversidad filogenética presente en la comunidad sin información previa sobre la muestra en cuestión. Es así como se han podido detectar microorganismos aún no cultivados o incluso desconocidos, cuya importante representación numérica y funcional en algunos ecosistemas era indetectada utilizando métodos clásicos de cultivo. Un ejemplo remarcable es el descubrimiento de divisiones bacterianas enteramente nuevas. Estas divisiones resultaron ser tan diversas como las otras divisiones del dominio *Bacteria* (Hedlund et al., 1997; Ludwig et al., 1997).

Sin embargo, el uso de la reacción en cadena de la polimerasa trae aparejados una serie de

desvíos que se enumeran a continuación:

Universalidad y especificidad de los cebadores: cuando no se posee ninguna información *a priori* sobre la comunidad microbiana a estudiar, lo más conveniente es utilizar cebadores generales, es decir secuencias conservadas en todo el dominio *Bacteria*. Desafortunadamente, ninguno de los cebadores catalogados como “universales” son realmente abarcativos de todo el grupo al que se intenta apuntar, y también presentan problemas de inespecificidad (complementariedad con secuencias fuera del grupo blanco). Por ejemplo, el cebador *S-D-Bact-0008-a-S-20*, general para bacterias, está presente en sólo 18800 de las 190800 secuencias dentro de *Bacteria*. Aunque se debe tener en cuenta la gran cantidad de secuencias parciales presentes en las bases de datos, esta proporción resulta de todas maneras muy baja. La secuencia de sonda *Alf1b* utilizada para detectar miembros de *Alfaproteobacteria*, se encuentra en 3229 secuencias de las 20333 de este grupo, y en 1565 secuencias de organismos que no pertenecen a *Alfaproteobacteria* (fuente: Ribosomal Database Project, <http://rdp.cme.msu.edu>). Este problema se ve agravado por la continua adición de secuencias a las bases de datos, para las cuales la complementariedad de los cebadores no fue evaluada (Baker et al., 2003; Forney et al., 2004).

Límite de resolución de la técnica de amplificación: la reacción de PCR es una reacción enzimática competitiva, por lo cual las moléculas en principio se amplifican de acuerdo a su abundancia relativa. En consecuencia, los genes de las poblaciones menos abundantes generalmente no están representadas en los perfiles electroforéticos generados luego de la reacción (Forney et al., 2004). Por lo tanto la *riqueza* de una comunidad permanece desconocida. Es más apropiado interpretar diferencias detectadas en los perfiles electroforéticos de las comunidades estudiadas como diferencias en la *dominancia* de ciertas poblaciones, sin hacer ninguna inferencia sobre la riqueza.

Eventos de renaturalización de los ADN más abundantes: a medida que las moléculas de producto amplificado aumentan, la tasa de reacción en la cual las moléculas simple cadena hibridan con sus complementarias se incrementa como función de su concentración. En reacciones con ADN que poseen secuencias diferentes (como en una comunidad microbiana) y cuando se utilizan cebadores de alta eficiencia de amplificación, los ADN

moldes con concentración inicial más alta llegan a concentraciones inhibitorias de la reacción antes que los menos abundantes. Se produce un desvío a favor de los menos abundantes, y como resultado la proporción original no se ve reflejada en los productos finales. Este fenómeno aumenta con el número de ciclos (Suzuki y Giovannoni, 1996).

Amplificación preferencial de secuencias: debido a la heterogeneidad del ADN genómico total de una comunidad, no todas las secuencias son igualmente accesibles a la polimerasa y/o a los cebadores que se utilizan en la reacción de PCR. Por ejemplo, los ADN de los microorganismos con alto contenido de G+C en sus genomas tienen menor temperatura de disociación que los de bajo contenido de G+C, y por lo tanto estarán subrepresentados en la población de secuencias molde. La introducción de acetamida y dimetilsulfóxido en las reacciones como factores de reducción de la temperatura de disociación de las secuencias molde permite la competencia más efectiva de los genes con alto contenido de G+C (Baskaran et al., 1996; Reysenbach et al., 1992).

Variabilidad en el número de copias de los genes ribosomales: el número de operones que codifican para los ARN ribosomales varía mucho entre los microorganismos, lo cual es una fuente de desvíos a favor de los organismos de más operones en la reacción de PCR. Se ha observado que los organismos de crecimiento lento poseen menos copias que los de crecimiento rápido (Klappenbach et al., 2000). A esto se le agrega el hecho que algunos microorganismos poseen diferencias de secuencia en sus operones, por lo cual estas secuencias podrían ser confundidas con varias especies cuando en realidad se trata de una sola (Clayton et al., 1995; Mylvaganam y Denis, 1992; von Wintzingerode et al., 1997; Wang et al., 1997).

Fluctuaciones al azar por dilución excesiva del ADN: Chandler y colaboradores (Chandler et al., 1997) observaron cambios significativos en las composiciones de bibliotecas de 16S preparadas con diferentes grados de dilución del ADN genómico. La hipótesis que explicaría este fenómeno es que las concentraciones muy bajas de ADN (en el orden de picogramos) generan fluctuaciones al azar en la eficiencia de PCR. La purificación del ADN para evitar la necesidad de dilución de los inhibidores de la reacción es un paso

fundamental en la extracción del ADN.

Formación de artefactos de la reacción: Estos artefactos pueden ser: *quimeras* que se producen por apareamiento entre dos moléculas de microorganismos diferentes pero homólogas en alguna zona y su consecuente amplificación. Existen programas mediante los cuales es posible identificar quimeras, por ejemplo el *Chimera Check* (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera>) que compara las secuencias con bases de datos en búsqueda de identidades parciales con microorganismos diferentes. La estructura secundaria del ADN puede dar lugar a zonas con baja accesibilidad y llevar a deleciones en los productos de amplificación. También pueden ocurrir *mutaciones puntuales* producto de errores de la polimerasa.

5.3 El ciclo del ARN ribosomal completo

Debido a la cantidad de desvíos que poseen los métodos basados en la reacción de PCR, no es posible tomar las abundancias relativas de las secuencias obtenidas como indicadores de las abundancias de los microorganismos que habitan una comunidad microbiana. Por lo tanto es necesario corroborar la presencia y estimar la abundancia relativa de las poblaciones dentro de la mezcla original de ácidos nucleicos ó preferentemente directamente a partir de la células de la muestra de la comunidad.

Para ello existen métodos de detección y cuantificación de microorganismos no basados en la reacción en cadena de la polimerasa. Estos métodos están basados en la hibridación directa con el ARN ribosomal. Se utilizan oligonucleótidos marcados radioactiva o fluorescentemente, cuyas secuencias poseen un determinado grado de resolución filogenética, para detectar y cuantificar grupos de organismos en la muestra ambiental.

La gran potencia de estos métodos reside en su combinación con los métodos basados en PCR anteriormente descritos. A partir de secuencias obtenidas mediante métodos basados en PCR se diseñan sondas específicas para determinadas poblaciones, y éstas se cuantifican en la comunidad original, cerrando el llamado *ciclo del ARN ribosomal completo* (Amann

et al., 1995) (Figura 11).

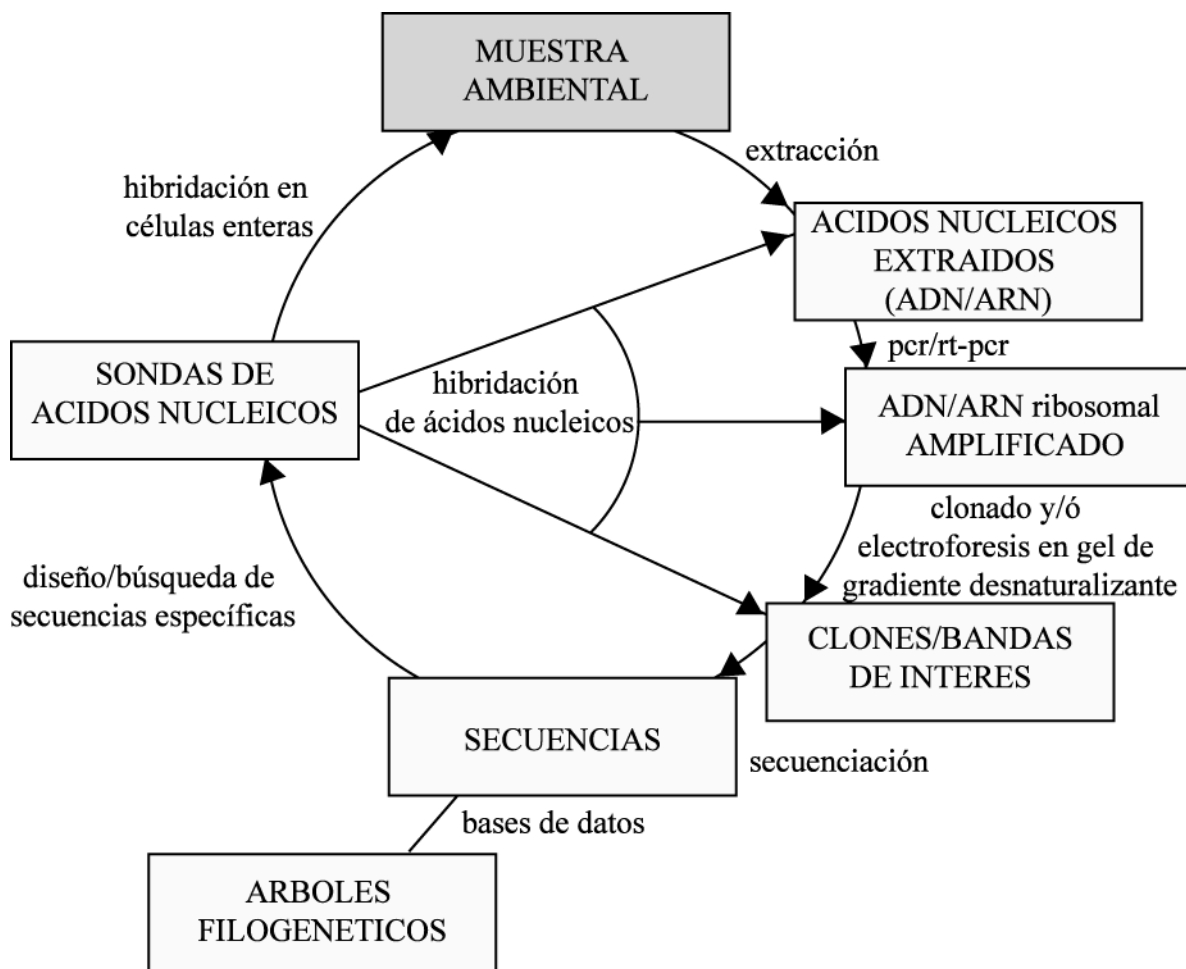


Figura 11. Diagrama del ciclo del ARN ribosomal completo. Modificado de Hugenholtz et al., 1998.

Objetivos

El Objetivo General de este trabajo es el estudio de la estructuración de las comunidades bacterianas que participan del proceso de biodegradación del detergente nonilfenol polietoxilado en barros activados.

Este objetivo se desglosa en dos objetivos particulares, que contemplan tanto aspectos ecológicos como microbiológicos:

Estudiar las características ecológicas de estas comunidades, en particular el efecto que ejerce el tipo de alimentación en su estructura y su dinámica.

Identificar y cuantificar las poblaciones bacterianas asociadas a la presencia de nonilfenol polietoxilado en el medio de alimentación.

Material es y métodos

Material es

6 Soluciones generales

Buffer acetato de sodio: acetato de sodio 0,1 M pH [5,2] con ácido acético.

Buffer fosfato de sodio: NaH_2PO_4 0,2 M 51 ml, Na_2HPO_4 0,2 M 49 ml, [pH 6,8].

Buffer de siembra: azul de bromofenol 0,075%, xileno cianol 0,075%, Na_2EDTA 5 mM, glicerol 80%.

Buffer SSC 20X: NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M [pH 7,0].

Buffer TAE 1X: Tris-HCl 20 mM, ácido acético 10 mM, EDTA 0,5 mM [pH 8,0].

Buffer TE: Tris-HCl 10 mM, Na_2EDTA 1 mM [pH 8,0]

Buffer TENP: Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 10 mM, polivinil pirrolidona 1% p/v [pH 7,6].

Buffer PBS 10X: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,3 mM, KH_2PO_4 1,4 mM [pH 7,3]

Solución I minipreparación de ADN plasmídico: Tris-HCl 50 mM [pH 8], EDTA 10 mM.

Solución II minipreparación de ADN plasmídico: NaOH 0,2 N, SDS 1% p/v.

Solución III minipreparación de ADN plasmídico: acetato de potasio 3 M, ácido acético 11% v/v.

Solución TFB I: acetato de potasio 30 mM, KCl 100 mM, CaCl_2 10 mM, MnCl_2 50 mM,

glicerol 15%, [pH 5,8] con ácido acético 0,2 M, esterilizado por filtración.

Solución TFB II: MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, KCl 10 mM, glicerol 15%, [pH 6,5] con KOH, esterilizado por filtración.

5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-galactósido (X-gal): solución madre 40 mg/ml en dimetilsulfóxido, 40 µl por placa.

Isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG): solución madre 100 mM, 40 µl por placa.

Solución de hibridación para FISH: NaCl 0,9 M, *buffer* Tris-HCl 20 mM [pH 7,2], SDS 0,1% p/v, formamida deionizada en la concentración adecuada para cada sonda (**Tabla 3**), 25 ng/µl de cada sonda marcada con un grupo fluorescente. Las sondas **BET42a** y **Gam42a**, fueron utilizadas acompañadas por un exceso de 10 veces en concentración molar de la sonda competidora sin marcar (**Gam42a** y **Bet42a** respectivamente). La sonda **Sph492** se utilizó junto con oligonucleótidos auxiliares (*helpers*) modificados a partir de Kalmbach et al., 1997, utilizando las secuencias obtenidas en este trabajo (**Tabla 2**).

Solución de lavado FISH: *buffer* Tris-HCl 20 mM [pH 7,2], SDS 0,1%, y NaCl en la concentración adecuada para cada sonda (**Tabla 3**).

Solución de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol): solución madre 1 mM (350 mg/ml) en agua destilada. Concentración final 1 µg/µl.

Solución de montaje: glicerol, 300 mg/ml, Mowiol 4-88 (Hoechst) 120 mg/ml, Tris-HCl 100 mM [pH 8,5].

Solución de Denhardt 100X: Ficoll 400 20 g/L, polivinil pirrolidona 20 g/L, seroalbúmina bovina 20 g/L, esterilizado por filtración.

Solución de hibridación en membrana: *buffer* SSC 5X, solución de Denhardt 5X, SDS 1%, ADN de espermatozoos de salmón 0,1 mg/ml.

7 Medios de cultivo

Efluente sintético (ISO:9887, 1992): peptona 160 mg/L, extracto de levadura 110 mg/L, urea 30 mg/L, NaCl 9 mg/L, CaCl₂·2H₂O 4 mg/L, MgSO₄·7 H₂O 2 mg/L, K₂HPO₄ 278 mg/L, KH₂PO₄ 80 mg/L.

Efluente sintético suplementado con NPEO₁₀: *idem* anterior, NPEO₁₀ 60 mg/L

Medio LB: peptona 1% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 1% p/v, [pH 7,0] (placas: 1,5% Agar).

Medio SOC: peptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, glucosa 20 mM [pH 7,0].

Medio R_{2A} suplementado con NPEO₁₀ (modificado de DSMZ: <http://www.dsmz.de/media/media.htm>): extracto de levadura 0,5 g/L, peptona 0,5 g/L, Casamino acids 0,5 g/L, glucosa 0,5 g/L, almidón soluble 0,5 g/L, piruvato de sodio 0,3 g/L, KH₂PO₄ 0,3 g/L, MgSO₄·7H₂O 0,05 g/L, NPEO₁₀ 0,06 g/L.

Medio VL55 suplementado con aminoácidos (Joseph et al., 2003): buffer MES 1,8 g/L, MgSO₄·7H₂O 0,2 mM, CaCl₂·2H₂O 0,3 mM, NH₄H₂PO₄ 0,2 mM, NH₄Cl 0,2 mM, solución de micronutrientes SL-10 (1000X) 1 ml/L, solución de selenito-tungstato (1000X) 2 ml/L, mezcla de aminoácidos (100X) 10ml/L, solución de vitaminas 1 (1000X) 1ml/L, solución de vitaminas 2 (333X) 3 ml/L [pH 5,5].

Solución de micronutrientes SL-10 (1000X): HCl 6M 1 ml, FeSO₄ 110 mg, ZnCl₂ 7 mg, MnCl₂·H₂O 7,2 mg, H₃BO₃ 6 mg/ml 0,1 ml, CoCl₂·6H₂O 19 mg, CuCl₂·2H₂O 2 mg/ml 0,1 ml, NiSO₄·6H₂O 2,6 mg, Na₂MoSO₄·2H₂O 3,6 mg, H₂O destilada hasta 100 ml.

Solución de selenito-tungstato (1000X): NaOH 50 mg, Na₂SeO₃ 2 mg/ml 0,1 ml, Na₂WO₄·2H₂O 4 mg/ml 0,1 ml, H₂O destilada hasta 50 ml.

Mezcla de aminoácidos (100X): ácido L-aspartico 470 mg, L-treonina 210 mg, L-serina 320 mg, ácido L-glutámico 960 mg, L-prolina 690 mg, L-glicina 150 mg, L-alanina 200 mg, L-valina 220 mg, L-metionina 40 mg, L-isoleucina 110 mg, L-leucina 250 mg, L-tirosina 70 mg, L-fenilalanina 140 mg, L-lisina 350 mg, L-cisteína 80 mg, L-arginina 180 mg, L-triptofano 80 mg, H₂O destilada hasta 100 ml, [pH 7].

Solución de vitaminas 1 (1000X): ácido 4-aminobenzoico 2 mg, biotina 1 mg/ml 0,5 ml, ácido nicotínico 4 mg, ácido pantoténico 2 mg, tiamina 4 mg, cianocobalamina 2 mg, H₂O destilada hasta 50 ml.

Solución de vitaminas 2 (333X): ácido lipoico 10 mg/ml 50 µl, riboflavina 0,5 mg, ácido fólico (2 mg/ml) 0,1 ml, H₂O destilada hasta 50 ml.

8 Cepas de bacterias

Cepa utilizada para transformación:

Escherichia coli DH10B: F- *mrcA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) *80dlacZΔM15 Δ*lacX74 deoR recA1 endA1 araD139* Δ(*ara, leu*)7697 *galU galK λ- rpsL nupG*.

Cepas utilizadas como standards para dot blot:

- *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 (gentilmente cedida por el Dr. Mentaberry)
- *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (fuente: BCCM)¹
- *Acinetobacter johnsonii* ATCC 17946 (fuente: BCCM)¹
- *Myroides odoratus* ATCC 29979 (fuente: Instituto Malbrán)²
- *Bacillus subtilis* ATCC 12432 (fuente: Instituto Malbrán)²
- *Micrococcus luteus* ATCC 13513 (fuente: Instituto Malbrán)²

¹BCCM/LMG Bacteria Collection Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent,

(<http://www.belspro.be.bccm>),

²Laboratorio de Bacteriología Especial, Instituto de Microbiología “Dr. Carlos G. Malbrán”
Av. Vélez Sarsfield 563 (1281) Buenos Aires – Argentina.

9 Vectores

Vector pGEM-T Easy: Vector de clonado para productos de PCR, Amp^r (Promega)

Permite el screening de transformantes que incorporaron plásmido con inserto mediante la disrupción del gen *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa, la cual en presencia de *X-gal* produce un intermediario de color azul.

10 Oligonucleótidos utilizados

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados.

	Uso	Subunidad	Posición ^a	Referencia o secuencia (5' a 3'), si fue diseñada en este estudio
S-D-Bact-0008-a-S-20	PCR	16S	8-27	(Godon et al., 1997)
S-*-Univ-1492-a-A-18	PCR	16S	1492-1509	(Godon et al., 1997)
341F	PCR-DGGE	16S	341-357	(Muyzer et al., 1993)
534r	PCR-DGGE	16S	518-534	(Muyzer et al., 1993)
984	PCR-DGGE	16S	968-984	(Heuer et al., 1999)
r1378b	PCR-DGGE	16S	1378-1401	(Heuer et al., 1999)
F930	PCR	16S	914-930	(Barberio et al., 2001)
31F	Clonado de <i>Acidobacteria</i>	16S	15-31	(Barns et al., 1999)
S-*-AcG3-1282-a-A-18^b	Clonado de <i>Acidobacteria</i>	16S	1282-1299	CTGAGACCGGTTTTTGCG
S-*-UGP-1230-a-A-18	Hibridación y PCR de <i>Gammaproteobacteria</i> ,	16S	1230-1247	ACCTCCCATTGTAGTACG

^a El organismo de referencia utilizado fue *Escherichia coli* gi2074407. ^b Las sondas diseñadas en este estudio fueron nombradas de acuerdo a Wheeler Alm et al., 1996. ^c versión reversa-complementaria. ^d Las sondas EUB 338, EUB338II y EUB338III fueron utilizadas en mezclas equimolares. ^e Los oligonucleótidos auxiliares (*helpers*) utilizados fueron: H433: ATCCCKGGTAAAAGAGC, H450 (modif): CCGGTACTGTTCATGTATC, H510 (modif): SSGCTGCTGGCACGRAGT, H528 (modif.): CTAGCTCCCYCGTATTACCG

S-*-UGP-1291-a-A-18	Clonado 16S-23S de <i>Gammaproteobacteria</i>	16S	1291-1308	ATCCGGACTGAGAGAGGT
1930-r	Clonado 16S-23S <i>Gammaproteobacteria</i>	23S	1930-1947	(Ehrmann et al., 1994)
23S-6F	Secuenciación de zona 23S de <i>Gammaproteobacteria</i>	23S	559-578	(Anton et al., 1999)
S-*-Univ-1392-a-A-15	Transcripción reversa	16S	1392-1406	(Pace et al., 1986)
Bet948β^c	Clonado <i>Betaproteobacteria</i>	16S	931-948	(Gomes et al., 2001)
EUB338^d	Hibridación <i>Eubacteria</i>	16S	338-356	(Amann et al., 1990)
EUB338II^d	Hibridación <i>Eubacteria</i>	16S	338-356	(Daims et al., 1999)
EUB338III^d	Hibridación <i>Eubacteria</i>	16S	338-356	(Daims et al., 1999)
Alph1b	Hibridación <i>Alphaproteobacteria</i>	16S	19-35	(Manz et al., 1992)
Bet42a	Hibridación <i>Betaproteobacteria</i>	23S	1027-1043	(Manz et al., 1992)
Gam42a	Hibridación <i>Gammaproteobacteria</i>	23S	1027-1043	(Manz et al., 1992)
CF319a	Hibridación Cytophaga- Flavobacterium-Bacteroides	16S	319-336	(Manz et al., 1996)
HGC69a	Hibridación <i>Actinobacteria</i>	23S	1901-1018	(Roller et al., 1994)
LGC344	Hibridación <i>Firmicutes</i>	16S	354-371	(Meier et al., 1999)
S-*-OTU45-0720-a-A-20	Hibridación <i>Acidobacteria</i> GIII	16S	720-739	(Juretschko et al., 2002)
S-*-LARI-0470-a-A-18	Hibridación <i>Burkholderiales</i>	16S	470-487	TACCGTCATCCTCCCGAG
Sph492^e	Hibridación <i>Sphingomonadales</i>	16S	492-509	(Friedrich et al., 2002)

Tabla 2. (continuación)

Tabla 3. Condiciones de hibridación para las sondas utilizadas.

Sonda	Temperatura de hibridación y lavados <i>dot blot</i>^a	% formamida FISH	Concentración NaCl FISH^b
EUB 338	49	0	900
Alph1b	45,7	20	225
Bet42a	40	35	80
Gam42a	40	35	80
CF319a	43,7	35	80
HGC69a	40	25	159
LGC344	40	20	225
S-*-OTU45-0720-a-A-20	-	35	80
S-*-LARI-0470-a-A-18	-	35	80
Sph492	-	20	225

^a La temperatura utilizada fue determinada de acuerdo a Sandaa et al., 1999.

^b La concentración de NaCl se determinó de acuerdo a Pernthaler et al., 1998.

Métodos

11 Diseño experimental

11.1 Construcción de los reactores a escala de laboratorio

Los reactores a escala de laboratorio, de un volumen de 3 litros, se implementaron según un esquema semi-continuo de barros activados (*SCAS*), según norma ISO:9887(ISO:9887, 1992). Este tipo de sistema experimental, análogo al reactor secuencial en *batch*, se muestra en la **Figura 12**.

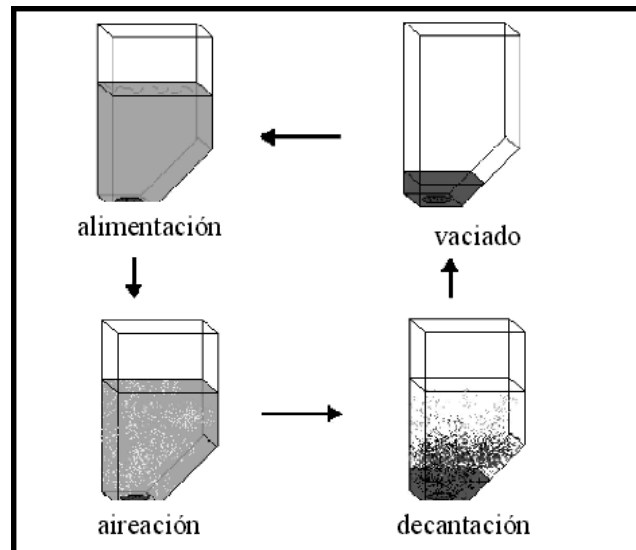


Figura 12. Esquema del sistema semicontinuo de barros activados.

En este sistema la discontinuidad entre la degradación aeróbica y la separación de la biomasa del líquido tratado se resuelve temporalmente: el mismo recipiente recibe la alimentación y la aireación por un determinado tiempo y luego la aireación se corta permitiendo la sedimentación del barro y la eliminación del efluente tratado. El ciclo se completa con un nuevo llenado. Periódicamente se realizan purgas del barro eliminando el exceso de biomasa producido por el sistema. El período de sedimentación fue establecido en 60 minutos, suficiente para la separación de fases que permite la retención de la biomasa

en el reactor.

Cuatro reactores idénticos fueron inoculados con barro proveniente de una planta de barros activados para el tratamiento de efluentes de un centro comercial (Plaza Oeste, Buenos Aires). Los reactores fueron alimentados con efluente sintético previamente esterilizado por autoclave con el objetivo de eliminar la posibilidad de contaminación por microorganismos provenientes del medio de alimentación (**Figura 13A**).

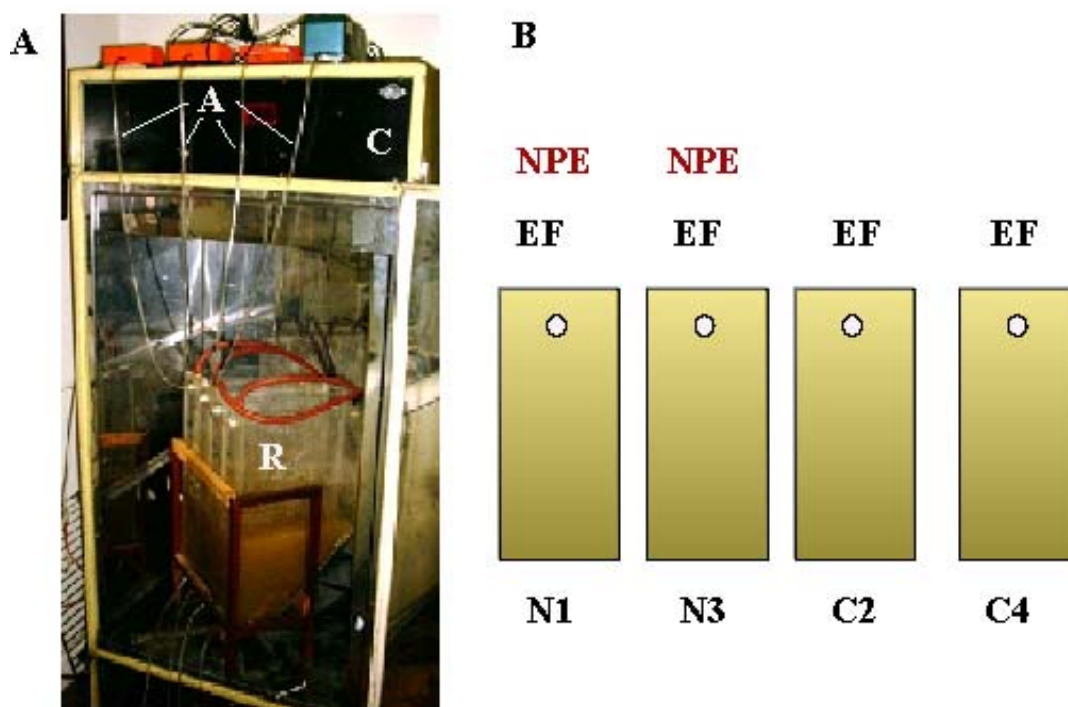


Figura 13. A- fotografía de los reactores construidos. R: reactores. C: cámara de temperatura controlada. A: sistema de aireación. B- diseño experimental. N1 y N3: reactores alimentados con nonilfenol polietoxilado. C2 y C4: reactores control. NPEO₁₀ nonilfenol polietoxilado. EF: efluente sintético.

La temperatura se mantuvo en $20 \pm 2^\circ\text{C}$ mediante el aislamiento en una cámara de temperatura controlada (**Figura 13A**), y el pH se mantuvo en $7,0 \pm 0,2$ por acción de una solución tampón en el efluente sintético. El objetivo de esto fue excluir cambios en la composición de las comunidades microbianas debido a cambios en estos factores ambientales.

La construcción y operación de los reactores y los análisis químicos se realizaron en colaboración con el Lic. Raúl Itria (Ingeniería Ambiental –INTI).

11.2 Diseño de réplicas

Dos de los reactores (C2 y C4) recibieron sólo el efluente sintético y constituyeron los controles. Los otros dos reactores (N1 y N3) recibieron el efluente sintético con el agregado de 60 mg/L de una mezcla comercial de NPEO₁₀ con un promedio de 10 unidades etoxiladas durante el período de operación que duró 21 meses (**Figura 13B**).

Este diseño experimental corresponde a un sistema de réplicas independientes en el sentido estadístico, consistente en 2 tratamientos (con y sin NPEO₁₀) y 2 réplicas anidadas (N1 y N3, C2 y C4) dentro de cada tratamiento.

12 Analisis químicos

12.1 Demanda química y bioquímica de oxígeno (DQO y DBO)

La demanda química y bioquímica de oxígeno (DQO y DBO respectivamente) son medidas que se utilizan para medir el nivel de contaminación orgánica tanto en ambientes naturales acuáticos como en sistemas de tratamiento de efluentes líquidos. La DBO es una medida del consumo de oxígeno requerido por la oxidación microbiana de materia orgánica en un efluente. La DQO es una medida de la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar la materia orgánica presente a CO₂ y H₂O, por medio de oxidantes químicos fuertes. (Gerba et al., 2000). La eficiencia del tratamiento se expresa como porcentaje de materia orgánica removida, medida como DBO ó DQO.

12.1.1 Demanda química de oxígeno

La demanda química de oxígeno se determinó mediante el método de reflujos cerrado en

viales de vidrio con tapa a rosca y contratapa de teflon, en un termorreactor para DQO (Hach Company). La digestión ácida de las muestras se llevó a cabo a 150°C durante 2 h en presencia de $K_2Cr_2O_7$, Ag_2SO_4 , y $HgSO_4$. La medición de equivalentes de oxígeno consumidos se realizó por el método colorimétrico a 600 nm, con un coeficiente de extinción molar del Cr^{3+} de $50 L mol^{-1} cm^{-1}$ (American Public Health Association, 1998). Se preparó una curva de calibración con ftalato de potasio (DQO teórica de 1,176 mgO_2/mg) con valores entre 0 y 1000 $mg O_2/L$. Los valores de DQO se interpolaron de la curva.

12.1.2 Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)

La demanda bioquímica de oxígeno se realizó por el método de dilución de las muestras en una solución con macro y micronutrientes (American Public Health Association, 1998), inoculada con un cultivo bacteriano mixto proveniente de una planta de tratamiento biológico de líquidos cloacales. Se incubó a $20 \pm 1^\circ C$ durante 5 días. Al principio y al final del experimento se midió el oxígeno electroquímicamente con medidor de oxígeno disuelto YSI modelo 57 (Yellow Springs Instruments). La DBO se calculó como:

$$DBO_5 (mg O_2/L) = (mg O_2 \text{ inicial} - mg O_2 \text{ luego de 5 días}) * 1000 / \text{dilución de la muestra} * \text{volumen de la solución (ml)}$$

12.2 Medición de sólidos suspendidos totales

Las muestras de barro se pasaron a través de un filtro de fibra de vidrio previamente pesado. El residuo retenido en el filtro se secó en estufa a 105°C hasta mantener un peso constante. Se midió el incremento en el peso del filtro (American Public Health Association, 1998). Los sólidos suspendidos totales (SST) se calcularon como:

$$SST (mg/L) = \text{incremento del peso del filtro (mg)} * 1000 / \text{volumen de muestra (ml)}$$

12.3 Medición de sólidos suspendidos volátiles

Para determinar sólidos suspendidos volátiles en el licor mezcla (SSVLM) se utilizó la fórmula que relaciona los sólidos suspendidos totales (SST) y los fijos (SSF):

$$\text{SST} - \text{SSF} = \text{SSVLM}$$

Para determinar la concentración de sólidos fijos se realizó un posterior calentamiento hasta peso constante del residuo de los sólidos totales (punto **2.3**) a 550°C en una mufla. Un filtro de fibra de vidrio utilizado como blanco se sometió al mismo tratamiento (American Public Health Association, 1998). Los sólidos fijos se calcularon mediante la fórmula:

$$\text{SSF (mg/L)} = \text{incremento del peso del filtro (mg)} * 1000 / \text{volumen de muestra (ml)}$$

12.4 Cálculo del tiempo de residencia de sólidos

El tiempo de residencia de sólidos (TRS) se define como:

$$\text{TRS (d)} = \text{sólidos totales en el reactor (g)} / \text{sólidos eliminados diariamente (g/d)}$$

La eliminación de sólidos se llevó a cabo a partir de la remoción de licor mezcla con el reactor llevado a su volumen máximo (3L). Por lo tanto la concentración de sólidos en el licor eliminado es equivalente a la concentración el licor mezcla del reactor, y los sólidos totales se calcularon mediante la fórmula:

$$\text{TRS (d)} = \text{Volumen del reactor (L)} / \text{Caudal de purga (L/d)}$$

12.5 Ensayos de biodegradabilidad

Los ensayos se diseñaron tomando como base el método de degradación aeróbica de Zahn–Wellens (ISO:15462, 1997). Estas condiciones consisten en una exposición prolongada del

compuesto a los microorganismos; con el sustrato presente en el medio como única fuente de carbono y energía y con una baja relación entre su concentración y la de la biomasa.

En cada ensayo se agregó una cantidad de sólidos suspendidos (SSVLM) de 400 mg/L proveniente de cada reactor. La concentración de NPEO₁₀ utilizada fue de 270 mg/L (aproximadamente 400 mg/L de DQO). La temperatura se mantuvo en 24±2°C y el pH a 7,4±0,1.

12.6 Electroforesis capilar

Este ensayo se realizó en colaboración con la Lic. Paola A. Babay, en la Unidad de Actividad Química, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA).

Se utilizó un equipo SpectraPHORESIS CE (Thermo Separation Products) con interfase SN4000 y software PC1000. Las muestras y los estándares de los reactores eluidos en columnas de fase reversa C18 fueron previamente diluidos en 40% acetonitrilo y *buffer* fosfato 5 mM [pH 6,8]. Los análisis fueron realizados en un capilar de sílica de 75 µm de diámetro interno y 39,3 cm de longitud.

La temperatura fue controlada a 25°C. La corrida electroforética se efectuó a un voltaje de 20 kV. La longitud de onda de detección utilizada fue de 200 nm. Para confirmar la identidad de los picos de los homólogos etoxilados se adicionaron a las muestras los respectivos estándares. Las soluciones estándares utilizadas fueron: 4-NP (Fluka), 4-NP₁EO y 4-NP₂EO (Promochem).

13 Cultivo de microorganismos

2 µl de barro de los reactores de la fecha correspondiente a los 21 meses de operación se utilizaron como inóculo para experimentos de cultivo líquido en 2 ml de medio, utilizando tubos de cultivo de 15 ml.

Los medios de cultivo utilizados fueron:

- efluente sintético suplementado con NPEO₁₀
- medio R₂A suplementado con NPEO₁₀ 0,06 g/L
- medio VL55 suplementado con aminoácidos (Joseph et al., 2003)
- sobrenadante del reactor N3 tomado a los 150 min luego de la alimentación y filtrado a través de un filtro de 0,2 µm
- sobrenadante del reactor N3 tomado a las 48 h luego de la alimentación y filtrado a través de un filtro de 0,2 µm
- el mismo sobrenadante tomado a las 48 h
- *idem* anterior suplementado con acetato de sodio (2,5 g/L)
- *idem* anterior suplementado con etilenglicol (1% p/v)
- *Idem* anterior suplementado con NPEO₁₀ 0,06 g/L.

Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente con agitación (150 rpm) durante una semana a un mes dependiendo del grado de turbidez alcanzado, considerándose como indicio de crecimiento una densidad óptica (600 nm) mayor a 0,6.

14 Analisis moleculares

14.1 Extracciones de ácidos nucleicos

14.1.1 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico directamente del barro de los reactores se realizó en base al método de Eichner y colaboradores (Eichner et al., 1999), con modificaciones.

500 µl de muestra de barro s activados se centrifugaron durante 10 min a 7000 g y se resuspendieron en *buffer* TENP [pH 7,6], previo lavado en el mismo *buffer*. Las muestras se trasvasaron a tubos de 2 ml con tapa a rosca conteniendo 0,5 g de bolitas de zirconia-silica de 100-150 µm de diámetro (Biospec Products). Se agregaron 50 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) 10% p/v, y 1 µl de RNAsa A 100 mg/ml (Invitrogen). Se incubó a 37°C en estufa durante 1 hora. Luego se agregaron 3 µl de proteinasa K 20 mg/ml (Promega) y se incubó a 37°C durante 1 hora más.

La disrupción mecánica de las células se realizó a 5000 rpm en un agitador recíproco (Biospec Products), durante 2 minutos por muestra a intervalos de 30 segundos en hielo. Se agregaron 100 µl de NaCl 5M y 80 µl de CTAB (10% en NaCl 0.7 M). Se mezcló suavemente y se incubó durante 10 min a 65°C. Se agregaron 700 µl de fenol equilibrado con *buffer* Tris-HCl [pH 8] y los tubos se centrifugaron a 16000 g durante 10 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se repitió la extracción con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Para precipitar los ácidos nucleicos se agregaron 0,7 volúmenes de isopropanol frío, y 0,1 volumen de acetato de sodio 3M [pH 5,8]. Los tubos se incubaron a -20°C durante 1 hora. Se centrifugaron a 16000 g y 4°C durante 40 min. Se descartó el líquido, los *pellets* se lavaron con 500 µl de etanol 70% y se secaron durante 10 minutos bajo lámpara. Los *pellets* se resuspendieron en 50 µl de agua de calidad para PCR. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su utilización.

El ADN genómico se visualizó por electroforesis en gel de agarosa 1% con bromuro de etidio (0,5 µg/ml), en un sistema de procesamiento de imágenes consistente en un

transiluminador UV acoplado a una cámara e interfase informática (ImageMaster VDS, Amersham). Se cuantificó mediante la comparación de intensidad de bandas con un marcador de peso molecular de masa conocida.

14.1.2 Minipreparación de ADN plasmídico

1 ml de cultivo de células transformadas fue incubado de 12 a 16 h en medio LB con ampicilina. El cultivo se centrifugó durante 3 min a 7000 g. Se descartó el sobrenadante. Se agregaron 300 µl solución I fría y se resuspendieron las células. Se agregaron 300 µl de solución II, y se mezclaron los tubos por inversión. Se incubaron 5 min en hielo. Inmediatamente se agregaron 300 µl de solución III fría. Los tubos se mezclaron por inversión y se incubaron 10 minutos en hielo. Los tubos se centrifugaron durante 15 min a 16000 g y 4°C. Se tomaron 800 µl de sobrenadante y transfirieron a un tubo nuevo. Se agregaron 5 µl de RNAsa A 20 mg/ml (Invitrogen). Se incubó a 37°C en estufa durante 2 hs. El ADN plasmídico se purificó extrayendo con 600 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se precipitó con 600 µl de isopropanol. Luego de 30 min de incubación a temperatura ambiente se centrifugaron durante 30 min a 16000 g. El *pellet* se lavó con 100 µl de etanol 70%. Los tubos se secaron durante 10 min bajo lámpara y se resuspendieron en 35 µl de agua de calidad para PCR.

14.1.3 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizaron materiales y soluciones libres de RNAsas por autoclavado. También se utilizó la solución RNAsaWay (Molecular Bioproducts) para el enjuague de frascos y mesadas. Las muestras de barro (1 ml) fueron lavadas con *buffer* TE [pH 7,5] y transferidas a tubos de 2 ml con tapa a rosca que contenían 0,5 g de bolitas de zirconia-sílica de 100-150 µm de diámetro (Biospec Products). Los tubos fueron transferidos a hielo, y se agregó inmediatamente fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:2) equilibrado con *buffer* acetato de sodio [pH=5,1]. Luego se agregaron 50 µl de

SDS 10%, y se realizó la disrupción mecánica de las células en un agitador recíproco (Biospec Products) durante 2 min a 5000 *rpm* en intervalos de 30 s en hielo. Se centrifugaron los tubos, la fase acuosa fue transferida a un tubo *ependorf*, y re-extraída con cloroformo-álcool isoamílico (24:1). El ARN fue precipitado con 2 volúmenes de etanol 100% y 0,1 volumen de acetato de sodio 3M [pH 5,8]. Los *pellets* se lavaron 2 veces con 500 μ l de etanol 70%, se secaron y se resuspendieron en 100 μ l de agua libre de RNAsas. Las muestras se trataron con 5 μ l de la enzima DNAsa (Promega), diluida 1:3 en el *buffer* proporcionado por el proveedor. Se incubaron 20 min a 37°C y se repitió la purificación y precipitación.

Las muestras de ARN extraído se visualizaron en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml), luego de 30 min de electroforesis a 100 V. El ARN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro.

14.2 Transcripción reversa

Para la reacción de transcripción reversa se utilizaron 200 ng de ARN. La mezcla de reacción contenía: 4 μ l de *buffer* de reacción 5X (Promega), 0,2 mM total de una mezcla equimolar de dNTPs, 0,6 μ M de cebador *S*-Univ-1392-a-A-15*, 200 U transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y agua libre de RNAsas hasta un volumen de 20 μ l. La reacción fue llevada a cabo de la siguiente manera: 5 min a 60°C, 1 hora at 37°C, y 10 min a 72°C. La enzima fue agregada en cada tubo luego de los primeros 10 min a 37°C. 2 μ l de estos tubos fueron utilizados como molde en las PCR subsiguientes.

14.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un termociclador PTC-100 (MJ Research). Todas las mezclas de reacción contenían *buffer* de *Taq* polimerasa 1X (Invitrogen), enzima *Taq* polimerasa (Invitrogen) 0,06 U/ μ l, dimetilsulfóxido 5%, seroalbúmina bovina 100 ng/ml, cada deoxinucleótido en una concentración de 50 μ M, y cada cebador en una concentración de 0,2 μ M. En la **Tabla 4** se listan las características

particulares y condiciones utilizadas para cada tipo de PCR efectuada. Las reacciones se llevaron a cabo con una desnaturalización inicial de 3 a 5 min a 94°C, y una extensión final de 10 min a 72°C. Luego de la amplificación los fragmentos fueron visualizados por electroforesis en en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

Para las electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante se llevaron a cabo PCR del tipo anidado. La primer amplificación se realizó utilizando cebadores de manera de amplificar casi la totalidad del gen ADNr 16S, y la segunda amplificación se realizó con cebadores internos, abarcando las regiones variables V3 ó V6-V8 dependiendo del fragmento a utilizar en la electroforesis.

Tabla 4A. Características de las PCR llevadas a cabo en este trabajo.

PCR	sustrato	Cebadores		MgCl ₂ (mM)
		Cebador <i>forward</i>	Cebador <i>reverse</i>	
PCR 1 para DGGE	1 ng ADNg	S-D-Bact-0008-a-S-20	S-*-Univ-1492-a-A-18	1,25
PCR 2 para DGGE	1 µl de PCR 1	341F (GC clamp)	534r	1
PCR 2' para DGGE	1 µl de PCR 1	984 (GC clamp)	r1378b	2
PCR de <i>Acidobacteria</i> Grupo III	1 ng ADNg	31F	S-*-AcG3-1282-a-A-18	2
PCR de <i>Gammaproteobacteria, Xanthomonadales</i>	1 ng ADNg	S-*-UGP-1291- a-A-18	23S-6F	2
PCR de <i>Betaproteobacteria</i>	1 ng ADNc	S-D-Bact-0008-a-S-20	Bet948β	2

Tabla 4B. Condiciones de las PCR llevadas a cabo en este trabajo.

	desnaturalización	apareamiento	extensión	número de ciclos
PCR 1 para DGGE	45 s a 94°C	30 s a 50°C	1 min a 72°C	35
PCR 2 para DGGE	45 s a 94°C	1 min a 48°C	1 min a 72°C	30
PCR 2' para DGGE	45 s a 94°C	1 min a 50°C	1 min a 72°C	30
PCR de <i>Acidobacteria</i> Grupo III	1 min a 94°C	1 min a 60°C	1,5 min a 72°C	30
PCR de <i>Gammaproteobacteria, Xanthomonadales</i>	1 min a 94°C	1 min a 62°C	1,5 min a 72°C	30
PCR de <i>Betaproteobacteria</i>	1 min a 94°C	1 min a 55°C	1,5 min a 72°C	30

14.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real fueron llevadas a cabo en nuestro laboratorio en el INGEBI por la Lic. Eva L. M. Figuerola. Se utilizó como sustrato de la reacción ADN genómico o ADN copia, producto de transcripción reversa del ARN ribosomal (sección 14.2). Para la amplificación del 16S total de la comunidad se utilizaron los cebadores generales *f1114* (Rainey et al., 1996) y *S*-Univ-1392-a-A-15* (Tabla 4). Para la amplificación de los fragmentos correspondientes a los miembros de la familia *Xanthomonadaceae*, clase *Gammaproteobacteria*, se utilizó el cebador específico *S*-UGP-1291- a-A-18* y el general para *Bacteria f930* (Tabla 4). Las condiciones de los ensayos llevados a cabo figuran en Lozada et al., 2005.

14.4 Electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (DGGE)

14.4.1 Principio

La técnica de *electroforesis en geles de gradiente desnaturizante* (DGGE) (Muyzer et al., 1993) es un método de separación de moléculas de ADN que se basa en las diferencias de movilidad electroforética que éstas sufren al ser sometidas a un gradiente químico de agentes desnaturizantes.

La desnaturización de los fragmentos de ADN procede en dominios discretos llamados “dominios de desnaturización” (*melting domains*): zonas que contienen pares de bases con idéntica temperatura de desnaturización (Muyzer et al., 1993). En un DGGE, una vez que el dominio con la menor temperatura de desnaturización llega al equivalente de esta temperatura en el gradiente desnaturizante, ocurre una transición de la molécula de la forma helicoidal a la parcialmente desnaturizada. Esta conformación parcialmente desnaturizada provoca una disminución en la movilidad de la molécula (Muyzer et al., 1996) (Figura 14).

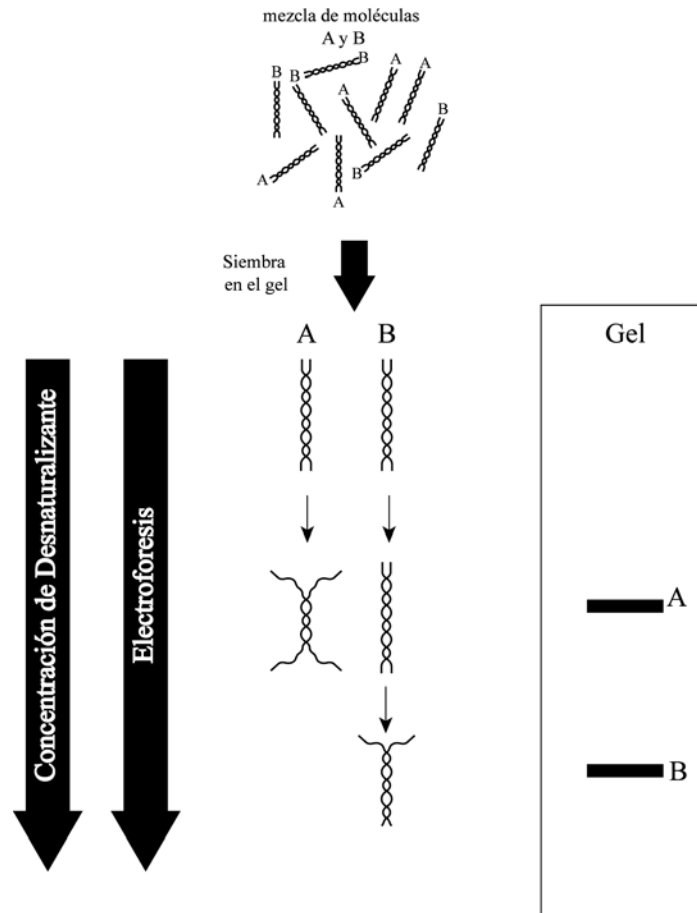


Figura 14. Esquema de separación de fragmentos de ADN por electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante.

En una mezcla de fragmentos del mismo tamaño pero distinta secuencia, la variación de secuencias en los dominios de desnaturalización define la temperatura de desnaturalización de cada fragmento, y por lo tanto su posición final en el gel de gradiente desnaturalizante. Esto da como resultado un perfil electroforético del tipo “huella digital”, en donde de cada muestra se obtiene un patrón único y representativo.

14.4.2 Electroforesis

Se utilizó un sistema de DGGE (CBS scientific, DelMar). 50 µl de las reacciones de PCR fueron concentradas a 10 µl (SpeedVac, *Savant*), se agregaron 2 µl de *buffer de siembra* y se sembraron en un gel de poliacrilamida 6% (PCR 2', página 51) u 8% (PCR 2, página 51) p/v en *buffer* TAE 1X. Los geles se prepararon con un gradiente de urea-formamida en un rango de 30% a 70% (PCR2) ó 35% a 70% (PCR2'), donde 100 % constituye urea 7M y formamida 40% v/v. La electroforesis fue efectuada durante 18 horas a un voltaje constante de 85V (PCR 2') ó 20 horas a un voltaje constante de 50V (PCR 2). La temperatura fue regulada a 60°C. Para realizar la tinción el gel se embebió durante 30-40 minutos en SYBR green I (Molecular Probes), diluído 1/10000 en TAE 1X. Las fotografías se tomaron en un sistema de imágenes consistente en un transiluminador UV acoplado a una cámara e interfase informática (Gene Scan, Hitachi). El cálculo de la posición e intensidad relativa de las bandas en el gel fue efectuada con el programa de análisis Gene Tools (Syngene).

14.4.3 Recorte y reamplificación de bandas del DGGE

Para recortar las bandas de interés se utilizó un escalpelo enjuagado en NaOH 0,4 N. Los trozos de gel fueron introducidos en un tubo *ependorf* de 1,5 ml conteniendo 250 µl de agua destilada. Luego de un *shock* térmico consistente en la incubación durante 15 min a –70°C, 15 min a 60°C y 15 min a 95°C se incubaron durante 20 hs a 4°C. El ADN eluído se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto en presencia de NaCl 100 mM. Los tubos se centrifugaron a 16000 g durante 15', y el *pellet* se resuspendió en 25 µl de agua para PCR. 1 µl de la resuspensión se utilizó como sustrato para la reamplificación del fragmento en las mismas condiciones de la primer amplificación (PCR2 ó PCR2') (**Tabla 4**).

14.5 Clonado

14.5.1 Ligación de fragmentos a clonar

Los fragmentos reamplificados fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa y purificados mediante el Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) y cuantificados mediante la comparación en electroforesis en geles de agarosa con un marcador de peso molecular de masa conocida.

Los fragmentos a clonar fueron ligados en el vector pGEM-TEasy (Promega), utilizando varias relaciones molares inserto:vector, según instrucciones del manual. La mezcla de ligada consistió en: 5 µl de *2X Rapid Ligation Buffer* (Promega), 1 µl de vector (50 ng/ µl), el producto de PCR en la concentración adecuada para la relación inserto vector utilizada, 1 µl de T4 DNA Ligasa (Promega) y agua de calidad para PCR hasta completar un volumen de 10 µl. La reacción de ligada se realizó durante 2 h a 37°C.

14.5.2 Preparación de células termocompetentes

Se tomó una colonia de una placa de células *Escherichia coli* DH10B y se incubó durante 16 h en medio LB líquido. Se sembraron 4 ml de este cultivo en 100 ml de LB en un *erlenmeyer* de 1L, y se incubaron a 37°C hasta una DO de 0,3 (600 nm). El cultivo se mantuvo en hielo durante 5 min y se centrifugó durante 5 min a 2500 g. Se resuspendió suavemente en hielo en 40 ml de la solución TFB I. Se mantuvo durante 5 min en hielo y se centrifugó nuevamente durante 5 min a 2500 g. Se resuspendió suavemente en hielo en 4 ml de la solución TFB II fría. Se mantuvo en hielo por 15 min y luego se alicuotaron las células de a 50 µl en tubos *ependorf*, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C.

14.5.3 Transformación de *Escherichia coli* DH10B

Se transformaron células *Escherichia coli* DH10B termocompetentes siguiendo el protocolo recomendado por el manual del plásmido PGEM-Teasy (Promega). Se descongelaron suavemente 50 µl de células en hielo, se adicionaron 2 µl de reacción de ligación (sección 14.5.1), se incubaron en hielo durante 20 min, y luego de un *shock* térmico de 45-50 s a 42°C se transfirió nuevamente a hielo por 2 min. Se agregaron 950 µl medio SOC a las células y se incubaron durante 1 h 30 min a 37°C en *shaker* a 150 rpm. Los cultivos transformados se incubaron durante 20 h a 37°C en placas en LB agar con ampicilina 100 µg/ml adicionada con *X-gal* e *IPTG*. Se seleccionaron las colonias blancas, correspondientes a las células que incorporaron plásmidos con inserto.

14.6 Secuenciación

Los clones obtenidos fueron secuenciados en el servicio de secuenciación del INGEBI. Aproximadamente 500 ng de plásmido fueron utilizados como sustrato en reacciones de secuenciación con dideoxinucleótidos marcados, e inyectadas en un secuenciador ABI 3100 DNA Sequencer (Amersham).

14.7 Hibridaciones de ácidos nucleicos

14.7.1 Marcación de sondas con fósforo radioactivo

Las sondas se marcaron mediante la reacción con la enzima T4 polinucleótido kinasa (PNK, Promega). La mezcla de reacción contenía en 10 µl de solución acuosa: 100 ng del oligonucleótido a marcar, *buffer* de la enzima 1X (Promega) 1 µl de ³²P γATP (3000 Ci/mmol, 150 µCi/ml) y 1U de enzima. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora. La reacción se detuvo por agregado de 50 µl de *buffer* TE. El oligonucleótido marcado fue purificado en columnas conteniendo resina Biogel P4 (Bio-Rad). La centrifugación se llevó

a cabo durante 2 min a 2000 rpm en una centrífuga de mesa (TC6, Sorvall). Los 60 µl de sonda marcada y purificada fueron recuperados en un tubo *ependorf* y guardados a -20°C hasta su utilización.

14.7.2 Hibridación *in situ* fluorescente

14.7.2.1 Fijación de células

1 ml de muestras de barro se fijaron durante 3 h con 3 volúmenes de paraformaldehído 4% preparado en el momento (Amann et al., 1995). Luego se centrifugaron durante 10 min a 7000 g, y se descartó el sobrenadante. Se lavaron 2 veces con *buffer* PBS 1X, y se resuspendieron en etanol:PBS (50:50), en el volumen original.

Para el conteo de células, las muestras fueron sometidas a una disrupción mecánica de los *flocs* en *Beadbeater* durante 2 minutos en intervalos de 30 s en hielo, utilizando bolitas de sílica de 0,5 mm de diámetro.

14.7.2.2 Preparación de portaobjetos

Los portaobjetos se sumergieron en agua y detergente durante 1 hora, se enjuagaron con agua corriente y luego con agua destilada. Se secaron y se embebieron durante 1 min en una solución de gelatina 0,1% p/v y CrKSO_4 0,01% p/v a 70°C . Se dejaron secar a temperatura ambiente.

14.7.2.3 Hibridación *in situ*

3 µl de muestras fijadas de barro fueron depositados en forma de *spot* en los portaobjetos recubiertos en gelatina. Se dejaron secar y se deshidrataron durante 3 min en soluciones acuosas de concentración creciente de etanol (50%, 80% y 96%). Se dejaron secar a temperatura ambiente.

Se preparó una cámara húmeda consistente en un tubo *falcon* de 50 ml, conteniendo en su

interior un filtro (Whatman) embebido en la solución de hibridación. La cámara fue equilibrada a la temperatura de hibridación.

10 μ l de solución de hibridación para FISH fueron depositados sobre cada *spot* en los portaobjetos, y se introdujeron en la cámara húmeda. La reacción de hibridación se llevó a cabo a 46°C en un horno de hibridación (Amersham) durante 2 h. Los lavados se realizaron durante 30 min a 48°C con 50 ml de solución de lavado (Tabla 3, página 41). Luego del lavado se enjuagaron los portaobjetos en agua destilada para eliminar las sales y se dejaron secar en el mismo horno.

14.7.2.4 Tinción con DAPI

Sobre cada *spot* se depositaron 5 μ l de solución de DAPI (1 μ g/ μ l), y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min. Luego se realizó un enjuague de 30 s en etanol 80%, y otro en agua destilada. Se dejó secar en el horno de hibridación y se adhirieron los cubreobjetos sobre 3 μ l de solución de montaje con Mowiol 4-88 (Hoechst), para evitar la pérdida de la señal de fluorescencia.

Se observó al microscopio de fluorescencia (DM LB, Leica), con los filtros correspondientes (I3 para isotiocianato de fluoresceína, Y3 para cy3, A para DAPI).

14.7.3 Hibridación en membrana con sondas radioactivas

14.7.3.1 Transferencia de ARN a membrana para dot blot

2 μ l de ARN extraído (1 μ g/ μ l) se mezclaron con 3 volúmenes de glutaraldehído 2% v/v, y se llevaron a un volumen de 250 μ l con agua destilada libre de RNAsas conteniendo 1 μ g de poliA. La membrana de nylon (HybondN+, Amersham) se prehumedeció en buffer SSC 6X, y se sembraron las muestras en 250 μ l totales utilizando un filtro Minifold (Schleicher and Schuell) aplicando un suave vacío. La membrana se lavó 2 veces con SSC 6X. El ARN se unió covalentemente a la membrana por irradiación con luz ultravioleta utilizando un

irradiador *Stratalinker* (Stratagene).

14.7.3.2 Transferencia a membrana a partir de DGGE

El ADN se transfirió desde el gel a una membrana de nylon (HybondN+, Amersham) utilizando una celda de electrotransferencia semi seca (Bio-Rad).

Tres filtros Whatman, el gel, la membrana y otros tres filtros Whatman apilados en orden se equilibraron durante 15 min en *buffer* TAE 0,5 X. Se depositaron en la cuba de transferencia, las burbujas se eliminaron cuidadosamente y el ADN se transfirió a la membrana durante 1 hora a amperaje constante 300 mA (voltaje inicial: aproximadamente 11 V). Luego se tomó la membrana y se apoyó durante 10 min sobre 3 filtros Whatman embebidos en NaOH 0,4 N para desnaturalizar el ADN. La membrana se lavó durante 10 min con *buffer* SSC 2X y se secó en estufa a 42°C durante 30 min. El ADN se unió covalentemente a la membrana mediante la irradiación con luz ultravioleta utilizando un irradiador *Stratalinker*.

14.7.3.3 Hibridación en membrana

La hibridación se llevó a cabo mediante un método modificado de Ausubel et al., 1998. La membrana se embebió en 20 ml de solución de hibridación en una botella de vidrio para hibridación. Se pre-hibridó durante 3 horas a 42°C en horno de hibridación (Amersham).

La sonda marcada se calentó a 95°C durante 10 minutos y se agregó a 20 ml de solución de hibridación precalentada a 42°C (1 ng de sonda/ml de solución de hibridación). La membrana se hibridó durante 20 h a la temperatura indicada en la **Tabla 3**.

Se realizaron dos lavados de 1 h a la temperatura indicada en la **Tabla 3**. Luego se realizaron 2 lavados adicionales de 30 min a temperatura ambiente. La membrana se expuso en una pantalla de tungsteno que emite fluorescencia a partir de la excitación por radioactividad (Storage PhosphoScreen, Pharmacia Biotech) durante 20 hs. Las imágenes se procesaron en un sistema de detección de fluorescencia (Storm, Pharmacia Biotech).

14.7.3.4 Estimación del porcentaje de ARNr 16S de cada grupo con respecto al ARNr 16S total

Se utilizó ARN extraído de cultivos puros de diferentes cepas bacterianas para construir curvas de calibración para cada sonda. Se utilizaron cultivos de 18 h en medio LB de *Agrobacterium tumefaciens* (**Alf1b**), *Chromobacterium violaceum* (**Bet42a**), *Acinetobacter johnsonii* (**Gam42a**), *Myroides odoratus* (**CF319A**), *Bacillus subtilis* (**LGC344**), *Micrococcus luteus* (**HGC69a**) y *Escherichia coli* (**Eub338**). Los datos fueron normalizados expresándolos como fracción de el ARN de *Bacteria* total en cada muestra, determinado por la hibridación con la sonda **Eub338**.

15 Analisis de datos

15.1 Analisis filogenéticos

Los cromatogramas de las secuencias de ADN se visualizaron y editaron en el programa Chromas (www.techne lysium.com.au/chromas.html). Las búsquedas en las bases de datos del *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) fueron realizadas mediante la opción BLAST (Altschul et al., 1990). El alineamiento de las secuencias se realizó por medio del programa *ClustalX* (Thompson et al., 1997). Los árboles filogenéticos se construyeron mediante los métodos de distancia, máxima parsimonia y máxima verosimilitud (*maximum likelihood*) utilizando el programa PHYLIP (Phylogeny Inference Package, Version 3.5, <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip>). Para los dos primeros métodos se utilizó el método de replicación de *bootstrap* como validación estadística, que genera 100 sets de datos virtuales a partir del reordenamiento de los datos originales (programa SEQBOOT en PHYLIP). Se computaron los 100 árboles correspondientes y se construyó un árbol consenso (programa CONSENSE en PHYLIP).

Los resultados de los análisis filogenéticos obtenidos mediante los tres métodos

mencionados se validaron mediante la construcción de un árbol consenso posterior (programa CONSENSE en PHYLIP).

Los árboles contruidos fueron visualizados utilizando el programa *Tree View*, version 1.6.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.uk/rod/rod.html>), ó *NJ plot* (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>).

15.2 Diseño de sondas de oligonucleótidos

Las secuencias específicas de cada grupo se diseñaron mediante la utilización de la herramienta *probe design* en el software ARB (<http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de/pub/ARB>) (Ludwig *et al.*, 2004), ó mediante la modificación de sondas existentes en la literatura.

La especificidad de las secuencias obtenidas fue confirmada utilizando la herramienta *probe match* del Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>).

15.3 Análisis de similitud entre perfiles de DGGE

15.3.1 Cálculo de índices de similitud

La similitud entre perfiles de DGGE fue estimada mediante el cálculo del índice de similitud de Dice en forma porcentual (Clarke y Warwick, 2001):

$$C_s = \frac{2j}{(a+b)} * 100$$

Donde *j* es el número de bandas comunes a dos muestras de las comunidades A y B, mientras que *a* y *b* corresponden a la cantidad de bandas en las muestras A y B respectivamente.

15.3.2 Análisis de ordenamiento multidimensional

El análisis de ordenamiento multidimensional (*multidimensional scaling*, MDS) interpreta los valores relativos de similitud entre comunidades de manera que los *rangos* de las similitudes se reflejan en un ordenamiento espacial. De esta manera, las comunidades que se parecen más entre sí se ubican más cerca y *viceversa*. Este análisis realizó mediante el programa de estadística no paramétrica PRIMER E-Ltd. (Plymouth Marine Laboratory, UK), a partir de las distancias entre los perfiles de DGGE, calculadas como **1- Cs** (índice de Dice).

15.3.3 Análisis de agrupamiento con *bootstrap*

La matriz de presencia-ausencia de bandas generada a partir del DGGE fue utilizada para generar 100 *sets* de datos mediante el método de *bootstrap*, utilizando el programa SEQBOOT en PHYLIP. Cada *set* de datos fue utilizado para construir una matriz de distancia utilizando **1-Cs** (índice de Dice) como medida de distancia con el programa PRIMER-E. Las 100 matrices fueron cargadas en el programa NEIGHBOR de PHYLIP para construir 100 dendrogramas mediante el algoritmo de agrupamiento UPGMA, que toma los promedios de las similitudes dentro de los grupos como método de agrupamiento jerárquico. De estos 100 árboles, el árbol consenso fue computado con sus valores de *bootstrap* mediante el programa CONSENSE en PHYLIP. Las distancias originales fueron vueltas a cargar en el árbol consenso. La escala de distancias fue transformada en escala de similitud mediante la fórmula:

$$\text{Sim} = 1 - 2d$$

De manera de que los valores de similitud entre 2 muestras puedan calcularse como la escala desde la muestra hasta el nodo.

15.4 Cálculo de índices de diversidad

A partir del número y las intensidades relativas de las bandas para cada muestra se calcularon:

El índice de diversidad de Margalef (D):

$$D = (S-1)/\log N$$

donde S es el número de bandas y N es la suma de todas las intensidades de las bandas

El índice de dominancia de Simpson (L) y su inversa (1/L):

$$L = \sum n_i (n_i - 1) / (N (N - 1))$$

donde n_i es la intensidad de cada banda y N es la suma de todas las intensidades.

El índice de diversidad de Shannon (H'):

$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$

donde p_i es la abundancia relativa (proporción) de cada especie, definida como el número de organismos de la especie i sobre el número total de individuos de la comunidad. En este caso p_i fue estimado como la intensidad de cada banda sobre el número total de intensidades de todas las bandas de cada perfil.

15.5 Analisis estadísticos

Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa STATISTICA 5.5 (StatSoft Inc., Tulsa, OK).

15.5.1 Análisis estadístico de las medias de los índices de similitud

Se utilizaron los índices de similitud de Dice para cada par de perfiles de DGGE calculados en la sección 15.3.1. Los índices de similitud fueron estimados entre comunidades independientemente del tiempo. Los valores de similitud correspondientes fueron definidos como variables y agrupados (van Versefeld y Roling, 2004).

El número mínimo de valores en cada grupo (N) fue de 10. Luego de constatar la homocedacia y normalidad de los datos la significancia estadística de las diferencias entre las medias de los índices de similitud fue evaluada mediante el Análisis de Varianza (ANOVA), y comparaciones *a posteriori* (unequal N HSD).

15.5.2 Análisis estadístico de los índices de diversidad

Las diferencias entre los índices de diversidad se evaluaron estadísticamente mediante el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de contrastes no paramétricos del tipo Scheffé (Zar, 1999). Cada grupo de valores contó con un N=4.

15.5.3 Análisis estadístico de conteos de células al microscopio

Los conteos se realizaron con un N>1000 células y k=5 a 8 campos por muestra. Se estimaron las abundancias relativas de las células que hibridaban con cada sonda con respecto a DAPI y se compararon estadísticamente. Los análisis estadísticos utilizados fueron: ANOVA del tipo anidado ó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de contrastes no paramétricos del tipo Scheffé en el caso de no cumplirse los supuestos del ANOVA.

Resultados

16 Degradación del nonilfenol polietoxilado en los reactores

16.1 Operación de los reactores

A partir de la puesta en marcha de los reactores se llevaron a cabo mediciones periódicas de los parámetros operativos que se indican en la **Tabla 5**. Luego de 4 meses, la operación de los reactores se consideró estabilizada, con una variabilidad menor a 5% en los valores de remoción de materia orgánica y características de sedimentación (IVL). Los resultados de la medición de los parámetros operativos en los reactores entre los meses 4 y 16 de operación se observan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Parámetros operativos de los reactores, medidos durante un período de un año luego de la aclimatación.

Tratamiento	NPEO ₁₀		Control	
	N1	N3	C2	C4
Oxígeno disuelto (mg/l)	>4	>4	>4	>4
SSVLM (mg/l)	2030±190	2005±270	2300±160	2410±245
TRS (d)	44	42	50	52
eficiencia de remoción de la DBO (%) ^a	96.1±4.0	95.8±5.4	97.2±2.2	98.4±6.2
eficiencia de remoción de la DQO (%) ^a	85.9±4.3	83.2±3.6	98.3±6.3	94.0±5.5
IVL (ml/g SSLVM)	16±2	16±4	92±7	80±10

Error: desvío estándar. SSVLM: sólidos suspendidos volátiles en el licor mezcla. TRS: tiempo de residencia de sólidos. IVL: índice volumétrico de lodos. ^b calculado como (final-inicial)/inicial * 100.

Los cuatro reactores presentaron buena capacidad de remoción de materia orgánica biodegradable (eficiencia de remoción de la DBO>95%). Sin embargo, la eficiencia de remoción de la DQO en los reactores alimentados con NPEO₁₀ resultó menor que en los controles (**Tabla 5**). Esto significa que en los reactores alimentados con NPEO₁₀ permaneció una cierta cantidad de materia orgánica remanente al final del ciclo de alimentación no susceptible a la biodegradación en las condiciones del ensayo de DBO.

16.2 Degradación de materia orgánica oxidable en los reactores

La cinética de degradación de materia orgánica oxidable fue analizada en los 4 reactores. La materia orgánica oxidable presente en el medio de alimentación se degradó en gran parte en las primeras horas, luego la degradación disminuyó llegando a una asíntota (**Figura 15**). La cinética de degradación fue ajustada a una función exponencial decreciente, correspondiente a la fórmula

$$\% \text{remoción DQO} = a * e^{(-b/t)}$$

donde **a** y **b** son los valores de remoción máxima de DQO y de vida media de la demanda química de oxígeno respectivamente, y **t** el tiempo. Los valores de estos parámetros para los 4 reactores, que se muestran en la **Tabla 6**, indican que la mayor parte de la materia orgánica oxidable es removida en las primeras horas de operación. La diferencia entre la vida media de degradación en los reactores alimentados con NPEO₁₀ respecto de los controles se debe a la más lenta degradación del detergente y sus productos intermediarios.

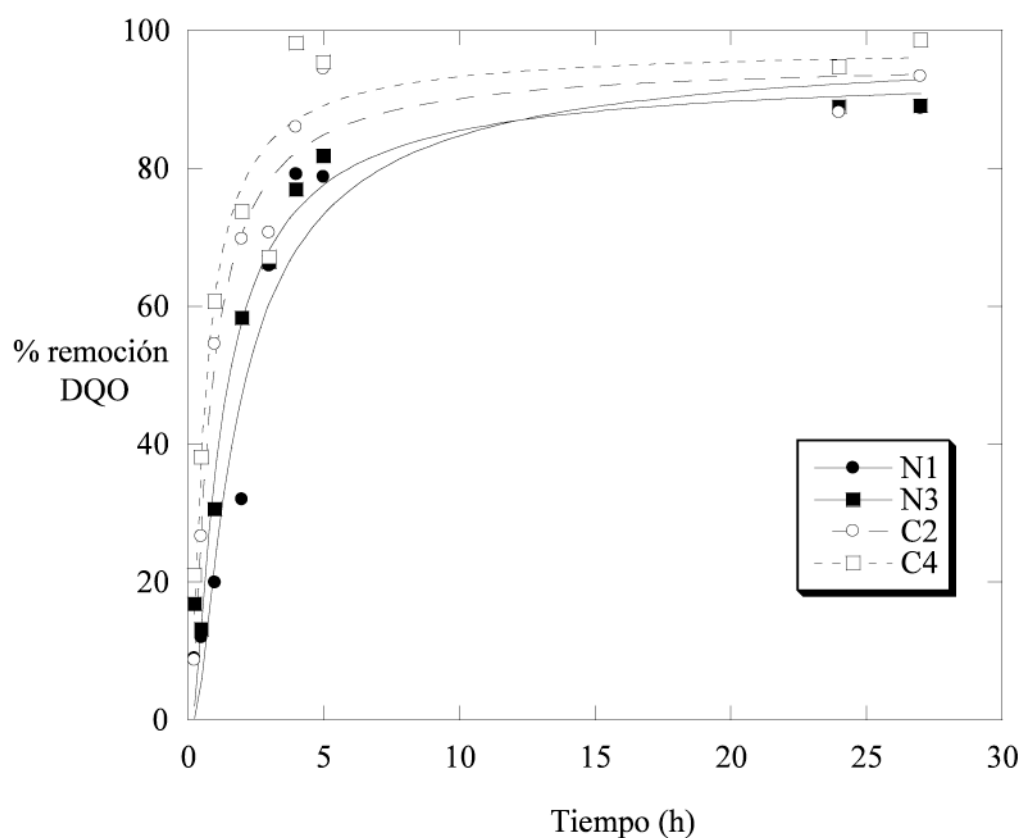


Figura 15. Degradación de la materia oxidable en los reactores (medida como demanda química de oxígeno) a lo largo del tiempo. Tiempo 0: momento de la alimentación de los reactores

Tabla 6. Parámetros de la cinética de degradación de la materia oxidable en los reactores.

reactor	parámetro		R ²
	a	b	
N1	98,0±6,7	1,4±0,3	0,94
N3	94,2±4,1	1,0±0,1	0,96
C2	95,7±3,0	0,6±0,1	0,97
C4	97,7±4,4	0,4±0,1	0,92

Los parámetros fueron estimados por ajuste a una ecuación exponencial $\%degradación = a \cdot e^{(-b/t)}$.

R²=coeficiente de correlación.

Los productos de degradación mayoritarios del nonilfenol etoxilado observados en los reactores fueron el nonilfenol dietoxilado (NPEO₂) y en menor medida el nonilfenol monoetoxilado (NPEO₁) y el nonilfenol (NP) (**Figura 16**).

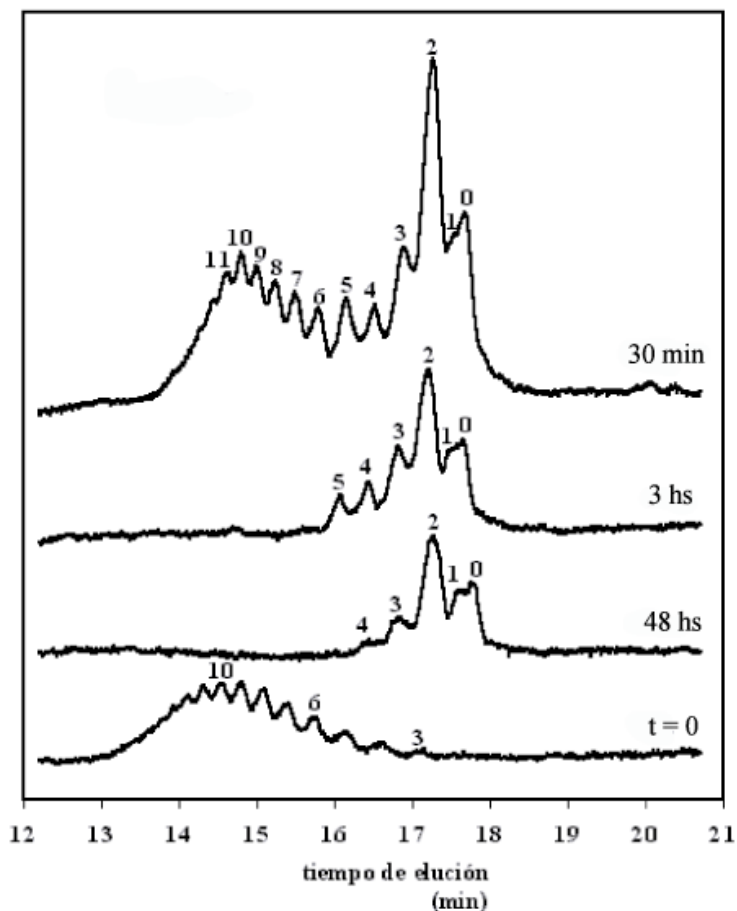


Figura 16. Electroferograma mostrando la distribución de los productos de degradación del NPEO₁₀ a lo largo del tiempo. $t=0$: tiempo correspondiente al momento de la alimentación del reactor. Los números sobre los picos corresponden al número de unidades etoxiladas de los etoxímeros.

El hecho de que a las 48 horas del agregado del NPEO₁₀ se observen todavía en los reactores los etoxímeros de cadena más corta confirma que la persistencia de materia orgánica remanente que se observa en la **Tabla 5** se debe al carácter recalcitrante de los productos de biodegradación primaria del NPEO₁₀.

16.3 Aclimatación de los barros de los reactores al NPEO₁₀

En la **Figura 17** se muestra que entre un 50 y 60% de la degradación del detergente mediada por los barros activados de los 2 reactores que habían estado alimentados con NPEO₁₀ por más de 1 año (N1 y N3), se produjo en el término de 48 horas. Por el contrario, los barros provenientes de los controles no degradaron el detergente al final de este mismo período (**Figura 17**).

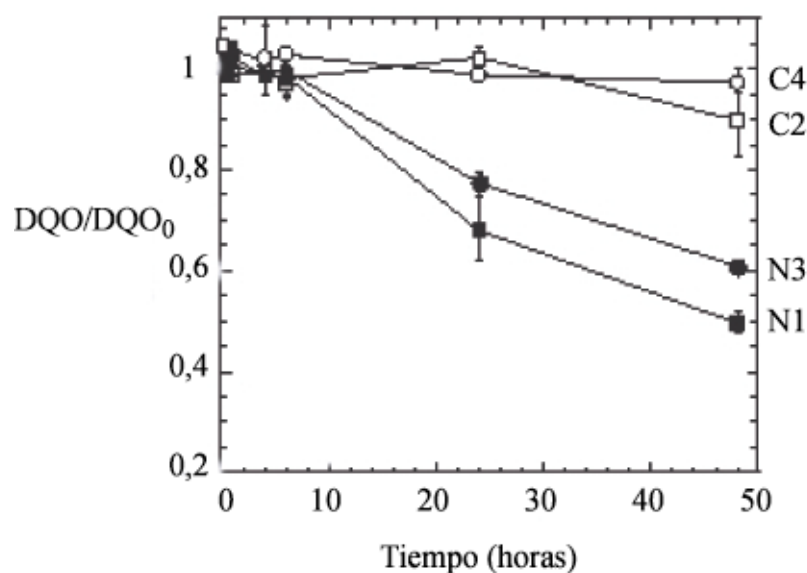


Figura 17. Degradación del NPEO₁₀ mediada por el barro de los reactores. DQO/DQO₀: proporción remanente con respecto a la DQO inicial. N1 y N3: barros provenientes de los reactores tratados. C2 Y C4: barros provenientes de los reactores control.

16.4 Cinética de degradación del NPEO₁₀

La cinética de degradación del detergente se estudió mediante experimentos de biodegradabilidad del NPEO₁₀ con barro activado de uno de los reactores (N1), abarcando un período de 20 días (**Figura 18**).

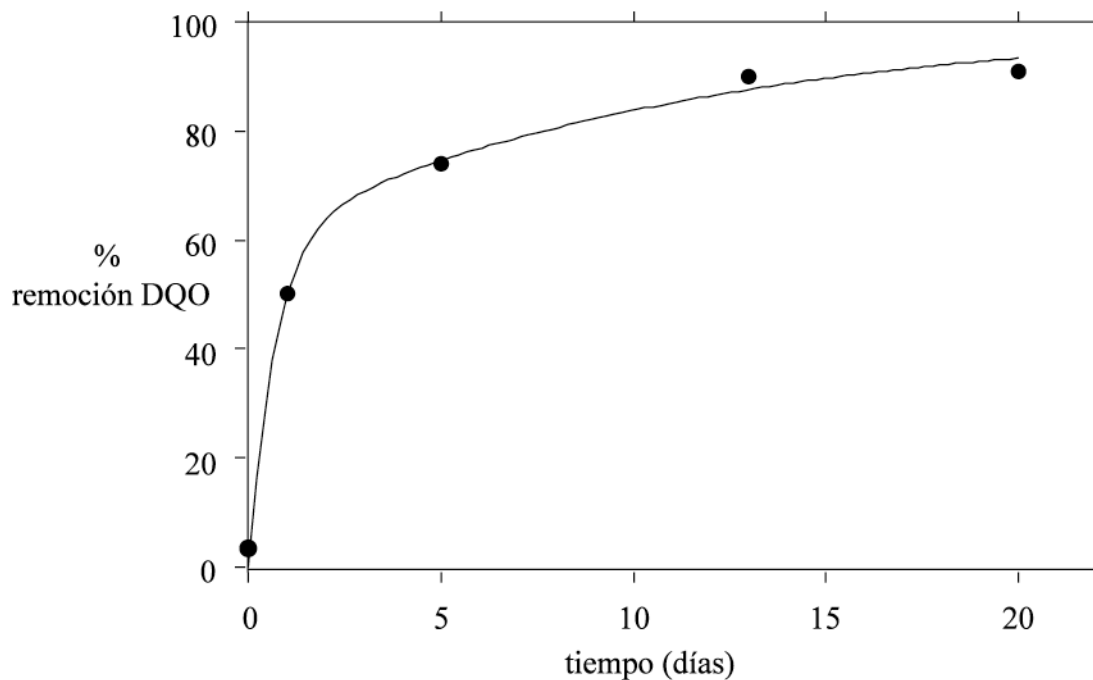


Figura 18. Cinética de degradación del NPEO₁₀.

El porcentaje de biodegradación, medido como demanda química de oxígeno (DQO) fue ajustado por medio de una curva biexponencial correspondiente a la fórmula

$$\% \text{ remoción DQO} = \alpha 1 * e^{(\tau 1/t)} + \alpha 2 * e^{(\tau 2/t)}$$

donde $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son 82% y 18%, y $\tau 1$ y $\tau 2$ corresponden a $-1,6$ días y $-11,5$ días respectivamente.

Este resultado demuestra que luego de la rápida degradación primaria del NPEO₁₀ se produce una acumulación de compuestos cuya biodegradación es un orden de magnitud más lenta.

17 Análisis comparativos de las comunidades bacterianas los reactores

Los barros activados de los reactores mostraron la típica estructura en *floc*, con agrupamiento de microorganismos y alta diversidad morfológica. La estructura de los *flocs* resultó diferente entre reactores sometidos a distintos tipos de alimentación (**Figura 19**).

En los reactores control, se observaron *flocs* irregulares intercalados por una variedad de filamentos diferentes. En los reactores alimentados con NPEO₁₀, se observaron *flocs* más compactos y pequeños, de aproximadamente 150 μm de diámetro. Se evidenció la presencia de ciliados sésiles y móviles (marcados con flechas, **Figura 19**), y menos cantidad de filamentos. Esta reducción en la cantidad de filamentos explica la disminución del índice volumétrico de lodos observado en los reactores tratados con respecto a los controles (SVI, **Tabla 5**).

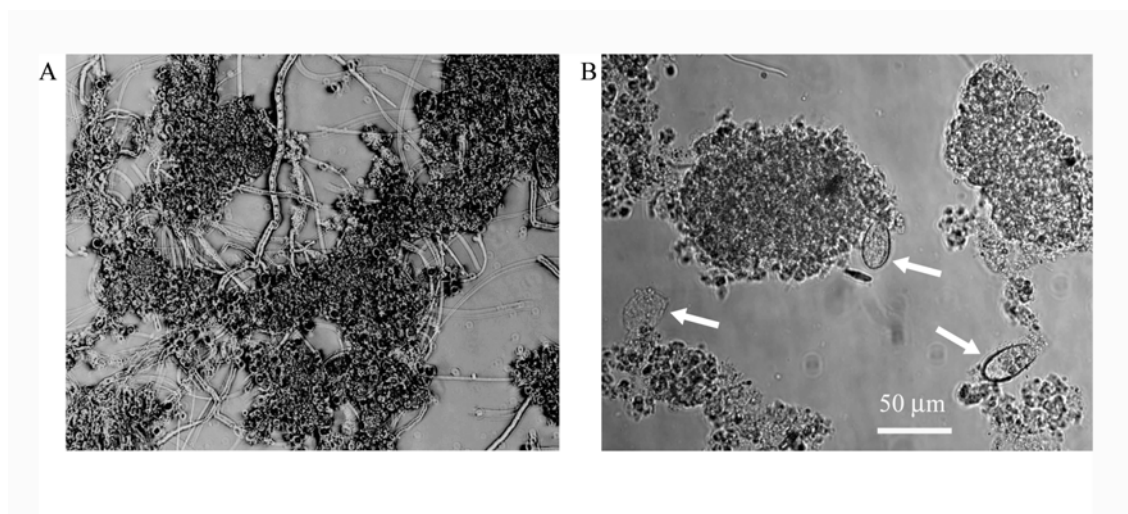


Figura 19. Microfotografías representativas de contraste de fase de los *flocs* de los reactores tomados a los 12 meses de operación. A- control. B- alimentado con NPEO₁₀.

17.1 Perfiles de las comunidades bacterianas obtenidos mediante electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (DGGE)

En la **Figura 20** se esquematizan la estrategia utilizada y los resultados obtenidos de las amplificaciones del gen para la subunidad pequeña del ARN ribosomal 16S (ADNr 16S), por PCR de tipo anidado a partir de ADN genómico de los barros activados.

En todos los casos se obtuvo ADN de peso molecular entre 10 y 20 kb, sin evidencias de degradación. Tomando como sustrato de la reacción el producto de la primer amplificación realizada con los cebadores *F8b* y *r1509*, se realizaron PCR anidadas utilizando los cebadores *f341b* específico del dominio *Bacteria*, y el universal *r534*. En ambos casos, los fragmentos obtenidos resultaron del tamaño esperado y no se evidenciaron fragmentos producto de amplificación inespecífica (**Figura 20**).

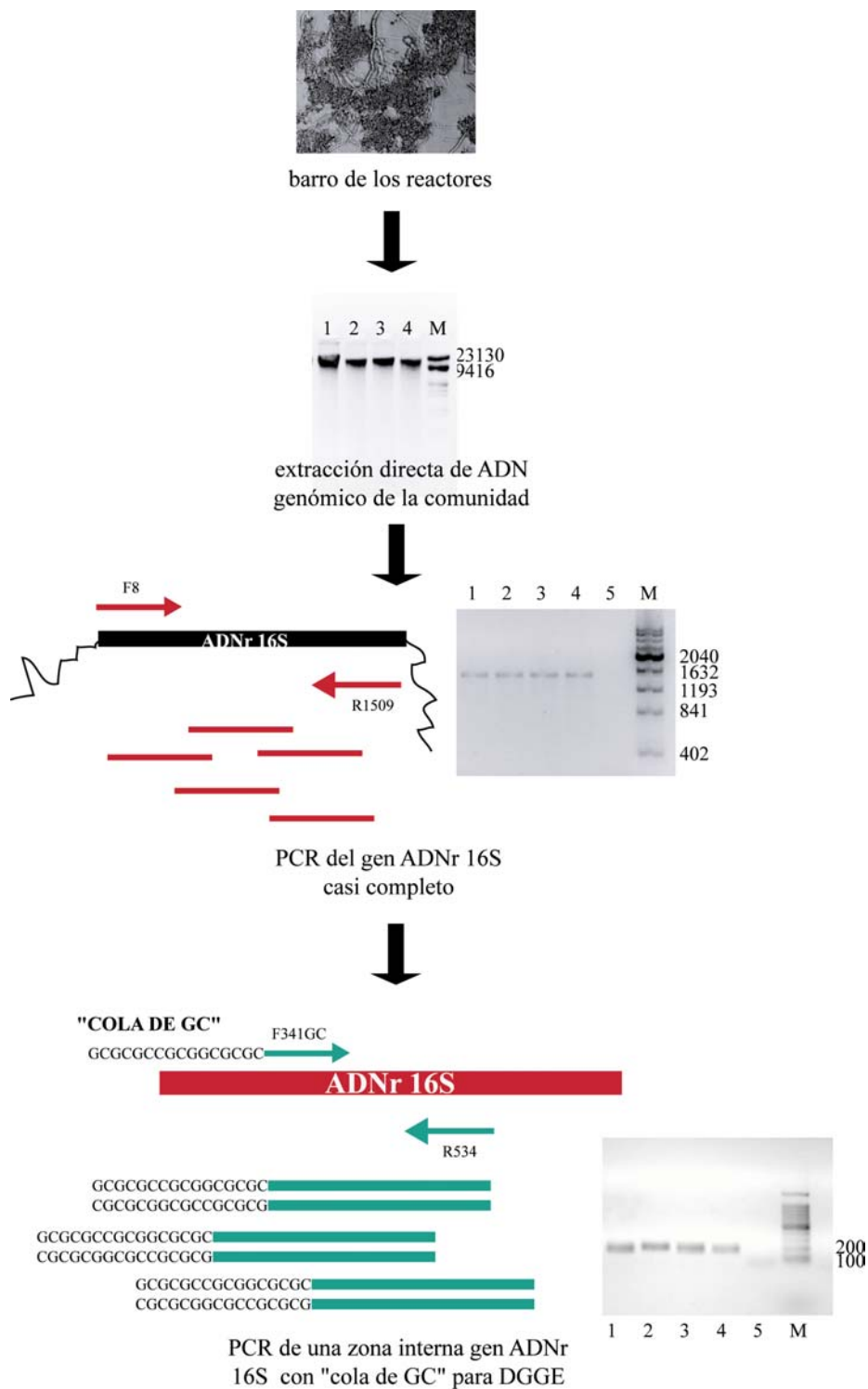


Figura 20. Amplificación de tipo anidado de fragmentos del gen ADNr 16S. Marcadores: Lambda HindIII, 400 bp ladder, 100bp ladder.

17.2 Análisis de similitud entre perfiles de DGGE

La variabilidad en la composición de las poblaciones bacterianas a distintos tiempos de operación y entre réplicas a igual tiempo de operación se observa en la **Figura 21**.

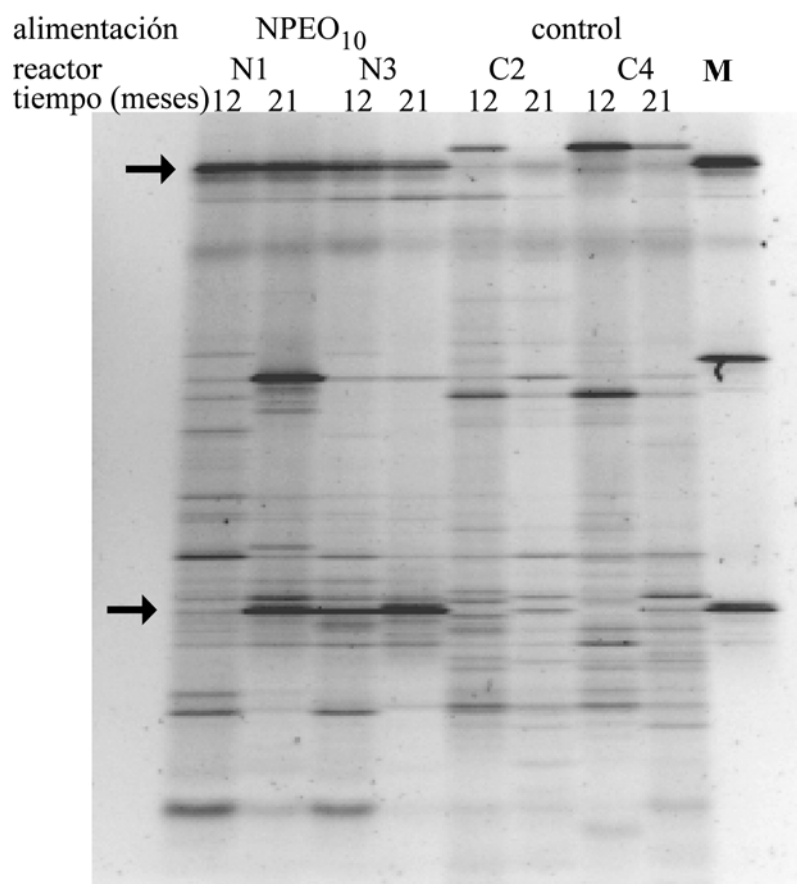


Figura 21. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) de fragmentos del gen ADNr 16S amplificados a partir de los reactores a 12 y 21 meses de operación. Calle M: marcador de migración electroforética.

Las comunidades de los barros activados presentaron una variabilidad que resulta evidente en los perfiles de DGGE de la **Figura 21**. A tiempos iguales, las réplicas de los reactores sometidos al mismo tratamiento eran similares pero no idénticas entre sí (calles 1 y 3, 2 y 4, y calles 5 y 7, 6 y 8, **Figura 21**). También se observa que la composición de la comunidad

de cada reactor se modificó a lo largo del tiempo (calles 1 y 2, 3 y 4, y calles 5 y 6, 7 y 8, **Figura 21**).

17.2.1 Análisis de ordenamiento multidimensional

Los reactores presentaron un patrón espacial en sus relaciones de similitud atribuible al tipo de alimentación recibida. Se pudieron definir 2 grupos que contienen los reactores sometidos a cada tipo de alimentación. La mayor similitud entre las comunidades de los reactores alimentados con NPEO₁₀ con respecto a los controles quedó evidenciado por su mayor cercanía en el espacio (**Figura 22**).

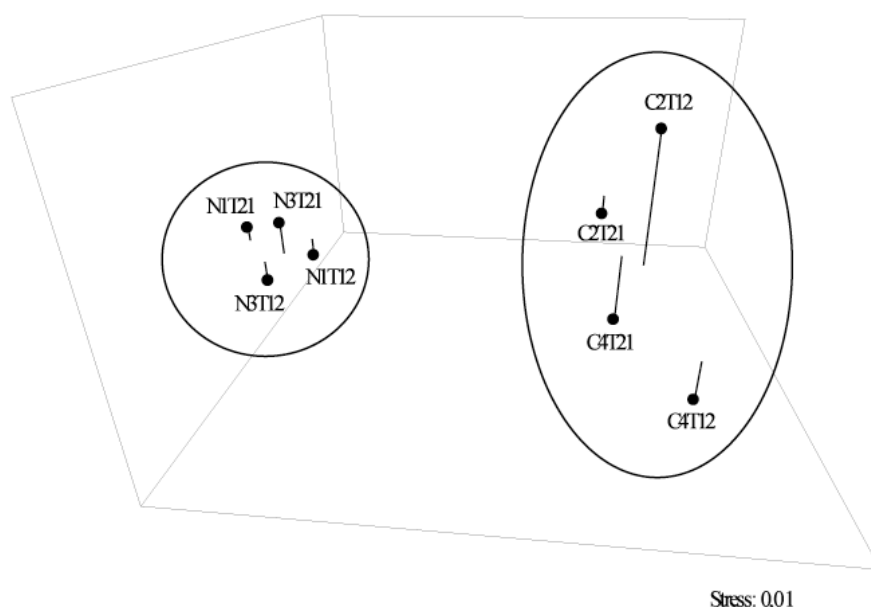


Figura 22. Ordenamiento multidimensional (MDS) a partir de los índices de similitud (Dice) entre perfiles de DGGE de las comunidades bacterianas de los reactores tratados con NPEO₁₀ y controles, a tiempos 12 y 21 meses de operación.

17.2.2 Análisis de agrupamiento

Un análisis de agrupamiento de los mismos datos de DGGE permitió dividir las comunidades bacterianas de los reactores se dividieron en dos grupos de comunidades definidos por la presencia o no de NPEO₁₀, con valores de *bootstrap* de 97 y 81% respectivamente (**Figura 23**).

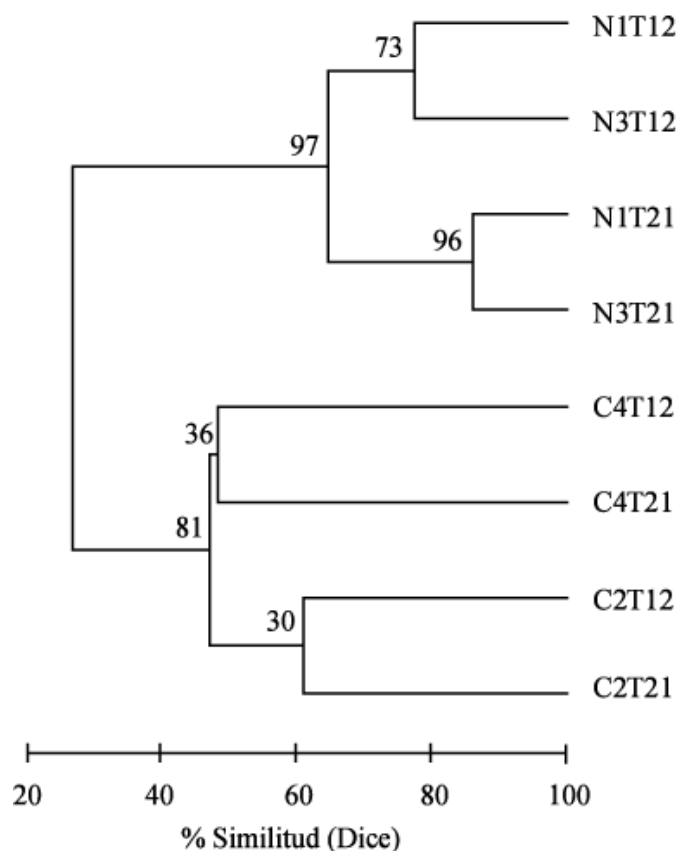


Figura 23. Análisis de agrupamiento a partir de perfiles DGGE de las comunidades bacterianas de los reactores. N1 y N3: reactores tratados con NPEO₁₀. C2 y C4: reactores control. T12 y T21: tiempos correspondientes a 12 y 21 meses del inicio del experimento. Los números en los nodos indican los valores de *bootstrap* con respecto a un total de 100 repeticiones.

En las comunidades de los reactores alimentados con NPEO₁₀, los reactores réplica resultaron más similares entre sí que las comunidades de un mismo reactor a tiempos diferentes. Esto se observa en la **Figura 23** donde a tiempos iguales, los reactores réplica

alimentados con NPEO₁₀ agrupan juntos con alto *bootstrap*.

Este resultado sugiere que los cambios temporales en las comunidades de los reactores tratados se dieron de una forma ordenada. Los cambios temporales ordenados son característicos de un proceso de *sucesión*. No se evidenció un patrón de este tipo en los controles, por lo cual postulamos que el NPEO₁₀ sería el factor que dirige el proceso de sucesión en las comunidades de los reactores alimentados con este detergente.

17.2.3 Análisis estadístico de índices de similitud

Las medias de los índices de similitud entre comunidades se compararon mediante un análisis estadístico. La magnitud de estas diferencias resultó dependiente de las comunidades comparadas, pero en todos los casos las diferencias detectadas resultaron significativas (**Figura 24**)

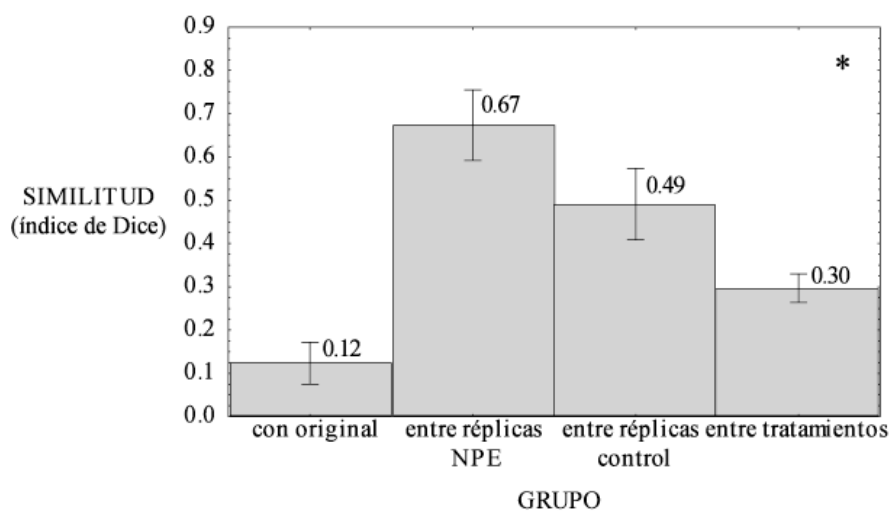


Figura 24. Comparación de índices de similitud de Dice calculados a partir de pares de perfiles de DGGE. Los grupos fueron definidos en base a los tipos de muestras comparadas. *Con original*: comparación entre barros de todos los reactores y el inóculo original. *Entre réplicas NPEO₁₀*: comparación entre reactores réplica alimentados con NPEO₁₀. *Entre réplicas control*: comparación entre reactores réplica control. *Entre tratamientos*: comparación entre reactores alimentados con NPEO₁₀ y reactores control. N>10. *p<0.02 para todas las comparaciones *post hoc*.

Las comunidades microbianas de los barros activados sufrieron modificaciones al ser

trasladados a escala de laboratorio, debido a lo cual la similitud entre las comunidades de los reactores y el inóculo original resultó muy baja (*con original*, **Figura 24**).

La similitud entre reactores sometidos a distinto tipo de alimentación (*entre tratamientos*, **Figura 24**) resultó significativamente más baja que entre reactores sometidos al mismo tipo de alimentación (*entre réplicas*, **Figura 24**). Esto significa que la composición del medio de alimentación constituyó un factor ambiental fundamental en la estructuración de estas comunidades.

Los reactores alimentados con NPEO₁₀ se caracterizaron por una mayor *replicabilidad*, ya que las comunidades de los reactores réplica alimentados con NPEO₁₀ resultaron más similares entre sí que las comunidades de los controles (*entre réplicas*, **Figura 24**).

17.3 Comparación entre las comunidades bacterianas de los reactores y las seleccionadas en cultivo

Uno de los factores responsables del mayor grado de reproducibilidad en los reactores alimentados con NPEO₁₀ fue la presencia de poblaciones representadas por bandas intensas en los DGGE, comunes a los barros activados provenientes de ambas réplicas (**Figura 21**). Una forma de evaluar la identidad de las poblaciones distintivas es a través de su aislamiento en cultivo. Sin embargo, como se observa en la **Figura 24**, la composición de grupos bacterianos de las comunidades de los reactores se modificó drásticamente luego de 48 h de cultivo en medio rico (**Figura 25**).

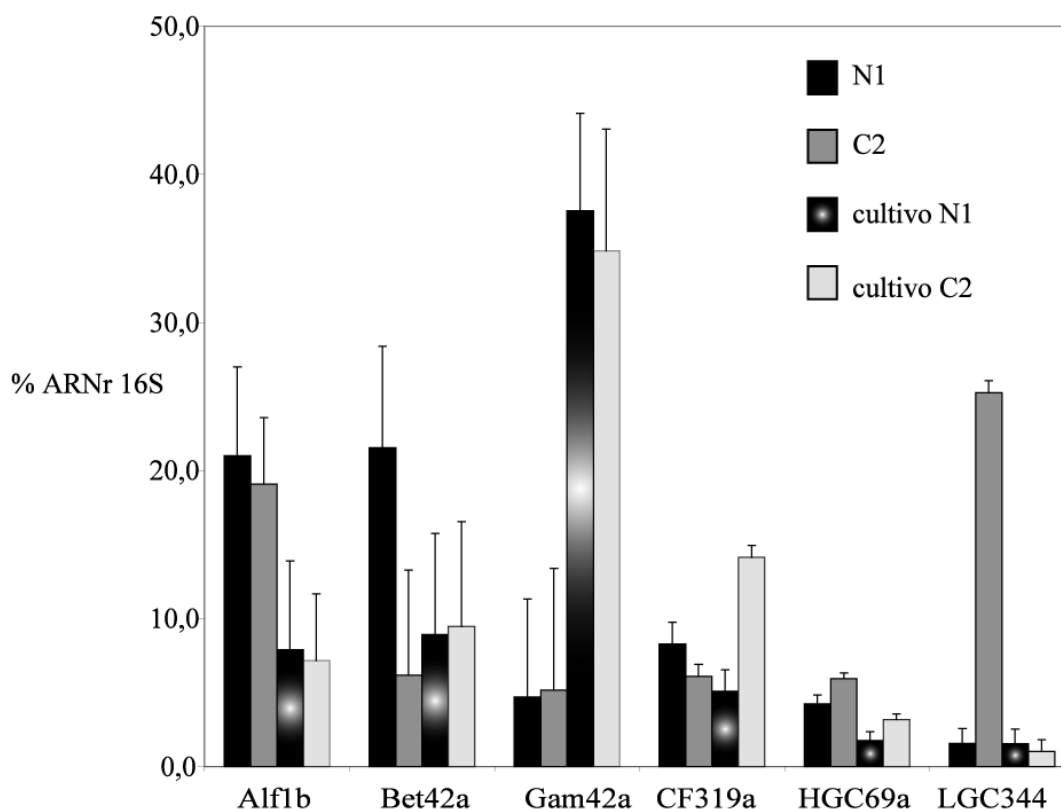


Figura 25. Estimación del porcentaje de ARN ribosomal (promedio \pm desvío *standard*) de grupos generales dentro del dominio *Bacteria*, estimado mediante hibridación *dot blot* en los reactores N1 y C2 y sus correspondientes cultivos en medio LB.

Las bacterias pertenecientes a las clases *Alfa* y *Betaproteobacteria*, así como las *Actinobacteria*, resultaron subrepresentadas en los cultivos con respecto a la comunidad original de los reactores. Esto se observa en los porcentajes de ARN ribosomal estimado por hibridación con las sondas *Alf1b*, *Bet42a* y *HGC69a* respectivamente. (**Figura 25**). Por el contrario, las *Gammaproteobacteria* fueron seleccionadas positivamente en los cultivos: mientras que sólo un 5% del ARN ribosomal hibridó con la sonda *Gam42a* en los reactores, un 40% del ARN ribosomal correspondía a miembros de este grupo en los cultivos (**Figura 25**).

Por otro lado, las diferencias observadas entre reactores alimentados con NPEO₁₀ y controles no se mantuvieron en los cultivos respectivos. Este es el caso de las

Betaproteobacteria, más abundantes en los reactores alimentados con NPEO₁₀, y *Actinobacteria*, más abundantes en los controles (***Bet42a*, *HGC69a***, **Figura 25**). Ninguno de los dos grupos presentaron diferencias en las abundancias relativas de su ARN ribosomal en los cultivos.

Las bacterias pertenecientes al grupo *Cytophaga-Flavobacteria* (***CF319***, **Figura 25**), invirtieron sus abundancias relativas en los cultivos con respecto a las abundancias que presentaban en los reactores.

Sin embargo, la utilización de medios ricos puede no ser conveniente por favorecer a los microorganismos de crecimiento rápido. Por lo tanto se utilizaron una batería de medios de cultivo para aislar las poblaciones de interés. Estos medios incluyeron una variedad de fuentes de carbono y la presencia de vitaminas. Se utilizaron también los sobrenadantes de los reactores alimentados con NPEO₁₀ como medios de cultivo (ver sección 13).

Las comunidades de los reactores se compararon con las de sus respectivos cultivos en diferentes medios, mediante análisis de ordenamiento multidimensional a partir de perfiles de DGGE.

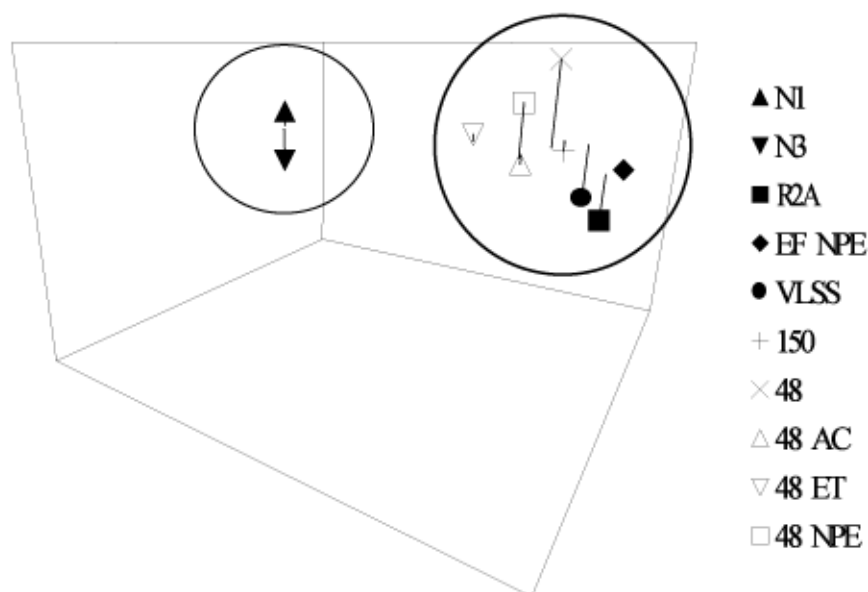


Figura 26. Análisis de ordenamiento multidimensional de los índices de similitud (Dice) entre los perfiles DGGE de las comunidades bacterianas de los reactores alimentados con NPEO₁₀ (N1 y N3) y de los cultivos en diferentes medios a partir de inóculo de estos reactores. Los diferentes medios utilizados figuran en la sección 13.

En la **Figura 26** se observa que las comunidades bacterianas de los reactores alimentados con NPEO₁₀ fueron muy similares entre sí, mientras que las comunidades de los cultivos formaron un agrupamiento diferente de las comunidades de los reactores.

El agrupamiento observado en las comunidades de los cultivos resultó independiente de la fuente de carbono utilizada y del tipo de nutrientes presentes en el medio (**Figura 26**). Aún en los cultivos realizados en sobrenadantes filtrados del mismo reactor se observó una baja similitud con respecto a la comunidad original (**Figura 26**). Este resultado está indicando que factores más complejos que la composición del medio son necesarios para la selección de las poblaciones seleccionadas por el NPEO₁₀.

Cabe mencionar que en los DGGE de las muestras obtenidas de ningún medio de cultivo se observaron las bandas correspondientes a las poblaciones características de los reactores

alimentados con NPEO₁₀.

Por lo tanto, debido a los desvíos que presenta favoreciendo a algunos grupos filogenéticos y seleccionando negativamente a otros, el análisis de cultivos a partir de los barros activados no puede considerarse representativo de las comunidades microbianas que allí habitan.

17.4 Análisis comparativo de la diversidad de las comunidades bacterianas

Los perfiles de DGGE de las comunidades de los barros activados fueron utilizados para realizar un análisis de la diversidad a lo largo del tiempo de operación de los reactores. La diversidad de las comunidades bacterianas mostró a largo plazo una tendencia decreciente en los reactores alimentados con NPEO₁₀. Hasta los 12 meses de operación no se observaron diferencias significativas en la diversidad de las comunidades. A los 21 meses de operación, la diversidad de los reactores alimentados con NPEO₁₀ resultó significativamente menor que los controles, tal como indican los índices de diversidad de Margalef (D) y Shannon (H) (**Figura 27**).

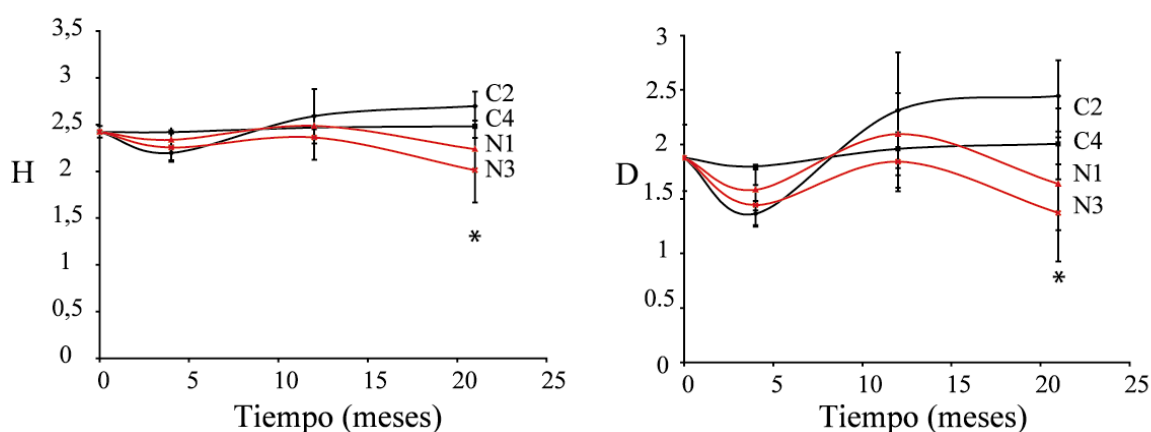


Figura 27. Índices de diversidad calculados a partir de perfiles DGGE de comunidades bacterianas de los reactores a lo largo del tiempo de operación. D: índice de diversidad de Margalef. H: índice

de diversidad de Shannon. $N=4$. $*p<0,001$.

Los índices de Shannon y de Margalef son afectados tanto por la riqueza (número de bandas en este caso) como por la dominancia (intensidad relativa de las bandas) (Magurran, 1988). Los dos componentes de la diversidad presentaron diferencias significativas entre reactores a los 21 meses también al ser analizados por separado (**Figura 28**). Los reactores alimentados con $NPEO_{10}$ presentaron menor número de bandas (**S, Figura 28**), y una mayor dominancia de especies bacterianas (**L, Figura 28**).

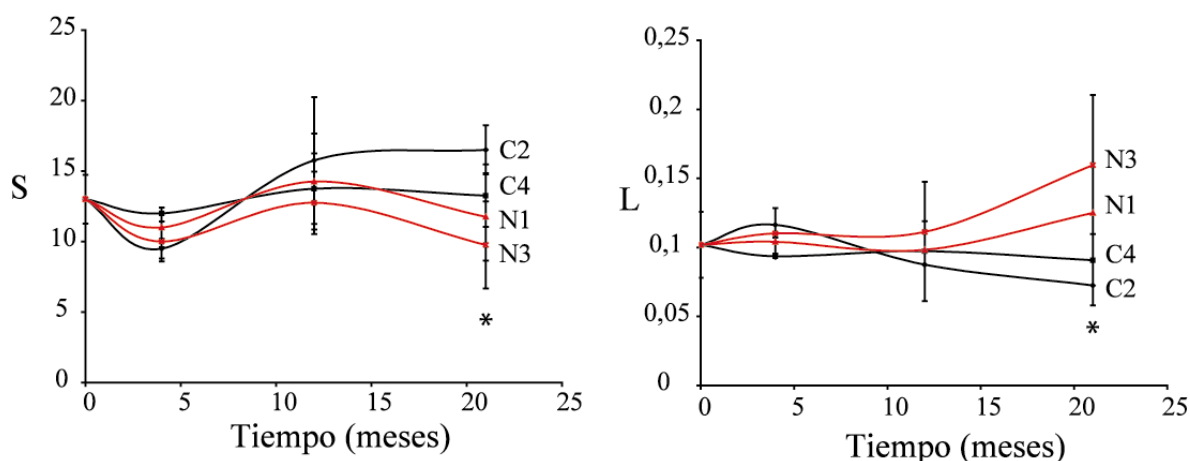


Figura 28. Número de bandas y valores de dominancia (índice de dominancia de Simpson) a lo largo del tiempo calculados a partir de perfiles DGGE de las comunidades bacterianas de los reactores.

18 Identificación y cuantificación de poblaciones dominantes en los reactores alimentados con $NPEO_{10}$

18.1 Composición de las comunidades bacterianas de los reactores

La composición de las comunidades bacterianas de los reactores, estimada con sondas para

distintos *phyla* y clases dentro del dominio *Bacteria*, resultó diferente en los reactores sometidos a los dos diferentes tipos de alimentación (**Figuras 29 y 30**).

La proporción de ARN ribosomal 16S de las *Betaproteobacteria* resultó significativamente mayor en los reactores alimentados con NPEO₁₀ que en los controles, mientras que la proporción del ARN ribosomal 16S de las *Actinobacteria* resultó significativamente menor (**Bet42a, HGC69a, Figura 29**).

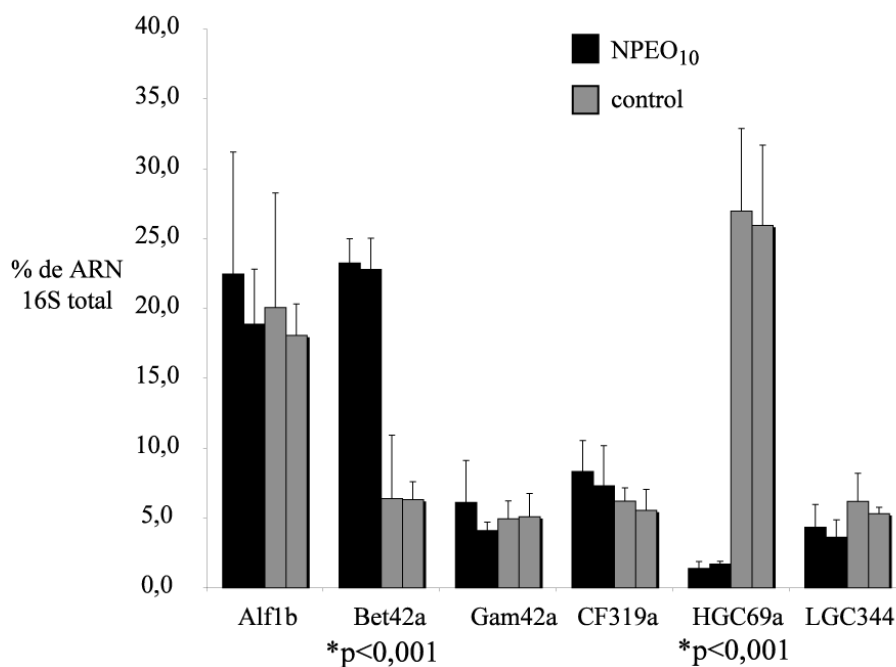


Figura 29. Porcentaje del ARN ribosomal total (promedio \pm desvío *standard*) de *phyla* y clases generales dentro del dominio *Bacteria* en las comunidades de los reactores, estimado por hibridación en membrana. p = valor de significancia entre reactores tratados y controles.

Concordantemente con los porcentajes de ARN ribosomal estimados a partir de hibridación en membrana, el porcentaje de células pertenecientes a la clase *Betaproteobacteria*, resultó significativamente mayor en los reactores alimentados con NPEO₁₀ (**Bet42a, Figura 30**). También pudo observarse un menor número de células de *Actinobacteria* en los reactores alimentados con NPEO₁₀ (**HGC69a, Figura 30**). Las *Alfaproteobacteria* mostraron una diferencia significativa entre reactores alimentados con NPEO₁₀ y controles (**Alf1b, Figura 30**), que no se evidenció en la abundancia de ARN ribosomal (**Figura 29**). En este caso

también se hallaron diferencias significativas entre las réplicas.

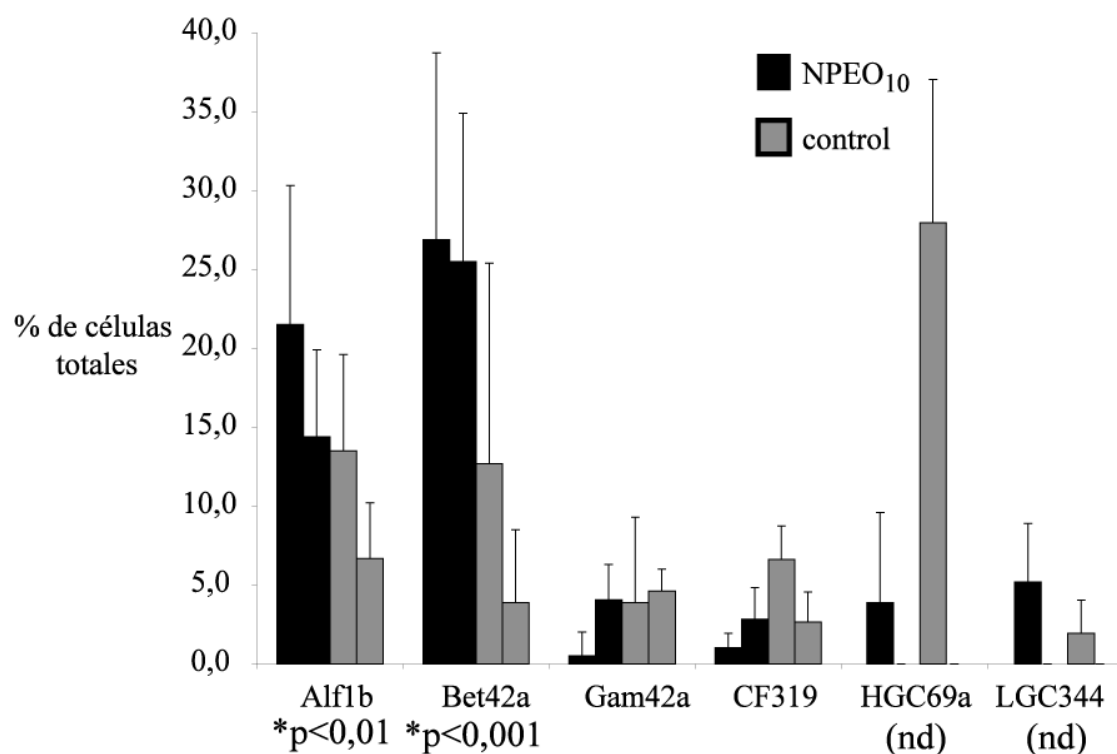


Figura 30. Porcentaje de células (promedio \pm desvío *standard*) estimado para distintos *phyla* y clases dentro del dominio *Bacteria* por hibridación *in situ* en barros activados de los reactores. p= valor de significancia estadística entre reactores tratados y controles. nd: no determinado.

Las *Gammaproteobacteria*, el grupo *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides*, y las bacterias pertenecientes al *phylum Firmicutes*, resultaron poco abundantes en todos los reactores y no presentaron diferencias significativas entre tratamientos (*Gam42a*, *CF319*, *LGC344*, **Figuras 29 y 30**). No se observaron diferencias significativas entre réplicas salvo en el caso de *Alf1b* mencionado anteriormente.

18.2 Identificación y cuantificación de las poblaciones distintivas de la alimentación con NPEO₁₀

En la **Figura 31** se ilustra esquemáticamente la estrategia utilizada para la identificación y cuantificación de las poblaciones dominantes, distintivas de la alimentación con NPEO₁₀ en los reactores N1 y N3. Esto se logró mediante la secuenciación de bandas extraídas de DGGE, el desarrollo de una estrategia consistente en la amplificación selectiva en base a cebadores específicos diseñados a partir de las secuencias obtenidas de DGGE combinadas con cebadores universales, la búsqueda en bibliotecas de ADNr 16S casi completo, y el diseño de sondas para hibridación *in situ* fluorescente (**Figura 31**).

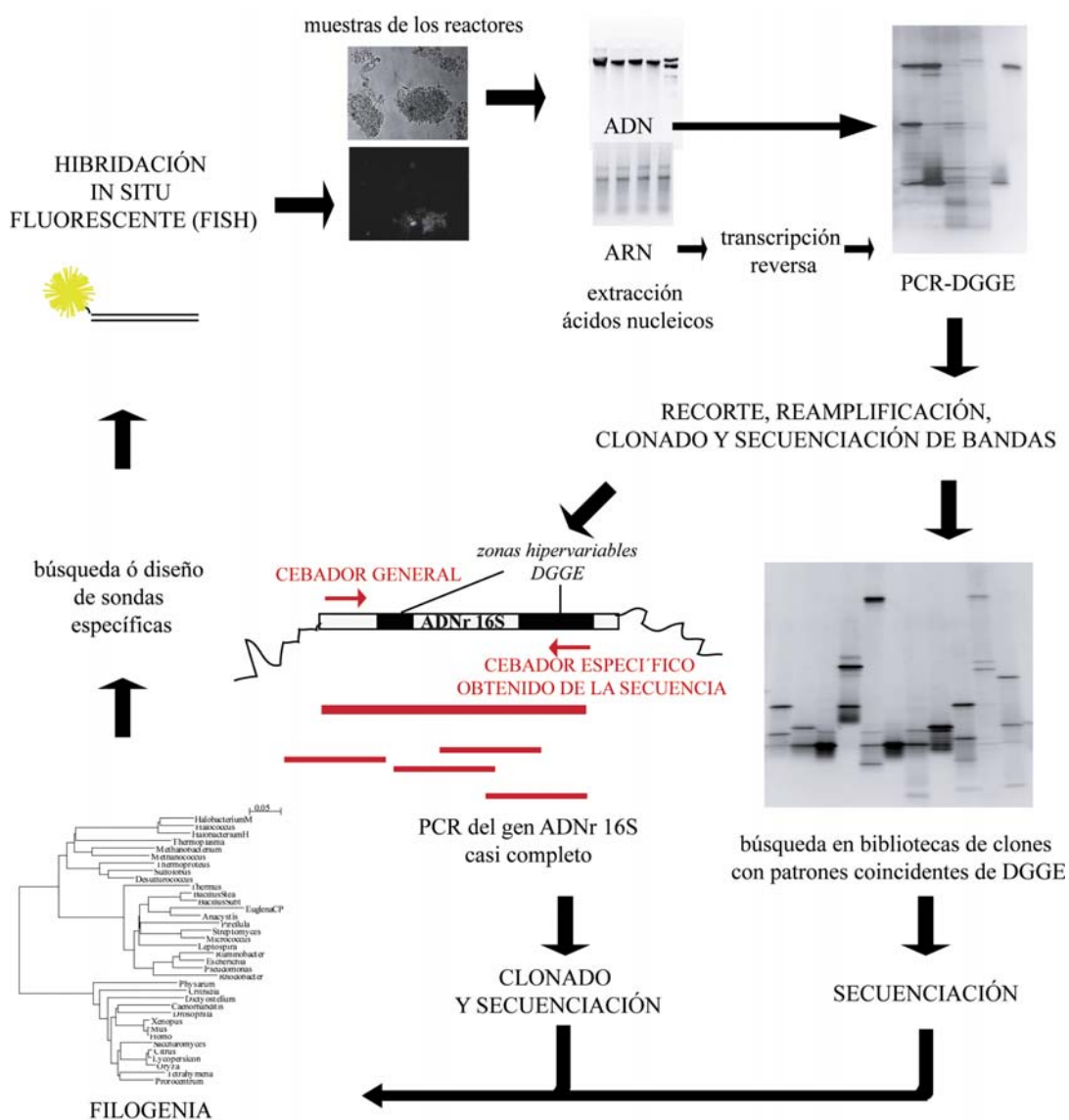


Figura 31. Esquema de la estrategia utilizada para la identificación y cuantificación *in situ* de las

poblaciones bacterianas distintivas del tratamiento con NPEO₁₀ presentes en los reactores.

En ninguno de los casos el ARN total extraído a partir de los barros activados de los reactores presentó signos de degradación (**Figura 31**).

En los perfiles de DGGE correspondientes a 2 regiones variables (V3 y V6-V8) del ADNr 16S (**Figura 9**), se identificaron bandas correspondientes a filotipos distintivos de la alimentación con NPEO₁₀. Los fragmentos correspondientes a estas dos regiones poseen aproximadamente 200 y 400 pb respectivamente. El análisis de los perfiles de DGGE de amplificados de ambos fragmentos proporciona información complementaria en dos regiones diferentes de la molécula del ADNr 16S sobre la identidad de estos filotipos. Los fragmentos de ADN fueron secuenciados por extracción, amplificación y clonado de bandas de los geles. La obtención de secuencias de mayor longitud del ADNr 16S de estos filotipos, necesarias para la construcción de árboles filogenéticos con patrones de agrupamiento consistentes (altos valores de *bootstrap* y bajos valores de máxima verosimilitud), se llevó a cabo mediante dos estrategias alternativas, las cuales se describen a continuación.

La primera consistió en un *screening* de las secuencias correspondientes a las bandas extraídas en bibliotecas de ADNr 16S casi completo construidas en nuestro laboratorio. Para ello se amplificaron y discriminaron por DGGE, un total de 97 clones, 45 en el reactor N1 y 52 en el reactor N3. Se realizó la comparación de la movilidad electroforética de los clones de las bibliotecas con las poblaciones en la comunidad de los reactores alimentados con NPEO₁₀. Los clones cuya movilidad coincidió con las bandas distintivas presentes en ambos reactores fueron secuenciados (**Figura 31**).

La otra estrategia consistió en diseñar cebadores específicos a partir de la información obtenida de las secuencias de las bandas identificadas en los perfiles de DGGE. Estos cebadores se combinaron con cebadores generales para el dominio *Bacteria*, ubicados en el extremo 5' del ADNr 16S (**Figura 31**). Con estos cebadores se obtuvieron, a partir del ADN genómico de las comunidades originales, secuencias de mayor longitud para los análisis filogenéticos.

Las bandas correspondientes a filotipos dominantes de los reactores alimentados con NPEO₁₀ en amplificadas de la región V3 y V6-V8, se muestran marcadas como A, B, C, D, A' y D' en las **Figuras 32 y 33**.

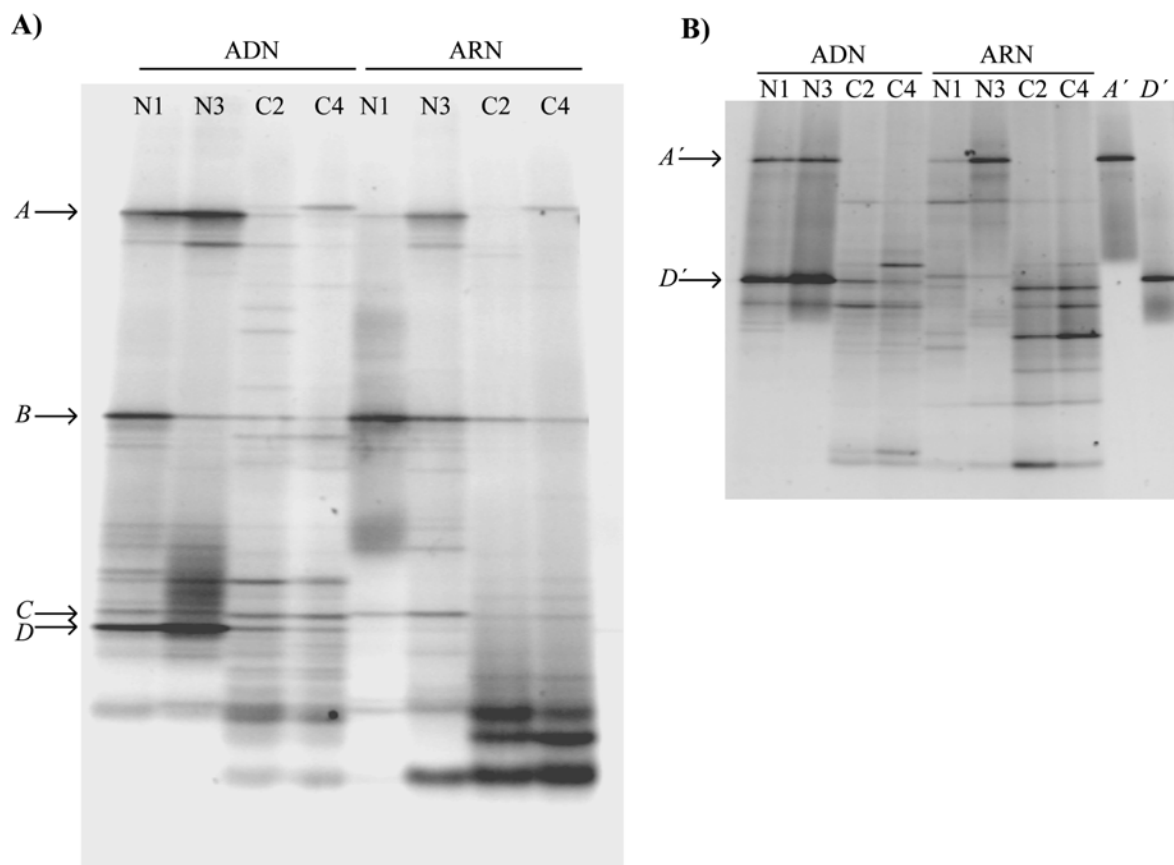


Figura 32. **A-** DGGE de amplificados del gen ADNr 16S en la región V3, a partir de ADN genómico (ADN) ó ADN copia (ARN) de los 4 reactores, a los 21 meses de operación. **B-** DGGE de amplificados del gen ADNr 16S en la región V6-V8, a partir de ADN genómico (ADN) ó ADN copia (ARN) de los 4 reactores, a los 21 meses de operación. **N1 y N3:** reactores alimentados con NPEO₁₀. **C2 y C4:** reactores control. **A, A', B, C, D y D':** bandas correspondientes a filotipos identificados.

Las bandas A y D se observaron como dominantes en los geles DGGE de amplificadas de la región V3 a partir de ADN genómico de los reactores alimentados con NPEO₁₀ (**Figura 32A**). Las bandas B y C se evidenciaron como dominantes en los geles DGGE de amplificadas de la región V3 a partir de ADN copia (**Figura 32A**), lo cual estaría indicando que una gran proporción del ARNr total corresponde a estas poblaciones. Las bandas A' y D' resultaron dominantes en los geles DGGE de amplificadas de la región V6-V8 a partir de ADN genómico de los reactores alimentados con NPEO₁₀ (**Figura 32B**).

Las bandas A y D persistieron desde los 12 meses de operación en los reactores alimentados con NPEO₁₀ lo cual sugiere que las poblaciones correspondientes se seleccionaron y establecieron en los barros activados debido a la presencia del detergente en el medio de alimentación (**Figura 33**).

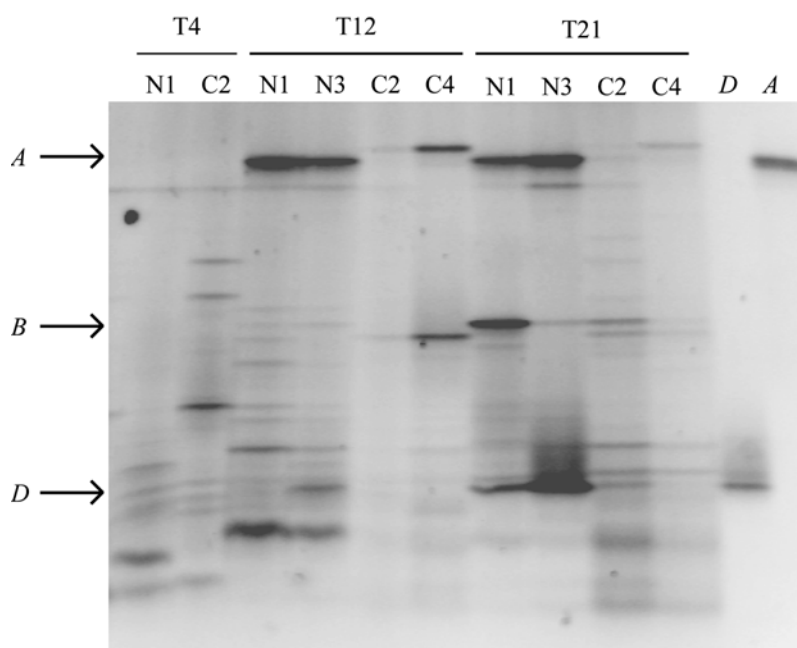


Figura 33. DGGE de amplificadas del gen ADNr 16S en la región V3, a partir de ADN genómico de los 4 reactores. T4, T12 y T21: 4, 12 y 21 meses de operación. A y D: bandas correspondientes a filotipos identificados.

Las bandas A, A', B, C, D y D' fueron extraídas, secuenciadas e identificadas por medio del

alineamiento con las secuencias disponibles en la base de datos *GenBank*.

18.2.1 Identificación y cuantificación del filotipo A

Las secuencias correspondientes a las bandas A y A' (**Figura 32**) resultaron poseer una alta similitud (>90%) con miembros no cultivados del *phylum Acidobacteria*. A partir de la secuencia de la banda A', en la región V6-V8, se diseñó el cebador **S^{*}-AcG3-1282-a-A-18**. La especificidad de este cebador se muestra en la **Figura 34**.

Bacteria (13/184990)

unclassified_Bacteria (13/13995)

uncultured soil bacterium; 395-1; AY326537
 unidentified bacterium; 2951; AF097766
 uncultured bacterium; SM-OTU04; AY321219
 uncultured Acidobacteria bacterium; EB1069; AY395388
 uncultured eubacterium; P12; U68646
 bacterium Ellin6099; AY234751
 uncultured soil bacterium; NPKa; AY391560
 uncultured soil bacterium; C0220; AF507445
 uncultured soil bacterium; S0120; AF507527
 uncultured Acidobacteria bacterium; Ac6; AY899797
 uncultured Acidobacteria bacterium; AKYH1309; AY921791
 uncultured bacterium; EC1136; DQ083321
 uncultured bacterium; ALT22; AY703460

Figura 34. Lista de filotipos conteniendo la secuencia del cebador **S^{*}-AcG3-1282-a-A-18** diseñada en este trabajo. Referencia: Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu>).

Como puede observarse en la **Figura 34**, estas secuencias pertenecen en su mayoría a organismos no cultivados, aún no clasificados en la base de datos del *RDP*. La secuencia del oligonucleótido **S^{*}-AcG3-1282-a-A-18** no está presente en ningún otro grupo taxonómico de la base de datos de ADN ribosomal.

Sobre ADN genómico de los reactores alimentados con NPEO₁₀ se amplificaron fragmentos correspondientes a secuencias específicas de este grupo de microorganismos, utilizando los cebadores **3If** (general para el *phylum Acidobacteria*) y **S^{*}-AcG3-1282-a-A-18**. Estos fragmentos, que abarcaban ambas regiones hipervariables del ADNr 16S, V3 y

V6-V8, resultaron del tamaño esperado (aproximadamente 1250 pb) (**Figura 35A**).

Los fragmentos fueron clonados y comparados con el fragmento amplificado por su migración electroforética en DGGE. Más de un 80% de los clones analizados migraron junto con la banda A en la región V3 (**Figura 35B**). Los clones que no migraron junto con la banda A no fueron analizados. Los clones que migraron junto con la banda A fueron secuenciados en su totalidad. Las secuencias de estos clones resultaron 100% idénticas a la secuencia de las bandas A y A' en las regiones V3 y V6-V8 respectivamente, sugiriendo que las bandas A y A' pertenecen al mismo filotipo, el cual fue denominado filotipo A.

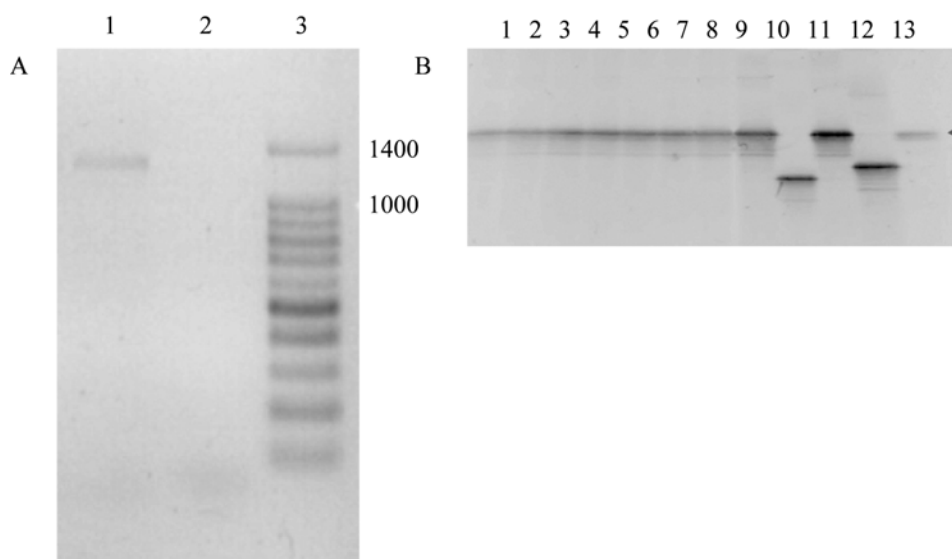


Figura 35. A- amplificación a partir de ADN genómico de los reactores con cebadores *3If* y *S*-**-AcG3-1282-a-A-18* específicos para el *phylum Acidobacteria*. Calles: 1- reactor N1, 2-reactor C2, 3- marcador de peso molecular (1 Kb ladder). B- perfiles de DGGE en la región V3 de clones obtenidos a partir del amplificado con cebadores *3If*- *S*-**-AcG3-1282-a-A-18*. Calles: 1 a 12- clones obtenidos, 13- banda A.

La posición filogenética del filotipo A (número de acceso del *GenBank* AY988797) está ubicada dentro del grupo III del *phylum Acidobacteria* (Quaiser et al., 2003) (**Figura 36**). En los nodos del árbol se muestra la especificidad de la secuencia *S*-**-AcG3-1282-a-A-18* utilizada como cebador.

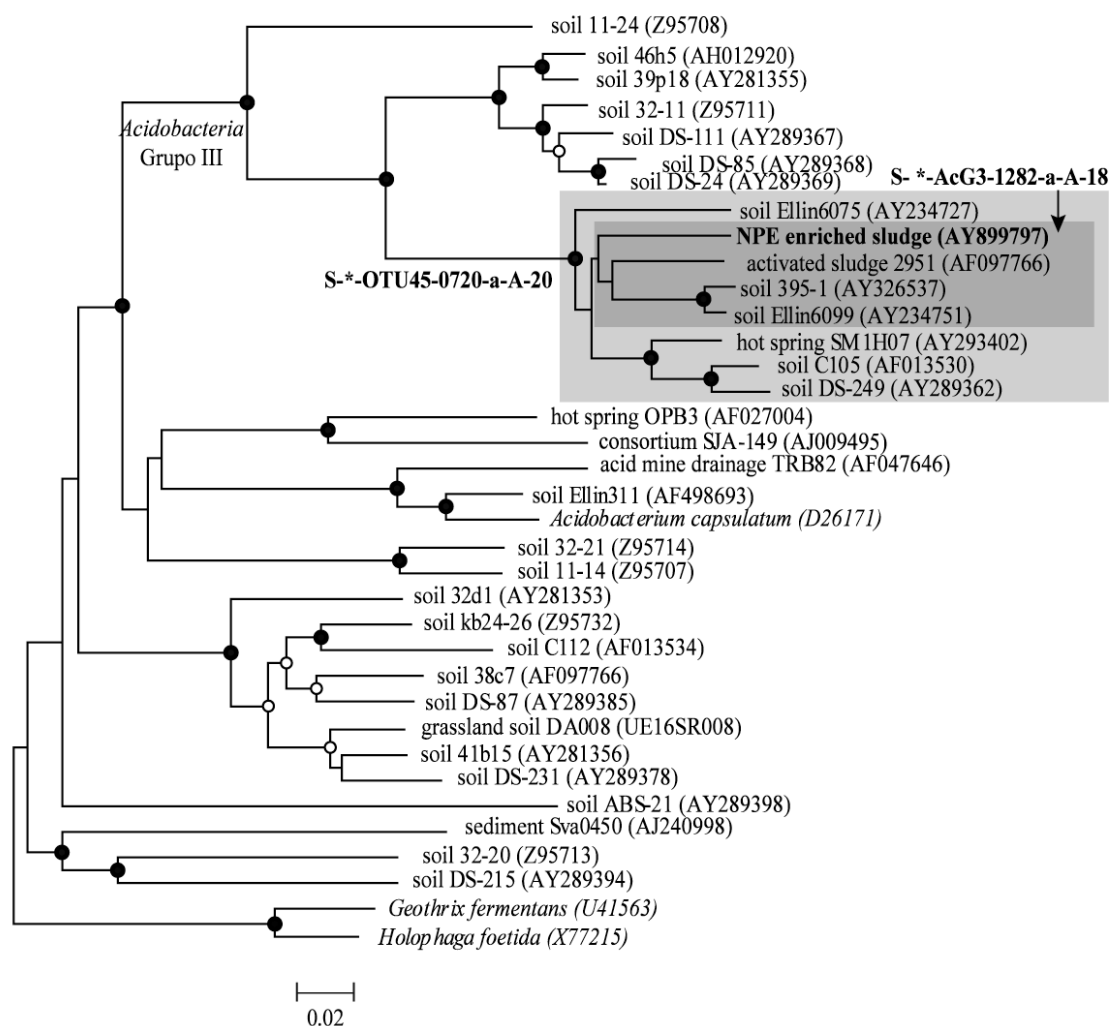


Figura 36. Dendrograma mostrando la posición filogenética del filotipo A, y secuencias relacionadas del *phylum Acidobacteria*. La barra indica una distancia genética de 2%. Los círculos negros corresponden a grupos que presentan consistencia para los 3 métodos analizados (*neighbor joining* con más de 70% de *bootstrap*, máxima verosimilitud y máxima parsimonia). Los círculos blancos corresponden a grupos que presentan consistencia para 2 de los 3 métodos analizados. Los *outgroups* utilizados fueron *Escherichia coli* (AY319394), *Bacillus sp.* (AB053351) y *Micrococcus luteus* (AY395033).

La secuencia de la sonda **S-*-OTU45-0720-a-A-20**, utilizada para detectar miembros no cultivados del *phylum Acidobacteria* en barros activados de una planta de tratamiento de efluentes industriales (Juretschko et al., 2002), fue alineada con las secuencias obtenidas a partir de la amplificación y clonado del filotipo A y secuencias relacionadas. La

secuencia de esta sonda resultó altamente específica para el filotipo A y los filotipos más cercanos a éste (**Figura 36**). *S*-*-*OTU45-0720-a-A-20* se utilizó para la detección y cuantificación de estas poblaciones en los reactores (**Figuras 37 y 38**).

Las células cuyo ARN hibridó con la sonda *S*-*-*OTU45-0720-a-A-20* se observaron como cocos de aproximadamente 2 μm , distribuidos uniformemente en el *floc* (**Figura 37**).

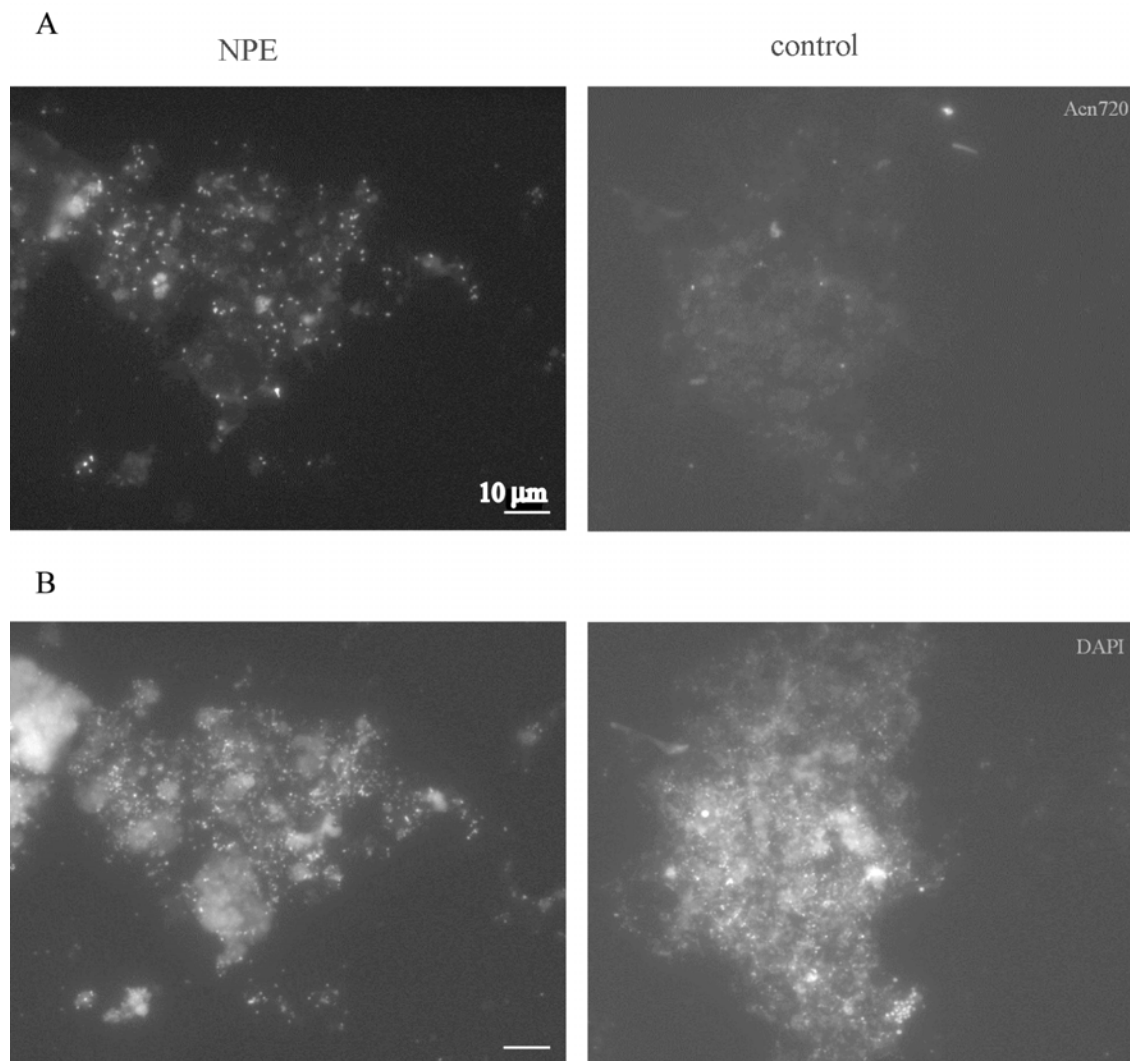


Figura 37. Microfotografías de hibridación in situ fluorescente (FISH) utilizando la sonda *S*-*-*OTU45-0720-a-A-20*. NPE: barro activado de reactor alimentado con NPEO₁₀. Control: barro de reactor control. **A**- sonda *S*-*-*OTU45-0720-a-A-20*. **B**- tinción con DAPI.

Las poblaciones pertenecientes al Grupo III, *phylum Acidobacteria* resultaron distintivas de la presencia de NPEO₁₀ en la alimentación. Esto se observa en la **Figura 38**, donde los porcentajes de células positivas para la sonda *S*-*-*OTU45-0720-a-A-20* fueron significativamente mayores en los reactores alimentados con NPEO₁₀ que en los controles.

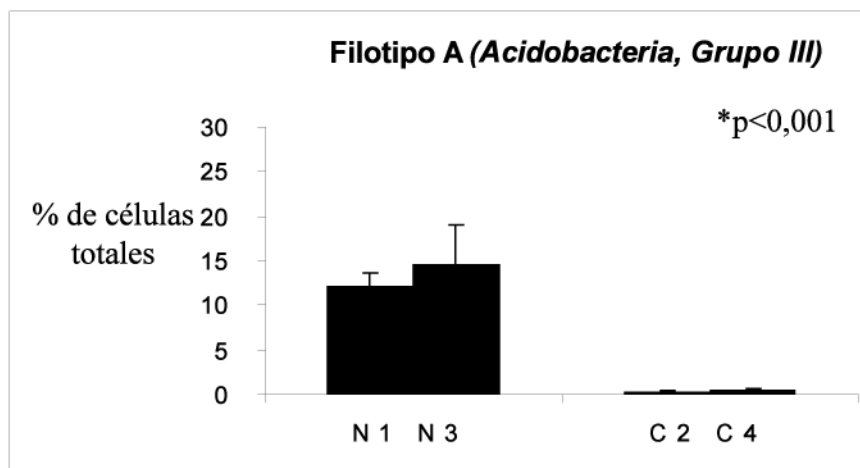


Figura 38. Porcentaje de células con respecto a células teñidas con DAPI (promedio \pm desvío *standard*) que hibridan con la sonda *S*-*-*OTU45-0720-a-A-20* en los barros activados de los reactores.

18.2.2 Identificación y cuantificación del filotipo B

La secuencia correspondiente a la banda B (**Figura 32**) presentó una alta similitud con miembros de la clase *Betaproteobacteria*. A partir de ADN total del barro de los reactores alimentados con NPEO₁₀ se amplificó un fragmento del ADN_r, utilizando los cebadores *F8*, general para *Bacteria*, y la secuencia inversa y complementaria de *Bet948β*, específica para miembros de la clase *Betaproteobacteria*, previamente utilizada para detectar la presencia de organismos de esta clase en la rizosfera de cultivos de maíz (Gomes et al., 2001).

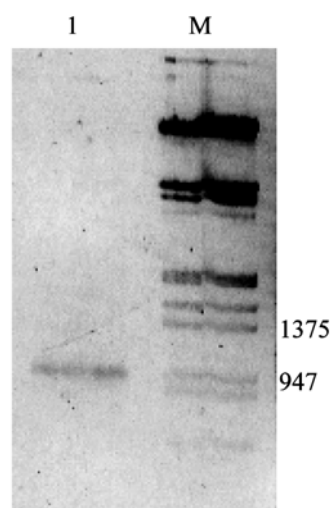


Figura 39. Amplificación a partir de ADN genómico del reactor N3 con cebadores *F8* y *Bet948β* versión reversa complementaria. Marcador: Lambda Hind III.

Los fragmentos, de aproximadamente 950 pb, fueron clonados, y los clones obtenidos fueron confirmados por su migración electroforética en DGGE, por comparación con la banda B en la región V3. Las secuencias de los clones que migraron junto con el fragmento amplificado resultaron 100% idénticas a la secuencia de la banda B. A partir de la secuencia de estos clones se definió y posicionó filogenéticamente al filotipo B.

El filotipo B (número de acceso AY899799) está ubicado filogenéticamente dentro de un grupo aún no definido como familia dentro del orden *Burkholderiales*, en la clase *Betaproteobacteria* (Figura 40).

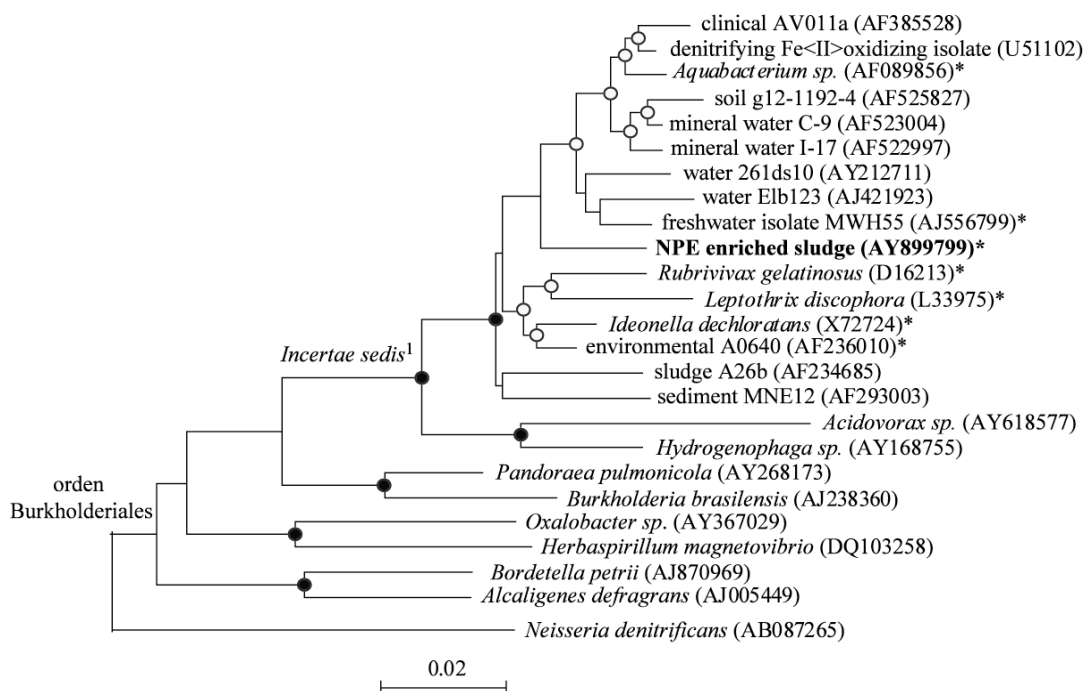


Figura 40. Dendrograma mostrando la posición filogenética del filotipo B y secuencias relacionadas en la clase *Betaproteobacteria*. La barra indica una distancia genética de 2%. Los círculos negros corresponden a grupos que presentan consistencia para los 3 métodos analizados (*neighbor joining* con más de 70% de *bootstrap*, máxima verosimilitud y máxima parsimonia). Los círculos blancos corresponden a grupos que presentan consistencia para 2 de los 3 grupos analizados. El asterisco indica las secuencias que son positivas para la sonda *S-*-LARI-0470-a-A-18* diseñada en este trabajo. Los *outgroups* utilizados fueron *Bacillus sp.* (AB053351) y *Micrococcus luteus* (AY395033). ¹Familia aún no clasificada dentro del orden *Burkholderiales* (referencia Ribosomal Database Project II, <http://rdp.cme.msu.edu>)

La sonda *Aq2*, específica para secuencias pertenecientes a miembros del género *Aquabacterium* (Kalmbach et al., 2000) y otros organismos relacionados con el filotipo B fue modificada de manera de resultar complementaria a la secuencia correspondiente en el filotipo B, y llamada *S-*-LARI-0470-a-A-18*. La especificidad de esta sonda modificada se muestra en la **Figura 41**.

S--LARI-0470-a-A-18* está presente en secuencias pertenecientes a las especies *Leptothrix*, *Aquabacterium*, *Rubrivivax*, e *Ideonella*, y a otros organismos aún no

identificados, y no se halló en ninguna secuencia por fuera de este grupo dentro de *Burkholderiales* (**Figura 41**).

```

Bacteria (97/177880)
  phylum Proteobacteria (97/72739)
    class Alphaproteobacteria (0/19152)
      class Betaproteobacteria (97/14873)
        order Burkholderiales (97/8587)
          family Burkholderiaceae (0/2030)
          family Oxalobacteraceae (0/1274)
          family Alcaligenaceae (0/787)
          family Comamonadaceae (0/2483)
          family Incertae sedis (97/1226)
            genus Aquabacterium (23/210)
            genus Ideonella (7/11)
            genus Leptothrix (33/109)
            genus Roseateles (0/90)
            genus Rubrivivax (8/25)
            genus Schlegelella (0/57)
            genus Thiomonas (0/181)
            genus Xylophilus (0/38)
            unclassified_Incertae sedis (26/505)
              unclassified_Burkholderiales (0/787)
              order Hydrogenophilales (0/95)
              order Methylophilales (0/155)
              order Neisseriales (0/1391)
              order Nitrosomonadales (0/1597)
              order Rhodocyclales (0/1166)
              unclassified_Betaproteobacteria (0/1882)
            class Gammaproteobacteria (0/29595)
            class Deltaproteobacteria (0/5059)
            class Epsilonproteobacteria (0/2083)
            unclassified_Proteobacteria (0/1977)

```

Figura 41. Lista de secuencias pertenecientes a la clase *Betaproteobacteria* conteniendo la secuencia complementaria a la sonda *S-*-LARI-0470-a-A-18* diseñada en este trabajo. Referencia: *Ribosomal Database Project II*.

Mediante la hibridación con la sonda *S-*-LARI-0470-a-A-18* se detectaron y cuantificaron las poblaciones del filotipo B en los reactores. Las células positivas para la sonda *S-*-LARI-0470-a-A-18* se presentaron en agrupamientos (**Figura 42**). En experimentos de doble hibridación las células positivas para la sonda *S-*-LARI-0470-a-A-18* marcada con fluoresceína cohibridaron en un 100% con la sonda *Bet42a* específica para la clase *Betaproteobacteria*, marcada con cy3.

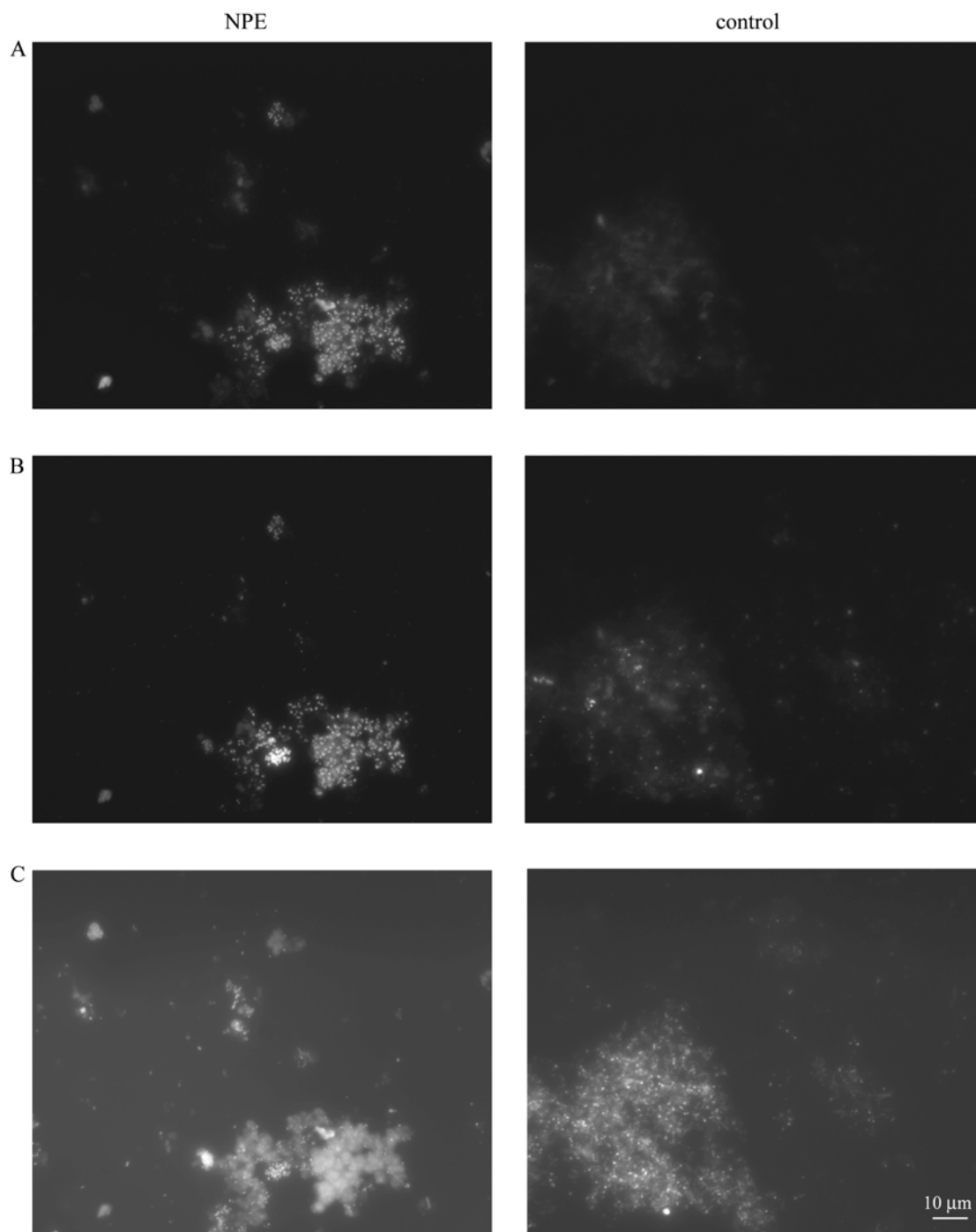


Figura 42. Microfotografías de hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*) de los reactores. **NPE:** Reactor tratado con NPEO₁₀. **Control:** reactor control. Las tres imágenes de cada reactor corresponden al mismo campo. **A-** células que hibridan con la sonda *S-*-LARI-0470-a-A-18*. **B-** vista correspondiente de las células que hibridan con la sonda *Bet42a*. **C-** tinción con DAPI.

Las poblaciones del filotipo B resultaron más abundantes en los reactores alimentados con NPEO₁₀ que en los controles. Estas diferencias resultaron significativas (**Figura 43**)

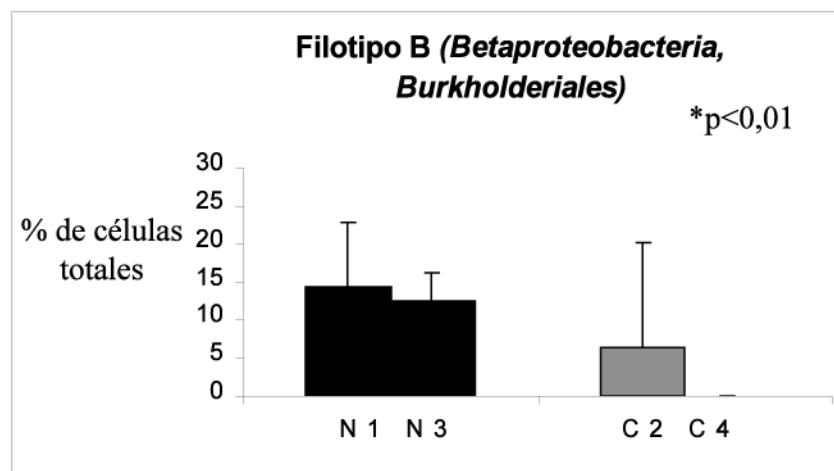


Figura 43. Porcentaje de células (promedio \pm desvío *standard*) que hibridan con la sonda *S*-**LARI-0470-a-A-18* en los barros activados de los reactores

18.2.3 Identificación y cuantificación del filotipo C

La secuencia correspondiente a la banda C (**Figura 32**) presentó una alta similitud con miembros de la clase *Alfaproteobacteria*. Se hallaron clones provenientes de las bibliotecas de ADN_r 16S, que migraron junto con la banda C en los DGGE, uno de los cuales se observa en la **Figura 44**, calle 11.

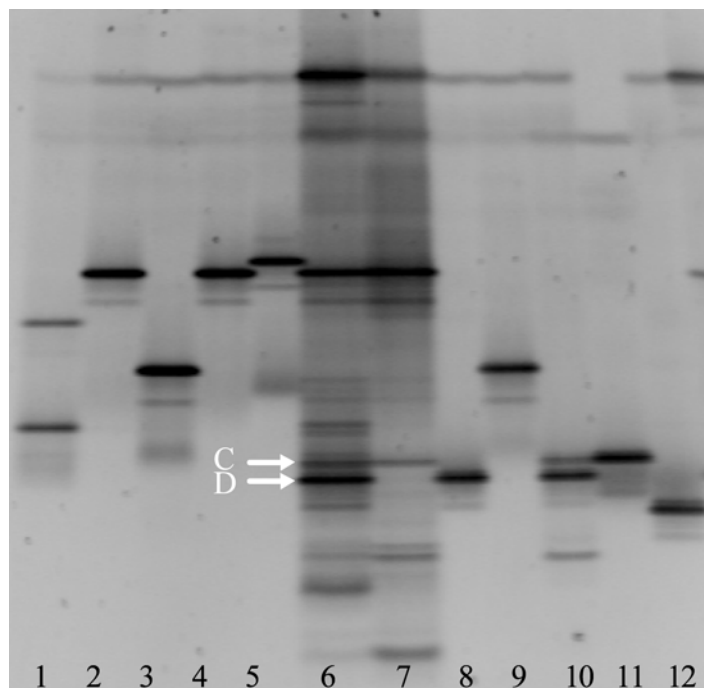


Figura 44. DGGE de amplificadores de las comunidades del reactor N1 y clones de las bibliotecas de ADNr 16S. C y D: bandas correspondientes a los filotipos C y D. Calles: 1- marcador de migración electroforética. 2 a 5, 8 a 12: bandas correspondientes a los clones de la biblioteca de ADNr 16S. 6: reactor N1, ADN genómico. 7: reactor N1 ADN copia.

La secuencia de los clones que migraron junto con la banda C resultó 100% idéntica a ésta en la región V3 del ARN ribosomal 16S. A partir de la secuenciación de estos clones se definió y posicionó filogenéticamente el filotipo C, en el orden *Sphingomonadales*, familia *Sphingomonadaceae* (clon S1D10, número de acceso AY899798, **Figura 45**).

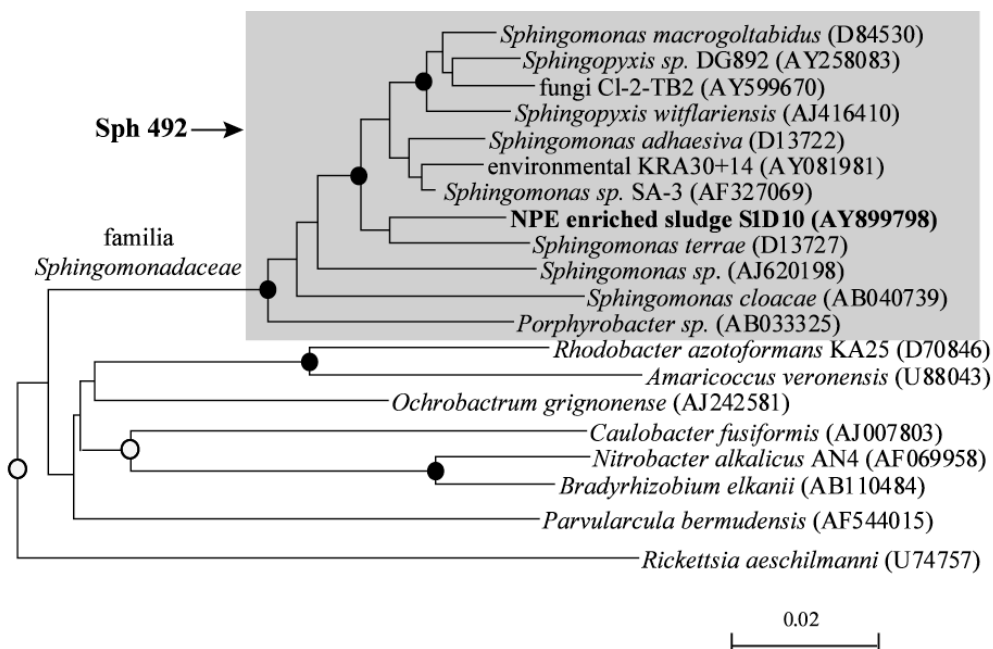


Figura 45. Dendrograma mostrando la posición filogenética del filotipo C, en la clase *Alfaproteobacteria*. La línea corresponde a un 2% de distancia genética. En el nodo correspondiente se muestra la especificidad de la sonda **Sph492**. Los círculos negros corresponden a ramas observadas mediante los tres métodos utilizados (*neighbor joining* con más de 70% de *bootstrap*, máxima verosimilitud y máxima parsimonia). Los círculos blancos corresponden a ramas observadas en dos de los métodos utilizados. Los *outgroups* utilizados fueron *Bacillus* sp. (AB053351) y *Micrococcus luteus* (AY395033).

La secuencia de la sonda **Sph492**, específica para miembros de la familia *Sphingomonadaceae* (Friedrich et al., 2002), fue comparada con las secuencias del filotipo C y relacionadas. Mediante la búsqueda de homologías en la página del Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu>) se confirmó que esta sonda no posee ningún *mismatch* con la secuencia del filotipo C, así como con ninguna secuencia de miembros de esta familia. La especificidad de esta sonda se muestra en la **Figura 45**.

Mediante la hibridación con la sonda **Sph492** se detectaron y cuantificaron las poblaciones correspondientes al filotipo C en los reactores.

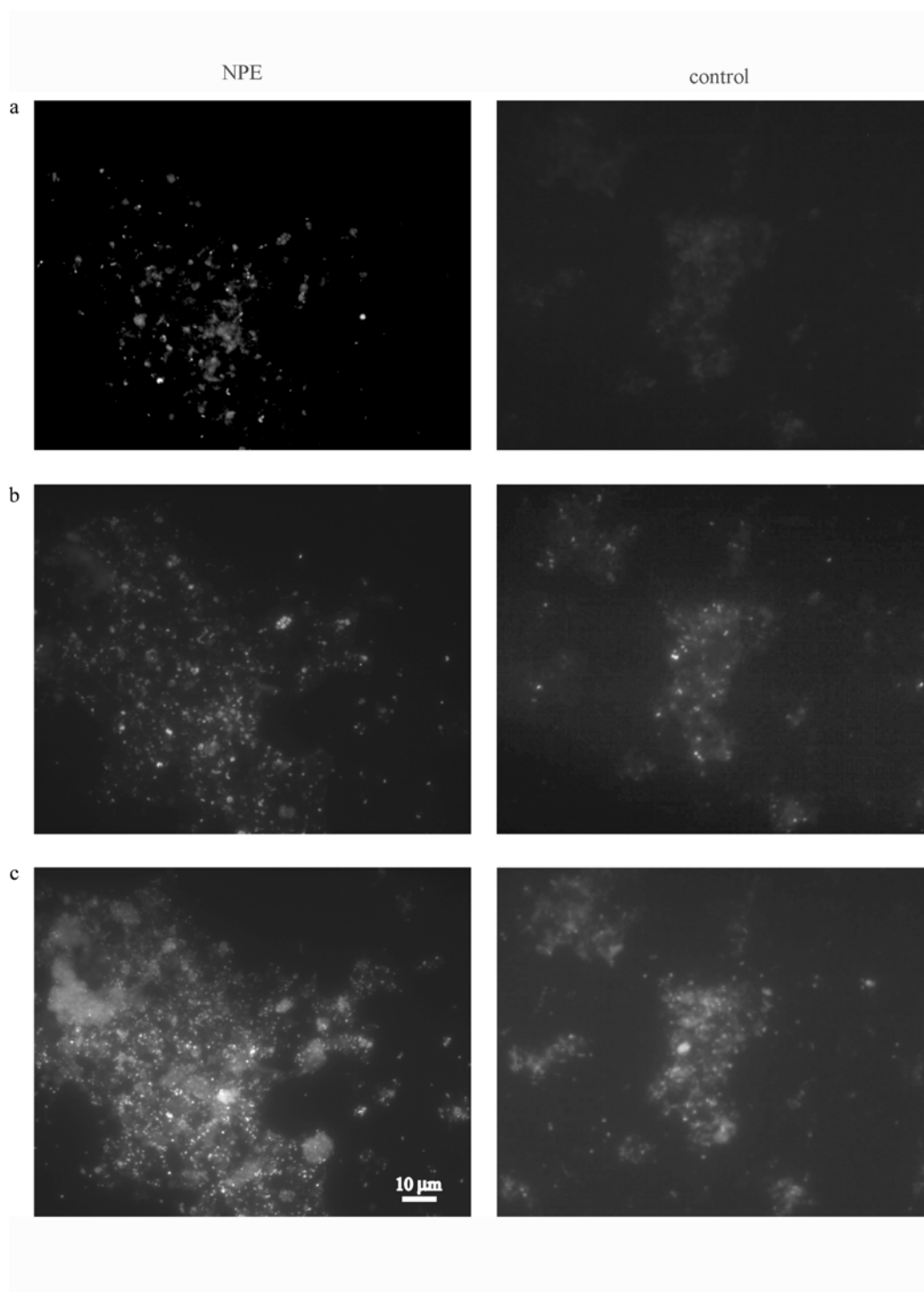


Figura 46. Microfotografías de hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*) de los reactores. **NPE:** Reactor tratado con NPEO₁₀. **Control:** reactor control. Las tres imágenes de cada reactor corresponden al mismo campo. **A-** células que hibridan con la sonda *Sph492*. **B-** vista correspondiente de las células que hibridan con la sonda *Alf1b*. **C-** tinción con DAPI.

Las células positivas para *Sph492* resultaron cocobacilos pequeños distribuidos uniformemente en el *floc* (Figura 46). Se realizaron experimentos de doble hibridación utilizando la sonda *Sph492* marcada con fluoresceína y la sonda *Alf1b* específica para la clase *Alfaproteobacteria* marcada con cy3. En los reactores alimentados con NPEO₁₀, todas las células positivas para *Sph492* hibridaron simultáneamente con *Alf1b*. En los controles no se observaron células positivas para *Sph492*, aunque se observaron células positivas para *Alf1b* (Figura 46).

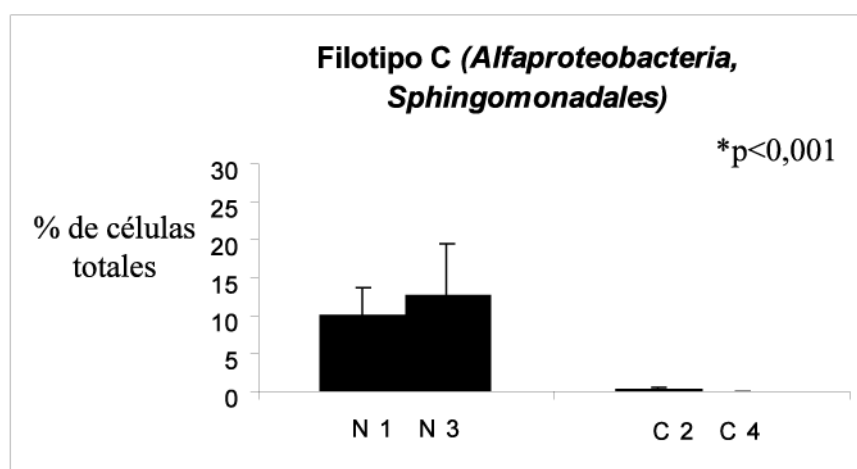


Figura 47. Porcentaje de células (promedio \pm desvío *standard*) que hibridan con la sonda *Sph492* en los barras activados de los reactores.

Las poblaciones pertenecientes al filotipo C correspondieron aproximadamente al 12% de las células totales de los reactores alimentados con NPEO₁₀ (Figura 47).

18.2.4 Identificación y cuantificación del filotipo D

Las secuencias correspondientes a las bandas D y D' (Figura 32) presentaron una alta similitud con miembros de la clase *Gammaproteobacteria*. Se hallaron clones provenientes de las bibliotecas de ADN_r 16S que coincidieron en su migración en DGGE con ambas bandas en las regiones V3 y V6-V8 respectivamente. La migración de dos de estos clones

en la región V3 se observa en la **Figura 44**, calles 8 y 10. La secuencia de estos clones resultó idéntica a la secuencia de ambas bandas en las regiones V3 y V6-V8.

A partir de las secuencias de los clones de las bibliotecas de ADNr 16S S1A3 y S3D1 se definió el filotipo D. La posición filogenética de este filotipo está entre organismos no cultivados dentro de la familia *Xanthomonadaceae*, en la clase *Gammaproteobacteria* (**Figura 48**). Otro clon que migró junto con las bandas D y D', pero no idéntico en secuencia al filotipo D, también resultó relacionado filogenéticamente (S3A1, **Figura 48**)

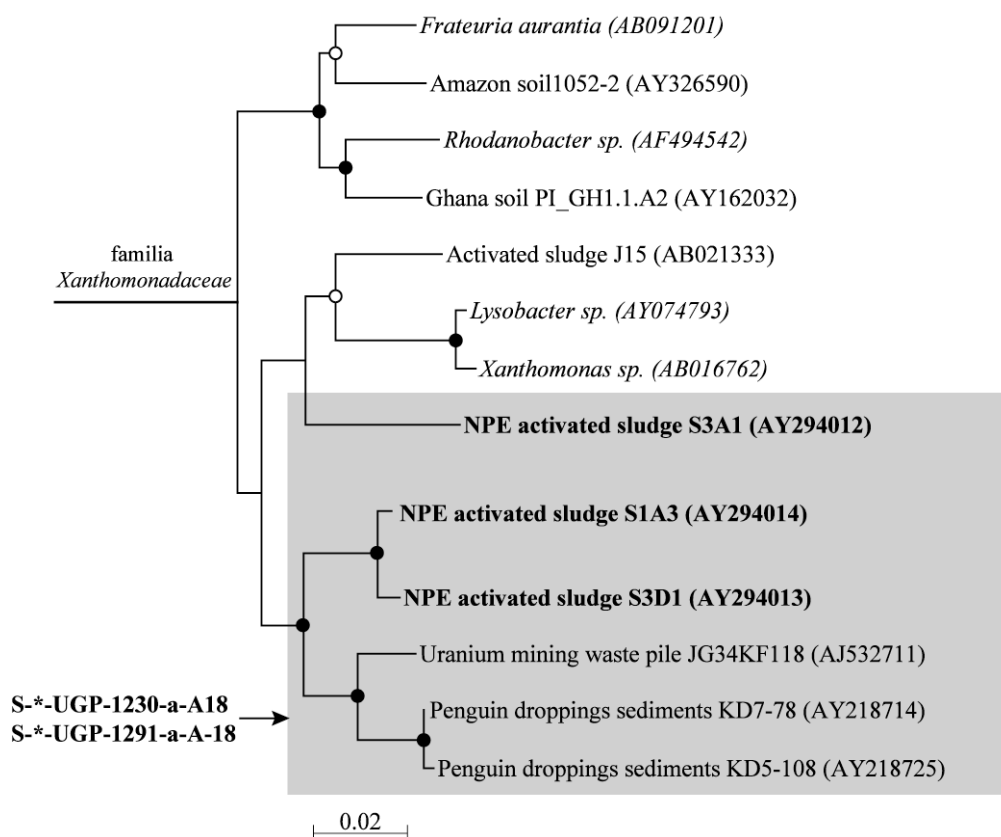


Figura 48. Dendrograma mostrando la posición filogenética del filotipo D y secuencias relacionadas en la familia *Xanthomonadaceae*, clase *Gammaproteobacteria*. La barra indica una distancia genética de 2%. Los círculos negros corresponden a grupos que presentan consistencia para los 3 métodos utilizados (*neighbor joining* con más de 70% de *bootstrap*, máxima verosimilitud y máxima parsimonia). Los círculos blancos corresponden a grupos que presentan consistencia para 2 de los 3 analizados métodos utilizados. El *outgroup* utilizado fue *Nitrosospira* sp.(AF359341).

A partir de las secuencias del filotipo D se diseñaron 2 sondas, *S*-*-*UGP-1230-a-A-18* y *S*-*-*UGP-1291-a-A-18*, cuyas especificidades se muestran en la **Figura 49**. Como puede observarse en la **Figura 49**, estas sondas presentan alta especificidad, ya que están presentes casi exclusivamente en en secuencias pertenecientes a organismos de la familia *Xanthomonadaceae*.

A

Bacteria (29/177880)

```

phylum Proteobacteria (28/72739) this node]
  class Alphaproteobacteria (0/19152)
    class Betaproteobacteria (2/14873)
      order Burkholderiales (2/8587)
        family Burkholderiaceae (1/2030)
          family Oxalobacteraceae (0/1274)
          family Alcaligenaceae (0/787)
          family Comamonadaceae (0/2483)
          family Incertae sedis (0/1226)
        unclassified_Burkholderiales (1/787)
          order Hydrogenophilales (0/95)
          order Methylophilales (0/155)
          order Neisseriales (0/1391)
          order Nitrosomonadales (0/1597)
          order Rhodocyclales (0/1166)
          unclassified_Betaproteobacteria (0/1882)
      class Gammaproteobacteria (26/29595)
        order Acidithiobacillales (0/188)
        order Thiotrichales (0/515)
        order Chromatiales (0/643)
        order Xanthomonadales (24/1792)
          family Xanthomonadaceae (24/1792)
            unclassified_Xanthomonadales (0/0)
          order Cardiobacteriales (0/15)
          order Legionellales (0/532)
          order Methylococcales (0/379)
          order Oceanospirillales (0/1800)
          order Pseudomonadales (0/7062)
          order Aeromonadales (0/1009)
          order Alteromonadales (0/3146)
          order Vibrionales (0/2507)
          order Enterobacteriales (0/4014)
          order Pasteurellales (0/1489)
        unclassified_Gammaproteobacteria (2/4504)
      class Deltaproteobacteria (0/5059)
      class Epsilonproteobacteria (0/2083)
      unclassified_Proteobacteria (0/1977)

```

B
Bacteria (36/177880)

phylum Proteobacteria (33/72739)

- class Alphaproteobacteria (0/19152)
- class Betaproteobacteria (3/14873)**
 - order Burkholderiales (3/8587)**
 - family Burkholderiaceae (1/2030)**
 - family Oxalobacteraceae (0/1274)
 - family Alcaligenaceae (0/787)
 - family Comamonadaceae (1/2483)**
 - family Incertae sedis (0/1226)
 - unclassified_Burkholderiales (1/787)**
 - order Hydrogenophilales (0/95)
 - order Methylophilales (0/155)
 - order Neisseriales (0/1391)
 - order Nitrosomonadales (0/1597)
 - order Rhodocyclales (0/1166)
 - unclassified_Betaproteobacteria (0/1882)
- class Gammaproteobacteria (30/29595)**
 - order Acidithiobacillales (0/188)
 - order Thiotrichales (0/515)
 - order Chromatiales (0/643)
 - order Xanthomonadales (28/1792)**
 - family Xanthomonadaceae (28/1792)**
 - unclassified_Xanthomonadales (0/0)
 - order Cardiobacteriales (0/15)
 - order Legionellales (0/532)
 - order Methylococcales (0/379)
 - order Oceanospirillales (0/1800)
 - order Pseudomonadales (0/7062)
 - order Aeromonadales (0/1009)
 - order Alteromonadales (0/3146)
 - order Vibrionales (0/2507)
 - order Enterobacteriales (0/4014)
 - order Pasteurellales (0/1489)
 - unclassified_Gammaproteobacteria (2/4504)**
- class Deltaproteobacteria (0/5059)
- class Epsilonproteobacteria (0/2083)
- unclassified_Proteobacteria (0/1977)

Figura 49. Especificidad de las sondas *UGP* diseñadas en este trabajo. A- *S*-UGP-1230-a-A-18*. B- *S*-UGP-1291-a-A-18*.

A pesar de que tanto la abundancia relativa de los clones de las bibliotecas (alrededor de un 30% de los clones de los reactores tratados con NPEO₁₀) como el análisis por DGGE (**Figura 32**) sugerían una alta abundancia de estos filotipos, no se observaron células positivas al realizar la hibridación *in situ* con las sondas específicas *S*-UGP1230-a-A-18* y *S*-UGP1291-a-A-18*. Al realizar la hibridación directamente con el ARN extraído

tampoco se observó una señal positiva, con lo cual se descartó que la falta de señal en FISH se deba a baja permeabilidad de las células. La hibridación con la sonda ***Gam42a***, general para *Gammaproteobacteria*, indicó menos de un 5% de miembros de este grupo en los reactores alimentados con NPEO₁₀ (**Figuras 29 y 30**).

A partir de estos resultados se plantearon 3 hipótesis:

La primera es que estas poblaciones, a pesar de pertenecer a la clase *Gammaproteobacteria*, fueran complementarias para la sonda ***Bet42a*** en su secuencia del ADN_r 23S. Las sondas ***Gam42a*** y ***Bet42a*** hibridan en la misma posición de la molécula del 23S, con la única diferencia de un nucleótido en la posición 1033 (numeración basada en *Escherichia coli*). Existen precedentes de algunos miembros de la clase *Gammaproteobacteria*, que no son complementarios en su secuencia a la sonda ***Gam42a*** (Siyambalapatiya y Blackall, 2005; Yeates *et al.*, 2003).

La segunda hipótesis es que estas células, a pesar de ser muy abundantes en los reactores, presentaran un bajo contenido de ARN ribosomal. Esta hipótesis es sugerida por el hecho de que las bandas D y D' correspondientes al filotipo D, se observaron como dominantes en los perfiles de DGGE de los amplificadores a partir de ADN genómico pero no fueron distinguidas en los perfiles basados en ADN copia de los reactores alimentados con NPEO₁₀ (**Figura 32**).

Finalmente, es posible que estas poblaciones en realidad fueran muy poco abundantes, pero se hubieran evidenciado como dominantes debido a una amplificación preferencial durante la PCR. La amplificación preferencial de secuencias se ha observado en cultivos mixtos de arqueas (Brunk y Eis, 1998), y en mezclas de ADN de diferentes orígenes (Reysenbach *et al.*, 1992). Sin embargo, esta hipótesis es improbable ya que el filotipo D se observó como dominante en las bibliotecas de ARN_r 16S, y en los geles de gradiente desnaturizante de las regiones V3 y V6-V8, análisis basados en amplificaciones con 3 pares de cebadores diferentes.

Para poner a prueba la primer hipótesis, se analizó la secuencia correspondiente a la zona de hibridación de estas sondas en el ADN_r del filotipo D. Para la obtención de esta

secuencia se utilizó el cebador específico *S*-*-*UGP-1291-a-A-18*, ubicado en la región 3' del ADNr 16S, *upstream* de la secuencia correspondiente a las sondas, junto con un cebador universal ubicado *downstream* en el ADNr 23S, el cebador *1930r* para amplificar un fragmento de aproximadamente 3 kilobases. Este fragmento, que abarca la zona 3' del 16S, el espacio intergénico y aproximadamente 1900 pares de bases en el 23S (**Figura 50**), fue clonado y los clones obtenidos fueron secuenciados. Todos los clones analizados presentaron en la zona 3' del ADNr 16S, más de 99% de identidad con el filotipo D. A su vez resultaron todos 100% idénticos a la sonda *Gam42a* en la posición 1033 del 23S (**Figura 50**), por lo cual la primera hipótesis quedó descartada.

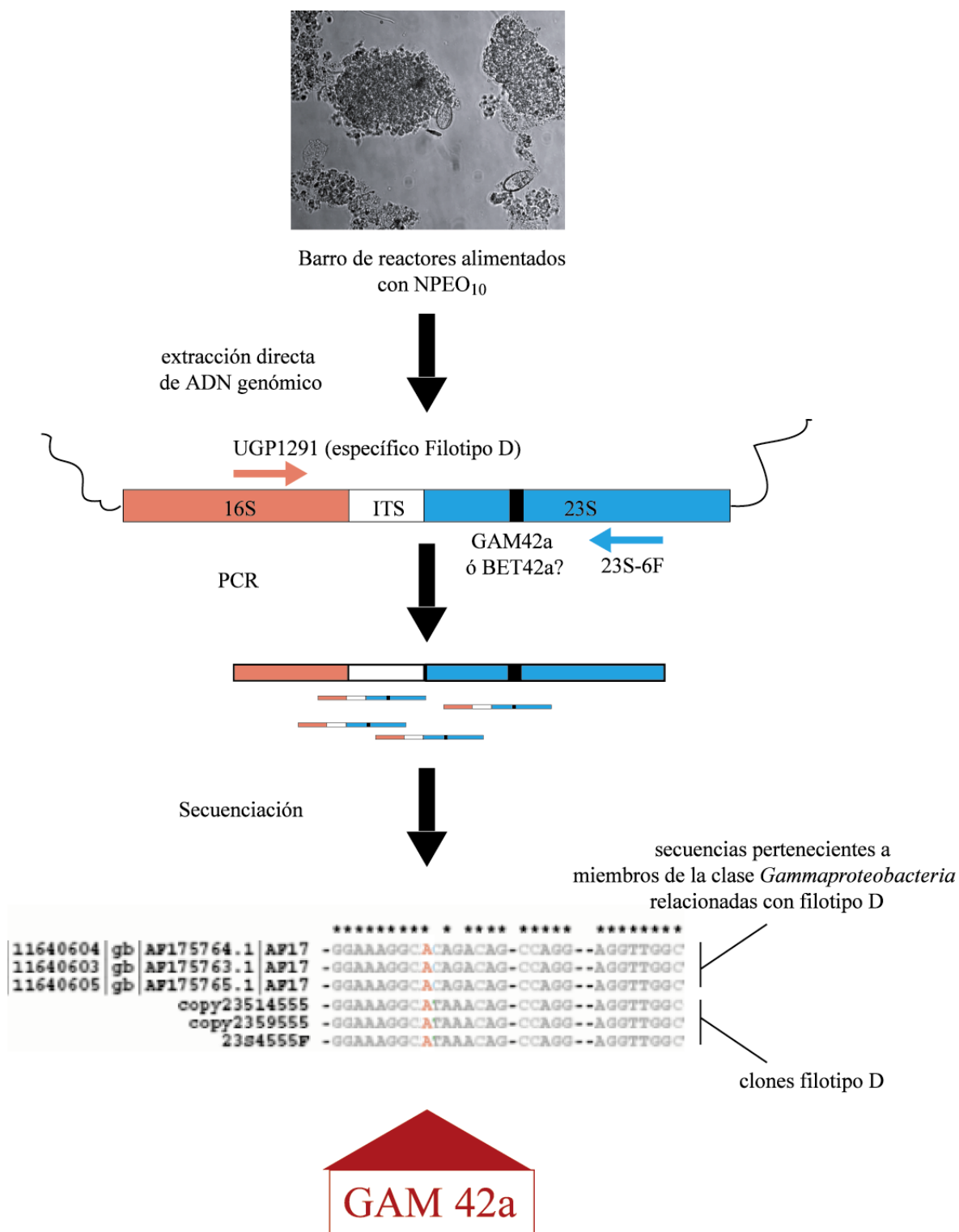


Figura 50. Análisis de secuencia de la zona de hibridación de la sonda *Gam42a* en el filotipo D (*Xanthomonadaceae*).

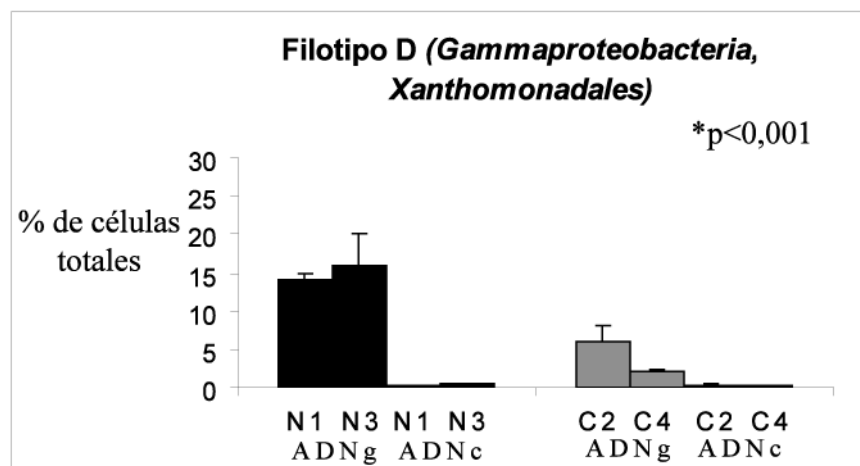


Figura 51. Cuantificación de filotipo D (promedio \pm desvío standard) mediante PCR en tiempo real. ADNg: ADN genómico. ADNc: ADN copia.

Para poner a prueba la segunda y tercer hipótesis se cuantificó el porcentaje de células de las poblaciones del filotipo D por PCR en tiempo real. El porcentaje de células del filotipo D resultó de aproximadamente un 15% en los reactores alimentados con NPEO₁₀, y significativamente menor en los controles (**Figura 51**). Sin embargo, los porcentajes de células de estas poblaciones estimados a partir del ARNr, resultaron en todos los casos menores a 1% (**Figura 51**). A partir de estos resultados, se confirmó la hipótesis de que los microorganismos pertenecientes a la población D fueron muy abundantes en los reactores alimentados con NPEO₁₀ pero presentaron un bajo contenido de ARN ribosomal (**Figura 51**).

18.2.5 Proporción de células pertenecientes a las poblaciones distintivas de la alimentación con NPEO₁₀

Las 4 poblaciones dominantes cuantificadas sumaron más de un 50% de las células totales en ambos reactores tratados, mientras que en los controles no llegaron a 15% (**Figura 52**). Las comunidades bacterianas de los barros activados de los reactores réplica alimentados con NPEO₁₀ resultaron altamente reproducibles (**Figura 51**). Estos resultados, obtenidos por medio de métodos cuantitativos de hibridación y amplificación de ácidos nucleicos,

resultaron consistentes con los previamente obtenidos mediante el análisis de los perfiles de DGGE (sección 17).

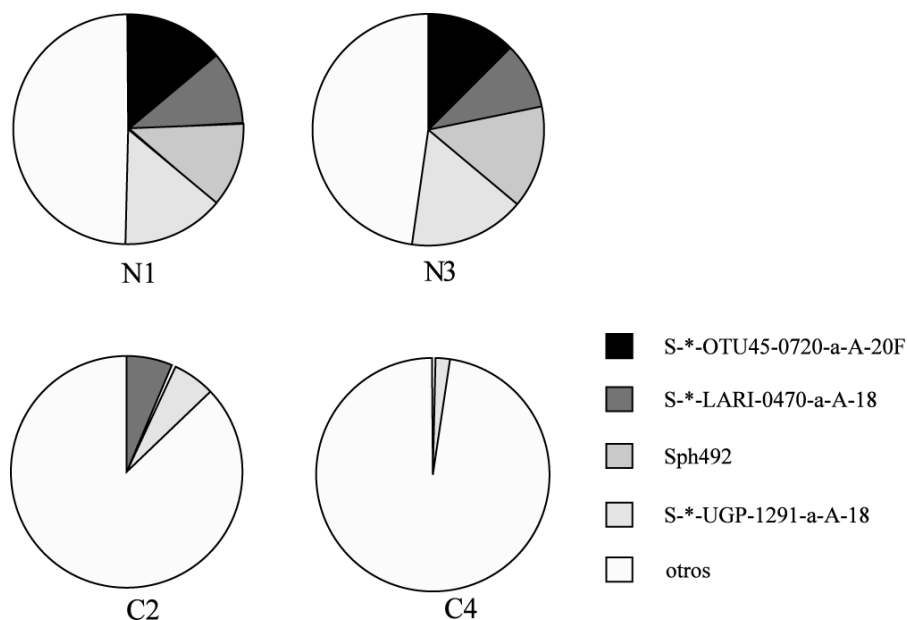


Figura 52. Porcentaje de células totales abarcado por las 4 poblaciones dominantes cuantificadas en barros de los reactores.

18.3 Cultivabilidad de los filotipos distintivos de la alimentación con NPEO₁₀

Se llevaron a cabo cultivos en una variedad de medios (sección 13) a partir de los barros activados de los reactores alimentados con NPEO₁₀ con el objetivo de seleccionar y aislar los microorganismos definidos como filotipos A, B, C y D. Se utilizaron las sondas específicas que probaron ser adecuadas para la detección de estos filotipos en los barros activados de los reactores (**Figura 52**). La detección se llevó a cabo por hibridación *in situ* sobre las células crecidas en cultivo. Para el *screening* del filotipo D, el cual previamente había demostrado poseer bajos contenidos de ARN ribosomal (**Figura 51**), se realizaron amplificaciones a partir de ADN genómico con las sondas específicas utilizadas como cebadores, e hibridaciones en membrana de fragmentos separados por DGGE.

Los filotipos A, B, C y D no resultaron cultivables en los medios y condiciones utilizados, a pesar de que éstos incluían una variedad de fuentes de carbono y vitaminas. Tampoco resultaron cultivables en el sobrenadante de los reactores alimentados con NPEO₁₀, utilizado como medio de cultivo.

Discusión

En este trabajo se estudiaron las características microbiológicas y ecológicas de comunidades bacterianas que degradan el detergente nonilfenol polietoxilado (NPEO₁₀) en barros activados. Este estudio se realizó utilizando sistemas a escala de laboratorio, mediante la aplicación de un diseño de réplicas que permitió separar los componentes de variabilidad atribuibles al tipo de alimentación (con o sin NPEO₁₀ en el medio) de los atribuibles a los procesos inherentes a las comunidades en particular, tales como migración y extinciones (Zar, 1999). Los reactores a escala de laboratorio fueron operados siguiendo un esquema semi-continuo de barros activados (ISO:9887, 1992). Estos sistemas se caracterizan por un alto tiempo de residencia de sólidos (TRS, **Tabla 5**), lo cual resulta en alta relación entre la biomasa y la materia orgánica y la consecuente eficiencia en la degradación (Bursch et al., 2004). Otra consecuencia del alto TRS es la retención en el sistema de microorganismos de crecimiento lento, con funciones degradativas más especializadas (Langford et al., 2005).

El nonilfenoldietoxilado (NPEO₂), monoetoxilado (NPEO₁) y nonilfenol (NP) fueron hallados como productos de degradación de este detergente en los reactores, en concordancia con lo observado tanto en plantas de tratamiento de efluentes (Giger et al., 1984; Ying et al., 2002), como en sistemas aeróbicos a escala de laboratorio (Langford et al., 2005). No se detectaron ácidos carboxílicos derivados del NPEO₁₀, que han sido observados como productos de degradación de este detergente en efluentes de plantas de tratamiento (Di Corcia *et al.*, 2000; Field y Reed, 1996).

El patrón de degradación observado es consistente con un mecanismo de acortamiento sucesivo de la cadena etoxilada desde el exterior, o *exoescisión*. Una de las evidencias del mecanismo de *exoescisión* de la molécula de NPEO₁₀ es el incremento transitorio en la proporción de oligómeros de cadena media, como resultado de la degradación sucesiva de la molécula completa. Esto se observa en los reactores a los 30 minutos del agregado de NPEO₁₀ (**Figura 16**). Éste es hasta ahora el único mecanismo de degradación propuesto para el NPEO₁₀ en condiciones aeróbicas (John y White, 1998; Maki *et al.*, 1994), aunque

en estudios de degradación de octilfenol polietoxilado existen reportes de un mecanismo de fisión central (Franska et al., 2003).

La cinética de degradación del detergente ajustó a una función biexponencial, con tiempos medios de degradación de 1,6 y 11,5 días (**Figura 18**), lo cual estaría indicando que luego de la rápida degradación del NPEO₁₀ se produce una acumulación de compuestos de biodegradación más lenta. Estos compuestos son el NPEO₂, NPEO₁ y NP observados por electroforesis capilar en los reactores a las 48 h luego de la alimentación (**Figura 16**).

Los barros activados provenientes de los reactores que habían estado alimentados con NPEO₁₀ durante más de un año mostraron mayor velocidad de degradación del detergente que los controles (**Figura 17**). Este resultado podría ser indicio de una mayor abundancia, de bacterias capaces de degradar el detergente, consecuencia del enriquecimiento en poblaciones degradadoras ó de una inducción de las enzimas degradadoras mediada por el mismo detergente o por la porción hidrofóbica de la molécula, como se ha observado en cultivos del género *Pseudomonas* (Maki et al., 1994).

Los sistemas utilizados en el tratamiento de efluentes contienen comunidades microbianas altamente diversas, complejas y dinámicas (Curtis et al., 2003; Wagner et al., 2002). La estructuración de estas comunidades es explicada por algunos autores (Curtis et al., 2003) utilizando el marco dado por teorías ecológicas clásicas, tales como la *teoría de biogeografía de islas* (MacArthur y Wilson, 1967), más recientemente revisada en la *teoría neutral de biodiversidad y biogeografía* (Hubbell, 2001). Estas teorías están basadas en *modelos neutrales*, porque asumen que todos los organismos de un grupo funcional particular tienen propiedades idénticas, por lo tanto no hay ninguna especie o individuo más competitivo que otro. A este supuesto se lo llama *hipótesis de la equivalencia funcional* (Hubbell, 2005). En los párrafos siguientes demostraremos cómo la estructuración de las comunidades estudiadas se ajusta hasta cierto punto a las teorías propuestas, mientras que algunos resultados son más claramente explicables a la luz de teorías que implican consideraciones biológicas, no puramente estocásticas.

Las plantas de tratamiento pueden definirse como ecosistemas insulares, ya que están

contenidas por límites definidos y relativamente aisladas del exterior. Suponiendo que la invasión desde el exterior es al azar, las características una comunidad dada en un reactor estarán influenciadas por: i) el tamaño de la comunidad en cuestión, ii) el tamaño del reservorio de microorganismos desde donde se produce su estructuración, o *metacomunidad*, iii) la distribución de taxones o especies dentro de la metacomunidad, iv) la tasa de invasión desde la metacomunidad, y v) la estructura espacial de la comunidad en cuestión.

La **Figura 53** esquematiza el efecto del *tamaño de una comunidad* en la dinámica de su estructuración. Cada isla representa una comunidad de distinto tamaño. Las tres islas poseen igual tasa de invasión de especies, ya que están igualmente aisladas de la metacomunidad. Sin embargo, cuanto menor sea el tamaño de la isla en cuestión, mayor será la tasa de extinción, mayor la deriva (fluctuación de especies al azar) y por lo tanto las islas más pequeñas tendrán comunidades más inestables en el tiempo, menos reproducibles entre sí y menos diversas (Curtis et al., 2003).

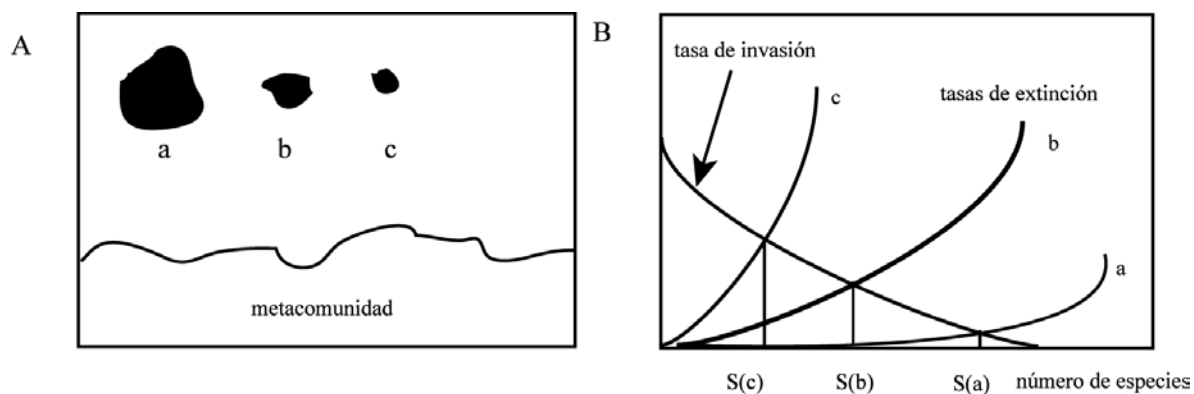


Figura 53. Modelo de equilibrio basado en la teoría de biogeografía de islas. **A-** Esquema de la situación de tres islas hipotéticas de distinto tamaño igualmente cercanas a la fuente de invasión. **B-** Gráfico de tasas de invasión y extinción correspondiente a esta situación hipotética. La tasa de invasión es constante para las tres islas. Las tasas de extinción **a**, **b** y **c** se corresponden con las islas **a**, **b** y **c** en **A** (Curtis et al., 2003)

De aquí surge una predicción que se aplica a las comunidades de plantas de tratamiento de efluentes: los reactores a escala de laboratorio deberían ser más dinámicos y menos

reproducibles que las plantas de tratamiento a escala real. Existen evidencias que apoyan esta predicción. Desde que Fernández y coautores encontraron que las comunidades bacterianas en réplicas de reactores anaeróbicos a escala de laboratorio no eran reproducibles entre sí (Fernandez et al., 2000), otros autores han reportado las mismas observaciones en reactores tanto anaeróbicos (McHugh et al., 2004; Zumstein et al., 2000), como aeróbicos (Kaewpipat y Grady, 2002). Por el contrario, no parece ocurrir lo mismo en las plantas de tratamiento a escala real, donde se observa mayor estabilidad en la composición de especies bacterianas (LaPara et al., 2002; Smith et al., 2003).

También se han reportado algunos resultados que no parecieran coincidir con lo previamente expuesto. La estructura de las comunidades de arqueas metanogénicas en réplicas de reactores anaeróbicos a escala de laboratorio, resultaron estables y similares entre sí (Fernandez et al., 1999; Pender et al., 2004). Sin embargo a la luz de las teorías postuladas esto es sólo en apariencia contradictorio, ya en este caso se debe tener en cuenta el efecto del *menor tamaño de la metacomunidad*. Una metacomunidad más pequeña implica un reservorio menor de diversidad, por lo cual se espera no sólo una menor diversidad en cada comunidad particular, sino una mayor estabilidad y reproducibilidad entre comunidades similares. Este es el caso de la metacomunidad de arqueas metanogénicas: su pequeño tamaño fue confirmado en un estudio de 44 reactores anaeróbicos en todo el mundo, de una variedad de tamaños y tipos de efluentes. En él se encontraron 23 secuencias diferentes en los primeros 24 reactores y ninguna nueva en los siguientes 20 (Leclerc et al., 2004).

Las comunidades bacterianas de los reactores *control* analizados en este trabajo, en forma similar a otras comunidades bacterianas a escala de laboratorio (Kaewpipat y Grady, 2002) presentaron baja similitud entre reactores réplica (**Figura 24**). El agrupamiento al azar de las comunidades de los reactores control es evidencia del dinamismo de estas comunidades (**Figura 23**).

Sin embargo, en los reactores alimentados con NPEO₁₀ se observó una alta replicabilidad en sus comunidades bacterianas (**Figura 24**) y un patrón temporal de evolución ordenada,

no azarosa (**Figura 23**). También se observaron diferencias en la diversidad que implicaban mayor dominancia de especies (**Figuras 27 y 28**).

Existen otras situaciones en las que se dan comportamientos estables y reproducibles en reactores a escala de laboratorio. El mecanismo de sucesión asociado a baja diversidad se ha reportado en sistemas de bioremediación de mercurio (von Canstein et al., 2002). Sucesión e incluso convergencia a partir de diferentes inóculos han sido descritas en comunidades de reactores de lecho fluidizado que degradaban compuestos aromáticos (Massoldeya et al., 1997). La característica en común que se puede encontrar en estas situaciones es la presencia de microorganismos especializados que llevan a cabo una determinada función como es la degradación de compuestos tóxicos o recalcitrantes.

A partir de estos resultados proponemos una hipótesis que agrega una consideración biológica y no puramente estocástica para la interpretación de la mayor estabilidad, replicabilidad y dominancia observadas en los reactores alimentados con NPEO₁₀. En este caso no todos los microorganismos son igualmente competitivos entre sí, ya que el NPEO₁₀ favorece la presencia persistente y reproducible de determinadas poblaciones con ventajas adaptativas específicas. La presencia de NPEO₁₀ en el medio de alimentación constituye entonces una presión de selección que favorece la especialización.

En este punto podría argumentarse que la metacomunidad de los degradadores de NPEO₁₀ es pequeña, y que esto restringe el reservorio de diversidad disponible. Sin embargo, esto no es concordante con la diversidad de bacterias que pueden crecer en NPEO₁₀ como única fuente de carbono (Barberio et al., 2001; Di Gioia et al., 2004; Frassinetti et al., 1996), ninguna de las cuales se seleccionó como dominante en los reactores. Los resultados obtenidos se interpretan más claramente suponiendo que, de una gran diversidad posible en la metacomunidad, sólo algunas poblaciones son seleccionadas por la presencia del detergente, por ser altamente especializadas y competitivas en el contexto particular de las comunidades de los reactores.

En este trabajo se encontraron evidencias de especialización en las comunidades de los reactores alimentados con NPEO₁₀. Según las teorías de estrategias ecológicas de

utilización de recursos aplicadas a las comunidades microbianas (Andrews y Hall, 1986), los microorganismos definidos como estrategias *K* poseen bajas tasa de crecimiento y son muy especializados en sus requerimientos. Estas características redundan en una menor cultivabilidad de este tipo de microorganismos (Garland *et al.*, 2001; Sigler y Zeyer, 2002; Sigler y Zeyer, 2004). Por lo tanto se podría predecir que las poblaciones especializadas seleccionadas por el NPEO₁₀ serán no cultivables o difícilmente cultivables. Ninguna de las poblaciones cuantificadas como dominantes y distintivas de la alimentación con NPEO₁₀ (**Figura 52**) fueron detectadas en cultivo. Esto se observó también indirectamente como una baja similitud entre las composiciones de las comunidades de los reactores alimentados con NPEO₁₀ y sus respectivos cultivos. En la **Figura 26** se observa que las comunidades de los reactores agruparon muy cercanas, mientras que los cultivos se alejaron formando un agrupamiento en sí. Este resultado implica que las poblaciones seleccionadas en los reactores no son las mismas que las seleccionadas en cultivo. También implica que el cultivo selecciona especies bacterianas en común independientemente del medio utilizado. Estas especies bacterianas que comparten los cultivos serían los miembros oportunistas de la comunidad, que aunque en baja proporción en los reactores, serían capaces de crecer en distintos medios de cultivo por ser generalistas en sus requerimientos fisiológicos.

En los organismos del tipo *K* la estrategia de especialización también está asociada a una lenta tasa de crecimiento (Andrews y Hall, 1986). En los reactores, 3 de las 4 poblaciones distintivas de la alimentación con NPEO₁₀ no fueron observadas como dominantes hasta después de 4 meses de operación (**Figura 33**), lo cual es consistente con bajas tasas de crecimiento en el reactor. El aumento de la dominancia de especies en los reactores alimentados con NPEO₁₀, que se observa como significativa luego de 21 meses (**Figura 28**), es la expresión cuantitativa de este fenómeno. Una de estas poblaciones, la población de miembros del filotipo D (*Gammaproteobacteria*, *Xanthomonadaceae*) demostró poseer una muy baja cantidad de ARN ribosomal (**Figura 51**). Existen evidencias en bacterias oligotróficas marinas pertenecientes al *phylum Proteobacteria*, que indican que un bajo contenido de ribosomas por célula está relacionado con una estrategia ecológica de crecimiento lento (Fegatella *et al.*, 1998).

Además de estos indicios indirectos, el proceso ordenado de desarrollo de la comunidad bacteriana característico de una sucesión, con la selección de las mismas especies con abundancias relativas similares en réplicas independientes (**Figura 52**) son evidencias directas de que el NPEO₁₀ constituye una presión de selección que favorece la presencia de microorganismos específicos, con ciertas ventajas adaptativas. Una de estas ventajas adaptativas podría ser la capacidad de degradación del detergente observada en los reactores. Sin embargo desde los resultados de este trabajo no es posible relacionar ninguna población con una función en particular. Desde el punto de vista metodológico, los resultados obtenidos implican correlación y no causalidad. Desde el punto de vista ecológico, alguna o algunas de las poblaciones observadas pueden estar alimentándose de productos de degradación liberados por otras poblaciones, por lo tanto beneficiándose indirectamente por la presencia del detergente.

Las poblaciones bacterianas dominantes en los reactores alimentados con NPEO₁₀ fueron identificadas y cuantificadas mediante el ciclo del ARN ribosomal completo (Amann et al., 1995). Para la identificación filogenética de estas poblaciones se llevó a cabo una estrategia novedosa que combinó la información obtenida a partir del DGGE y la utilización de cebadores generales situados en el extremo 5' del ADNr 16S, para amplificar fragmentos de mayor longitud pertenecientes a los filotipos detectados mediante el DGGE. A partir de estas secuencias se diseñaron sondas específicas que permitieron cuantificar estos filotipos (**Figura 31**). Una estrategia similar acaba de ser publicada por Hofle en la revista *Environmental Microbiology* (Hofle et al., 2005).

Los filotipos dominantes seleccionados en los reactores mediante la alimentación con NPEO₁₀ se ubicaron filogenéticamente en los *phyla Acidobacteria* y *Proteobacteria* (clases *Alfa*, *Beta* y *Gammaproteobacteria*).

Los miembros de *Acidobacteria* encontrados en este trabajo pertenecen al grupo III de este *phylum* (Quaiser et al., 2003) (**filotipo A, Figura 36**). La secuencia más cercana a las secuencias obtenidas en este estudio presentó sólo un 94% de identidad con éstas, lo cual sugiere que este filotipo podría constituir una especie diferente de las conocidas hasta el momento (Stackebrandt y Goebel, 1994). A partir de la secuencia del ADNr 16S de este

filotipo se diseñó una sonda (**S^{*}-AcG3-1282-a-A-18**) que resultó altamente específica para este filotipo y las secuencias relacionadas más cercanas (**Figuras 34 y 36**).

El *phylum Acidobacteria* es altamente diverso. Según algunos autores, sería equivalente a otros *phyla* como las *Proteobacteria* o *Actinobacteria* en su diversidad genética y metabólica (Quaiser et al., 2003). Sin embargo este *phylum* fue descubierto recientemente, dada la dificultad de aislamiento de sus miembros en medios de cultivo clásico. Esta dificultad limita el conocimiento de su fisiología y de sus posibles roles en los numerosos ecosistemas en donde ha sido encontrado. Los ARN ribosomales de miembros de esta división han sido hallados por métodos moleculares en hábitats tan diversos como diferentes tipos de suelo (Dunbar et al., 1999), aguas (Barns et al., 1999), y barros activados (LaPara et al., 2000; Layton et al., 2000). Sólo tres especies han sido descritas (*Acidobacterium capsulatum*, *Geothrix fermentans* y *Holophaga foetida*). En trabajos recientes se han obtenido nuevos aislamientos que aún no han sido caracterizados y por lo tanto no poseen categoría de especies (Joseph et al., 2003; Sait et al., 2002).

Las *Alfaproteobacteria* halladas en este estudio (filotipo C) pertenecen a la familia *Sphingomonadaceae*, dentro del orden *Sphingomonadales* (**Figura 45**). El género *Sphingomonas* incluye muchas cepas aisladas que son capaces de degradar una variedad de compuestos como por ejemplo hidrocarburos aromáticos policíclicos (Bastiaens et al., 2000; Khan et al., 1996; Pinyakong et al., 2000) A pesar de la gran cantidad de cepas aisladas hasta el momento, se demostró también la existencia en suelos de muchas *Sphingomonadaceae* que aún no ha sido cultivadas (Leys et al., 2004).

La especie *Sphingomonas terrae*, que utiliza polietilenglicol como fuente de carbono (Takeuchi et al., 1993), es la especie descrita que presentó una mayor similitud en su secuencia (96%) con el filotipo C de los reactores. El mecanismo de exoescisión de unidades de etilenglicol propuesto para la degradación del NPEO₁₀ se ha observado también en el metabolismo de polietilenglicol (Frings et al., 1992). Una posibilidad interesante sería la existencia, en las poblaciones de *Sphingomonas* encontradas en los reactores, de una enzima con capacidad de degradación tanto de polietilenglicol como de NPEO₁₀ mediante este mecanismo de exoescisión. Una evidencia en contra de esta

hipótesis es que las cepas de *Pseudomonas* capaces de degradar NPEO₁₀ (John y White, 1998; Maki *et al.*, 1994) no son capaces de degradar polietilenglicol, por lo cual se deduce que la enzima en estos microorganismos debe ser diferente de la que cataliza la degradación de polietilenglicol. Sin embargo, las comunidades que se seleccionan en los barros activados que degradan NPEO₁₀ son muy diferentes de los cultivos aislados en laboratorio, por lo cual las enzimas involucradas también podrían ser diferentes.

Las *Betaproteobacteria* halladas en este trabajo (filotipo B) pertenecen a un grupo aún no clasificado dentro del orden *Burkholderiales* (**Figura 40**). Las secuencias más cercanas a éstas halladas en las bases de datos presentan con ellas una identidad menor de 96%. El género *Aquabacterium* es el género clasificado más cercano. Las bacterias relacionadas con *Aquabacterium sp.* fueron halladas en *biofilms* formados en cañerías de agua potable, donde podrían estar asociadas a la degradación de impurezas, incluyendo detergentes no iónicos (Kalmbach *et al.*, 2000). La sonda **S^{*}-LARI-0470-a-A-18** diseñada en este trabajo, específica para el filotipo B y organismos relacionados (**Figuras 40 y 41**) resultó exitosa para la cuantificación de las poblaciones del filotipo B en experimentos de hibridación *in situ* en los barros activados de los reactores.

Las *Gammaproteobacteria* halladas en este trabajo (filotipo D) pertenecen a la familia *Xanthomonadaceae*, dentro del orden *Xanthomonadales*. Las secuencias más cercanas a éstas pertenecen a microorganismos no cultivados dentro de este grupo (**Figura 48**). Los miembros del filotipo D no resultaron cultivables en una variedad de medios y no fueron observados hasta después de los 4 meses de operación del reactor (**Figura 33**). A partir de las secuencias del filotipo D se diseñaron las sondas **S^{*}-UGP-1230-a-A-18** y **S^{*}-UGP-1291-a-A-18** altamente específicas para el filotipo D y algunos organismos relacionados (**Figuras 48 y 49**).

Todas las bacterias que hasta el momento se han aislado en cultivo con NPEO₁₀ como única fuente de carbono pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria* (Barberio *et al.*, 2001; Di Gioia *et al.*, 2004; John y White, 1998; Maki *et al.*, 1994) pero esto se debe probablemente a que el cultivo favorece específicamente a algunos miembros de esta clase. La selección positiva en cultivos de los miembros de la clase *Gammaproteobacteria* (**Figura 25**) se

ha observado en trabajos anteriores (Manz et al., 1994; Wagner et al., 1993). Ninguna de las cepas previamente aisladas está relacionada filogenéticamente con el filotipo D.

En las comunidades de los reactores control se observó una gran proporción de microorganismos pertenecientes al *phylum Actinobacteria*. Una disminución drástica de la abundancia de este grupo fue observada en los reactores alimentados con NPEO₁₀ (**Figuras 29 y 30**), lo cual es evidencia de una selección negativa mediada por el detergente. Una causa posible sería que el NPEO₁₀, tal como otros surfactantes, resulte tóxico para estos microorganismos (Kitatsuji et al., 1996; Malik et al., 2005).

En este trabajo se lograron caracterizar a nivel microbiológico y ecológico las comunidades bacterianas que degradan el detergente nonilfenol polietoxilado en barros activados. El hallazgo de que el NPEO₁₀ constituye una presión de selección que favorece el establecimiento de microorganismos específicos, pertenecientes a diversos grupos filogenéticos y con características de especies de sucesión tardía, hace necesario un enfoque diferente al hasta ahora manejado para analizar problema de la identificación de las especies responsables de su degradación. Este enfoque debe contemplar la estructuración de la comunidad como factor fundamental de selección de microorganismos asociados a la degradación del detergente, en cada ambiente en particular.

Conclusiones

En este trabajo se estudiaron las comunidades bacterianas que degradan NPEO₁₀ en barros activados. Se identificaron los productos de degradación primaria de este compuesto, y se confirmó que el mecanismo de degradación propuesto en estudios anteriores con cultivos puros también está presente en sistemas microbianos de alta biodiversidad.

Se observó un tipo de estructuración en las comunidades bacterianas de estos sistemas que resultó consistente con un mecanismo de sucesión. Se propuso una interpretación biológica basada en las diferencias de competitividad de determinadas poblaciones bajo la presión de selección del NPEO₁₀.

En las poblaciones dominantes seleccionadas por el NPEO₁₀ se encontraron evidencias de estrategias propias de especies de sucesión tardía o especies *K*, tales como dificultad de obtención en cultivo, bajo contenido de ribosomas, detección tardía en la comunidad y persistencia en el ecosistema por tiempos prolongados.

Se desarrolló un método novedoso de identificación filogenética de poblaciones bacterianas que consistió en el diseño de cebadores a partir de secuencias obtenidas por análisis de bandas del DGGE y su utilización junto con cebadores generales en el extremo 5' del ADNr 16S para amplificar fragmentos de mayor longitud pertenecientes a filotipos previamente desconocidos. A partir de estas secuencias se diseñaron sondas para estos filotipos. Por su alta especificidad, las sondas son útiles como marcadores de niveles taxonómicos de muy alta resolución.

Se identificaron y cuantificaron poblaciones bacterianas dominantes, altamente reproducibles en réplicas independientes, seleccionadas mediante la alimentación a largo plazo con NPEO₁₀. Los representantes de estas poblaciones pertenecen a diversos grupos filogenéticos, ninguno de ellos previamente identificado en estudios de biodegradación de este detergente.

Las evidencias apuntan hacia un mecanismo de especialización de estas poblaciones, adaptado específicamente a la presencia de NPEO₁₀, y las ubican como candidatos posibles para estudios próximos de identificación de poblaciones particulares degradadoras de este detergente en barros activados.

Referencias

Abramsky, Z., y Rosenzweig, M. L. (1984). Tilman's predicted productivity-diversity relationship shown by desert rodents. *Nature* **309**, 150-151.

Ahel, M., Giger, W., y Koch, M. (1994). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment .1. occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Research* **28**, 1131-1142.

Ahel, M., Schaffner, C., y Giger, W. (1996). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. 3. Occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Water Research* **30**, 37-46.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.

Amann, R., Krumholz, L., y Stahl, D. A. (1990). Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* **172**, 762-770.

Amann, R. I., Ludwig, W., y Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**, 143-169.

American Public Health Association, A. W. W. A., Water Environment Federation (1998). *Standard methods for examination of water and wastewater*, 20ava edn (Washington DC).

Andrews, J. H., y Hall, R. F. (1986). r- and K selection in microbial ecology. *Advances in Microbial Ecology* **9**, 99-147.

Anton, A. I., Martinez-Murcia, A. J., y Rodriguez-Valera, F. (1999). Intraspecific diversity of the 23S rRNA gene and the spacer region downstream in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **181**, 2703-2709.

Atlas, R. M., y Bart, A. (1998). *Microbial Ecology. Fundamentals and Applications*, 4ta edn (California, Benjamin/Cummings).

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., y Struhl, K., eds. (1998). *Current Protocols in Molecular Biology*, 2da edn (Dordrecht, Kluwer Academic Publishers).

Baker, G. C., Smith, J. J., y Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* **55**, 541-555.

Barberio, C., Pagliai, L., Cavalieri, D., y Fani, R. (2001). Biodiversity and horizontal gene transfer in culturable bacteria isolated from activated sludge enriched in nonylphenol ethoxylates. *Research in Microbiology* **152**, 105-112.

- Barns, S. M., Takala, S. L., y Kuske, C. R. (1999). Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. *Applied & Environmental Microbiology* **65**, 1731-1737.
- Baskaran, N., Kandpal, R. P., Bhargava, A. K., Glynn, M. W., Bale, A., y Weissman, S. M. (1996). Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. *PCR Methods & Applications* **6**, 633-638.
- Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., deWachter, R., Verachtert, H., y Diels, L. (2000). Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Applied & Environmental Microbiology* **66**, 1834-1843.
- Bennett, E. R., y Metcalfe, C. D. (2000). Distribution of degradation products of alkylphenol ethoxylates near sewage treatment plants in the lower great lakes, North America. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**, 784-792.
- Bowman, J. P., y McCuaig, R. D. (2003). Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Applied & Environmental Microbiology* **69**, 2463-2483.
- Braker, G., Ayala-del-Rio, H. L., Devol, A. H., Fesefeldt, A., y Tiedje, J. M. (2001). Community structure of denitrifiers, Bacteria, and Archaea along redox gradients in pacific northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (nirS) and 16S rRNA genes. *Applied & Environmental Microbiology* **67**, 1893-1901.
- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D., y Noller, H. F. (1980). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **148**, 107-127.
- Brunk, C. F., y Eis, N. (1998). Quantitative measure of small-subunit rRNA gene sequences of the kingdom *Korarchaeota*. *Applied & Environmental Microbiology* **64**, 5064-5066.
- Buckling, A., Kassen, R., Bell, G., y Rainey, P. B. (2000). Disturbance and diversity in experimental microcosms. *Nature* **408**, 961-964.
- Bursch, W., Fuerhacker, M., Gemeiner, M., Grillitsch, B., Jungbauer, A., Kreuzinger, N., Moestl, E., Scharf, S., Schmid, E., Skutan, S., y Walter, I. (2004). Endocrine disrupters in the aquatic environment: the Austrian approach - ARCEM. *Water Science & Technology* **50**, 293-300.
- Button, D. K., Robertson, B. R., Lepp, P. W., y Schmidt, T. M. (1998). A small, dilute-cytoplasm, high-affinity, novel bacterium isolated by extinction culture and having kinetic constants compatible with growth at ambient concentrations of dissolved nutrients in seawater. *Applied & Environmental Microbiology* **64**, 4467-4476.

- Cammarano, P., Palm, P., Creti, R., Ceccarelli, E., Sanangelantoni, A. M., y Tiboni, O. (1992). Early evolutionary relationships among known life forms inferred from elongation factor EF-2/EF-G sequences: phylogenetic coherence and structure of the archaeal domain. *Journal of Molecular Evolution* **34**, 396-405.
- Chandler, D. P., Fredrickson, J. K., y Brockman, F. J. (1997). Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Molecular Ecology* **6**, 475-482.
- Cho, J.-C., y Giovannoni, S. J. (2004). Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine *Gammaproteobacteria*. *Applied & Environmental Microbiology* **70**, 432-440.
- Clarke, K. R., y Warwick, R. M. (2001). *Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation*, 2da edn (Plymouth, PRIMER-E).
- Clayton, R. A., Sutton, G., Hinkle, P. S., Bult, C., y Fields, C. (1995). Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank - why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 595-599.
- Connell, J. H. (1978). Diversity in tropical rain forests and coral reefs. *Science* **199**, 1302-1310.
- Curtis, T. P., Head, I. M., y Graham, D. W. (2003). Theoretical ecology for engineering biology. *Environmental Science & Technology* **37**, 64A-70A.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., y Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic & Applied Microbiology* **22**, 434-444.
- de Queiroz, K. (1999). The general lineage concept and the defining properties of species category. En *Species: New Interdisciplinary Essays*, R. A. Wilson, ed. (Cambridge, MIT Press), pp. 49-89.
- DeLong, E. F., Frankel, R. B., y Bazylinski, D. A. (1993). Multiple evolutionary origin of magnetotaxis in bacteria. *Science* **259**, 803-806.
- Di Corcia, A., Cavallo, R., Rescenzi, C., y Nazzari, M. (2000). Occurrence and abundance of dicarboxylated metabolites of nonylphenol polyethoxylate surfactants in treated sewages. *Environmental Science & Technology* **34**, 3914-3919.
- Di Gioia, D., Fambrini, L., Coppini, E., Fava, F., y Barberio, C. (2004). Aggregation-based cooperation during bacterial aerobic degradation of polyethoxylated nonylphenols. *Research in Microbiology* **155**, 761-769.

- Dunbar, J., Takala, S., Barns, S. M., Davis, J. A., y Kuske, C. R. (1999). Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Applied & Environmental Microbiology* **65**, 1662-1669.
- Ehrmann, M., Ludwig, W., y Schleifer, K. H. (1994). Reverse dot blot hybridization. A useful method for the direct identification of lactic acid bacteria in fermented food. *FEMS Microbiology Letters* **117**, 143-150.
- Eichner, C. A., Erb, R. W., Timmis, K. N., y Wagner-Dobler, I. (1999). Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Applied & Environmental Microbiology* **65**, 102-109.
- Euzéby, J. P., y Tindall, B. J. (2002). Necessary corrections to the Approved Lists of Bacterial Names according to Rule 40d (formerly Rule 46). Request for an opinion. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* **52**, 2321-2322.
- Fegatella, F., Lim, J., Kjelleberg, S., y Cavicchioli, R. (1998). Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas sp.* strain RB2256. *Applied & Environmental Microbiology* **64**, 4433-4438.
- Fernandez, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C., y Tiedje, J. (1999). How stable is stable? function versus community composition. *Applied & Environmental Microbiology* **65**, 3697-3704.
- Fernandez, A. S., Hashsham, S. A., Dollhopf, S. L., Raskin, L., Glagoleva, O., Dazzo, F. B., Hickey, R. F., Criddle, C. S., y Tiedje, J. M. (2000). Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Applied & Environmental Microbiology* **66**, 4058-4067.
- Field, J. A., y Reed, R. L. (1996). Nonylphenol polyethoxy carboxylate metabolites of nonionic surfactants in U.S. paper mill effluents, municipal sewage treatment plant effluents, and river waters. *Environmental Science & Technology* **30**, 3544-3550.
- Forney, L. J., Zhou, J. Z., y Brown, C. J. (2004). Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Current Opinion in Microbiology* **7**, 210-220.
- Frank, J. (2001). Cryo-electron microscopy as an investigative tool: the ribosome as an example. *Bioessays* **23**, 725-732.
- Frank, J. (2003). Toward an understanding of the structural basis of translation. *Genome Biology* **4**, 237.
- Franska, M., Franski, R., Szymanski, A., y Lukaszewski, Z. (2003). A central fission pathway in alkylphenol ethoxylate biodegradation. *Water Research* **37**, 1005-1014.
- Frassinetti, S., Isoppo, A., Andrea, C., y Vallini, G. (1996). Bacterial attack of non-ionic aromatic surfactants - comparison of degradative capabilities of new isolates from

- nonylphenol polyethoxylate polluted wastewaters. *Environmental Technology* **17**, 199-205.
- Friedrich, U., Prior, K., Altendorf, K., y Lipski, A. (2002). High bacterial diversity of a waste gas-degrading community in an industrial biofilter as shown by a 16S rDNA clone library. *Environmental Microbiology* **4**, 721-734.
- Friesa, E., y Puttmann, W. (2004). Occurrence of 4-Nonylphenol in rain and snow. *Atmospheric Environment* **38**, 2013-2016.
- Frings, J., Schramm, E., y Schink, B. (1992). Enzymes involved in anaerobic polyethylene glycol degradation by *Pelobacter venetianus* and *Bacteroides* strain PG1. *Applied & Environmental Microbiology* **58**, 2164-2167.
- Garland, J. L., Cook, K. L., Adams, J. L., y Kerkhof, L. (2001). Culturability as an indicator of succession in microbial communities. *Microbial Ecology* **42**, 150-158.
- Gerardi, M. H. (2002). *Settleability Problems and Loss of Solids in the Activated Sludge Process*, 3a edn (Hoboken, John Wiley and sons).
- Gerba, C. P., Maier, R. M., y Pepper, I. L. (2000). Domestic wastes and waste treatment. En *Environmental Microbiology* (San Diego, Academic Press), pp. 585.
- Giger, W., Brunner, P. H., y Schaffner, C. (1984). 4-nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* **225**, 623-625.
- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., y Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied & Environmental Microbiology* **63**, 2802-2813.
- Gogarten, J. P., y Townsend, J. P. (2005). Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 679-687.
- Gomes, N. C. M., Heuer, H., Schonfeld, J., Costa, R., Mendonca-Hagler, L., y Smalla, K. (2001). Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant & Soil* **232**, 167-180.
- Gutell, R. R., Larsen, N., y Woese, C. R. (1994). Lessons from an evolving rRNA - 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiological Reviews* **58**, 10-26.
- Hedlund, B. P., Gosink, J. J., y Staley, J. T. (1997). *Verrucomicrobia* div. nov. a new division of the *Bacteria* containing three new species of *Prostheco bacter*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **72**, 29-38.
- Heuer, H., Hartung, K., Wieland, G., Kramer, I., y Smalla, K. (1999). Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Applied & Environmental Microbiology* **65**, 1045-1049.

Hoang, P. T. (2002) Effect of nutrients on extracellular polymeric substance production and sludge characteristics., Master Thesis, School of Environment, Resources and Development, Thailand.

Hofle, M. G., Flavier, S., Christen, R., Botel, J., Labrenz, M., y Brettar, I. (2005). Retrieval of nearly complete 16S rRNA gene sequences from environmental DNA following 16S rRNA-based community fingerprinting. *Environmental Microbiology* **7**, 670-675.

Hubbell, S. P. (2001). *The unified neutral theory of biodiversity and biogeography*. (Princeton, Princeton University Press).

Hubbell, S. P. (2005). Neutral theory in community ecology and the hypothesis of functional equivalence. *Functional Ecology* **19**, 166-172.

Hugenholtz, P., Goebel, B. M., y Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* **180**, 4765-4774.

Huston, M. A. (1994). *Biological Diversity* (Cambridge, Cambridge Univ. Press).

ISO:9887 (1992). Water quality. Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium. Semi-continuous activated sludge method (SCAS) (Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization).

ISO:15462 (1997). Water quality. Selection of tests for biodegradability (Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization).

Jenkins, D., G., R. M., y Daigger, G. T. (2004). *Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation problems*, 3ra edn (Boca Raton, Florida, CRC Press LLC).

John, D. M., y White, G. M. (1998). Mechanism of biotransformation of nonylphenol polyethoxylates to xenoestrogens in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* **180**, 4332-4338.

Joseph, S. J., Hugenholtz, P., Sangwan, P., Osborne, C. A., y Janssen, P. H. (2003). Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied & Environmental Microbiology* **69**, 7210-7215.

Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A., y Wagner, M. (2002). The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Systematic and Applied Microbiology* **25**, 84-99.

Kaewpipat, K., y Grady, C. P. L. (2002). Microbial population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors. *Water Science & Technology* **46**, 19-27.

- Kalmbach, S., Manz, W., Bendinger, B., y Szewzyk, U. (2000). *In situ* probing reveals *Aquabacterium commune* as a widespread and highly abundant bacterial species in drinking water biofilms. *Water Research* **34**, 575-581.
- Kalmbach, S., Manz, W., y Szewzyk, U. (1997). Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their *in situ* dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Applied & Environmental Microbiology* **63**, 4164-4170.
- Kassen, R., Buckling, A., y Rainey, P. B. (2000). Diversity peaks at intermediate productivity in a laboratory microcosm. *Nature* **406**, 508-511.
- Khan, A. A., Wang, R. F., Cao, W. W., Franklin, W., y Cerniglia, C. E. (1996). Reclassification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Beijerinckia* sp. strain B1, as *Sphingomonas yanoikuyae* by fatty acid analysis, protein pattern analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S ribosomal DNA sequencing. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* **46**, 466-469.
- Kitatsuji, K., Miyata, H., y Fukase, T. (1996). Lysis of filamentous bacteria by surfactants. *Water Science and Technology* **34**, 145-153.
- Klappenbach, J. A., Dunbar, J. M., y Schmidt, T. M. (2000). rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied & Environmental Microbiology* **66**, 1328-1333.
- Lane, D. J., Stahl, D. A., Olsen, G. J., Heller, D. J., y Pace, N. R. (1985). Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. *Journal of Bacteriology* **163**, 75-81.
- Langford, K. H., Scrimshaw, M. D., Birkett, J. W., y Lester, J. N. (2005). Degradation of nonylphenolic surfactants in activated sludge batch tests. *Water Research* **39**, 870-876.
- LaPara, T. M., Nakatsu, C. H., Pantea, L., y Alleman, J. E. (2000). Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. *Applied & Environmental Microbiology* **66**, 3951-3959.
- LaPara, T. M., Nakatsu, C. H., Pantea, L. M., y Alleman, J. E. (2002). Stability of the bacterial communities supported by a seven-stage biological process treating pharmaceutical wastewater as revealed by PCR-DGGE. *Water Research* **36**, 638-646.
- Layton, A. C., Karanth, P. N., Lajoie, C. A., Meyers, A. J., Gregory, I. R., Stapleton, R. D., Taylor, D. E., y Sayler, G. S. (2000). Quantification of *Hyphomicrobium* populations in activated sludge from an industrial wastewater treatment system as determined by 16S rRNA analysis. *Applied & Environmental Microbiology* **66**, 5106-5120.
- Leclerc, M., Delgenes, J.-P., y Godon, J.-J. (2004). Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environmental Microbiology* **6**, 809-819.

- Leys, N., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E. M., y Springael, D. (2004). Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied & Environmental Microbiology* **70**, 1944-1955.
- Li, W.-H. (1997). *Molecular Evolution* (Sunderland, MA, Sinauer Associates).
- Lozada, M., Figuerola, E. L. M., Itria, R. F., y Erijman, L. (2005). Replicability of dominant bacterial populations after long-term surfactant enrichment in lab-scale activated sludge. *Environmental Microbiology* doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00939.x.
- Ludwig, W., Bauer, S. H., Bauer, M., Held, I., Kirchhof, G., Schulze, R., Huber, I., Spring, S., Hartmann, A., y Schleifer, K. H. (1997). Detection and *in situ* identification of representatives of a widely distributed new bacterial *phylum*. *FEMS Microbiology Letters* **153**, 181-190.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., *et al.* (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**, 1363-1371.
- MacArthur, R., y Wilson, E. (1967). *The theory of island biogeography* (Princeton, NJ, Princeton University Press).
- Magurran, A. E. (1988). *Ecological Diversity and Its Measurement* (Princeton, NJ, Princeton University Press.).
- Maki, H., Masuda, N., Fujiwara, Y., Ike, M., y Fujita, M. (1994). Degradation of alkylphenol ethoxylates by *Pseudomonas* sp. Strain TR01. *Applied & Environmental Microbiology* **60**, 2265-2271.
- Malik, M., Kimchhayarasy, H., y Kakii, K. (2005). Effect of surfactants on stability of *Acinetobacter johnsonii* S35 and *Oligotropha carboxidovorans* S23 coaggregates. *FEMS Microbiology Ecology* **51**, 313-321.
- Maltseva, O., y Oriel, P. (1997). Monitoring of an alkaline 2,4,6-trichlorophenol-degrading enrichment culture by DNA fingerprinting methods and isolation of the responsible organism, haloalkaliphilic *Nocardioides* sp. strain m6. *Applied & Environmental Microbiology* **63**, 4145-4149.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., y Schleifer, K. H. (1996). Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the *phylum* *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment. *Microbiology* **142**, 1097-1106.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., y Schleifer, K. H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* **15**, 593-600.

- Manz, W., Wagner, M., Ammann, R., y Schleifer, K. H. (1994). *In situ* characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Water Research* **28**, 1715-1723.
- Manzano, M. A., Perales, J. A., Sales, D., y Quiroga, J. M. (1999). The effect of temperature on the biodegradation of a nonylphenol polyethoxylate in river water. *Water Research* **33**, 2593-2600.
- Margalef, R. (1983). *Limnología* (Barcelona, Ediciones Omega).
- Massoldeya, A., Weller, R., Rioshernandez, L., Zhou, J. Z., Hickey, R. F., y Tiedje, J. M. (1997). Succession and convergence of biofilm communities in fixed-film reactors treating aromatic hydrocarbons in groundwater. *Applied & Environmental Microbiology* **63**, 270-276.
- McHugh, S., Carton, M., Collins, G., y O'Flaherty, V. (2004). Reactor performance and microbial community dynamics during anaerobic biological treatment of wastewaters at 16-37°C. *FEMS Microbiology Ecology* **48**, 369-378.
- Meier, H., Amann, R., Ludwig, W., y Schleifer, K. H. (1999). Specific oligonucleotide probes for *in situ* detection of a major group of Gram-positive bacteria with low DNA G+C content. *Systematic and Applied Microbiology* **22**, 186-196.
- Meregalli, G., Pluymers, L., y Ollevier, F. (2001). Induction of mouthpart deformities in *Chironomus riparius* larvae exposed to 4-nonylphenol. *Environmental Pollution* **111**, 241-246.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., y Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied & Environmental Microbiology* **59**, 695-700.
- Muyzer, G., Hottentrager, S., Teske, A., y Wawer, C. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. En *Molecular Microbial Ecology Manual*, G. A. Kowalchuk, F. J. de Bruijn, I. M. Head, A. D. L. Akkermans, y J. D. van Elsas, eds. (Dordrecht, Kluwer Academic Publishers), pp. 1-23.
- Mylvaganam, S., y Denis, P. P. (1992). Sequence heterogeneity between the two genes encoding 16S rRNA from the halophilic archaeobacterium *Haloarcula marismortui*. *Genetics* **130**, 399-410.
- Nogales, B., Moore, E. R. B., Llobet-Brossa, E., Rossello-Mora, R., Amann, R., y Timmis, K. N. (2001). Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Applied & Environmental Microbiology* **67**, 1874-1884.

- O'Donnell, A. G., y Gorres, H. E. (1999). 16S rDNA methods in soil microbiology. *Current Opinion in Biotechnology* **10**, 225-229.
- Olsen, G. J., y Woese, C. R. (1993). Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *The FASEB Journal* **7**, 113-123.
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., y Olsen, G. J. (1986). The use of rRNA sequences to characterize natural microbial populations. *Advances in Microbial Ecology* **9**, 1-55.
- Pedersen, S. N., Christiansen, U. L. B., Pedersen, K. L., Korsgaard, B., y Bjerregaard, P. (1999). In vivo estrogenic activity of branched and linear alkylphenols in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *The Science of the Total Environment* **233**, 89-96.
- Pender, S., Toomey, M., Carton, M., Eardly, D., Patching, J. W., Colleran, E., y Orsquo Flaherty, V. (2004). Long-term effects of operating temperature and sulphate addition on the methanogenic community structure of anaerobic hybrid reactors. *Water Research* **38**, 619-630.
- Pernthaler, J., Glockner, F. O., y Amann, R. (1998). Fluorescence *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. En *Methods in Microbiology: Marine Microbiology*, J. Paul, ed. (London, Academic Press), pp. 206-226.
- Philippe, H., y Douady, C. J. (2003). Horizontal gene transfer and phylogenetics. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 498-505.
- Pinyakong, O., Habe, H., Supaka, N., Pinpanichkarn, P., Juntongjin, K., Yoshida, T., Furihata, K., Nojiri, H., Yamane, H., y Omori, T. (2000). Identification of novel metabolites in the degradation of phenanthrene by *Sphingomonas sp.* strain P2. *FEMS Microbiology Letters* **191**, 115-121.
- Puhler, A., Leffers, H., Gropp, F., Palm, P., Klenk, H., Lottspeich, F., Garrett, R. A., y Zillig, W. (1989). Archaeobacterial DNA-dependent RNA polymerases testify to the evolution of the eukaryotic nuclear genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **86**, 4569-4573.
- Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Lanz, C., Schuster, S. C., Treusch, A. H., Eck, J., y Schleper, C. (2003). *Acidobacteria* form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Molecular Microbiology*, 1-13.
- Rainey, F. A., Wardrainey, N., Kroppenstedt, R. M., y Stackebrandt, E. (1996). The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage. Proposal of *Nocardiopsaceae* fam nov. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* **46**, 1088-1092.
- Renner, R. (1997). European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environmental Science & Technology* **31**, 316-320.

- Reysenbach, A. L., Giver, J. L., Wickham, G. S., y Pace, N. R. (1992). Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied & Environmental Microbiology* **58**, 3417-3418.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., y Schleifer, K. H. (1994). *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* **140**, 2849-2858.
- Sabik, H., Gagné, F., Blaise, C., Marcogliese, D. J., y Jeannot, R. (2003). Occurrence of alkylphenol polyethoxylates in the St. Lawrence River and their bioconcentration by mussels (*Elliptio complanata*). *Chemosphere* **51**, 349-356.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., y Ehrlich, H. A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sait, M., Hugenholtz, P., y Janssen, P. H. (2002). Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environmental Microbiology* **4**, 654-666.
- Sandaa, R. A., Torsvik, V., Enger, O., Daae, F. L., Castberg, T., y Hahn, D. (1999). Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiology Ecology* **30**, 237-251.
- Schmidt, T. M., DeLong, E. F., y Pace, N. R. (1991). Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of Bacteriology* **173**, 4371-1378.
- Sigler, W. V., y Zeyer, J. (2002). Bacterial succession in glacial forefield soils characterized by community structure, activity and opportunistic growth dynamics. *Microbial Ecology* **44**, 306-316.
- Sigler, W. V., y Zeyer, J. (2004). Colony-forming analysis of bacterial community succession in deglaciated soils indicates pioneer stress-tolerant opportunists. *Microbial Ecology* **48**, 316-323.
- Simu, K., y Hagstrom, A. (2004). Oligotrophic bacterioplankton with a novel single-cell life strategy. *Applied & Environmental Microbiology* **70**, 2445-2451.
- Siyambalapatiya, N., y Blackall, L. L. (2005). Discrepancies in the widely applied GAM42a fluorescence in situ hybridisation probe for *Gammaproteobacteria*. *FEMS Microbiology Letters* **242**, 367-373.
- Smith, N. R., Yu, Z., y Mohn, W. W. (2003). Stability of the bacterial community in a pulp mill effluent treatment system during normal operation and a system shutdown. *Water Research* **37**, 4873-4884.

- Stackebrandt, E., y Goebel, B. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* **44**, 846-849.
- Stahl, D. A., Lane, D. J., Olsen, G. J., y Pace, N. R. (1984). Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science* **224**, 409-411.
- Stahl, D. A., Lane, D. J., Olsen, G. J., y Pace, N. R. (1985). Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Applied & Environmental Microbiology* **49**, 1379-1384.
- Staples, C., Mihaich, E., Carbone, J., Woodburn, K., y Klecka, G. (2004). A weight of evidence analysis of the chronic ecotoxicity of nonylphenol ethoxylates, nonylphenol ether carboxylates, and nonylphenol. *Human & Ecological Risk Assessment* **10**, 999-1017.
- Suzuki, M. T., y Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied & Environmental Microbiology* **62**, 625-630.
- Takeuchi, M., Kawai, F., Shimada, Y., y Yokota, A. (1993). Taxonomic study of polyethylene glycol-utilizing bacteria: emended description of the genus *Sphingomonas* *Sphingomonas macrogoltabidus* sp. nov., *Sphingomonas sanguis* sp. nov. and *Sphingomonas terrae* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **16**, 228-238.
- Tanaka, J. N., y Grizzle, J. M. (2002). Effects of nonylphenol on the gonadal differentiation of the hermaphroditic fish, *Rivulus marmoratus*. *Aquatic Toxicology* **57**, 117-125.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., y Higgins, D. G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**, 4876-4882.
- Tilman, D., y Pacala, S. (1993). *Species Diversity in Ecological Communities* (Chicago, Illinois, University of Chicago Press).
- Torsvik, V., Goksoy, J., y Daae, F. L. (1990). High diversity of DNA of soil bacteria. *Applied & Environmental Microbiology* **56**, 782-787.
- Van den Belt, K., Verheyen, R., y Witters, H. (2003). Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **56**, 271-281.
- van Verseveld, H. K., y Roling, W. F. M. (2004). Cluster analysis and statistical comparison of molecular community profile data. En *Molecular Microbial Ecology Manual*, G. A. Kowalchuk, F. J. de Bruijn, I. M. Head, A. D. L. Akkermans, y J. D. van Elsas, eds. (Dordrecht, Kluwer Academic Publishers), pp. 1373-1396.

- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., Devos, P., Kersters, K., y Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* **60**, 407 ff.
- Vandeppeer, Y., Chapelle, S., y Dewachter, R. (1996). A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Research* **24**, 3381-3391.
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D. Y., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., *et al.* (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**, 66-74.
- von Canstein, H., Li, Y., Leonhauser, J., Haase, E., Felske, A., Deckwer, W., y Wagner-Dobler, I. (2002). Spatially oscillating activity and microbial succession of mercury reducing biofilms in a technical scale bioremediation system. *Applied & Environmental Microbiology* **68**, 1938-1946.
- von Wintzingerode, F., Gobel, U. B., y Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples - Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **21**, 213-229.
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., y Schleifer, K. (1993). Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied & Environmental Microbiology* **59**, 1520-1525.
- Wagner, M., Loy, A., y al, e. (2002). Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**, 665-680.
- Wagner-Dobler, I., Bennasar, A., Vancanneyt, M., Strompi, C., Brummer, I., Eichner, C., Grammel, I., y Moore, E. R. B. (1998). Microcosm enrichment of biphenyl-degrading microbial communities from soils and sediments. *Applied & Environmental Microbiology* **64**, 3014-3022.
- Wang, Y., Zwang, Z. S., y Ramanan, N. (1997). The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes. *Journal of Bacteriology* **179**, 3270-3276.
- Watts, J. E. M., Wu, Q. Z., Schreier, S. B., May, H. D., y Sowers, K. R. (2001). Comparative analysis of polychlorinated biphenyl-dechlorinating communities in enrichment cultures using three different molecular screening techniques. *Environmental Microbiology* **3**, 710-719.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Murry, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., y Trupper, H. G. (1987). Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* **37**, 463-464.

- Wheeler Alm, E., Oerther, D. B., Larsen, N., Stahl, D. A., y Raskin, L. (1996). The oligonucleotide probe database. *Applied & Environmental Microbiology* **62**, 3557-3559.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S., Sumpter, J., y Parker, M. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* **135**, 175-182.
- Wilén, B. M., Nielsen, J. L., Keiding, k., y Nielsen, P. H. (2000). Influence of microbial activity on the stability of activated sludge flocs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **18**, 145–156.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* **51**, 221-271.
- Woese, C. R., Kandler, O., y Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **87**, 4576-4579.
- Wolin, M. J. (1979). The rumen fermentation: a model for microbial interaction in anaerobic ecosystems. *Advances in Microbial Ecology* **3**, 49-77.
- Yeates, C., Saunders, A. M., Crocetti, G. R., y Blackall, L. L. (2003). Limitations of the widely used GAM42a and BET42a probes targeting bacteria in the *Gammaproteobacteria* radiation. *Microbiology* **149**, 1239-1247.
- Ying, G. G., Williams, B., y Kookana, R. (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - A review. *Environment International* **28**, 215-226.
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis* (London, Prentice Hall International).
- Zumstein, E. R., Moletta R., y Godon, J. J. (2000). Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* **2**, 69-78.