

Tesis Doctoral

# Estructura y dinámica de comunidades bacterianas en sistemas de barros activados que degradan fenol

Basile, Laura Ana

2009

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Basile, Laura Ana. (2009). Estructura y dinámica de comunidades bacterianas en sistemas de barros activados que degradan fenol. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Basile, Laura Ana. "Estructura y dinámica de comunidades bacterianas en sistemas de barros activados que degradan fenol". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

## **ESTRUCTURA Y DINAMICA DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN SISTEMAS DE BARROS ACTIVADOS QUE DEGRADAN FENOL**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el  
área CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Laura Ana Basile

Director de tesis: Dr. Leonardo Erijman

Consejero de estudios: Dr. Jorge Prometeo Muschietti

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular  
(INGEBI-CONICET)

Buenos Aires, 2009

## **Estructura y dinámica de comunidades bacterianas en sistemas de barros activados que degradan fenol**

### **RESUMEN**

La forma en la que las comunidades responden a las alteraciones suelen manifestarse a través de cambios en la composición o en la abundancia relativa de las especies. Frecuentemente estos cambios pueden ser atribuidos a caracteres funcionales o adaptativos. La búsqueda de modelos que expliquen los patrones de composición de especies y la coexistencia de especies similares dentro de comunidades ecológicas, pueden aportar datos sobre los mecanismos subyacentes que regulan la biodiversidad y su relación con el funcionamiento del ecosistema. En este trabajo se estudió la dinámica de las comunidades bacterianas, a nivel taxonómico y funcional, y el funcionamiento de sistemas de barros activados especializados en la degradación de fenol. Se evaluó en primer lugar la dinámica de las comunidades bacterianas en función del tiempo de aclimatación al fenol, operando bioreactores a escala de laboratorio bajo condiciones constantes a lo largo de 9 meses. En una segunda etapa se analizó el modo en que las comunidades bacterianas respondían a un aumento escalonado en la concentración de fenol. El funcionamiento de los reactores se analizó por mediciones de biomasa, niveles de turbidez y de fenol en el sobrenadante y velocidades de degradación de fenol. La estructura de la comunidad bacteriana se estudió por medio de geles de gradiente desnaturalizantes (DGGEs) del dominio variable V3 del ADN ribosomal 16S. La estructura a nivel funcional se determinó mediante la cuantificación por ensayos de PCR en tiempo real de las distintas variantes del gen de la subunidad mayor de la enzima fenol hidroxilasa multicomponente (LmPH), que cataliza la oxidación de fenol a catecol, paso limitante de la vía de degradación de fenol. Finalmente, buscando relacionar los patrones de abundancia de los grupos LmPH con sus propiedades cinéticas, se estudiaron representantes de los grupos LmPH obtenidos mediante técnicas de cultivo y aislamiento. Los resultados demuestran que la actividad de degradación de fenol en el sistema es debida a la acción combinada de un número de organismos funcionalmente redundantes. La comparación de los patrones de abundancia de las poblaciones que degradan fenol sugiere un grado de determinismo considerable, donde la abundancia relativa de cada especie parece determinada por la concentración de fenol en el alimento. Las características cinéticas de representantes de siete de los ocho genotipos LmPH, obtenidos utilizando un amplio rango de condiciones de cultivo, exhibieron un intervalo

relativamente acotado de variabilidad fisiológica, indicando que la capacidad de una bacteria particular de volverse un miembro predominante de la comunidad bajo condiciones ambientales cambiantes no puede ser inferida únicamente de las propiedades de degradación de fenol.

**Palabras clave:** fenol, fenol hidroxilasa, barros activados, DGGE, PCR cuantitativa, ecología microbiana.

## **Structure and dynamics of bacterial communities in phenol-degrading activated sludge**

### **ABSTRACT**

Communities' responses to disturbance are commonly manifested as changes in species composition or relative species abundances. These changes are often attributed to functional or adaptive traits. The understanding of the patterns of species abundance, and the coexistence of similar species within ecological communities can provide important insights into the underlying mechanisms that regulate biodiversity and its relationship with ecosystem function. In this work we studied bacterial communities dynamics, using both taxonomic and functional approaches, and its relationship with the activity of phenol degrading activated sludge systems. Firstly, we evaluated bacterial communities dynamics as a function of phenol acclimation time, over 9 months of reactor operation under constant conditions. In a second stage, we analyzed the responses of bacterial communities to a step-increase in phenol concentration. Reactors performance was analyzed by biomass concentration, turbidity and phenol concentration in supernatants, and degradation rates. The structure of bacterial communities was studied using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of the variable domain V3 of PCR-amplified 16S ribosomal DNA. Functional structure was determined by real time quantitative PCR on different gene variants of the major subunit of the multicomponent phenol hydroxylase enzyme (LmPH), which catalyzes the oxidation of phenol to catechol, the rate limiting step in phenol biodegradation pathway. Finally, looking for a relationship between LmPH abundance patterns and kinetic properties, we studied representatives of LmPH groups, which were obtained through cultivation and isolation techniques. We concluded that phenol degradation activity in our systems depend on the combined action of a number of functional redundant organisms. Comparison of the abundance patterns of phenol degrading populations suggests a considerable degree of determinism, where the relative abundance of each species seems to be determined by the concentration of phenol in the feed. The kinetics characteristics of representatives of seven from eight LmPH groups, obtained using a wide range of culture conditions, exhibited a rather narrow range of physiological variability, suggesting that the ability of a particular bacteria to become a predominant member of the community under changing ambiental conditions cannot be inferred exclusively from the phenol-degrading properties.

**Keywords:** phenol, phenol hydroxylase, activated sludge, DGGE, quantitative PCR, microbial ecology

Los resultados presentados en esta tesis forman parte de los siguientes trabajos:

- Quantitative assessment of phenol hydroxylase diversity in bioreactors using a functional gene analysis. Basile, L.A., Erijman, L. *Appl Microbiol Biotechnol* (2008) 78:863 – 872.
- Shifts in the abundance distribution of phenol-hydroxylase genotypes in bioreactors exposed to step increases in phenol loading. Basile, L.A., Erijman, L. Enviado a *FEMS Microbiology Ecology*.

## **Agradecimientos**

A Leo por la ayuda constante, por guiarme durante todos estos años e intentar siempre enseñarme algo nuevo, por su interés y preocupación por mi trabajo, por la paciencia, y también por la variedad de anécdotas, charlas y terapias de estos años.

A mis compañeros de grupo: a Eva por todos sus consejos, los químicos y de los otros, por preguntarme siempre y buscar respuestas, por (y a pesar de) su sinceridad, por estar dispuesta a darme una mano todas las veces que la necesité. A Leandro por sus muchísimas ayudas de todos los días, por perdonarme mis constantes invasiones a su mesada, y por la lectura y sugerencias finales de la tesis. A Joaquín por su interés en mi trabajo. Y a los compañeros de los primeros años: a Raúl por haberme ayudado a organizarme con los reactores, a Mariana por mostrarme como manejarme en el laboratorio, a Nadia por tantas charlas, por su buen humor, y porque era mi aliada con la elección de la radio.

Al grupo de Jorge por todos estos años compartidos: a Diego porque desde que llegué fue siempre un gran compañero, y por los chistes, cantos y confidencias; a Jorge por sus consejos, su preocupación diaria por solucionar los problemas, y por aparecerse con el saquito de té en el momento justo; a Tamara por muchos momentos compartidos, porque aún con nuestros desacuerdos cotidianos siempre pude contar con ella; a María Laura por ofrecerme siempre la computadora; a Gabi por alentarme con la escritura, por su buena onda y por compartir los últimos pasos del trabajo; a Agustina por las ayudas de estadística; a Romina por seguirme los ensayos cada vez que me tenía que ir corriendo, por los mates de la tarde y las charlas de este último tiempo; a Mariana.

A Mirtha Flawiá y Hector Torres, por permitirme realizar el trabajo en el INGEBI. A la Tere por su interés. A Irma, Gladis, Mari, Francisco y Rubén por facilitarnos la tarea de todos los días. Al CONICET por financiar el trabajo.

A Meli, Vicky, Ale, Xime (y a Ibi y Loana) por estar siempre, por la alegría palabras viajes por compartir tanto. A Luli y a Pablo por ayudarme a desconectarme. A Paula, Agus, Marina, Ezequiel y Eli por acompañarme, escucharme y entenderme.

A Mara por tratar de orientarme, a Mariana por escucharme, a la tía Ani por los consejos, a la baba por sus historias, a mamá y a papá por todo el apoyo.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
 <b>INTRODUCCIÓN</b>	
Diversidad microbiana.....	11
Modelos determinísticos y neutrales en el estudio de la diversidad.....	11
Preguntas fundamentales en ecología microbiana.....	13
Relación diversidad-funcionamiento.....	13
Sistemas de barros activados.....	16
Usos, toxicidad y eliminación de los compuestos fenólicos.....	17
Degradación de compuestos aromáticos.....	18
Degradación de fenol.....	20
Métodos directos y métodos dependientes de cultivo en ecología microbiana.....	25
Hipótesis y objetivos.....	27
 <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1. Preparación de los reactores de barros activados a escala de laboratorio.....	28
2. Diseño experimental.....	29
3. Determinación de Sólidos Suspendidos Totales (SST).....	31
4. Determinación de fenol.....	31
5. Determinación de la velocidad de degradación de fenol de los barros activados por ensayos en batch.....	31
6. Extracción de ácidos nucleicos.....	32
6.1 Extracción de ADN genómico.....	32
6.2 Extracción de ARN total.....	32
7. Retrotranscripción del ARN.....	33
8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	34
8.1 Amplificación de genes ribosomales.....	34
8.2 Amplificación del gen LmPH.....	34
9. Electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) del dominio V3 del ADN/ARNr 16S.....	35
9.1 Preparación del gel y condiciones de electroforesis.....	36

9.2 Análisis de datos.....	36
9.3 Identificación de las bandas de interés.....	37
10. Construcción de bibliotecas del gen LmPH.....	38
10.1 Preparación de células electrocompetentes.....	38
10.2 Clonado del gen de la subunidad mayor de la fenol hidroxilasa multicomponente.....	38
10.2.1 Amplificación, purificación y cuantificación de los genes LmPH.....	38
10.2.2 Reacción de ligada en el vector de clonado.....	39
10.2.3 Transformación de células <i>Escherichia coli</i> DH10 $\beta$ electrocompetentes.....	39
10.2.4 <i>Screening</i> de las colonias transformadas por <i>colony</i> -PCR.....	39
10.3 Preparación de ADN plasmídico.....	40
10.4 Secuenciación.....	40
10.5 Construcción de árboles filogenéticos .....	40
10.6 Clasificación de las secuencias en unidades taxonómicas operativas.....	41
10.7 Cálculo de la cobertura de la biblioteca y curva de rarefacción.....	41
11. PCR en tiempo real.....	42
11.1 Diseño de <i>primers</i> y control de especificidad.....	42
11.2 Preparación de estándares de concentración.....	43
11.3 Curvas de estándares y cálculo de eficiencia.....	43
11.4 Condiciones de amplificación.....	44
11.5 Cuantificación de los subgrupos LmPH en muestras de barros activados	44
11.6 PCR en tiempo real de los genes ribosomales 16s.....	45
11.7 Análisis de datos.....	46
12. Aislamiento de bacterias que degradan fenol de barros activados.....	48
12.1 Condiciones de cultivo.....	48
12.2 <i>Screening</i> de los microorganismos aislados por análisis de restricción....	49
13. Caracterización de las bacterias aisladas.....	50
13.1 Caracterización genotípica.....	50
13.2 Caracterización fenotípica.....	50
13.3 Caracterización funcional: cinética de degradación y de crecimiento e inhibición por fenol.....	50
14. Experimentos de coexistencia.....	52
14.1 Diseño experimental.....	52
14.2 Hibridación in situ fluorescente (FISH).....	53

14.2.1 Preparación de las muestras.....	54
14.2.2 Hibridación con sondas marcadas.....	54
14.2.3 Lavados.....	54
14.2.4 Tinción con DAPI.....	54
14.2.5 Montaje y visualización.....	54
ANEXO I: Soluciones utilizadas.....	55
ANEXO II: Medios de cultivo utilizados.....	57

## RESULTADOS

### **PARTE 1. Análisis de la diversidad de un gen funcional y su relación con la actividad de degradación**

1.1 Funcionamiento de los reactores.....	59
1.2 Degradación de fenol por los barros activados.....	60
1.3 Estructura de las comunidades bacterianas de los barros activados.....	61
1.4 Detección de genes LmPH en las comunidades de los barros activados...	62
1.5 Construcción de bibliotecas del gen LmPH y análisis filogenético.....	63
1.6 Cuantificación de las variantes genéticas LmPH por ensayos de PCR en tiempo real.....	70

### **PARTE 2. Análisis del efecto sobre la capacidad funcional y la dinámica de las principales poblaciones que degradan fenol en respuesta a un aumento en la concentración de fenol**

2.1 Funcionamiento de los reactores.....	73
2.2 Degradación de fenol por los barros activados.....	75
2.3 Estructura de las comunidades bacterianas de los barros activados.....	76
2.4 Construcción de bibliotecas del gen LmPH y análisis filogenético.....	79
2.5 Cuantificación de las variantes genéticas LmPH por ensayos de PCR en tiempo real.....	82
2.6 Detección de mensajeros LmPH en los barros activados.....	86
2.7 Comunidades del floc y del sobrenadante.....	87
2.8 Recuperación de la función de degradación de los barros activados.....	91

<b>PARTE 3. Aislamiento de microorganismos conteniendo distintas variantes genéticas LmPH. Caracterización genotípica, fenotípica y funcional</b>	
3.1 Aislamiento.....	93
3.2 Caracterización genotípica.....	93
3.3 Caracterización fenotípica.....	95
3.4 Caracterización funcional.....	96
3.4.1 Cálculo de las constantes cinéticas de la degradación de fenol por respirometría.....	96
3.4.2 Cálculo de constantes cinéticas del crecimiento e inhibición por fenol.....	98
3.5 Ensamblado de poblaciones con redundancia funcional.....	100
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>104</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>116</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>117</b>

## INTRODUCCIÓN

### **Diversidad microbiana**

Los microorganismos, particularmente las bacterias, han desarrollado estrategias que les permiten obtener energía de prácticamente cualquier compuesto bajo condiciones óxicas o anóxicas (Diaz, 2004). Tienen un rol crucial en el mantenimiento de la biosfera y en los ciclos biogeoquímicos, catalizando reacciones únicas e indispensables. La abundancia de microorganismos, junto con su capacidad de transferencia horizontal de genes y sus altas tasas de crecimiento, les permiten evolucionar rápidamente y adaptarse a condiciones ambientales cambiantes, incluso a ambientes extremos donde el resto de los organismos no pueden desarrollarse. La enorme diversidad genética de los microorganismos refleja su gran versatilidad metabólica (de Lorenzo, 2001; Lovley, 2003).

La biodiversidad es un fenómeno ecológico fundamental, porque representa el resultado de una compleja red de interacciones ecológicas, evolutivas, biogeográficas y de procesos físicos (Huston, 1997). Uno de los principales objetivos de la ecología microbiana es entender cómo se genera y se mantiene la biodiversidad. Una amplia variedad de modelos, desarrollados originalmente en base a estudios macroecológicos, han sido utilizados para abordar el tema de la diversidad microbiana, buscando esclarecer por qué tantas especies pueden coexistir en ambientes donde aparentemente hay muy pocos nichos disponibles.

### **Modelos determinísticos y neutrales en el estudio de la diversidad**

La búsqueda de modelos que expliquen los patrones de composición de especies y la coexistencia de especies similares dentro de comunidades ecológicas, puede aportar datos sobre los mecanismos subyacentes que regulan la biodiversidad, siendo centrales para el desarrollo de teorías ecológicas (van der Gast et al., 2008). Dos tipos de modelos teóricos han sido desarrollados a partir de estudios macroecológicos con el fin de estudiar y predecir la distribución y la abundancia de las especies en el espacio y en el tiempo: los modelos determinísticos de diferenciación de nicho y los modelos neutrales.

Tradicionalmente se acepta que la coexistencia de especies puede ser explicada, al menos en parte, por diferencias en el modo en que las especies interactúan con diversas características de su ambiente. La diferenciación de nicho puede involucrar un gran número de factores, incluyendo disponibilidad de recursos, competencia, mutualismos, requerimientos de hábitats, tolerancia al ambiente, cambios temporales y espaciales, regulación de las propias densidades poblacionales. La coexistencia requiere entonces que las especies difieran en caracteres ecológicamente relevantes que causen respuestas diferenciales a las heterogeneidades ambientales (Chesson, 2000). En este mismo contexto, la hipótesis del disturbio intermedio (Connell, 1978) sugiere que la exclusión competitiva en las comunidades estaría balanceada por disturbios de moderada frecuencia e intensidad, que favorecerían el mantenimiento de una elevada diversidad mediante la generación de nichos disponibles. Los modelos determinísticos basados en los conceptos de competencia y diferenciación de nicho son la base de la gran mayoría de las teorías de coexistencia y han sido utilizados para explicar la distribución y abundancia de un amplio rango de taxa en ambientes terrestres y acuáticos (Silvertown, 2004). Estos modelos suponen que la coexistencia es posible porque las especies difieren en sus nichos, ya sea en el uso de los recursos, en su habilidad para colonizar sitios disponibles luego de un disturbio, o en su respuesta a fluctuaciones temporales en el ambiente. En teoría, las especies limitarían sus propias densidades poblacionales más que las de las otras especies, promoviendo la coexistencia (Chesson, 2000).

El segundo tipo de modelos supone especies ecológicamente equivalentes y una dinámica gobernada por procesos estocásticos de extinción, inmigración y especiación. De este modo los modelos neutrales (Bell, 2000; Hubbell, 2001) proponen que las similitudes entre las especies, y no las diferencias, explicarían la alta diversidad observada en muchas comunidades naturales, asumiendo que todas las especies serían idénticas en cuanto a su *fitness* y a sus efectos sobre las otras especies. Aun cuando estos supuestos parecen no reflejar adecuadamente las condiciones reales, los modelos neutrales han mostrado que pueden reproducir exitosamente la distribución de abundancia de especies observada para comunidades de macroorganismos (Hubbell, 2001), sugiriendo que el azar desarrollaría también un papel clave en la estructuración de estas comunidades. Estos modelos han sido adaptados para su aplicación en

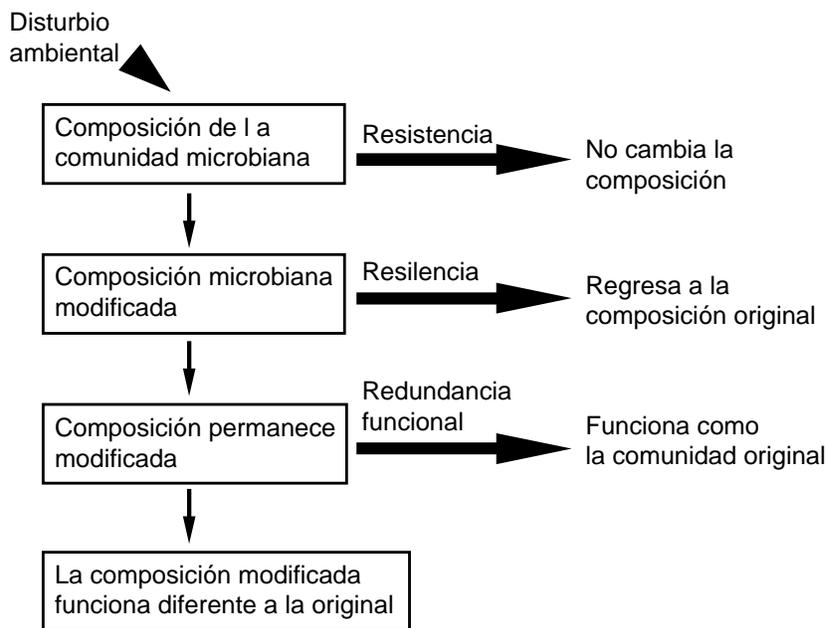
comunidades microbianas (Sloan et al., 2006; Woodcock et al., 2007). Estudios desarrollados sobre comunidades bacterianas sugieren que en determinadas situaciones los procesos estocásticos pueden explicar el ensamblado de las comunidades (Baptista et al., 2008; van der Gast et al., 2008).

### **Preguntas fundamentales en ecología microbiana**

La ecología microbiana estudia principalmente cuatro aspectos fundamentales: i) el modo en que las comunidades se estructuran, en cuanto a la diversidad de las especies que la componen, ii) el potencial fenotípico de las especies que componen la comunidad, iii) la función que la comunidad desarrolla en el ambiente, y iv) las interrelaciones entre las especies y de las especies con su ambiente. Estos aspectos se ven influenciados por las características altamente dinámicas de las comunidades, especialmente bajo condiciones ambientales cambiantes. La integración de teorías y conceptos sobre diversidad y dinámica de las comunidades con la función del ecosistema es uno de los temas de mayor relevancia en ecología microbiana.

### **Relación diversidad – funcionamiento**

Las respuestas de las comunidades a las condiciones ambientales cambiantes suelen manifestarse como cambios en la composición o en la abundancia relativa de las especies. Estos cambios son frecuentemente atribuidos a caracteres funcionales o adaptativos de las especies, que les permiten una mayor tolerancia a la fluctuación ambiental (Lavorel and Garnier, 2002; Eviner and Chapin III, 2003). El modo en que un ecosistema responde a un disturbio ambiental puede ser medido en base al efecto inmediato del disturbio, o resistencia, o a la recuperación de la función en el tiempo, o resiliencia. La resistencia se define como una medida de la capacidad de un sistema de mantenerse en su estado original al enfrentar un disturbio, la resiliencia es una medida de la velocidad a la cual el sistema retorna a su estado original (figura 1).



**Figura 1.** Esquema de cómo las comunidades microbianas pueden responder frente a un cambio ambiental. Modificado de (Allison and Martiny, 2008).

Se cree que existe un rol potencial de la biodiversidad en estabilizar la función del ecosistema luego de una perturbación, en el sentido de que si algunas especies son afectadas por la perturbación, una alta diversidad sería capaz de proveer un reservorio de especies alternativas de modo que se sigan desarrollando las funciones ecológicas clave. Sin embargo, no se ha probado experimentalmente que la relación entre la diversidad y la estabilidad de todos los ecosistemas se manifieste en la misma forma: si bien se han encontrado varios ejemplos de una correlación positiva entre la diversidad y la estabilidad (Loreau et al., 2001; Lynch, 2002; Aoki, 2003; Griffiths et al., 2004), también se ha postulado que ecosistemas conteniendo un mayor número de especies podrían ser menos estables (May, 1988; Ulanowicz, 2003). La observación de que una mayor diversidad no necesariamente aumenta la estabilidad funcional indica que esta relación no puede ser abordada únicamente por estudios sobre la diversidad taxonómica, sino que estaría más directamente relacionada con la diversidad funcional.

Se acepta en general que la estabilidad está relacionada con la redundancia funcional, es decir, con la presencia de un número de especies diferentes que tienen la capacidad

de llevar a cabo funciones similares. De este modo al perderse una especie funcionalmente importante, otra especie menos sensible al disturbio ambiental seguirá desarrollando la misma función, ocupando el nicho disponible y otorgando al sistema resistencia o resiliencia frente a la variabilidad ambiental. Por ejemplo, se ha observado que una especie dentro de un grupo de *Pseudomonas* aumentó su abundancia en respuesta a una reducción o pérdida de otra especie del mismo grupo bajo condiciones ambientales cambiantes, indicando que especies que son funcionalmente redundantes para un proceso en un momento determinado pueden dejar de serlo luego de un disturbio ambiental (Ellis et al., 1999). La presencia de una mayor variabilidad fenotípica dentro de grupos funcionales implica una mayor probabilidad de que ocurran estos crecimientos compensatorios, pudiendo llevar a una mayor estabilidad del ecosistema (Naeem and Li, 1997; Norberg et al., 2001).

Con algunas excepciones, por ejemplo los estudios sobre las bacterias oxidantes de amonio (genes de la amonio monooxigenasa) (Mosier and Francis, 2008; Sahan and Muyzer, 2008; Chen et al., 2009) y sobre las bacterias que degradan hidrocarburos policíclicos aromáticos (genes que codifican para dioxigenasas) (Ni Chadhain et al., 2006; Zhou et al., 2006; Kumar and Khanna, 2009), la mayoría de los análisis sobre diversidad microbiana han sido realizados en base a la diversidad taxonómica, en el marco de los genes que codifican para la subunidad menor de los ribosomas microbianos (ARNr 16S). La información obtenida de las secuencias del ARNr 16S permiten el estudio de las relaciones filogenéticas entre los microorganismos, sin embargo éstas generalmente no permiten obtener conclusiones sobre las similitudes fisiológicas entre las especies o la diversidad funcional de las comunidades. El modo en que un organismo interactúa con su ambiente se encuentra frecuentemente determinado por sus genes funcionales y las enzimas que éstos codifican, más que por el ARNr 16S. Si la diversidad de los genes funcionales refleja el potencial real para llevar a cabo una función ecológica, entonces esta diversidad tendría implicancias sobre el funcionamiento y la estabilidad del ecosistema (Ward, 2002).

Este trabajo aborda la dinámica de las comunidades bacterianas en términos de la diversidad de un gen funcional, además de la diversidad taxonómica, y su relación con el funcionamiento del ecosistema. Esta dinámica es estudiada en función de cambios

ambientales controlados, en un modelo de estudio que consiste en la degradación de fenol en sistemas de barros activados.

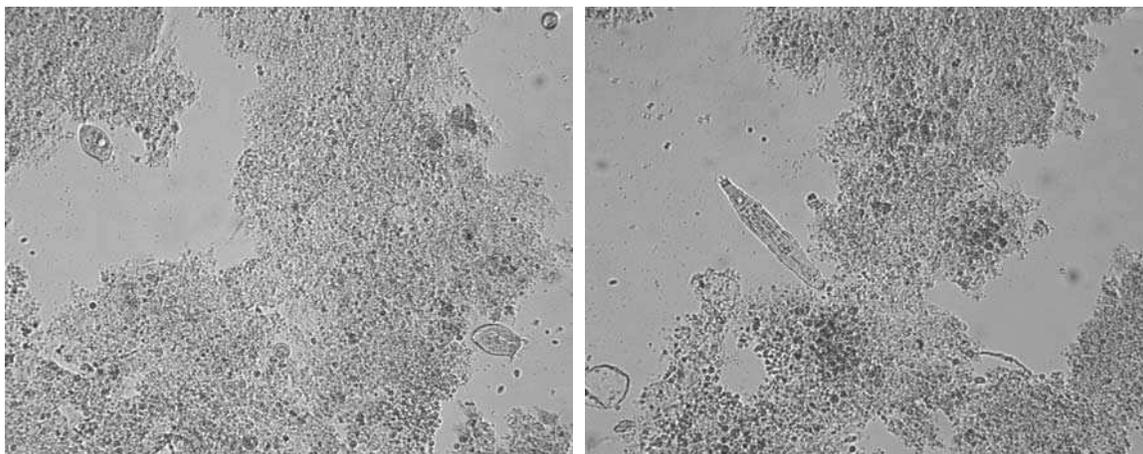
### **Sistemas de barros activados**

El tratamiento de los efluentes provenientes de los procesos domésticos e industriales es esencial para evitar el deterioro del ambiente. Las plantas de tratamiento basadas en los sistemas de barros activados representan uno de los procesos biotecnológicos más ampliamente utilizados.

En los sistemas de barros activados se utiliza la actividad de los microorganismos para la remoción de contaminantes y del carbono orgánico y otros nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, lo cual es esencial para evitar la eutrofización y el deterioro de las aguas en que el efluente es descargado (Seviour et al., 2003).

Los barros activados están conformados por comunidades microbianas complejas, donde las bacterias, que representan aproximadamente el 95% de la biomasa activa, son las principales responsables de la degradación. Suelen encontrarse también protozoos, rotíferos y nematodos, conformando una red trófica en la cual los nematodos se alimentan de protozoos y rotíferos, estos últimos, de protozoos, y todos de las bacterias en suspensión. La materia orgánica es oxidada y transformada en biomasa microbiana y CO<sub>2</sub>, incluso en condiciones de fluctuaciones en los niveles de carga, aunque en general no ocurre una mineralización completa (Kapley and Purohit, 2009).

El éxito del tratamiento no depende de microorganismos agregados externamente al proceso, sino que la composición de la biomasa activa es el resultado natural de complejos mecanismos de selección. Las bacterias presentes en los barros activados tienen la capacidad de formar agregados o flocs (figura 2). De este modo sedimentan al interrumpir la agitación, por lo cual pueden ser retenidas y separadas del sobrenadante tratado. Los flocs se forman por la secreción por parte de las bacterias de sustancias exopoliméricas (EPS) cargadas negativamente, tales como polisacáridos, lípidos, proteínas o ácidos nucleicos, que rodean a las bacterias y se mantienen unidas entre sí por cationes divalentes presentes en la solución (Novak et al., 2007). La capacidad de sedimentación de los barros activados es crucial para una buena separación del efluente tratado.



**Figura 2.** Microfotografías de los barros activados, tomadas con luz visible bajo un aumento 20X.

Los sistemas de barros activados son ampliamente utilizados como modelos de estudio de procesos ecológicos, ya que representan ecosistemas complejos y diversos pero físicamente acotados, donde las condiciones ambientales son más homogéneas en comparación con muchos de los ecosistemas naturales (Daims et al., 2006). Por otro lado, los microorganismos residentes tienen tiempos de regeneración relativamente cortos, lo cual facilita hacer estudios ecológicos abarcativos (Graham and Smith, 2004). Además, en el caso de utilizarse reactores a escala de laboratorio, permiten la manipulación y un diseño experimental en el cual la mayoría de las condiciones pueden ser controladas. De este modo constituyen sistemas apropiados donde desarrollar y poner a prueba conceptos fundamentales de la ecología microbiana.

### **Usos, toxicidad y eliminación de los compuestos fenólicos**

El fenol es ampliamente utilizado en varios procesos industriales, siendo uno de los contaminantes ambientales más comunes. Se origina principalmente en las refinerías de petróleo, plantas de coque, petroquímicas, y en la manufactura de resinas, plásticos, tinturas, herbicidas, productos farmacéuticos, etc.

Si bien no es considerado carcinógeno, el fenol es un compuesto venenoso que causa quemaduras en los tejidos, afectando al hígado y los riñones. Resulta tóxico por ingestión, contacto o inhalación aún a bajas concentraciones. En los ecosistemas acuáticos, el fenol produce efectos tóxicos sobre los peces a concentraciones relativamente bajas, de entre 5 y 25 mg/l (Kibret et al., 2000).

En los efluentes industriales el fenol se encuentra a concentraciones entre 10 y 1000 mg/l (Veeresh et al., 2005), que deben ser reducidas antes de la descarga en cursos de agua hasta niveles que no excedan los 0,5 mg/l (por ejemplo Resolución 336/03, OPDS, Prov. Buenos Aires). Existen distintos métodos para la eliminación del fenol de los residuos industriales, siendo el tratamiento biológico universalmente preferido frente a los métodos químicos o físicos, dado su bajo costo y su posibilidad de mineralización completa. Los compuestos fenólicos han sido desde hace varios años eficientemente tratados utilizando procesos de barros activados, dado que sólo por encima de los 1000 mg/l ejercen un fuerte efecto inhibitorio sobre los microorganismos (Amor et al., 2005). Sin embargo, los sistemas biológicos utilizados para el tratamiento de efluentes que contienen fenoles se encuentran comúnmente expuestos a sobrecargas tóxicas, lo cual afecta tanto la composición como la función de las comunidades microbianas. Un problema habitual en el tratamiento de compuestos fenólicos es que el exceso o shock en la carga puede resultar tóxico o inhibitorio aún para las comunidades aclimatadas, produciendo eventualmente una salida de régimen del proceso de barros activados (Watanabe et al., 1999).

La toxicidad de los compuestos aromáticos es frecuentemente atribuida a una disrupción de la estructura de la membrana por interacciones hidrofóbicas de compuestos lipofílicos con la bicapa lipídica, afectando la estructura e integridad de la membrana así como la función de las proteínas de membrana (Sikkema et al., 1994, 1995).

### **Degradación de compuestos aromáticos**

El anillo de benceno es una de las unidades de estructura química más ampliamente distribuida en la naturaleza, siendo muchos de los compuestos aromáticos importantes contaminantes ambientales. Mediante diferentes vías catabólicas, los microorganismos pueden utilizar una gran variedad de compuestos aromáticos como única fuente de carbono y energía (Diaz, 2004).

La biodegradación de compuestos aromáticos estructuralmente diversos comienza a través de las llamadas vías periféricas, dando lugar a un limitado número de intermediarios que serán utilizados en el metabolismo central de la célula. En la degradación aeróbica, la mayoría de las vías involucran reacciones de oxigenación que son llevadas a cabo por monooxigenasas y dioxigenasas. De este modo se generan

compuestos aromáticos dihidroxilados tales como catecol, hidroquinona, hidroxiquinol, etc. Estos compuestos son sustratos de enzimas que utilizan oxígeno molecular para abrir el anillo de benceno. En la vía orto, la ruptura se produce entre los dos grupos hidroxilos y es catalizada por intradiol dioxigenasas; en la vía meta, catalizada por extradiol dioxigenasas, la ruptura se produce próxima a uno de los grupos hidroxilos. A continuación, las llamadas vías centrales involucran una serie de reacciones que llevan a la formación de intermediarios del ciclo de Krebs.

Las monooxigenasas son enzimas claves en las vías periféricas de degradación, catalizando la hidroxilación de compuestos aromáticos con un grupo hidroxilo en el anillo (fenol, cresoles, ácido para y meta hidroxibenzoico, ácido salicílico, etc), dando lugar a derivados dihidroxilados. Pertenecen a la familia de monooxigenasas solubles con dos átomos de hierro en su centro catalítico. Se han encontrado monooxigenasas uni y multicomponentes.

Todas las monooxigenasas bacterianas multicomponentes (BMMs) conocidas son transcritas a partir de un único operón que codifica para 4 a 6 polipéptidos. Constituyen una familia de enzimas que puede ser dividida en 6 grupos distintivos, cada uno con una composición de subunidades y una especificidad de sustrato características (Notomista et al., 2003). Entre estas enzimas se encuentran la metano, fenol, tolueno, benceno y alcano monooxigenasas multicomponentes. Análisis de secuencias presentes en las bases de datos indicaron que la mayoría de las cepas bacterianas poseen sólo una BMM, sin embargo se han detectado algunos casos de bacterias conteniendo más de una monooxigenasa en su genoma (Notomista et al., 2003). Se encontró además que la localización genómica era cromosómica para la mayoría de las BMMs (Notomista et al., 2003) y plasmídica para al menos dos BMMs: un plásmido circular para una fenol hidroxilasa (PH) de *Pseudomonas* sp CF600 (Bartilson et al., 1990) y un plásmido lineal para una epoxidasa de *Nocardia corallina* (Saeki et al., 1999).

Las BMMs presentan en general una amplia especificidad de sustrato: tanto la PH de *Pseudomonas* sp CF600 como la tolueno monooxigenasa de *Burkholderia cepacia* G4 catalizan la oxidación de fenol y de ciertos fenoles metil-sustituídos. Las PH tienen la capacidad de catalizar también la oxigenación del tricloroetileno (TCE), contaminante frecuentemente encontrado en los suelos y acuíferos. Se observó que las bacterias que

presentaban alta afinidad por el fenol mostraban también alta afinidad por el TCE (Futamata et al., 2001).

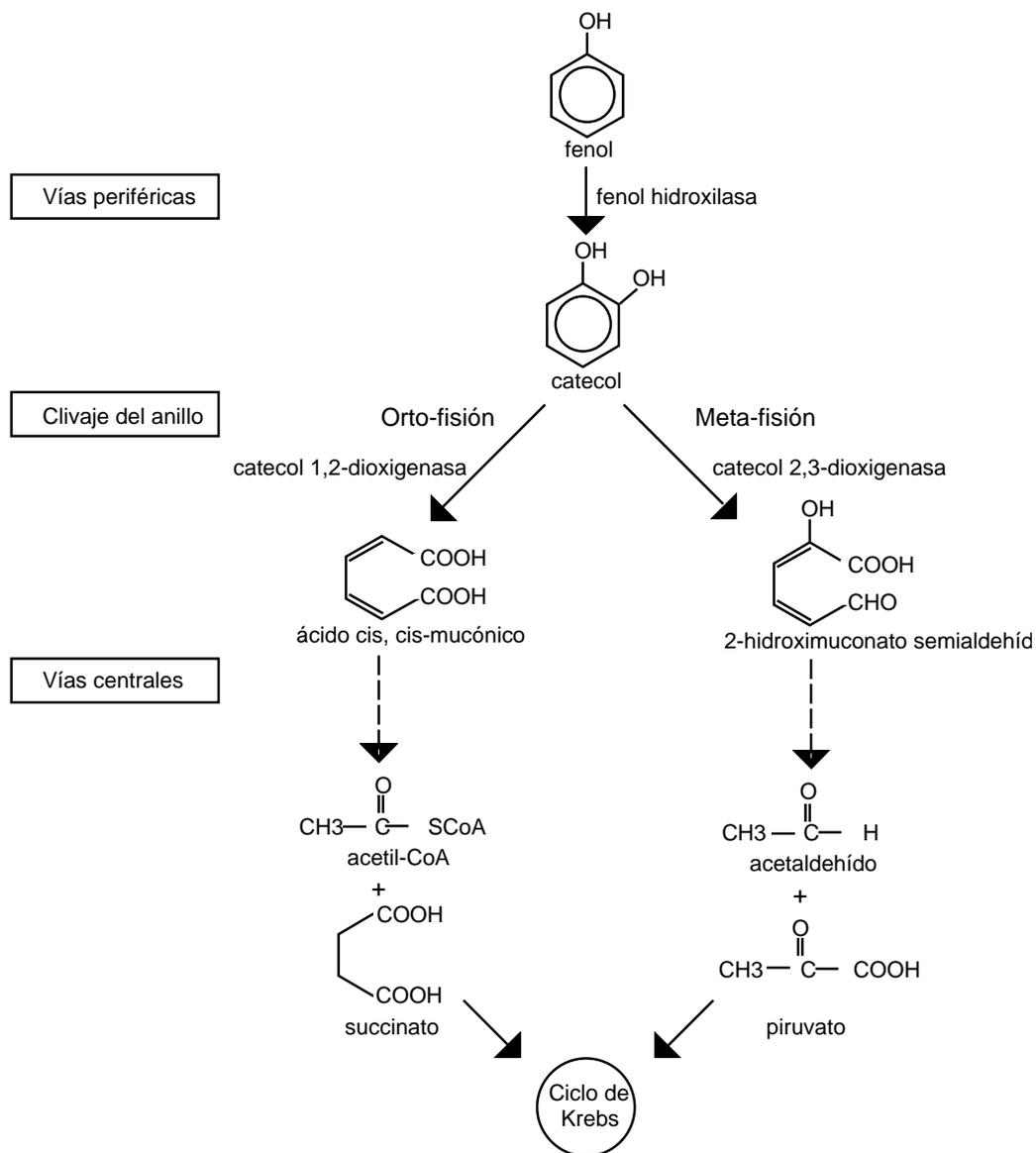
Análisis filogenéticos realizados a partir de componentes conservados de las BMMs indicaron que existe una correlación con el fenotipo asociado a la bacteria, es decir, con la habilidad de crecer en determinados compuestos orgánicos, pero no con su filogenia (Notomista et al., 2003). Esto sugiere que estos operones han estado sujetos a eventos de transferencia horizontal, como es el caso de muchas otras vías metabólicas. Estos eventos probablemente hayan sido favorecidos por la presencia de transposones y secuencias de movilización asociados a estos operones y a su inserción en plásmidos, permitiendo su transferencia entre distintas bacterias y de este modo la rápida adaptación de diversos microorganismos a los contaminantes. Por ejemplo, estudios realizados sobre aislamientos de cepas de *Alcaligenes* sp sugieren una falta de correlación entre los genotipos de la subunidad mayor de la PH y la filogenia de las bacterias degradadoras de fenol, la cual fue atribuida a la transferencia lateral (Zhang et al., 2004). En *Alcaligenes faecalis*, un ORF codificando transposasas de la familia de secuencias de inserción (SI) 4 fue encontrado río abajo del *cluster* del gen de la PH (Zhu et al., 2008), sugiriendo que el *cluster* completo para el catabolismo del fenol podría haber sido transferido entre diferentes bacterias.

### **Degradación de fenol**

Una amplia variedad de microorganismos tienen la capacidad de degradar compuestos fenólicos, tanto en cultivos puros (Hill and Robinson, 1975; Gonzalez et al., 2001; Goswami et al., 2005), en consorcios mixtos (Ambujom, 2001; Chen et al., 2008) o en comunidades complejas como los barros activados (Watanabe et al., 1998; Kibret et al., 2000; Zhang et al., 2004; Jiang et al., 2007). Numerosas bacterias han sido aisladas en laboratorio con el objetivo de estudiar la vía de degradación del fenol, la cual fue analizada en detalle en *Pseudomonas* sp CF600.

La degradación aeróbica de los compuestos fenólicos comienza por una hidroxilación en el átomo de carbono adyacente al grupo hidroxilo pre-existente para formar catecol, y continúa con la ruptura del anillo aromático en posición orto o meta. El paso inicial es catalizado por la enzima PH (fenol 2 monooxigenasa), utilizando oxígeno molecular y NAD(P)H como cosustratos. El segundo paso puede ser catalizado por la enzima

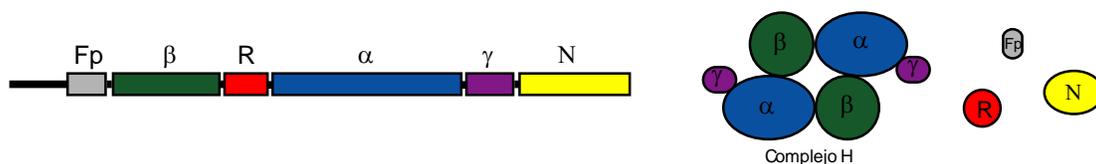
catecol 1,2 dioxigenasa, comenzando la vía orto de degradación que lleva a la formación de succinil-CoA y acetil-CoA, o por la enzima catecol 2,3 dioxigenasa, iniciando la vía meta, que lleva a la formación de piruvato y acetaldehído (figura 3).



**Figura 3.** Esquema de la degradación aeróbica del fenol en microorganismos.

La hidroxilación inicial es considerada la etapa limitante de la velocidad de la vía de degradación, determinando las constantes cinéticas de la actividad celular de oxigenación de fenol (Hino et al., 1998). La enzima PH es además quien generalmente determina el rango de sustrato de cada microorganismo, si bien otros factores tales como la especificidad de sustrato de los reguladores transcripcionales y de los transportadores de membrana podrían estar también involucrados (Ng et al., 1995).

Dos tipos de PH han sido identificadas en bacterias: uni y multicomponente, siendo la multicomponente (mPH) la principal enzima PH encontrada en los ambientes naturales (Watanabe et al., 1998; Futamata et al., 2001). Todas las mPH son similares en cuanto a su estructura, que consiste en seis subunidades, de las cuales la subunidad mayor (de aproximadamente 60 kD) es la que contiene el sitio catalítico. Las subunidades se denominan:  $\alpha$  (la mayor),  $\beta$ ,  $\gamma$ , N, R y Fp. Las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  forman un complejo de alto peso molecular, llamado complejo H, que es el que contiene la actividad de hidroxilación. En base a estudios de cristalografía se determinó que el complejo H estaría conformado por una estructura de hexámero del tipo  $(\alpha\beta\gamma)_2$ , en la cual las subunidades  $\gamma$  estabilizarían a los heterodímeros  $\alpha$ - $\beta$  (figura 4). La subunidad N presenta un dominio tipo ferredoxina en el extremo N-terminal, y un dominio reductasa NADPH dependiente en el C-terminal, y su función sería la de proveer electrones al oxidar NADPH. La subunidad R tendría una actividad reguladora, acoplado a la oxidación de NADPH por N con la actividad de hidroxilación del complejo H, aumentando el rendimiento de la reacción. Por último, la subunidad Fp no parece ser necesaria para la actividad enzimática, pero estaría involucrada en el ensamblado del complejo H (Notomista et al., 2003).



**Figura 4.** Esquema de la organización genética del operón de las PH multicomponente y del ensamblado de sus subunidades. Modificado de (Notomista et al., 2003).

De acuerdo a su organización genética en el operón, las mPHs pueden ser clasificadas en dos grupos: en el grupo del tipo *dmp* (de *Pseudomonas* sp CF600) los genes de la mPH se encuentran ligados a la vía meta de degradación (Shingler et al., 1989), en el grupo del tipo *mop* (de *Acinetobacter calcoaceticus*), están ligados a la vía orto de degradación (Ehrt et al., 1995).

Los genes responsables de las vías de degradación de compuestos aromáticos suelen estar organizados en *clusters*, los cuales comprenden genes catabólicos que codifican para los distintos pasos enzimáticos, genes de transporte, responsables del transporte activo del sustrato, y genes regulatorios que ajustan la expresión de los genes catabólicos y de transporte en base a la presencia del compuesto a degradar (Diaz, 2004).

La expresión de las vías catabólicas de compuestos aromáticos está frecuentemente controlada por una o más proteínas reguladoras de la transcripción. La expresión de las mPH se cree que está bajo el control de la subclase XylR/DmpR dentro de la familia de los reguladores transcripcionales del tipo NtrC (Teramoto et al., 2002). De este modo la expresión de los genes mPH ocurre únicamente en presencia del sustrato o de un análogo estructural, dado que este tipo de reguladores se activan por interacción directa con la molécula efector, que normalmente es el sustrato de la vía catabólica en cuestión. En *Comamonas testosteroni* R5 los mecanismos de control parecen ser más elaborados que en otras bacterias, involucrando además de un regulador positivo, un represor que evita la expresión gratuita de la PH en ausencia de fenol y un tercer regulador (Teramoto et al., 2002).

Dado que el fenol tiene efectos inhibitorios sobre la actividad de degradación, suelen usarse modelos cinéticos con inhibición por sustrato, siendo la ecuación de Haldane (Folsom et al., 1990) la más frecuentemente utilizada para describir la biodegradación de fenol en cultivos puros o mixtos:

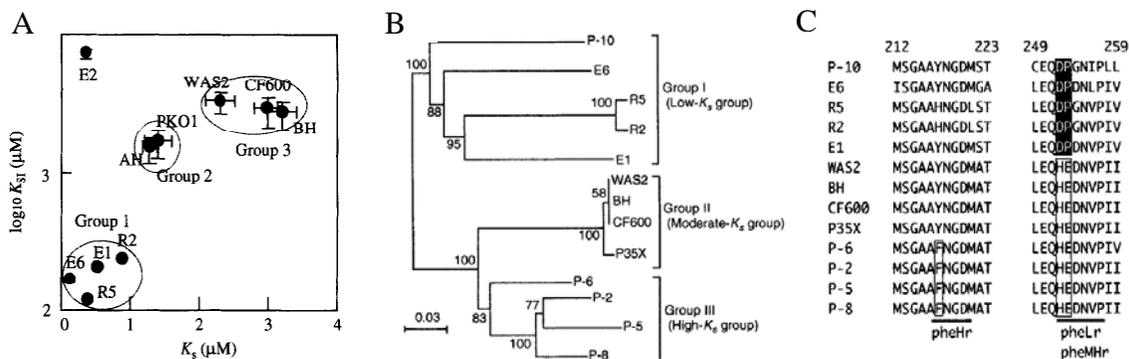
$$V = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S]}{[S] + K_S + [S]^2 / K_{SI}}$$

donde  $V_{\text{máx}}$  es la velocidad máxima de degradación,  $[S]$  es la concentración de sustrato,  $K_S$  es la constante de saturación media de la enzima mPH y  $K_{SI}$  es la constante de

inhibición. Se utiliza el término  $K_S$  en lugar de  $K_m$  dado que los parámetros cinéticos se determinan sobre células intactas y no sobre las enzimas purificadas (Folsom et al., 1990; Watanabe et al., 1996).

El gen que codifica para la subunidad mayor de la enzima mPH (LmPH) ha sido ampliamente utilizado como un marcador molecular para el estudio de la diversidad genética y funcional de las bacterias que degradan fenol (Watanabe et al., 1998; Watanabe, 2002). Mediante estudios realizados sobre bacterias aisladas, se ha observado que existe una correlación entre una clasificación genotípica, realizada en base a la secuencia aminoacídica del gen LmPH, y una fisiológica, basada en las características cinéticas de la degradación de fenol (Futamata et al., 2001): se encontró que las bacterias conteniendo mPH con alta afinidad por el fenol formaban, en un árbol filogenético construido a partir de las secuencias LmPH, un grupo separado de aquellas que presentaban una baja afinidad (figura 5B). Watanabe *et al* establecieron que las bacterias que degradan fenol podían ser clasificadas en tres grupos distintivos basado en los valores de la constante de saturación media ( $K_S$ ) y de la constante de inhibición ( $K_{SI}$ ) (Watanabe and Hino, 1996). El grupo 1 comprende bacterias con bajas  $K_S$  y  $K_{SI}$ , presentando alta afinidad por el fenol, el grupo 2 incluye bacterias con moderadas  $K_S$  y  $K_{SI}$ , y el grupo 3 bacterias con altas  $K_S$  y  $K_{SI}$ , es decir, con baja afinidad por el fenol (figura 5A).

Las secuencias aminoacídicas derivadas de la secuenciación de los genes LmPH presentaban entonces residuos característicos de cada grupo cinético. En base a esta información se han diseñado *primers* para PCR específicos de cada grupo de alta, media o baja  $K_S$  (figura 5C) (Futamata et al., 2001).



**Figura 5.** A. Clasificación de bacterias degradadoras de fenol en base a los valores de  $K_S$  y  $K_{SI}$  de la ecuación de Haldane (Watanabe and Hino, 1996) B. Análisis filogenético de las secuencias LmPH utilizadas para el diseño de los *primers* específicos de grupo (Futamata et al., 2001). C. Aminoácidos característicos de cada grupo (Futamata et al., 2001).

Dicha clasificación resulta importante en relación a la degradación del tricloroetileno (TCE). El TCE es un compuesto orgánico clorado potencialmente carcinogénico. Ha sido ampliamente utilizado como solvente y agente desengrasante, siendo un contaminante común de suelos y acuíferos. El TCE puede ser degradado aeróbicamente por cometabolismo, a través de bacterias que metabolizan compuestos alifáticos e hidrocarburos aromáticos (Ayala-del-Rio et al., 2004). La degradación del TCE puede ser inducida por sustratos como metano, tolueno o fenol, sin embargo la eficiencia de degradación del TCE no siempre es elevada. El estudio y la clasificación de las bacterias que degradan fenol ha estado muchas veces orientado al desarrollo de estrategias para una eficiente bioremediación del TCE. Ensayos en laboratorio sugieren que sólo las bacterias que codifican para una enzima fenol hidroxilasa de baja  $K_S$  son capaces de una eficiente degradación del TCE a concentraciones ambientalmente relevantes (Baker et al., 2001).

### Métodos directos y métodos dependientes de cultivo en ecología microbiana

La utilidad del aislamiento y cultivo de microorganismos en los estudios de ecología microbiana ha sido un tema controversial desde que se evidenció que la gran mayoría de los microorganismos presentes en una muestra ambiental no podía ser aislada bajo las condiciones de cultivo tradicionales. La enorme diferencia observada entre el número de células obtenido por recuentos en placa y el obtenido por observación directa

al microscopio, fenómeno denominado “great plate count anomaly” (Staley and Konopka, 1985), sugiere una importante falta de representatividad de la fracción cultivable de una comunidad (Ritz, 2007). Los métodos directos realizados a partir del análisis colectivo de los ácidos nucleicos presentes en muestras ambientales permitirían en cambio describir las comunidades microbianas evitando los pasos de cultivo y sus desvíos asociados. Sin embargo, el cultivo y aislamiento continúan siendo una herramienta necesaria para obtener una colección de microorganismos sobre los cuales realizar estudios bioquímicos, genéticos o fisiológicos, y con los cuales analizar interacciones intra o interespecíficas (Sizova et al., 2003). En este sentido, el cultivo provee de un contexto sobre el cual corroborar los datos de secuenciación (Nichols, 2007). Además, la caracterización de los microorganismos cultivables puede proveer información sobre el papel ecológico de al menos algunos de los miembros de la comunidad, pudiendo ayudar al entendimiento de los patrones observados bajo los métodos moleculares directos (Miteva et al., 2004).

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Las hipótesis de trabajo son:

1. Que el funcionamiento y la estabilidad de los sistemas de barros activados que poseen la capacidad de degradar fenol se encuentran determinados por la diversidad funcional del gen clave del metabolismo del fenol, más que por la identidad de las especies presentes,
2. Que distintas bacterias conteniendo la misma variante del gen funcional son ecológicamente equivalentes,
3. Que distintas variantes del gen funcional representan diferencias ecológicamente relevantes.

El objetivo general del proyecto es estudiar la dinámica de las comunidades bacterianas y su relación con la actividad en sistemas de barros activados que degradan fenol.

Para avanzar hacia el objetivo general se diseñó una serie de experimentos sobre reactores de barros activados a escala de laboratorio especializados en la degradación de fenol, buscando alcanzar los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto de la aclimatación al fenol sobre la dinámica de la diversidad taxonómica y funcional y su relación con la actividad de degradación de fenol,
2. Estudiar el efecto sobre la capacidad funcional y la dinámica de las principales poblaciones que degradan fenol en respuesta a cambios ambientales generados por un aumento en la concentración de fenol,
3. Estudiar las características genotípicas y funcionales de bacterias aisladas conteniendo distintas variantes del gen funcional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Preparación de los reactores de barros activados a escala de laboratorio

El inóculo inicial proviene de la cámara de aireación de la planta de tratamiento de efluentes de una refinería de petróleo, donde el efluente que es tratado consiste casi exclusivamente en hidrocarburos, fenoles y nitrógeno amoniacal. 500 ml de muestra de barros activados (aproximadamente 5 g de sólidos suspendidos totales por litro) fueron transportados al laboratorio en un recipiente a temperatura ambiente, ocupando un volumen aproximado del 20% del total. Inmediatamente luego de su arribo las muestras fueron divididas en 4 partes iguales de 125 ml. Se llevó a volumen con medio sintético (anexo 2). Se establecieron de esta manera cuatro reactores de 800 ml de volumen útil que se mantuvieron a 28°C durante todo el período de muestreo (figura 6).

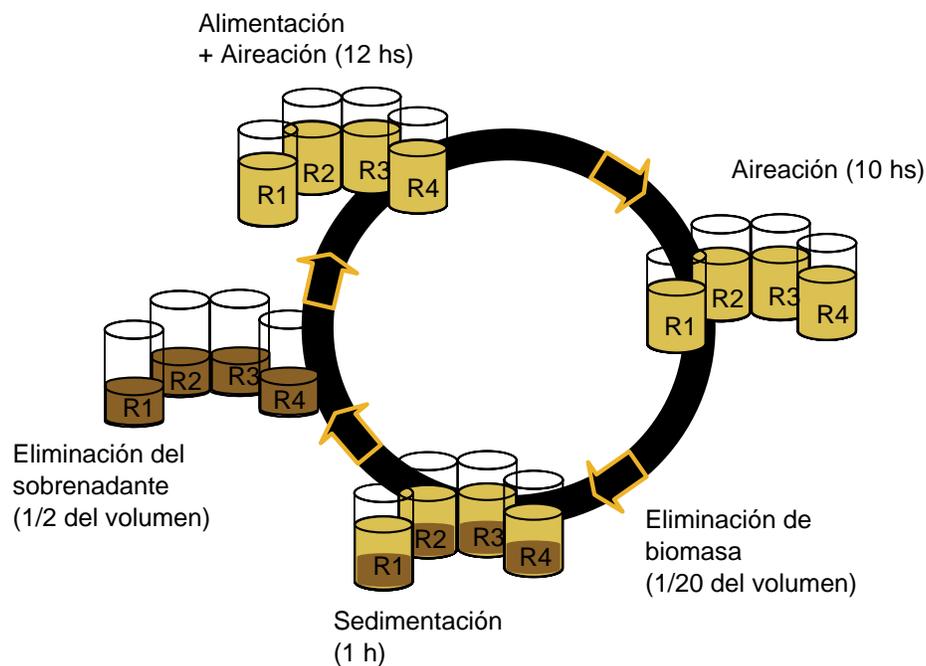


**Figura 6.** Reactores de barros activados a escala de laboratorio.

Cada uno de los reactores fue alimentado en forma semicontinua con medio sintético preparado según las normas ISO 9887 (anexo 2), utilizando bomba peristáltica a una tasa de 33 ml/h. El ciclo diario de operación consistió en un período de alimentación con aireación, de 12 horas (400 ml de medio), un período adicional de aireación de 10 hs, una etapa de sedimentación de 1 hora, y eliminación de 360 ml de sobrenadante. Diariamente se eliminaron además 40 ml de barros activados al final del período de aireación, de modo de mantener la biomasa aproximadamente constante (figura 7). De

este modo los parámetros de operación quedaron establecidos en un tiempo de retención de sólidos de 20 días y un tiempo de retención hidráulica de 2 días.

La toma de muestra se realizó durante el período de aireación para todos los ensayos, excepto para los de extracción de ARN mensajero. En este caso las muestras se tomaron durante el período de alimentación para favorecer su detección, dado que los mensajeros tienen corta vida media. Las muestras que no se procesaron en el momento fueron conservadas en glicerol 50% a  $-70^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 7.** Ciclo diario de operación de los reactores a escala de laboratorio.

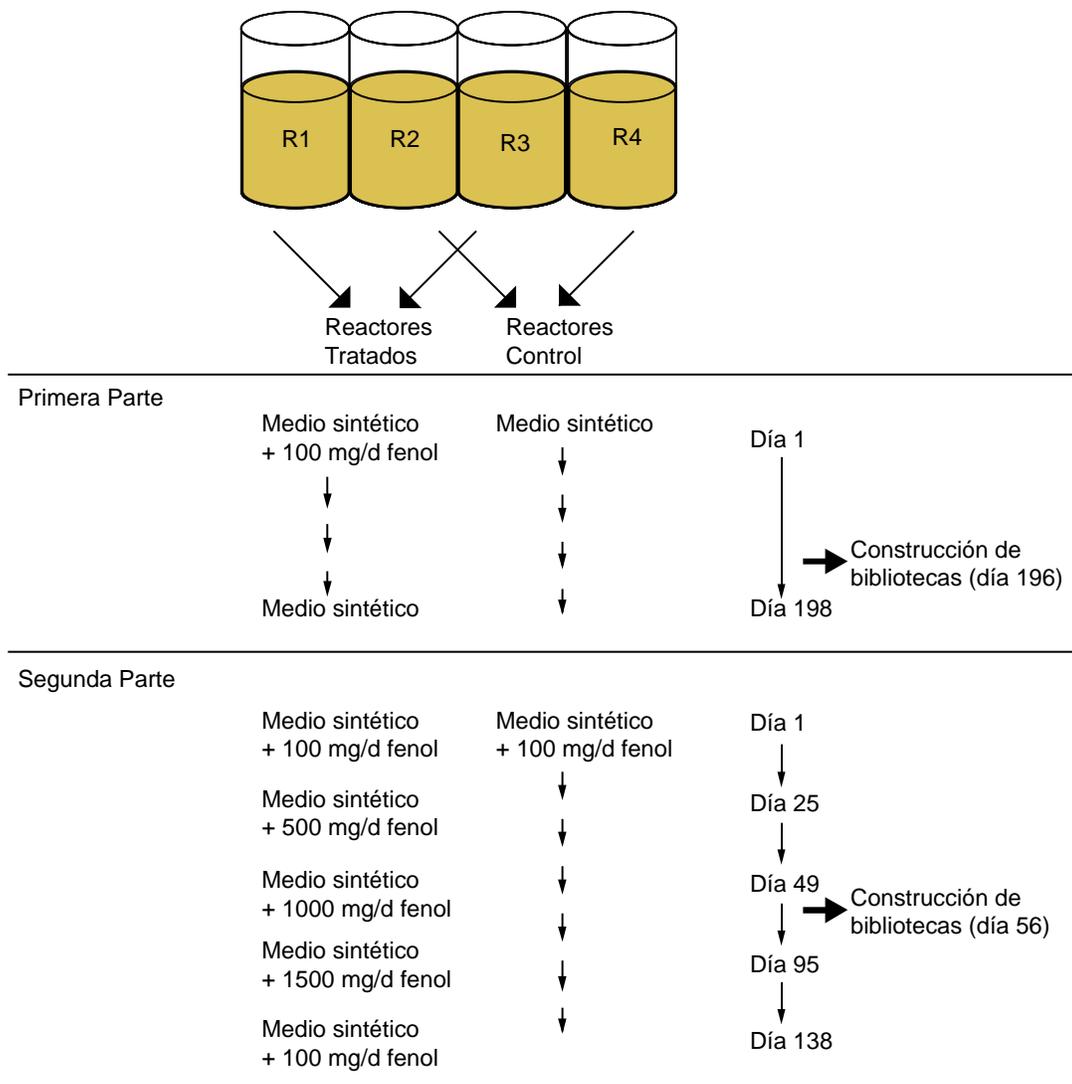
## 2. Diseño experimental

Los cuatro reactores se mantuvieron operando bajo las mismas condiciones durante 30 días, como etapa de aclimatación a las condiciones de laboratorio.

Se utilizó un sistema de réplicas en el cual dos de los reactores fueron sometidos al tratamiento y los dos restantes fueron mantenidos como controles (figura 8).

En la primera parte del trabajo el tratamiento consistió en agregar al medio sintético 100 mg/día/reactor de fenol, mientras que los controles eran alimentados sólo con el medio

sintético. Luego de 5 meses de operación se interrumpió el agregado de fenol y se mantuvieron los reactores por otros dos meses, alimentándolos dos veces por semana. A continuación se mezclaron los barros activados operando un único reactor hasta comenzar la segunda parte del trabajo. En esta etapa, luego de dividir el barro nuevamente en cuatro reactores, se incorporaron en todos los reactores 100 mg/día de fenol como la concentración basal, y el tratamiento consistió en realizar un aumento escalonado en la carga de fenol en el alimento: 100, 500, 1000 y 1500 mg/día/reactor. Luego de 43 días de operación con una carga de 1,5 g/d se bajó la concentración de fenol a 100 mg/d en todos los reactores (figura 8).



**Figura 8.** Esquema del diseño experimental utilizado en la primera y segunda parte del trabajo.

### **3. Determinación de Sólidos Suspendedos Totales (SST)**

La concentración de biomasa presente en los reactores se estimó por mediciones del peso seco sobre 40 ml de muestra (SST) obtenida de los reactores al finalizar la etapa de aireación. Se eliminó el sobrenadante por centrifugación y se secaron los barros en estufa a 105°C hasta peso constante (25 horas) (Clesceri et al., 1998).

Los SST se calcularon como

$$\text{SST (g/l)} = \frac{\text{Peso (g)}}{\text{Volumen de muestra (l)}}$$

### **4. Determinación de fenol**

La concentración de fenol se determinó sobre el sobrenadante de las muestras mediante un ensayo colorimétrico (Clesceri et al., 1998). Las muestras fueron centrifugadas a 13200 rpm por 3 min para eliminar los restos de biomasa. Se agregaron 2 ml de muestra a 10,5 ml de agua y se llevó a pH >10 con 700 µl de solución de amonio. Inmediatamente se bajó a pH = 7,9 ± 0,1 con aproximadamente 800 µl de buffer fosfato de potasio pH 6,8. Se agregaron las soluciones de 4-aminoantipirina y de hexacianoferrato (III) de potasio (125 µl de cada una). A pH básico y en presencia de hexacianoferrato (III) de potasio, los compuestos fenólicos reaccionan con 4-aminoantipirina dando lugar a una solución coloreada. Se incubó 15 min para dejar desarrollar el color y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 500 nm. En paralelo se prepararon estándares y se realizó una curva de calibración de fenol (absorbancia versus concentración) para calcular la concentración de fenoles en la muestras.

### **5. Determinación de la velocidad de degradación de fenol de los barros activados por ensayos en batch:**

Los ensayos se realizaron sobre muestras de 40 ml de barros de los reactores, a 28°C con agitación. Se agregaron 20 mg/l de fenol y se determinó la cantidad no degradada por ensayos colorimétricos sobre 2 ml de sobrenadante. Las muestras se tomaron a intervalos de 15-30 min hasta que todo el fenol fuera degradado. La velocidad de

degradación se calculó a partir de la pendiente de la parte lineal de la curva de absorbancia versus tiempo según la siguiente ecuación:

$$V (\text{mg}_{\text{fenol}} / \text{g}_{\text{SST}} \cdot \text{min}) = \frac{- \text{pendiente (abs/min)}}{\text{g}_{\text{SST}} \cdot \text{factor (abs/mg}_{\text{fenol}})}$$

donde el factor corresponde a la pendiente de la curva de calibración.

## 6. Extracción de ácidos nucleicos

### 6.1 Extracción de ADN genómico

El volumen de muestra utilizado en cada extracción fue de 1 ml. Se eliminó el sobrenadante por centrifugación a 7000 g y se resuspendieron las células en 0,8 ml de *buffer* TENP pH 7,6. Se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de SDS 10% p/v y una capa de bolitas de zirconio y sílica de 0,1 mm de diámetro y se agitó a 5000 rpm en un agitador recíproco durante 2 min en pasos de 30 seg cada uno e intervalos de incubación en hielo. Se centrifugó 2 min a 3000 g y se agregó al sobrenadante 5  $\mu\text{L}$  de RNAsa A 20 mg/ml (Sigma), incubándose a 37°C durante 1 hora. A continuación se agregaron 3  $\mu\text{l}$  de proteinasa K 20 mg/mL (Promega) y se incubó 40 min a 37°C. Se incorporaron 100  $\mu\text{l}$  de NaCl 5M, 80  $\mu\text{l}$  de CTAB 10% y se incubó a 65°C por 10 min. Se agregó 1 vol de fenol pH 8. Se centrifugó a 16000 g durante 15 min y se recuperó la fase acuosa, a la cual se le realizaron dos extracciones con 1 vol de cloroformo:isoamílico 24:1 centrifugando 5 min a 13200 rpm. Se precipitó el ADN agregando 2 vol de etanol 100%, 0,1 vol de acetato de sodio 3M e incubando durante una hora a -20°C. Se centrifugó durante 40 min a 13200 rpm y se lavó el pellet con etanol 70 %. Se dejó secar el precipitado bajo lámpara y se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de agua.

La integridad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio, junto a un marcador de peso molecular ( $\lambda$  HindIII, PBL). Se determinó la concentración de ADN por mediciones de absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro.

### 6.2 Extracción de ARN total

El volumen de muestra utilizado en cada extracción fue de 1 ml de muestra de barros de los reactores. Se eliminó el sobrenadante por centrifugación a 7000 g y se resuspendieron las células en 0,8 ml de *buffer* TE pH 8. Se realizó una ruptura química y

mecánica de las células: se agregaron 50  $\mu$ l de dodecilsulfato de sodio (SDS) 10% p/v, 1 vol de fenol pH 5 y una capa de bolitas de zirconio y sílica de 0,1 mm de diámetro y se agitó a 5000 rpm en un agitador recíproco (Mini Bead Beater, Biospec Products) durante 3 min en pasos de 30 seg cada uno e intervalos de incubación en hielo. A continuación se incubó durante 10 min a 65°C para separar el ADN, que a pH ácido y alta temperatura es soluble en la fase orgánica. Se centrifugó a 16000 g durante 10 min y se recuperó la fase acuosa, a la cual se le realizaron dos extracciones con 1 vol de cloroformo:isoamílico 24:1 centrifugando 5 min a 16000 g. Se precipitó el ARN agregando 2 vol de etanol 100%, 0,1 vol de acetato de sodio 3M pH 5,2 e incubando durante una hora a -20°C. Se centrifugó durante 40 min a 16000 g y se lavó el pellet con etanol 70 %. Se dejó secar el precipitado bajo lámpara y se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua. Los ácidos nucleicos fueron incubados durante 30 min a 37°C con 5  $\mu$ l de enzima DNAsa I (1U/ $\mu$ l) en un volumen de 50  $\mu$ l conteniendo *buffer* DNAsa 1X (Promega), para eliminar los restos de ADN presentes en la muestra. Luego de la incubación se agregaron 150  $\mu$ l de agua para trabajar con un volumen mayor y se realizó una extracción con fenol pH 5, seguida de una extracción con cloroformo:isoamílico (24:1). Se precipitó el ARN como se describe más arriba y se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua. Se analizó la calidad del ARN por electroforesis en gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio y visualizado en transiluminador. Las muestras se sembraron en el gel con 1 vol de formamida 100% para evitar la degradación. Se determinó la concentración de ARN por mediciones de absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro.

## **7. Retrotranscripción del ARN**

La mezcla de reacción para la síntesis de cADN contenía: *buffer* transcriptasa reversa 1X (Promega), deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 50  $\mu$ M de cada uno y primer reverse 0,2  $\mu$ M. El volumen total fue de 20  $\mu$ l por tubo. El programa consistió en 10 min a 65°C, 1 h a 37°C y 10 min a 72°C. Transcurridos los primeros 10 min de la incubación a 37°C se agregó 1  $\mu$ l de la enzima Transcriptasa Reversa MMLV (Promega) a cada tubo. Para la retrotranscripción del ARNr 16S, se utilizaron aproximadamente 100 ng de RNA total por reacción, y el *primer* 534R. Se utilizó 1  $\mu$ l del producto como molde para la PCR.

Para la retrotranscripción de los mensajeros LmPH, se utilizaron aproximadamente 6 µg de ARN total por reacción y el *primer* Phe UR. Se utilizaron 5 µl del producto como molde para la PCR.

## **8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

### **8.1 Amplificación de genes ribosomales**

La mezcla de reacción contenía *buffer* Taq polimerasa 1X (Invitrogen), enzima Taq polimerasa (Invitrogen) 0,03 U/µl, dimetilsulfóxido 5%, dNTPs 50 µM de cada uno, MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM, cada *primer* en una concentración de 0,2 µM y aproximadamente 100 ng de ADN por tubo. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguida de 30 ciclos de 45 seg de desnaturalización a 94°C, 1 min de *annealing* a 55°C y 1 min de extensión a 72°C, con un paso de extensión final de 10 min a 72°C.

Para la amplificación del fragmento de 200 pb del dominio V3 del ADN/ARNr 16S se utilizaron los *primers* F341-GC y R534. La incorporación de una secuencia rica en GC en el *primer* F se utilizó para evitar la desnaturalización completa durante la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante. Para la amplificación del gen del ADNr 16S se utilizaron los *primers* F8 y R1509 (tabla 1).

### **8.2 Amplificación del gen LmPH**

La mezcla de reacción contenía *buffer* Taq polimerasa 1X (Invitrogen), enzima Taq polimerasa (Invitrogen) 0,03 U/µl, dimetilsulfóxido 5%, dNTPs 50 µM de cada uno, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, cada *primer* en una concentración de 0,4 µM y aproximadamente 100 ng de ADN por tubo. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 seg de desnaturalización a 94°C, 30 seg de *annealing* a 59°C y 45 seg de extensión a 72°C, con un paso de extensión final de 10 min a 72°C.

Se utilizaron los *primers* Phe UF y Phe UR (tabla 1) para amplificar todos los genes LmPH. En la segunda parte del trabajo estos *primers* fueron modificados para que hibridaran también con secuencias LmPH adicionales obtenidas del GenBank: los *primers* LmPH UF 2, 3 y 4 se diseñaron en base a 108 secuencias y el *primer* LmPH UR2 en base a 82 secuencias.

La amplificación de los genes de baja  $K_S$  se realizó con los *primers* Phe LR y Phe UF, la de los genes de moderada  $K_S$ , con los *primers* Phe MHR y Phe UF, y la de los de alta  $K_S$  con los *primers* Phe HR y Phe UF (tabla 1).

Para la amplificación de las distintas variantes genéticas LmPH se utilizaron los *primers* diseñados a partir de las bibliotecas como se explica más adelante (tabla 2).

Todas las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador Minicycler (MJ Research).

El producto fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa 1 o 1,5% teñido con bromuro de etidio.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Blanco	Referencia
F8	AGAGTTTGATCMTGGCTC	Bacteria (16S)	(Godon et al., 1997)
R1509	GNTACCTTGTTACGACTT	Universal (16S)	(Godon et al., 1997)
F341-GC	CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGG GGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG	Bacteria (16S)	(Muyzer et al., 1993)
R534	ATTACCGCGGCTGCTGG	Universal (16S)	(Muyzer et al., 1993)
Phe UF	CCAGGSBGARAARGAGARGAARCT	LmPH Universal	(Futamata et al., 2001)
Phe UR	CGGWARCCGCGCCAGAACCA	LmPH Universal	(Futamata et al., 2001)
Phe LR	GGVABRTTGYCCGGGTC	LmPH Baja $K_S$	(Futamata et al., 2001)
Phe MHR	GATBGGCACRTTGTCTTC	LmPH Moderada $K_S$	(Futamata et al., 2001)
Phe HR	GTGGCCATGTCGCCATTGA	LmPH Alta $K_S$	(Futamata et al., 2001)

**Tabla 1.** *Primers* utilizados en las amplificaciones por PCR.

## 9. Electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) del dominio V3 del ADN/ARNr 16S

En la técnica de DGGE los fragmentos amplificados son separados según su comportamiento de fusión al migrar a lo largo de un gel que contiene un gradiente de concentración creciente de compuestos desnaturantes del ADN. Durante la

electroforesis, las moléculas de ADN se disocian parcialmente por acción del desnaturalizante, viéndose afectada su movilidad. Dado que el comportamiento de fusión está determinado por la secuencia nucleotídica, el perfil de bandas que se obtiene es un reflejo de la variabilidad genética presente en la muestra.

### **9.1 Preparación del gel y condiciones de electroforesis**

Utilizando un armador de gradiente (Hoefer Scientific Instruments), se prepararon geles de poliacrilamida 8% conteniendo un gradiente lineal de 40 a 65 % de desnaturalizante (donde el 100% de desnaturalizante contiene urea 7M y formamida 40% v/v).

Los productos de amplificación del dominio V3 del ARN/ADNr 16S (200 pb) fueron concentrados en *speed vac* (FTS Systems) hasta 10  $\mu$ l para ser sembrados en el gel. Las condiciones de electroforesis fueron a 65V (aproximadamente 15 mA) durante 16 horas a 60°C en *buffer* TAE 1X. Los geles fueron teñidos con *Sybr Gold* (Molecular Probes) 1X en TAE 1X durante 30 min, lavados en TAE 1X durante 10 min y visualizados en transiluminador.

### **9.2 Análisis de datos**

La posición y la intensidad de las bandas en el gel fueron determinadas utilizando el programa *Gene Tools* (SynGene), obteniéndose una matriz de intensidades de bandas. Esta matriz se utilizó como material de partida para los análisis multivariados.

El propósito general de los análisis multivariados es reducir situaciones de muchas variables a unas pocas dimensiones, eliminando redundancia y ruido y resumiendo objetivamente los datos para facilitar su comprensión.

El análisis de agrupamiento (*Cluster Analysis*) corresponde a una técnica de clasificación, de modo que las muestras son agrupadas en base a características comunes. A partir de la matriz de datos se evalúa la similitud entre muestras mediante un coeficiente de similitud y se agrupan las muestras en un dendrograma por medio de un algoritmo de ligamiento. Se utilizó el índice de Bray-Curtis como medida de similitud y el algoritmo de UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic media*).

La técnica de ordenamiento NMDS (*Non-metric multidimensional scaling*) opera también sobre una matriz de similitud entre todos los pares de muestras. Las muestras resultan ubicadas como puntos en el espacio de ordenamiento que consiste en un gráfico de dos

o tres dimensiones. Este método busca un ordenamiento en el cual las distancias entre todos los pares de muestras se correspondan lo mejor posible con el orden de rangos de las disimilitudes de los datos originales. La calidad del ordenamiento se evalúa en base al valor de *stress*: éste se obtiene a partir de una regresión monótona entre las distancias en el gráfico de ordenamiento y el orden de los rangos de las disimilitudes entre las muestras. El valor de *stress* disminuye cuanto mejor es el ordenamiento: valores menores a 0,2 indican que el gráfico obtenido es una buena representación de los datos originales. Se utilizó el índice de Bray-Curtis como medida de similitud entre las muestras.

El uso del coeficiente de Bray-Curtis es recomendado cuando se comparan muestras en base a la abundancia de diferentes especies (Faith et al., 1987), dado que la ausencia compartida de especies no modifica el valor de similitud.

El índice de Bray-Curtis se define como:

$$1 - \frac{2 \sum_{j=1}^p \min(y_{1j}, y_{2j})}{\sum_{j=1}^p (y_{1j} + y_{2j})}$$

donde  $y_{1j}$ ,  $y_{2j}$  son los valores de la variable  $j$  en las muestras 1 y 2,  $\min(y_{1j}, y_{2j})$  es el menor valor de cada variable en ambas muestras cuando es mayor que cero y  $p$  es el número de variables. En el caso del análisis de los perfiles de DGGE, cada variable corresponde a cada banda en una posición del gel y el valor de la variable es la intensidad de la banda.

Todos los análisis fueron realizados en el programa PAST (*Paleontological Statistics software package*, versión 1.92, <http://folk.uio.no/ohammer/past>).

### 9.3 Identificación de las bandas de interés

Las bandas de interés fueron recortadas del DGGE, eluidas en 400  $\mu$ l de buffer TE pH 8 (20 horas a 4°C) y precipitadas con 100 mM de NaCl y 2,5 vol de etanol 100% a 0°C por 30 min. Se centrifugó a 13200 rpm por 30 min. El precipitado se lavó con etanol 70%, se dejó secar y se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua. Se utilizaron 2  $\mu$ l como templado para una amplificación por PCR. Luego de verificar su posición en otro DGGE, se

secuenciaron los productos de amplificación en Macrogen Inc con el *primer* R534. Se determinaron las secuencias de mayor similitud en la base de datos del GenBank (*Nucleotide Collection*) utilizando la función BLAST (*basic local alignment search tool*) en el sitio del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). La asignación taxonómica de las bacterias se realizó por medio del programa de clasificación filogenética en el sitio Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) utilizando un nivel de confianza de al menos 80%.

## **10. Construcción de bibliotecas del gen LmPH**

Se prepararon dos bibliotecas de genes LmPH para cada reactor tratado, la primera corresponde a una carga de fenol en el alimento de 100 mg/día, en el día 196 de operación de la primera parte del trabajo; la segunda corresponde a una carga de 1000 mg/d, en el día 56 de operación durante la segunda parte.

### **10.1 Preparación de células electrocompetentes**

Se inocularon 3 ml de medio YT con una colonia de *Escherichia coli* DH10 $\beta$  y se incubó durante 16 hs a 37°C con agitación (180 rpm). Se inocularon 500 ml de medio SOB con 0,5 ml del cultivo y se incubó en las mismas condiciones hasta obtener una densidad óptica a 600 nm de 0,6 a 0,8. Se enfrió en hielo 15 min y se centrifugó a 1250 g y 4°C durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 350 ml de glicerol 10% estéril frío. Se repitió el procedimiento de centrifugación y resuspensión en 250 ml, 125 ml y finalmente en 0,75 ml, obteniéndose una DO a 600 nm de entre 0,2 y 0,3. Las células se congelaron en nitrógeno líquido en alícuotas de 50  $\mu$ l y se conservaron a -70°C hasta su utilización.

### **10.2 Clonado del gen de la subunidad mayor de la fenol hidroxilasa multicomponente**

#### **10.2.1 Amplificación, purificación y cuantificación de los genes LmPH**

A partir de ADN genómico extraído de los reactores 1 y 3, se amplificaron por PCR los genes LmPH con *primers* universales. En el caso de las bibliotecas construídas durante la primera parte del trabajo, se utilizaron los *primers* LmPH UF-UR (tabla 1). Para la construcción de bibliotecas en la segunda parte se utilizaron los *primers* LmPH UF 2, 3 y

4 - UR 2 (tabla 2B, ver sección 8.2): se realizaron tres PCR (una para cada *primer* LmPH UF) y se juntaron los productos de amplificación.

El producto de 620 pb fue purificado por electroforesis en gel de agarosa 1%, las bandas fueron recortadas y extraídas del gel por medio del kit de extracción QBIQ. Se cuantificó en espectrofotómetro a 260 nm.

### **10.2.2 Reacción de ligada en el vector de clonado**

El fragmento purificado fue ligado en el vector *pGem T-easy* (Promega) durante 16 horas a 4°C, utilizando una relación inserto-vector de 3:1 según las instrucciones del fabricante.

Este vector contiene genes de resistencia a ampicilina para la selección de bacterias que incorporaron el plásmido, y los genes para la enzima  $\beta$ -galactosidasa conteniendo el sitio de clonado, para el *screening* de las bacterias transformadas: color blanco en placas conteniendo IPTG/X-Gal indica presencia del inserto interrumpiendo el ORF de la  $\beta$ -galactosidasa.

### **10.2.3 Transformación de células *Escherichia coli* DH10 $\beta$ electrocompetentes**

Se transfirieron 50  $\mu$ l de células electrocompetentes a una celda de electroporación de 1mm de paso, se agregaron 2  $\mu$ l del producto de ligada y se sometieron a un pulso Ec1 en un electroporador Micropulser (Bio-Rad). Inmediatamente se agregaron 250  $\mu$ l de SOC a temperatura ambiente, se transfirió a tubos de cultivo de 15 ml y se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación.

El cultivo se rastrilló en placas de LB-agar conteniendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina, IPTG (26  $\mu$ l de un stock 0,1M por placa) y X-Gal (16  $\mu$ l de un stock 40  $\mu$ g/ $\mu$ l por placa). Las placas fueron incubadas por 16 horas en estufa a 37°C.

### **10.2.4 *Screening* de las colonias transformadas por *colony*-PCR**

Las colonias que presentaron color blanco, indicativo de células que incorporaron el plásmido con inserto, fueron analizadas por PCR con los *primers* M13 para corroborar que el tamaño del fragmento fuera el esperado. De esta manera se seleccionaron los clones para su secuenciación.

### **10.3 Preparación de ADN plasmídico**

Se inocularon 2 ml de LB-ampicilina (100 µg/ml) con cada clon. Se incubó por 16 horas a 37°C con agitación. Los cultivos se centrifugaron 3 min a 7000 g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 300 µl de Solución I fría. Se agregaron 300 µl de Solución II y se mezcló por inversión. Se incubó 5 min en hielo y se agregaron 300 µl de Solución III fría, manteniendo en hielo por 10 min. Se centrifugó 15 min a 16000 g y 4°C. Sobre 800 µl del sobrenadante se añadieron 100 µg de RNAsa A (Sigma) y se incubó a 37°C durante dos horas. A continuación se realizó una extracción con cloroformo-isoamílico (24:1) y se precipitó el ADN de la fase acuosa con el agregado de 0,7 vol de isopropanol e incubando 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 30 min a 13200 rpm; el precipitado se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 40 µl de agua. Se verificó la presencia de ADN plasmídico y la ausencia de ARN por electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. La cuantificación se realizó en espectrofotómetro a 260 nm.

### **10.4 Secuenciación**

Las reacciones de secuenciación fueron realizadas por extensión simple con el *primer* M13F por MacroGen Inc ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)).

### **10.5 Construcción de árboles filogenéticos**

Las secuencias obtenidas fueron traducidas en los 6 marcos de lectura a secuencias de aminoácidos por medio del programa *Sequences Utilities* en el sitio BCM Launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>) y se seleccionó el marco de lectura correcto por comparación con secuencias conocidas. Las secuencias nucleotídicas o aminoacídicas fueron alineadas utilizando el programa ClustalX, junto a secuencias de referencia obtenidas del GenBank.

Se construyeron árboles filogenéticos con los métodos de *neighbour joining* (NJ) y parsimonia. El método de NJ sigue un criterio de distancia, convirtiendo una matriz de secuencias alineadas en una de distancias de a pares, a partir de la cual se construye el árbol filogenético. En el método de parsimonia se considera directamente cada sitio nucleotídico (o aminoacídico) como parte de la matriz, y se buscan los árboles más parsimoniosos, es decir aquellos que minimicen el número de cambios.

Los niveles de confianza de cada rama se calcularon por *bootstrap* con 100 matrices generadas al azar.

Estos análisis se realizaron utilizando el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, [www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) (Tamura et al., 2007).

### 10.6 Clasificación de las secuencias en unidades taxonómicas operativas (OTUs)

El programa DOTUR (Distance-based OTU and richness) asigna secuencias a unidades taxonómicas operativas basado en las distancias genéticas entre secuencias, por medio de los algoritmos de vecino más cercano, promedio o más lejano, para cada nivel de distancia (Schloss and Handelsman, 2005). Permite además construir curvas de rarefacción, calculando índices de diversidad y cobertura.

Las secuencias de los clones se utilizaron para construir una matriz de distancia por medio del programa DNADIST o PROTDIST (PHYLIP software, versión 3.5). La matriz fue analizada en el programa DOTUR ([www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html](http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html)) utilizando el algoritmo del vecino más lejano.

### 10.7 Cálculo de la cobertura de la biblioteca y curva de rarefacción

Estos parámetros se utilizaron para evaluar cuan representativa de la comunidad es la muestra analizada. Un elevado valor del grado de cobertura o una curva de rarefacción en la que se alcance la asíntota, es decir que al aumentar el número de clones analizados no aumente el número de OTUs observados, son indicadores de que el esfuerzo de muestreo ha sido suficiente, siendo la muestra representativa de la comunidad.

El grado de cobertura fue calculado según el índice de Good de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$C = 1 - \frac{n_1}{N} \cdot 100$$

donde  $n_1$  es el número de OTUs observados una única vez en la biblioteca y  $N$  es el número de secuencias examinadas (Good, 1953).

La curva de rarefacción se construyó utilizando el programa DOTUR ([www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html](http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html)).

## 11. PCR en tiempo real

La técnica de PCR en tiempo real permite la detección cuantitativa de secuencias de ácidos nucleicos en muestras ambientales, sin los desvíos asociados a la PCR convencional. La cuantificación se lleva a cabo mediante la detección de un compuesto fluorescente que se acumula proporcionalmente a la cantidad de producto de amplificación. La amplificación es registrada luego de cada ciclo por un aumento en la señal de fluorescencia. La cantidad de templado inicial se obtiene a través de la determinación del ciclo umbral ( $C_t$ ) de las muestras y de una serie de estándares preparados a partir de concentraciones conocidas de la secuencia en cuestión. El  $C_t$  corresponde al número de ciclo en el cual la intensidad de fluorescencia supera el nivel umbral de detección. En este punto el número de copias amplificadas es directamente proporcional al número de copias iniciales, por lo tanto las muestras pueden ser cuantificadas por comparación de sus  $C_t$  con los de la curva de estándares (Smith and Nedwell, 2006). Cuanto menor sea el número de copias iniciales mayor será el  $C_t$ , dado que se necesitarán más ciclos de amplificación para que la fluorescencia supere el nivel umbral.

Se utilizó un sistema de PCR en tiempo real con *Sybr Green I* para la detección cuantitativa de las distintas variantes genéticas LmPH y de los genes ribosomales 16S. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Opticon 2 (MJ Research), los datos se analizaron con el programa Opticon Monitor, versión 2.02.

### 11.1 Diseño de *primers* y control de especificidad

Las secuencias nucleotídicas del gen LmPH obtenidas en las bibliotecas se utilizaron para el diseño de *primers* específicos para cada uno de los grupos detectados. Se buscó sobre las secuencias alineadas regiones de aproximadamente 18 bases características de cada grupo.

En la tabla 2A se muestran los *primers* diseñados a partir de las secuencias de la primera biblioteca, que se utilizaron para la cuantificación en la primera parte del trabajo. Con el agregado de las secuencias de la segunda biblioteca, se diseñaron nuevos *primers* (tabla 2B), que se utilizaron para la cuantificación en la segunda parte.

Las condiciones de amplificación fueron optimizadas con clones conteniendo la secuencia blanco. Se probaron distintas temperaturas de annealing, entre 50 y 62°C, y distintas concentraciones de magnesio, entre 1 y 3 mM. Para cada par de *primers*

diseñado se utilizaron clones correspondientes a cada uno de los subgrupos no específicos como controles negativos ( $10^6$  copias por ensayo).

En los casos necesarios se diseñaron oligonucleótidos de secuencia complementaria al *primer reverse* pero más cortas (tabla 2A) para lograr por competencia la especificidad requerida: se forma un *primer* doble cadena entre el dúplex y el *primer*, luego, en presencia de la secuencia blanco, la cadena más corta es desplazada (Li et al., 2002). Para el diseño de los dúplex de *primers* se tuvieron en cuenta los valores de  $\Delta G$  de las hibridaciones, determinados en el sitio [www.bioinfo.rpi.edu/mfold/old/dna](http://www.bioinfo.rpi.edu/mfold/old/dna). La preparación de los *primers* doble cadena se realizó mezclando el *primer reverse* con el dúplex en Tris-HCl pH 8 10 mM en presencia de 1,5 mM de  $MgCl_2$ ; se incubó por 2 min a  $94^\circ C$ , seguido de 5 min a  $50^\circ C$  y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se probaron tres relaciones *primer*-dúplex, 1:1, 1:1,5 y 1:2; la cuantificación se realizó en una relación *primer*-dúplex 1:1.

### 11.2 Preparación de estándares de concentración

Los estándares se prepararon a partir de diluciones seriadas 1:10 de ADN plasmídico de clones de las bibliotecas. La concentración del ADN plasmídico fue determinada en fluorómetro (Hoefer DyNA Quant 200 Fluorometer) utilizando solución de Hoescht (0,1 mg/l) en *buffer* TNE 1X filtrado por membranas de  $0,45 \mu m$  de poro. Se cuantificó además por gel luego de digerir 2 horas con la enzima EcoR1 (Promega), junto a un marcador de masa y peso molecular ( $\lambda$  Hind III, PBL).

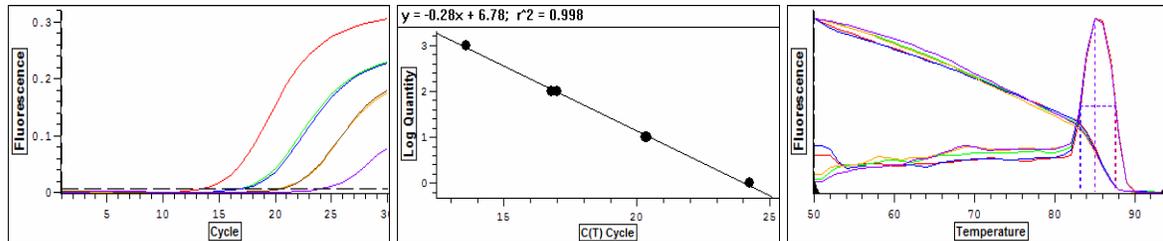
### 11.3 Curvas de estándares y cálculo de eficiencia

Se realizaron curvas de calibración por duplicado para cada set de *primers*, graficándose el logaritmo del número de copias en función del ciclo umbral ( $C_t$ ). La pendiente de la curva de calibración se utilizó para calcular la eficiencia de la amplificación usando la ecuación:

$$\text{Eficiencia} = 10^{-\text{pendiente}}$$

Valores cercanos a 2 indican que el número de copias se duplica luego de cada ciclo, resultando en una alta eficiencia de amplificación. Se analizaron únicamente los

ensayos en los cuales las curvas de calibración presentaban un coeficiente de regresión ( $R^2$ ) mayor a 0,990 y una eficiencia mayor al 80% (figura 9).



**Figura 9.** Puesta a punto de los ensayos de PCR en tiempo real: curva de estándares y curva de *melting* con los *primers* correspondientes al grupo L5.

#### 11.4 Condiciones de amplificación

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 25  $\mu$ l. Las mezclas de reacción contenían *buffer* Taq polimerasa 1X (Invitrogen), 0,03 U/ $\mu$ l de enzima Platinum Taq polimerasa, *Sybr Green I* 1:50000 (Molecular Probes), DMSO 5%,  $MgCl_2$  2mM, dNTPs 50  $\mu$ M de cada uno, *primers* 0,4  $\mu$ M de cada uno. El programa consistió en un paso de desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 59°C y 45 seg a 72°C, registrándose los valores de fluorescencia luego de cada ciclo. Al finalizar los ciclos de amplificación se realizó una curva de *melting* entre 50 y 94°C; se verificó la presencia de un único pico a la temperatura de *melting*.

#### 11.5 Cuantificación de los subgrupos LmPH en las muestras de barros activados

Las muestras de ADN fueron analizadas en dos diluciones 1:10 (4 y 0,4 ng /tubo) y en triplicado. Cada grupo LmPH fue cuantificado junto a la curva de estándares correspondiente. En el mismo ensayo se determinaron también las copias LmPH totales por medio de los *primers* Phe UF - Phe UR (en la primera parte, tabla 1) o LmPH UF2, 3 y 4 (mezclados en relación 1:1:1) - LmPH UR2 (en la segunda parte, tabla 2B). La abundancia de cada grupo LmPH en las muestras se determinó como el porcentaje de copias de ese grupo con respecto al número de copias totales detectadas con los *primers* LmPH universales.

### **11.6 PCR en tiempo real de los genes ribosomales 16s**

El número total de bacterias se estimó mediante la cuantificación de los genes ribosomales 16S, asumiendo un número promedio de 3,6 copias de ADNr por célula (Klappenbach et al., 2001). Se utilizaron los *primers* universales F1114 y R1392 (Pace et al., 1986; Rainey et al., 1996) (tabla 2C). Los estándares para la curva de calibración se prepararon mediante diluciones seriadas 1:10 de un clon conteniendo el gen del ARNr 16S.

Las mezclas de reacción contenían *buffer* Taq polimerasa 1X (Invitrogen), 0,03 U/ $\mu$ l de enzima Platinum Taq polimerasa, *Sybr Green I* 1:50000 (Molecular Probes), DMSO 5%, MgCl<sub>2</sub> 3mM, dNTPs 50  $\mu$ M de cada uno, *primers* 0,4  $\mu$ M de cada uno. El programa consistió en un paso de 94°C 5 min y 30 ciclos de 94°C 30 seg, 55°C 30 seg y 72°C 30 seg, leyéndose los valores de fluorescencia luego de cada ciclo. Al finalizar los ciclos de amplificación se realizó una curva de *melting* entre 50 y 94°C, verificándose la presencia de un único pico a la temperatura de *melting*.

<b>A. Primers LmPH utilizados en la primera parte</b>			
Target	Forward primer	Reverse primer	Tamaño (pb)
LmPH L1	CAGATCCACAGCCTGTCC	GGCAGGTTGTCCGGATC	335
LmPH L2	CAGATCCACTCGCTGTCC	GGCAGGTTGGCCGGGTC	341
LmPH L3	TCACTTCCAGACCGAAAATG	GGCACGTTGTCCGGATC	348
LmPH L4	CCACTGCCAGACCGAAAC	GGCACGTTGGCCGGGTC	348
LmPH L5	GAGACCCATGCGCTGTCC	GGCACATTGCCCGGGTC	335
LmPH L6	GAGACCCATGCGCTGAGC	GGCACGTTGGCCGGGTC	335
Dúplex L2		GACCCGGCCAACCTGC	
Dúplex L4/L6		GACCCGGCCAACGTGC	
<b>B. Primers LmPH utilizados en la segunda parte</b>			
Target	Forward primer	Reverse primer	Tamaño (pb)
LmPH L1	CAGATCCACAGCCTGTCC	GGCRTCGTCAAAGAACGA	113
LmPH L2	GCGTGGCCTGCCTGATG	GCGTCGTGGAAGAAGCTC	165
LmPH L3	TCACTTCCAGACCGAAAATG	GCGTCTTCAAAAAATGAC	125
LmPH L4	CCACTGCCAGACCGAAAC	CGGCATCTCAAAGAACG	127
LmPH L5	GAGACCCATGCGCTGTCC	GCTCAGCGCATCTTCAA	119
LmPH L6	GAGACSCATGCGYTGAGC	TCATCGCGTCCTCGAAGA	118
LmPH L7	ACTGCGTCACTGCCAGAC	TCGCGTCGTGGAAGAAGG	134
LmPH L8	GACGAGCTGCGGCATTCG	TCGCATCGTCGAAATACG	132
LmPH U 2	YCARGSYGARAARGARAAAAARCT	CGRWARCCGCGCCAGAACCA	620
LmPH U 3	CCAGKCBGARAARGAGCGCAAGYT		
LmPH U 4	CCAGGSBGARAARGARARGAARCT		
<b>C. Primers utilizados para la cuantificación de los genes ribosomales 16S</b>			
Target	Forward primer (F1114)	Reverse primer (R1392)	Tamaño (pb)
Bacteria (16S)	GCAACGAGCGCAACCC	ACGGGCGGTGTGTRC	278

**Tabla 2.** Primers utilizados en los ensayos de PCR en tiempo real.

### 11.7 Análisis de datos

La comparación entre el número de copias LmPH totales entre reactores fue realizada por análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Se verificó la homogeneidad de varianzas (test de homocedacea de Levene) y la normalidad de los datos (test de Shapiro-Wilks). El diseño experimental permitió considerar a las unidades experimentales aleatorias e independientes.

La comparación de los valores LmPH determinados con los *primers* universales o a través de la suma de los grupos específicos se hizo por ANOVA de dos factores con un diseño de bloques completamente aleatorizado.

A partir de los datos de abundancia proporcional de cada grupo LmPH, se calculó el índice de diversidad de Shannon ( $H'$ ) (Magurran, 2004) para cada reactor en cada tiempo, según la ecuación:

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

donde  $p_i$  representa la abundancia de cada variante LmPH. Las desviaciones estándar se determinaron por propagación de errores. Las diferencias en los índices de Shannon entre reactores tratados y control a lo largo del tiempo se analizaron por ANOVA de medidas repetidas (primera parte). La comparación en cada tiempo correspondiente a cada concentración de fenol se realizó mediante pruebas de Mann-Whitney (segunda parte).

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa SPSS versión 11.0.

Se construyeron curvas de distribución de Lorenz para representar gráficamente la equitatividad de los grupos LmPH en las comunidades de los reactores expuestos a distintas cantidades de fenol. Para cada muestra los grupos LmPH fueron ordenados por rangos, de mayor a menor, en base a su abundancia relativa. Se graficó para cada muestra la proporción acumulativa de la abundancia de grupos en función del número acumulativo de grupo, obteniéndose una curva convexa. En este análisis, cuanto más se alejan las curvas de Lorenz de una línea diagonal a 45°, correspondiente a una distribución teórica de equitatividad perfecta, menor es la equitatividad en la muestra (Lorenz, 1905; Mertens et al., 2005).

Los cambios en la composición de las variantes LmPH entre muestras del mismo reactor o entre muestras de los distintos reactores fueron visualizados en un ordenamiento multidimensional (NMDS), utilizando el índice de Bray-Curtis como medida de similitud.

Se realizó un análisis de similitud (ANOSIM) para poner a prueba la hipótesis nula de que las distintas cargas de fenol en el alimento no tienen efecto sobre la distribución de

abundancias de los genes LmPH entre los reactores. El método de ANOSIM es un análisis multivariado no paramétrico; ordena en rangos todas las combinaciones de pares de muestras en base al grado de similitud, separa las combinaciones en dos tipos: dentro y entre grupos (previamente definidos), y calcula en cada caso el rango promedio. El estadístico R se calcula a partir de la diferencia entre el rango promedio de las disimilitudes entre grupos de muestras y el rango promedio dentro de cada grupo. Los valores de R van entre -1 y +1; valores cercanos a cero indican que no hay diferencias entre grupos, en cambio si las muestras dentro de cada grupo son más similares que entre grupos, R aumenta. La significancia estadística de R se determina por un test de aleatorización, obteniéndose el valor p (Quinn and Keough, 2002). Los contrastes se realizaron mediante tests de ANOSIM entre pares de grupos. Se utilizó el índice de Bray-Curtis como medida de similitud.

Se realizó un análisis del porcentaje de similitud (SIMPER) para analizar qué genotipos LmPH serían los principales responsables de las diferencias detectadas por ANOSIM entre grupos de muestras. Este método compara la disimilitud promedio entre todos los pares de muestras dentro de un grupo con las de otro grupo y calcula el porcentaje de contribución de cada OTU a las diferencias observadas entre grupos o tratamientos. La técnica de SIMPER no asigna significancia estadística a las diferencias en la abundancia de los OTUs sino que se usa como un análisis exploratorio (Quinn and Keough, 2002).

Los análisis fueron realizados en el programa PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past>).

## **12. Aislamiento de bacterias que degradan fenol de barros activados**

### **12.1 Condiciones de cultivo**

Se buscó aislar representantes de bacterias que contengan las diferentes variantes del gen LmPH detectadas en las bibliotecas. Para esto se utilizó un amplio rango de condiciones de cultivo, incluyendo:

- 1) medio mínimo MP con distintas concentraciones de fenol, de 100 a 500 mg/l, con o sin solución de elementos traza,
- 2) medio basal LU suplementado con solución de elementos traza con 200 mg/l de fenol,

- 3) sobrenadante de los reactores esterilizado por filtración, a distintas concentraciones de fenol, entre 5 y 500 mg/l,
- 4) varios pasos de enriquecimiento en medio mínimo MP con 3 concentraciones de fenol, de 10, 100 y 1000  $\mu\text{M}$  (en medio líquido, con agitación) previo al pasaje a placa,
- 5) condiciones anóxicas (nitrato o hierro como aceptor de electrones) en placa o en medio líquido previo a pasaje a placa, en jarra anaeróbica.

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave; el fenol se esterilizó por filtración a través de membranas de 0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

Todos los cultivos fueron incubados a 28°C.

Los inóculos provienen de los barros activados de los reactores en distintos tiempos de operación o directamente de los barros activados de la cámara de aireación de la refinería de petróleo, utilizada como fuente inicial de los reactores a escala de laboratorio. Se rompieron los flocs agitando en un agitador recíproco (*bead beater*) con bolitas de vidrio (1 mm de diámetro) para facilitar la distribución de la muestra sobre las placas. Se realizaron repiques sucesivos hasta la obtención de bacterias aisladas.

## **12.2 Screening de los microorganismos aislados por análisis de restricción**

Se amplificó por PCR el gen LmPH a partir de colonias aisladas. Se utilizaron los *primers* LmPH UF2,3,4 - LmPH UR2 (tabla 2B). El producto de 620 pb fue purificado por precipitación con 0,1 vol de acetato de sodio 3M y 2,5 vol de etanol 100%, incubando 40 min a -20°C y centrifugando a 13200 rpm por 40 min. Se resuspendió en 26  $\mu\text{l}$  de agua. El *screening* se realizó por análisis de restricción, incubando 8  $\mu\text{l}$  del producto en un volumen total de 20  $\mu\text{l}$  separadamente con las enzimas Rsa I, Mbo I y Alu I (Promega), en las condiciones indicadas por el fabricante. El tamaño de los fragmentos de restricción se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Se caracterizaron aquellos aislamientos que presentaron diferencias en su perfil de restricción. Los cultivos se conservaron a -70°C en glicerol 30% o en dimetilsulfóxido (DMSO) 7%.

### **13. Caracterización de las bacterias aisladas**

#### **13.1 Caracterización genotípica**

El genotipo LmPH y la identificación filogenética de los microorganismos aislados se determinaron por secuenciación de los genes LmPH y ribosomal 16S, amplificados con los *primers* LmPH UF2,3,4- LmPH UR2, y F8-R1509, respectivamente. El producto se purificó por medio del kit QBIO. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo por extensión simple a partir de los *primers* LmPH UR2 o F8, en Macrogen Inc.

La asignación taxonómica de las bacterias se realizó por medio del programa de clasificación filogenética en el sitio Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>), en base a secuencias de aproximadamente 700 pb. La pertenencia de las secuencias LmPH a los grupos descriptos se analizó mediante el programa DOTUR, además de por la posición en el árbol filogenético.

#### **13.2 Caracterización fenotípica**

Se realizaron ensayos de identificación fenotípica API 20 NE (bacterias gram negativas no enterobacterias, de bioMérieux). Se inoculó con una suspensión de turbidez similar al estándar MacFarland 0,5, en las condiciones indicadas por el fabricante. Esta suspensión fue preparada en solución fisiológica a partir de colonias aisladas, previamente crecidas por 24-48 hs en placas de medio R2A. Se incubó por 24-48 hs a 28°C en cámara húmeda. Se registraron las reacciones positivas y negativas, se obtuvo el perfil numérico y se identificaron los microorganismos con el programa *apiweb* (bioMérieux).

#### **13.3 Caracterización funcional: cinética de degradación y de crecimiento e inhibición por fenol**

Las células fueron crecidas durante tres días en medio MP suplementado con 500  $\mu$ M de fenol, a 28°C con agitación, renovando el medio cada día. Antes de cada ensayo, se lavó y resuspendió en medio MP sin fenol hasta una DO a 600 nm de 0,1 para los ensayos de degradación y de 0,3 para inocular las microplacas en los ensayos de crecimiento.

El peso seco de los cultivos se determinó luego de filtrar por membranas de 0,4 µm de tamaño de poro.

La oxidación de fenol fue determinada utilizando un microrespirómetro de 600 µl equipado con una fibra óptica de titanio (Instech Laboratories, inc.). Se midió la actividad de oxidación en lugar de la actividad de degradación de fenol debido a que los ensayos que monitorean cambios en la concentración de fenol presentan baja sensibilidad para determinar velocidades a bajas concentraciones de fenol (Folsom et al., 1990). Dado que en bacterias la oxidación es necesariamente el paso inicial de la vía de degradación de fenol bajo condiciones aeróbicas (Harayama et al., 1992) y que éste es considerado el paso limitante de la velocidad de toda la vía de degradación (Shingler et al., 1989), la tasa de consumo de oxígeno dependiente de fenol puede ser utilizada para evaluar la actividad de degradación de fenol en bacterias (Watanabe et al., 1996).

Se midió el consumo de oxígeno en el tiempo a 12 concentraciones de fenol, desde 1 µM a 2500 µM. Las mediciones se realizaron a 30°C con agitación. Se obtuvo la pendiente (V) para cada concentración de fenol luego de restar la tasa de consumo endógeno de oxígeno y se determinaron los parámetros cinéticos que mejor ajustaban a la ecuación de Haldane (Folsom et al., 1990):

$$V = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S]}{[S] + K_S + [S]^2 / K_{SI}}$$

donde  $V_{\text{máx}}$  es la velocidad máxima de degradación,  $[S]$  es la concentración de sustrato,  $K_S$  es la constante de saturación media y  $K_{SI}$  es la constante de inhibición.

Para determinar las curvas de crecimiento e inhibición por fenol, los cultivos se incubaron con agitación (200 rpm) en microplacas de 96 wells a 30°C. Se inocularon 135 µl de medio mínimo MP con 15 µl del cultivo. Se utilizaron 8 concentraciones iniciales de fenol, desde 200 µM hasta 10600 µM, midiéndose cada una hora la densidad óptica en lector de ELISA a 492 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Mediante una regresión lineal, se calculó la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) para cada concentración de fenol inicial como la pendiente de la curva semilogarítmica de absorbancia versus tiempo en la fase exponencial del crecimiento (Viggor et al., 2008).

Se determinaron los parámetros cinéticos que mejor ajustaban a la ecuación de Aiba-Edwards (Kim et al., 2005; Viggor et al., 2008):

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} \cdot [S]}{K_{\text{SG}} + [S]} \cdot e^{-[S]/K_i}$$

donde  $\mu_{\text{máx}}$  es la tasa máxima de crecimiento específica,  $K_{\text{SG}}$  es la constante de saturación media y  $K_i$  es la constante de inhibición.

Los ajustes a ambos modelos cinéticos se realizaron mediante una regresión no lineal utilizando el programa PRISMA (GraphPad Prism, versión 4).

## 14. Experimentos de coexistencia

### 14.1 Diseño experimental

Los ensayos de coexistencia se realizaron con tres de las bacterias aisladas, denominadas MPE1, Col8 y FC2.13, las cuales se incubaron en tubos de 50 ml en distintas combinaciones: cada una por separado, de a dos, o las tres juntas (tabla 3). Todas las combinaciones se realizaron por duplicado. Los cultivos fueron alimentados con medio mínimo MP a 3 concentraciones de fenol: 40, 100 o 250 mg/l. Las concentraciones de fenol fueron elegidas buscando representar condiciones de bajos, intermedios y altos recursos, seleccionando la mínima concentración de fenol que permita mantener el crecimiento en medio mínimo y la máxima cantidad que no resulte inhibitoria en las condiciones utilizadas (pulsos de alimentación).

No. de tubo	Composición del inóculo inicial
1	MPE1
2	Col8
3	FC2.13
4	MPE1 + Col8 (en relación 1:1)
5	MPE1 + FC2.13 (1:1)
6	Col8 + FC2.13 (1:1)
7	MPE1 + Col8 + FC2.13 (1:1:1)

**Tabla 3.** Esquema de la preparación de los inóculos iniciales. El mismo esquema se realizó para las tres concentraciones de fenol analizadas, por duplicado.

Se incubó a 28°C con agitación (180 rpm), renovando el alimento cada 2 días (se inocularon 8 ml de medio fresco con 2 ml del cultivo). La cantidad de inóculo inicial fue similar en todos los tubos, partiendo de una DO a 600 nm de aproximadamente 0,172. La duración del experimento fue de 15 días.

El crecimiento de los cultivos fue monitoreado por mediciones de absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro. Se determinó la concentración de fenol (como se explica en la sección 4) sobre muestras de los cultivos antes de cada recambio de alimento. Se determinaron las velocidades de degradación (sección 5) sobre 8 ml de cultivo. Se tomaron muestras cada 2 días, que fueron conservadas en DMSO 7% a -70°C o fijadas para los ensayos de hibridación in situ fluorescente. La ausencia de contaminación se controló por plaqueo en medio LB-agar.

#### 14.2 Hibridación in situ fluorescente (FISH)

La abundancia de cada bacteria en los cultivos se determinó por ensayos de FISH. Las sondas utilizadas fueron elegidas en base a las secuencias del ADNr 16S de las tres bacterias. Las características de cada sonda se muestran en la tabla 4.

Sonda	Especificidad	Bacteria blanco	Secuencia (5´-3´)	FA	NaCl	Referencia
DEN220-Cy3	<i>Alicyclophilus</i> , <i>Diaphorobacter</i> y <i>Xilophilus</i>	MPE1	GGCCGCTCCGTCGGC	40 %	56 mM	(Ginige et al., 2005)
ALBO577-Cy3	<i>Alcaligenes</i> , <i>Bordetella</i> y relacionados	Col8	TCCGAACCGCCTGCGCA	35 %	80 mM	(Friedrich et al., 2003)
CTE-A-Cy3	<i>Comamonas</i> <i>testosteroni</i>	FC2.13	CATGACCCGGGGATATTAGC	30 %	112 mM	(Bathe and Hausner, 2006)

**Tabla 4.** Sondas fluorescentes utilizadas para la cuantificación por FISH. FA corresponde al porcentaje de formamida utilizado en el *buffer* de hibridación. NaCl corresponde a la concentración de cloruro de sodio en el *buffer* de lavado.

#### **14.2.1 Preparación de las muestras**

0,3 ml de muestra fueron fijados por incubación con 3 volúmenes de paraformaldehído 4% durante 2 horas a 0°C. Se centrifugó durante 5 min a 5000 g y se descartó el sobrenadante. Las células se lavaron con 0,3 ml de *buffer* fosfato de sodio (PBS) 1X y se resuspendieron en 0,3 ml de PBS 1X. Se agregaron 0,3 ml de etanol 100% frío y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Los portaobjetos fueron sumergidos en solución de gelatina 0,1% KCrSO<sub>4</sub> 0,01% a 70°C y se dejaron secar. Se colocaron 4 µl de muestra por *well*. Una vez seca la muestra, se deshidrató sumergiendo el portaobjetos sucesivamente en etanol 50% por 3 min, en etanol 80% por 3 min y en etanol 100% por 3 min. Se dejó secar a temperatura ambiente.

#### **14.2.2 Hibridación con sondas marcadas**

Se colocaron 9 µl de mezcla de hibridación (8 µl de *buffer* de hibridación y 1 µl de sonda de 25 ng/µl) sobre cada preparado y se incubó durante 2 hs en cámara húmeda, a 46°C en horno de hibridación. La cámara húmeda consistió en un tubo de 50 ml conteniendo papel Whatman embebido en el *buffer* de hibridación.

#### **14.2.3 Lavados**

Los portaobjetos fueron sumergidos en el *buffer* de lavado correspondiente durante 20 min a 46°C. Se enjuagó con agua y se dejó secar en oscuridad.

#### **14.2.4 Tinción con DAPI**

Se colocaron sobre cada muestra 5 µl de solución de DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) 1 ng/µl y se incubó por 5 min en oscuridad. Se lavó con etanol 80%, se enjuagó con agua y se dejó secar.

#### **14.2.5 Montaje y visualización**

Los preparados fueron montados con glicerol 100%. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia Olympus con un aumento de 1000X, por medio de los filtros correspondientes para Cy3 o DAPI.

El recuento de células fue realizado con la ayuda del programa *Gene Tools* (SynGene), utilizando la opción *Colony*. Se ajustaron los niveles de sensibilidad y se calculó el porcentaje de cada bacteria en relación al número total de células detectadas por DAPI.

## **ANEXO I: Soluciones utilizadas**

### *Extracción de Ácidos Nucleicos*

*Buffer* TE: Tris-HCl 10 mM pH 8, Na<sub>2</sub>EDTA 1mM (pH 8)

*Buffer* TENP (pH 7,6): Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 10mM, polivinilpirrolidona (PVP) 1% p/v

Acetato de Sodio 3M, se llevó a pH 5,2 con ácido acético 3M

Solución de CTAB: Bromuro de cetiltrimetil amonio 10% en NaCl 0,7M

### *Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante*

Solución 40% (para 12 ml): 2,5 ml de solución de Acrilamida:Bisacrilamida 37:1, 4,8 ml de solución de Urea 7M-Formamida 40%, 0,24 ml de TAE 50X, 4,46 ml de H<sub>2</sub>O, 125 µl de APS (persulfato de amonio) 10% p/v, 3 µl de Temed.

Solución 65 % (para 12 ml): 2,5 ml de solución de Acrilamida:Bisacrilamida 37:1, 7,8 ml de solución de Urea 7M-Formamida 40%, 0,24 ml de TAE 50X, 1,46 ml de H<sub>2</sub>O, 125 µl de APS (persulfato de amonio) 10% p/v, 3 µl de Temed.

TAE 50X (pH 8,5): Tris base 242 g, Ácido acético glacial 57,1 ml, Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O 37,2 g, en 1 l de H<sub>2</sub>O

### *Preparación de ADN plasmídico*

Solución I: Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM

Solución II: NaOH 0,2 N, SDS 1% p/v

Solución III: acetato de potasio 3M, ácido acético glacial 11% v/v

### *Medición de fenol*

Solución de amonio: 3,5 ml de amonio concentrado (25%) en 100 ml de H<sub>2</sub>O

*Buffer* fosfato de potasio (pH 6,8): 10,45 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7,23 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 100 ml de H<sub>2</sub>O

Solución de 4 aminoantipirina: 0,4 g en 20 ml de H<sub>2</sub>O

Solución de hexacianoferrato (III) de potasio: 1,6 g en 20 ml de H<sub>2</sub>O

*Fluorómetro*

*Buffer* TNE 10X (pH 7,4): Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, NaCl 2M

Solución de Hoescht 10000X : 1 mg en 1 ml de H<sub>2</sub>O

*Hibridación in situ fluorescente (FISH)*

Solución de fijado: paraformaldehído 4% pH 7,2.

*Buffer* PBS 10X (pH 7,3): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> -7H<sub>2</sub>O 4,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM.

*Buffer* de Hibridación: NaCl 0,9M, Tris-HCl 20mM pH 7,2, SDS 0,1%, formamida según tabla 4.

*Buffer* de lavado: Tris-HCl 20 mM pH 7,2, SDS 0,1%, NaCl según tabla 4.

## **ANEXO II: Medios de cultivo utilizados**

### *Alimento sintético (según normas ISO 9887):*

Peptona 160 mg/l, Extracto de carne 110 mg/l, Urea 30 mg/l, NaCl 7 mg/l, CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O 4 mg/l, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 2 mg/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 28 mg/l (pH 7 - 7,5)

### *Medio de cultivo LB:*

Extracto de levadura 5 g/l, Peptona 10 g/l, NaCl 10g/l (agar 12 g/l)

### *Medio de cultivo R2A:*

Extracto de levadura 0,5 g/l, Peptona 0,5 g/l, Casaminoácidos 0,5 g/l, Dextrosa 0,5 g/l, Almidón soluble 0,5 g/l, Piruvato de sodio 0,3 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 g/l, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0,05 g/l (agar 12 g/l)

### *Medio de cultivo YT (pH 7,2):*

Peptona 16 g/l, Extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l

### *Medio de cultivo SOB (pH 7):*

Peptona 2%, Extracto de levadura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1M 10 ml/l

### *Medio de cultivo SOC (pH 7):*

Peptona 2%, Extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 10 mM, Glucosa 20 mM

### *Medio de cultivo MP:*

CaCl<sub>2</sub> 0,01 g/l, FeCl<sub>3</sub> 0,02 g/l, NaCl 0,1 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,75 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,25 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g/l, MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0,2 g/l (agar 12 g/l, solución de elementos traza 50 µl/l).

*Medio de cultivo LU:*

KNO<sub>3</sub> 9,14 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/l, KCl 0,1 g/l, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0,5 g/l, CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O 0,01 g/l, FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0,012 g/l, Extracto de levadura 1 g/l (agar 12 g/l, solución de elementos traza 50 µl/l).

*Medio de cultivo Hierro III (pH 7):*

NaHCO<sub>3</sub> 2,5 g/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O 0,6 g/l, NH<sub>4</sub>Cl 0,25 g/l, KCl 0,1 g/l, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0,03 g/l, NaCl 0,01 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0,001 g/l I (agar 12 g/l). Se agregaron 100 mmoles/l de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y 20 µl/l de solución de elementos traza.

*Solución de elementos traza:*

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,26 g/l, CuSO<sub>4</sub> 0,264 g/l, MnSO<sub>4</sub> 0,452 g/l, MoNa<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0,06 g/l, ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0,7 g/l.

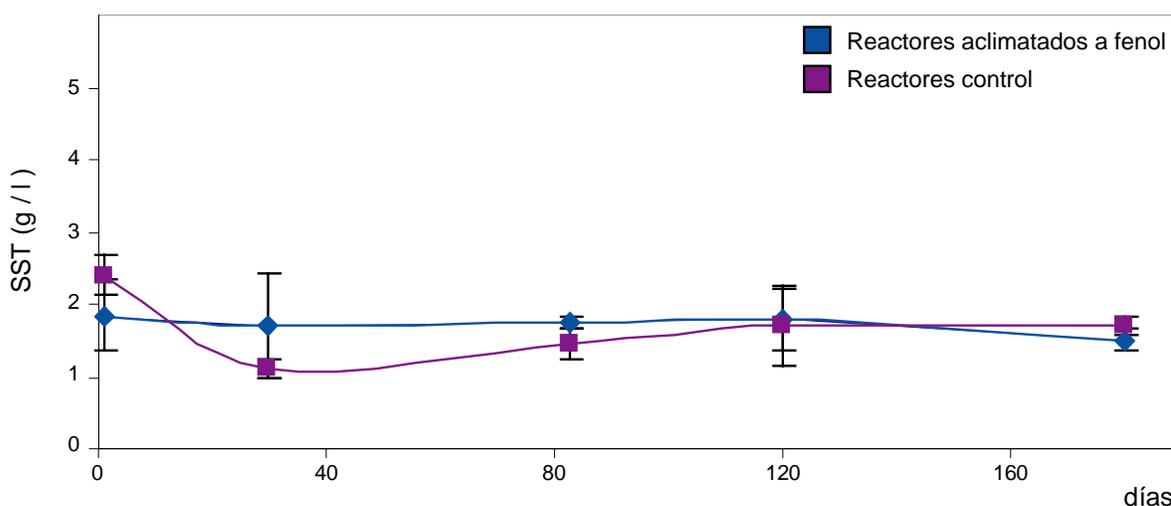
## RESULTADOS

### PARTE 1. Análisis de la diversidad de un gen funcional y su relación con la actividad de degradación

Durante la primera parte del trabajo se realizó la caracterización del sistema de barros activados a escala de laboratorio: se establecieron cuatro reactores de 800 ml de volumen útil cada uno. Luego de 30 días de aclimatación a las condiciones de laboratorio y a la alimentación con medio sintético, dos de ellos comenzaron a recibir adicionalmente 100 mg de fenol por día en el alimento, mientras que los dos restantes fueron mantenidos como controles. Luego de 5 meses de operación (día 198) se interrumpió el agregado de fenol (figura 8).

#### 1.1 Funcionamiento de los reactores

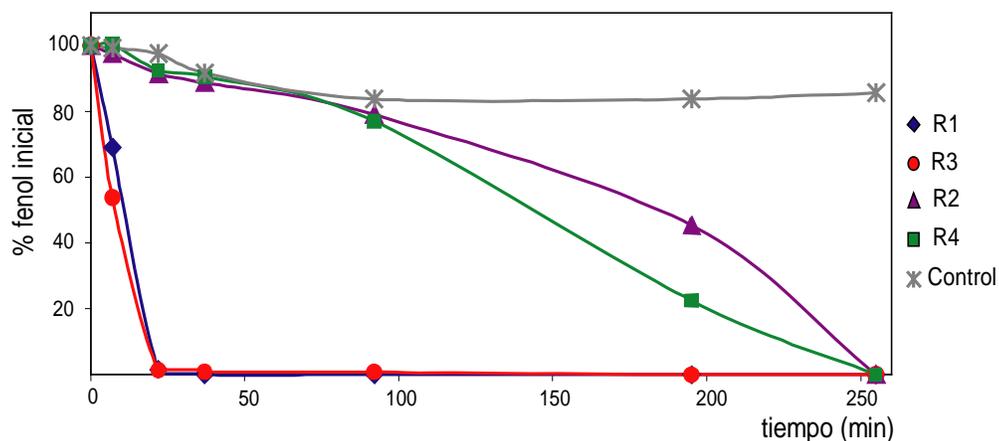
Luego de un descenso inicial, durante el resto del período analizado la cantidad de biomasa se mantuvo relativamente estable en los reactores tratados y control, con valores de SST (sólidos suspendidos totales) entre 1,5 y 1,8 g/l (figura 10). No se detectó turbidez en el efluente. La concentración de fenol en el sobrenadante de los reactores se encontró siempre por debajo del límite de detección de 10 µg/l, indicando un buen funcionamiento del sistema.



**Figura 10.** Sólidos suspendidos totales en función del tiempo de operación de los reactores. Las barras de error representan la desviación estándar de las réplicas.

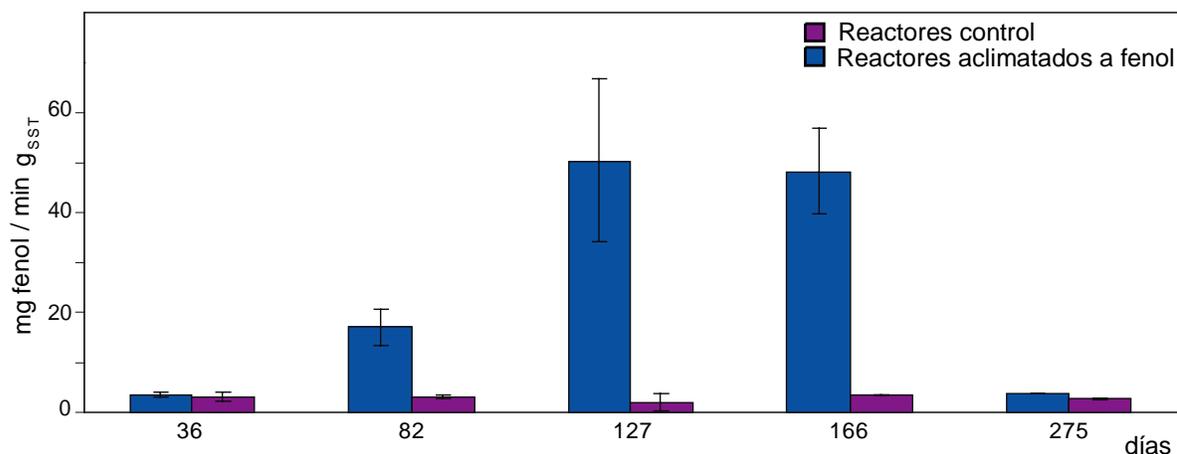
## 1.2 Degradación de fenol por los barros activados

Se determinaron las velocidades de degradación de fenol a partir de ensayos realizados sobre muestras extraídas de los reactores. Como ejemplo, en la figura 11 se muestra una curva representativa para muestras provenientes de los cuatro reactores y de un control de barro autoclavado, correspondiente a los 127 días de operación.



**Figura 11.** Curva representativa de los ensayos de degradación de fenol para los 4 reactores y un control de barro autoclavado, correspondiente a los 127 días de operación.

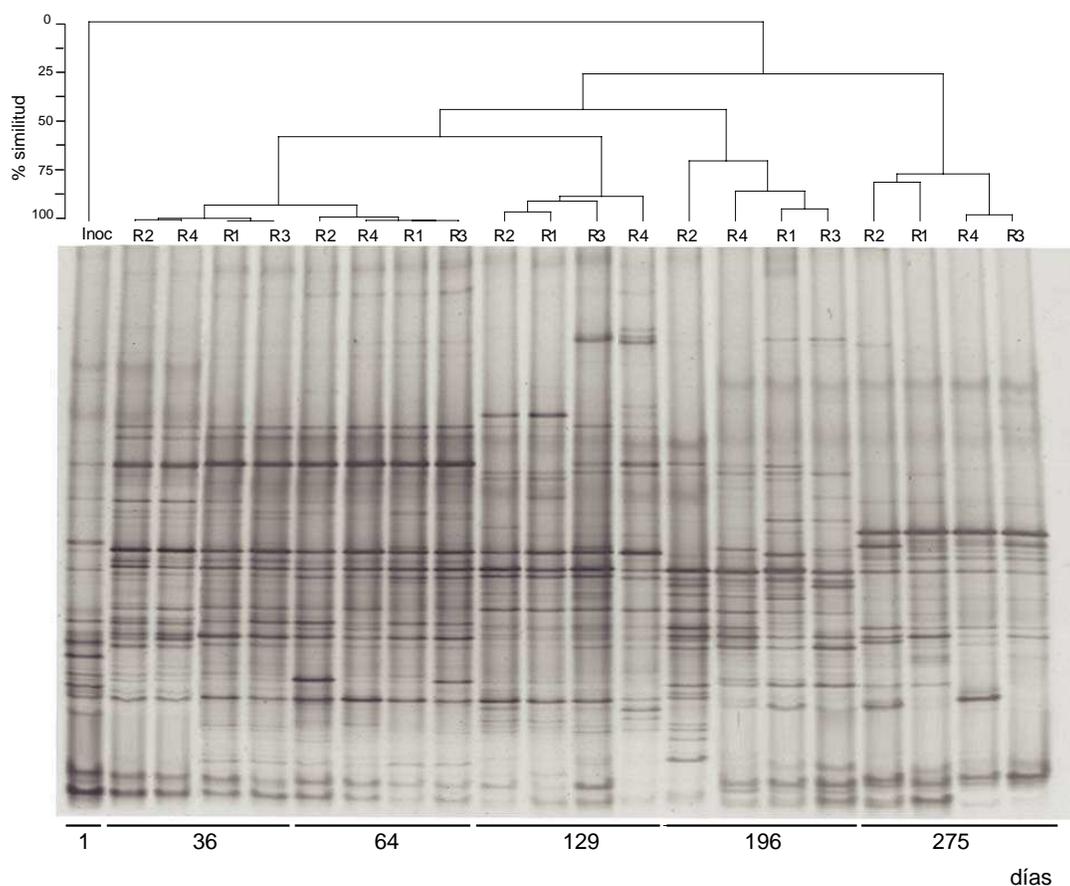
Este experimento se realizó con muestras provenientes de los reactores tratados y control a lo largo de todo el período de estudio. Los barros activados de los reactores aclimatados a fenol mostraron un aumento de 4 veces en la velocidad de degradación, comparado con los reactores control, luego de aproximadamente un mes y medio de tratamiento (figura 12, día 82). Estos resultados indican que la capacidad de degradar fenol se ve afectada por la aclimatación al fenol. Las velocidades iniciales de degradación en los reactores tratados alcanzaron valores más de 10 veces mayores que los controles luego de 4 meses de operación (figura 12, días 127 y 166). Este efecto se revirtió al suspender la alimentación con fenol (día 198), observándose luego de dos meses de operación una velocidad de degradación típica de los controles para todos los reactores (figura 12, día 275).



**Figura 12.** Velocidad de degradación de fenol a distintos tiempos de operación (ensayos en batch). Al día 198 se suspende el agregado de fenol al alimento. Las barras de error representan la desviación estándar de las réplicas.

### 1.3 Estructura de las comunidades bacterianas de los barros activados

La dinámica de las poblaciones bacterianas de los barros activados de los cuatro reactores fue monitoreada por RT-PCR-DGGE del dominio V3 del ARN ribosomal 16S. Se observa que los perfiles de las comunidades bacterianas cambian considerablemente durante el tiempo muestreado, revelando un comportamiento dinámico. El análisis de *clusters* muestra que los perfiles del DGGE agrupan por tiempo y no por tratamiento (figura 13), por lo tanto los cambios no parecen estar relacionados con el agregado de fenol, dado que se dieron de modo similar en todos los reactores, independientemente del tipo de alimento. Por lo tanto, dado que no se observaron bandas que pudieran ser relacionadas con el tratamiento, no se seleccionó ninguna banda para recortar y secuenciar. Para cada tiempo, los perfiles entre reactores mostraron cierta variabilidad, dado que fueron similares pero no idénticos.



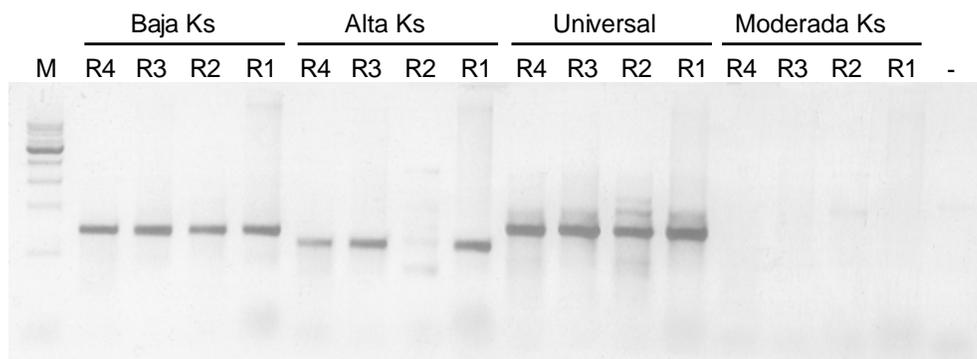
**Figura 13.** DGGE de 200 pb del ARNr 16S a distintos tiempos de operación y análisis de *clusters* resultante. Inoc: inóculo original, R2 y R4: reactores control, R1 y R3: reactores aclimatados a fenol.

Para evaluar si existían diferencias entre el ADN y el ARN ribosomal en cuanto a los perfiles de las comunidades, se realizaron DGGEs tomando como material de partida para la amplificación el ADN y el ARN de los reactores, extraídos en forma paralela. Los perfiles obtenidos fueron muy similares, por lo tanto se descartó la posibilidad de que estuvieran ocurriendo cambios en las comunidades que no pudieran ser detectados debido a que las poblaciones involucradas contuvieran bajos niveles de ARN ribosomal.

#### 1.4 Detección de genes LmPH en las comunidades de los barros activados

A modo preliminar del análisis de la diversidad funcional, se evaluó por PCR la presencia de los genes LmPH en las comunidades de los reactores; se utilizaron *primers* LmPH universales y *primers* correspondientes a los grupos de alta, moderada y

baja  $K_S$ . Se observó amplificación en el caso de los genes LmPH de baja y alta  $K_S$  en los cuatro reactores; no se detectaron genes de moderada  $K_S$  en ninguno de los reactores (figura 14).

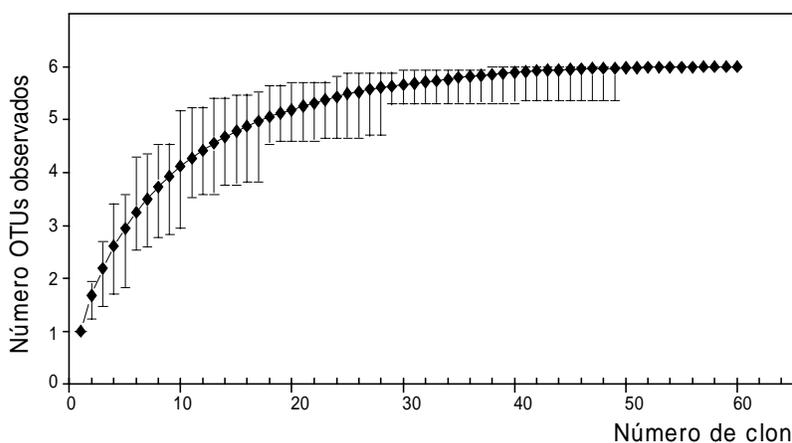


**Figura 14.** Amplificación por PCR de las distintas clases LmPH. R1 a R4: reactores 1 a 4, - : control negativo con *primers* universales, M: marcador de PM (400 pb, PBL).

### 1.5 Construcción de bibliotecas del gen LmPH y análisis filogenético

Con los sistemas funcionando en forma estable, luego de cinco meses de operación se procedió a construir una biblioteca de un fragmento del gen que codifica para la subunidad mayor de la enzima fenol hidroxilasa multicomponente (LmPH). Se eligió el tiempo correspondiente a la máxima actividad de degradación de fenol (figura 12). Se utilizó ADN genómico de los barros activados de ambos reactores aclimatados al fenol como molde para una PCR con *primers* universales para los genes LmPH (Phe UF, Phe UR).

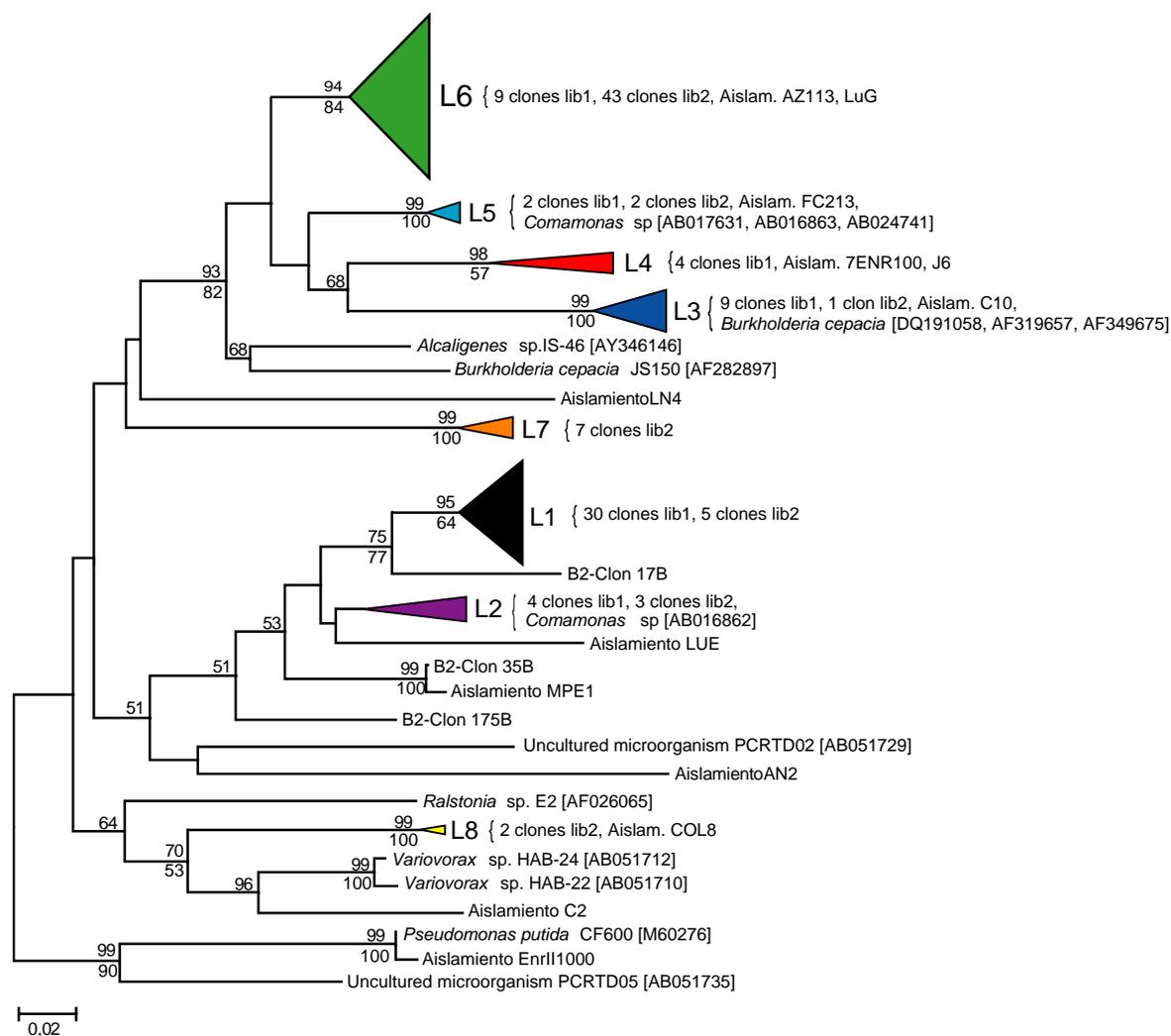
Se obtuvieron en total 59 secuencias de aproximadamente 470 pb (30 secuencias provenientes del reactor 1 y 29 del reactor 3, que se analizaron conjuntamente). En la figura 15 se muestra la curva de rarefacción resultante para una distancia genética de 0,11. No se detectaron secuencias únicas para esta distancia genética. Este resultado sugiere que el esfuerzo de muestreo fue suficiente para lograr un adecuado nivel de cobertura de la biblioteca.



**Figura 15.** Curva de rarefacción obtenida para una distancia genética de 0,11.

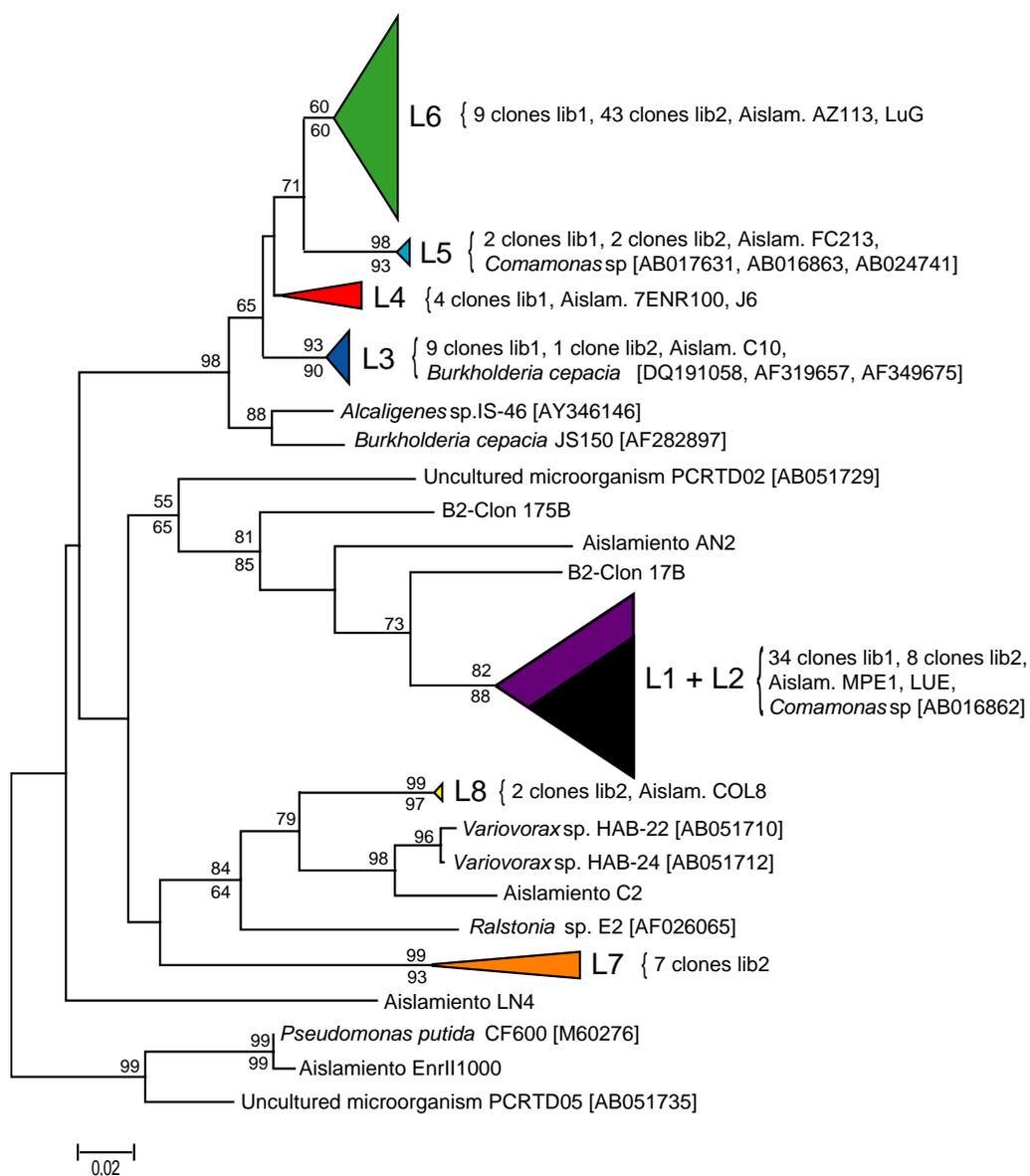
Las secuencias aminoacídicas derivadas presentaron los residuos D y P (ácido aspártico y prolina) característicos en las posiciones 253-254 (numeración del gen DmpN de *Pseudomonas* sp CF600 (Nordlund et al., 1990), indicando que todos los clones analizados pertenecían al grupo cinético de baja constante de saturación media ( $K_S$ ) en la ecuación de Haldane (Futamata et al., 2001). El análisis filogenético de las secuencias indicó que los barros activados presentaban una elevada diversidad de estos genes. Utilizando el programa DOTUR, las secuencias fueron asignadas a OTUs, quedando definidos 6 grupos con una distancia genética de 0,11. Los grupos L1, L2 y L4 contenían secuencias provenientes de ambos reactores, los grupos L3 y L5 sólo contenían representantes del reactor 1, y el L6 sólo del reactor 3 (figuras 18 a 23). Cerca del 50 % de los clones pertenecían al grupo L1.

Los árboles filogenéticos que se muestran en las figuras 16 y 17 fueron construidos a partir del análisis conjunto de las secuencias de las bibliotecas preparadas en la primera (a los 196 días de operación, con una carga de 100 mg/d de fenol) y en la segunda parte del trabajo (a los 56 días de operación, correspondiente a una carga de 1000 mg/d de fenol, ver figura 8 en materiales y métodos). Se incorporaron además secuencias LmPH de referencia obtenidas del GenBank y las secuencias de las bacterias aisladas durante la tercera parte del trabajo. El agrupamiento de las secuencias en las clases L1 a L8 corresponde a los grupos definidos por DOTUR. Las secuencias obtenidas en esta parte del trabajo se ubican en los grupos L1 a L6.



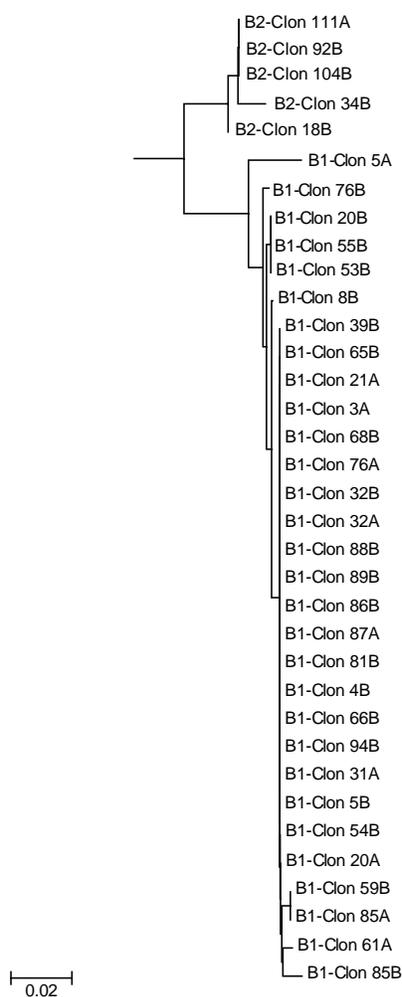
**Figura 16.** Árbol filogenético construido a partir de las secuencias nucleotídicas de las bibliotecas del gen LmPH. lib1, *library* construída en la primera parte; lib2, *library* construída en la segunda parte. Se indican los ocho grupos resultantes y los valores de *bootstrap* correspondientes a los métodos de *Neighbour Joining* (arriba) y Parsimonia (abajo). La barra representa el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. Excepto por las secuencias M60276 y EnrII1000 (moderada  $K_S$ ) y AB051735 (alta  $K_S$ ), todas las secuencias corresponden al grupo de baja  $K_S$  de la enzima.

A pesar de la heterogeneidad observada en las secuencias nucleotídicas, los genotipos L1 y L2 resultaron agrupados conjuntamente a nivel proteico, considerando para la asignación a los grupos un límite de similitud del 10% entre las secuencias aminoacídicas deducidas.

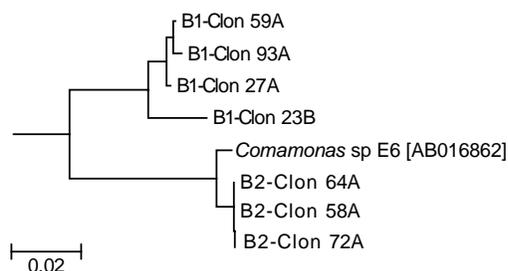


**Figura 17.** Árbol filogenético construido a partir de las secuencias aminoacídicas de las bibliotecas del gen LmPH. lib1, *library* construída en la primera parte; lib2, *library* construída en la segunda parte. Se indican los ocho grupos resultantes y los valores de *bootstrap* correspondientes a los métodos de *Neighbour Joining* (arriba) y Parsimonia (abajo). La barra representa el número de sustituciones de aminoácidos por sitio. Excepto por las secuencias M60276 y EnrII1000 (moderada  $K_S$ ) y AB051735 (alta  $K_S$ ), todas las secuencias corresponden al grupo de baja  $K_S$  de la enzima.

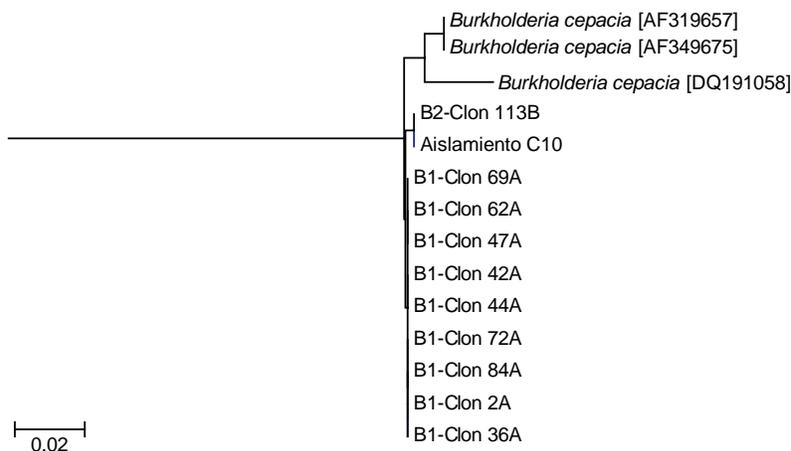
En las figuras 18 a 23 se muestran en detalle las ramas correspondientes a los grupos L1 a L6, basadas en las secuencias nucleotídicas. El grupo L1 quedó conformado por 30 clones provenientes de las bibliotecas construidas en esta parte del trabajo y 4 clones de las bibliotecas de la segunda parte. El grupo L2, por 4 clones de la primera y 4 de la segunda. El grupo L3, por 9 clones de la primera y 1 de la segunda. El grupo L4 sólo contenía representantes de la biblioteca construida en la primera parte. El grupo L5 contenía 2 clones de la primera y 1 de la segunda. El grupo L6 quedó conformado por 9 clones de la primera y 43 de la segunda parte.



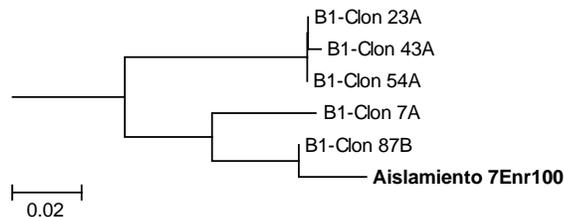
**Figura 18.** Detalle de la rama correspondiente al grupo L1. B1 y B2: secuencias provenientes de las bibliotecas construidas en la primera o en la segunda parte del trabajo. A y B: secuencias provenientes de los reactores 1 y 3, respectivamente.



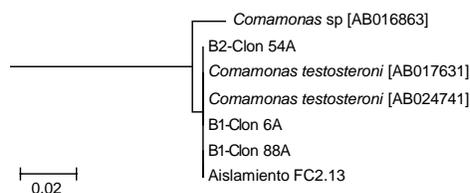
**Figura 19.** Detalle de la rama correspondiente al grupo L2. B1 y B2: secuencias provenientes de las bibliotecas construidas en la primera o en la segunda parte del trabajo. A y B: secuencias provenientes de los reactores 1 y 3, respectivamente.



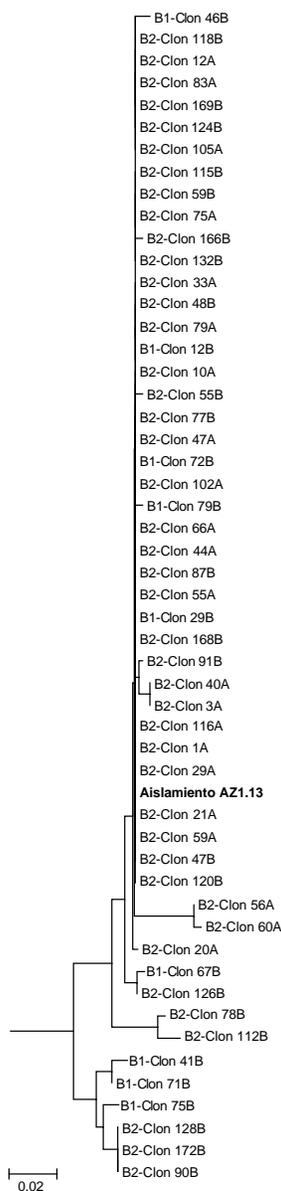
**Figura 20.** Detalle de la rama correspondiente al grupo L3. B1 y B2: secuencias provenientes de las bibliotecas construidas en la primera o en la segunda parte del trabajo. A y B: secuencias provenientes de los reactores 1 y 3, respectivamente.



**Figura 21.** Detalle de la rama correspondiente al grupo L4. B1: secuencias provenientes de las bibliotecas construidas en la primera parte del trabajo. A y B: secuencias provenientes de los reactores 1 y 3, respectivamente.



**Figura 22.** Detalle de la rama correspondiente al grupo L5. B1 y B2: secuencias provenientes de las bibliotecas construidas en la primera o en la segunda parte del trabajo. A y B: secuencias provenientes de los reactores 1 y 3, respectivamente.



**Figura 23.** Detalle de la rama correspondiente al grupo L6. B1 y B2: secuencias provenientes de las bibliotecas construidas en la primera o en la segunda parte del trabajo. A y B: secuencias provenientes de los reactores 1 y 3, respectivamente.

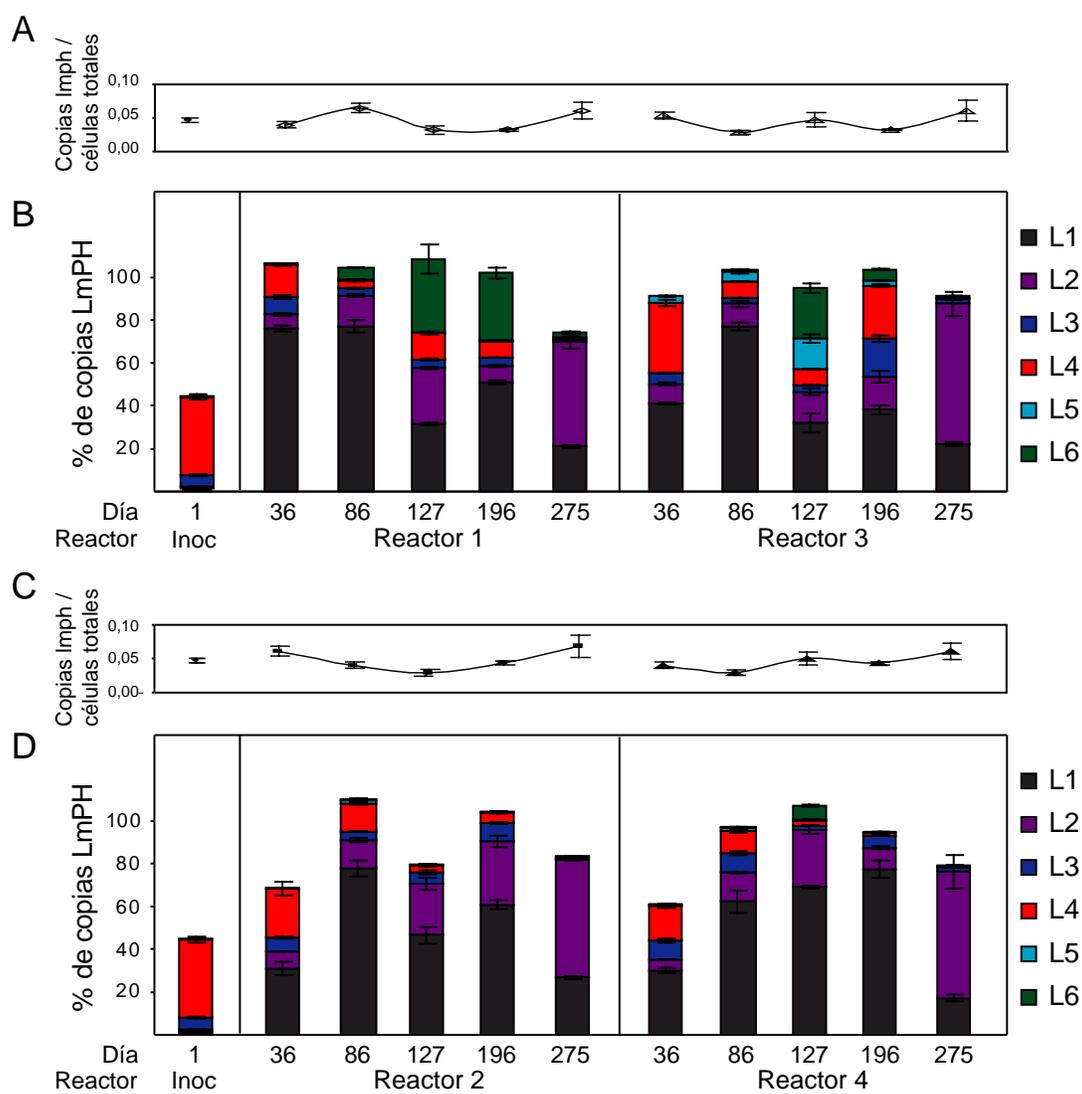
## 1.6 Cuantificación de las variantes genéticas LmPH por ensayos de PCR en tiempo real

Con el objetivo de analizar cuantitativamente la dinámica de los genes LmPH en los reactores, se diseñaron en base a las secuencias obtenidas, *primers* específicos para cada uno de los 6 grupos detectados en la biblioteca 1 (tabla 2A). Se realizó la puesta a punto de un sistema de PCR en tiempo real para la detección cuantitativa del gen LmPH con los *primers* universales (PheUf -PheUr), los de alta  $K_s$  (PheUf-PheHr) y los distintos *primers* diseñados.

Los *primers* correspondientes a los grupos L1, L3 y L5 mostraron ser suficientemente específicos en las condiciones de amplificación establecidas. En el caso de los grupos L2, L4 y L6 fue necesario el uso de dúplex de *primers* para eliminar la amplificación inespecífica (ver materiales y métodos sección 11.1). De este modo todos los sets de *primers* mostraron en los ensayos de especificidad al menos aproximadamente 3 órdenes de magnitud de diferencia en el número de copias detectadas entre el clon específico y el clon inespecífico más similar partiendo de la misma cantidad de templado ( $10^6$  copias/tubo). Teniendo en cuenta las cantidades en que estos genes se encontraban en las muestras de ADN de los reactores, el aporte de la señal inespecífica resulta despreciable. No se detectó amplificación en los controles negativos.

El número de copias LmPH detectado mediante la suma de los distintos sets de *primers* específicos no fue significativamente diferente del obtenido en el ensayo con *primers* LmPH universales ( $p > 0,05$ ), excepto para la muestra proveniente de la planta de tratamiento utilizada como inóculo original, donde aproximadamente la mitad de los genes LmPH no fueron detectados con los *primers* diseñados.

Se encontró que a lo largo de 9 meses de operación, el número de copias totales del gen LmPH no cambió significativamente en los reactores ( $p > 0,05$ ) (figura 24 A y C). Este número representa entre el 2,9 y el 6,8 % de las células totales, las cuales fueron determinadas en ensayos de PCR en tiempo real con *primers* universales para bacterias. En cambio la cantidad de cada grupo L1 a L6 fue altamente variable: el agregado de fenol habría inducido un aumento en la abundancia de los genes LmPH de los grupos minoritarios L3, L4, L5 y L6 (figura 24 B).



**Figura 24.** Cuantificación por PCR en tiempo real de los genes LmPH en cada reactor a distintos tiempos de operación. A,C: Número de copias totales LmPH por número de células totales. B,D: Abundancia relativa de los grupos LmPH a distintos tiempos de operación. Inoc: inóculo original, Reactores 1 y 3: reactores aclimatados a fenol, Reactores 2 y 4: reactores control. Las barras de error representan la desviación estándar de las réplicas.

A partir de los datos de abundancia, se calculó el índice de Shannon para cada reactor y en cada tiempo, con el objetivo de evaluar el efecto del agregado de fenol sobre la diversidad de los genes LmPH. Se encontró que la diversidad aumentó significativamente entre los días 127 y 196 en ambos reactores aclimatados al fenol

(tabla 5). Este efecto se revirtió al suspender la alimentación con fenol, encontrándose abundantes sólo los grupos L1 y L2 en todos los reactores (figura 24, día 275).

Día	Reactor 2	Reactor 4	Reactor 1	Reactor 3	p
36	1,11 ± 0,03	1,08 ± 0,03	0,93 ± 0,04	1,15 ± 0,02	0,864
86	0,95 ± 0,08	1,10 ± 0,07	0,90 ± 0,05	0,92 ± 0,07	0,456
127	0,98 ± 0,05	0,98 ± 0,03	1,49 ± 0,03	1,56 ± 0,05	<b>0,003</b>
196	1,05 ± 0,04	0,68 ± 0,09	1,25 ± 0,04	1,56 ± 0,10	<b>0,003</b>
275	0,79 ± 0,01	0,74 ± 0,08	0,86 ± 0,02	0,77 ± 0,07	0,690

**Tabla 5.** Índice de diversidad de Shannon para los genes LmPH a distintos tiempos de operación. Los errores fueron determinados por propagación de errores. El análisis estadístico corresponde a un ANOVA de medidas repetidas.

## **PARTE 2. Análisis del efecto sobre la capacidad funcional y la dinámica de las principales poblaciones que degradan fenol en respuesta a un aumento en la concentración de fenol**

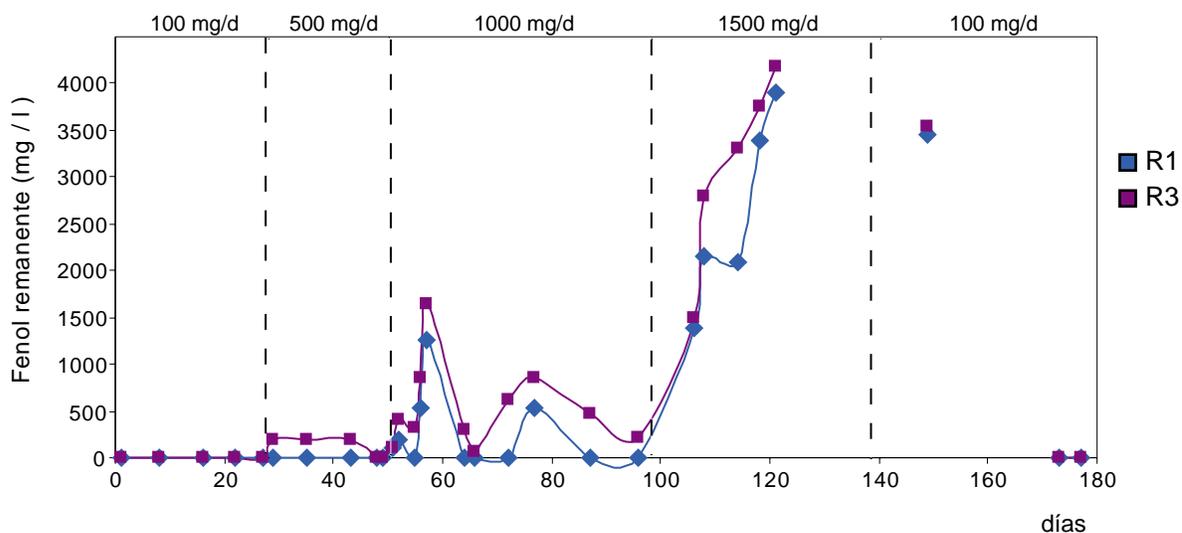
El segundo objetivo planteado consistió en analizar el efecto sobre el funcionamiento y la composición de la comunidad en respuesta a un aumento en la carga de fenol en el alimento. Partiendo de una concentración basal de 100 mg fenol/día/reactor, se aumentó escalonadamente el contenido de fenol en el alimento hasta desestabilizar funcionalmente el sistema (1500 mg/día/reactor). Posteriormente se volvió a alimentar a los reactores con la concentración basal de fenol (100 mg/día). Durante todo el período se mantuvieron dos reactores con 100 mg de fenol /día (controles) (ver figura 8).

### **2.1 Funcionamiento de los reactores**

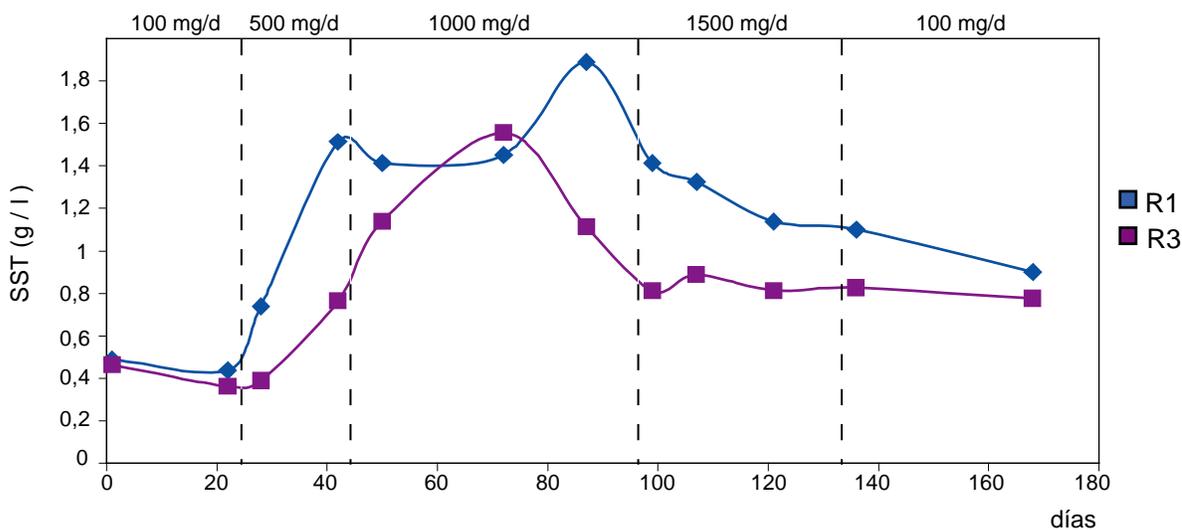
El funcionamiento de los reactores se evaluó por mediciones de biomasa (sólidos suspendidos totales, SST) y de fenol no degradado en el sobrenadante.

Mientras los reactores operaron con bajas cargas, el fenol fue degradado eficientemente; al agregar 1 g/d se observaron inicialmente altos niveles de fenol, que luego fueron eliminados. Sin embargo, con una carga diaria de 1,5 g el fenol no pudo ser degradado y se fue acumulando en el sobrenadante de los reactores. Luego de 30 días de retornar a un alimento con 100 mg de fenol por día los sistemas recuperaron la capacidad de degradación, no detectándose fenol en el sobrenadante (figura 25).

La concentración de biomasa varió considerablemente en función de la carga de fenol del alimento, con valores de SST entre 0,4 y 1,9 g/l (figura 26). Al operar con una concentración de fenol de 1000 mg/d, se evidenciaron problemas en la capacidad de floculación de los barros, observándose turbidez en el sobrenadante. La cantidad de SST determinada sobre el sobrenadante de los reactores tratados presentó durante este período valores de entre 0,17 y 0,19 g/l. Al aumentar la concentración de fenol a 1500 mg/día, el sobrenadante de los reactores ya no presentó turbidez pero contenía altos niveles de fenol (figura 26), indicando que la función de degradación de los microorganismos había sido desestabilizada.



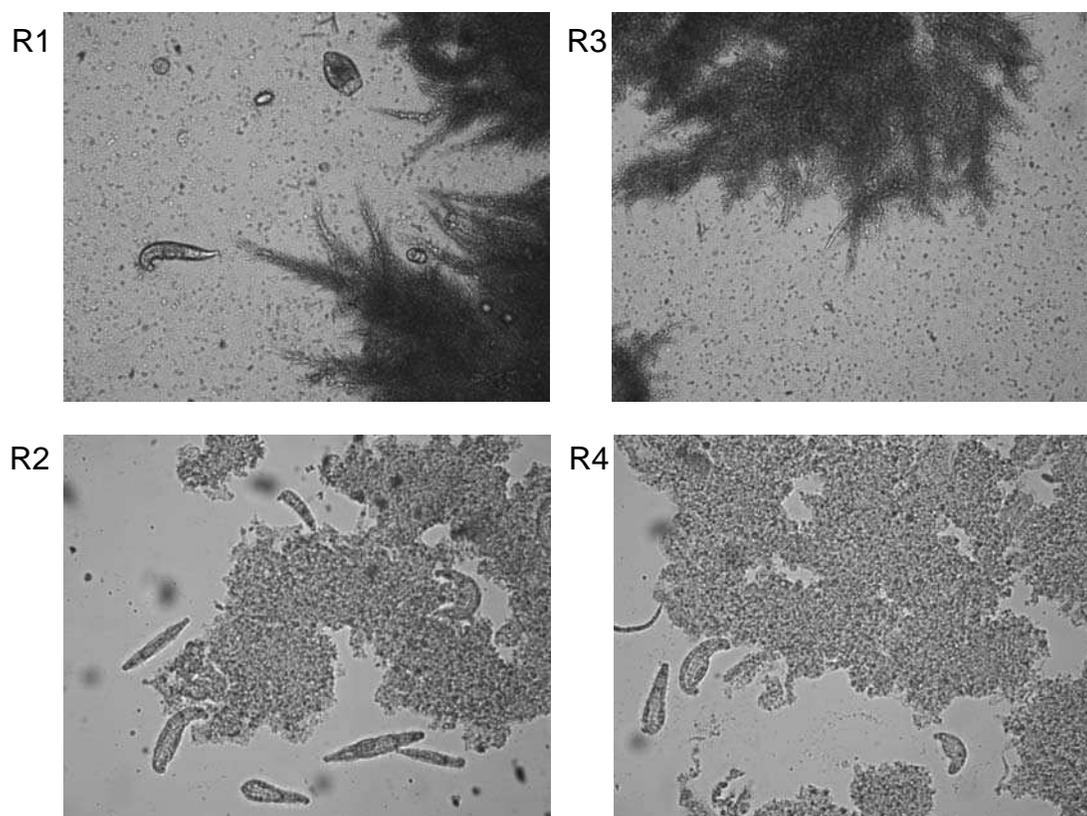
**Figura 25.** Determinación de fenol en el sobrenadante de los reactores tratados en función del tiempo de operación. Se indican las cantidades de fenol agregadas diariamente en el alimento.



**Figura 26.** Sólidos suspendidos totales en función del tiempo de operación de los reactores 1 y 3. Se indican las cantidades de fenol agregadas diariamente al alimento.

Las características de los flocs de los barros activados expuestos a distintas cargas de fenol se analizaron por observación al microscopio. En la figura 27 se muestran fotografías representativas para los reactores tratados y control a un tiempo correspondiente a una carga de fenol de 1000 mg/d. Se observó que los barros activados de los reactores tratados presentaban muchas células suspendidas, flocs con

bordes poco definidos y menor cantidad de rotíferos, en comparación con los barros de los reactores control. Esta observación, que se corresponde con la presencia de turbidez en el sobrenadante de los reactores tratados y el menor número de rotíferos podrían sugerir un efecto tóxico del fenol sobre los microorganismos.

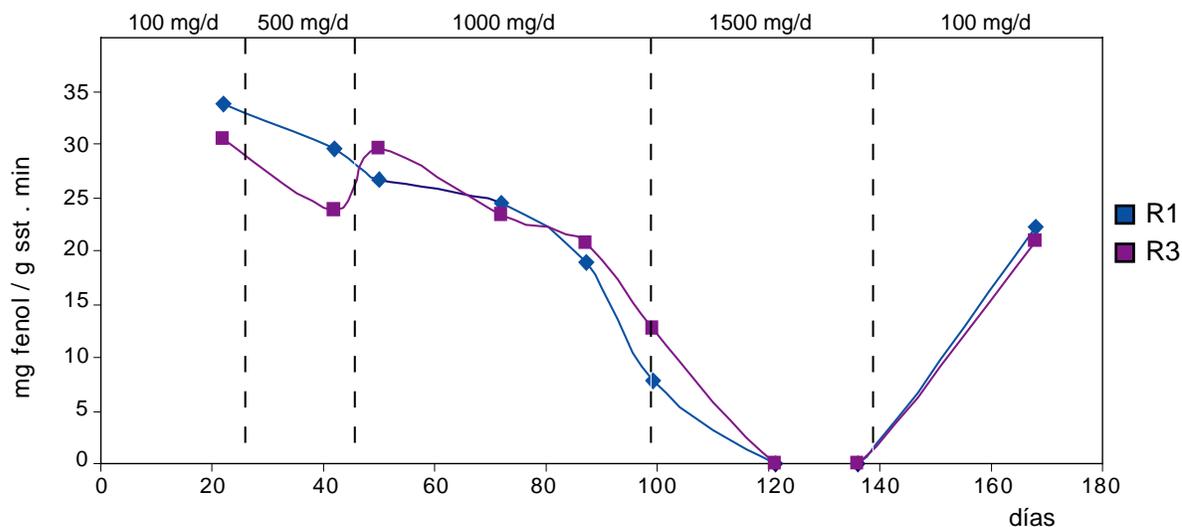


**Figura 27.** Microfotografías representativas de los barros activados de los reactores a un tiempo correspondiente a una carga de fenol de 1 g/día, tomadas con luz visible a un aumento de 10X. R1 y R3: reactores tratados, R2 y R4: reactores control.

## 2.2 Degradación de fenol por los barros activados

Las velocidades iniciales de degradación de fenol se determinaron mediante ensayos en batch incubando los barros activados con 20 mg/l de fenol inicial. Las comunidades degradaron inicialmente el fenol a una velocidad de alrededor de 30 mg/g<sub>SST</sub>.min; se observó una disminución en la velocidad en los tiempos correspondientes a una

descarga de fenol de 1 g/d en el alimento, no llegando a detectarse actividad dentro de 6 horas de incubación en los tiempos correspondientes a 1,5 g/d (figura 28).



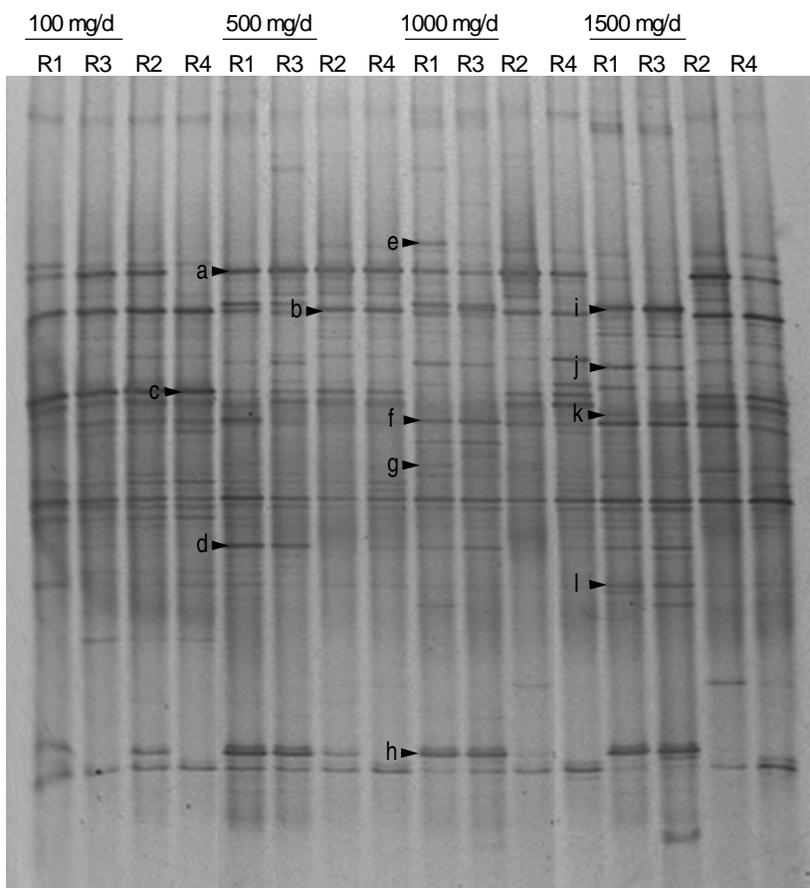
**Figura 28.** Velocidad de degradación de fenol en función del tiempo de operación de los reactores 1 y 3. Se indican las cantidades de fenol agregadas diariamente al alimento.

### 2.3 Estructura de las comunidades bacterianas de los barros activados

En la figura 29 se muestra un gel de gradiente desnaturalizante para los cuatro reactores a tiempos correspondientes a las distintas cargas de fenol en el alimento. Las muestras se tomaron luego de aproximadamente 20 días de cada aumento en la cantidad de fenol.

Los perfiles del DGGE presentaron bandas distintivas entre los reactores expuestos a altas cargas de fenol y los reactores recibiendo la concentración basal de 100 mg/día. Se seleccionaron las bandas más relevantes, es decir aquellas cuya intensidad cambiaba marcadamente según la cantidad de fenol, y se recortaron para su secuenciación. Las bandas *a* y *b* se encuentran presentes en todos los reactores, pero desaparecen en los reactores 1 y 3 cuando la carga de fenol corresponde a 1,5 g/d. Similarmente, la banda *c* aparece en todos los reactores con 100 mg/d, y su abundancia disminuye en los reactores 1 y 3 con el aumento de fenol, no siendo detectada a partir de los 1000 g/d. Las bandas *d*, *e*, *g*, *h*, *i*, *j*, *k* y *l*, en cambio, aumentan su abundancia

relativa en los reactores expuestos a concentraciones de fenol en el alimento superiores a los 100 mg/d. La banda *f* presentó abundancias similares en todos los reactores en todos los tiempos de operación. La asignación filogenética de las secuencias obtenidas se muestra en la tabla 6. Las bandas *a*, *b*, *e* y *g* fueron clasificadas dentro del grupo de los Bacteroidetes; en particular, las bandas *a* y *e* en el orden *Sphingobacteriales*. Las bandas *c*, *d*, *f*, *i*, *j*, y *k*, dentro de las  $\beta$ -Proteobacterias: la banda *k* en la familia *Alcaligenaceae* y el resto en la familia *Comamonadaceae* (las bandas *d* y *j* quedaron ubicadas dentro del género *Comamonas*, la banda *f* dentro del género *Delftia* y la banda *c*, en el género *Simplicispira*). El resto de las bandas secuenciadas correspondieron a  $\alpha$ -Proteobacteria (orden *Rhizobiales*, banda *l*) y *Actinobacteria* (suborden *Corynebacterinae*, orden *Actinomycetales*, banda *h*).



**Figura 29.** Gel de gradiente desnaturalizante del ADNr 16S de los reactores a distintos tiempos de operación, correspondientes a las distintas cargas de fenol en el alimento. R1 y R3: reactores tratados, R2 y R4: reactores control. Se indican las bandas secuenciadas.

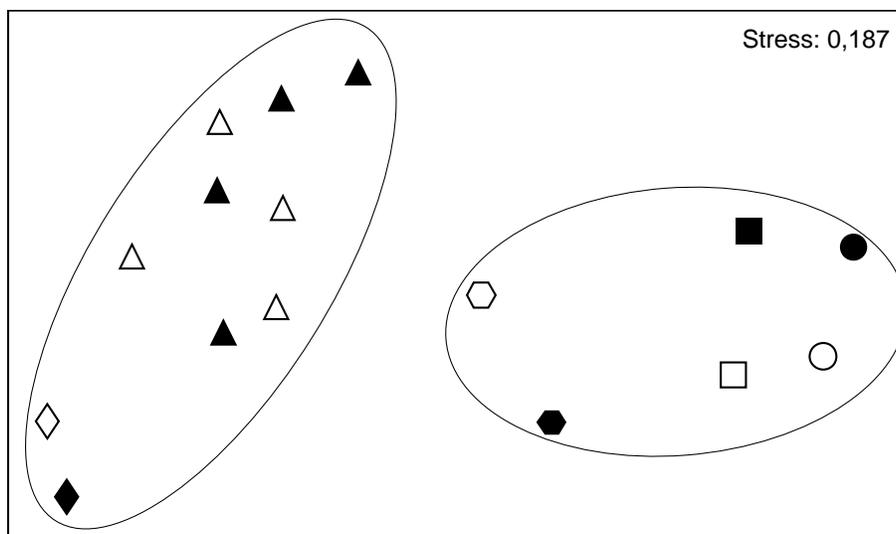
Banda DGGE	Filiación filogenética (RDP II) <sup>1</sup>	Secuencia de mayor similitud (GenBank) <sup>2</sup>	No. acceso GenBank	Identidad
a	<i>Sphingobacteriales</i>	Bacteroidetes no cultivado	FM253021	98% (125/127)
b	Bacteroidetes	Bacteroidetes no cultivado	FJ517722	100% (133/133)
c	<i>Simplicispira</i>	Betaproteobacteria	GU123159	98% (143/145)
d	<i>Comamonas</i>	<i>Comamonas testosteroni</i> GAD4	FJ639332	100% (133/133)
e	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Sphingobacterium</i> sp. GF2B	FJ548749	100% (127/127)
f	<i>Delftia</i>	<i>Delftia</i> sp. LP2MM	GU272362	100% (139/139)
g	Bacteroidetes	Bacteroidetes no cultivado	EF179856	99% (110/111)
h	<i>Corynebacterinae</i>	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> SB 3094	GU191923	100% (129/129)
i	<i>Comamonadaceae</i>	Betaproteobacteria no cult.	FM252654	100% (142/142)
j	<i>Comamonas</i>	<i>Comamonas</i> sp. PG-0	AY566581	100%(123/123)
k	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Alcaligenes</i> sp. C4	AF384197	97% (115/118)
l	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Ochrobactrum</i> sp. ITRH1	FJ013273	97% (118/121)

**Tabla 6.** Análisis de las bandas recortadas del DGGE, realizado en base a secuencias de entre 110 y 145 pb, utilizando el programa *Classifier* en el sitio del RDP II con un nivel de confianza de al menos 80% (<sup>1</sup>) y la función BLASTn en la base de datos del NCBI (<sup>2</sup>).

Se calcularon índices de diversidad de Shannon en base a los perfiles de corrida del DGGE. No se observaron diferencias significativas entre las muestras de los reactores tratados y las de los controles en ninguno de los tiempos correspondientes a las distintas cantidades de fenol ( $p > 0,05$ ); los valores de diversidad para el índice de Shannon variaron entre 3,03 y 3,62.

La similitud entre los perfiles de corrida se analizó mediante un ordenamiento multidimensional (NMDS), teniendo en cuenta la posición e intensidad de las bandas. En la figura 30 se observa que los reactores expuestos a altos contenidos de fenol se

ubicados alejados del resto de los reactores, es decir que presentan perfiles de corrida más diferentes, sugiriendo que existiría un efecto del agregado de fenol sobre la composición de las comunidades bacterianas de los reactores. Se observó además que las réplicas del mismo tratamiento se encontraron ubicadas cerca, mientras que los reactores control se ubicaron más dispersos en el gráfico de ordenamiento.

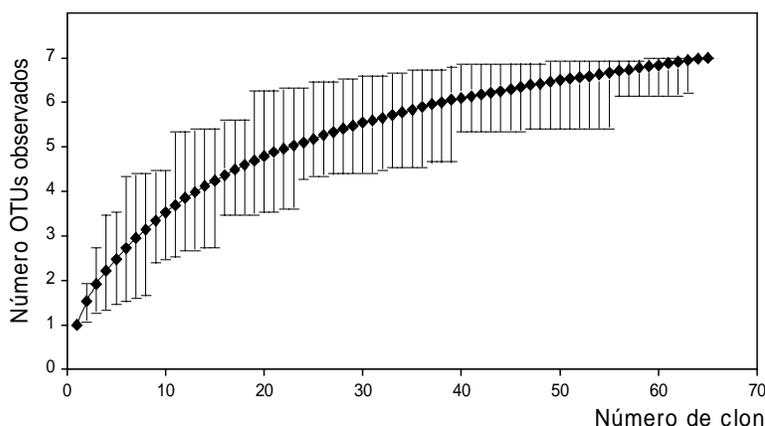


**Figura 30.** Análisis de ordenamiento multidimensional (NMDS). Los perfiles de bandas del DGGE fueron transformados en una matriz de intensidades que se utilizó para el análisis de ordenamiento. Triángulos: reactores control, rombos: reactores 1 y 3 con 100 mg/d, hexágonos: R1 y R3 con 500 mg/d, cuadrados: R1 y R3 con 1000 mg/d, círculos: R1 y R3 con 1500 mg/d. Los símbolos llenos o vacíos corresponden a cada una de las réplicas. Las elipses representan los grupos obtenidos en un análisis de *clusters* con un nivel de corte correspondiente al promedio de la matriz de similitud.

#### 2.4 Construcción de bibliotecas del gen LmPH y análisis filogenético

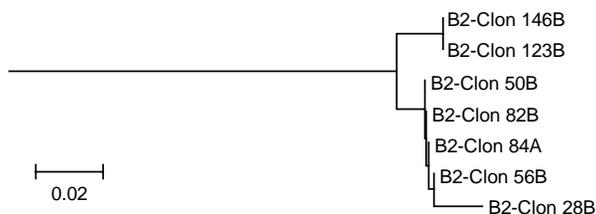
Con el objetivo de conocer la diversidad de las poblaciones capaces de degradar fenol se preparó una nueva biblioteca del fragmento del gen LmPH. En este caso, se utilizó ADN genómico de los barros activados de ambos reactores tratados en un tiempo correspondiente a una descarga de fenol de 1000 mg/l como molde para una PCR con *primers* universales para los genes LmPH (LmPH UF2, 3 y 4 - LmPH UR2).

Se obtuvieron en total 65 secuencias de entre 500 y 600 pb. En la figura 31 se muestra la curva de rarefacción resultante para una distancia genética de 0,11. La cobertura de la biblioteca, determinada según el índice de Good, fue de un 95% para esta distancia genética.

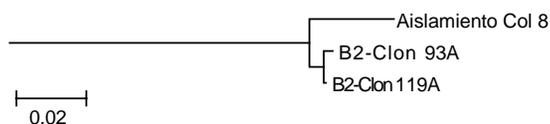


**Figura 31.** Curva de rarefacción para la biblioteca construida a partir de los reactores 1 y 3 a 56 días de operación, correspondiente a una carga de 1000 mg fenol/día/reactor.

Utilizando el programa DOTUR, quedaron definidos 7 grupos con una distancia genética de 0,11, los cuales se muestran en los árboles filogenéticos de las figuras 16 y 17. Con respecto a las bibliotecas preparadas en la primera parte del trabajo (ver figura 8), se detectaron 5 de los 6 grupos (L1, 2, 3, 5 y 6, figuras 18, 19, 20, 22 y 23) y se encontraron 2 nuevos grupos, denominados L7 y L8. Los grupos L2, L5 y L8 sólo contenían secuencias provenientes del reactor 1, el grupo L3, sólo del reactor 3, y los grupos L1, L6 y L7, de ambos reactores. Alrededor del 65% de los clones pertenecían al grupo L6. En las figuras 32 y 33 se muestran en detalle las ramas correspondientes a los nuevos grupos detectados.



**Figura 32.** Detalle de la rama correspondiente al grupo L7. B2: secuencias provenientes de las bibliotecas construidas en la segunda parte del trabajo. A y B: secuencias provenientes de los reactores 1 y 3, respectivamente.



**Figura 33.** Detalle de la rama correspondiente al grupo L8. B2: secuencias provenientes de las bibliotecas construidas en la segunda parte del trabajo. A y B: secuencias provenientes de los reactores 1 y 3, respectivamente.

Las secuencias aminoacídicas derivadas mostraron para los grupos L1 a L6 los residuos característicos del grupo de baja  $K_S$  descrito por Futamata (Futamata et al., 2001), es decir que presentan una D (ácido aspártico) y una P (prolina) en las posiciones 253-254. Con respecto a los dos nuevos grupos detectados en la segunda biblioteca, se encontró que el grupo L8 presentaba además una F (fenilalanina) en la posición 217, típica del grupo de alta  $K_S$ , y una M (metionina) en la posición 118, característica de las cepas de *Variovorax* de baja afinidad por el fenol (Futamata et al., 2005), encontrándose además ubicadas en una misma rama en el árbol filogenético. Por último, el grupo L7 presentó una mezcla de los residuos característicos, con una D típica del grupo de baja  $K_S$  (posición 253) seguida de una E (ácido glutámico), típica de los grupos de media y alta  $K_S$  (figura 34).

115-124	129-150	177-184	214-223	246-258	
GFAHVGRQYP	VACMMQSLDEIRHAQTQIHSLS	SFFDDA <sup>vs</sup>	GAAYNGDMGA	KFILEQ <sup>DP</sup> DNLP <sup>I</sup>	L1
GFAHVGRQFP	VACLMQSLDEIRHAQTQIHSLS	SFFDDAVT	GAAYNGDMGA	KFILEQ <sup>DP</sup> DNLP <sup>I</sup>	L2
GFAHVGRHFT	VACQMQSIDELRHFQTE <sup>MF</sup> HALS	SFFEDAAT	GAAYNGDMST	KFMLEQ <sup>DP</sup> DNVPI	L3
GFAHVGRHFT	VAAQMQSIDELRHCO <sup>TE</sup> ETHALS	SFFEDAAT	GAAHNGDMST	KFMLEQ <sup>DP</sup> ANVPI	L4
GFAHAGRHFT	VAAQMQSIDELRHFQTE <sup>ETHALS</sup>	SFFEDALS	GAAHNGDLST	KFMLEQ <sup>DP</sup> DNVPI	L5
GFAHVGRHFT	VAAQMQSIDELRHFQTE <sup>ETHALS</sup>	SFFEDAMT	GAAHNGDLST	KFMLEQ <sup>DP</sup> ANVPI	L6
HFAHLARHLP	VAAQMQSIDELRHCO <sup>TE</sup> QIHTIS	SFFDDATS	GAAYNGDMAT	RFLLEQ <sup>DE</sup> ANVPI	L7
GYAMAGRNRFR	IASQMQSIDELRHS <sup>OT</sup> QIHTIS	SFFDDAMS	GAA <sup>F</sup> NGDMAT	KFLLEQ <sup>DP</sup> DNLP <sup>I</sup>	L8
GYAMAGRSTIR	VACQMQSIDELRHAQTQFHTIS	SYFEDAMS	GAAYNGDMAT	KFILEQ <sup>DP</sup> DNVPI	<i>Variovorax</i> HAB-22
GFAHAGRHFT	VAAQMQSIDELRHFQTE <sup>ETHALS</sup>	SFFEDALS	GAAHNGDLST	KFMLEQ <sup>DP</sup> DNVPI	<i>Comamomas</i> R2 (baja $K_S$ )
GFSRVGRQFS	VACQMQAIDELRHVQ <sup>TQ</sup> VHAMS	SYMDDART	GAAYNGDMAT	KFMLEQ <sup>HE</sup> DNVPI	<i>Ps.</i> CF600 (moderada $K_S$ )
GFAHVGRQFS	IACQMQIAD <sup>EL</sup> RHVQ <sup>TQ</sup> IHAMS	SFFEDART	GAA <sup>F</sup> NGDMAT	KFLLEQ <sup>HE</sup> DNVPI	PCRTD05 (alta $K_S$ )

**Figura 34.** Secuencias aminoacídicas de los grupos LmPH. Los residuos característicos del grupo de baja  $K_S$  se muestran en amarillo, los de moderada y alta  $K_S$  en naranja, y los de las cepas de *Variovorax* de baja afinidad, en verde. Las regiones marcadas en rojo y violeta indican las zonas elegidas para el diseño de los *primers forward* y *reverse* específicos de cada grupo LmPH. La numeración corresponde a la secuencia del gen DmpN de *Pseudomonas* sp CF600 (Nordlund et al., 1990).

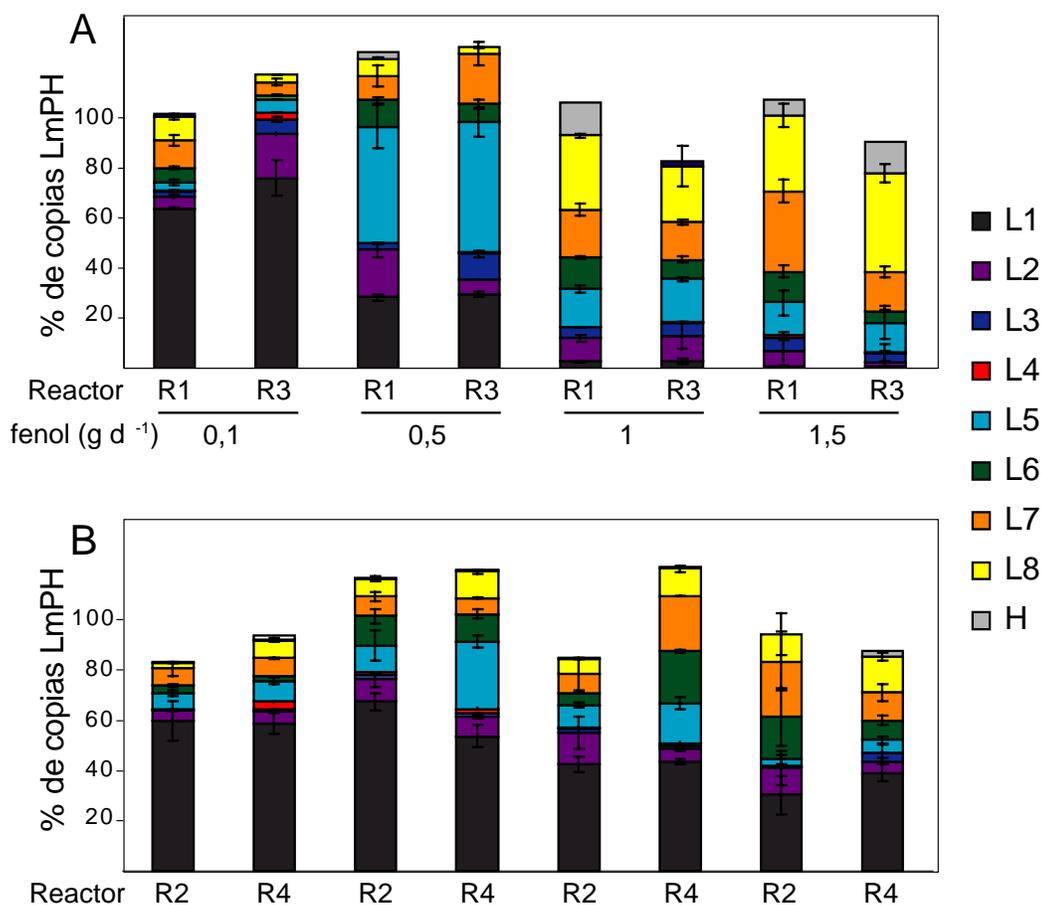
## 2.5 Cuantificación de las variantes genéticas LmPH por ensayos de PCR en tiempo real

Teniendo en cuenta las secuencias nucleotídicas de ambas bibliotecas, se diseñaron los *primers* para cada grupo (tabla 2B) y se verificó su especificidad utilizando clones de los grupos no específicos como controles negativos. Todos los sets de *primers* permitieron detectar específicamente al grupo en cuestión.

Utilizando ensayos de *real time* PCR con los *primers* específicos para cada uno de los grupos, se analizó cuantitativamente la dinámica de los genes LmPH en los reactores (a partir de ADN genómico) en tiempos correspondientes a las distintas cargas de fenol en el alimento (100, 500, 1000 y 1500). Los mismos sets de *primers* fueron utilizados para cuantificar las variantes LmPH en los 2 reactores control en los mismos tiempos de operación. Se cuantificaron también los genes LmPH de alta  $K_S$ . En la figura 35 se muestran los porcentajes de cada grupo relativo al número total de copias LmPH, detectado con los *primers* LmPH UF 2, 3 y 4 y LmPH UR2.

El número total de copias de los genes LmPH no cambió significativamente en respuesta al aumento en la concentración de fenol ( $p > 0,05$ ): durante todo el período el número de bacterias conteniendo genes LmPH representó entre el 4 y el 6 % de las células totales, suponiendo un número promedio de 3,6 copias de ADN ribosomal por célula (Klappenbach et al., 2001).

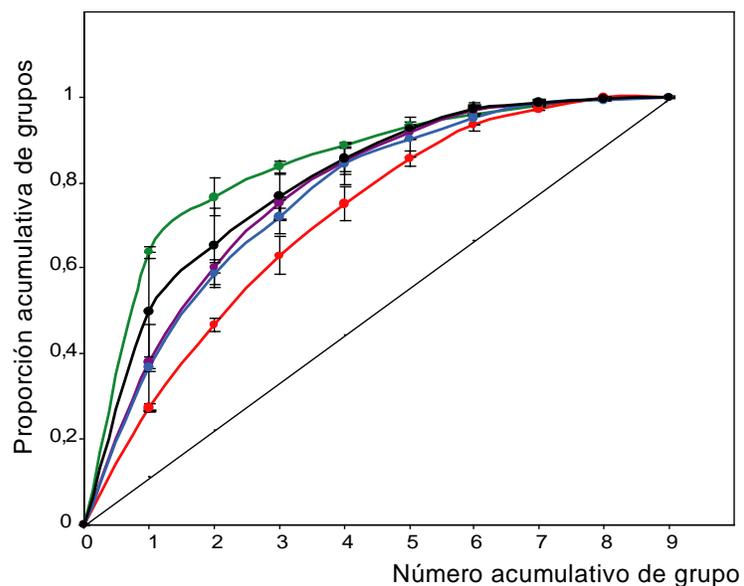
La estructura de las comunidades degradadoras de fenol, evaluada a nivel de las variantes genéticas LmPH, resultó similar entre las réplicas de los reactores a cada concentración de fenol en el alimento (figura 35). La proporción de algunos genotipos LmPH cambió con la concentración de fenol, sugiriendo que su abundancia relativa estaría influenciada por la cantidad de fenol en el alimento: el grupo L8 aumentó con el incremento de fenol mientras que el grupo L1 disminuyó; en el caso del grupo L5 se observó un aumento en el número de copias detectadas cuando la cantidad de fenol era de 500 mg/d (figura 35). Cabe mencionar que se detectó amplificación para todos los genotipos LmPH analizados, en los cuatro reactores y a todas las concentraciones de fenol, indicando una coexistencia estable de poblaciones que serían funcionalmente redundantes.



**Figura 35.** Cuantificación de los grupos LmPH a distintas concentraciones de fenol en el alimento. A) Reactores bajo tratamiento, se indican las cantidades de fenol agregadas al momento de la extracción; B) Reactores control, para los mismos tiempos que los reactores tratados. Los valores corresponden al porcentaje respecto del número total de copias LmPH detectado con *primers* universales. Las barras de error indican la desviación estándar de las réplicas.

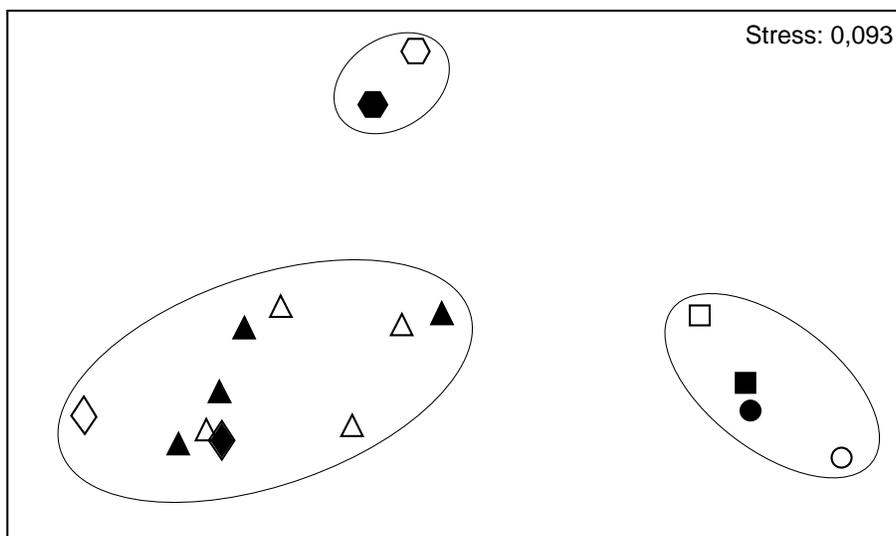
A partir de las proporciones de cada grupo LmPH determinadas en los ensayos de PCR cuantitativa, se determinaron los índices de diversidad de Shannon para los genes LmPH. Si bien los valores más altos de diversidad correspondieron a las muestras provenientes de los reactores 1 y 3 con una carga de 1 g de fenol por día, no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos y controles a ninguna de las concentraciones de fenol ( $p > 0,05$ ); los valores para el índice de Shannon se encontraron entre 1,24 y 1,79.

La equitatividad de las poblaciones LmPH en las muestras de los reactores expuestos a distintas cantidades de fenol se analizó gráficamente mediante una curva de Lorenz (figura 36). Se observó que la mayor equitatividad se alcanzó cuando la concentración de fenol era de 1 g/día.



**Figura 36.** Curva de Lorenz para los datos de abundancia de los 9 grupos LmPH, determinados en los ensayos de PCR en tiempo real. La línea diagonal muestra una distribución totalmente equitativa. En rojo: reactores 1 y 3 a 1 g/d de fenol, celeste: reactores 1 y 3 a 1,5 g/d, violeta: reactores 1 y 3 a 0,5 g/d, verde: reactores 1 y 3 a 0,1 g/d, negro: reactores 2 y 4 (promedio de todos los tiempos analizados). Las barras de error indican la desviación estándar de las réplicas.

Los cambios en las abundancias de los genotipos LmPH de acuerdo al aumento en la concentración de fenol se ven reflejados en el ordenamiento multidimensional de la figura 37, donde se observan grupos bien diferenciados, uno conformado por los reactores recibiendo la concentración basal de fenol, otro con los reactores recibiendo 500 mg/d y un tercer grupo con los reactores expuestos a altas cargas de fenol. En el gráfico se observa además que los reactores 1 y 3 se ubicaron cerca en cada tiempo correspondiente a cada concentración de fenol, indicando que las poblaciones LmPH cambiaron similarmente en ambas réplicas. Los reactores control se ubicaron de modo más disperso en el gráfico del ordenamiento, junto con los reactores 1 y 3 en un tiempo correspondiente a la carga basal de fenol.



**Figura 37.** Análisis de ordenamiento multidimensional (NMDS). Triángulos: reactores control, rombos: reactores 1 y 3 con 100 mg/d, hexágonos: R1 y R3 con 500 mg/d, cuadrados: R1 y R3 con 1000 mg/d, círculos: R1 y R3 con 1500 mg/d. Los símbolos llenos o vacíos corresponden a cada una de las réplicas. Las elipses representan los grupos obtenidos en un análisis de *clusters* con un nivel de corte correspondiente al promedio de la matriz de similitud.

Los análisis de similitud (ANOSIM) sugieren también un efecto de la concentración de fenol sobre la distribución de abundancias LmPH en los reactores, siendo significativamente más similar la composición entre réplicas que entre tratamientos ( $R = 0,74$ ,  $p < 0,001$ ). Se realizaron entonces comparaciones entre pares de tratamientos, los análisis que resultaron significativos se muestran en la tabla 7. Para evaluar a qué grupos LmPH se debían estas diferencias, se realizó un análisis del porcentaje de similitud (SIMPER), revelando que tres genotipos (L1, L5 y L8) contribuían mayoritariamente a los cambios en la composición entre las comunidades de los reactores expuestos a distintas cargas de fenol (tabla 7).

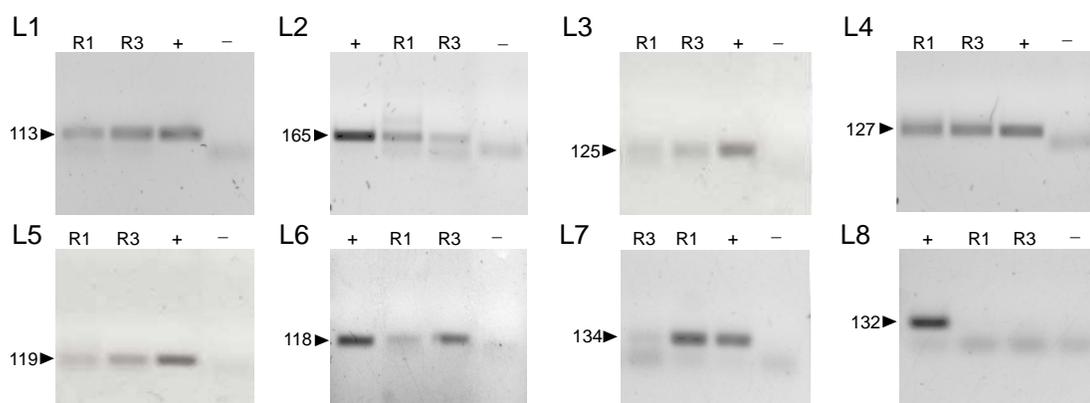
Comparación	ANOSIM		SIMPER: Porcentaje de contribución de los genotipos LmPH a las diferencias entre las comunidades expuestas a distintas cargas de fenol								
	R	p	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	H
Global	0,74	0,0001	<b>37,1</b>	6,0	4,1	1,1	<b>16,9</b>	5,9	8,2	<b>15,5</b>	5,3
100 vs 500	0,88	0,021	<b>22,1</b>	7,9	7,8	1,1	<b>41,7</b>	5,9	7,3	5,2	0,9
100 vs 1000	0,98	0,023	<b>46,5</b>	3,4	3,4	1,1	8,7	5,9	7,4	<b>16,9</b>	6,6
100 vs 1500	0,99	0,023	<b>41,7</b>	3,7	2,8	0,9	5,6	5,3	9,5	<b>22,5</b>	8,1

**Tabla 7.** ANOSIM y SIMPER. Resultados de las comparaciones globales y de a pares de la distribución de los genes LmPH bajo las distintas cargas de fenol. Sólo se muestran las comparaciones que resultaron significativamente diferentes.

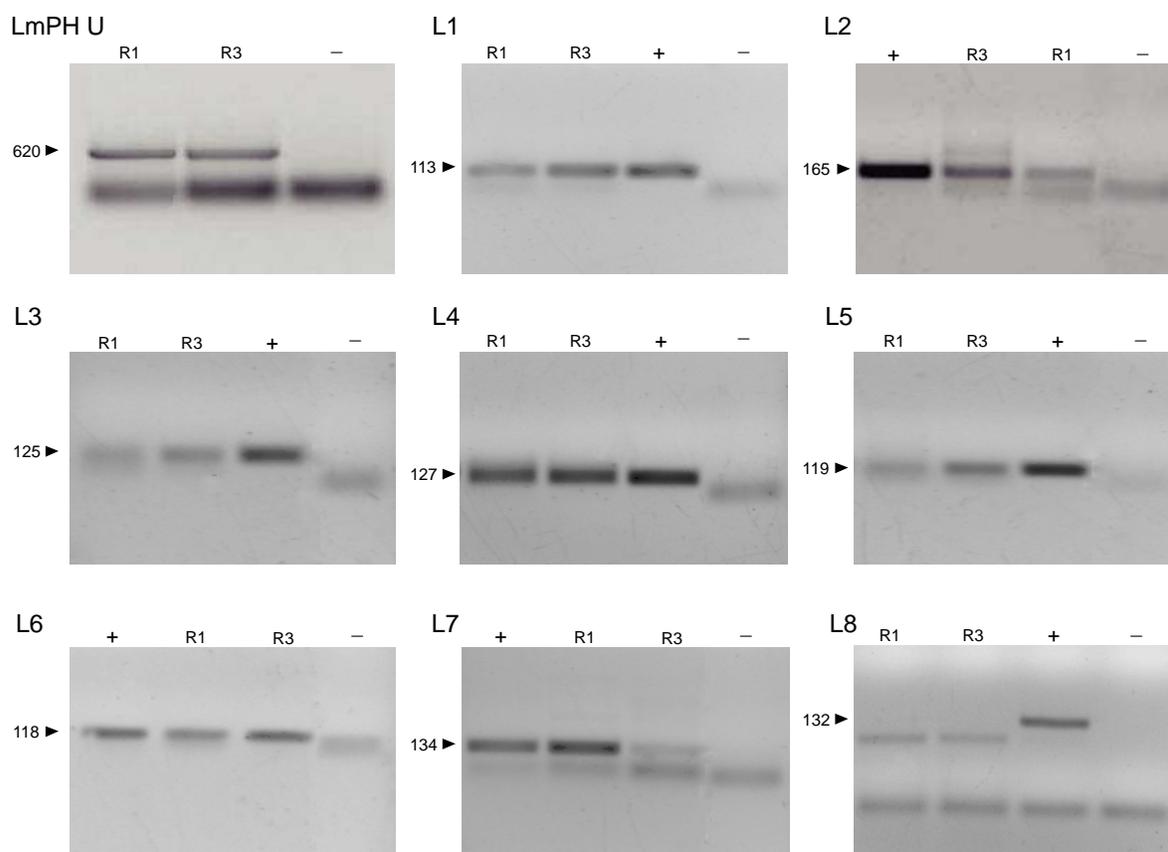
## 2.6 Detección de mensajeros LmPH en los barros activados

Dado que los resultados proceden de muestras de ADN, para evaluar si los genes analizados estaban siendo expresados, se extrajo el ARN total de ambos reactores (en dos tiempos correspondientes a una descarga de fenol de 100 y 1000 mg/d) y se evaluó por RT-PCR la presencia de mensajeros de las distintas variantes del gen LmPH.

Excepto en el caso del grupo L8, donde no se observó amplificación en el tiempo correspondiente a 100 mg/d de fenol, se detectaron mensajeros de todos los grupos LmPH en ambos reactores en los dos tiempos, con diferencias en cuanto a la intensidad de las bandas amplificadas para las distintas variantes genéticas y para los dos reactores (figuras 38 y 39).



**Figura 38.** RT-PCR de grupos LmPH a los 22 días de operación (100 mg/d de fenol). R1 y R3: Reactores 1 y 3; +: control positivo (miniprep del grupo LmPH correspondiente), -: control negativo de ADN (sin transcriptasa reversa). Se indica el tamaño en pb de los productos amplificados.



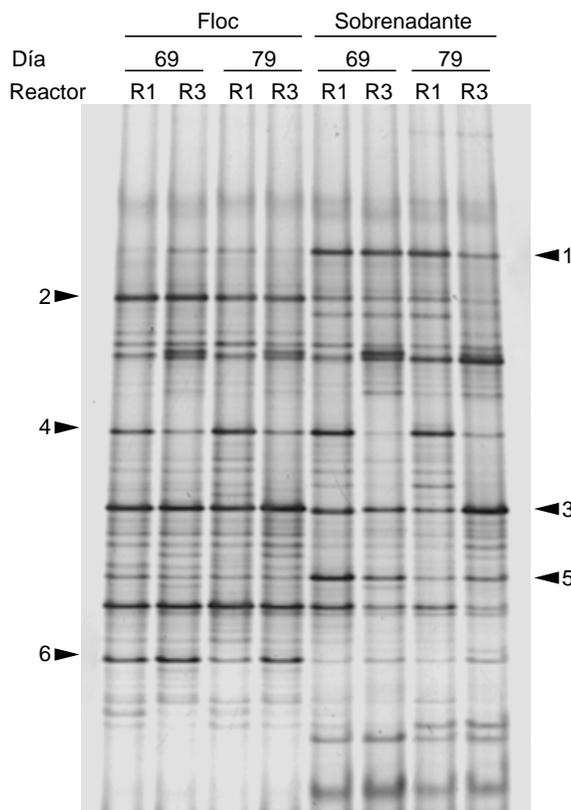
**Figura 39.** RT-PCR de mensajeros LmPH universal y grupos L1 a L8 a los 86 días de operación (1000 mg/d de fenol). R1 y R3: Reactores 1 y 3; +: control positivo (miniprep del grupo LmPH correspondiente), -: control negativo de ADN (sin transcriptasa reversa). Se indica el tamaño en pb de los productos amplificados.

## 2.7 Comunidades del floc y del sobrenadante

Durante la etapa de alimentación correspondiente a una cantidad de 1 g/día de fenol se observó un aumento en la turbidez del sobrenadante de los reactores tratados. En este período se analizaron por DGGE del ADN ribosomal 16S las diferencias entre las comunidades bacterianas de los flocs y las del sobrenadante.

Se encontraron diferencias en los perfiles de corrida entre las muestras provenientes del floc o del sobrenadante, presentando bandas distintivas en cuanto a su abundancia relativa (figura 40). Se recortaron y secuenciaron algunas de estas bandas con el fin de

identificar las poblaciones involucradas; la asignación filogenética y las secuencias de mayor similitud en el GenBank se muestran en la tabla 8.



**Figura 40.** DGGE del ADNr 16S del floc y sobrenadante de los reactores 1 y 3, a dos tiempos de operación correspondientes a una descarga de 1 g/día de fenol en el alimento. Se indican con números las bandas recortadas.

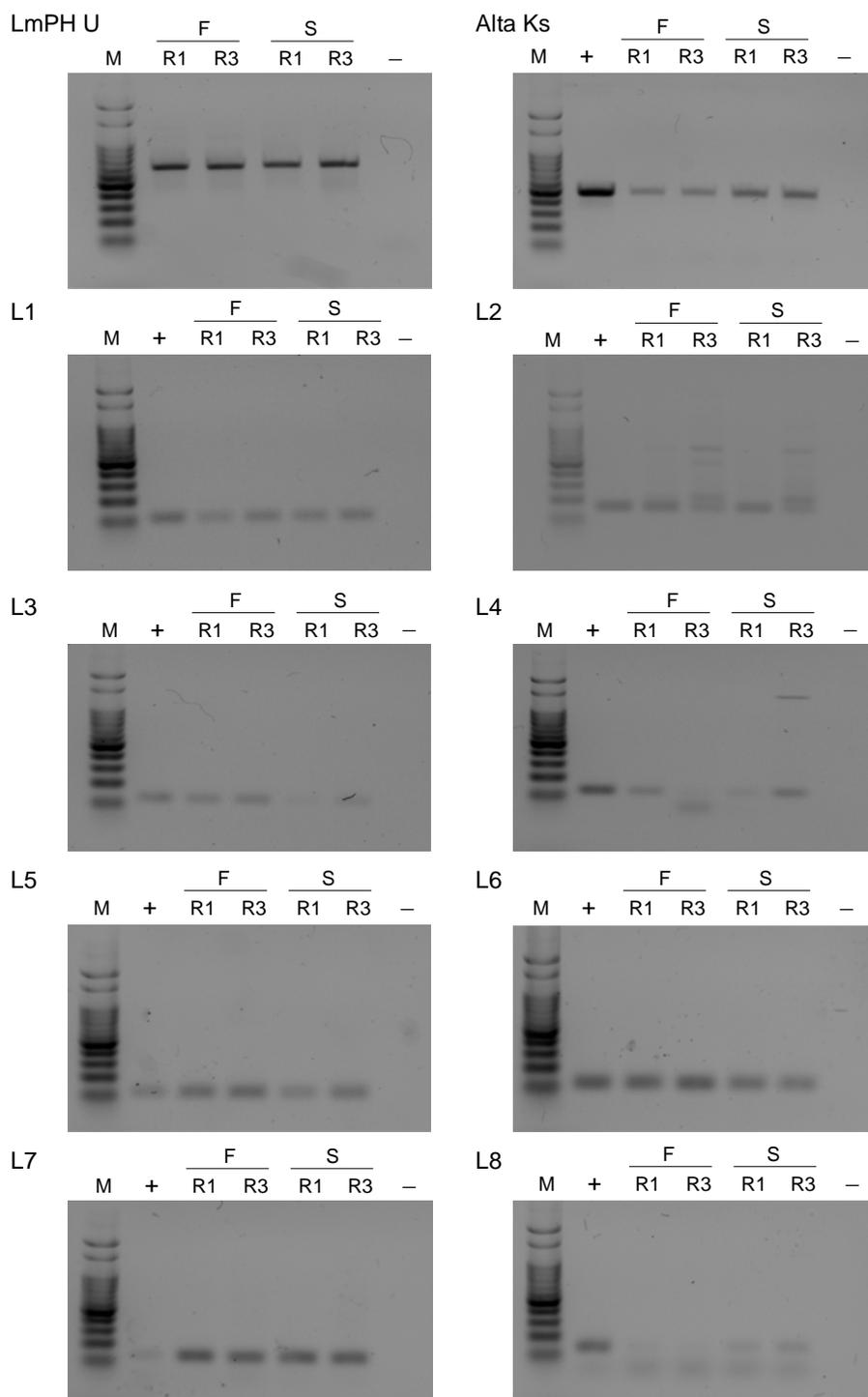
Las bandas 1 y 5 aparecen principalmente en las muestras provenientes del floc, mientras que las bandas 2, y 6 aparecen mayoritariamente en aquellas tomadas del sobrenadante de los reactores.

Banda DGGE	Filiación filogenética <sup>1</sup>	Secuencia de mayor similitud <sup>2</sup>	No. acceso GenBank	Identidad	F vs S
1	Bacteroidetes	<i>Sediminibacterium</i> sp	AM990456	95% (112/117)	F << S
2	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Sphingobacterium</i> sp	FJ548749	99% (116/117)	F >> S
3	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Delftia</i> sp	GU272362	100% (122/122)	F ~ S
4	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Comamonas</i> sp	GQ891815	95% (118/124)	F ~ S
5	Bacteroidetes	Bacteroidetes no cult.	FJ764602	94% (112/118)	F < S
6	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Comamonas</i> sp	FJ823944	97% (114/118)	F >> S

**Tabla 8.** Análisis de las bandas recortadas del DGGE, realizado en base a secuencias de aproximadamente 120 pb, utilizando el programa *Classifier* en el sitio del RDP II con un nivel de confianza de al menos 80% (<sup>1</sup>) y la función BLASTn en la base de datos del NCBI (<sup>2</sup>). Se indica la relación de intensidad entre las muestras provenientes del floc (F) y las del sobrenadante (S).

Se determinó la velocidad de degradación por parte de las comunidades del sobrenadante de los reactores a un tiempo correspondiente a una carga de fenol de 1 g/d. Los valores de velocidad fueron similares a aquellos obtenidos para las comunidades del floc en el mismo tiempo de operación: 22,3 y 20,5 mg<sub>fenol</sub>/g<sub>SST</sub>.min para las muestras del floc de los reactores 1 y 3, respectivamente, y 27,5 y 24,6 mg<sub>fenol</sub>/g<sub>SST</sub>.min para las muestras del sobrenadante de los reactores 1 y 3, respectivamente.

Por medio de ensayos de PCR con los *primers* correspondientes a los distintos grupos LmPH (tabla 2B), se analizó la presencia de los genes LmPH en muestras del floc y del sobrenadante de los reactores a los 79 días de operación. Si bien los resultados no son cuantitativos, la diferencia en la intensidad de las bandas obtenidas sugiere que los genes de alta K<sub>S</sub> y del grupo L8 se encontraban principalmente en las muestras del sobrenadante, mientras que los de los grupos L3, L5 y L6 se encontraban mayoritariamente en muestras del floc de los reactores (figura 41).



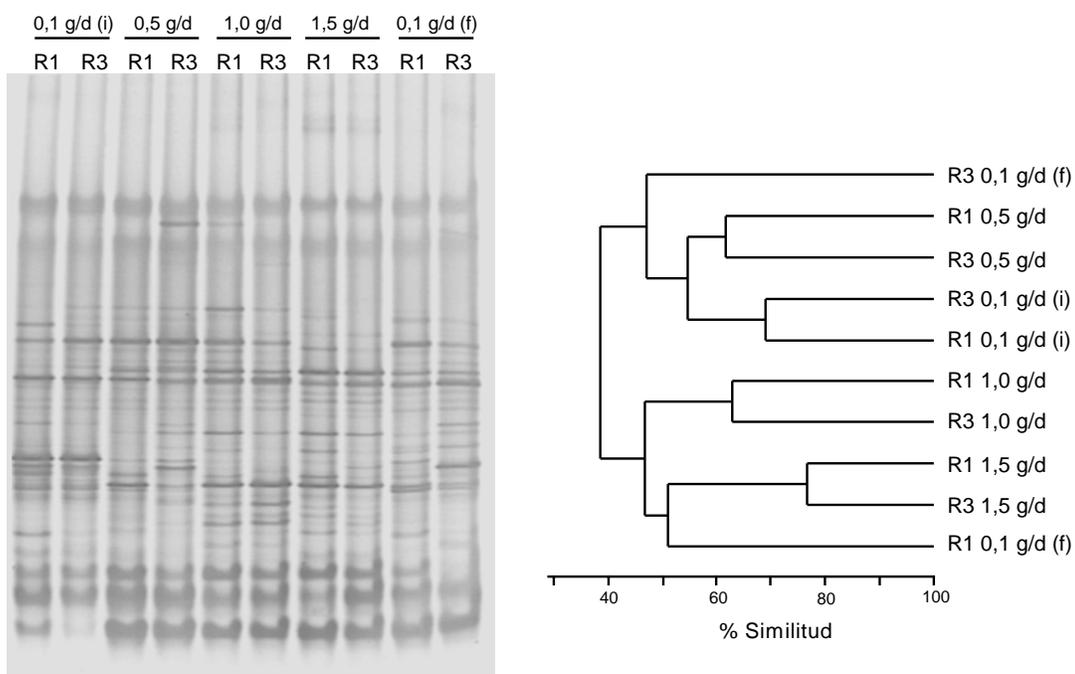
**Figura 41.** PCR de los genes LmPH universal, alta  $K_S$  y grupos L1 a L8 sobre muestras de ADN del floc (F) y sobrenadante (S) de los reactores tratados, tomadas a los 79 días de operación. +: control positivo (miniprep del grupo LmPH correspondiente), R1 y R3: reactores 1 y 3, -: control negativo, M: marcador de PM (100 pb, PBL).

## 2.8 Recuperación de la función de degradación de los barros activados

Al operar con una carga de 1,5 g de fenol por día, el funcionamiento de los reactores se desestabilizó, viéndose inhibida la actividad de degradación y presentando el sobrenadante altos niveles de fenol. Con el objetivo de estudiar si los sistemas podían recuperar espontáneamente su función, se bajó la concentración de fenol en el alimento de los reactores tratados a 100 mg/día.

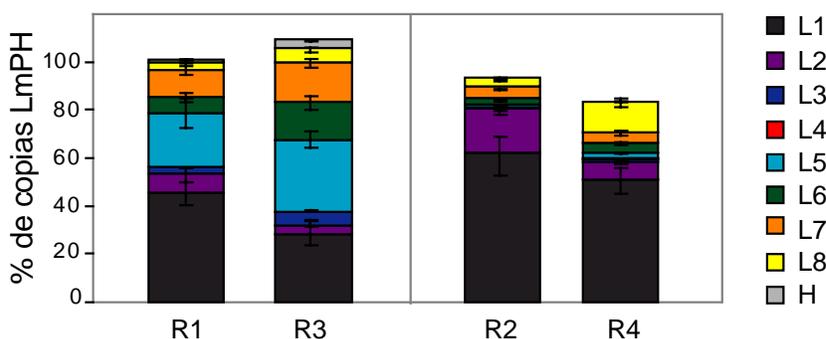
Luego de 30 días de operar con la concentración basal de fenol, se observó que se recuperaron los niveles de actividad/velocidad de degradación (figura 28) y que ya no se acumulaba fenol en el sobrenadante de los reactores (figura 25). Volvió a detectarse temporalmente turbidez en el sobrenadante, sin embargo a los 4-5 días se encontró nuevamente clarificado.

La estructura de las comunidades bacterianas, evaluada a nivel de los genes ribosomales 16S, presentó diferencias entre las réplicas, resultando ambos reactores ubicados en ramas diferentes en un análisis de agrupamiento (figura 42). Ninguna de las réplicas al final del tratamiento agrupó con las muestras provenientes de los reactores con la misma concentración de fenol al inicio del tratamiento.

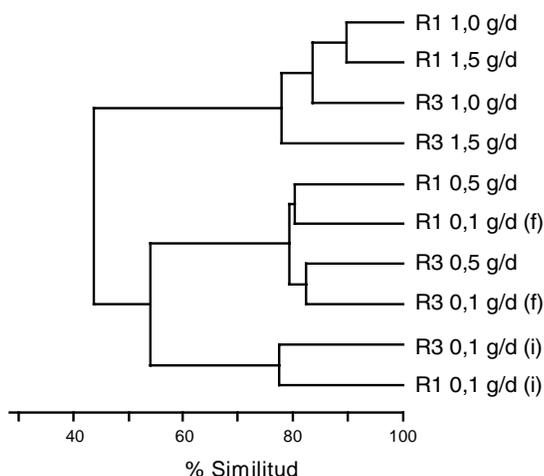


**Figura 42.** DGGE y análisis de *clusters* de los reactores tratados a las distintas cargas de fenol en el alimento: de 0,1 (i) a 1,5 g/d y la vuelta a 0,1 g/d (f).

Con respecto a los genes LmPH, se observaron cambios en las abundancias relativas de cada genotipo: particularmente en el caso de los grupos L1, L5 y L8, que habían sido asociados principalmente con los cambios en respuesta al agregado de fenol (tabla 7), se encontró en ambas réplicas un aumento en los grupos L1 y L5 y una disminución en el grupo L8 (figura 43). Aún así, la distribución de abundancias LmPH presentó diferencias con la de los reactores control al mismo tiempo de operación, presentando mayor similitud con las muestras correspondientes a una carga de fenol de 0,5 g/d (figura 44).



**Figura 43.** Cuantificación por PCR en tiempo real de las variantes LmPH de los reactores tratados (R1, R3) y control (R2, R4) luego de 37 días de retornar a una concentración de fenol en el alimento de 100 mg por día. Las barras de error indican la desviación estándar de las réplicas.



**Figura 44.** Análisis de *clusters* realizado en base a los resultados de la cuantificación por PCR en tiempo real de las variantes LmPH para los reactores tratados a las distintas cargas de fenol en el alimento: 0,1 (i) a 1,5 g/d y la vuelta a 0,1 g/d (f).

### **PARTE 3. Aislamiento de microorganismos conteniendo distintas variantes genéticas LmPH. Caracterización genotípica, fenotípica y funcional**

Los resultados obtenidos en la segunda parte del trabajo indicaron que la dominancia de genotipos LmPH particulares cambiaba a las distintas cargas de fenol en el alimento. Estos cambios en la abundancia relativa podrían ser atribuidos a caracteres funcionales de las bacterias, relacionados con su afinidad y/o tolerancia al fenol. Con el objetivo de poner a prueba esta hipótesis, se buscó aislar representantes de cada variante genética LmPH detectada en las bibliotecas para evaluar sus características cinéticas en cuanto a la degradación y al crecimiento con fenol como única fuente de carbono y energía.

#### **3.1 Aislamiento**

Se seleccionaron para los análisis aquellos aislamientos que presentaron diferencias en los perfiles de restricción de los genes LmPH, obtenidos por incubación con las enzimas Rsa I, Mbo I y Alu I.

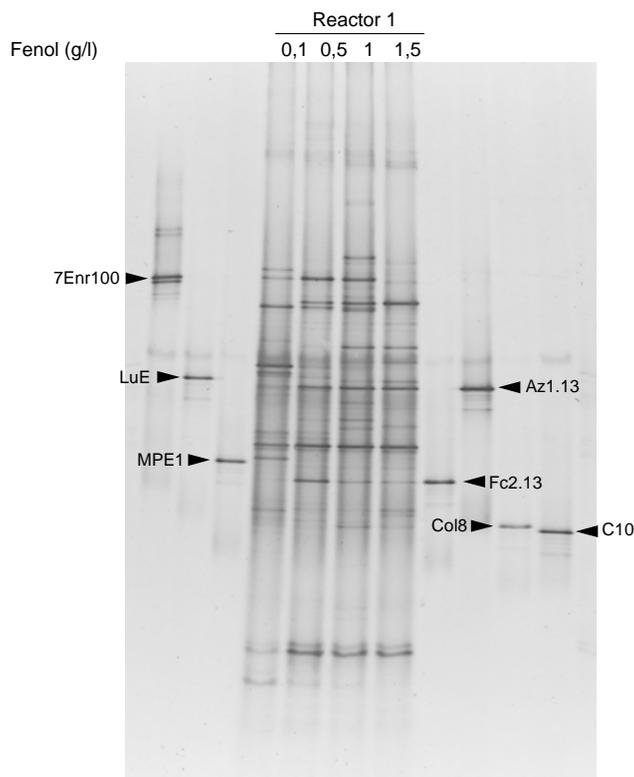
Los cultivos MPE1, FC2.13 y Col8 fueron aislados en medio MP-agar con 200 mg/l de fenol; 7Enr100 y EnrII1000, en MP-agar con 100 o 1000  $\mu$ M de fenol luego de 10 días de enriquecimiento en medio líquido de la misma composición; Lu-E y Lu-G fueron aislados en medio basal suplementado con solución de elementos traza y 200 mg/l de fenol; C10, C2 y AZ1.13, en medio preparado a partir del sobrenadante de los reactores, con 5 o 500 mg/l de fenol; AN2, J6 y LN4 fueron aislados en condiciones anóxicas utilizando nitrato (AN2, J6) o hierro (LN4) como aceptor de electrones.

#### **3.2 Caracterización genotípica**

Los genes LmPH de las bacterias aisladas fueron secuenciados e incorporados para la construcción de los árboles filogenéticos (figuras 16 y 17). El cultivo C10 quedó ubicado dentro de la rama del grupo L3; 7Enr100 y J6, en la rama del grupo L4; FC2.13 en la del grupo L5; AZ1.13 y Lu-G, en la del grupo L6 y Col8 en la del grupo L8 (figuras 20, 21, 22, 23 y 33). Los cultivos MPE1 y Lu-E no formaron parte de ninguno de los grupos descriptos teniendo en cuenta las secuencias nucleotídicas, si bien quedaron ubicados próximos a los grupos L1 y L2. Cuando el análisis se realizó en base a las secuencias aminoacídicas derivadas, los genes LmPH de las bacterias MPE1 y Lu-E resultaron incluidos en el grupo L1+L2. Dichos agrupamientos fueron confirmados en los análisis

realizados con el programa DOTUR. El resto de los cultivos no formaron parte de los grupos detectados en las bibliotecas. Excepto en el caso de EnrII1000, que contenía genes LmPH de moderada  $K_S$ , todos los cultivos aislados pertenecieron a la clase de baja  $K_S$  de la enzima (figuras 16 y 17).

Para analizar si las bacterias aisladas formaban parte de las comunidades de los barros activados estudiados durante la segunda parte del trabajo, se corrieron geles de gradiente desnaturalizante del ADNr 16S junto a muestras del reactor 3 a tiempos correspondientes a las distintas cargas de fenol. Sólo los cultivos AZ1.13 y FC2.13 mostraron bandas a la misma altura de alguna de las bandas presentes en las muestras de los reactores (figura 45). Dichas bandas habían sido secuenciadas durante los análisis de la segunda parte del trabajo (bandas *f* y *d* respectivamente, tabla 6); se confirmó que el dominio V3 del ADNr 16S de los cultivos AZ1.13 y FC2.13 y de las muestras de los reactores correspondientes presentaban la misma secuencia (100% de identidad en un alineamiento).



**Figura 45.** DGGE 40-65% de 200 pb de los cultivos aislados junto al reactor 1 a distintas cargas de fenol en el alimento.

La identificación filogenética de los microorganismos aislados se realizó por secuenciación del ADN ribosomal 16S. De las 11 secuencias obtenidas, 9 correspondieron a  $\beta$ -Proteobacterias y 2 a  $\gamma$ -Proteobacterias (tabla 10).

### 3.3 Caracterización fenotípica

Se realizaron ensayos de identificación fenotípica (API 20 NE) para confirmar los datos de secuenciación. Los resultados de las reacciones para los microorganismos analizados se muestran en la tabla 9.

Reacción	MPE1	Lu E	C 10	7Enr100	Fc213	Az113	Col 8	LN 4	Enr II
NO3	+	+	+	+	+	+	+	+	-
TRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	+
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC	-	-	-	-	-	-	-	+	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PNG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	-	-	+	+	+
ARA	+	-	-	+	-	-	-	+	-
MNE	+	+	+	-	-	-	+	+	+
MAN	+	+	+	-	-	+	+	+	-
NAG	+	+	+	-	-	-	+	+	-
MAL	+	+	+	-	-	-	+	-	-
GNT	+	+	+	-	+	+	+	+	+
CAP	+	+	+	+	-	+	+	+	+
ADI	+	-	+	+	+	+	+	+	-
MLT	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+	-	+	+	+	+
PAC	+	+	+	-	-	+	+	+	+

**Tabla 9.** Resultados de las reacciones de identificación (API 20NE) para los microorganismos aislados.

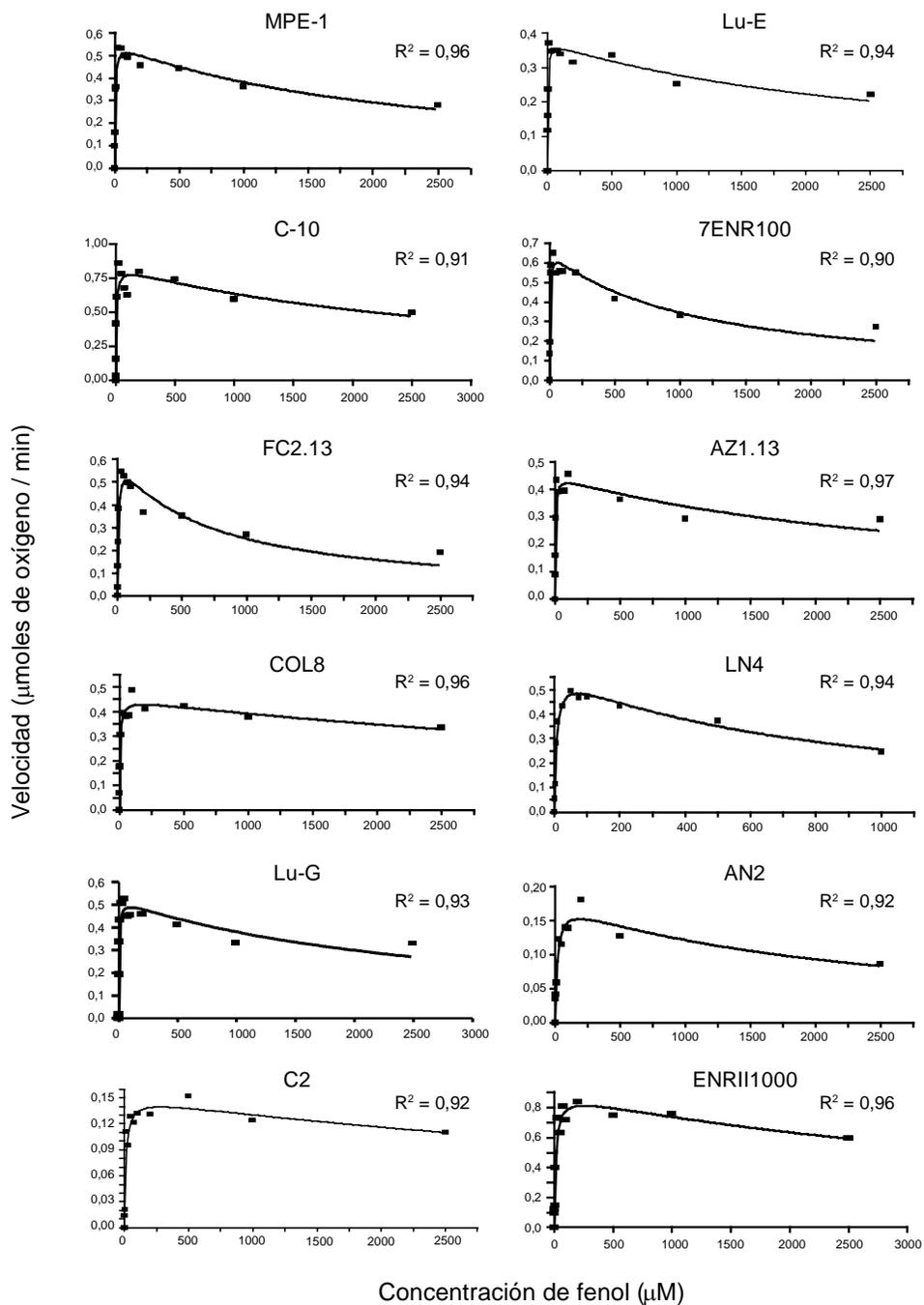
En base a los códigos numéricos obtenidos con las pruebas API se determinó la identidad de los cultivos: MPE1, Lu-E, C-10, FC2.13, AZ1.13, Col8 y LN-4 fueron identificados como pertenecientes a la clase  $\beta$ -Proteobacteria: excepto para AZ1.13 y FC2.13, que fueron clasificadas como *Delftia acidovorans* y *Comamonas testosteroni*

respectivamente, el resto fueron determinadas como *Burkholderia cepacia*. Los datos de secuenciación indicaron que los aislamientos MPE1, Lu-E, C-10 y Col8 eran  $\beta$ -Proteobacterias distintas a *Burkholderia* sp, probablemente estas diferencias se deban a que los géneros a los que pertenecerían estos cultivos no se encuentran dentro del catálogo de identificación API. Los aislamientos 7Enr100 y EnrII1000 fueron clasificados como  $\gamma$ -Proteobacterias: 7Enr100 correspondía a *Acinetobacter baumannii* / *calcoaceticus* y EnrII1000, a *Pseudomonas putida*.

### **3.4 Caracterización funcional**

#### **3.4.1 Cálculo de las constantes cinéticas de la degradación de fenol por respirometría**

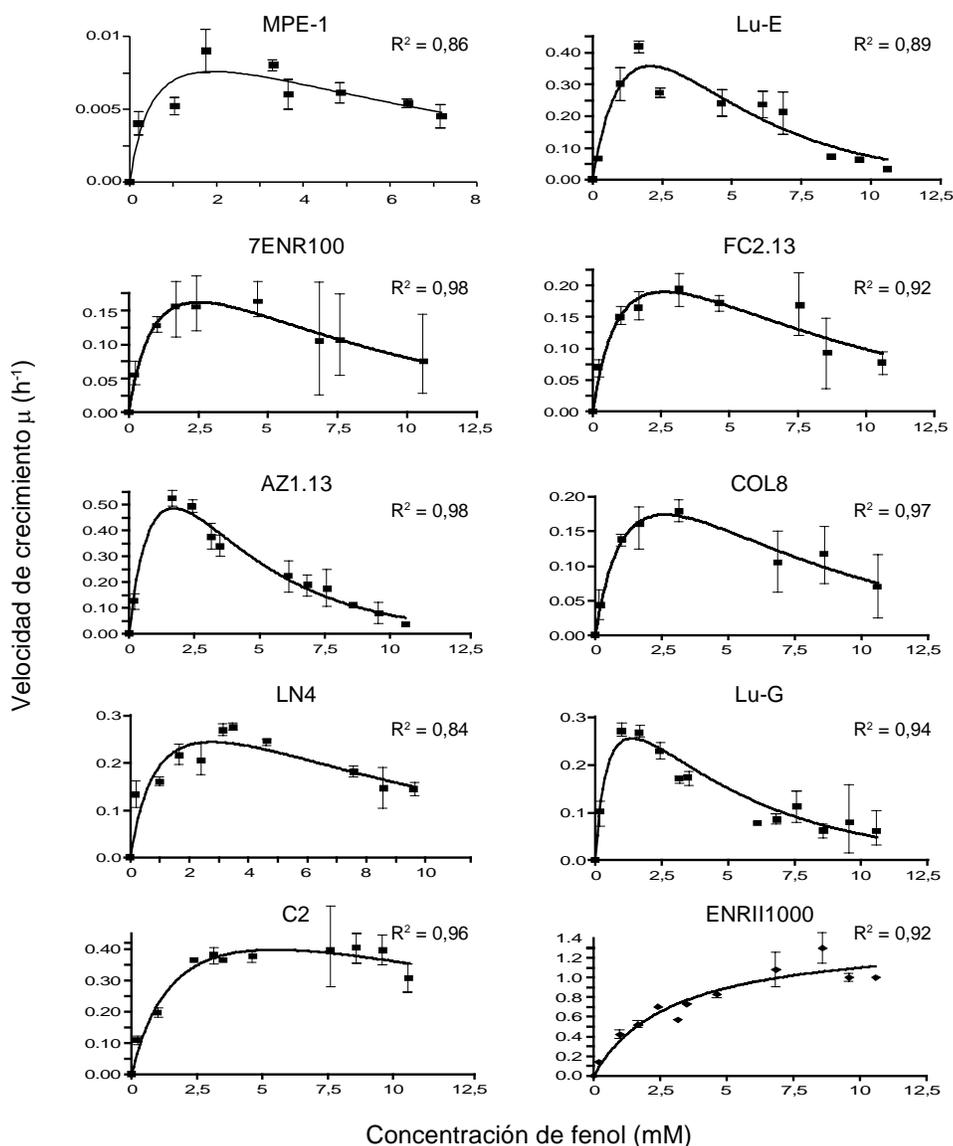
Los cultivos fueron caracterizados en base a sus propiedades cinéticas para la degradación de fenol. Las velocidades iniciales determinadas para cada concentración de fenol fueron ajustadas al modelo cinético de Haldane; las curvas obtenidas para cada cultivo se muestran en la figura 46.



**Figura 46.** Ajuste de la cinética de degradación de fenol a la ecuación de Haldane para los microorganismos aislados. Se indican los valores de R<sup>2</sup> del ajuste.

### 3.4.2 Cálculo de las constantes cinéticas del crecimiento e inhibición por fenol

Los cultivos fueron caracterizados en base a sus propiedades cinéticas para el crecimiento e inhibición por fenol. Las tasas de crecimiento determinadas para cada concentración de fenol fueron ajustadas al modelo cinético de Aiba-Edwards; las curvas obtenidas para cada cultivo se muestran en la figura 47.



**Figura 47.** Ajuste de la cinética de crecimiento en fenol a la ecuación de Aiba-Edwards para los microorganismos aislados. Las barras de error indican la desviación estándar de las velocidades de crecimiento  $\mu$  obtenidas por regresión lineal a partir de ensayos realizados por triplicado. Los valores de  $R^2$  corresponden al ajuste a la ecuación de Aiba-Edwards.

En la tabla 10 se muestra la clasificación filogenética y las constantes cinéticas obtenidas para la degradación y el crecimiento en fenol de los microorganismos aislados. Con respecto a los cultivos que contenían los genes LmPH detectados en las bibliotecas, los valores de  $K_S$  para la actividad de oxigenación de fenol se encontraron en un rango acotado, entre 2,3  $\mu\text{M}$  y 6,6  $\mu\text{M}$ . Las constantes de inhibición variaron en un orden de magnitud, entre 700  $\mu\text{M}$  y 6800  $\mu\text{M}$ . MPE1 presentó la mayor afinidad para el crecimiento en fenol, el resto de los aislamientos tuvieron valores de  $K_{SG}$  en el rango de 0,6 mM a 3 mM.

Cultivo	Grupo LmPH	Filiación filogenética (RDP)	Actividad de oxigenación de fenol (Ecuación de Haldane)			Crecimiento en fenol (Ecuación de Aiba-Edwards)		
			$K_S$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{SI}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{m\acute{a}x}$	$K_{SG}$ (mM)	$K_I$ (mM)	$\mu_{m\acute{a}x}$ ( $\text{h}^{-1}$ )
MPE1	L1	<i>Alicyclophilus</i>	4,1 $\pm$ 0,8	2200 $\pm$ 600	340 $\pm$ 20	0,4 $\pm$ 0,2	7,7 $\pm$ 3,5	0,013 $\pm$ 0,004
LU-E	L2	<i>Brachymonas</i>	2,3 $\pm$ 0,5	3000 $\pm$ 900	103 $\pm$ 5	2,1 $\pm$ 1,7	3,6 $\pm$ 0,9	nd
C-10	L3	<i>Pigmentiphaga</i>	5,3 $\pm$ 1,8	3300 $\pm$ 1500	420 $\pm$ 30	nd	nd	nd
7Enr100	L4	<i>Acinetobacter</i>	2,6 $\pm$ 0,9	1100 $\pm$ 400	250 $\pm$ 20	1,5 $\pm$ 0,6	7,8 $\pm$ 1,4	0,36 $\pm$ 0,08
J6	L4	<i>Alicyclophilus</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
FC2.13	L5	<i>Comamonas</i>	6,6 $\pm$ 1,8	700 $\pm$ 200	500 $\pm$ 40	1,3 $\pm$ 0,9	7,7 $\pm$ 2,4	0,40 $\pm$ 0,15
AZ1.13	L6	<i>Delftia</i>	6,5 $\pm$ 1,3	1300 $\pm$ 300	330 $\pm$ 20	1,2 $\pm$ 0,5	4,7 $\pm$ 0,5	0,88 $\pm$ 0,18
LU-G	L6	nd	3,5 $\pm$ 1,0	2700 $\pm$ 1000	200 $\pm$ 20	0,6 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 0,6	0,48 $\pm$ 0,09
COL-8	L8	<i>Pigmentiphaga</i>	5,3 $\pm$ 1,0	6700 $\pm$ 1500	260 $\pm$ 10	1,7 $\pm$ 0,9	6,7 $\pm$ 1,4	0,42 $\pm$ 0,13
C2	-	nd	11,4 $\pm$ 4,1	6800 $\pm$ 4600	32 $\pm$ 3	2,2 $\pm$ 1,3	19,4 $\pm$ 9,7	0,74 $\pm$ 0,25
LN-4	-	<i>Burkholderia</i>	5,3 $\pm$ 1,4	1500 $\pm$ 400	210 $\pm$ 20	1,1 $\pm$ 0,8	9,6 $\pm$ 3,7	0,45 $\pm$ 0,16
AN-2	-	<i>Alcaligenes</i>	16,2 $\pm$ 5,8	2200 $\pm$ 1000	220 $\pm$ 20	nd	nd	nd
EnrII1000	M	<i>Pseudomonas</i>	12,9 $\pm$ 3,3	4900 $\pm$ 2100	270 $\pm$ 20	3,0 $\pm$ 0,9	-	1,43 $\pm$ 0,17

**Tabla 10.** Caracterización de los cultivos aislados. Los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  están expresados en  $\mu\text{moles de oxígeno consumido/min} \cdot \text{g}_{\text{peso seco}}$ . Los errores indican las desviaciones al ajuste. nd: no determinado. L1 a L8: grupos LmPH detectados en las bibliotecas, M: gen LmPH de moderada  $K_S$ . La filiación filogenética está basada en secuencias de 700 pb con un umbral de confianza del 95% para todos los aislamientos, excepto para MPE-1, que fue clasificada con una confianza del 90% en el sitio RDP *Classifier*.

### **3.5 Ensamblado de poblaciones con redundancia funcional**

Los ensayos de PCR en tiempo real indicaron una coexistencia de poblaciones conteniendo genes LmPH a lo largo de 5 meses de operación de los reactores, mostrando una muy alta diversidad para un mismo grupo funcional. Se propuso entonces analizar la coexistencia en ambientes más homogéneos y menos complejos, utilizando un modelo simplificado en el cual tres bacterias aisladas, representantes de distintos grupos LmPH, fueron incubadas en presencia de fenol como única fuente de carbono.

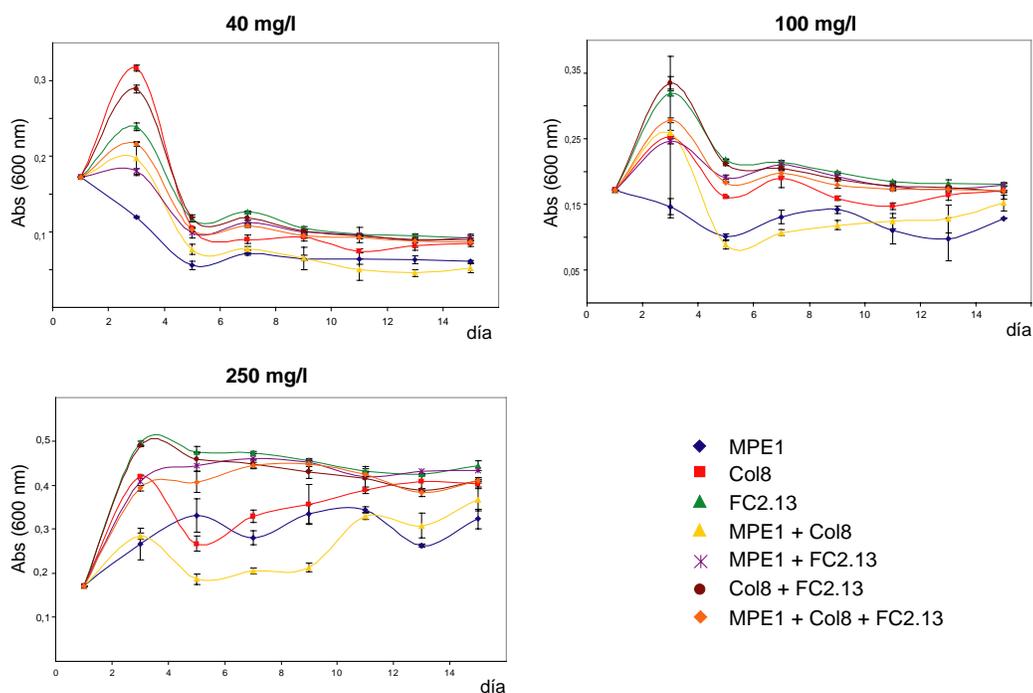
Se utilizaron las bacterias MPE1, FC2.13 y Col8, representantes de los grupos LmPH L1, L5 y L8 respectivamente, dado que dichos grupos fueron los principales genotipos LmPH que modificaron en mayor medida su abundancia relativa con el aumento de fenol en el alimento.

Las tres especies mencionadas fueron crecidas en medio mínimo a tres concentraciones de fenol (40,100 y 250 mg/l) a lo largo de 15 días en distintas combinaciones: cada una por separado, de a dos, o las tres juntas (ver materiales y métodos, sección 14).

Durante todo el experimento no se detectó fenol en ninguno de los cultivos, indicando que en todos los casos el fenol era completamente degradado entre cada pulso de alimentación

Los cultivos conteniendo a MPE1 y a MPE1 junto a Col8 presentaron menores valores de absorbancia (DO a 600nm) que el resto de los cultivos a las tres concentraciones de fenol analizadas (figura 48). Mediante un recuento en placa se verificó que los menores valores de DO600 correspondían a un menor número de células.

Las velocidades de degradación de fenol, determinadas sobre muestras tomadas en el día 14 del experimento, resultaron similares para todos los cultivos en cada concentración de fenol, excepto en las muestras conteniendo a FC2.13 con 250 mg/l; en estos casos las velocidades de degradación fueron mayores (tabla 11).

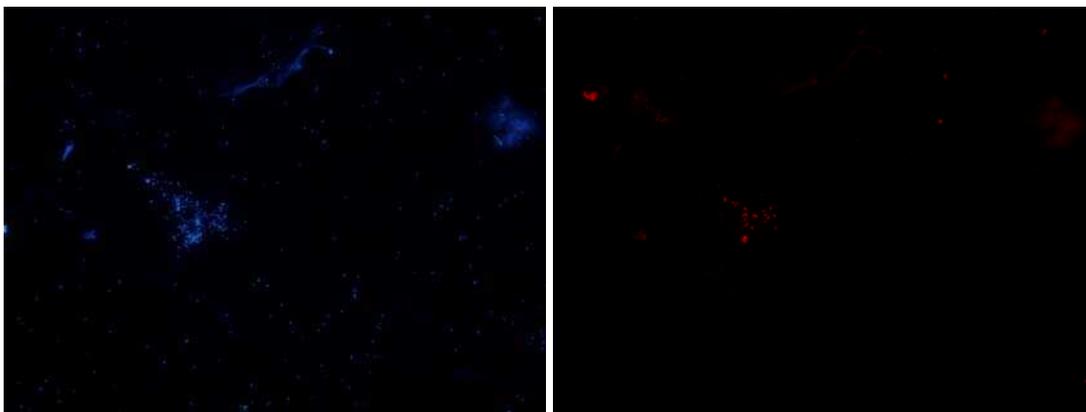


**Figura 48.** Crecimiento de los cultivos con 40, 100 y 250 mg/l de fenol en función del tiempo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de las réplicas.

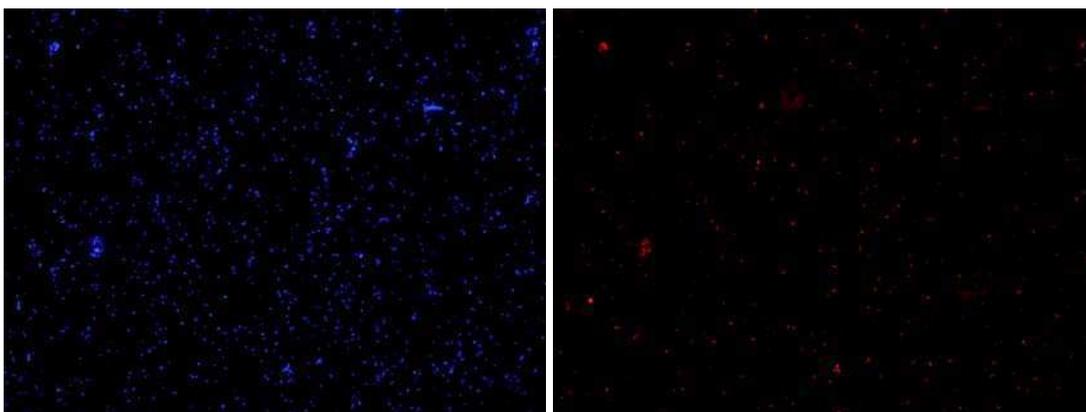
Cultivo	Grupo LmPH	Actividad de degradación (mg fenol / l . min)		
		40 mg fenol / l	100 mg fenol / l	250 mg fenol / l
MPE1	L1	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,23 ± 0,04
Col8	L8	0,08 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,23 ± 0,01
FC2.13	L5	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,48 ± 0,02
MPE1 + Col8	L1 + L8	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,19 ± 0,01
MPE1 + FC2.13	L1 + L5	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,50 ± 0,03
Col8 + FC2.13	L8 + L5	0,09 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,57 ± 0,08
MPE1 + Col8 + FC2.13	L1 + L8 + L5	0,12 ± 0,05	0,17 ± 0,00	0,40 ± 0,01

**Tabla 11.** Degradación de fenol (ensayos en batch) determinada sobre muestras del día 14 de los cultivos crecidos con 40, 100 y 250 mg/l de fenol. Se incubó con 20 mg/l de fenol inicial.

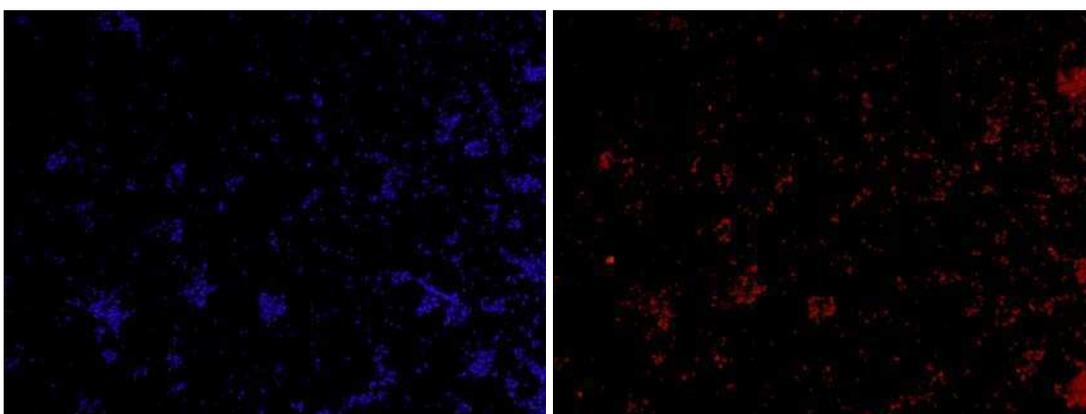
En las figuras 49 a 51 se muestran fotografías representativas de ensayos de hibridación in situ fluorescente para los cultivos conteniendo la mezcla de las tres especies. Se utilizaron sondas específicas elegidas en base a las secuencias del ADN ribosomal 16S.



**Figura 49.** Microfotografía de hibridación in situ fluorescente (aumento 1000X). En azul: tinción con DAPI, en rojo: mismo campo con la sonda DEN220 (específica de MPE1). La muestra fue tomada del cultivo conteniendo las tres especies con 40 mg/l de fenol, en el día 15.

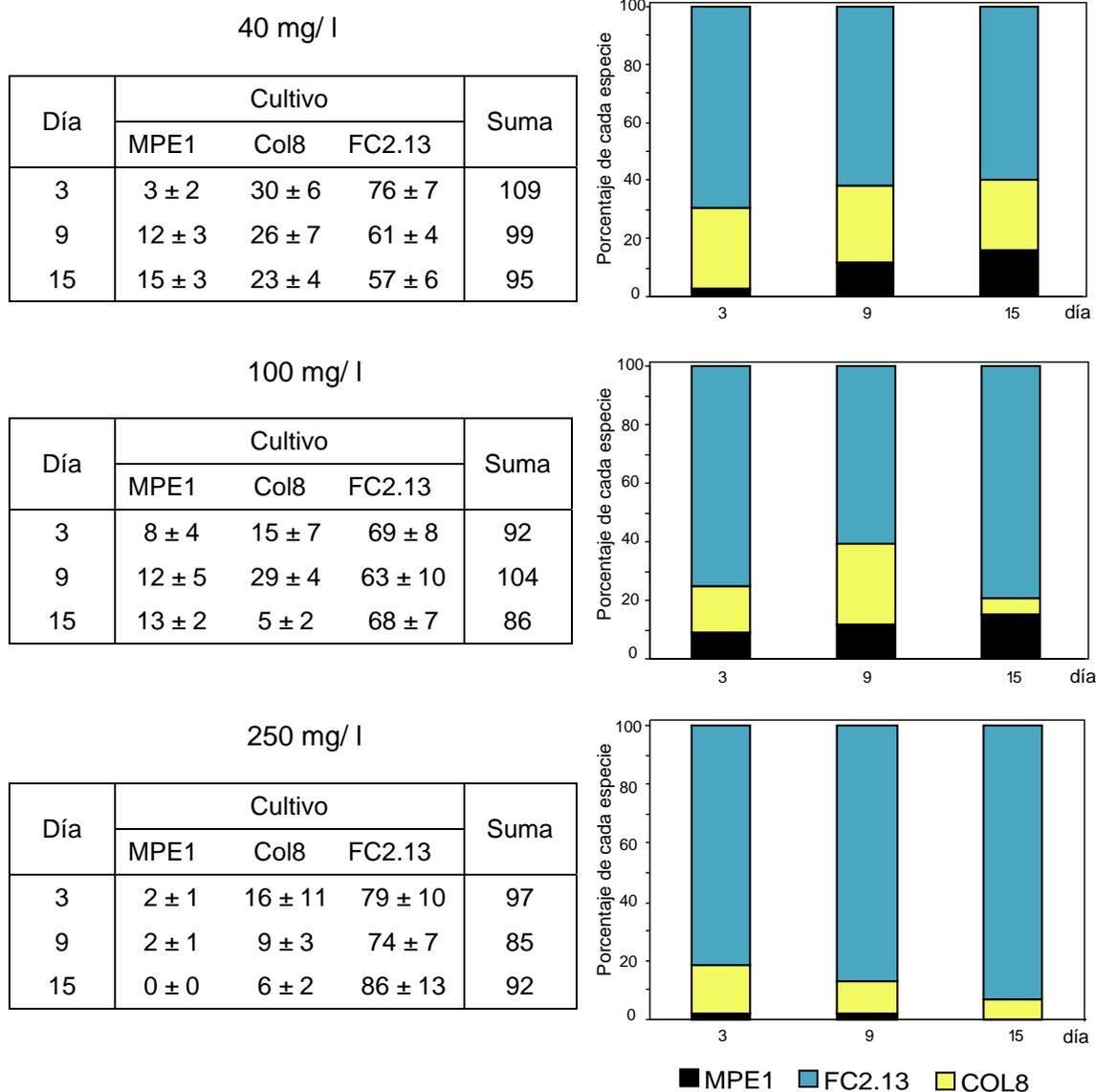


**Figura 50.** Microfotografía de hibridación in situ fluorescente (aumento 1000X). En azul: tinción con DAPI, en rojo: mismo campo con la sonda ALBO577m (específica de Col8). La muestra fue tomada del cultivo conteniendo las tres especies con 40 mg/l de fenol, en el día 15.



**Figura 51.** Microfotografía de hibridación in situ fluorescente (aumento 1000X). En azul: tinción con DAPI, en rojo: mismo campo con la sonda CTE-A (específica de FC2.13). La muestra fue tomada del cultivo conteniendo las tres especies con 250 mg/l de fenol, en el día 15.

La abundancia de cada una con respecto al número de células totales detectadas por tinción con DAPI fue determinada en los días 3, 9 y 15 del experimento (figura 52). Se encontró que la bacteria FC2.13 predominó en todos los casos, siendo su abundancia relativa mayor a la más alta concentración de fenol en el alimento.



**Figura 52.** Resultados de la cuantificación por FISH de muestras del cultivo conteniendo las tres especies con 40, 100 y 250 mg/l de fenol, tomadas en los días 3, 9 y 15. Los valores indican el porcentaje de células detectadas con la sonda correspondiente respecto de las detectadas con DAPI (promedio de 4 a 7 campos representativos, tomados en dos ensayos independientes).

## DISCUSIÓN

La relación entre la estructura de las comunidades microbianas y el funcionamiento de los ecosistemas es un tema fundamental de la ecología microbiana. El conocimiento de los patrones que rigen el ensamblado de las comunidades puede ser de utilidad para predecir el comportamiento de los sistemas frente a los cambios ambientales a los que suelen estar expuestos. El estudio de la diversidad ha sido hasta el momento mayoritariamente encarado desde la diversidad taxonómica. Sin embargo, se cree que sería la diversidad funcional, a través de la redundancia funcional, la que estaría más directamente relacionada con la estabilidad de los sistemas. En este trabajo se estudió la dinámica de las comunidades bacterianas en términos de la diversidad de un gen funcional, además de la diversidad taxonómica, y su relación con el funcionamiento del ecosistema, en un modelo que consiste en la degradación de fenoles en sistemas de barros activados.

Se evaluó en primer lugar el efecto de la aclimatación al fenol sobre la dinámica de las comunidades, operando los reactores bajo condiciones constantes a lo largo de 9 meses, y a continuación se analizó el modo en que las comunidades respondían a un aumento escalonado en la concentración de fenol. El funcionamiento de los reactores se analizó por mediciones de biomasa, niveles de turbidez y de fenol en el sobrenadante y velocidades de degradación. La estructura de la comunidad a nivel taxonómico se estudió por medio de geles de gradiente desnaturalizantes (DGGEs) del dominio V3 de los genes ribosomales 16S. La estructura a nivel funcional se determinó mediante la cuantificación por ensayos de PCR en tiempo real de las distintas variantes del gen LmPH presentes en los reactores. Finalmente, con el objeto de relacionar los patrones de abundancia de los grupos LmPH con sus propiedades cinéticas, se estudiaron representantes de los grupos LmPH obtenidos mediante técnicas de cultivo y aislamiento.

Los grupos LmPH fueron definidos en base a la distancia genética entre las secuencias. No existe hasta el momento un consenso sobre cuál es el valor de distancia genética capaz de diferenciar proteínas según un criterio que sea ecológicamente relevante. En este trabajo se utilizó un nivel de corte de 0,11, dado que los grupos así definidos se correspondían con el agrupamiento observado en los árboles filogenéticos realizados

con los métodos de *neighbour joining* y parsimonia. Previamente, Yannarell *et al* determinaron, a través del uso del programa DOTUR sobre 50 secuencias nifH de organismos cultivados, que la distancia genética que agrupaba consistentemente estas secuencias por especie era de 0,07 (Yannarell *et al.*, 2006). En otro estudio, Taroncher-Oldenberg *et al* propusieron que una distancia del 13% resultaría en un nivel de corte de alta resolución para detectar variaciones en la secuencia del gen *nirS* (Taroncher-Oldenburg *et al.*, 2003). Por lo tanto es razonable suponer que la distancia de 0,11 utilizada en este trabajo refleje diferencias funcionalmente relevantes en cuanto a la actividad de degradación de fenol.

Los perfiles de DGGE de las comunidades bacterianas cambiaron considerablemente a lo largo de 9 meses de operación de los reactores, con una concentración basal de fenol en el alimento de 100 mg/día, revelando un comportamiento dinámico (figura 13). El comportamiento dinámico de las poblaciones parece ser una característica intrínseca de los sistemas biológicos. Se ha observado repetidamente que comunidades bacterianas pueden divergir en bioreactores operados idénticamente y funcionar de modo similar (Fernandez *et al.*, 1999; Kaewpipat and Grady, 2002). Los cambios periódicos observados en los perfiles de DGGE durante la primera parte de este trabajo se dieron de modo similar para los cuatro reactores, tanto los aclimatados al fenol como los controles (sin agregado de fenol), lo que implica que dichos cambios no se deberían a la presencia de fenol en el alimento, sino que estarían probablemente relacionados con un efecto de procesos neutrales sobre las comunidades bacterianas de los reactores.

Una característica particular de los sistemas microbianos complejos es el hecho de que funciones importantes del ecosistema pueden ser desarrolladas por poblaciones numéricamente minoritarias. El análisis de los genes ribosomales no permitió detectar un efecto de la aclimatación al fenol, el cual sí fue evidenciado mediante el estudio de los grupos LmPH. Esto pone en evidencia las limitaciones de las técnicas de *fingerprinting* basadas en los genes ribosomales para monitorear procesos ambientalmente relevantes ejercidos por miembros minoritarios de la comunidad (Wellington *et al.*, 2003). Dado que se espera que poblaciones con abundancias mayores al 1% puedan ser detectadas por DGGE, habría una aparente falta de concordancia entre ambos enfoques, la cual podría atribuirse al hecho de que el número

de células conteniendo cada grupo LmPH deriva de la suma de diferentes poblaciones, cuyas abundancias individuales estarían por debajo del umbral de detección del DGGE. Por otro lado, dado que en algunos casos la localización de los genes LmPH es plasmídica (Bartilson et al., 1990), no puede descartarse que el número de células conteniendo genes LmPH haya sido sobreestimado.

Los cambios en la abundancia proporcional de los grupos LmPH se vieron reflejados por un aumento en el índice de diversidad de Shannon  $H'$  (tabla 5). La diversidad en los genes LmPH fue el único factor directamente relacionado con el aumento en las velocidades de degradación de fenol observado como resultado de la aclimatación (figura 12), sugiriendo que la actividad de degradación dependería de la actividad combinada de un número de especies redundantes.

Los reactores control contuvieron un número importante de copias totales del gen LmPH, no significativamente diferente del número de copias detectado en los reactores tratados. Por lo tanto la abundancia total de genes LmPH no puede ser considerada como un indicador de las velocidades de degradación de fenol. Descartamos que la detección de genes LmPH en los reactores control a lo largo del estudio se deba a la presencia de ADN de células no viables o de ADN desnudo, dado que el tiempo que transcurre entre las mediciones supera al tiempo de retención de sólidos en los reactores y que los barros activados suelen contener un alto número de nucleasas. La presencia de bacterias conteniendo genes LmPH en los reactores control podría deberse al contenido de L-tirosina o ácido p-hidroxibenzoico en la peptona o en el extracto de levadura del medio utilizado para alimentar los reactores. Estos compuestos actuarían como fuente minoritaria de fenoles, dado que se detectó que el alimento contenía una concentración de fenol de 0,28 mg/l.

Tanto el análisis de las secuencias LmPH obtenidas en las bibliotecas como los resultados de la cuantificación por PCR en tiempo real, mostraron que los barros activados se encontraban enriquecidos en genes LmPH del tipo de baja constante de saturación media ( $K_s$ ). Esto estaría relacionado con la forma de alimentación de los reactores, en la cual el alimento es agregado de a poco (33 ml /h) por medio de una bomba peristáltica. De este modo la concentración de fenol en los reactores es siempre baja dado que el fenol va siendo degradado a medida que es incorporado. Esto favorecería la presencia de poblaciones conteniendo genes LmPH de alta afinidad por el

fenol (baja  $K_S$ ). El inóculo original, por el contrario, recibe en la planta de tratamiento altas concentraciones de fenol de los efluentes, lo cual podría explicar el hecho de que aproximadamente la mitad de los genes LmPH, detectados con *primers* cuyo blanco son regiones conservadas de todas las formas de este gen, no fueran detectados con los *primers* diseñados en este trabajo, que corresponden a formas para baja  $K_S$ .

El aumento en la concentración de fenol en el alimento provocó alteraciones en el funcionamiento de los bioreactores. Se observó acumulación de fenol en el sobrenadante de los bioreactores cuando se operó con una carga diaria de 1,5 g (figura 25). Utilizando reactores a escala de laboratorio, operando con fenol como única fuente de carbono, Watanabe *et al* habían observado una salida de régimen de los sistemas de barros activados cuando se aumentó la concentración de fenol de 1 a 2 g/l/d. Encontraron una repentina e importante disminución en la actividad de oxidación de fenol, indicando que ésta habría sido la causa de los altos valores de fenol (superiores a 1 g/l) detectados. Observaron además que la cantidad de biomasa se mantuvo estable durante los primeros días de operar con 2 g/l/d, sugiriendo que a diferencia de la actividad de oxidación, la viabilidad bacteriana en los barros no se habría visto inicialmente alterada (Watanabe and Hino, 1996). Similarmente, en este estudio observamos que los niveles de biomasa no disminuyeron mientras que hubo una importante inhibición en las velocidades de degradación de los barros activados al operar con una carga de 1,5 g/d de fenol (figuras 26 y 28).

Las abundancias relativas de los distintos grupos LmPH se vieron afectadas por la concentración de fenol en el alimento; esto acompañó los cambios observados en las velocidades de degradación de fenol, sugiriendo una relación estructura-función de la comunidad.

La presencia de turbidez en el sobrenadante de los reactores se mantuvo a lo largo de más de un mes de operación con una carga de 1 g/d, desapareciendo finalmente luego de aumentar el contenido de fenol a 1,5 g/d. Al volver a alimentar con la concentración basal de fenol volvió a detectarse turbidez, desapareciendo nuevamente a los pocos días junto con el fenol del sobrenadante. Esto sugiere que niveles altos pero no excesivos de fenol en el sobrenadante favorecerían la presencia de poblaciones no floculadoras en los reactores. Los perfiles de corrida en DGGEs muestran que la defloculación no afecta a todas las especies por igual, dado que ciertas poblaciones

son encontradas principalmente en los flocs o en el sobrenadante (figura 39). La misma conclusión se desprende a partir la diferencia de intensidad observada para los productos de amplificación de PCR de algunos de los genotipos LmPH (figura 40). Watanabe y colaboradores detectaron, utilizando sistemas de barros activados alimentados con fenol, el crecimiento de poblaciones degradadoras de fenol no floculadoras luego de un aumento en la concentración de fenol. El aumento en la abundancia de poblaciones no floculadoras habría sido la causa de la salida de régimen observada (Watanabe et al., 1999).

La tendencia a flocular o a co-flocular es la propiedad que le permite a los microorganismos mantenerse en los reactores, sin ser eliminados en el sobrenadante. Por esa razón, hubiera sido esperable que a partir del momento en que es detectado principalmente en el sobrenadante, el grupo L8 disminuya su proporción relativa en los reactores. Como esto no sucede (figura 35), la conclusión es que se tiene una tasa de crecimiento que le permite compensar su pérdida por “lavado”. Inversamente, los grupos L3, L5 y L6, encontrados mayoritariamente en el floc, no aumentan sus abundancias relativas (figura 35), lo que implica que a pesar de ser preferencialmente retenidos en el floc, su crecimiento no estaría favorecido por las condiciones del medio.

La aplicación de aumentos escalonados en la carga de fenol generó cambios reproducibles en ambas réplicas, tanto en relación a las poblaciones que degradan fenol, medidas en los experimentos de PCR cuantitativa, como a nivel de la estructura general de las comunidades, determinada por DGGE de los genes ribosomales. En ambos enfoques los reactores resultaron agrupados en función de la concentración de fenol, y no por la identidad del reactor. La reproducibilidad de las poblaciones bacterianas en reactores replicados ha sido reconocida como un indicador de selección determinística, de acuerdo a su capacidad para ocupar los nichos disponibles (Curtis and Sloan, 2004; Saikaly et al., 2005; Lozada et al., 2006; McGuinness et al., 2006; Ayarza et al., 2009; Falk et al., 2009; Wittebolle et al., 2009). La similitud en los patrones de abundancia de los genes LmPH fue asimismo mantenida a las concentraciones más altas de fenol, indicando que la tolerancia a la toxicidad del fenol podría dirigir parcialmente los cambios detectados.

Al mismo tiempo, cambios debidos a efectos estocásticos también pueden ser inferidos a partir de las comunidades de los reactores control: se observó una mayor divergencia

entre las réplicas tanto en el análisis de los genes LmPH como en el de los genes ribosomales 16S (figuras 37 y 30). Si el ensamblado de las comunidades está dirigido por eventos estocásticos, entonces comunidades replicadas que se desarrollan bajo las mismas condiciones ambientales pueden diferir en cuanto a la composición o abundancia relativa de sus poblaciones. El efecto de los procesos neutrales en el ensamblado de las comunidades bacterianas fue sugerido a partir de la divergencia en la composición de comunidades en réplicas de reactores anaeróbicos (Fernandez et al., 1999), en barros activados (Kaewpipat and Grady, 2002), en reactores desnitrificantes (Gentile et al., 2007), y en microcosmos replicados recibiendo pulsos discretos de proteínas (Carrero-Colon et al., 2006; Konopka et al., 2007).

En relación al debate sobre la importancia relativa de la dinámica neutral y determinística sobre la composición de las comunidades, se plantea que el modelo neutral sería un caso especial que se da en ausencia de mecanismos de estabilización y en presencia de especies con *fitness* equivalentes (Adler et al., 2007). Chase sugirió que la influencia de cada factor dependería de la hostilidad del ambiente físico: los procesos estocásticos prevalecerían en hábitats benignos, donde distintas especies pueden ocupar los nichos disponibles, mientras que los procesos determinísticos prevalecerían bajo condiciones ambientales hostiles, donde nichos especializados seleccionan a las especies que contienen caracteres apropiados (Chase, 2007). Esta predicción fue confirmada por van der Gast *et al*, quienes encontraron que la estructuración de las comunidades en bioreactores pasaba de tener un carácter predominantemente estocástico a uno determinístico tras la aplicación de una presión de selección creciente (van der Gast et al., 2008). En este trabajo, el requerimiento de poblaciones especializadas para degradar y/o tolerar fenoles podría explicar por qué los reactores expuestos a las más altas concentraciones de fenol presentan una baja divergencia, quedando ubicados próximos en los gráficos de ordenamiento a pesar de que las condiciones ambientales fueron importantemente alteradas.

Como ya se mencionó anteriormente, las comunidades de los reactores analizadas en base a los perfiles de DGGEs agruparon de acuerdo a la concentración de fenol en el alimento (figura 30). Este agrupamiento es el resultado de los cambios en las abundancias relativas de las poblaciones detectadas por DGGE. Una de las poblaciones que aumentó su abundancia con el aumento de fenol fue clasificada en el orden

*Actinomycetales*, dentro de las bacterias gram positivas con alto contenido de GC (H-GC), apareciendo a muy altas concentraciones de desnaturalizante en el DGGE (figura 29 y tabla 6). Las bacterias gram positivas H-GC no fueron miembros dominantes en otros sistemas de barros activados que degradan fenol (Watanabe et al., 1998; 1999; Whiteley et al., 2001). La presencia de altas abundancias de esta población en los barros expuestos a altas concentraciones de fenol podría estar relacionada con su tolerancia al fenol, dado que se sabe que este tipo de organismos suelen ser resilientes a perturbaciones externas debido a la presencia de una fuerte envoltura celular (Zhuang et al., 2003). Dos especies del género *Comamonas* y una de la familia *Comamonadaceae* se vieron también favorecidas por el aumento de fenol, sin embargo otros géneros de la misma familia disminuyeron (*Simplicispira*) o no variaron (*Delftia*) su abundancia relativa. Por lo tanto en el caso de las bacterias pertenecientes a la familia *Comamonadaceae* los cambios en las abundancias relativas dependerían más probablemente de características particulares de cada género. El aislamiento FC2.13 también fue clasificado dentro del género *Comamonas*; esta bacteria contenía un gen LmPH del tipo L5, siendo la abundancia relativa de este grupo LmPH máxima a concentraciones intermedias de fenol.

Una gran proporción de las bacterias detectadas en este trabajo, ya sea por secuenciación de bandas de DGGEs o mediante diversos métodos de aislamiento, corresponden a  $\beta$ -Proteobacterias. Este resultado concuerda con estudios previos en los cuales se observó, mediante técnicas de clonado, de FISH o de aislamiento, que las  $\beta$ -Proteobacterias constituían una amplia fracción de las bacterias presentes en plantas de tratamiento de efluentes (Bond et al., 1995; Snaidr et al., 1997) o en gránulos aeróbicos (Jiang et al., 2004). Miembros del grupo de las  $\beta$ -Proteobacterias han demostrado además estar involucrados en la degradación de fenol en barros activados (Watanabe et al., 1998). La mayoría de las bacterias degradadoras de fenol pertenecientes al grupo de baja  $K_S$  de la enzima mPH que han sido caracterizadas corresponden a  $\beta$ -Proteobacterias, mientras que las de los grupos de moderada y alta  $K_S$  suelen estar relacionadas con las  $\gamma$ -Proteobacterias, especialmente con el género *Pseudomonas* (Zhang et al., 2004). Similarmente, el único aislamiento obtenido en este trabajo que perteneció al grupo de moderada  $K_S$  de la enzima mPH, fue caracterizado genotípicamente y fenotípicamente como un miembro del género *Pseudomonas*.

Los índices de Shannon y las curvas de Lorenz (figura 36) mostraron una tendencia, aunque no significativa, de máxima diversidad y equitatividad, respectivamente, a concentraciones intermedias de fenol (1 g/d). El grupo L1 (o L1+L2) fue siempre un miembro predominante mientras los reactores operaron con bajas cargas de fenol en el alimento (0,28 y 100 mg/l). El aumento de otros grupos LmPH con mayores niveles de fenol podría deberse a la disponibilidad de los nichos previamente ocupados por especies conteniendo el grupo L1, o a la mayor cantidad de recurso (fenol) presente en los reactores. Es interesante que el número de copias totales del gen LmPH no fue significativamente diferente del de los reactores control, aunque desconocemos las razones que explican la constancia de este valor.

Con el objeto de relacionar los cambios en las abundancias relativas de los grupos LmPH con las características cinéticas de la degradación de fenol, se aislaron bacterias conteniendo la mayoría de los genotipos LmPH detectados en las bibliotecas de clones LmPH. En trabajos previos, Futamata *et al* habían encontrado que la clasificación filogenética de diferentes genotipos LmPH correlacionaba con las propiedades cinéticas de la degradación de fenol de las bacterias analizadas (Futamata et al., 2001). De este modo bacterias que presentaban mayor afinidad por el fenol (baja  $K_S$ ) podían ser distinguidas en base a la presencia de determinados aminoácidos en las secuencias de sus genes LmPH. Observaron además que las bacterias que tenían una alta afinidad por el fenol presentaban altos niveles de actividad para la degradación de tricloroetileno (TCE). Dada la toxicidad de este compuesto, las bacterias degradadoras de fenol del tipo de baja  $K_S$  adquieren un interés adicional. Los mismos autores reportaron más tarde cepas que contenían genes LmPH del tipo de baja  $K_S$  pero que no eran eficientes para la degradación de TCE (Futamata et al., 2005). En este trabajo se detectaron, mediante clonado o aislamiento, dos nuevas poblaciones LmPH (grupos L7 y L8) para las cuales las secuencias aminoacídicas derivadas incluyeron una mezcla de aminoácidos característicos. Las propiedades cinéticas de estas cepas en relación a la degradación de cosustratos como el TCE y su posible utilidad para la bioremediación de ambientes contaminados con compuestos policlorados será una tarea que se encarará en estudios futuros.

En este estudio, los microorganismos aislados exhibieron un rango de diversidad fisiológica relativamente acotado, en el cual ni las velocidades de crecimiento ni los

parámetros cinéticos para la actividad de oxidación de fenol de las bacterias aisladas correlacionaron con los cambios en las abundancias relativas de los genotipos LmPH a las diferentes cargas de fenol. Esto contrasta con los estudios de Jiang *et al* (Jiang *et al.*, 2006), quienes encontraron un amplio rango de diversidad fisiológica para la degradación de fenol en diez cepas bacterianas aisladas de gránulos. La diferencia puede ser atribuída a la mayor heterogeneidad de nichos presente en los gránulos en comparación con los sistemas de barros activados (Jiang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009): la estructura granular facilitaría la aparición de gradientes químicos llevando a la formación de una mayor variedad de nichos ecológicos.

Si bien la proporción de los distintos grupos LmPH cambió considerablemente con el aumento en la concentración de fenol, ninguno de los grupos fue completamente desplazado, indicando que poblaciones que serían funcionalmente redundantes pudieron coexistir en los cuatro reactores durante todo el período analizado. Sin embargo, cabe mencionar que el número de genes funcionales presentes en una muestra no provee necesariamente información acerca de la expresión y la actividad de los microorganismos que contienen estos genes. Por ejemplo, una cepa de *Variovorax* conteniendo genes PH no pudo crecer en fenol como única fuente de carbono (Futamata *et al.*, 2003). La falta de expresión del gen LmPH tras inducción con fenol también fue reportada en cepas de *Pseudomonas* (Merimaa *et al.*, 2006). En este caso la expresión de los distintos genes LmPH fue verificada a los 22 y a los 86 días de operación mediante la detección de sus ARN mensajeros (figuras 38 y 39).

La co-ocurrencia de especies con funciones similares podría favorecer la estabilidad de un ecosistema mediante redundancia funcional. Desde un punto de vista práctico, esta idea ha sido discutida en términos de las estrategias de bioaumentación, sugiriendo que la inoculación de varias cepas funcionalmente similares podría resultar más efectivo que la inoculación con una única cepa (Jiang *et al.*, 2007). En relación a este tema, este trabajo sugiere que la capacidad de una cepa particular de volverse un miembro dominante de la comunidad bajo condiciones ambientales cambiantes no puede ser inferida únicamente de sus propiedades de degradación de fenol.

Buscando analizar si la coexistencia era aún posible en ambientes homogéneos y menos complejos, se utilizaron modelos simplificados en los cuales las especies MPE1,

Col8 y FC2.13 fueron incubadas en medio mínimo a tres concentraciones de fenol. Los experimentos de ensamblado mostraron que en ciertas condiciones las tres especies coexistieron, pudiendo ser detectadas por FISH hasta el final del ensayo. Este resultado estaría en contradicción con el principio de exclusión competitiva, que propone que el número de especies presentes en un sistema no puede ser mayor al número de recursos limitantes. Este concepto presupone que el resultado de la competencia por los recursos llevaría a un estado de equilibrio en el cual las especies competitivamente dominantes excluirían a las especies restantes. Sin embargo, Huisman y Weissing sugirieron, a partir del estudio de comunidades de fitoplancton, que condiciones de no equilibrio y oscilaciones en la estructura de las comunidades permitirían la coexistencia de un mayor número de especies que recursos limitantes (Huisman and Weissing, 1999). Posteriormente, mediante el desarrollo de un modelo mecanístico aplicado sobre seis especies bacterianas aeróbicas heterotróficas, Oerther y colaboradores encontraron que el principio de exclusión competitiva no sería el único mecanismo que determina el resultado de la competencia (Saikaly and Oerther, 2004). Las simulaciones mostraron que el número de especies dentro de un mismo grupo funcional podía exceder al número de recursos limitantes disponibles frente a condiciones de no equilibrio y a oscilaciones en la abundancia de las especies, permitiendo la coexistencia y por lo tanto aumentando la diversidad (Saikaly and Oerther, 2004).

Las bacterias utilizadas para los ensayos de ensamblado fueron seleccionadas por ser cada una representante de los grupos LmPH que cambiaron principalmente su abundancia relativa en los reactores de acuerdo a la cantidad de fenol agregada en el alimento. Sin embargo no se observó una correlación entre los resultados de los reactores y los obtenidos en los ensayos de ensamblado. Los menores números celulares detectados para MPE1 en todas las concentraciones de fenol ensayadas, aún cuando todo el fenol había sido degradado al final de cada pulso de alimentación, sugieren diferencias en cuanto a características del crecimiento celular y al modo en que utilizan los recursos. La caracterización fisiológica había indicado que este aislamiento presentaba una baja velocidad de crecimiento y una alta afinidad por el fenol (tabla10). La bacteria FC2.13 fue predominante a las tres concentraciones de fenol, representando entre el 60 y el 86 % de las células totales en los cultivos inoculados con las tres especies. La mayor abundancia se detectó en los cultivos conteniendo 250 mg/l de fenol, lo que podría estar relacionado con las mayores velocidades de degradación que

se obtuvieron en estas condiciones. Asimismo, este cultivo fue el que presentó la mayor velocidad de oxigenación de fenol (tabla 10). Con respecto a los cultivos individuales, las tres bacterias pudieron crecer a las tres concentraciones, indicando que no habría un efecto tóxico del fenol en estas cantidades. La bacteria Col8, conteniendo el grupo LmPH L8, cuya abundancia relativa en los reactores aumentó considerablemente a las concentraciones más altas de fenol en el alimento (parte 2), no presentó altos números en ninguno de los cultivos conteniendo a las tres especies. Esto podría deberse a que las cantidades de fenol utilizadas en estos ensayos estarían por debajo de las concentraciones presentes en los reactores durante la alimentación con 1 y 1,5 g/d de fenol. La bacteria MPE1 (grupo L1) no fue abundante al alimentar con la menor concentración de fenol, mientras que su grupo LmPH fue predominante en los reactores con la concentración basal de fenol. Similarmente esta diferencia podría deberse a que la menor concentración utilizada en estos ensayos (40 mg/l) podría ser todavía demasiado alta en comparación con la concentración presente en los reactores. La bacteria FC2.13, conteniendo al grupo L5, cuya abundancia en los reactores fue mayor a las concentraciones intermedias de fenol, predominó en todas las condiciones ensayadas, sugiriendo también que las tres concentraciones elegidas para estos ensayos corresponderían a una situación de concentraciones intermedias de fenol en los reactores. Debe tenerse en cuenta las diferencias entre ambos enfoques: los ensayos de cultivo se realizaron utilizando un único sustrato, el cual era incorporado por pulsos de alimentación en un ambiente homogéneo. Al utilizar fenol como única fuente de carbono y energía, el crecimiento era prácticamente indetectable por debajo de los 40 mg/l. Por otro lado, el límite superior de la concentración de fenol estaba dado por la toxicidad del pulso de fenol en el experimento. El uso de un sistema de quimiostato podría permitir analizar si concentraciones más altas de fenol reproducen los patrones de abundancia observados en los reactores.

Finalmente, no se puede descartar que las bacterias conteniendo un mismo grupo LmPH no sean ecológicamente equivalentes. Una respuesta a este interrogante podría obtenerse a través del aislamiento y la caracterización de un alto número de bacterias conteniendo el mismo gen LmPH. Si bien los aislamientos utilizados contenían los genes LmPH correspondientes a los grupos L1, L5 y L8, el DGGE de los genes ribosomales indicó que no eran miembros predominantes de las comunidades de los reactores (figura 45). Por lo tanto, en el caso en que la hipótesis de equivalencia

ecológica de especies del mismo grupo LmPH sea rechazada, sólo se podrían extrapolar los resultados de los ensayos de ensamblado si se asegura que las cepas utilizadas son predominantes en los reactores. Podemos anticipar que esta tarea no será trivial, ya que en el intento de obtener bacterias conteniendo las distintas variantes LmPH, utilizando diversas condiciones de cultivo, sólo dos de las bacterias aisladas correspondieron a miembros predominantes de las comunidades de los reactores.

En resumen, la aplicación de métodos moleculares para la detección y cuantificación de genes específicos ha permitido avanzar en la comprensión de la estructura y dinámica de comunidades bacterianas complejas. La reproducibilidad en la distribución de abundancia de los genotipos LmPH sugiere la existencia de reglas que determinan los patrones observados, por encima de los cambios estocásticos observados sobre la dinámica de las comunidades bacterianas.

En este trabajo, los resultados obtenidos mediante el uso de herramientas moleculares se han complementado con estudios fisiológicos y bioquímicos. Las características cinéticas de la degradación de fenol y los parámetros de crecimiento de las bacterias aisladas no son las únicas propiedades que determinan la capacidad de una bacteria en particular de ser un miembro predominante de la comunidad bajo las condiciones ambientales examinadas. Este resultado resalta la importancia del aislamiento y caracterización de cepas ecológicamente relevantes en el estudio de comunidades microbianas. En el futuro será importante realizar esfuerzos adicionales de aislamiento, junto con el estudio de más caracteres fisiológicos, entre otros la tendencia a flocular o co-flocular, para ayudar a inferir las reglas que gobiernan el ensamblado de las comunidades bacterianas en los barros activados.

## CONCLUSIONES

El uso de *primers* específicos de grupo diseñados a partir de bibliotecas de clones obtenidas de los sistemas bajo estudio resultó una estrategia adecuada para evaluar la redundancia funcional en ambientes complejos.

El aumento en la actividad de degradación de fenol en los reactores aclimatados al fenol fue acompañado por un aumento en la diversidad de los genes LmPH. Esto sugiere que la actividad de degradación de fenol en el sistema es debida a la acción combinada de un número de organismos funcionalmente redundantes.

Encontramos una coexistencia replicable de especies redundantes, en donde la abundancia relativa de cada especie parece determinada por la concentración de fenol en el alimento. La comparación de los patrones de abundancia de las poblaciones que degradan fenol sugiere un grado de determinismo considerable, en el cual las poblaciones serían reclutadas en a base a caracteres ecológicos particulares que posiblemente determinen su abundancia relativa en la comunidad.

Se obtuvieron 13 aislamientos utilizando un amplio rango de condiciones de cultivo, encontrando al menos un representante para siete de las ocho poblaciones. Las características cinéticas de la degradación de fenol y los parámetros de crecimiento de las bacterias aisladas no son suficientes para determinar la capacidad de una bacteria en particular de volverse un miembro predominante de la comunidad bajo las condiciones ambientales examinadas, por lo que caracteres fisiológicos adicionales serían necesarios para inferir las reglas que gobiernan el ensamblado de las comunidades bacterianas en los barros activados.

**REFERENCIAS**

- Adler, P.B., Hillerislambers, J., and Levine, J.M. (2007). A niche for neutrality. *Ecol Lett* 10, 95-104.
- Allison, S.D., and Martiny, J.B. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 Suppl 1, 11512-11519.
- Ambujom, S. (2001). Studies on composition and stability of a large membered bacterial consortium degrading phenol. *Microbiol Res* 156, 293-301.
- Amor, L., Eiroa, M., Kennes, C., and Veiga, M.C. (2005). Phenol biodegradation and its effect on the nitrification process. *Water Res* 39, 2915-2920.
- Aoki, I. (2003). Diversity-productivity-stability relationship in freshwater ecosystems: Whole-systemic view of all trophic levels. *Ecological Research* 18, 397–404.
- Ayala-del-Rio, H.L., Callister, S.J., Criddle, C.S., and Tiedje, J.M. (2004). Correspondence between community structure and function during succession in phenol- and phenol-plus-trichloroethene-fed sequencing batch reactors. *Appl Environ Microbiol* 70, 4950-4960.
- Ayarza, J.M., Guerrero, L.D., and Erijman, L. (2009). Nonrandom assembly of bacterial populations in activated sludge flocs. *Microb Ecol*, in press.
- Baker, P., Futamata, H., Harayama, S., and Watanabe, K. (2001). Molecular diversity of pMMO and sMMO in a TCE-contaminated aquifer during bioremediation. *FEMS Microbiol Ecol* 38, 161–167.
- Baptista, J., Davenport, R., Donnelly, T., and Curtis, T. (2008). The microbial diversity of laboratory-scale wetlands appears to be randomly assembled. *Water Res* 42, 3182-3190.
- Bartilson, M., Nordlund, I., and Shingler, V. (1990). Location and organization of the dimethylphenol catabolic genes of *Pseudomonas* CF600. *Mol Gen Genet* 220, 294-300.
- Bathe, S., and Hausner, M. (2006). Design and evaluation of 16S rRNA sequence based oligonucleotide probes for the detection and quantification of *Comamonas testosteroni* in mixed microbial communities. *BMC Microbiol* 6, 54.

- Bell, G. (2000). The Distribution of Abundance in Neutral Communities. *Am Nat* 155, 606-617.
- Bond, P.L., Hugenholtz, P., Keller, J., and Blackall, L.L. (1995). Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. *Appl Environ Microbiol* 61, 1910-1916.
- Carrero-Colon, M., Nakatsu, C.H., and Konopka, A. (2006). Microbial community dynamics in nutrient-pulsed chemostats. *FEMS Microbiol Ecol* 57, 1-8.
- Clesceri, L., Greenberg, A., and Eaton, A. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. (Washington).
- Connell, J.H. (1978). Diversity in Tropical Rain Forests and Coral Reefs. *Science* 199, 1302-1310.
- Curtis, T.P., and Sloan, W.T. (2004). Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr Opin Microbiol* 7, 221-226.
- Chase, J.M. (2007). Drought mediates the importance of stochastic community assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17430-17434.
- Chen, C.L., Wu, J.H., and Liu, W.T. (2008). Identification of important microbial populations in the mesophilic and thermophilic phenol-degrading methanogenic consortia. *Water Res* 42, 1963-1976.
- Chen, G.Y., Qiu, S.L., and Zhou, Y.Y. (2009). Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria in eutrophic and oligotrophic basins of a shallow Chinese lake (Lake Donghu). *Res Microbiol* 160, 173-178.
- Chesson, P. (2000). Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31, 343–366.
- Daims, H., Taylor, M.W., and Wagner, M. (2006). Wastewater treatment: a model system for microbial ecology. *Trends Biotechnol* 24, 483-489.
- de Lorenzo, V. (2001). Cleaning up behind us. The potential of genetically modified bacteria to break down toxic pollutants in the environment. *EMBO Rep* 2, 357-359.

Diaz, E. (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol* 7, 173-180.

Ehrt, S., Schirmer, F., and Hillen, W. (1995). Genetic organization, nucleotide sequence and regulation of expression of genes encoding phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *Mol Microbiol* 18, 13-20.

Ellis, R.J., Thompson, I.P., and Bailey, M.J. (1999). Temporal fluctuations in the pseudomonad population associated with sugar beet leaves. *FEMS Microbiol Ecol* 28, 345 - 356.

Eviner, V.T., and Chapin III, F.S. (2003). Functional Matrix: A conceptual framework for predicting multiple plant effects on ecosystem processes *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34, 455–485.

Faith, D., Minchin, P., and Belbin, L. (1987). Compositional dissimilarity as a robust measure of ecological distance. *Vegetatio* 69, 57–68.

Falk, M.W., Song, K.G., Matiasek, M.G., and Wuertz, S. (2009). Microbial community dynamics in replicate membrane bioreactors - Natural reproducible fluctuations. *Water Res* 43, 842-852.

Fernandez, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C., and Tiedje, J. (1999). How stable is stable? Function versus community composition. *Appl Environ Microbiol* 65, 3697-3704.

Folsom, B.R., Chapman, P.J., and Pritchard, P.H. (1990). Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates. *Appl Environ Microbiol* 56, 1279-1285.

Friedrich, U., Van Langenhove, H., Altendorf, K., and Lipski, A. (2003). Microbial community and physicochemical analysis of an industrial waste gas biofilter and design of 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Environ Microbiol* 5, 183-201.

Futamata, H., Harayama, S., and Watanabe, K. (2001). Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 67, 4671-4677.

Futamata, H., Harayama, S., Hiraishi, A., and Watanabe, K. (2003). Functional and structural analyses of trichloroethylene-degrading bacterial communities under different

phenol-feeding conditions: laboratory experiments. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 594-600.

Futamata, H., Nagano, Y., Watanabe, K., and Hiraishi, A. (2005). Unique kinetic properties of phenol-degrading *Variovovax* strains responsible for efficient trichloroethylene degradation in a chemostat enrichment culture. *Appl Environ Microbiol* 71, 904-911.

Gentile, M.E., Jessup, C.M., Nyman, J.L., and Criddle, C.S. (2007). Correlation of functional instability and community dynamics in denitrifying dispersed-growth reactors. *Appl Environ Microbiol* 73, 680-690.

Ginige, M.P., Keller, J., and Blackall, L.L. (2005). Investigation of an acetate-fed denitrifying microbial community by stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent in situ hybridization-microautoradiography. *Appl Environ Microbiol* 71, 8683-8691.

Godon, J.J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., and Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 63, 2802-2813.

Gonzalez, G., Herrera, M.G., Garcia, M.T., and Pena, M.M. (2001). Biodegradation of phenol in a continuous process: comparative study of stirred tank and fluidized-bed bioreactors. *Bioresour Technol* 76, 245-251.

Good, I.J. (1953). The population frequencies of species and the estimation of population parameters, pp. 237-264.

Goswami, M., Shivaraman, N., and Singh, R.P. (2005). Microbial metabolism of 2-chlorophenol, phenol and rho-cresol by *Rhodococcus erythropolis* M1 in co-culture with *Pseudomonas fluorescens* P1. *Microbiol Res* 160, 101-109.

Graham, D.W., and Smith, V.H. (2004). Designed ecosystem services: application of ecological principles in wastewater treatment engineering. *Front Ecol Environ* 2, 199-206.

Griffiths, B.S., Kuan, H.L., Ritz, K., Glover, L.A., McCaig, A.E., and Fenwick, C. (2004). The relationship between microbial community structure and functional stability, tested experimentally in an upland pasture soil. *Microb Ecol* 47, 104-113.

- Harayama, S., Kok, M., and Neidle, E.L. (1992). Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu Rev Microbiol* 46, 565-601.
- Hill, G.A., and Robinson, C.W. (1975). Substrate inhibition kinetics: Phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Bioeng* 17, 1599-1615.
- Hino, S., Watanabe, K., and Takahasbi, N. (1998). Phenol hydroxylase cloned from *Ralstonia eutropha* strain E2 exhibits novel kinetic properties. *Microbiology* 144, 1765-1772.
- Hubbell, S.P. (2001). *The unified neutral theory of biodiversity and biogeography*. (Princeton: Princeton University Press).
- Huisman, J., and Weissing, F.J. (1999). Biodiversity of plankton by species oscillations and chaos. *Nature* 402, 407-410.
- Huston, M. (1997). Hidden treatments in ecological experiments: re-evaluating the ecosystem function of biodiversity. *Oecologia* 110, 449-460.
- Jiang, H.L., Maszenan, A.M., and Tay, J.H. (2007). Bioaugmentation and coexistence of two functionally similar bacterial strains in aerobic granules. *Appl Microbiol Biotechnol* 75, 1191-1200.
- Jiang, H.L., Tay, J.H., Maszenan, A.M., and Tay, S.T. (2004). Bacterial diversity and function of aerobic granules engineered in a sequencing batch reactor for phenol degradation. *Appl Environ Microbiol* 70, 6767-6775.
- Jiang, H.L., Tay, S.T., Maszenan, A.M., and Tay, J.H. (2006). Physiological traits of bacterial strains isolated from phenol-degrading aerobic granules. *FEMS Microbiol Ecol* 57, 182-191.
- Kaewpipat, K., and Grady, C.P.L. (2002). Microbial population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors. *Water Sci Technol* 46, 19-27.
- Kapley, A., and Purohit, H.J. (2009). Diagnosis of treatment efficiency in industrial wastewater treatment plants: a case study at a refinery ETP. *Environ Sci Technol* 43, 3789-3795.
- Kibret, M., Somitsch, W., and Robra, K. (2000). Characterization of phenol-degrading mixed population by enzyme assay. *Water Res* 34, 1127-1134.

Kim, D.J., Choi, J.W., Choi, N.C., Mahendran, B., and Lee, C.E. (2005). Modeling of growth kinetics for *Pseudomonas* spp. during benzene degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 69, 456-462.

Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R., and Schmidt, T.M. (2001). rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res* 29, 181-184.

Konopka, A., Carrero-Colon, M., and Nakatsu, C.H. (2007). Community dynamics and heterogeneities in mixed bacterial communities subjected to nutrient periodicities. *Environ Microbiol* 9, 1584-1590.

Kumar, M., and Khanna, S. (2009). Diversity of 16S rRNA and dioxygenase genes detected in coal-tar-contaminated site undergoing active bioremediation. *J Appl Microbiol*, in press.

Lavorel, S., and Garnier, E. (2002). Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail *Functional Ecology* 16, 545-556.

Li, Q., Luan, G., Guo, Q., and Liang, J. (2002). A new class of homogeneous nucleic acid probes based on specific displacement hybridization. *Nucleic Acids Res* 30, E5.

Liu, Q.S., Liu, Y., Show, K.Y., and Tay, J.H. (2009). Toxicity effect of phenol on aerobic granules. *Environ Technol* 30, 69-74.

Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J.P., Hector, A., Hooper, D.U., Huston, M.A., Raffaelli, D., Schmid, B., Tilman, D., and Wardle, D.A. (2001). Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science* 294, 804-808.

Lorenz, M.O. (1905). Methods of measuring the concentration of wealth *Publications of the American Statistical Association* 9, 209-219.

Lovley, D.R. (2003). Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nat Rev Microbiol* 1, 35-44.

Lozada, M., Figuerola, E.L., Itria, R.F., and Erijman, L. (2006). Replicability of dominant bacterial populations after long-term surfactant-enrichment in lab-scale activated sludge. *Environ Microbiol* 8, 625-638.

- Lynch, J.M. (2002). Resilience of the rhizosphere to anthropogenic disturbance. *Biodegradation* 13, 21-27.
- Magurran, A. (2004). *Measuring Biological Diversity*. (Blackwell Publishing).
- May, R.M. (1988). How Many Species Are There on Earth? *Science* 241, 1441-1449.
- McGuinness, L.M., Salganik, M., Vega, L., Pickering, K.D., and Kerkhof, L.J. (2006). Replicability of bacterial communities in denitrifying bioreactors as measured by PCR/T-RFLP analysis. *Environ Sci Technol* 40, 509-515.
- Merimaa, M., Heinaru, E., Liivak, M., Vedler, E., and Heinaru, A. (2006). Grouping of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase genes among phenol- and p-cresol-degrading *Pseudomonas* species and biotypes. *Arch Microbiol* 186, 287-296.
- Mertens, B., Boon, N., and Verstraete, W. (2005). Stereospecific effect of hexachlorocyclohexane on activity and structure of soil methanotrophic communities. *Environ Microbiol* 7, 660-669.
- Miteva, V.I., Sheridan, P.P., and Brenchley, J.E. (2004). Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep greenland glacier ice core. *Appl Environ Microbiol* 70, 202-213.
- Mosier, A.C., and Francis, C.A. (2008). Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary. *Environ Microbiol* 10, 3002-3016.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., and 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. *Appl Environ Microbiol* 59, 695-700.
- Naeem, S., and Li, S. (1997). Biodiversity enhances ecosystem reliability. *Nature* 390, 507-509.
- Ng, L., Poh, C., and Shingler, V. (1995). Aromatic effector activation of the NtrC-like transcriptional regulator PhhR limits the catabolic potential of the (methyl)phenol degradative pathway it controls. *J Bacteriol* 177, 1485-1490.
- Ni Chadhain, S.M., Norman, R.S., Pesce, K.V., Kukor, J.J., and Zylstra, G.J. (2006). Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. *Appl Environ Microbiol* 72, 4078-4087.

- Nichols, D. (2007). Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiol Ecol* 60, 351-357.
- Norberg, J., Swaney, D.P., Dushoff, J., Lin, J., Casagrandi, R., and Levin, S.A. (2001). Phenotypic diversity and ecosystem functioning in changing environments: a theoretical framework. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11376-11381.
- Nordlund, I., Powlowski, J., and Shingler, V. (1990). Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J Bacteriol* 172, 6826–6833
- Notomista, E., Lahm, A., Di Donato, A., and Tramontano, A. (2003). Evolution of bacterial and archaeal multicomponent monooxygenases. *J Mol Evol* 56, 435-445.
- Novak, J.T., Verma, N., and Muller, C.D. (2007). The role of iron and aluminium in digestion and odor formation. *Water Sci Technol* 56, 59-65.
- Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J., and Olsen, G.J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. (New York: Plenum).
- Quinn, G., and Keough, M. (2002). Experimental design and data analysis for biologists. (Cambridge University Press).
- Rainey, F.A., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R.M., and Stackebrandt, E. (1996). The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* 46, 1088-1092.
- Ritz, K. (2007). The plate debate: cultivable communities have no utility in contemporary environmental microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 60, 358-362.
- Saeki, H., Akira, M., Furuhashi, K., Averhoff, B., and Gottschalk, G. (1999). Degradation of trichloroethene by a linear-plasmid-encoded alkene monooxygenase in *Rhodococcus corallinus* (*Nocardia corallina*) B-276. *Microbiology* 145 ( Pt 7), 1721-1730.
- Sahan, E., and Muyzer, G. (2008). Diversity and spatio-temporal distribution of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in sediments of the Westerschelde estuary. *FEMS Microbiol Ecol* 64, 175-186.

- Saikaly, P.E., and Oerther, D.B. (2004). Bacterial competition in activated sludge: theoretical analysis of varying solids retention times on diversity. *Microb Ecol* 48, 274-284.
- Saikaly, P.E., Stroot, P.G., and Oerther, D.B. (2005). Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 71, 5814-5822.
- Schloss, P.D., and Handelsman, J. (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* 71, 1501-1506.
- Seviour, R.J., Mino, T., and Onuki, M. (2003). The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiol Rev* 27, 99-127.
- Shingler, V., Franklin, F.C., Tsuda, M., Holroyd, D., and Bagdasarian, M. (1989). Molecular analysis of a plasmid-encoded phenol hydroxylase from *Pseudomonas* CF600. *J Gen Microbiol* 135, 1083-1092.
- Sikkema, J., de Bont, J.A., and Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem* 269, 8022-8028.
- Sikkema, J., de Bont, J.A., and Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 59, 201-222.
- Silvertown, J. (2004). Plant coexistence and the niche. *Trends Ecol Evol* 19, 605-611.
- Sizova, M.V., Panikov, N.S., Tourova, T.P., and Flanagan, P.W. (2003). Isolation and characterization of oligotrophic acido-tolerant methanogenic consortia from a Sphagnum peat bog. *FEMS Microbiol Ecol* 45, 301-315.
- Sloan, W.T., Lunn, M., Woodcock, S., Head, I.M., Nee, S., and Curtis, T.P. (2006). Quantifying the roles of immigration and chance in shaping prokaryote community structure. *Environ Microbiol* 8, 732-740.
- Smith, C.J., and Nedwell, D.B. (2006). *Environ Microbiol* 8, 804-815.
- Snaird, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1997). Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 63, 2884-2896.

- Staley, J.T., and Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* 39, 321-346.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.
- Taroncher-Oldenburg, G., Griner, E.M., Francis, C.A., and Ward, B.B. (2003). Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Appl Environ Microbiol* 69, 1159.
- Teramoto, M., Ohnishi, K., Harayama, S., and Watanabe, K. (2002). An AraC/Xy1S family member at a high level in a hierarchy regulators for phenol-metabolizing enzymes in *Comamonas testosteroni* R5. *J Bacteriol* 184, 3941-3946.
- Ulanowicz, R.E. (2003). Some steps toward a central theory of ecosystem dynamics. *Comput Biol Chem* 27, 523-530.
- van der Gast, C.J., Ager, D., and Lilley, A.K. (2008). Temporal scaling of bacterial taxa is influenced by both stochastic and deterministic ecological factors. *Environ Microbiol* 10, 1411-1418.
- Veeresh, G.S., Kumar, P., and Mehrotra, I. (2005). Treatment of phenol and cresols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review. *Water Res* 39, 154-170.
- Viggor, S., Heinaru, E., Kunnapas, A., and Heinaru, A. (2008). Evaluation of different phenol hydroxylase-possessing phenol-degrading pseudomonads by kinetic parameters. *Biodegradation* 19, 759-769.
- Ward, B.B. (2002). How many species of prokaryotes are there? *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10234-10236.
- Watanabe, K. (2002). Linking genetics, physiology and ecology: An interdisciplinary approach for advancing bioremediation. *J Biosci Bioeng* 94, 557-562.
- Watanabe, K., and Hino, S. (1996). Identification of a functionally important population in phenol-digesting activated sludge with antisera raised against isolated bacterial strains. *Appl Environ Microbiol* 62, 3901-3904.

- Watanabe, K., Teramoto, M., and Harayama, S. (1999). An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. *Appl Environ Microbiol* 65, 2813-2819.
- Watanabe, K., Teramoto, M., Futamata, H., and Harayama, S. (1998). Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 64, 4396-4402.
- Watanabe, K., S., Hino, K., Onodera, S., Kajie, S.-I., and Takahashi, N. (1996). Diversity in kinetics of bacterial phenol-oxygenating activity. *J Ferment Bioeng* 81, 562–565.
- Wellington, E.M., Berry, A., and Krsek, M. (2003). Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing. *Curr Opin Microbiol* 6, 295-301.
- Whiteley, A.S., Wiles, S., Lilley, A.K., Philp, J., and Bailey, M.J. (2001). Ecological and physiological analyses of *Pseudomonad* species within a phenol remediation system. *J Microbiol Methods* 44, 79-88.
- Wittebolle, L., Van Vooren, N., Verstraete, W., and Boon, N. (2009). High reproducibility of ammonia-oxidizing bacterial communities in parallel sequential batch reactors. *J Appl Microbiol* 107, 385-394.
- Woodcock, S., van der Gast, C.J., Bell, T., Lunn, M., Curtis, T.P., Head, I.M., and Sloan, W.T. (2007). Neutral assembly of bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 62, 171-180.
- Yannarell, A.C., Steppe, T.F., and Paerl, H.W. (2006). Genetic variance in the composition of two functional groups (diazotrophs and cyanobacteria) from a hypersaline microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 72, 1207-1217.
- Zhang, X.L., Gao, P.P., Chao, Q.F., Wang, L.H., Senior, E., and Zhao, L.P. (2004). Microdiversity of phenol hydroxylase genes among phenol-degrading isolates of *Alcaligenes* sp from an activated sludge system. *FEMS Microbiol Lett* 237, 369-375.
- Zhou, H.W., Guo, C.L., Wong, Y.S., and Tam, N.F. (2006). Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. *FEMS Microbiol Lett* 262, 148-157.

Zhu, C., Zhang, L., and Zhao, L. (2008). Molecular cloning, genetic organization of gene cluster encoding phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase in *Alcaligenes faecalis* IS-46 *World J Microbiol Biotechnol* 24, 1687-1695.

Zhuang, W.Q., Tay, J.H., Maszenan, A.M., Krumholz, L.R., and Tay, S.T. (2003). Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. *Lett Appl Microbiol* 36, 251-257.

Zumstein, E., Moletta, R., and 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. *Environ Microbiol* 2, 69-78.