



Ayarza, Joaquín Manuel

# Desarrollo de la comunidad bacteriana del floc biológico de barros activados y respuesta a la desestabilización mediada por agentes externos



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

*Cita recomendada:*

Ayarza, J. M. (2013). *Desarrollo de la comunidad bacteriana del floc biológico de barros activados y respuesta a la desestabilización mediada por agentes externos. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/136>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

## Desarrollo de la comunidad bacteriana del *floc* biológico de barros activados y respuesta a la desestabilización mediada por agentes externos

### Assembly of activated sludge floc bacterial community and the response to destabilization mediated by external agents

TESIS DOCTORAL

Joaquín Manuel Ayarza

jayarza83@gmail.com

#### Resumen

El tratamiento de efluentes basado en barros activados es el proceso más ampliamente empleado en todo el mundo para el tratamiento biológico de efluentes de origen industrial o domiciliario. El éxito del proceso radica no sólo en la selección de poblaciones bacterianas capaces de degradar los compuestos orgánicos y nutrientes del efluente, sino que también depende de la agregación de las mismas para conformar el *floc* biológico, posibilitando la separación de la biomasa del líquido depurado por gravedad. En otras palabras, la eficiencia del proceso depende en gran medida de la formación del *floc* biológico y de su estabilidad frente a agentes que interfieren con la biofloculación. Ambos aspectos fueron estudiados en este trabajo, empleando reactores de barros activados a escala de laboratorio.

El objetivo de la primer parte del trabajo fue evaluar la contribución de dos teorías ecológicas contrapuestas para el ensamblado de las comunidades bacterianas durante la formación del *floc* biológico: la teoría basada en nichos (determinística) y la teoría neutral (estocástica). Inicialmente se diseñaron experimentos para probar que los cambios producidos en la composición de las comunidades bacterianas no se producen totalmente al azar, sino que existe una selección determinada por nichos. Partiendo de una comunidad bacteriana enriquecida en poblaciones planctónicas, distribuida en cuatro reactores replicados, se analizó la dinámica de las comunidades bacterianas durante el desarrollo del *floc* biológico utilizando la técnica de electroforesis con gradiente desnaturizante (DGGE, del inglés *denaturing gradient gel electrophoresis*). Los cambios producidos en las estructuras de las comunidades bacterianas se dieron de manera significativamente similar en los cuatro reactores replicados, lo cual manifiesta un fuerte carácter determinístico. Otra prueba que sustentó esta hipótesis se obtuvo al observar que reactores con comunidades bacterianas con distinta distribución de abundancia de especies convergieron hacia una comunidad significativamente similar luego de 40 días de operación. Por otro lado se evaluó la hipótesis de que el carácter estocástico del ensamblado aumenta con el número de especies en la metacomunidad. Analizando los cambios temporales observados en comunidades de diferente grado de diversidad, se observó que la tasa de recambio de especies aumentó significativamente con el número de especies disponibles. Adicionalmente se observó un mejor ajuste a un modelo de ensamblado neutral, ante el incremento del número de especies disponibles para conformar el *floc* biológico. Se concluye que tanto la dinámica determinística como la neutral operan en conjunto durante la formación del *floc* biológico, y que el balance entre ambos procesos depende del tamaño de la metacomunidad.

En la segunda parte del trabajo nos enfocamos en la respuesta de la comunidad del *floc* ante la desfloculación mediada por incrementos puntuales de temperatura o de concentración de fenol. Ambos tipos de perturbaciones ocurren frecuentemente en plantas de tratamiento, provocando una pérdida de sólidos y la consecuente reducción de la calidad del efluente tratado. El objetivo fue determinar si los sólidos que se desprenden del *floc* corresponden a células de bacterias localizadas en la zona externa del *floc*, o si las perturbaciones afectan distintivamente las propiedades fisiológicas de miembros internos del *floc* comprometiendo la estabilidad del agregado. Comparando la estructura de la comunidad bacteriana entre la fracción floculenta y sobrenadante, se determinó que la mayoría de los taxones que forman parte del *floc* se desprenden inespecíficamente en respuesta a los *shocks* desfloculantes. Sin embargo, identificamos un taxón perteneciente al género *Sediminibacterium* que incrementó marcadamente su abundancia en la fracción sobrenadante luego de ambos tipos de *shocks*. El incremento poblacional de *Sediminibacterium* sp. no se debió a un desprendimiento distintivo,

sino a la activación del crecimiento planctónico ocurrido inmediatamente luego de la disrupción del *floc* y que se mantuvo luego de una semana de los *shocks*. Mediante un análisis de hibridación fluorescente *in situ* se determinó que la población de *Sediminibacterium* sp. es un componente estable del *floc*, que se encuentra en baja abundancia y se localiza en zonas internas del mismo. Por otro lado, se logró aislar una cepa de *Sediminibacterium* sp. en cultivo puro, la cual es microaerófila y, dependiendo de la presencia de piruvato en el medio de cultivo, exhibió la capacidad de crecer en forma agregada o planctónica. Ambas formas de crecimiento fueron comparadas en un análisis proteómico, utilizando el genoma de *Sediminibacterium* sp. anotado como base de datos para la asignación de los fragmentos peptídicos. Este análisis mostró que el crecimiento planctónico está asociado a una mayor expresión de proteínas relacionadas con estrés.

En base a estos resultados se propone un modelo bifásico de desfloculación, por el cual la disrupción inicial del *floc*, inducida por incrementos bruscos en la temperatura o en la concentración de fenol, expone a la población de *Sediminibacterium* sp. a concentraciones de oxígeno que activan un mecanismo de respuesta a estrés, resultando en un crecimiento planctónico que afecta notablemente la calidad del efluente tratado.

**Palabras clave:** Barros activados, *floc* biológico, DGGE, modelos ecológicos, *Sediminibacterium* sp., crecimiento planctónico, respuesta a estrés.

## ABSTRACT

The activated sludge process is the most widely used method for biological treatment of industrial or domestic wastewater around the world. The success of the process is not only due the selection of bacterial populations capable of degrading organic compounds and nutrients from the wastewater, but also depends on its aggregation properties, which allows the separation of the biomass from the treated water by gravity. In other words, the efficiency of the process depends greatly on biological floc formation and stability against agents that interfere with the biofloculation. Both aspects were studied in this work.

The aim of the first part of the Thesis was to evaluate the contribution of two contrasting ecological theories for the assembly of bacterial communities during biological floc formation: the niche-based theory (deterministic) and the neutral theory (stochastic). Initially, we designed experiments to prove that changes in composition of bacterial communities do not occur completely at random. Starting from a bacterial community enriched in planktonic populations, we used four replicated reactors to analyze the dynamics of bacterial communities during the formation of the biological floc, using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Changes in the structure of bacterial communities were significantly similar in the four reactors replicated, which suggested a strong deterministic character of the assembly process. Further evidence that supported this hypothesis was obtained by the fact that reactors bacterial communities with different species abundance distribution converged and were significantly similar after 40 days of operation. In addition, we tested the hypothesis that the stochastic nature of the assembly increases with the number of species in the metacommunity. Analyzing temporal changes observed in communities with different levels of diversity, we observed that the rate of species turnover increased significantly with the number of species available. Additionally there was a better fit to a neutral assembly model with the increase of the number of species available to form the biological floc. We conclude that both deterministic and the neutral dynamics, operate together during the biological floc formation, and that the balance between the two processes depends on the size of the metacommunity.

In the second section, we focused on the community response to deflocculation mediated by transient increases in temperature or concentration of phenol. Both types of disturbances occur frequently in industrial wastewater treatment plants, causing a loss of solids and an overall reduction of effluent quality.

The objective was to determine whether the solids that are released from the perturbed floc are bacteria cells located in the outer zone of the floc, or whether different shocks distinctly affect the physiological properties of internal members of the floc, compromising the aggregate stability.

Comparing the bacterial community structure between flocculent and the supernatant fraction, it was determined that most of the taxa that are part of floc deflocculate nonspecifically in response to the shocks. However, we identified a taxa belonging to the genus *Sediminibacterium*, which markedly increased their abundance in the supernatant fraction after both types of shocks. However, the presence of *Sediminibacterium* sp. in the planktonic fraction was not due to a distinctive detachment from the floc, but to the steady growth that started immediately after the disruption of the floc and continued after a week of shocks. Fluorescence *in situ* hybridization showed that the population of *Sediminibacterium* sp. was a stable component of the floc, which was found in low abundance and was located in inner regions thereof. Furthermore, I isolated a strain of *Sediminibacterium* sp. in pure culture. The isolate was microaerophilic and, depending on the presence of pyruvate in the culture medium the strain exhibited the ability to grow in autoaggregate or planktonic mode. Both growth forms were compared in a proteomic analysis using *Sediminibacterium* sp. annotated genome as local database for the peptide fragments identification. This analysis showed that the planktonic growth was associated with an increased expression of stress-related proteins.

Based on these results, we propose a biphasic model of deflocculation, in which the initial floc disruption induced by the transient increases in temperature or concentration of phenol, exposes the population of *Sediminibacterium* sp. to conditions that activates a stress response mechanism, resulting in the massive

planktonic growth that significantly affects effluent quality.

**Key words:** Activated sludge, biological floc, DGGE, ecological models, *Sediminibacterium* sp., planktonic growth, stress response.

## ÍNDICE

### INTRODUCCIÓN GENERAL

Tratamiento de efluentes basado en barros activados  
Formación y estructura del *floc* biológico  
Estudio de los agregados bacterianos  
Ecología de las comunidades de barros activados  
Ecología microbiana y biotecnología  
Enfoque de este trabajo

### Capítulo 1: Desarrollo de la comunidad bacteriana del *floc* biológico

#### INTRODUCCIÓN

Dinámica de la estructura de la comunidad bacteriana en barros activados  
Teoría ecológica basada en nichos  
Teoría ecológica neutral Tasa de recambio de especies  
Hipótesis y objetivos

#### RESULTADOS

Desarrollo del *floc* biológico  
Dinámica de la comunidad bacteriana durante el desarrollo del *floc*  
Comparación de la comunidad bacteriana entre reactores replicados  
Convergencia de la comunidad a partir del mismo *pool* de especies  
Parámetros funcionales de los reactores B  
Tasa de recambio de especies bacterianas  
Ajuste al modelo neutral propuesto para comunidades procariotas

#### DISCUSIÓN

Dinámica de las comunidades del *floc* de barros activados  
Determinismo durante desarrollo del *floc* biológico  
Dinámica neutral  
Tasa de recambio de especies  
Modelo neutral para procariotas  
Empleo del DGGE en ecología microbiana  
Discusión actual sobre la dinámica neutral y determinística

#### CONCLUSIONES

### Capítulo 2: Respuesta de la comunidad bacteriana del *floc* biológico ante la desestabilización mediada por agentes externos

#### INTRODUCCIÓN

Problema de la desfloculación  
Comunidades planctónicas y floculentas  
Mecanismos de desfloculación  
Desprendimiento distintivo de grupos filogenéticos  
Agentes desfloculantes  
Estudio de las propiedades fisiológicas de bacterias del *floc*  
Hipótesis y objetivos

#### RESULTADOS

Efecto de *shocks* térmicos y de fenol sobre el *floc* biológico  
Estructura de la comunidad del *floc* y sobrenadante luego de *shocks* térmicos y de fenol  
Crecimiento de *Sediminibacterium* sp. luego de *shocks* desfloculantes  
Cultivo y aislamiento de las cepas *Sediminibacterium* sp. y *Thauera* sp.  
Caracterización de *Sediminibacterium* sp.  
*Sediminibacterium* sp. es microaerófilo  
Autoagregación de *Sediminibacterium* sp.  
Efecto del piruvato sobre la agregación de *Sediminibacterium* sp.  
Curvas de crecimiento de *Sediminibacterium* sp. agregado y planctónico  
Matriz extracelular de *Sediminibacterium* sp.  
Respuesta de *Sediminibacterium* sp. a agentes estresantes  
Localización de *Sediminibacterium* sp. en el *floc* biológico  
Secuenciación del genoma de *Sediminibacterium* sp.  
Análisis comparativo del genoma  
*Sediminibacterium* sp. pertenece a la especie *Sediminibacterium salmoneum*  
Análisis proteómico del crecimiento agregado y planctónico de *Sediminibacterium* sp.

Transcripción de *usp* durante el crecimiento agregado y planctónico de *Sediminibacterium*

## **DISCUSIÓN**

Mecanismos de desfloculación

*Sediminibacterium* en otros ambientes

Bacterias microaerófilas

Efecto del piruvato frente al estrés oxidativo y agregación

Aporte nutricional del piruvato

Acción del piruvato intracelular como mecanismo frente al estrés oxidativo

Análisis proteómico / Proteína universal de estrés

Análisis del genoma de *Sediminibacterium* sp

Crecimiento planctónico vs agregado

Crecimiento planctónico como respuesta a estrés

Estrés directo o indirecto de *Sediminibacterium* sp.

Modelo de crecimiento planctónico como respuesta a estrés en barros activados

## **CONCLUSIONES**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Reactores a escala de laboratorio

Dinámica de formación del *floc*

Experimento de desfloculación

Análisis del tamaño del *floc* biológico

Parámetros funcionales

Extracción de ADN-ARN

Tratamiento con ARNasa A libre de ADNasa

Tratamiento con ADNasa RQ1 libre de ARNasa

Transcripción reversa del ARN

Amplificación de genes de ARN ribosomal 16S

Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

DGGE-*Southern Blot*

Análisis de geles de DGGE

Análisis de *Moving-Window*

Índice de similitud de Raup-Crick

Tasa de recambio de especies

Modelo neutral propuesto para procariontas

Índice de similitud Bray-Curtis

Diseño de sondas específicas de *Sediminibacterium* sp. y *Thauera* sp.

*Screening*, aislamiento y cultivo de *Sediminibacterium* sp

ERIC-PCR

Secuenciación del gen de ARN ribosomal 16S

Análisis filogenético de *Sediminibacterium* sp.

Cultivos puros de *Sediminibacterium* sp.

Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido

Hibridación ADN-ADN *in silico*

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Diseño de sonda específica para *Sediminibacterium* sp

Preparación de las muestras

Hibridación con sondas marcadas

PCR cuantitativa en tiempo real

Cuantificación de genes de ARN ribosomal 16S

Análisis proteómico - Electroforesis bidimensional

Extracción proteínas con fenol a pH básico

Carga de las tiras comerciales

Isoelectroenfoque

Visualización y análisis de los geles

Secuenciación de los *spots*

Secuenciación del genoma de *Sediminibacterium* sp

Purificación de ADN genómico de *Sediminibacterium* sp

Secuenciación

Anotación del genoma

Análisis transcripcional del gen *usp*  
Diseño de los cebadores específicos del gen *usp*  
Cultivos planctónicos y agregados  
Transcripción reversa del ARNm del gen *usp* y ARNr 16S de *Sediminibacterium* sp.  
Cuantificación de la expresión del gen *usp*  
ANEXO I: Soluciones utilizadas  
ANEXO II: Cebadores utilizados  
ANEXO III: Medios de cultivo utilizados  
**REFERENCIAS**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director Leonardo Erijman, por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, por guiar mi trabajo de Tesis de manera excelente, por la confianza y motivación de cada día.

A mi co-director Claudio Valverde, por mostrar muchísimo interés en nuestro trabajo y predisposición para discutir temas relacionados al mismo.

A mi consejero de posgrado Daniel Ghiringhelli por estar siempre presente ante cualquier consulta durante mi doctorado.

A mis compañeros de grupo Eva, Leandro, Laura, Fede, Vicky y Dominique, quienes colaboraron permanentemente en discusiones e ideas en este trabajo, y con quienes cuento con su amistad fuera del laboratorio.

A Agus por la colaboración en los ensayos de proteómica y por las charlas en la hora del almuerzo. A Romi y Mariana, con quienes compartí laboratorio y siempre estuvieron presentes para cualquier consejo u opinión. También a Pato, por su compañerismo y amistad.

A Jorge Muschietti y el resto de su grupo de trabajo: Laura, Regi, Juli, Diego, y Tamara; con quienes compartimos muchos momentos dentro y fuera del laboratorio.

Al Dr. Héctor Torres y Dra. Mirtha Flawiá por haberme permitido realizar mi Tesis Doctoral en el INGEBI.

A todos los integrantes del INGEBI, que siempre colaboraron conmigo cuando lo necesité, y por hacer que en el instituto se viva un excelente clima donde compartimos el día a día.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por haberme financiado estos años de trabajo.

A mis padres, hermanos, y amigos por el apoyo incondicional, y porque siempre mostraron admiración por mi trabajo.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### ***Tratamiento de efluentes basado en barros activados***

El tratamiento de aguas residuales de origen municipal o industrial es esencial para el mantenimiento de los ecosistemas acuáticos. Estos efluentes, si no son previamente tratados, aportan materia orgánica y/o nutrientes (básicamente compuestos nitrogenados o fosforados) produciendo un desbalance en el ecosistema acuático.

El ingreso desmedido de materia orgánica a un curso natural de agua promueve la actividad de bacterias heterótrofas que degradan aeróbicamente estos compuestos carbonados. Por consiguiente, disminuye drásticamente la concentración de oxígeno disuelto en el agua, provocando la muerte de formas de vida superiores que necesitan oxígeno para vivir, tales como los peces e invertebrados. Asimismo, se produce un estímulo en el crecimiento de bacterias anaeróbicas responsables del mal olor debido a la emisión de sulfuro de hidrógeno y metano.

Por otro lado, el aporte de compuestos nitrogenados y fosforados a un curso de agua provoca el fenómeno conocido como eutrofización, que consiste en el crecimiento desmedido de algas que aprovechan de manera más eficaz estos nutrientes, que en condiciones normales se encuentran en bajas concentraciones. La gran cantidad de biomasa producida conlleva una magnificación de la cadena trófica, por lo cual se estimula el crecimiento de bacterias que degradan aeróbicamente los desechos de las algas. Es así que el efecto final también es un descenso neto del oxígeno disuelto, con las consecuencias negativas detalladas anteriormente.

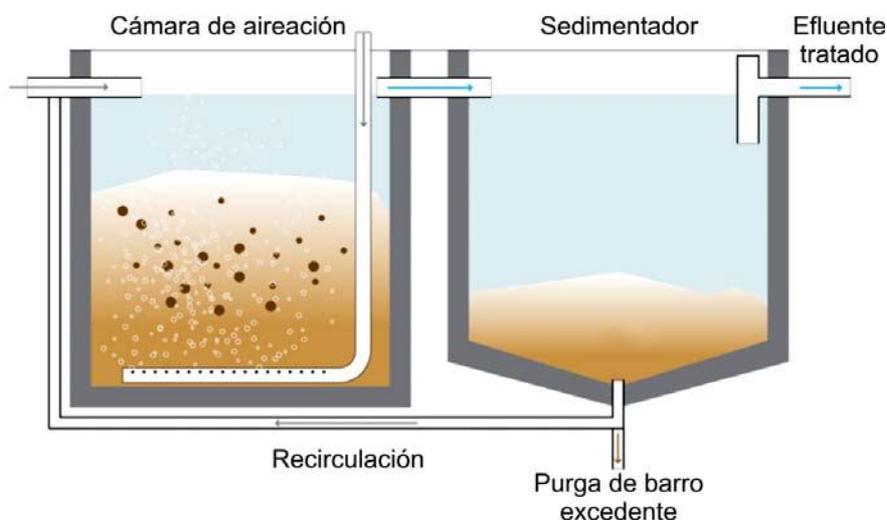
Todos los ambientes acuáticos hospedan comunidades bacterianas, las cuales tienen la particularidad de llevar a cabo numerosas reacciones de degradación y ciclado de nutrientes dentro del ecosistema. El tratamiento biológico de aguas residuales, se basa en este servicio del ecosistema, aprovechando la actividad de las bacterias presentes en ambientes naturales para transformar los compuestos orgánicos y nutrientes, en CO<sub>2</sub> y biomasa (Graham and Smith 2004).

Las bacterias llevan a cabo la mayoría de las reacciones de degradación y constituyen alrededor del 95 % de la biomasa activa en un tratamiento biológico, pero también incluye la actividad de hongos, protozoos y algunos metazoos. De esta forma, al basarse en una actividad biológica, el tratamiento biológico de aguas residuales se considera un proceso biotecnológico, siendo uno de los más importantes y empleados en todo el mundo.

La primera aproximación a un tratamiento biológico consiste en disponer el efluente en lagunas controladas hasta que se estabilice, y se pueda volcar en un curso de agua natural sin inconvenientes. Una mejora significativa de estos sistemas se adquiere al suministrar mecánicamente oxígeno por la acción de paletas, acelerando el proceso de degradación aeróbica.

Hace más de un siglo se creó el concepto de tratamiento de efluentes basado en barros activados. El funcionamiento tiene los mismos fundamentos de las lagunas aireadas, con la diferencia que se logra un aumento en la concentración de biomasa activa mediante la sedimentación y recirculación de la misma, con la correspondiente decantación del efluente tratado. En consecuencia, se aumenta la eficiencia del proceso y el sistema se compacta.

El esquema de funcionamiento se detalla en la Figura 1. El efluente ingresa a la cámara de aireación, donde se mezcla y se airea mecánicamente (con difusores o paletas). Este suministro constante de oxígeno, promueve la actividad biológica de una comunidad compleja de bacterias y otros microorganismos heterótrofos que degradan aeróbicamente los compuestos orgánicos del efluente.



**Figura 1.** Esquema del tratamiento de efluentes basado en barros activados. Fuente: Sandec/Eawag ([www.sandec.ch](http://www.sandec.ch))

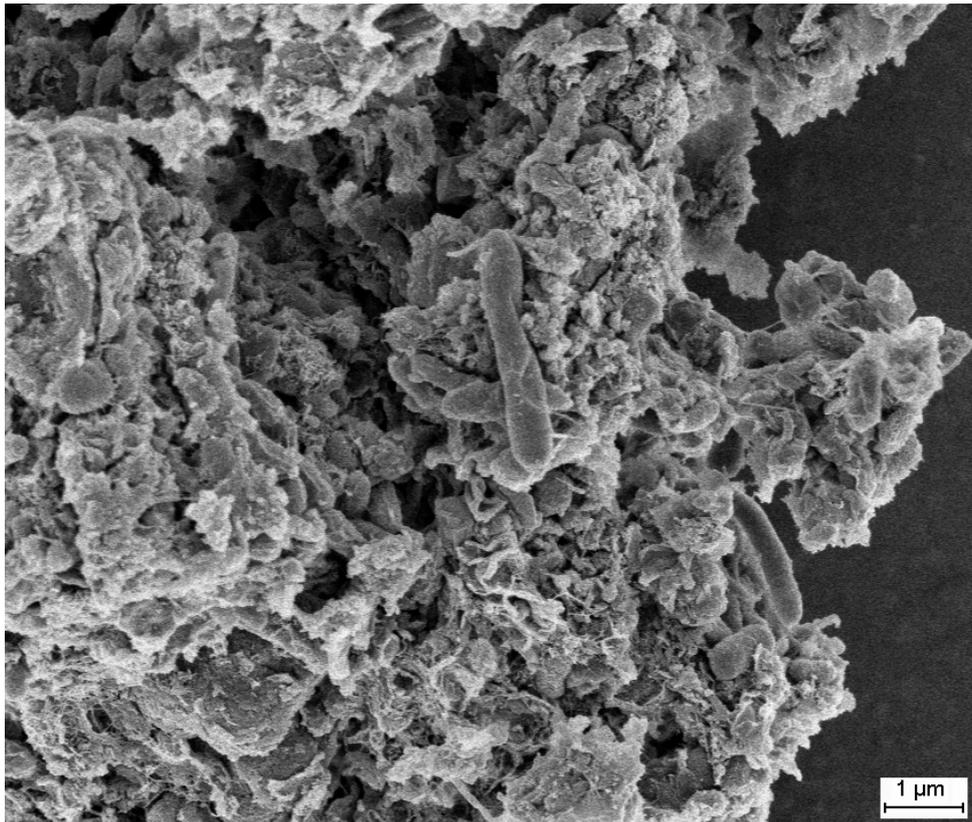
Luego, la mezcla de microorganismos con el efluente tratado pasa a un sedimentador en el cual la biomasa activa flocula en forma de barro (de aquí el término de “barro activado”), y permite su separación por gravedad del efluente tratado. Finalmente, parte de la biomasa se recircula y el barro excedente que se elimina del sistema puede tratarse en reactores anaeróbicos para disminuir la cantidad de sólidos final a disponer. La cantidad de barro que se elimina del sistema en cada ciclo determina el tiempo de retención celular o

tiempo de retención de sólidos (SRT, del inglés *solids retention time*). La separación entre la biomasa activa y el efluente tratado lograda en la etapa de sedimentación permite manejar operativamente este parámetro en forma independiente al tiempo de retención hidráulico (HRT, del inglés *hydraulic retention time*), que determina la permanencia del efluente en el reactor, y resulta de la división del volumen del reactor y del caudal de efluente tratado.

### **Formación y estructura del floc biológico**

Para que sea posible la separación por gravedad de la biomasa del efluente tratado es indispensable la formación del *floc* biológico, que consiste en el agregado de múltiples especies microbianas dentro de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, del inglés *extracellular polymeric substances*), compuesta principalmente por polisacáridos y proteínas, aunque también se pueden encontrar en su composición sustancias húmicas, lípidos, ácidos nucleicos y ácidos urónicos (Sheng et al. 2010). Estos compuestos provienen de la secreción activa por parte de los microorganismos, o bien pasivamente, a partir de productos de lisis celular o del efluente. Se estima que el 80-95 % de la materia orgánica del *floc* biológico corresponde a EPS, y el resto a la biomasa (Figura 2). En el *floc* biológico no existe un sustrato definido de adhesión como en las biopelículas. Igualmente, la integridad de ambos agregados celulares depende de las múltiples interacciones fisicoquímicas existentes en la matriz extracelular, entre las cuales se destacan las fuerzas electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones iónicas mediadas por cationes divalentes (Flemming and Wingender 2010). Al formarse el agregado, la biomasa floculenta alcanza una densidad adecuada para sedimentar, mientras que las bacterias que no son capaces de incorporarse al *floc* biológico, se comportan como sólidos coloidales y se pierden del sistema junto con el efluente tratado.

Aunque históricamente se ha caracterizado a las bacterias como organismos de vida libre (o planctónicos), debido a su crecimiento en solución durante el cultivo en medios ricos, ya hace mucho tiempo se caracterizó la capacidad de las bacterias de formar agregados o biopelículas. Sin embargo, recién en la década del '70 se determinó que las bacterias presentes en ambientes naturales mayoritariamente se encuentran formando parte de agregados (Karunakaran et al. 2011). Actualmente se reconoce la ubicuidad de los agregados bacterianos en los ecosistemas acuáticos, habiéndose incluso determinado que menos del 0,1 % del total de bacterias del ecosistema se encuentran suspendidas en medio líquido (O'Toole et al. 2000). Esta propiedad de agregación, generalizada para distintos flitotipos bacterianos, es la que hace factible el tratamiento basado en barros activados.



**Figura 2.** Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de barrido de un *floc* biológico perteneciente al barro activado de una planta de tratamiento de efluentes. Se puede advertir la diversidad de morfologías bacterianas y la densa capa de material polimérico extracelular que mantiene unido al agregado.

### ***Estudio de los agregados bacterianos***

El estudio de los agregados bacterianos goza actualmente de un gran interés debido a su influencia, positiva o negativa, en distintas disciplinas, que abarcan el cuidado del medio ambiente, la industria y la salud pública. Como vimos, la formación de agregados bacterianos durante el tratamiento de efluentes basado en barros activados es positiva, ya que posibilita la separación de la biomasa, aumentando la eficiencia del proceso. Algo similar ocurre durante la formación de gránulos bacterianos en reactores de tratamiento de efluentes anaeróbicos. La formación de biopelículas, también se explota de manera positiva en otras aplicaciones de biotecnología ambiental tales como biorremediación y en celdas de combustible microbianas. En el campo industrial, la agregación de las levaduras durante el proceso de elaboración de la cerveza también tiene una influencia positiva sobre este proceso industrial (Karunakaran et al. 2011).

Por otro lado, la agregación bacteriana o formación de biopelículas puede tener un efecto perjudicial sobre procesos industriales o en el campo de la salud pública. Se estiman costos millonarios asociados a la contaminación biológica de maquinarias y tuberías con

biopelículas persistentes. Mucho más grave es la contaminación biológica en el campo de la salud, donde afecta la esterilidad de catéteres e implantes.

Otra razón por la cual las biopelículas tienen particular atención en el campo de la salud, es que también forman parte de muchas infecciones resistentes, por ejemplo en la placa dental. Igualmente, el estudio de las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* radica en uno de los de mayor interés, debido a su influencia en la fibrosis quística. Interesantemente, se determinó que las bacterias cuando forman parte de biopelículas son 1000 veces más resistentes a los antibióticos que cuando crecen planctónicamente, lo cual implica un problema grave para la salud pública (Davey and O'toole 2000).

Los estudios realizados bajo el interés del campo de la salud, permitieron avanzar sobre el conocimiento de los mecanismos de agregación y comportamiento de las bacterias que forman parte de biopelículas. Se pudo determinar para *Pseudomonas aeruginosa*, que existen distintas señales ambientales que inducen la agregación, tales como la disponibilidad de nutrientes, oxígeno, y el balance osmótico del medio (O'Toole et al. 2000). Otro hallazgo importante, fue que las bacterias cuando forman parte de biopelículas cambian considerablemente el patrón de expresión genética (Whiteley et al. 2001).

De esta forma, el conocimiento avanzó sobre el estudio de biopelículas de una sola especie. Sin embargo, en la naturaleza y fundamentalmente en los sistemas de tratamiento de efluentes, los agregados están compuestos por múltiples especies bacterianas. A partir de los mecanismos descritos para biopelículas de cultivos puros se intentó explicar la agregación de las bacterias de barros activados, postulando la acción de variables ambientales tales como gradientes de nutrientes, inanición, predación o respuestas a estrés (Bossier and Verstraete 1996). Si bien estos mecanismos pueden llevarse a cabo, quedan enmascarados en la inmensidad de interacciones presentes en estas comunidades complejas.

Más allá de los mecanismos de agregación, es importante destacar que la regla en los ambientes naturales es el crecimiento en forma agregada. Esta forma de crecimiento es beneficiosa para las bacterias y pudo haber sido fundamental para su prevalencia desde el comienzo de la vida en la Tierra. La agregación es el mecanismo bacteriano más importante para posicionarse en un ambiente favorable, mediante el incremento de su capacidad de sedimentación o la adherencia a una superficie. Además, al mantenerse en una comunidad, los organismos toman provecho de interacciones beneficiosas, cooperando metabólicamente o intercambiando material genético. Por otro lado, la matriz extracelular provee protección frente a una gran cantidad de variables ambientales, tales como la radiación UV, cambios de pH, *shocks* osmóticos, y deshidratación (Davey and O'toole 2000).

Si bien las células de las biopelículas se pueden desprender debido a perturbaciones externas que afectan la integridad de la matriz extracelular, se cree que existe un desprendimiento controlado de células planctónicas desde las biopelículas, y que esta

estrategia es muy importante para su supervivencia y predominio en los ecosistemas acuáticos. En tales sistemas se caracterizaron bacterias planctónicas de un tamaño extremadamente pequeño (ultramicrobacterias), que se encuentran en un estado inactivo bajo condiciones oligotróficas. Este estado permite a las bacterias sobrevivir ante condiciones perjudiciales, y dispersarse para colonizar un ambiente benéfico donde vuelve a desarrollar una biopelícula (Costerton and Zbigniew 1995).

En estudios realizados sobre cultivos puros se caracterizó un mecanismo de desprendimiento activo en *Pseudomonas aeruginosa*, mediado por la sobreexpresión de la enzima alginato liasa, que degrada la matriz extracelular constituida principalmente por alginato. En otras especies también se observó un mecanismo similar mediante la expresión de proteasas que afectan específicamente a proteínas extracelulares responsables de la agregación. En biopelículas de *Pseudomonas fluorescens*, se observó el desprendimiento de bacterias ante incubaciones extensas que conducen a la pérdida de EPS, y se demostró que la presencia de moléculas en el sobrenadante de cultivos en fase estacionaria median este efecto (O'Toole et al. 2000). En definitiva, existen diferentes rutas regulatorias involucradas en la liberación activa de bacterias en biopelículas, y se trata de un campo de investigación muy activo debido a su posible aplicación directa en diversas disciplinas.

### **Ecología de las comunidades de barros activados**

El análisis de los mecanismos de agregación del *floc* biológico de barros activados se dificulta al tratarse de un ensamblado de múltiples especies bacterianas, por lo cual se requiere un enfoque diferente al realizado habitualmente en biopelículas de una sola especie. Para estudiar las interacciones intra e interespecíficas existentes durante el desarrollo del agregado, sumadas a otras interacciones benéficas o perjudiciales típicas de cualquier comunidad, y las múltiples actividades metabólicas que intervienen en la degradación de los compuestos del efluente, es necesario aplicar un enfoque desde la teoría ecológica.

Los sistemas de barros activados se consideran buenos modelos para el estudio de la ecología microbiana, ya que se encuentran definidos física y químicamente, permitiendo controlar más variables respecto de los ecosistemas naturales. Incluso está la posibilidad de montar reactores a escala de laboratorio para confinar un ambiente más controlado aún, o para realizar manipulaciones experimentales (Daims et al. 2006). La aplicación de técnicas moleculares independientes de cultivo al estudio de las comunidades presentes en los sistemas de barros activados, permitió identificar una gran diversidad bacteriana, como así también las reacciones metabólicas involucradas en la degradación y transformación de compuestos orgánicos y nutrientes presentes en los efluentes (Wagner et al. 2002).

Estudios derivados de estos análisis permitieron develar que cada planta de

tratamiento configura una comunidad bacteriana funcional a través de un proceso de selección natural dictado por el efluente a tratar, la configuración de la planta de tratamiento, variables ambientales y operativas, entre otros factores. La construcción de una comunidad bacteriana *de novo* que pueda degradar la totalidad de compuestos orgánicos presentes en un efluente y conformar un *floc* biológico estable es una tarea casi imposible de lograr. Incluso la incorporación al *floc* biológico de bacterias exógenas (bioaumentación) con una actividad metabólica deseada ha tenido poco éxito hasta el momento (Limbergen et al. 1998).

Por esta razón, la comprensión de los factores que determinan la estructura, dinámica y fisiología de los ecosistemas de tratamiento de efluentes, pueden aportar conocimientos fundamentales para ayudar en la adopción de medidas correctivas y en la toma de decisiones que conduzcan a óptimas condiciones operativas en estos sistemas (Erijman et al. 2011).

### ***Ecología microbiana y biotecnología***

Los estudios derivados de sistemas de tratamiento de efluentes también pueden aportar a la comprensión general de las comunidades microbianas. La biotecnología ambiental se centra en la manipulación de comunidades microbianas para brindarle un servicio al ser humano. Si bien el nombre designa a esta disciplina recién a partir del desarrollo de técnicas moleculares, el uso benéfico de los microorganismos en la remediación ambiental precede largamente a los conocimientos logrados en el campo de la ecología microbiana. Actualmente, esta disciplina tiene la potencialidad de ofrecer soluciones a las problemáticas de la sociedad moderna, relacionadas no sólo con el mantenimiento de los ecosistemas acuáticos, sino también en la búsqueda de fuentes renovables de energía, mejoras de procesos industriales, o en el campo de la salud. Para ello es indispensable un conocimiento profundo sobre el funcionamiento de las comunidades microbianas. Esta es la razón por la cual la biotecnología ambiental y la ecología microbiana se relacionan íntimamente y tienden a fusionarse en un futuro cercano. De esta forma, el incremento de conocimiento en el área de la ecología de comunidades microbianas podría permitir comprender y predecir cambios en ambientes naturales, permitir la manipulación de procesos industriales y agropecuarios, y proveer mejoras respecto a la protección de la salud humana (Rittmann et al. 2006).

La ecología microbiana, como ciencia básica, tiene como objetivo fundamental comprender las comunidades microbianas, las cuales son ensamblados organizados y autosustentables de distintas poblaciones de microorganismos, y su relación con el ambiente. De esta manera, intenta responder cuatro preguntas fundamentales:

1. Qué microorganismos están presentes en la comunidad. La identidad y número de los microorganismos presentes componen lo que se llama estructura de la comunidad.
2. Qué reacciones que modifican el ambiente de la comunidad son capaces los microorganismos de llevar a cabo. El conjunto de capacidades catalíticas se denomina potencial fenotípico de la comunidad.
3. Qué reacciones son llevadas a cabo por los microorganismos de la comunidad. En definitiva se trata de la realización del potencial fenotípico y se define como función de la comunidad.
4. Cuáles son las relaciones entre los miembros de la comunidad y con el ambiente. La comprensión de estas interacciones es el objetivo fundamental de la ecología microbiana.

Desde los comienzos de esta disciplina, en la década del '40, no había herramientas suficientes para resolver cuestiones relacionadas a estos cuatro ítems. Esto se debió fundamentalmente a que los organismos en estudio no se pueden ver a simple vista, e incluso al ser visualizados al microscopio sus formas simples y muchas veces compartidas no permiten identificarlos correctamente. El cultivo selectivo de microorganismos permitió grandes avances en este campo. Sin embargo se estima que sólo el 1 % de los microorganismos se han podido cultivar hasta el momento, lo cual limita considerablemente el alcance de esta técnica.

La aplicación de técnicas moleculares, principalmente a partir de la amplificación selectiva de secuencias de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) a partir de la década del '80, revolucionó la ecología microbiana. El gen que codifica el ARN ribosomal de la subunidad 16S (ARNr 16S) es el blanco más empleado para determinar la identidad de microorganismos. Este gen tiene dos ventajas fundamentales para tal fin. La primera es su ubicuidad, todas las formas de vida descritas hasta el momento requieren la actividad de ribosomas para la síntesis proteica, los cuales están constituidos por dos subunidades compuestas a su vez por proteínas y ARN. La otra ventaja es que este gen posee regiones conservadas y variables, esto se debe a que secciones del ARNr 16S tienen un papel importante en el plegamiento del ribosoma y por ende en su función, mientras que existen regiones más expuestas las cuales son sometidas a mutaciones sin que la traducción de los ARN mensajeros (ARNm) corra riesgo. De este modo, el grado de variabilidad de distintas regiones del gen ARNr 16S está relacionado con su filogenia, por lo cual se pueden reconocer motivos determinados que permiten definir unidades taxonómicas operacionales. Otra gran ventaja es que la aplicación de técnicas moleculares evita la limitación del cultivo, lo que permite caracterizar la totalidad de microorganismos presentes en el sistema en estudio (Rittmann et al. 2006).

El avance en las técnicas moleculares que ofrecieron respuestas a las cuestiones básicas en ecología microbiana, forjó una revolución en esta disciplina. Sin embargo, el análisis de comunidades bacterianas generó una gran cantidad de datos que en muchas ocasiones permanecen como meramente descriptivos. Actualmente, se plantea la necesidad de adaptar los resultados obtenidos a modelos ecológicos que brinden un entendimiento de los procesos llevados a cabo en las comunidades microbianas. Esta es la única manera de que el conocimiento adquirido genere capacidad de predicción para ser aplicado a las problemáticas de la sociedad moderna (Prosser et al. 2007).

### ***Enfoque de este trabajo***

El objetivo general de este trabajo es estudiar la dinámica de las poblaciones bacterianas en la formación y ruptura del *floc* de barros activados.

La Tesis está dividida en dos partes. En el primer capítulo se presenta el análisis de los cambios ocurridos en la estructura de la comunidad bacteriana durante el ensamblado del *floc* biológico de barros activados.

En el segundo capítulo nos enfocamos en el proceso inverso, es decir la desfloculación, una problemática habitual que ocurre en sistemas reales de tratamiento de efluentes, la cual está relacionada con la incidencia de perturbaciones externas que afectan la estabilidad del *floc* biológico.

### **Capítulo 1: Desarrollo de la comunidad bacteriana del *floc* biológico**

Los resultados del primer capítulo fueron publicados en dos artículos científicos, y un artículo de revisión:

- Ayarza, J.M., Guerrero, L.D., Erijman, L., 2010. Nonrandom assembly of bacterial populations in activated sludge flocs. *Microbial Ecology* 59 (3), 436–44
- Ayarza, J.M., Erijman, L., 2011. Balance of neutral and deterministic components in the dynamics of activated sludge floc assembly. *Microbial Ecology* 61 (3), 486–495
- Erijman, L., Figuerola, E. L. M., Guerrero, L. D., Ayarza, J. M. (2011). Impacto de los recientes avances en el análisis de comunidades microbianas sobre el control del proceso de tratamiento de efluentes. *Revista Argentina de Microbiología* 43, 127–135.

## INTRODUCCIÓN

### ***Dinámica de la estructura de la comunidad bacteriana en barros activados***

La mayoría de los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales tienen la capacidad de presentar un rendimiento estable en el contexto de una estructura de la comunidad microbiana variable. Investigaciones realizadas en varios laboratorios mostraron que las comunidades bacterianas en biorreactores son altamente dinámicas y pueden divergir en sistemas replicados a lo largo del tiempo, incluso en ausencia de perturbaciones externas (Falk et al. 2009; Konopka et al. 2007). Sin embargo, este cambio constante en la configuración de especies bacterianas generalmente no modifica la eficiencia del proceso, manteniéndose altos niveles de remoción de la demanda química de oxígeno (DQO) del efluente durante el proceso (Fernández et al. 1999; Kaewpipat and Grady 2002).

El rendimiento general del proceso parece ser mantenido por numerosas especies que coexisten con funciones similares (McMahon et al. 2007). En principio, la existencia de redundancia funcional podría permitir que las comunidades se ensamblen de manera diferente en sistemas replicados. Sin embargo, los sucesivos pasos de sedimentación y decantación en los sistemas de barros activados pueden ejercer una presión de selección sobre las poblaciones bacterianas, siendo las más aptas para permanecer en el sistema aquellas que son capaces de conformar el *floc* biológico.

Los reactores a escala de laboratorio, al igual que los sistemas reales, también exhiben una gran diversidad de especies, las cuales se ensamblan y forman una comunidad funcional. El análisis de los cambios en el patrón de la estructura de las comunidades que ocurren en reactores replicados nos permitirá analizar si existe un reclutamiento de especies al azar durante el desarrollo del *floc* biológico, o bien se produce el ensamblado siguiendo un cierto mecanismo.

### ***Teoría ecológica basada en nichos***

El concepto de nicho fue fundamental para la fundación de la ecología como ciencia hace más de 100 años, ya que el mismo permitió explicar la coexistencia de especies. El “principio de exclusión competitiva” establece que dos especies no pueden ocupar el mismo nicho ecológico. Si esto ocurre, las dos especies compiten entre sí y una de ellas queda localmente extinta. En consecuencia, solamente las especies con nichos lo suficientemente diferenciados pueden coexistir en la misma comunidad, la cual tendrá tantas especies como nichos disponibles en el ambiente. Esta teoría se condice con las diferencias fisiológicas presentes en especies diversas, las cuales determinan su adaptación en distintos ambientes.

En las plantas de tratamiento de barros activados ocurren dos grandes procesos de

selección, por un lado las poblaciones bacterianas deben tener la capacidad catabólica de adoptar los compuestos orgánicos del efluente como fuente de carbono y energía, pero además deben poder agregarse para conformar el *floc* biológico.

En las plantas de tratamiento de efluentes industriales, donde los compuestos del efluente son más complejos, el proceso de selección es más fuerte, ya que las bacterias presentes en la comunidad funcional deben tener la capacidad de catabolizar o resistir a la presencia de compuestos generalmente tóxicos para la mayoría de las especies bacterianas presentes en la naturaleza. Habitualmente las plantas de tratamiento domésticos también tratan efluentes industriales, lo cual complica estos tipos de análisis en plantas de tratamiento real. Sin embargo, en un estudio realizado en reactores de laboratorio alimentados con mezclas de efluente domiciliario e industrial en distinta proporción, se observó que el aumento de la concentración relativa de efluente industrial produjo un cambio gradual del modo de ensamblado de la comunidad bacteriana desde un régimen estocástico (aleatorio) a uno más determinista (basada en nicho) (van der Gast et al. 2008).

En un trabajo anterior realizado en el laboratorio, se observó que las comunidades encargadas de degradar compuestos complejos y de relevancia ambiental como los surfactantes no iónicos en reactores a escala de laboratorio, mostraron una replicabilidad en los miembros de la comunidad más abundantes, lo cual refleja un proceso de selección ante un nicho altamente especializado (Lozada et al. 2006). Otras pruebas de que las comunidades menos diversas, o más especializadas, están más influenciadas por un carácter determinístico se obtuvo en reactores dispuestos en condiciones desnitrificantes (McGuinness et al. 2006).

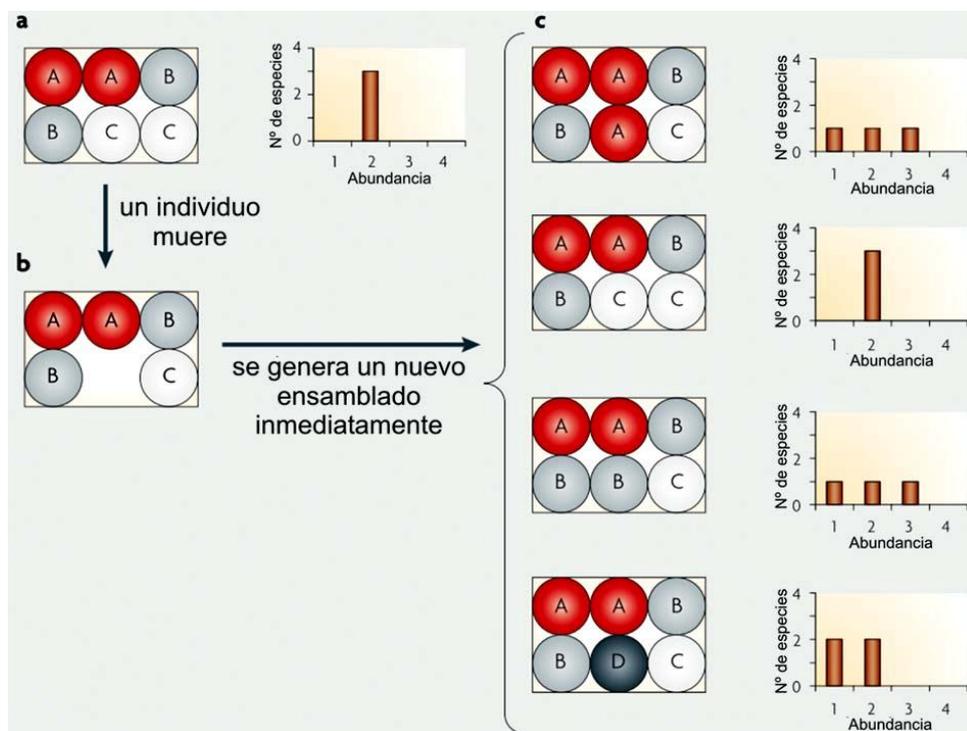
Hasta el momento no ha sido estudiado cuál es el efecto de los sucesivos pasos de sedimentación y decantación de los sistemas de barros activados sobre la selección de las bacterias capaces de conformar el *floc* biológico.

### ***Teoría ecológica neutral***

Más recientemente se postuló la teoría neutral, la cual asume que todas las especies de un nivel trófico determinado son equivalentes en las tasas de natalidad, mortalidad, dispersión y especiación (Hubbell and Borda-de-Água 2004).

Los modelos neutrales se basan en el concepto de la metacomunidad, que comprende un conjunto de comunidades locales, las cuales están conectadas por la dispersión al azar de especies entre sí. Se asume que cada comunidad local está saturada, y cuando pierde un individuo por la muerte o emigración del mismo, este es reemplazado inmediatamente por un miembro de la metacomunidad. Los inmigrantes se toman al azar de este grupo, y su abundancia relativa es el único parámetro que tiene influencia sobre la probabilidad de que se establezca en la comunidad local. Por otro lado, el grado de aislamiento de la comunidad

local determina la probabilidad de que se establezca un inmigrante de la metacomunidad, o si ocupa el lugar vacante un organismo que se reproduce a nivel local. De esta manera la comunidad se desarrolla neutralmente debido a una progresión de ciclos continuos de inmigración, nacimientos y muerte (Figura 3, Bell 2000; Hubbell and Borda-de-Água 2004).

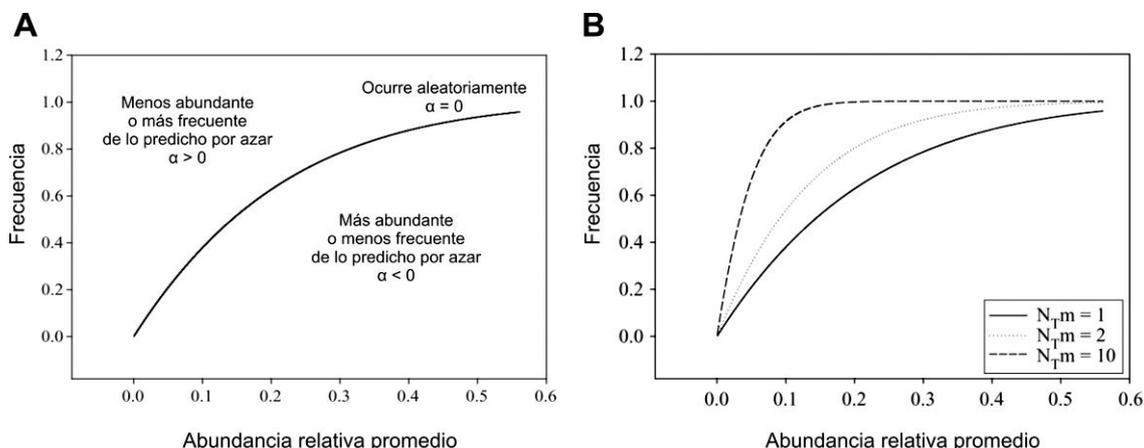


**Figura 3.** Esquema de la dinámica neutral en una comunidad pequeña de 6 individuos, inicialmente con tres taxones igualmente abundantes (a). Se asume que la comunidad está saturada de individuos, por esta razón para que el ensamblado cambie es necesario que un individuo muera o abandone el sistema (b). Este es inmediatamente reemplazado por la reproducción de algún integrante de la comunidad local o por la inmigración de otros individuos de la metacomunidad (c). Nótese que cada ensamblado está descrito por un gráfico de distribución de abundancia de especies (adaptado de Battin et al. 2007)

Los modelos neutrales fueron adoptados rápidamente en macroecología, ya que a pesar de su simplicidad, sus predicciones se acercan mucho a lo observado en la naturaleza (Whitfield et al. 2002). Con el impulso de la ecología microbiana, estos modelos también se comenzaron a aplicar en comunidades procariontas. Las comunidades bacterianas replicadas muchas veces sufren cambios erráticos en el tiempo, como así también se advirtió un desarrollo diferencial de comunidades en hábitat similares (Baptista et al. 2008; Roeselers et al. 2006). Estas observaciones presuponen un reclutamiento de especies al azar, y han estimulado el desarrollo de enfoques estocásticos en ecología microbiana.

Sloan, Curtis y colaboradores han propuesto un modelo de comunidad neutral para describir los patrones de las comunidades microbianas, que ajusta la relación observada entre la abundancia relativa de los distintos taxones y la frecuencia con la que son

encontrados en las muestras de análisis. Intuitivamente, bajo una dinámica neutral, la frecuencia debe crecer monótonamente en función de la abundancia relativa y converger en 1 (Figura 4, Sloan et al., 2006; Woodcock et al., 2007).



**Figura 4.** De acuerdo al modelo neutral, la frecuencia relativa de los taxones observados asciende en función de la abundancia relativa hasta converger en 1. Los taxones que se desvían del comportamiento teórico se encuentran a la izquierda o derecha de la curva de acuerdo a su ventaja o desventaja adaptativa, respectivamente; la cual se refleja con el parámetro  $\alpha$  (A). A partir del ajuste mediante el método de cuadrados mínimos se puede obtener el valor del producto  $N_T m$ , a partir del cual se determina el valor de  $m$  correspondiente a la tasa de inmigración (adaptado de Curtis and Sloan 2006).

Algunas especies pueden no comportarse neutralmente, por lo que se encuentran fuera de la curva teórica que predice la relación abundancia-frecuencia. Este modelo desarrollado para procariontas se diferencia del puramente neutral debido a que introduce un parámetro de ventaja  $\alpha$ , que incrementa o disminuye la probabilidad de que cada especie aumente su número en la comunidad. De esta forma, las especies que se encuentran hacia la izquierda de la curva, que muestran una abundancia menor o una frecuencia mayor a la predicha por azar, están adscritas a valores de  $\alpha$  positivos; mientras que las especies que se encuentran a la derecha de la curva, más abundantes o menos frecuentes que lo establecido neutralmente, se asocian a valores de  $\alpha$  negativos (Figura 4A).

Por otro lado, el modelo neutral adaptado para procariontas toma los datos de abundancia relativa de los taxones, y emplea el método de cuadrados mínimos para generar la curva con el mejor ajuste, que tiene valores asociados de  $N_T m$ , donde  $N_T$  corresponde al número total de individuos de la metacomunidad y  $m$  es la tasa de inmigración en la comunidad. De esta forma, a partir de estos ajustes se puede calcular un valor de  $m$ , que refleja el grado de estabilidad de la comunidad (Figura 4B).

## ***Tasa de recambio de especies***

Uno de los objetivos fundamentales de la ecología es entender como las comunidades son generadas y mantenidas a través de escalas espaciales y temporales. Los patrones de diversidad de especies proporcionan importantes conocimientos sobre los mecanismos subyacentes que regulan la biodiversidad, y son fundamentales para el desarrollo de modelos ecológicos y teorías. Uno de los patrones más analizados, corresponde a la relación especie-área (SAR, del inglés *species-area relationship*), que ha proporcionado la base para muchas teorías ecológicas, entre ellas la teoría de biogeografía de islas (van der Gast et al. 2008). En 1960, Preston observó que la manera en que se reproducen los patrones de especies en el tiempo ocurre de manera similar a lo observado a través de escalas temporales. En consecuencia, propuso la relación especie-tiempo (STR, del inglés *species-time relationship*), como una extensión de la ley exponencial de especie-área (Preston 1960). La relación especie-tiempo se ajusta a la siguiente función exponencial:

$$S = cT^w$$

Donde,

**S**= riqueza acumulada

**c**= constante empírica

**w** = tasa de recambio de especies

De esta manera, a partir del ajuste a esta ecuación se obtiene la tasa de recambio de especies, definida como el número de especies que es eliminado y reemplazado por unidad de tiempo.

## ***Hipótesis y objetivos***

El objetivo general es determinar la contribución de los componentes estocásticos y determinísticos en el ensamblado del *floc* de barros activados.

La primera hipótesis planteada es que el ensamblado del *floc* biológico conlleva un fuerte proceso de selección, por lo que puede ser explicado bajo la teoría nicho-específica. Para resolver esta cuestión, se analizó la evolución de la estructura de la comunidad determinada mediante DGGE en distintas réplicas de reactores a escala de laboratorio, y se aplicaron métodos estadísticos para determinar su similitud.

En segundo lugar evaluamos la hipótesis de que el aumento del número de especies disponibles para conformar el agregado aumenta la contribución de la dinámica neutral

durante el ensamblado del *floc* biológico. Para ello, se manipuló la diversidad de la comunidad inicial en distintos grupos de reactores y se realizó el seguimiento de la dinámica de la comunidad mediante DGGE. Los patrones de abundancia detectados mediante esta técnica se emplearon para calcular la tasa de recambio de especies y para realizar el ajuste al modelo neutral propuesto para procariontas.

## RESULTADOS

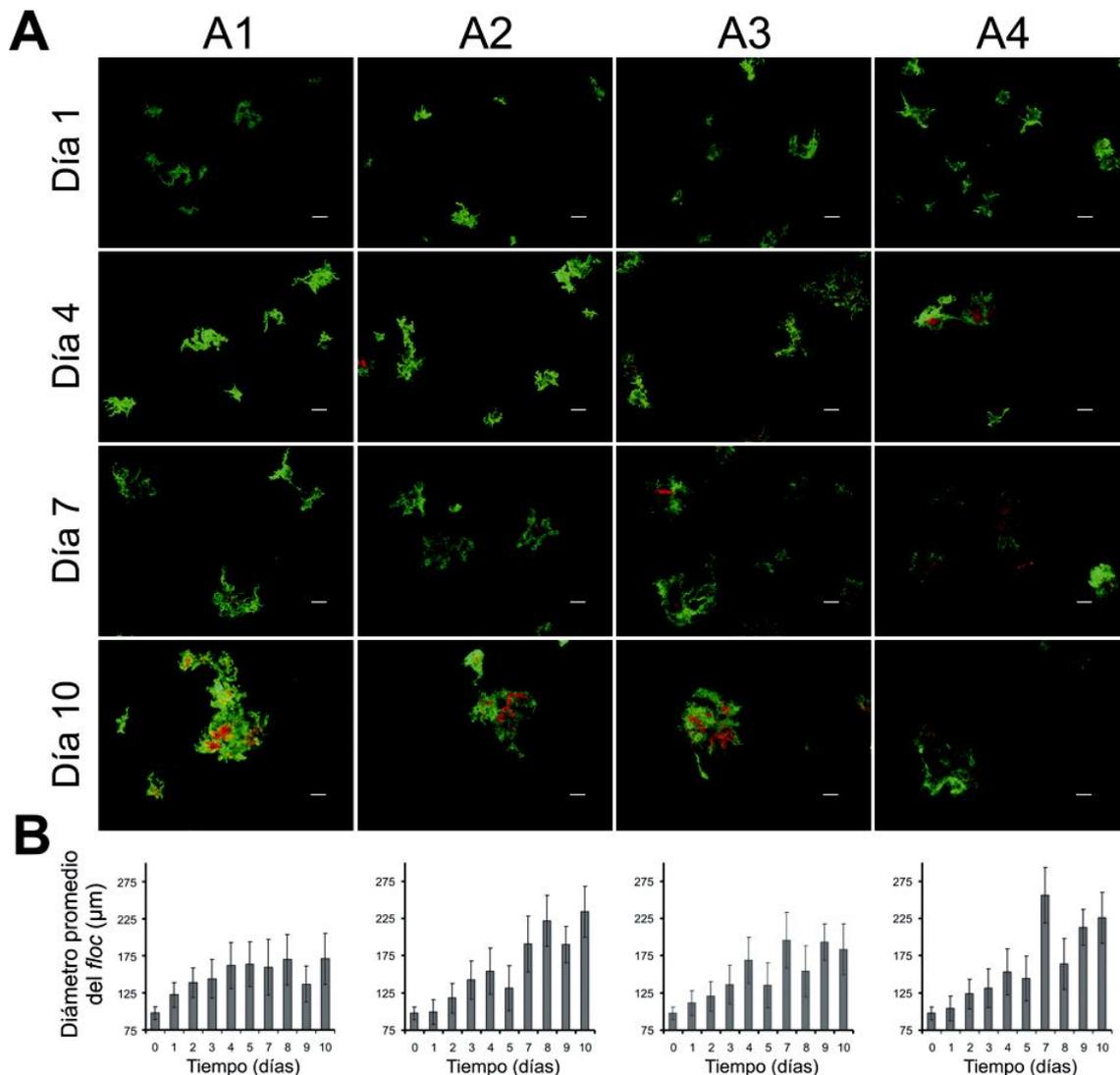
### ***Desarrollo del floc biológico***

Para estudiar la formación del *floc* biológico, se utilizó barro proveniente de la cámara de aireación de una planta de tratamiento de efluentes domésticos, sobre la cual se realizó una disgregación parcial de los *flocs*. Sobre esta muestra se llevó a cabo un proceso de aclimatación en el laboratorio con el objetivo enriquecer la comunidad en poblaciones bacterianas planctónicas.

Luego de la aclimatación, esta mezcla se empleó para inocular cuatro reactores replicados (Reactores A1-A4), los cuales simulaban el funcionamiento de una planta de tratamiento de efluentes basada en barros activados. Los reactores se operaron bajo el modo de *batch* secuencial con retención de biomasa, con sucesivos ciclos que incluyeron pasos de sedimentación y decantación del efluente tratado (ver *Materiales y Métodos*).

Se observaron muestras temporales al microscopio para determinar la evolución del tamaño y viabilidad de las bacterias en el *floc* (Figura 5A). A pesar de que se advirtió una diversidad de tamaños de *flocs* en todas las muestras, se observó la presencia de *flocs* de mayor tamaño a medida que transcurrieron los días de experimento. Por otra parte se comprobó la viabilidad de las bacterias que conforman el *floc* (fluorescencia verde), sin embargo se advirtió la presencia de bacterias muertas (rojo) ocupando la región central de los *flocs* maduros correspondientes al día 10 (Figura 5A).

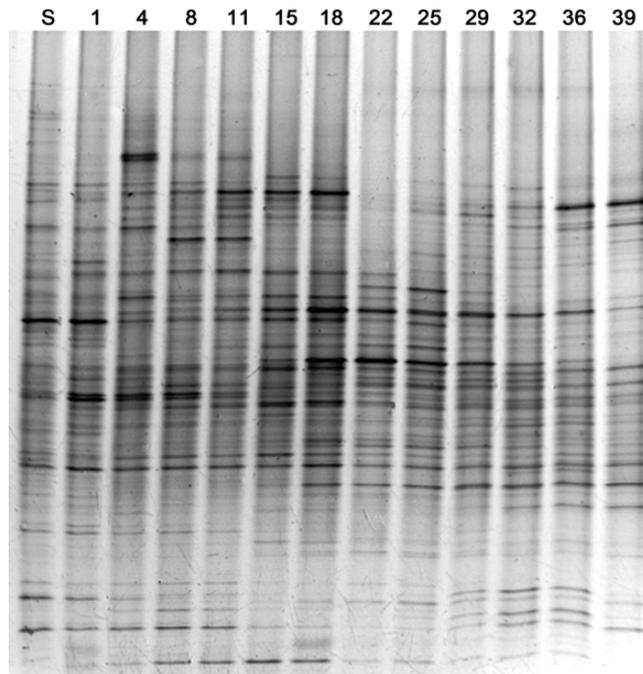
Por otra parte, se realizó la medición del tamaño de la población de *flocs* de cada muestra analizada, observando que se partió de un tamaño de *floc* promedio correspondiente a los 80  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 5B, día 0). Este valor fue incrementándose durante el transcurso del experimento hasta llegar a un tamaño estable aproximado a los 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, el cual fue alcanzado en los cuatro reactores dentro de los primeros 10 días (Figura 5B).



**Figura 5.** Evolución del tamaño del *floc* biológico durante los primeros 10 días del experimento en los reactores A. En la parte A de la figura se observan microfotografías representativas pertenecientes a los días 1, 4, 7 y 10 de los cuatro reactores A; empleando el kit de tinción *BacLight* para diferenciar poblaciones vivas (verde) de las células con membranas dañadas (rojo). En la parte B, se muestran los valores de diámetro promedio de la población de *flocs* durante los primeros 10 días de estudio.

### ***Dinámica de la comunidad bacteriana durante el desarrollo del floc***

Para estudiar la dinámica de la estructura de la comunidad durante el desarrollo del *floc* biológico se analizaron muestras temporales durante los 40 días de experimento en los cuatro reactores replicados. Los patrones correspondientes a la estructura de la comunidad bacteriana se obtuvieron empleando la técnica de DGGE sobre los fragmentos amplificados mediante RT-PCR del ARNr 16S (Figura 6). Hay que destacar que la amplificación se realizó sobre el ARNr 16S transcripto (no sobre el ADNr 16S) para reducir la interferencia por parte de las bacterias de la comunidad que no se encuentran metabólicamente activas.



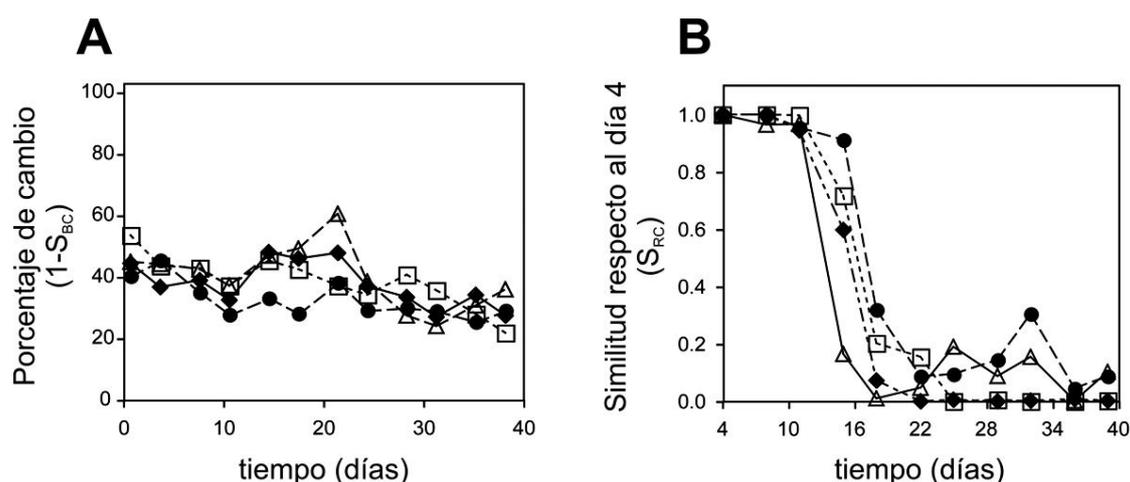
**Figura 6.** DGGE representativo de las muestras temporales correspondientes al reactor A1, donde se observan los cambios en la estructura de la comunidad durante la formación del *floc* biológico. La calle rotulada como "S" corresponde a la muestra aclimatada empleada como inóculo para iniciar los reactores (tiempo 0). El resto de las calles corresponden a muestras en las cuales el número indica el tiempo de operación (días) respecto al inicio.

En los geles de DGGE cada banda pertenece a un taxón independiente, y la intensidad se corresponde con su abundancia relativa en la comunidad. Al comparar entre muestras, las bandas que se ubican en la misma posición del gel se consideran taxones equivalentes. De esta manera cada gel digitalizado se convirtió en una matriz donde los números, que representan la abundancia relativa de cada taxón, están ordenados en filas de acuerdo a cada taxón independiente, y en columnas asignadas para las distintas muestras analizadas.

Las matrices obtenidas fueron analizadas mediante el procedimiento de *Moving-Window*, el cual consiste en calcular la inversa de la similitud (empleando el índice de Bray-Curtis) entre muestras consecutivas a lo largo del experimento (Figura 7A). De esta forma, cada valor obtenido corresponde al porcentaje de cambio de la comunidad en cada tiempo analizado. En los reactores A, se observó un porcentaje de cambio promedio de  $36,6 \pm 6 \%$ , con valores máximos correspondientes al  $45 \pm 5 \%$  durante los primeros días del experimento, y decreciendo hasta un mínimo de  $27 \pm 6 \%$  hacia el final del mismo (Figura 7A). A pesar de que se observa una tendencia de disminución, estos valores de cambio representan altos niveles de dinámica en la estructura de la comunidad bacteriana durante el desarrollo del *floc*.

Otro análisis complementario para evaluar la dinámica consistió en determinar la

similitud entre cada una de las muestras temporales y la correspondiente a una muestra inicial, empleando el índice de similitud probabilístico de Raup-Crick (SRC). Este índice permite distinguir las similitudes o disimilitudes observadas entre muestras de las esperadas si las comunidades se ensamblaran combinando al azar las especies disponibles en la metacomunidad. De esta manera, empleando un nivel de confianza del 95 %, se puede determinar que valores de  $SRC > 0,95$  corresponden a muestras significativamente similares; mientras que valores de  $SRC < 0,05$  son significativamente disímiles. En la Figura 7B, se observan los valores de SRC obtenidos al comparar cada muestra temporal con la muestra correspondiente al día 4 en los reactores A. A pesar de que se observan pequeñas diferencias en las curvas, los cuatro reactores tuvieron la misma tendencia, en la cual la comunidad bacteriana deja de ser significativamente similar respecto a la inicial ( $0,05 < SRC < 0,95$ ) luego del día 12, y tiende a ser significativamente disímil luego del día 22 ( $SRC < 0,05$ ).



**Figura 7.** Evaluación de la dinámica de la comunidad bacteriana durante el desarrollo del *floc* biológico a través del análisis de *Moving-Window* basado en la inversa de la medición del índice de Bray-Curtis (SBC) entre muestras temporales (A) y mediante la determinación de la similitud con el índice de Raup-Crick (SRP) respecto al día 4 (B). Estos análisis se efectuaron a partir de los datos obtenidos mediante DGGE de los reactores A1 (círculos negros), A2 (cuadrados blancos, A3 (triángulos blancos) y A4 (rombos negros).

Se realizaron las mediciones correspondientes a la riqueza (número de bandas del DGGE) correspondientes a las comunidades bacterianas de las cuatro réplicas de reactores A. En la Tabla 1 se observan los valores promedio entre todas las muestras de cada reactor, los cuales fueron similares entre sí, y su correspondiente desvío estándar. Los valores promedio de bandas observadas en cada uno de los reactores fueron similares en todas las réplicas.

**Tabla 1.** Valores de riqueza correspondientes a las comunidades bacterianas de las cuatro réplicas de reactores A.

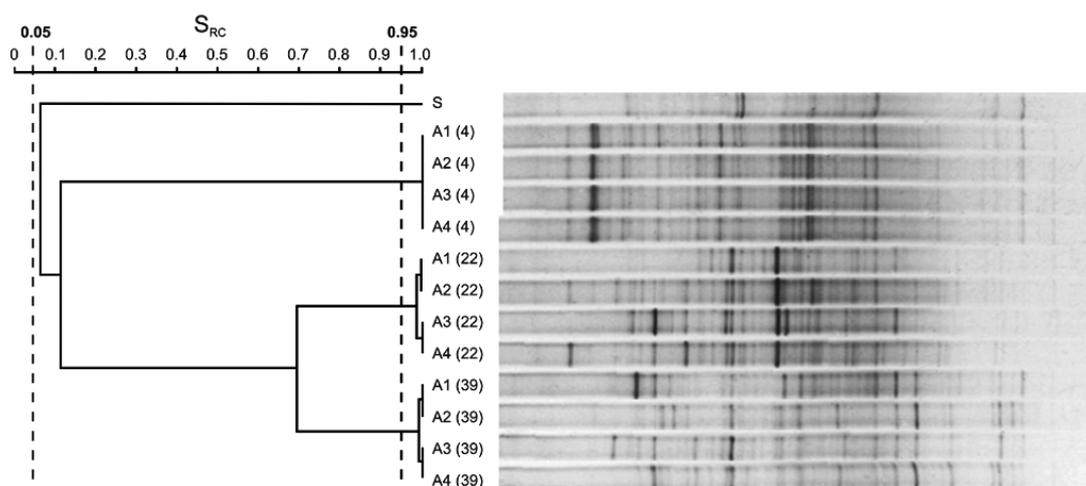
Reactor	A1	A2	A3	A4
Riqueza	41,6 ± 4,4	37,4 ± 4,6	37,2 ± 3,7	40,1 ± 4,0

Los resultados están expresados como el promedio ( $\pm$  desvío estándar) de los valores temporales durante los 40 días de experimento.

### **Comparación de la comunidad bacteriana entre reactores replicados**

Una vez comprobado el carácter dinámico de la estructura de la comunidad bacteriana durante el desarrollo del *floc* biológico, se examinó la replicabilidad de la misma, analizado la similitud entre los reactores en muestras temporales equivalentes.

En la Figura 8 se muestra el dendrograma generado empleando el índice probabilístico SRC al comparar los patrones de estructura de la comunidad obtenidos para los cuatro reactores replicados durante los días 4, 22 y 39 de operación.



**Figura 8.** Análisis de *cluster* empleando el índice de similitud de Raup-Crick de los patrones de estructura de la comunidad bacteriana de las muestras correspondientes a los reactores replicados A durante los días 4, 22 y 39. La muestra rotulada como “S” corresponde a la muestra de barro inicial empleada para inocular a los reactores.

Las comunidades bacterianas de los cuatro reactores replicados divergen levemente entre sí con el correr del experimento. Esto queda demostrado mediante la disminución de la similitud entre réplicas (Tabla 2). Sin embargo, se puede advertir que se mantiene el agrupamiento con una similitud significativa ( $SRC > 0,95$ ) en los tres tiempos de estudio. Esto significa que los cambios que se producen a lo largo del tiempo son similares en todos los reactores, indicando un fuerte carácter determinístico durante el ensamblado de la

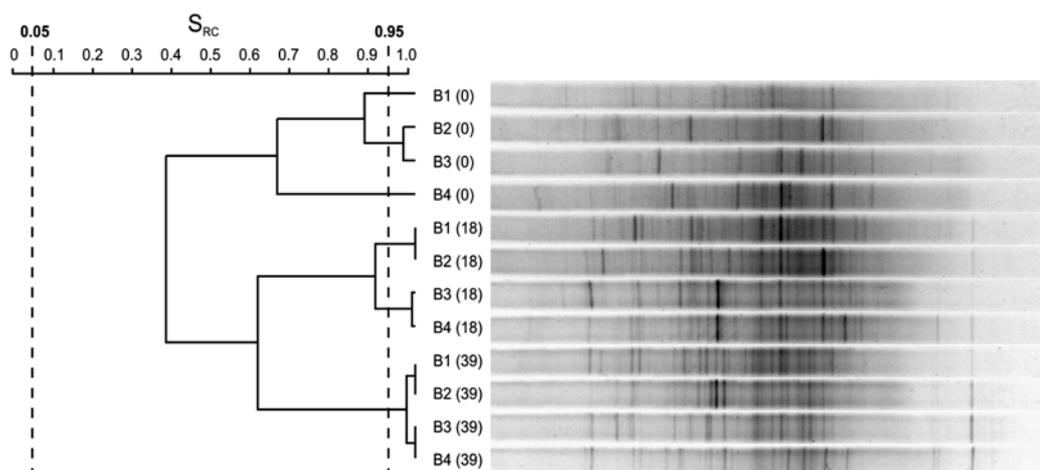
comunidad bacteriana del *floc* biológico (Figura 8).

**Tabla 2.** Similitud entre las comunidades de los reactores replicados A medida con el índice de Bray-Curtis durante los días 4, 22 y 39 del experimento.

Día	4	22	39
<b>Similitud (Bray-Curtis)</b>	0,83 ± 0,05	0.60±0.06	0.54±0.09

### ***Convergencia de la comunidad a partir del mismo pool de especies***

Para evaluar el carácter determinístico del ensamblado de la comunidad del *floc* biológico se puso a prueba la hipótesis siguiente: partiendo de comunidades que contienen las mismas especies, pero con distinta abundancia relativa, los cambios producidos durante el ensamblado conducirán a una menor similitud entre muestras en el tiempo si el ensamblado se produce al azar y, por el contrario, la similitud aumentará con el tiempo si existe una selección determinista. Para probar esta hipótesis se operaron reactores a escala de laboratorio inoculados con mezclas de cuatro barros de distintos orígenes durante 40 días (Reactores B1-B4). Los cuatro reactores B en este caso no eran verdaderas réplicas, ya que cada reactor fue inoculado con un 70 % de la muestra de barro proveniente de una planta de tratamiento y 10 % de cada uno de las restantes plantas de tratamiento (ver *Materiales y Métodos*). De esta manera, los cuatro reactores B contienen el mismo *pool* de especies pero con distinta abundancia relativa. Por esta razón, al realizar un análisis mediante DGGE de la estructura de la comunidad bacteriana en el tiempo 0 del experimento, se observan diferencias en los patrones, ya que esta técnica detecta sólo los miembros más abundantes (Figura 9). Al realizar un análisis conjunto con las muestras correspondientes a tiempos posteriores de operación, se puede advertir que las diferencias iniciales disminuyen durante el transcurso del experimento, y finalmente durante el día 39 de operación las comunidades de los cuatro reactores convergen con una similitud significativa. Este resultado indica claramente que el ensamblado no se produjo al azar a partir del *pool* de especies disponibles, sino que presenta un fuerte carácter determinístico (Figura 9).

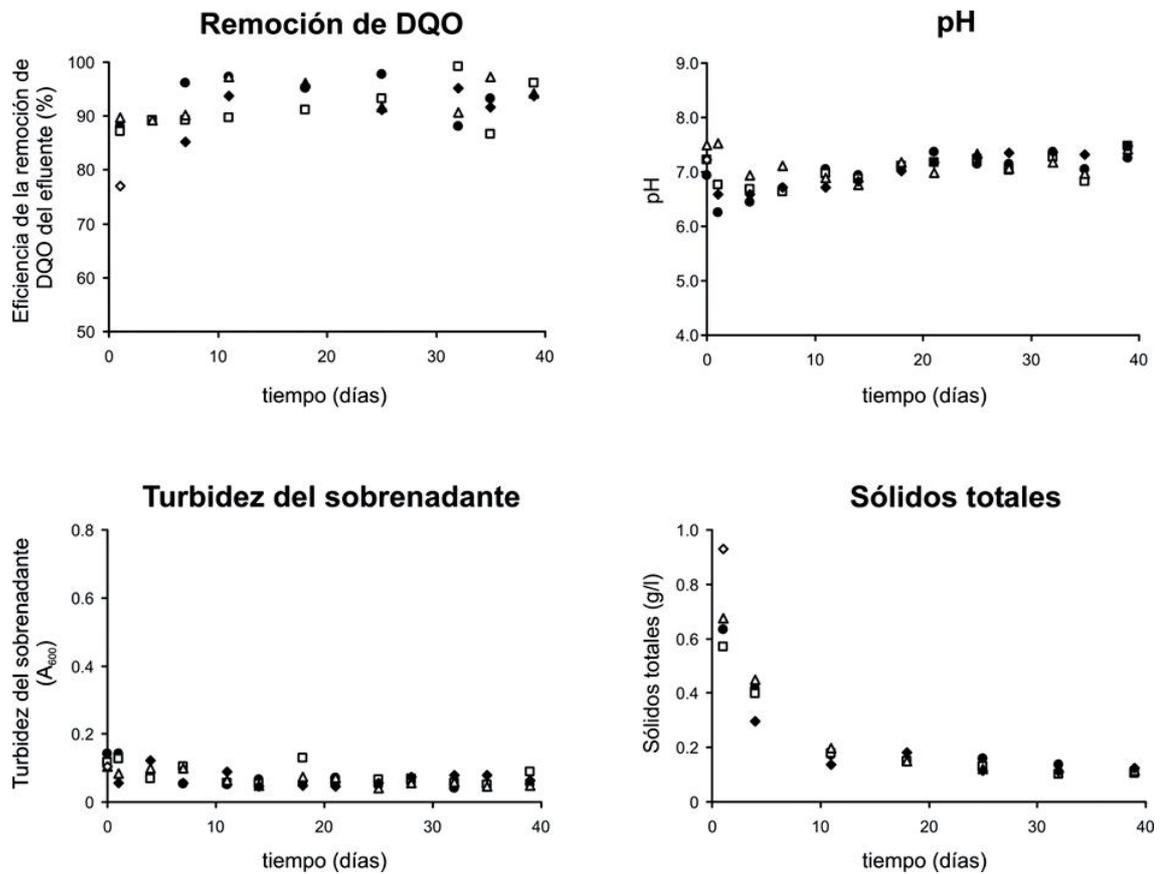


**Figura 9.** Análisis de *cluster* empleando el índice de similitud de Raup-Crick de los patrones de estructura de la comunidad bacteriana de las muestras correspondientes a los reactores B durante los días 0, 18 y 39.

### **Parámetros funcionales de los reactores B**

Los reactores B fueron inoculados con mezclas de barros procedentes de distintos orígenes. Para certificar el buen funcionamiento de los mismos se llevaron a cabo mediciones de la DQO del efluente tratado, turbidez del sobrenadante, pH y sólidos totales durante 40 días de operación (Figura 10).

A pesar de no ser réplicas exactas se observaron valores similares de los parámetros analizados para los distintos reactores B. Un parámetro importante de funcionalidad, como lo es la remoción de DQO, se mantuvo en valores cercanos al 90 % durante todo el experimento. Por otro lado, la turbidez del sobrenadante se mantuvo en valores bajos, lo cual genera efluentes límpidos. Los sólidos totales experimentaron una caída inicial, atribuida a la entrada en régimen de los reactores, y después se estabilizaron en un valor aceptable. Por último, no se registraron grandes cambios de pH (Figura 10).



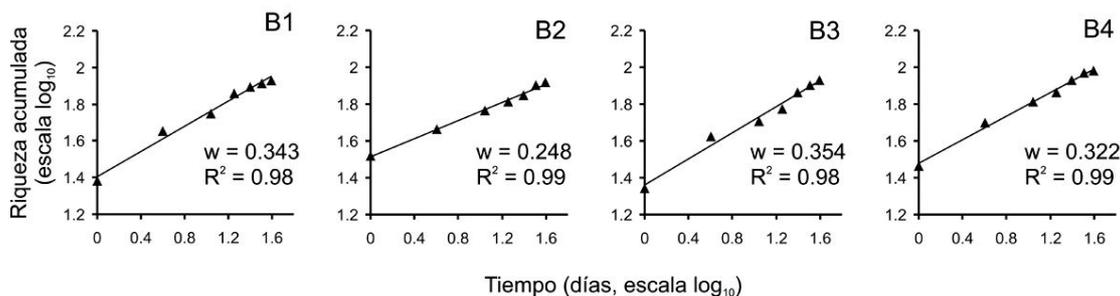
**Figura 10.** Parámetros funcionales de los reactores B1 (círculos negros), B2 (cuadrados blancos, B3 (triángulos blancos) y B4 (rombos negros) durante los 40 días de experimento.

### **Tasa de recambio de especies bacterianas**

A pesar de la similitud significativa observada entre muestras temporales se observó cierto grado de divergencia, que responder a una dinámica al azar (Tabla 2). En consecuencia se llevaron a cabo experimentos para determinar la importancia de la dinámica neutral y su dependencia con el tamaño de la comunidad a partir de la cual se ensambla el *floc* biológico.

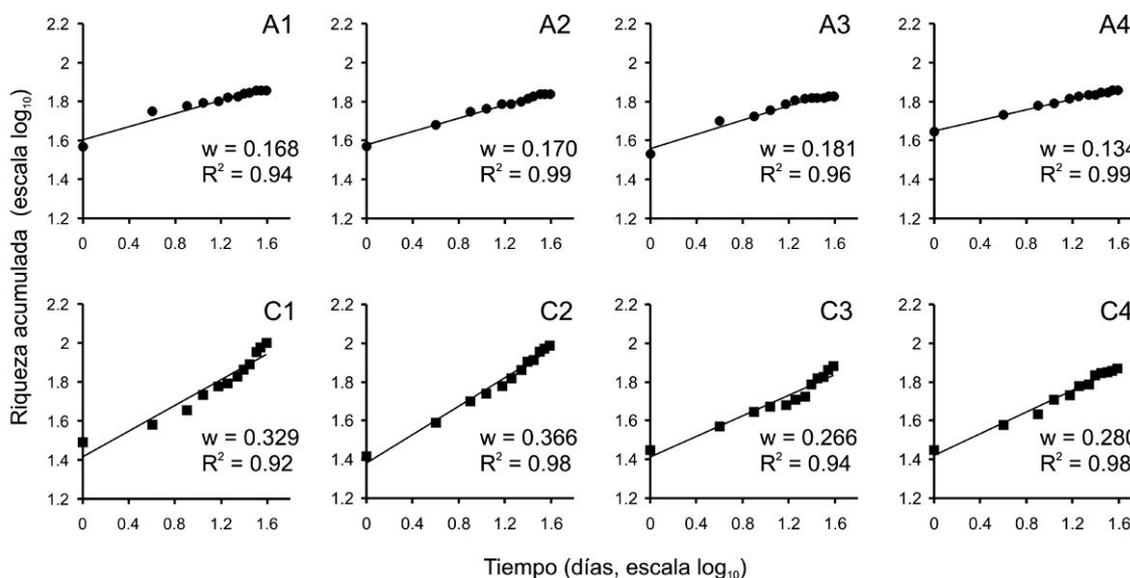
El primer análisis consistió en determinar la tasa de recambio de especies bacterianas ( $w$ ) que ocurre en los reactores B durante los 40 días de experimento. El valor de  $w$  surge de la pendiente de la regresión lineal ajustada a los datos en escala logarítmica de la riqueza acumulada en función del tiempo (Figura 11).

Se obtuvo un promedio de  $w = 0,32 \pm 0,05$  para los reactores B el cual fue mayor al obtenido para los reactores A (Figura 12), los cuales parten de un *pool* de especies menor para llevar a cabo el ensamblado del *floc* biológico. Como los reactores B no son réplicas exactas, no es posible comparar estadísticamente estos datos.



**Figura 11.** Determinación de la tasa de recambio de especies en los reactores B, realizada mediante el ajuste de una regresión lineal de los datos de riqueza acumulada en función del tiempo (en escala logarítmica).

En consecuencia, para poder realizar una comparación estadísticamente válida se diseñó un nuevo experimento, correspondiente a los reactores C, los cuales fueron inoculados con barro procedentes de distintos orígenes, pero mezclados en idéntica proporción (25 % de cada uno). Los valores de  $w$  para los reactores C dieron un valor promedio de  $0,31 \pm 0,05$ , muy cercano al obtenido para los reactores B, y significativamente superior ( $p < 0,01$ , prueba  $t$  de Student) al promedio de  $0,16 \pm 0,02$  obtenido en los reactores A (Figura 12). En definitiva, estos resultados demuestran que al incrementarse el número de especies disponibles en la comunidad a partir de la cual se produce el ensamblado del *floc* biológico, se produce un aumento significativo en la riqueza acumulada de especies observadas.



**Figura 12.** Determinación de la tasa de recambio de especies en los reactores A y C, realizada mediante el ajuste de una regresión lineal de los datos de riqueza acumulada en función del tiempo (en escala logarítmica).

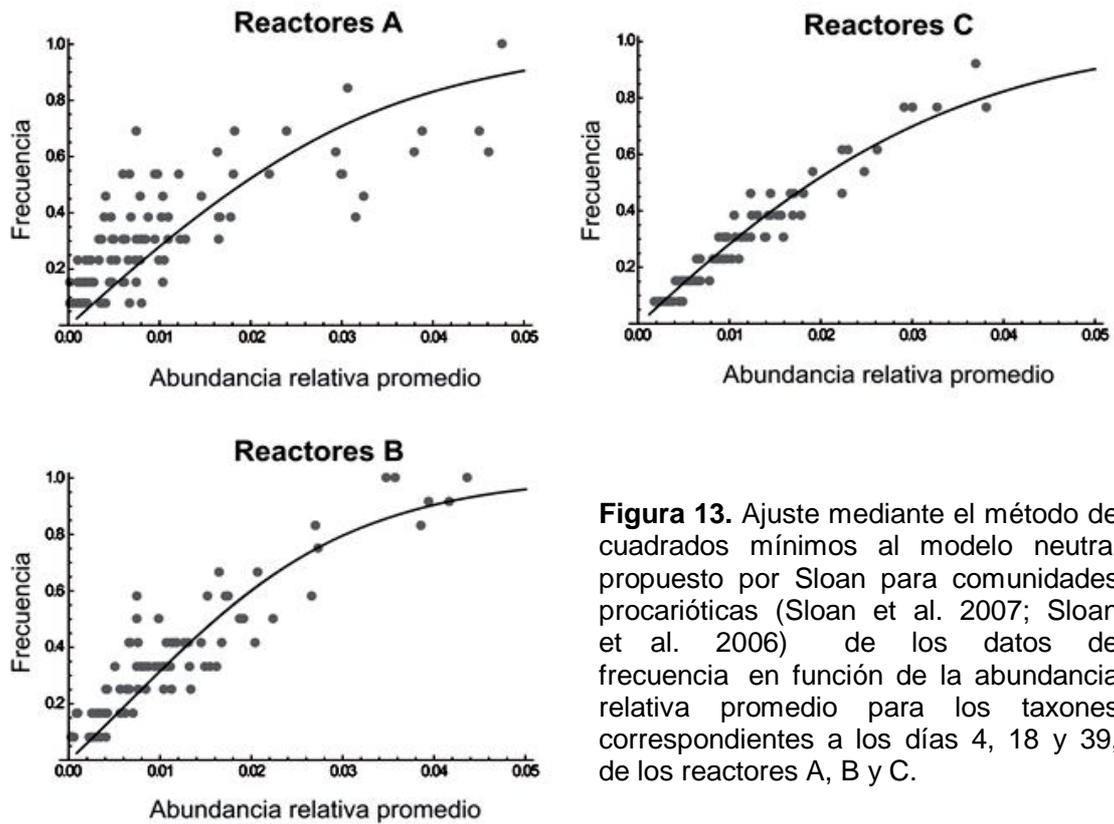
### ***Ajuste al modelo neutral propuesto para comunidades procariotas***

Una evidencia adicional de la dinámica neutral que ocurre durante el ensamblado del *floc* biológico de barros activados se obtuvo mediante el ajuste al modelo neutral de Sloan y colaboradores propuesto para procariotas (Sloan et al. 2007; Sloan et al.

2006). El modelo ajusta la relación observada entre la abundancia relativa de los distintos taxones y la frecuencia con la que son encontrados en las muestras de análisis. En este trabajo empleamos los datos obtenidos mediante DGGE, de los cuales se extrajeron los valores de frecuencia de aparición de cada taxón y su abundancia relativa promedio a lo largo de las muestras temporales analizadas en los reactores A, B y C (Figura 13).

En la Figura 13 se advierte que los datos correspondientes a los reactores B y C ajustan mejor al modelo neutral que los datos de los reactores A, lo cual se condice con la hipótesis propuesta que indica que un número mayor de especies disponibles acrecienta el predominio de la dinámica neutral durante el ensamblado del *floc* biológico. Otra observación importante, es que la mayoría de los puntos correspondientes a los reactores A se encuentra hacia la izquierda de la curva que ajusta la relación teórica entre frecuencia y abundancia relativa. Esto se relaciona con valores positivos de  $\alpha_i$ , el parámetro de ventaja, con lo que la mayoría de las especies detectadas en este sistema posee una ventaja adaptativa que aumenta su probabilidad de establecerse en la comunidad.

Los valores de  $N\tau m$  obtenidos a partir de los ajustes fueron muy similares para los tres experimentos: 31, 47 y 30 en los reactores A, B y C respectivamente. Debido a que los datos de abundancia relativa fueron extraídos a partir de la intensidad de las bandas de DGGE, no es posible determinar un valor de  $N\tau$ . En consecuencia los valores de  $m$ , que indican la tasa de inmigración para los distintos experimentos, no pudieron ser determinados. Se hubiesen esperado valores de  $m$  mayores en los reactores B y C, ya que tienen un mayor *pool* de especies disponibles para la inmigración.



**Figura 13.** Ajuste mediante el método de cuadrados mínimos al modelo neutral propuesto por Sloan para comunidades procarióticas (Sloan et al. 2007; Sloan et al. 2006) de los datos de frecuencia en función de la abundancia relativa promedio para los taxones correspondientes a los días 4, 18 y 39, de los reactores A, B y C.

## DISCUSIÓN

### ***Dinámica de las comunidades del floc de barros activados***

Generalmente se atribuye la gran estabilidad de los sistemas de barros activados a la gran diversidad bacteriana que se encuentra en los mismos. Considerando que varios miembros de la comunidad pueden llevar a cabo funciones similares, la función del ecosistema será mantenida bajo un amplio espectro de condiciones ambientales (McMahon et al. 2007). La redundancia funcional en estos sistemas está reflejada en los valores de riqueza a lo largo del experimento. En conjunto con los altos niveles de dinámica, el número de especies abundantes se mantuvo relativamente constante, lo cual indica que cuando un miembro de la comunidad reduce su abundancia o se pierde del sistema, otro miembro reemplaza el nicho vacante.

La dinámica de la comunidad bacteriana durante el desarrollo del *floc* biológico fue cuantificada mediante el análisis de *Moving-Window*, el cual consiste determinar el porcentaje de cambio en la comunidad entre muestras temporales sucesivas. De esta manera se observó un alto nivel de dinámica en los reactores, aún en ausencia de perturbaciones externas. Este resultado es consistente con estudios anteriores que marcan una estabilidad funcional de estos sistemas a pesar de una dinámica considerable en la composición de especies (Falk et al. 2009; Fernández et al. 1999; Kaewpipat and Grady 2002; Lozada et al. 2006; McGuinness et al. 2006). En este trabajo también se comprobó que los cambios producidos en las comunidades microbianas no se reflejaron en cambios significativos en parámetros funcionales, tales como la remoción de la DQO o la turbidez del sobrenadante (Figura 10).

Los valores de dinámica observados en este estudio fueron mayores a los reportados previamente en sistemas similares (Falk et al. 2009). Estas diferencias pueden ser explicadas por diversas razones, que radican en el diseño experimental llevado a cabo. En este estudio se partió de una comunidad de barros activados con los *floc* parcialmente disgregados y enriquecida en poblaciones planctónicas, la cual se logró luego de una aclimatación en *batch*. Luego se pasó directamente al esquema de funcionamiento de los reactores en el día 0 de experimento, el cual incluye los pasos de sedimentación y decantación, con el propósito de estudiar la dinámica cuando comienza a desarrollarse el *floc*. De esta manera, gran parte de las poblaciones planctónicas que no lograron formar parte del *floc* biológico se eliminan del sistema, ocasionando grandes cambios en la estructura de la comunidad. Seguramente por esta razón, se observa incluso una tasa de cambio mayor en los primeros días del experimento (Figura 7A).

Además, durante el inicio del experimento se registró un incremento en el tamaño del *floc* (Figura 5), que denota el desarrollo del mismo. El agregado progresivo de las bacterias

claramente modifica la estructura de la comunidad en el tiempo, contribuyendo a los altos valores de dinámica iniciales.

Por otro lado, nuestro análisis se enfocó solamente en las poblaciones metabólicamente activas, analizando los patrones de DGGE de los fragmentos del ARNr 16S amplificados mediante RT-PCR. Mediante la tinción que distingue las poblaciones viable y no viables (con las membranas plasmáticas dañadas) durante el desarrollo del *floc*, se observó un considerable aumento de las poblaciones inactivas en el centro del los *flocs* maduros (Figura 5). Estas poblaciones ancladas en los *flocs* son detectadas en los análisis basados en la detección del ADN del gen ribosomal 16S, y pueden conducir a una subestimación de la verdadera dinámica.

El período de aclimatación fue diseñado con el objetivo de enriquecer la comunidad en poblaciones planctónicas, manteniendo al mismo tiempo la riqueza original del inóculo proveniente de barros activados. De esta manera el inóculo inicial constituye el reservorio de especies del cual deriva cualquier especie "invasora". La colonización exitosa se produjo cuando una especie dada se volvió detectable mediante la técnica de DGGE. De esta manera seguimos la definición de Marzorati y colaboradores, donde se interpreta la dinámica como el número de especies que en promedio llegan a un predominio significativo (por encima del límite de detección de la técnica) durante un intervalo de tiempo definido (Marzorati et al. 2008).

Los reactores se alimentaron con medio esterilizado y los reactores se mantuvieron en un sistema cerrado, aunque no hermético, para minimizar la colonización por parte de especies del ambiente. De esta forma las bacterias que van colonizando el *floc* y crecen en su abundancia relativa (hasta alcanzarse a visualizar la banda correspondiente en el DGGE) corresponden a especies presentes en la comunidad original del inóculo. Esto nos llevó a diseñar los experimentos con los reactores B y C, donde se aumentó la diversidad de especies disponibles para observar su incidencia en la dinámica. Si bien no se observaron diferencias significativas en la dinámica de los reactores A, B y C mediante ensayos de MW (datos no mostrados), se establecieron cambios significativos cuantificando la tasa de recambio de especies.

### ***Determinismo durante desarrollo del *floc* biológico***

En la Figura 7A se observa que los cuatro reactores mantienen un perfil de dinámica similar a lo largo del experimento. Estos cambios, no implican necesariamente las mismas trayectorias en la sucesión de la comunidad. Con el objetivo de analizar las rutas en ensamblado, se analizaron los patrones de DGGE comparando muestras correspondientes a distintos estadios temporales de los cuatro reactores replicados, empleando el índice de similitud probabilístico de Raup-Crick. Mediante este índice se puede determinar si dos

comunidades son significativamente similares, más allá de la similitud esperada por azar.

Las comunidades bacterianas siguieron un patrón de ensamblado definido durante el desarrollo del *floc* biológico. Por un lado, las comunidades alcanzan a ser significativamente distintas respecto a la comunidad inicial (Figura 7B), lo cual ratifica los altos niveles de dinámica. Por otra parte, la estructura de las comunidades bacterianas de las cuatro réplicas, durante tres estadios temporales, fueron significativamente similares (Figura 8). El hecho de que la estructura de la comunidad entre réplicas sea más reproducible de lo esperado por azar, bajo altas condiciones de dinamismo, nos permite aseverar que la comunidad del *floc* biológico no se ensambla al azar a partir del consorcio bacteriano disponible. Esta hipótesis se confirmó al observar la convergencia de los reactores B, los cuales poseen el mismo número de especies pero con diferente abundancia relativa (Figura 9), lo cual manifiesta una selección de las especies que logran incrementar su abundancia relativa durante el desarrollo del *floc* biológico.

Estos resultados sugieren la existencia de un proceso de sucesión, en el cual las bacterias son reclutadas progresivamente a partir del *pool* disponible, cada una con los requerimientos ecológicos particulares determinados por la comunidad en las distintas fases del desarrollo del *floc* biológico. Las especies que logran invadir el *floc* biológico, pueden volverse momentáneamente dominantes, desplazando a otras especies establecidas cuando su eficacia biológica (*fitness*) relativa es superior.

La existencia de cierto carácter determinístico en sistemas de barros activados ya había sido reportada y principalmente se fundamentó en una presión de selección por parte del efluente (van der Gast et al. 2008; Lozada et al. 2006). En este trabajo se empleó un medio sintético el cual no debería tener mayor presión de selección sobre las bacterias del inóculo. En consecuencia, la única presión de selección considerable en estos reactores es la ejercida por los sucesivos pasos de sedimentación y decantación, la cual está determinando las especies que forman parte del *floc* biológico durante su formación.

### ***Dinámica neutral***

En paralelo al determinismo observado durante el desarrollo del *floc* biológico, algunas observaciones sugieren la existencia adicional de cierta dinámica neutral. Si bien se encontraron similitudes significativas entre réplicas luego de 40 días de operación (correspondientes a 10 veces el SRT), las comunidades bacterianas de los reactores replicados A no se modificaron de forma idéntica. Esto quedó evidenciado con la disminución de la similitud de Bray-Curtis promedio entre las réplicas y un aumento de la varianza (Tabla 2). Es posible que hubieran seguido divergiendo aún más si los experimentos se han ejecutado por más de 40 días, debido a la influencia progresiva de esta dinámica neutral.

Una metacomunidad se ha definido como un conjunto de comunidades locales que están vinculadas por la dispersión de múltiples especies que interactúan al azar entre ellas (Leibold et al. 2004). Aunque esta definición implica un cierto grado de aislamiento entre las comunidades locales, el concepto de metacomunidad proporciona un marco conveniente para estudiar la dinámica en la estructura de la comunidad bacteriana de *floc* de barros activados en reactores de laboratorio. Se sabe que los procesos estocásticos, tales como la mutación, la dispersión y la extinción, podrían contribuir a los patrones de diversidad. Los reactores son sistemas abiertos, sin barreras físicas para la dispersión de especies, igualmente la inmigración a partir de fuentes externas fue esencialmente impedida por el uso de medios de cultivo esterilizados. De esta forma, consideramos que cada reactor alberga una metacomunidad, compuesta por diferentes comunidades locales comprendidas por poblaciones planctónicas o que forman parte de los *flocs* biológicos. Entonces, las bacterias que inmigran a los *flocs*, provienen de la misma comunidad de cada reactor, aunque indetectables por la técnica de DGGE.

Los altos valores de dinámica observados se deben al reclutamiento de especies a partir del consorcio bacteriano disponible. De ello se desprende que el efecto relativo de los componentes determinísticos y estocásticos puede depender de la riqueza en la comunidad original.

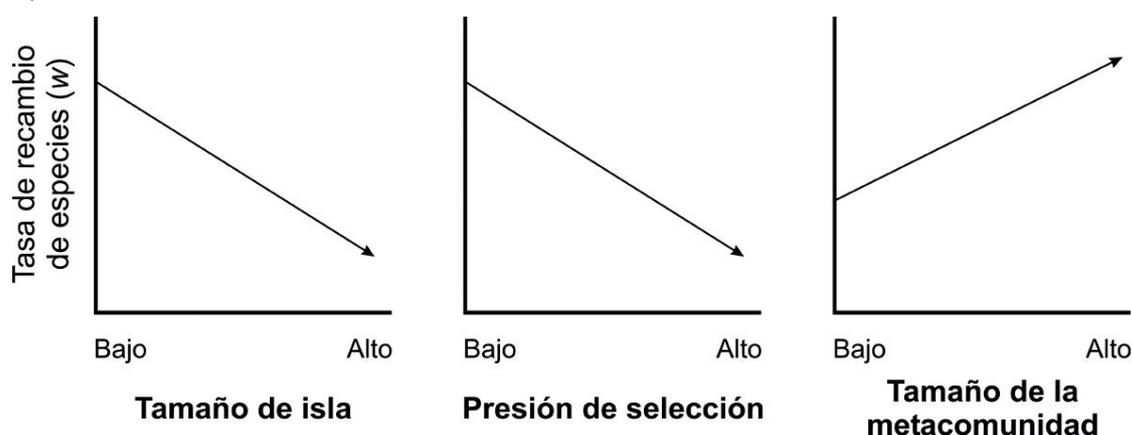
En este trabajo se realizó la suposición de que la mezcla de los barros de cuatro plantas en los reactores B y C, originan una comunidad con una mayor riqueza respecto a los reactores A. Esta suposición podría no ser válida si existe una gran cantidad de taxones compartidos entre estos inóculos, algo muy poco probable de acuerdo a los distintos orígenes de las muestras. Igualmente, la validez de esta suposición se comprobó posteriormente en otro trabajo del laboratorio, el cual incluyó la secuenciación masiva de muestras de barros que empleamos aquí para inocular los reactores (Ibarbalz et al. 2013).

### ***Tasa de recambio de especies***

Las pendientes más elevadas de los ajustes de STR, que indican un mayor recambio de especies en el tiempo, se obtuvieron para los reactores que contienen un mayor número de especies disponibles para conformar el *floc* (reactores B y C). Este resultado confirma el incremento del carácter neutral durante el ensamblado con el aumento en el número de especies en la metacomunidad. El análisis de la relación especie-tiempo fue utilizada por van der Gast y sus colegas, para examinar la presión selectiva ejercida por la alimentación de los reactores con distinta proporción de efluentes industriales y municipales (van der Gast et al. 2008). Ellos observaron que la tasa de recambio de especies disminuyó a medida que aumentó la presión selectiva (incrementando la concentración de efluente industrial), asociando las pendientes más bajas obtenidas con un aumento en la

selección basada en nichos dentro de las comunidades bacterianas. Los valores de las pendientes calculadas en este trabajo estuvieron dentro del rango de valores obtenidos para las comunidades bacterianas al cambiar de un modelo estocástico hacia uno determinístico en el ensamblado de las comunidades bacterianas (van der Gast et al. 2008).

En el capítulo *Species-time relationships for bacteria* del libro *Microbial Ecological Theory* (Oliver et al. 2012) se discute la influencia de distintos factores sobre la STR durante el ensamblado de comunidades bacterianas (Figura 14). Además de la influencia negativa de la presión de selección sobre la tasa de recambio de especies reportada por van der Gast, el mismo autor destacó el mismo efecto al incrementarse el tamaño de isla, dado por reactores de mayor tamaño. La explicación de este fenómeno radica en el aumento del número de nichos cuando se incrementa el tamaño de la isla, lo cual brinda más posibilidades de refugio para las especies y estabiliza la comunidad bacteriana. Por último describieron los resultados obtenidos en este trabajo para destacar el efecto positivo del tamaño de la metacomunidad sobre la tasa de recambio de especies (gráfico de la derecha en la Figura 14).



**Figura 14.** Influencia de distintas variables en la STR. Se observó una relación negativa con el incremento del tamaño de isla y con la presión de selección. La relación positiva de la STR con el tamaño de la metacomunidad es la obtenida en este trabajo (adaptado de Oliver et al. 2012).

### ***Modelo neutral para procariontas***

Para probar la hipótesis de que los procesos estocásticos son más dominantes al aumentar el número de especies disponibles, se analizaron los datos obtenidos en los patrones de DGGE utilizando también el modelo neutral para procariontas desarrollado por Sloan y colaboradores (Sloan et al. 2007; Sloan et al. 2006; Woodcock et al. 2007). Los datos de los reactores A en su mayoría quedaron hacia la izquierda de la curva establecida por el ajuste al modelo neutral teórico, es decir que las especies exhiben una frecuencia más alta a la que su abundancia podría dictar o una menor abundancia que la propuesta por su alta

frecuencia. Esto es explicado por una ventaja positiva de las especies observadas, la cual se atribuye a la capacidad de agregarse en el *floc* biológico. Este resultado se condice con el carácter determinístico observado en los reactores A.

En los reactores B y C, que parten un mayor número de especies, existe una mayor redundancia para conformar el ensamblado del *floc* biológico. De esta manera, los ajustes al modelo neutral mejoraron notablemente (Figura 13). Esto nos permite aseverar que la dinámica neutral se impone durante el ensamblado de las comunidades bacterianas al aumentar el tamaño de la metacomunidad.

### ***Empleo del DGGE en ecología microbiana***

La técnica de DGGE, al igual que otras técnicas de *fingerprinting*, nos permite definir la estructura de la comunidad bacteriana de un gran número de muestras en simultáneo. De esta manera, son especialmente útiles cuando se quieren comparar muestras en escalas temporales.

Al igual que la mayoría de los métodos utilizados para analizar los ecosistemas biológicos complejos, la técnica de DGGE tiene limitaciones. Fundamentalmente, el análisis de la estructura de la comunidad se centra sólo en los miembros más abundantes de la comunidad (Smalla et al. 2007). Además puede estar sesgada por la recuperación del ADN (Head et al. 1998), por la selectividad diferencial de la PCR (Suzuki et al. 2000), y por algunos artefactos que pueden ocurrir durante la electroforesis (Hong et al. 2007). Por estas razones, se ha recomendado que los parámetros calculados a partir de DGGE no deben ser tomados como medidas absolutas del grado de diversidad en una comunidad bacteriana (Wittebolle et al. 2009).

Si bien en este trabajo calculamos valores de riqueza de los reactores A, determinados mediante el número de bandas (Tabla 1), de ninguna manera los consideramos como valores absolutos. La utilidad de este dato fue para demostrar que el nicho vacante dejado por una especie abundante era tomado inmediatamente por otra especie, manteniéndose relativamente constante la riqueza de los miembros más representativos de la comunidad a pesar del alto grado de dinámica. También se calcularon valores de riqueza acumulada a partir del número de bandas, pero con la finalidad de establecer el cálculo de la tasa de recambio de especies.

A pesar del sesgo dado por la baja sensibilidad en la determinación de la riqueza, los resultados de este trabajo ilustran que la técnica de DGGE puede servir como una forma válida de seguimiento de los miembros predominantes de una comunidad para la prueba hipótesis o modelos pertinentes en la ecología microbiana (Baptista et al. 2008; Bell et al. 2005; van der Gast et al. 2008; Ge et al. 2008; Kaewpipat and Grady 2002; Konopka et al. 2007; Nadarajah et al. 2007; Possemiers et al. 2004; Roeselers et al. 2006; Wittebolle et al.

2009).

### ***Discusión actual sobre la dinámica neutral y determinística***

Actualmente, siguen apareciendo estudios relativos al ensamblado de comunidades bacterianas en sistemas de tratamiento de efluentes, adoptando modelos neutrales y determinísticos, lo cual manifiesta la vigencia de esta temática.

En un estudio realizado en plantas de tratamiento de efluentes reales se demostró la influencia combinada de una dinámica determinística y neutral en las comunidades bacterianas, y se estableció un mayor carácter determinístico en reactores de mayor tamaño, los cuales albergan una mayor riqueza de especies (Valentín-Vargas et al.

2012). Este efecto no debe confundirse con un aumento en la riqueza de la metacomunidad, como se postuló en este trabajo, sino más bien con el efecto del tamaño de isla mencionado descrito por van der Gast (Oliver et al. 2012).

Otro trabajo reciente describe una dinámica diferencial entre las especies abundantes y raras en reactores de barros activados (Kim et al. 2013a). Interesantemente, se observó que la tasa de recambio de especies raras es significativamente mayor que la correspondiente a las especies más abundantes. Si bien no está establecido en el trabajo, este resultado podría vincularse con un balance de fuerzas determinísticas y estocásticas.

Finalmente, otro estudio remarca cómo la historia previa de una comunidad afecta la variabilidad de respuesta a la selección dada en un ambiente. De esta manera, se destaca la importancia de la pre-adaptación del inóculo para que una comunidad genere patrones reproducibles en un ambiente determinado (Pagaling et al. 2013). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, en el cual reactores de laboratorio inoculados con muestras de plantas de tratamiento de efluentes experimentan una selección en un ambiente similar, se dirigen en este sentido ya que se observó una convergencia en las comunidades y patrones de abundancia reproducibles en el tiempo.

### **CONCLUSIONES**

Demostramos que existe un gran dinamismo de la estructura de la comunidad bacteriana durante el desarrollo del *floc* biológico de barros activados en reactores a escala de laboratorio.

Los cambios observados en la comunidad no fueron al azar, sino que siguieron un patrón reproducible. Además, al partir de comunidades que difieren en la distribución de abundancia de sus especies, éstas convergen en un patrón de estructura de comunidad común. Estos resultados indican un fuerte carácter determinístico durante el ensamblado del *floc* biológico.

Los patrones replicados, a pesar de que fueron significativamente similares, no fueron idénticos, lo cual se atribuye a la presencia de cierta dinámica estocástica. Demostramos que al aumentar la cantidad de especies disponibles para conformar el agregado bacteriano, se incrementa considerablemente el carácter neutral del ensamblado de la comunidad.

De esta forma concluimos que ambos componentes, determinísticos y estocásticos, operan en conjunto durante el ensamblado del *floc* biológico de barros activados, y el balance entre los mismos está influenciado por el tamaño de la metacomunidad.

Este hallazgo contribuye al entendimiento del ensamblado de agregados bacterianos, el cual es necesario para desarrollar aplicaciones biotecnológicas más efectivas relacionadas con el cuidado del ambiente, y que también podría tener implicancias en otras áreas relacionadas con la industria y la salud.

## **Capítulo 2: Respuesta de la comunidad bacteriana del *floc* biológico ante la desestabilización mediada por agentes externos**

Los resultados del segundo capítulo fueron enviados para su publicación a las siguientes revistas:

- Ayarza, J.M., Mazzella A., Erijman, L., 2013. Planktonic outgrowth of microaerophilic bacteria after stressor-induced deflocculation of activated sludge. Enviado a *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Ayarza, J.M., Erijman, L., 2013. Draft genome sequences of *Sediminibacterium* sp. C3, a novel *Sediminibacterium* strain isolated from activated sludge, and type strain *Sediminibacterium salmoneum* NJ-44. Enviado a *Genomes announcement*.

## **INTRODUCCIÓN**

### ***Problema de la desfloculación***

La estabilidad del *floc* biológico es clave para la eficiente separación líquido-sólido durante el tratamiento de efluentes basado en barros activados. Perturbaciones externas durante el tratamiento pueden erosionar o fragmentar el *floc* biológico, lo cual desencadena problemas en la sedimentación de la biomasa. De esta manera, las consecuencias negativas se centran en la pérdida de biomasa activa y fundamentalmente en la reducción de la calidad del efluente tratado debido al incremento en la concentración de sólidos suspendidos.

Durante estos incidentes casi nunca se observa una desfloculación total de los barros activados. Sin embargo, aún cuando los sólidos que se desprenden correspondan a una

pequeña fracción del barro, su pasaje al sobrenadante tiene grandes implicancias sobre la calidad del efluente tratado (Figura 15).



**Figura 15.** Efecto de la desfloculación en reactores a escala de laboratorio. El reactor de la izquierda se encuentra en condiciones normales, con la biomasa sedimentada y el sobrenadante límpido. El reactor de la derecha sufrió un proceso de desfloculación, advertido por la turbidez del sobrenadante, no obstante se observa sedimentación de biomasa, lo cual sugiere que no se afecta la totalidad de la misma.

Por ejemplo, suponiendo que sólo el 2 % de los *flocs* se disgregan completamente, la concentración de sólidos en el sobrenadante podría incrementarse hasta 80 mg/l, la cual es ampliamente superior al límite de 15-20 mg/l en descarga de efluentes impuesta en muchos países (Wilén et al. 2000b). Si bien en la mayoría de las jurisdicciones en Argentina no se establecen límites de sólidos suspendidos, estos contribuyen a otros parámetros regulados, tales como sólidos sedimentables (en 10 minutos y 2 horas), demanda biológica de oxígeno (DBO), o demanda química de oxígeno (DQO).

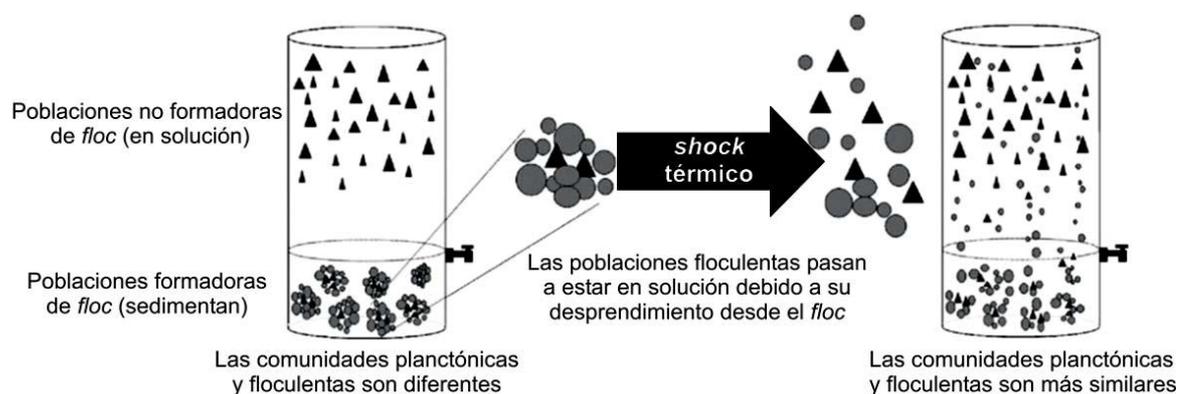
La desfloculación como respuesta a perturbaciones externas está ampliamente reportada, e incluye cambios bruscos en la concentración de compuestos tóxicos (Galil et al. 1998), metales pesados (Neufeld 1976), temperatura (Morgan-Sagastume and Grant Allen 2005; Nadarajah et al. 2007), oxígeno disuelto (Wilén et al. 2000a), pH (Sarlin et al. 1999) y fuerza iónica (Zita and Hermansson 1994). Generalmente estos cambios son inducidos por fluctuaciones en las propiedades fisicoquímicas del efluente a tratar. Debido a las variaciones que ocurren durante las distintas etapas de los procesos industriales, las plantas de barros activados destinadas a tratar este tipo de efluentes están expuestas mayormente a estas perturbaciones. En contraposición, las plantas de tratamiento de efluentes

municipales están menos sometidas a estas fluctuaciones, ya que la composición del efluente y su temperatura se mantienen relativamente constantes en el tiempo.

### **Comunidades planctónicas y floculentas**

Como indicamos en la introducción general de este trabajo, las poblaciones planctónicas en los sistemas de barros activados son minoritarias, y en consecuencia es posible obtener un efluente clarificado. Luego del efecto de perturbaciones externas, se experimenta un incremento en la turbidez del sobrenadante que puede corresponder al desprendimiento bacterias del *floc* biológico, permaneciendo de forma planctónica o formando parte de *flocs* de menor tamaño que no son capaces de sedimentar; o bien al crecimiento de poblaciones planctónicas.

En un estudio realizado en reactores a escala de laboratorio, se detectó mediante análisis de *fingerprinting* que la similitud entre la estructura de las comunidades planctónicas y floculentas se incrementó luego de un *shock* térmico, lo cual estaría indicando un desprendimiento de las bacterias del *floc* luego de esta perturbación, descartando el crecimiento de poblaciones planctónicas (Figura 16, Nadarajah et al. 2010).



**Figura 16.** Ilustración adaptada del trabajo publicado por Nadarajah y colaboradores, que grafica cómo las comunidades planctónicas y floculentas son más similares luego de un *shock* térmico, que induce el desprendimiento de las bacterias que normalmente habitan el *floc* biológico hacia la fase acuosa (adaptado de Nadarajah et al., 2010).

Alternativamente, si bien es menos frecuente, existe la posibilidad de que el crecimiento de poblaciones planctónicas ocasione el mismo problema. Watanabe y colaboradores, detectaron el incremento desmedido de poblaciones planctónicas que degradan fenol ocasionando el colapso del funcionamiento de reactores basados en barros activados, ante el incremento en la dosificación de este compuesto orgánico hasta una concentración de 1,5 g/l (Watanabe et al. 1999).

Además del crecimiento de especies planctónicas, también deben considerarse los

cambios en la estructura de la comunidad bacteriana del *floc* que pueden alterar la estabilidad del mismo. Por ejemplo, el crecimiento poblacional de bacterias filamentosas, que puede verse favorecida en períodos de niveles bajos de oxígeno disuelto, puede inducir la fragmentación del *floc* al atravesar su estructura (Martins et al. 2004). Por otro lado, también se podría desencadenar el enriquecimiento hacia poblaciones bacterianas con menor capacidad de agregación, produciendo un *floc* más endeble y susceptible a la desfloculación (Wilén et al. 2008b).

### **Mecanismos de desfloculación**

A pesar de que el efecto de distintos agentes desfloculantes está ampliamente reportado, se tiene poco conocimiento acerca de los mecanismos por los cuales se produce la desfloculación.

El mecanismo más aceptado de disrupción del *floc* es a través de la alteración de las interacciones físicas de la matriz extracelular que sostienen el agregado bacteriano.

Sin lugar a dudas, cambios en la fuerza iónica, temperatura, pH, o compuestos hidrofóbicos por ejemplo, pueden disociar las uniones de las EPS entre sí o con las bacterias del *floc*, afectando su integridad.

Además de la incidencia de las perturbaciones externas sobre la estructura de la matriz extracelular, es importante estudiar de qué manera estos agentes pueden afectar el metabolismo o las propiedades fisiológicas de las bacterias que integran el *floc* biológico, y tener consecuencias negativas sobre la integridad del agregado. Wilén y colaboradores, establecieron la importancia de la actividad metabólica de las bacterias que componen el *floc* para la estabilidad del mismo. Estos autores observaron *flocs* más estables cuando las bacterias se encontraban metabólicamente activas bajo condiciones aeróbicas, o ante la dosificación de un aceptor final de electrones como el nitrato en condiciones anóxicas (Wilén et al. 2000b). En un estudio paralelo, observaron eventos de desfloculación inducida por periodos anaeróbicos, los cuales se revirtieron restableciendo la oxigenación, que reactiva el metabolismo oxidativo (Wilén et al. 2000a). Aunque se desconoce exactamente de qué manera es necesaria la actividad metabólica, se infiere que una disminución de la misma afecta la producción de las EPS necesarias para mantener la integridad del *floc*. Galil y Schwartz-Mittelmann, postularon este mecanismo al observar una inhibición del metabolismo energético (menor producción de ATP) luego de *shocks* de fenol en reactores a escala de laboratorio (Schwartz-Mittelmann and Galil 2000). Otra posibilidad es que se afecte el metabolismo de manera de que se sintetizen otras EPS, que debido a su composición ofrezcan menos resistencia frente a perturbaciones externas. Por ejemplo, se demostró que la composición del efluente a tratar puede modificar la fracción de las EPS unidas débilmente (Li and Yang 2007). No sólo la naturaleza de la fuente de

carbono tiene incidencia, sino también su concentración, ya que efluentes a tratar con valores de DQO extremadamente altos o bajos influyen negativamente sobre la estabilidad del *floc* (Van Dierdonck et al. 2012).

Además de la inhibición del metabolismo, las perturbaciones externas pueden ocasionar una respuesta fisiológica por parte de las bacterias del *floc* biológico, con consecuencias negativas para la estabilidad del mismo. Algunas de las repuestas posibles solamente fueron descritas en cultivos puros hasta el momento, aunque podrían suceder en barros activados. Un ejemplo es la secreción de enzimas hidrolíticas que degradan las EPS, la cual se puede desencadenar ante periodos de inanición (Flemming and Wingender 2010). También una diferenciación hacia formas celulares planctónicas observada durante el ciclo celular de biopelículas, podría ocasionar problemas de sólidos suspendidos (McDougald et al. 2012).

Existe un único mecanismo mediante el cual se detalla cómo una respuesta a estrés se relaciona directamente con la desfloculación. El mismo consiste en una respuesta a agentes electrofílicos, la cual desencadena la expulsión de  $K^+$  citoplasmático al medio extracelular. El incremento en la concentración de este catión monovalente interfiere en las uniones de las EPS mediadas por  $Ca^{2+}$ , debilitando de esta forma la estructura del *floc* (Bott and Love 2004).

### ***Desprendimiento distintivo de grupos filogenéticos***

Debido a que solamente una fracción pequeña de las bacterias que conforman normalmente el *floc* biológico se libera durante los eventos de desfloculación, es interesante estudiar si existe un desprendimiento diferencial de ciertos grupos taxonómicos. La caracterización de estos grupos podría ayudar al diseño de medidas preventivas o correctivas ante problemas de desfloculación.

En algunos trabajos, se pudo determinar que ciertos grupos taxonómicos mostraron un mayor desprendimiento del *floc* ante eventos de desfloculación. Las razones de este fenómeno pueden deberse a la localización de ciertos grupos bacterianos dentro del *floc*. Wilén y colaboradores, mostraron que las bacterias pertenecientes al grupo *Gammaproteobacteria* se encuentran mayormente en la sección externa del *floc*, lo que las hace más susceptibles al desprendimiento luego de perturbaciones externas (Wilén et al. 2008b).

Por otro lado, puede existir un desprendimiento diferencial de acuerdo a las distintas capacidades de agregación de los grupos filogenéticos que componen el *floc* biológico. Se determinó que las bacterias del grupo *Planctomycetes* y *Firmicutes*, aunque se encuentran en el *floc* biológico, tienden a crecer de forma planctónica y se desprenden masivamente ante eventos de desfloculación (Morgan-Sagastume et al. 2008).

## **Agentes desfloculantes**

Como explicamos en las secciones anteriores, las fluctuaciones en las propiedades fisicoquímicas inducidas por diversos agentes externos afectan la integridad del *floc*. En este trabajo nos centraremos en el estudio del efecto de un agente físico (temperatura) y otro químico (fenol), los cuales inducen la desfloculación a través de distintos mecanismos.

Los cambios bruscos de temperatura (*shocks* térmicos), son uno de los factores que comúnmente inducen la desfloculación en plantas de tratamiento basadas en barros activados, y pueden darse por variaciones ambientales o por los cambios de temperatura del efluente a tratar (Morgan-Sagastume and Allen 2003; Wilén et al. 2008a). El efecto de *shocks* térmicos se comprobó al incrementarse bruscamente la temperatura en reactores de barros activados a escala de laboratorio, lo cual provocó el aumento de la concentración de sólidos suspendidos (Morgan-Sagastume and Allen 2003). Posteriormente, se postuló que la desfloculación observada se debe a la solubilización de las EPS que mantienen unido al *floc* biológico, y que este *shock* térmico no tiene mayor impacto en la lisis y viabilidad celular (Morgan-Sagastume and Grant Allen 2005). Además del efecto sobre la matriz extracelular, los *shocks* térmicos pueden tener incidencia sobre el estado fisiológico de las bacterias que conforman el *floc* biológico. Si bien los mecanismos de respuesta a estrés térmico están ampliamente caracterizados en bacterias a partir de la experimentación con cultivos puros (Yura et al. 1993), poco se sabe de las respuestas fisiológicas a dicho estrés por parte de las bacterias que integran el *floc* biológico. Existe un reporte donde se detectó la expresión de la proteína de *shock* térmico GroEL en barros activados expuestos a cambios bruscos de temperatura, demostrando la respuesta directa a estrés térmico de las bacterias del *floc* (Bott and Love 2001). Sin embargo, aún se desconocen las posibles implicancias que pueden tener este tipo de respuestas sobre la integridad *floc* biológico.

Por otro lado, el fenol es uno de los agentes químicos que está presente en variadas concentraciones en efluentes tratados en plantas de barros activados, y que promueve la desfloculación cuando se descarga en altas concentraciones (Galil et al. 1998). Generalmente, ante una aclimatación previa con fenol en reactores de barros activados, se seleccionan comunidades bacterianas que pueden utilizar el fenol como fuente de carbono y energía, el cual es metabolizado inicialmente por la enzima fenol hidroxilasa. El *shock* con alta concentración de fenol, además de promover la solubilización de las EPS, puede inhibir directamente la producción de las mismas; como así también puede alterar las uniones hidrofóbicas que forman parte de la matriz extracelular o incluso provocar la lisis celular (Schwartz-Mittelman and Galil 2000)

En un trabajo anterior realizado en el laboratorio, destinado al estudio de comunidades bacterianas que degradan fenol, se observó un incremento masivo de la turbidez del sobrenadante al superar concentraciones de 1 g/l. Ante este acontecimiento se analizó la

estructura de la comunidad bacteriana en la fracción floculenta y planctónica mediante DGGE, advirtiéndose el un enriquecimiento de ciertos grupos bacterianos en la fracción sobrenadante (Basile 2009).

### ***Estudio de las propiedades fisiológicas de bacterias del floc***

El estudio de las propiedades fisiológicas de bacterias claves para la estabilidad del *floc* puede ser de gran importancia para determinar los mecanismos por los cuales ocurre la desfloculación, y así orientar medidas de control para evitar este fenómeno. La mayoría de los trabajos en esta área se centran en la caracterización, mediante técnicas independientes de cultivo, de los grupos filogenéticos que se comportan diferencialmente durante estos incidentes. Sin embargo, existen pocos reportes del estudio fisiológico de las bacterias de barros activados que pueden tener importancia en la estabilidad del *floc*. Para abordar el estudio de las propiedades de estas bacterias, indefectiblemente se requiere el aislamiento de las mismas. Se estima que sólo el 1 % de las bacterias podría ser cultivable en el laboratorio (Staley and Konopka 1985). Por esta razón el aislamiento de un taxón específico, determinado mediante herramientas moleculares independientes de cultivo a partir de una comunidad bacteriana compleja, puede ser una tarea difícil de llevar a cabo.

### ***Hipótesis y objetivos***

Los antecedentes descriptos nos llevan a preguntar si los sólidos que se desprenden del *floc* ante eventos de desfloculación corresponden a células de bacterias localizadas en la zona externa del *floc*, o bien si las distintas perturbaciones afectan distintivamente las propiedades fisiológicas de miembros internos del *floc*, comprometiendo la estabilidad del agregado. Para constatar estas hipótesis planteamos los siguientes objetivos:

- Comparar la comunidad del *floc* y sobrenadante de reactores a escala de laboratorio ante la desfloculación inducida por agentes físicos y químicos, para analizar si existe un desprendimiento diferencial de ciertos taxones o grupos filogenéticos.
- Determinar la localización espacial dentro del *floc* biológico de los taxones que muestren un desprendimiento distintivo.
- Aislar dichos taxones, y caracterizar las propiedades fisiológicas que guarden una relación con la capacidad de autoagregación.

Particularmente nos enfocamos en el estudio de un aislamiento asociado al género *Sediminibacterium*, el cual mostró un gran enriquecimiento de su abundancia en la fracción sobrenadante de los reactores luego de ambos tipos de *shocks*. El estudio de sus

propiedades fisiológicas, proteómicas y genómicas nos permitieron proponer un mecanismo que explica los altos valores de sólidos suspendidos en el sobrenadante de los reactores luego de *shocks* térmicos y de fenol.

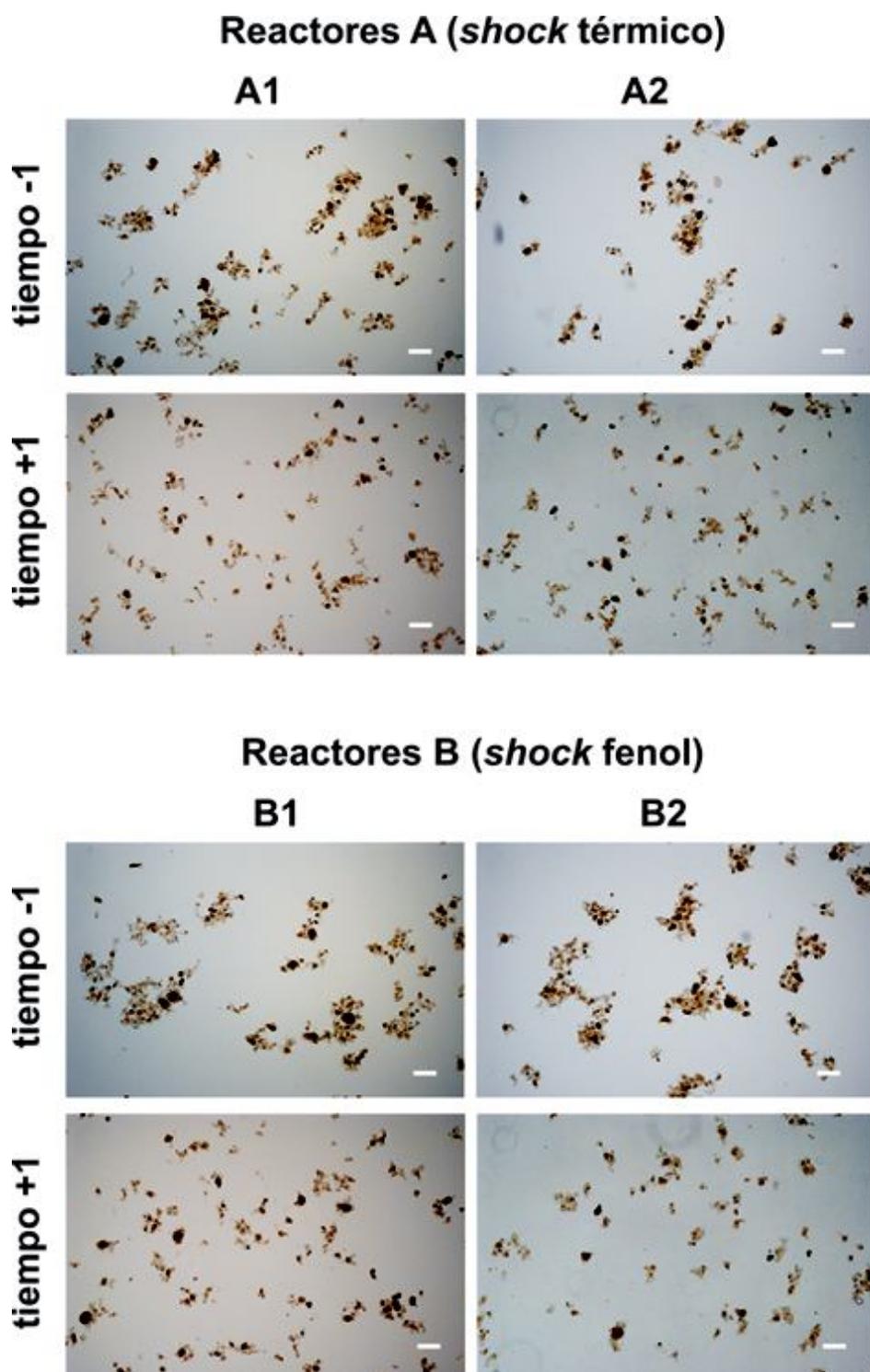
## RESULTADOS

### ***Efecto de shocks térmicos y de fenol sobre el floc biológico***

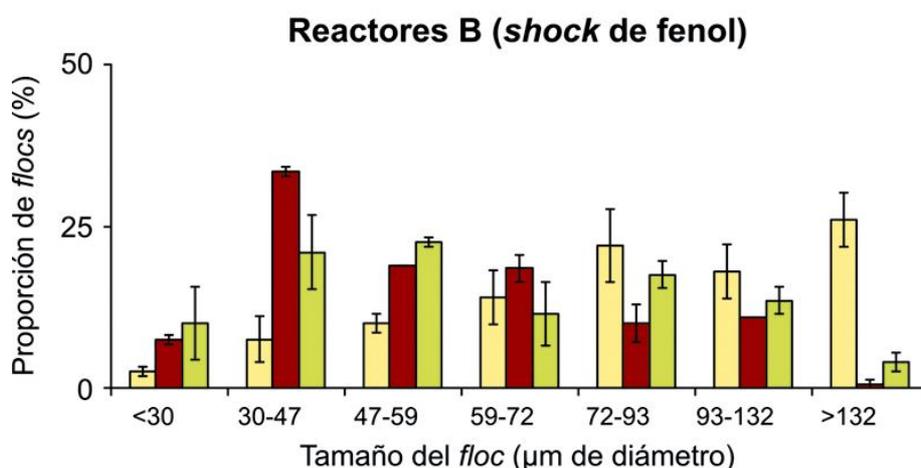
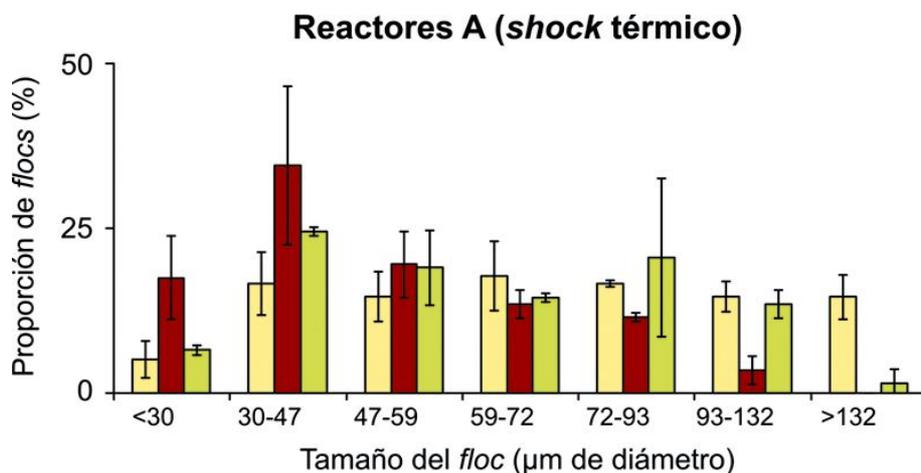
Se estudió el efecto de cambios bruscos de temperatura o concentración de fenol sobre la integridad del *floc* biológico de barras activados empleando cuatro reactores a escala de laboratorio. Dos reactores fueron sometidos de forma replicada a un *shock* térmico (Reactores A) y los otros dos a un *shock* de fenol (Reactores B). En ambos tipos de reactores se analizaron muestras tomadas a tres tiempos, correspondientes al día previo (-1), siguiente (+1) y una semana posterior al *shock* (+7). Mediante el análisis microscópico se pudo observar una variabilidad en el tamaño de los *flocs* en las muestras, incluso antes de los *shocks* aplicados. Sin embargo, en todos los reactores se pudo advertir una desfloculación masiva, manifestada por la reducción en el número de *flocs* de mayor tamaño y el incremento de la abundancia de *flocs* más pequeños (Figura 17). Adicionalmente se examinaron muestras empleando el kit de viabilidad *BacLight*, y se observó que ambos tipos de *shocks* no comprometen mayormente a la viabilidad de las bacterias del *floc* (imágenes no mostradas).

En la Figura 18 se muestran los resultados del análisis de la distribución de tamaños del *floc* en tiempos anteriores y posteriores a las perturbaciones. Se observó que la distribución inicial (barras amarillas) se modificó luego del *shock* térmico y de fenol, con un aumento considerable en la cantidad de *flocs* de tamaños menores (barras marrones), siendo los de tamaño de entre 30-47  $\mu\text{m}$  de diámetro los más abundantes. Además, se observó un detrimento importante de los *flocs* más grandes, ya que prácticamente no se hallaron *flocs* con un diámetro superior a los 132  $\mu\text{m}$ . Una semana después del *shock* (barras verdes), se alcanzó una recuperación parcial en el tamaño del *floc*, observándose una disminución marcada en la abundancia de *flocs* pequeños (30-47  $\mu\text{m}$ ), mientras que la proporción de *flocs* más grandes (132  $\mu\text{m}$ ) comenzó a aumentar (Figura 18).

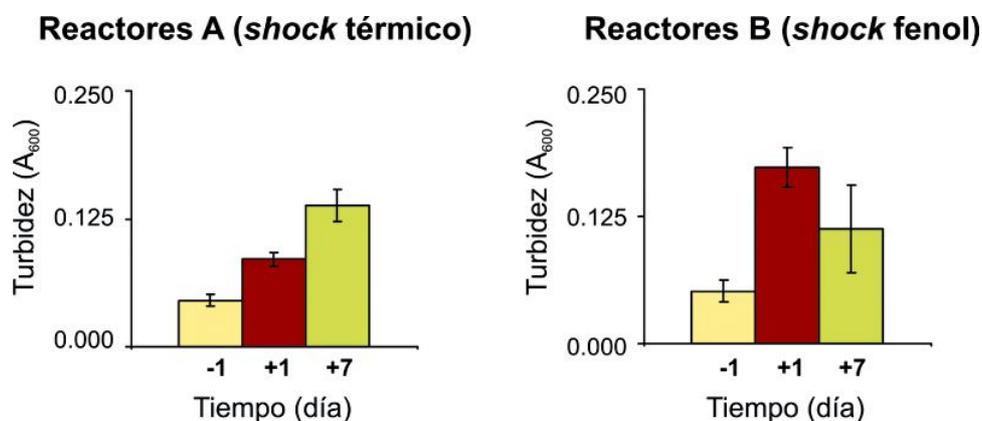
En concordancia con la fragmentación del *floc*, la liberación de bacterias hacia la fase acuosa fue cuantificada mediante la medición de la turbidez del sobrenadante en los reactores. Si bien en ambos tipos de reactores se registró un incremento de la turbidez luego del *shock*, éste fue más acentuado en los Reactores B tratados con fenol. A pesar de la recuperación parcial en el tamaño del *floc*, alcanzado luego de una semana del *shock*, llamativamente se mantuvieron valores altos de turbidez en ambos tipos de reactores, lo cual estaría evidenciando un crecimiento de poblaciones planctónicas (Figura 19).



**Figura 17.** Imágenes microscópicas representativas de los *flocs* en los reactores A y B, durante los tiempos de muestreo realizados un día antes (-1) y un día después del *shock* (+1). A pesar de observarse una variabilidad en el tamaño del *floc*, luego de ambos tipos de *shocks* se advirtió un enriquecimiento en *flocs* de menor tamaño. La longitud de la barra en escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 18.** Distribución de tamaños del *floc* promedio para los reactores A y B en los tiempos -1 (amarillo), +1 (marrón), y +7 (verde). Las barras de error corresponden a la medida del error estándar ( $n=2$ ). Se realizó la medición de 100 *flocs* escogidos al azar, y se clasificaron en distintos rangos de tamaño. El tamaño del *floc* está expresado en valores de diámetro considerando una forma circular de los mismos, y fueron calculados a partir de la conversión del valor de área correspondiente.



**Figura 19.** Medida de la turbidez promedio del sobrenadante ( $A_{600}$ ) en los reactores A y B a los tiempos -1 (amarillo), +1 (marrón) y +7 (verde). Las barras de error corresponden a la medida del error estándar ( $n=2$ ).

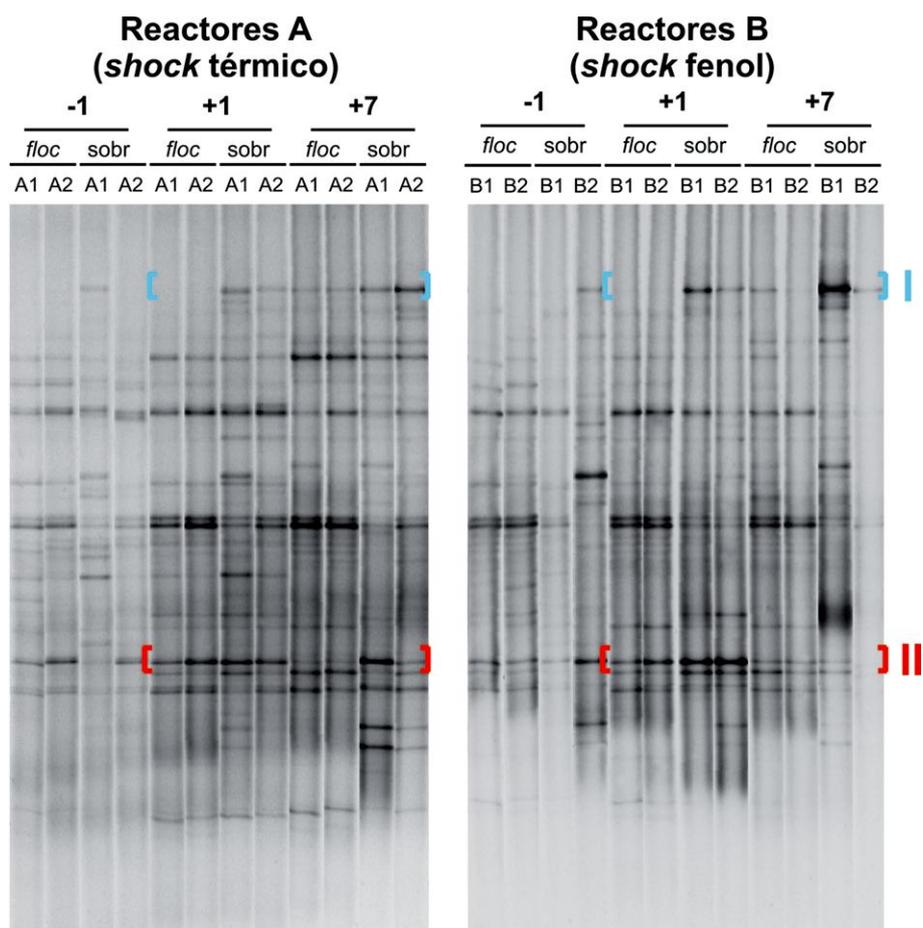
## ***Estructura de la comunidad del floc y sobrenadante luego de shocks térmicos y de fenol***

El primer objetivo de esta parte del trabajo fue determinar si la desfloculación observada se debe al desprendimiento selectivo de ciertos miembros de la comunidad bacteriana del *floc* biológico, o si este fenómeno es inespecífico. Para ello, se analizaron los cambios en la estructura de las comunidades bacterianas correspondientes a la fracción floculenta y sobrenadante de los reactores durante el experimento.

En la Figura 20, se exhiben los geles de DGGE que muestran la estructura de la comunidad del *floc* y sobrenadante de los reactores sometidos a *shocks* térmicos (A1 y A2) y de fenol (B1 y B2), en los tiempos correspondientes al día previo (-1), posterior (+1) y una semana después del *shock* (+7).

Un análisis cualitativo de los patrones observados revela diferencias entre las comunidades del *floc* y del sobrenadante en los cuatro reactores durante todo el experimento. Estas diferencias fueron apreciablemente menores en las muestras correspondientes al día siguiente del *shock* (+1). Esta observación fue ratificada mediante el cálculo del índice de similitud de Bray-Curtis entre las comunidades del *floc* y sobrenadante de los reactores en los tres tiempos de estudio. Luego del *shock* (+1) se observó un incremento de la similitud entre las comunidades del *floc* y sobrenadante en ambos tipos de reactores respecto al valor inicial (-1). El aumento de la similitud entre ambas fracciones estaría reflejando un desprendimiento masivo e inespecífico de las bacterias que habitan el *floc* hacia la fracción acuosa luego del *shock* térmico o de fenol. Una semana después (+7) se observó que la similitud disminuyó a valores cercanos a los iniciales en ambos tipos de reactores, lo cual indica que las comunidades del *floc* y del sobrenadante volvieron a diferenciarse (Tabla 3).

A pesar de la gran similitud entre las comunidades del *floc* y sobrenadante luego del *shock* (+1), se visualizaron algunas bandas con una intensidad mucho mayor en la fracción sobrenadante, lo cual estaría indicando un desprendimiento distintivo desde el *floc* biológico. Particularmente nos enfocamos en las bandas que mostraron repetidamente este comportamiento bajo ambos tipos de *shocks*. Los taxones analizados correspondieron a las bandas rotuladas como I y II, y aunque ambos exhibieron un desprendimiento distintivo ante *shocks* térmicos y de fenol, presentan comportamientos diferentes.



**Figura 20.** Estructura de la comunidad bacteriana determinada mediante DGGE de la fracción *floc* y sobrenadante en los tiempos correspondientes al día anterior (-1), posterior (+1) y una semana después (+7) del *shock* térmico en los Reactores A y del *shock* de fenol en los Reactores B. Los taxones analizados en este trabajo corresponden a las bandas rotuladas como I y II.

**Tabla 3.** Índice de similitud Bray-Curtis promedio entre las comunidades del *floc* y sobrenadante de los reactores A y B, calculado en los tres tiempos de estudio (-1, +1, +7) con su respectivo desvío estándar.

	-1	+1	+7
Reactores A	0,51 ± 0,05	0,60 ± 0,08	0,53 ± 0,08
Reactores B	0,44 ± 0,09	0,58 ± 0,08	0,49 ± 0,13

El taxón asociado a la banda I presentó un comportamiento llamativo frente a *shocks* térmicos y de fenol, ya que se detectó exclusivamente en la fracción sobrenadante en el momento del *shock* (+1), permaneciendo indetectable en la fracción floculenta. Mediante el

análisis de porcentaje de similitud (SIMPER), que permite estipular la contribución de cada banda/taxón sobre la disimilitud entre comunidades, se determinó que este taxón tiene una gran incidencia sobre las diferencias observadas entre las fracciones de *floc* y sobrenadante de las muestras +1. Estos valores correspondieron al 5 % en los reactores A, siendo el tercer taxón con mayor contribución, mientras que en los reactores B esta banda fue la principal responsable de las diferencias entre las comunidades, con un valor de contribución del 6 %. Además, luego de una semana (+7) su intensidad aumentó en la fracción sobrenadante e incluso se pudo detectar en la fracción floculenta en todos los reactores. En definitiva, este taxón se encuentra en baja abundancia en el *floc* biológico y luego del *shock* exhibe un crecimiento poblacional en forma planctónica, que es seguido por su reincorporación parcial en la fracción agregada.

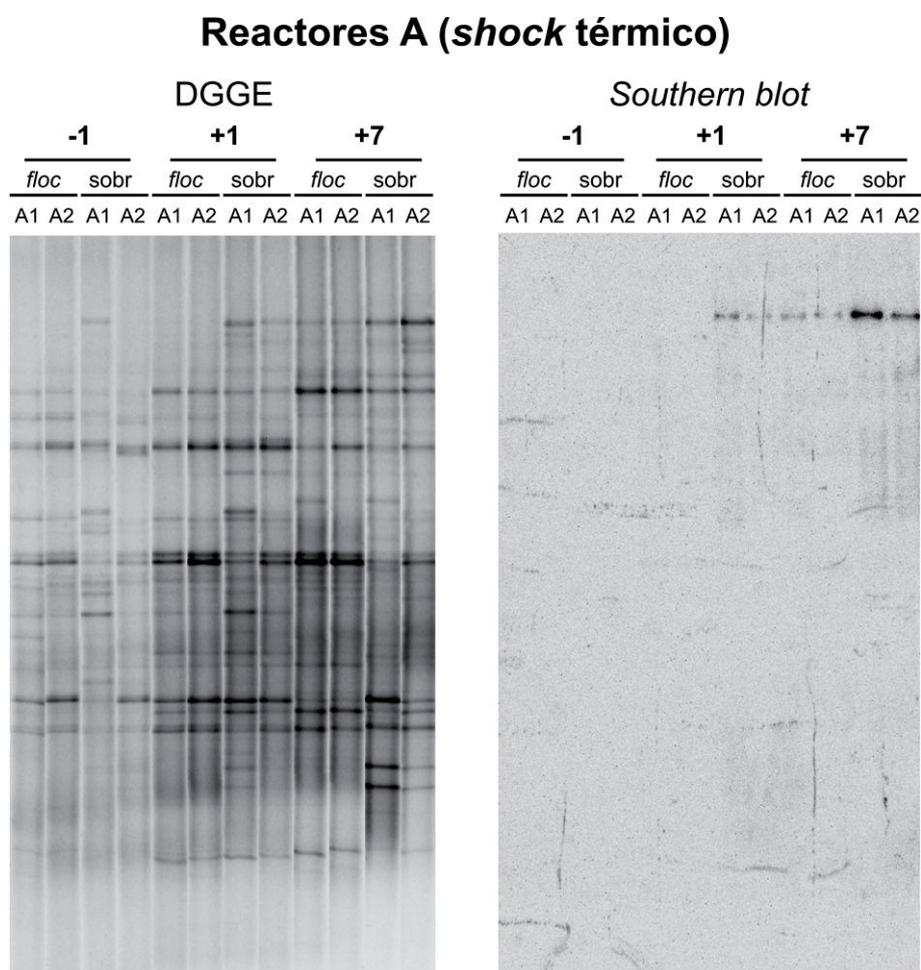
Por el contrario, el taxón asociado a la banda II se detectó en la fracción floculenta. Luego del *shock* (+1) esta banda incrementa su intensidad en la fracción sobrenadante, principalmente en los reactores B sometidos a una alta concentración de fenol, lo que indicaría un desprendimiento diferencial de este taxón. Sin embargo, este taxón no tiene mucha influencia en la disimilitud de las comunidades floculentas y del sobrenadante del día +1. Las diferencias de abundancia fueron importantes únicamente en los reactores B tratados con fenol. En este caso, su abundancia disminuyó drásticamente una semana después del *shock* (+7), lo que estaría indicando que este taxón se eliminó del sistema debido al desprendimiento desde el *floc* y a los sucesivos ciclos de sedimentación y decantación en los reactores.

Se realizó la caracterización taxonómica de estas bandas, y pudimos establecer que la banda I corresponde a un taxón perteneciente al género *Sediminibacterium* (99 % de confianza), mientras que la banda II se relacionó con el género *Thauera* (53 % de confianza). Utilizando la información genética correspondientes a los fragmentos secuenciados se diseñaron los oligonucleótidos SDM469 y THAU468, específicos de *Sediminibacterium* sp. y *Thauera* sp. respectivamente.

Generalmente se considera que las bandas que poseen una movilidad similar en DGGE pertenecen al mismo taxón, sin embargo la migración no se debe tomar como prueba de identidad, ya que distintas secuencias con un contenido similar de GC pueden migrar análogamente. Por esta razón se empleó la técnica de *Southern blot* sobre los DGGE detallados anteriormente, utilizando las sondas SDM469 o THAU468 marcadas radioactivamente, para determinar la identidad de las bandas de interés. Mediante ensayos de *Southern blot* sobre los DGGE empleando la sonda SDM469, se observó una señal específica correspondiente a la banda I asociada a *Sediminibacterium* sp. (Figura 21 y Figura 22). De esta forma, se pudo confirmar que esta banda irrumpió en la fracción sobrenadante en el día +1 en los cuatro reactores, y luego en fracción *floc* y sobrenadante en el día +7. Además, en los DGGE se pudo advertir la presencia de una banda que tuvo una

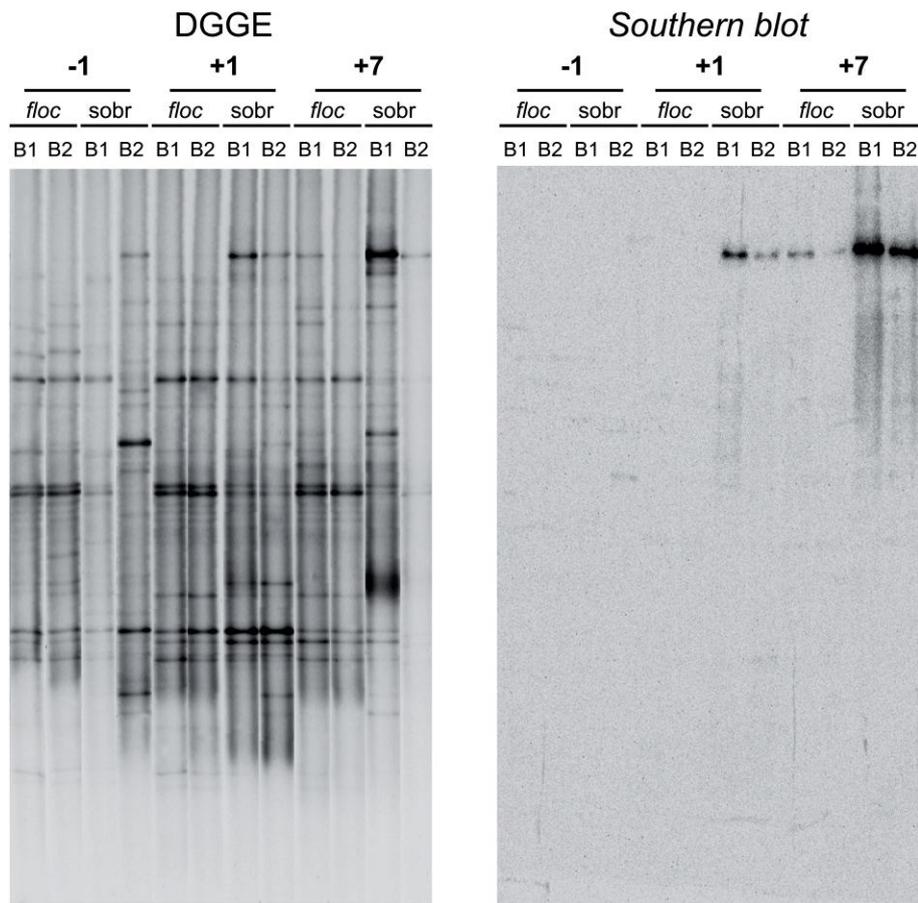
movilidad similar al taxón de interés en la fracción sobrenadante de los reactores A1 y B2 correspondientes al día anterior al shock (-1). Sin embargo el oligonucleótido marcado no hibridó sobre estas secuencias ya que no se observó la señal correspondiente en el ensayo de *Southern blot* (Figura 21 y Figura 22). En consecuencia, pudimos determinar que estas bandas no corresponden a *Sediminibacterium* sp.

La sonda THAU468 no mostró en los ensayos de *Southern blot* la especificidad sugerida por el análisis *in silico*. Si bien se observó la señal correspondiente a la banda de interés, principalmente a los tiempos -1 y +1, se visualizó un patrón de señales indicando que esta sonda también hibridó con secuencias relativas a otras bandas del gel (no mostrado).



**Figura 21.** Estructura de la comunidad bacteriana determinada mediante DGGE de la fracción *floc* y sobrenadante en los tiempos correspondientes al día anterior (-1), posterior (+1) y una semana después (+7) del *shock* térmico en los reactores A. La imagen de la derecha corresponde al *Southern blot* del DGGE mostrado, realizado con la sonda radioactiva SDM469 específica de *Sediminibacterium* sp.

## Reactores B (*shock* fenol)



**Figura 22.** Estructura de la comunidad bacteriana determinada mediante DGGE de la fracción *floc* y sobrenadante en los tiempos correspondientes al día anterior (-1), posterior (+1) y una semana después (+7) del *shock* de fenol en los reactores B. La imagen de la derecha corresponde al *Southern blot* del DGGE mostrado, realizado con la sonda radioactiva SDM469 específica de *Sediminibacterium* sp.

### ***Crecimiento de Sediminibacterium* sp. luego de shocks desfloclantes**

Conjuntamente a la presencia del taxón correspondiente a *Sediminibacterium* sp. en el sobrenadante al día siguiente del *shock* térmico o de fenol (+1), también se observó un aumento en su intensidad a la semana siguiente (+7), incluso también en la fracción floculenta. Este crecimiento de *Sediminibacterium* sp. en ambas fracciones fue corroborado mediante PCR cuantitativa específica de este taxón, empleando el oligonucleótido específico SDM469 como cebador inverso en conjunto con el cebador F341, universal de bacterias. La abundancia porcentual de *Sediminibacterium* sp. fue estimada relativizando el número de copias obtenidas de ADNr 16S de *Sediminibacterium* sp. al total de secuencias de ADNr 16S determinada mediante PCR cuantitativa en tiempo real con los cebadores universales de bacteria R534 y F341. En la Figura 23 se presentan los porcentajes de secuencias de *Sediminibacterium* sp. obtenidas en las fracciones del *floc* y sobrenadante, durante los tres tiempos de estudio, y en ambos tipos de reactores. Se pudo confirmar la baja

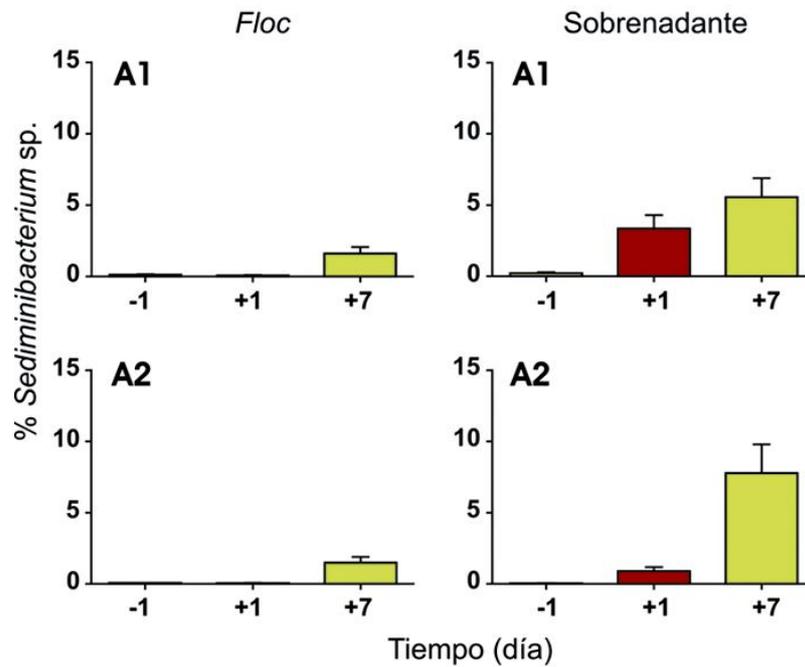
abundancia de este taxón previo al *shock* en los cuatro reactores y su incremento considerable en la fracción sobrenadante después del mismo. Este aumento se acentuó aun más una semana después del *shock* (+7), alcanzando en todos los reactores valores superiores al 5 % de la comunidad bacteriana total (incluso cerca del 50 % en B1, uno de los reactores tratados con fenol). Por otro lado también se observó un leve incremento poblacional de *Sediminibacterium* sp. en la fracción floculenta una semana después de ambos *shocks*, el cual puede deberse a la incorporación de las poblaciones planctónicas al *floc*. En definitiva no sólo se observó un desprendimiento distintivo de *Sediminibacterium* sp. luego de *shocks* térmicos y de fenol, sino que también se mantuvo en el sistema hasta una semana después del *shock* debido al crecimiento planctónico de esta cepa.

Para estudiar la respuesta de este taxón en las horas subsiguientes a la aplicación de las perturbaciones, se realizaron experimentos adicionales en reactores a escala de laboratorio inoculados con el barro de la misma planta de tratamiento de efluentes industriales. Se realizaron tres experimentos independientes en los cuales se sometió a los reactores a un *shock* de fenol idéntico al de los reactores B. En la Figura 24A se observa el incremento poblacional de *Sediminibacterium* sp. en el sobrenadante en las 12 horas siguientes al *shock* para tres experimentos. De esta forma, se demuestra el crecimiento de esta población, el cual comienza a ser notorio luego de las 4 horas de haber transcurrido *shock* (Figura 24A).

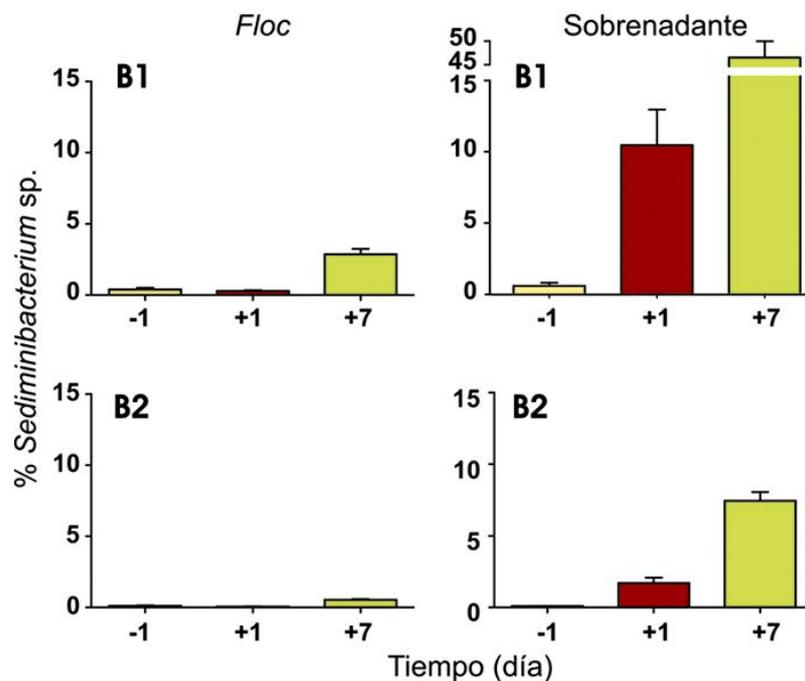
En paralelo, también se observó un aumento inmediato en la turbidez del sobrenadante luego del *shock*, que fue atribuido al desprendimiento inicial masivo e inespecífico de bacterias del *floc*, pero que siguió en aumento por varias horas luego del *shock* (Figura 24B). Este incremento sigue la misma tendencia que la abundancia de *Sediminibacterium* sp., lo que estaría indicando que los sólidos suspendidos estarían representados principalmente por *Sediminibacterium* sp.

Por otra parte, mediante estos experimentos también se comprobó la reproducibilidad de la respuesta de *Sediminibacterium* sp., y que este taxón es un miembro estable de la comunidad bacteriana de la planta de tratamientos de efluentes petroquímicos de la cual se obtuvo el inóculo para los experimentos.

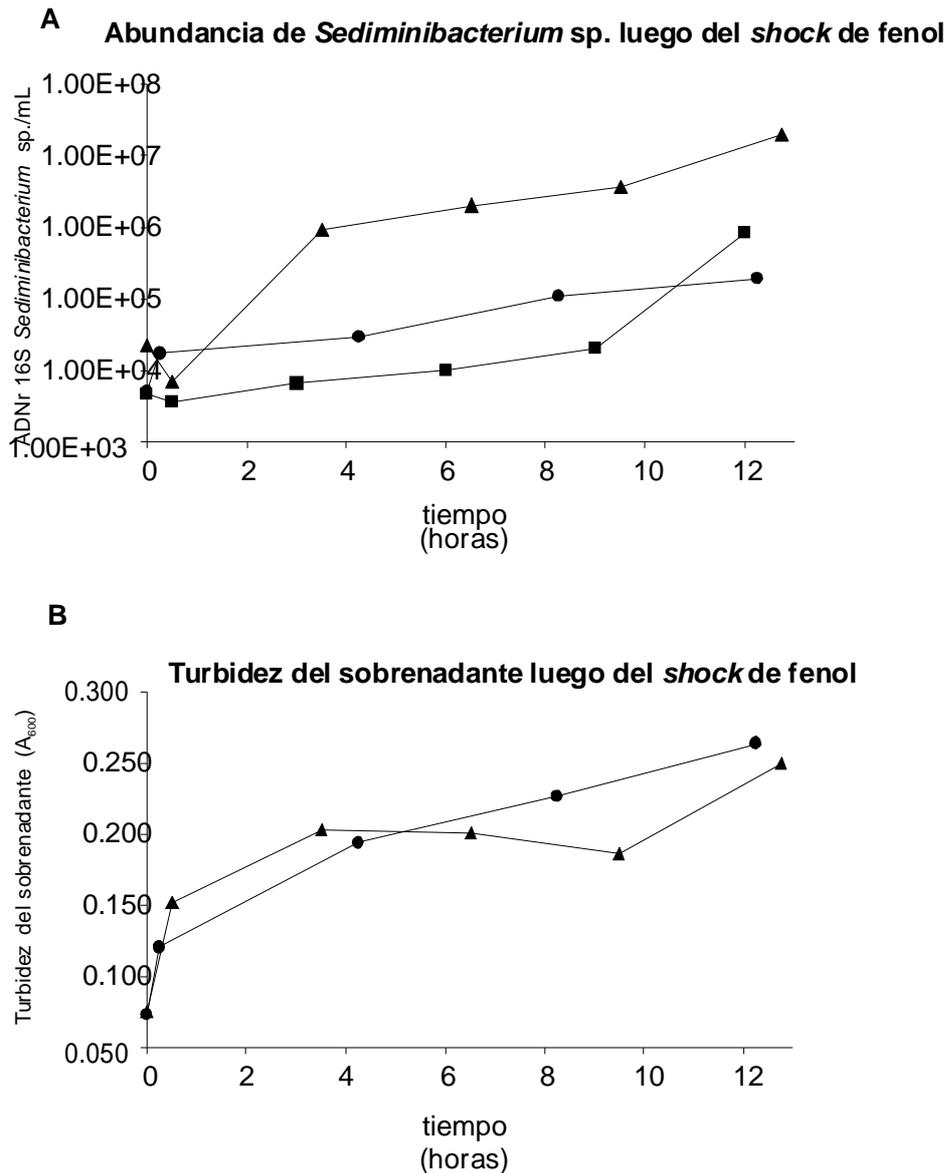
### Reactores A (*shock térmico*)



### Reactores B (*shock fenol*)



**Figura 23.** Porcentaje de secuencias de ADNr 16S de *Sediminibacterium* sp. sobre el total de secuencias de ADNr 16S bacterianas, cuantificadas mediante PCR cuantitativa en tiempo real en los reactores sometidos a *shocks* térmicos y de fenol. Los gráficos de la izquierda corresponden a la fracción floculenta y los de la derecha al sobrenadante, mientras que las barras pertenecen a los distintos días de estudio: -1 (amarillo), +1 (marrón), y +7 (verde).



**Figura 24.** Abundancia de *Sediminibacterium* sp. en el sobrenadante durante las horas siguientes al *shock* en reactores tratados con fenol correspondientes a tres experimentos independientes, determinada mediante PCR cuantitativa en tiempo real específica de *Sediminibacterium* sp. El tiempo 0 corresponde al estadio previo, mientras que el tiempo 0,5 corresponde al momento inmediato posterior a la adición de fenol. Los resultados para el experimento 1 están manifiestos con cuadrados, el experimento 2 con triángulos, y el 3 con círculos (A). También se muestran los valores de turbidez del sobrenadante de los reactores correspondientes a los mismos experimentos, excepto los del experimento 1 los cuales no se registraron (B).

#### **Cultivo y aislamiento de las cepas *Sediminibacterium* sp. y *Thauera* sp.**

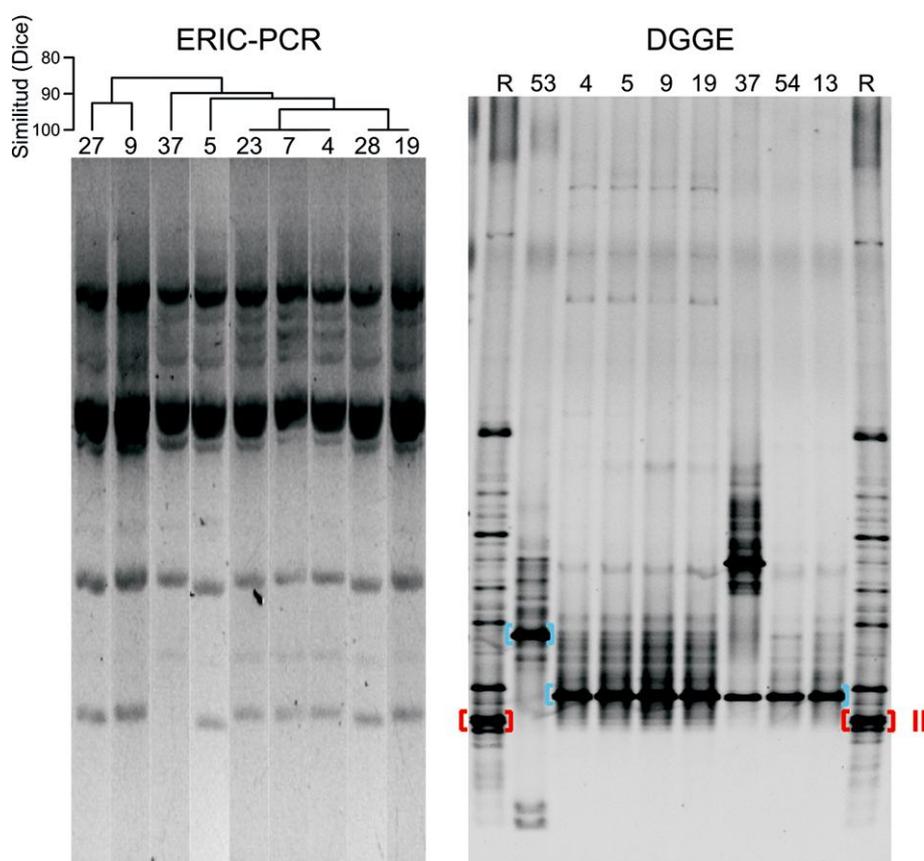
Con el objetivo de estudiar la fisiología de los taxones identificados mediante técnicas independientes de cultivo que mostraron un comportamiento distintivo luego de *shocks* térmicos y de fenol, se procedió a realizar el aislamiento de los mismos. Como se desconocen las condiciones de cultivo óptimas para estas cepas y no se dispone de

un criterio de selección, se realizó una estrategia similar a la propuesta por Stevenson y colaboradores para la detección y aislamiento de microorganismos previamente no cultivados (Stevenson and Eichorst 2004). Este procedimiento consistió en realizar cultivos por duplicado empleando distintos medios y condiciones de incubación (ver *Materiales y Métodos*). Seguidamente se obtuvo un lisado de todas las colonias que crecieron en cada placa incubada bajo distintas condiciones, del cual se purificó el ADN para realizar la detección por PCR empleando los oligonucleótidos específicos de los taxones de interés. Se obtuvo un resultado positivo, tanto para *Sediminibacterium* sp. como para *Thauera* sp., cuando se realizó el cultivo en un medio R2A suplementado con un extracto de barro bajo condiciones aeróbicas. Seguidamente se efectuó una PCR de colonias, empleando nuevamente los oligonucleótidos específicos, sobre el duplicado del cultivo que se realizó bajo las mismas condiciones para detectar la colonia perteneciente a cada taxón. Finalmente se repicaron estas colonias positivas para consumar el aislamiento.

Hay que destacar que se encontró una sola colonia correspondiente a *Sediminibacterium* sp. a partir de la cual se realizó el aislamiento, mientras que se obtuvieron una gran cantidad de aislamientos positivos para *Thauera* sp. En consecuencia, se procedió a caracterizar genéticamente a los distintos aislamientos de *Thauera* sp. mediante la amplificación por PCR de las secuencias intergénicas consenso repetitivas mediante la técnica desarrollada para enterobacterias (ERIC-PCR, del inglés *enterobacterial repetitive intergenic consensus*). En la Figura 25 se puede observar el agrupamiento en *clusters* de acuerdo a la similitud de los patrones obtenidos para nueve aislamientos, el cual denota la presencia de cinco genotipos distintos. Más allá de estas diferencias, se realizó un DGGE para caracterizar la secuencia de 193 pb de la región V3 de estos grupos y otros aislamientos de *Thauera* sp. De este modo, se observó que ninguno de los aislamientos se correspondió con la banda II identificada en los reactores (Figura 25). En conclusión la estrategia de aislamiento de *Thauera* sp. falló debido a la falta de especificidad de la sonda THAU469. Por otra parte, este resultado revela la gran diversidad del género *Thauera* en plantas de tratamiento de efluentes basadas en barros activados (Valle et al. 2004). Por el contrario, el aislamiento realizado de *Sediminibacterium* sp. coincidió con el taxón caracterizado en los reactores (gel no mostrado).

Cómo *Sediminibacterium* sp. presentó un interés particular por responder creciendo planctónicamente ante los dos tipos de perturbaciones aplicadas, los análisis posteriores se centraron en esta cepa.

## Caracterización de aislamientos de *Thauera* sp.

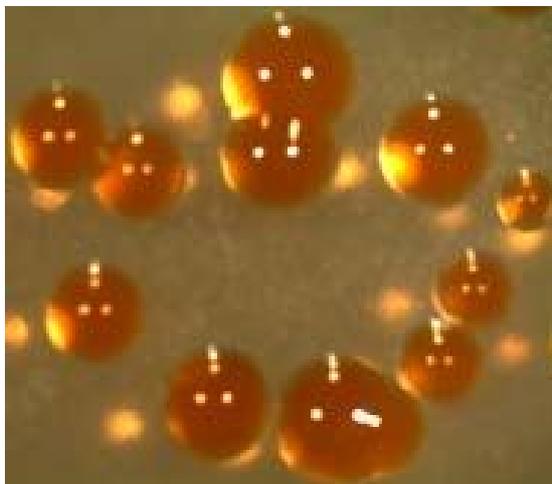


**Figura 25.** Caracterización genética de los aislamientos de *Thauera* sp. El gel de la izquierda representa los resultados obtenidos mediante la técnica de ERIC-PCR de distintos aislamientos de *Thauera* sp., agrupados mediante un análisis de *cluster* basado en el índice de similitud Dice. El gel de la derecha corresponde a un DGGE de distintos aislamientos de *Thauera* sp. comparados con los patrones observados en la muestra +1 del sobrenadante del reactor B1 (R). Las bandas correspondientes a aislamientos de *Thauera* sp. están señaladas en celeste, mientras que la banda II correspondiente a *Thauera* sp. detectada en los reactores está marcada en rojo.

### **Caracterización de *Sediminibacterium* sp.**

El aislamiento de *Sediminibacterium* sp. se llevó a cabo en un medio R2A suplementado con un extracto de barro activado. El requerimiento estricto del extracto sugiere que éste le provee nutrientes u otras moléculas presentes en su ambiente natural que necesita obligatoriamente para crecer. Este procedimiento fue adaptado del extracto de sedimento realizado por Qu e Yuan, a partir del cual se aisló la cepa de *Sediminibacterium salmoneum* (Qu and Yuan 2008). A diferencia de lo reportado para *Sediminibacterium salmoneum*, no se consiguió crecer eficientemente en un medio R2A convencional a la cepa aislada en este trabajo. El crecimiento en un medio definido que reemplazara al extracto de barro se logró utilizando R2A suplementado con una solución de vitaminas y minerales (ver Anexo III). Las colonias de *Sediminibacterium* sp. exhibieron un color

anaranjado, un tamaño de entre 1-3 mm de diámetro aproximadamente, su forma fue circular y la superficie lisa (Figura 26).



**Figura 26.** Colonias de *Sediminibacterium* sp. magnificadas 10 veces con lupa, creciendo en medio R2A suplementado con vitaminas y minerales.

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de cultivos en medio R2A líquido suplementado con vitaminas y minerales. El gen casi completo del ARNr 16S fue amplificado con los cebadores F27 y R1509, clonado y posteriormente secuenciado. El amplicón de 193 pb correspondiente a la banda de *Sediminibacterium* sp. extraída del DGGE presentó una identidad del 100 % con la región V3 del ADNr 16S.

La secuencia del gen ARNr 16S se comparó con las secuencias correspondientes a los dos únicos representantes del género *Sediminibacterium* cultivados hasta el momento. La secuencia obtenida presentó el 99 % y 95 % de identidad con *Sediminibacterium salmoneum* y *Sediminibacterium ginsengisoli*, respectivamente. En la Tabla 4 se muestra una comparación de algunas características fenotípicas de estas cepas. Entre las principales diferencias, se destaca el fenotipo catalasa negativo solamente observado en la cepa *Sediminibacterium* sp.

**Tabla 4.** Comparación fenotípica de *Sediminibacterium* sp. respecto a los datos publicados para *Sediminibacterium salmoneum* (Qu and Yuan 2008) y *Sediminibacterium ginsengisoli* (Kim et al. 2013b).

	<b><i>Sediminibacterium</i> sp.</b>	<b><i>S. salmoneum</i> NJ-44T</b>	<b><i>S. ginsengisoli</i> DCY13T</b>
<b>Fuente de aislamiento</b>	Planta de barros activados	Reservorio eutrófico	Cultivo de ginseng
<b>Morfología celular</b>	bacil	bacilo curvado	bacil
<b>Pigmentación de</b>	anaranjado	rosa salmón	anaranjado-
<b>Requerimiento de</b>	microaerófilo	aerobio estricto	anaerobio
<b>Crecimiento a 37°C</b>	+	+	+
<b>Crec. con 2 % (p/v)</b>	+	-	+
<b>Motilidad (<i>gliding</i>)</b>	+	+	+
<b>Reducción de nitrato</b>	-	-	-
<b>Producción de:</b>			
<b>Pigmento flexiburina</b>	-	-	-
<b>H<sub>2</sub>S</b>	-	+	-
<b>Catalasa</b>	-	+	+
<b>β-Galactosidasa</b>	+	+	d
<b>Ureasa</b>	-	-	-
<b>Similitud gen ARNr 16S</b>	-	1390/1395 (99)	1317/1386 (95)

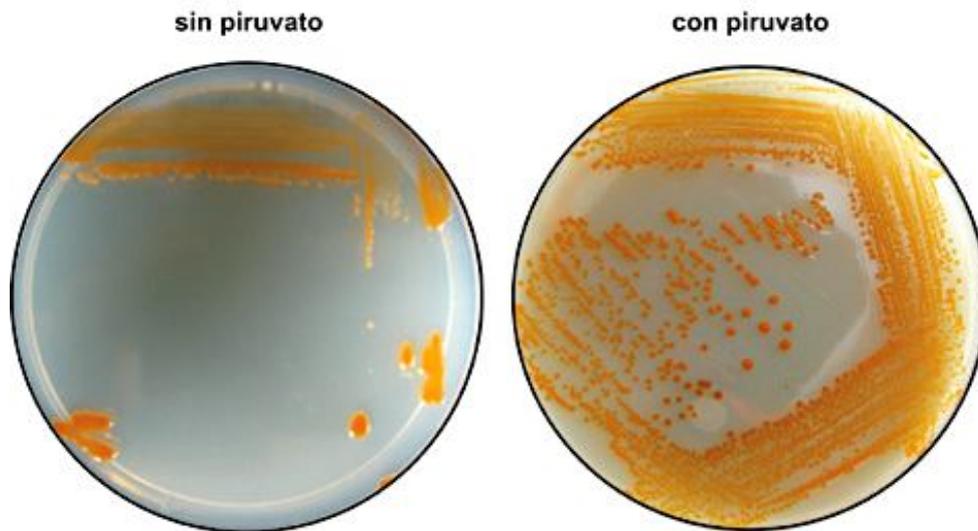
La coloración de las colonias se basó en el crecimiento en el medio R2A. d = reacción débilmente positiva

#### ***Sediminibacterium* sp. es microaerófilo**

En los cultivos estriados realizados sobre placas R2A, suplementadas con vitaminas y minerales, se observó un crecimiento restringido mayormente a la sección por donde se comenzó la inoculación y pequeños “parches” de crecimiento en otras partes de la placa. Este crecimiento errático pudo ser corregido mediante la suplementación con piruvato (0,3 %), en donde se consiguió un crecimiento uniforme conforme al agotamiento por estrías (Figura 27).

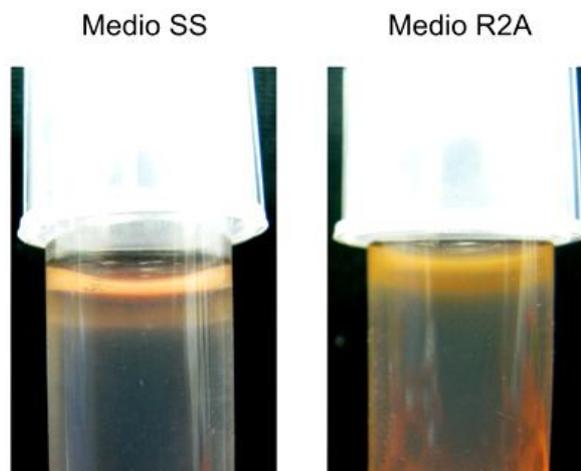
La suplementación con piruvato, un conocido agente protector frente al estrés oxidativo, estimuló el crecimiento de esta cepa en cultivos sólidos donde la exposición al oxígeno es máxima. Para confirmar la susceptibilidad al oxígeno de *Sediminibacterium* sp., se realizaron cultivos en medios semisólidos (agar 0,3 g/l). De esta manera se pudo advertir la banda de crecimiento por debajo de la superficie, donde la concentración de oxígeno es menor a la atmosférica, lo cual confirma la naturaleza microaerófila de esta cepa. Además, la distancia a la superficie de la banda de crecimiento fue distinta según el medio empleado, siendo de aproximadamente 3 mm en el medio *Synthetic Sewage* (SS) y 2 mm en R2A. En este último medio se observó una proximidad mayor a la superficie, lo cual manifiesta una mayor tolerancia al oxígeno (Figura 28).

### Cultivos de *Sediminibacterium* sp. en placas de R2A



**Figura 27.** Cultivos estriados realizados sobre placas R2A sin suplementar (izquierda) o suplementadas (derecha) con piruvato 0,3 %.

### Cultivos de *Sediminibacterium* sp. en medio semisólido



**Figura 28.** Cultivos de *Sediminibacterium* sp. realizados en medios SS y R2A en estado semisólido incubados durante 10 días a 30°C.

No se obtuvo crecimiento en cultivos en placa incubados bajo condiciones microaeróbicas empleando el kit *Campygen generating gas* (Oxoid), que asegura una atmósfera con un 6 % de oxígeno. Este kit está diseñado especialmente para el crecimiento de especies del género *Campylobacter*, sobre las cuales se caracterizaron fehacientemente los requerimientos de oxígeno (Bolton et al. 1997).

### **Autoagregación de *Sediminibacterium* sp.**

Cuando se realizaron cultivos líquidos de *Sediminibacterium* sp. se advirtió la capacidad de esta cepa de crecer en forma agregada. Este comportamiento se observó parcialmente en los cultivos realizados con el medio R2A, donde el comienzo del crecimiento es inicialmente de forma agregada y más tarde se observa la turbidez característica del crecimiento planctónico. En cambio, los cultivos realizados en medio SS fueron completamente planctónicos.

Como la composición de los medios SS y R2A es similar (ver Anexo III), se buscaron los componentes del medio R2A que inducían el crecimiento en forma agregada. Los cultivos en SS suplementados con sustratos que no se encuentran en su composición original, pero sí en el medio R2A, como ser glucosa, almidón o casaminoácidos; no mostraron un efecto apreciable en la forma de crecimiento de *Sediminibacterium* sp. Otra diferencia importante entre los medios SS y R2A radica en la concentración de  $Mg^{2+}$ , el cual puede mediar interacciones entre polisacáridos extracelulares aniónicos promoviendo la autoagregación bacteriana (Vu et al. 2009). Sin embargo, no se encontró una estimulación del crecimiento de forma agregada en cultivos SS cuando se incrementó la concentración de este catión divalente hasta la concentración correspondiente al medio R2A (50 mg/l).

Interesantemente, cuando se incrementó la concentración de peptona en medios SS se logró un crecimiento agregado. Incluso cuando se probaron concentraciones superiores a las del R2A (0,5 g/l) se consiguió un crecimiento agregado mayor al detectado en este medio. De esta manera pudimos determinar que el componente del medio de cultivo que promueve la capacidad del autoagregación en *Sediminibacterium* sp. es la peptona.

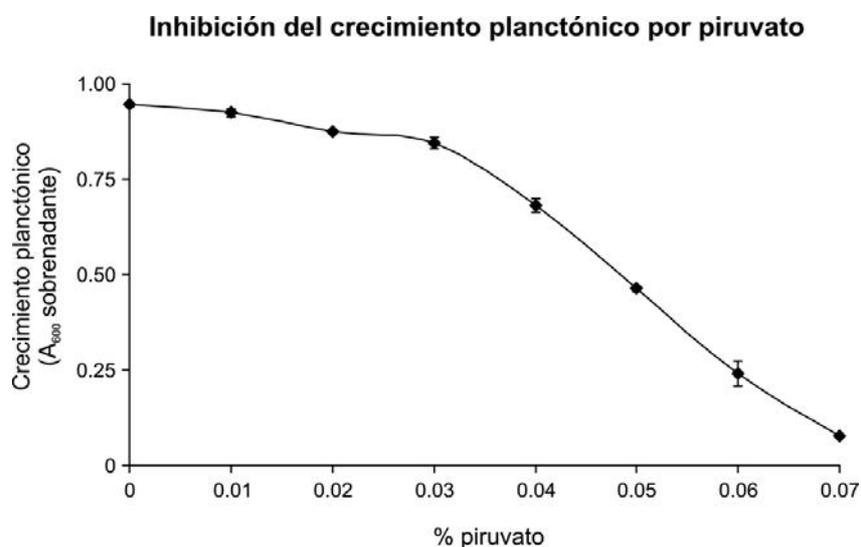
En la sección anterior, vimos que los cultivos semisólidos realizados en medio R2A, que posee una mayor concentración de peptona que el SS, mostraron una mayor tolerancia al oxígeno. Por lo tanto, la peptona también podría contribuir positivamente al crecimiento de *Sediminibacterium* sp. en condiciones aeróbicas. Esto se comprobó realizando cultivos semisólidos de SS con concentraciones crecientes de peptona, donde se observó un desplazamiento de la banda de crecimiento hacia la superficie (resultado no mostrado).

De esta manera, demostramos que un aumento en la concentración de peptona está relacionado con una mayor tolerancia al oxígeno y también con un aumento del crecimiento agregado. Llamativamente, también se observó que el crecimiento en forma agregada se incrementó al realizar cultivos líquidos con volúmenes crecientes y con menor o nula agitación, condiciones que suscitan una menor oxigenación del medio. Por esta razón, postulamos que existe una relación inversamente proporcional entre la exposición al oxígeno y el crecimiento agregado de esta cepa microaerófila.

### **Efecto del piruvato sobre la agregación de *Sediminibacterium* sp.**

A pesar de que se observó la capacidad de *Sediminibacterium* sp. de crecer en forma agregada, este tipo de crecimiento siempre se observó, en mayor o menor medida, en conjunto con crecimiento planctónico. El crecimiento planctónico se inhibió parcialmente al incrementar la concentración de peptona o disminuyendo la aireación del medio de cultivo. Estas dos condiciones que disminuyen el crecimiento planctónico, están asociadas a una protección frente al estrés oxidativo. En una sección anterior, mostramos el efecto positivo del piruvato durante el crecimiento en placa, atribuido a una protección frente al estrés oxidativo. Por esta razón, probamos el efecto del piruvato sobre cultivos líquidos de *Sediminibacterium* sp.

El piruvato tuvo un efecto similar a la peptona promoviendo el crecimiento agregado, pero se observó un efecto mayor sobre la inhibición del crecimiento planctónico. En la Figura 29, se muestra este efecto a distintas concentraciones de piruvato, advirtiéndose que este suplemento comienza a ser efectivo en valores superiores a 0,03 % y alcanza una inhibición prácticamente completa del crecimiento planctónico de *Sediminibacterium* sp. a una concentración de piruvato de 0,07 %, lográndose de esta forma cultivos completamente agregados.



**Figura 29.** Crecimiento planctónico de *Sediminibacterium* sp. cuantificado mediante la  $A_{600}$  del sobrenadante de cultivos MM4 (peptona 4 g/l) suplementados con distintas concentraciones de piruvato.

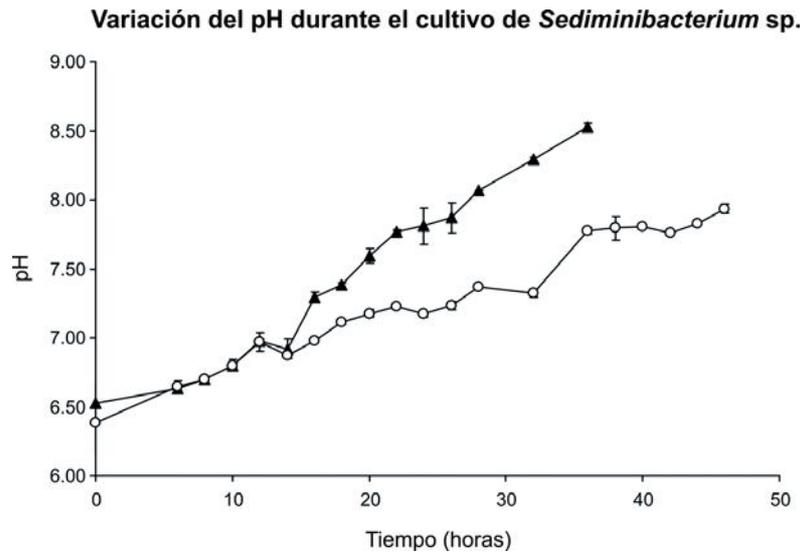
Así, empleando un medio con peptona como único componente en una concentración de 4 g/l suplementados con vitaminas y minerales (MM4), se lograron cultivos de *Sediminibacterium* sp. completamente planctónicos, y alternativamente cultivos completamente agregados empleando el mismo medio pero suplementado con piruvato en una concentración de 0,07 % (Figura 30).



**Figura 30.** Cultivo de *Sediminibacterium* sp. planctónico (izquierda) y agregado (derecha) realizado en medio MM4 y MM4 piruvato 0,07% respectivamente.

A pesar de que se emplearon concentraciones bajas de piruvato, este podría tener un efecto nutricional como fuente de carbono y energía en los cultivos. Este aporte se puede simular suplementando a los cultivos con cantidades equimolares de acetato. Los cultivos suplementados con acetato no mostraron ningún efecto sobre el cultivo, por lo que se descarta un efecto inducido por la degradación aeróbica del piruvato. Por otro lado, el piruvato podría ser empleado como fuente de carbono y energía a través de la fermentación ácida, que provocaría un descenso del pH por la producción de ácidos carboxílicos. Se realizó la medición del pH a lo largo del crecimiento de cultivos de *Sediminibacterium* sp. con o sin piruvato. En ambos casos se observó un incremento del pH a medida que transcurre el crecimiento, el cual está atribuido a reacciones de descarboxilación (Figura 31). De este modo, se descartaron las reacciones metabólicas posibles del piruvato que podrían tener una incidencia nutricional sobre los cultivos.

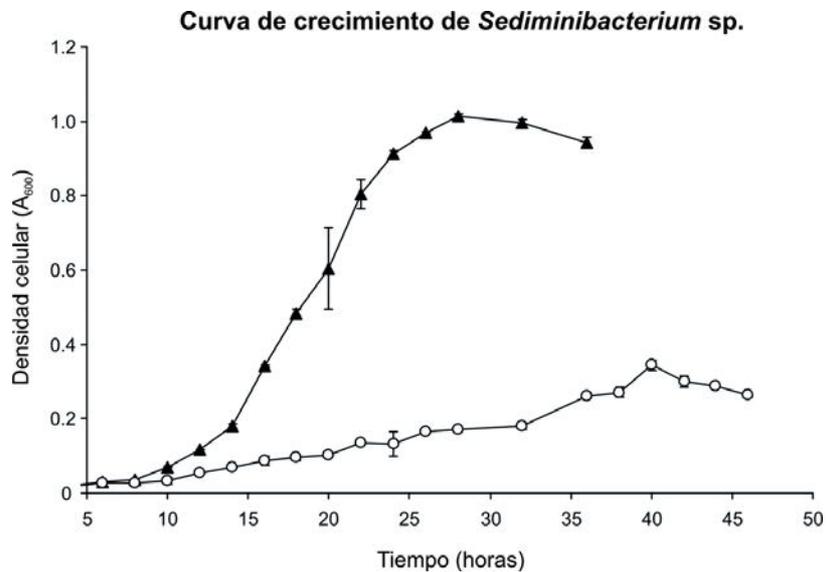
Al observar la relación entre protección frente al estrés oxidativo y agregación, y como se detectó un fenotipo catalasa negativo en *Sediminibacterium* sp., se realizaron cultivos líquidos suplementados con catalasa para determinar si esta enzima tenía incidencia en la agregación de los cultivos, pero los resultados fueron negativos.



**Figura 31.** Medición del pH durante el crecimiento agregado (círculos blancos) y planctónico (triángulos negros) de *Sediminibacterium* sp. Los cultivos fueron realizados por duplicado, y las barras de error corresponden al error estándar (n=2).

**Curvas de crecimiento de *Sediminibacterium* sp. agregado y planctónico**

Se realizaron las curvas de crecimiento de *Sediminibacterium* sp. en forma agregada y planctónica, empleando medios con y sin piruvato (Figura 32).



**Figura 32.** Curvas de crecimiento de *Sediminibacterium* sp. en forma agregada (círculos blancos) y planctónica (triángulos negros). Cada punto de medición de la A600 total corresponde a cultivos independientes realizados por duplicado. Las barras muestran el error estándar (n=2).

Se observó un crecimiento más rápido y con un rendimiento de biomasa mayor en el crecimiento planctónico, es decir cuando los cultivos no se suplementaron con piruvato. Este resultado se condice con el registro del pH a lo largo del crecimiento, donde se observó un incremento mayor en el crecimiento planctónico, resultante de una mayor actividad metabólica (Figura 32). Mediante estas observaciones, también se refuta una incidencia ponderable del piruvato desde el punto de vista nutricional, ya que se obtuvo una merma en el crecimiento cuando se empleó como suplemento, contrariamente a lo observado en el cultivo en placa.

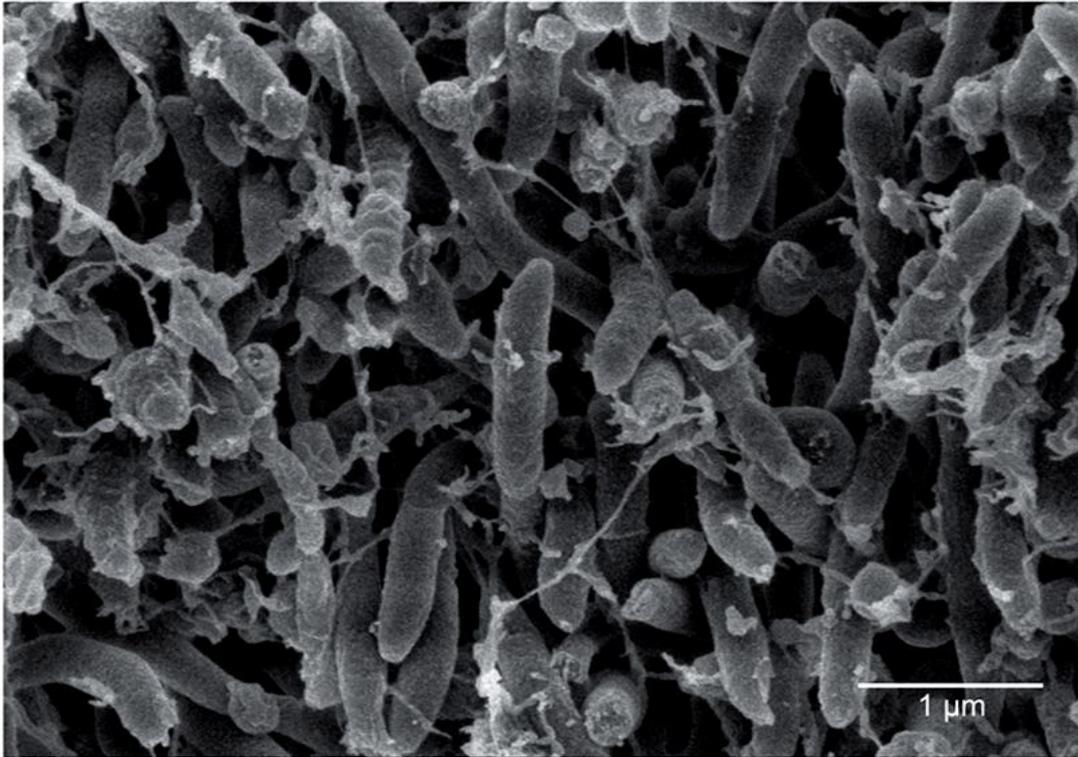
A pesar de que se obtuvo un mayor crecimiento de la forma planctónica, se observó que el número de colonias obtenidas en placa al inocular con un cultivo de este tipo fue menor al esperado de acuerdo al número de bacterias presentes (estimado mediante la A600). Esto sugiere que una gran proporción de las células planctónicas se encuentran en un estado cercano al “viable pero no cultivable”.

### ***Matriz extracelular de Sediminibacterium sp.***

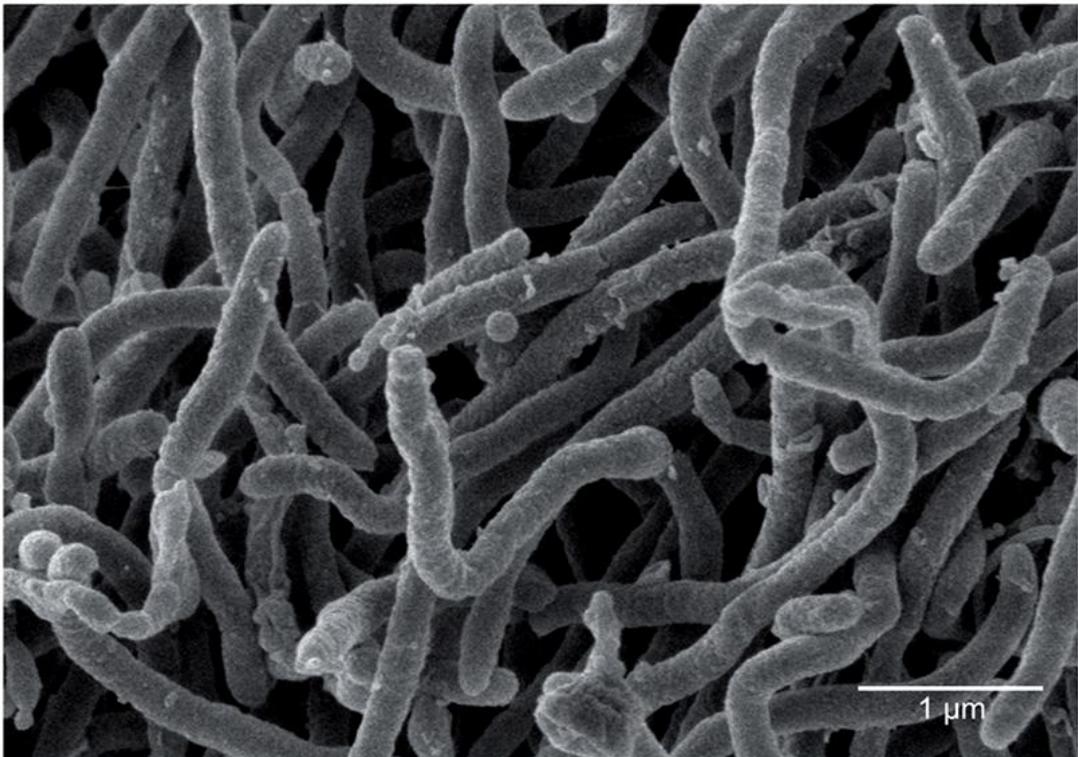
En la Figura 33 se muestran fotografías de microscopía electrónica de barrido de ambas formas de crecimiento de *Sediminibacterium sp.* Se puede observar la presencia de material polimérico extracelular fundamentalmente durante el crecimiento agregado, el cual sería necesario para la agregación celular. Sin embargo, al realizar la cuantificación de proteínas, carbohidratos y ADN de la fracción extracelular extraída mediante dos técnicas distintas (tratamiento térmico y EDTA), no se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de crecimiento (datos no mostrados).

Por otro lado, las células planctónicas parecen más alargadas, lo que sugiere que se están reproduciendo más activamente. El tamaño celular de *Sediminibacterium sp.*, que se realizó a partir de una célula septada justo antes de la división celular, fue de 0,3  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1,9  $\mu\text{m}$  de largo en promedio. Estos valores fueron similares a los reportados para *Sediminibacterium salmoneum* (0,2-0,3  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0,8  $\mu\text{m}$  de largo), pero notablemente inferiores a los de *Sediminibacterium ginsengisoli* (1,0-1,2  $\mu\text{m}$  y 3,0  $\mu\text{m}$ ).

**A** *Sediminibacterium* sp. agregado



**B** *Sediminibacterium* sp. planctónico



**Figura 33.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de *Sediminibacterium* sp. creciendo en forma agregada en medio MM4 suplementados con piruvato 0,07 % (A) y planctónica en medio MM4 sin piruvato (B). Las imágenes corresponden a magnificaciones de 50.000 X, la

barra muestra la distancia en escala correspondiente a 1  $\mu\text{m}$ .

### ***Respuesta de Sediminibacterium sp. a agentes estresantes***

Basados en la hipótesis de que el crecimiento planctónico de *Sediminibacterium sp.* corresponde a un estado estresado se realizaron distintas pruebas para observar si agentes estresantes externos, agregados desde el inicio del cultivo o durante el inicio de la fase exponencial, tienen una incidencia sobre la agregación de los cultivos.

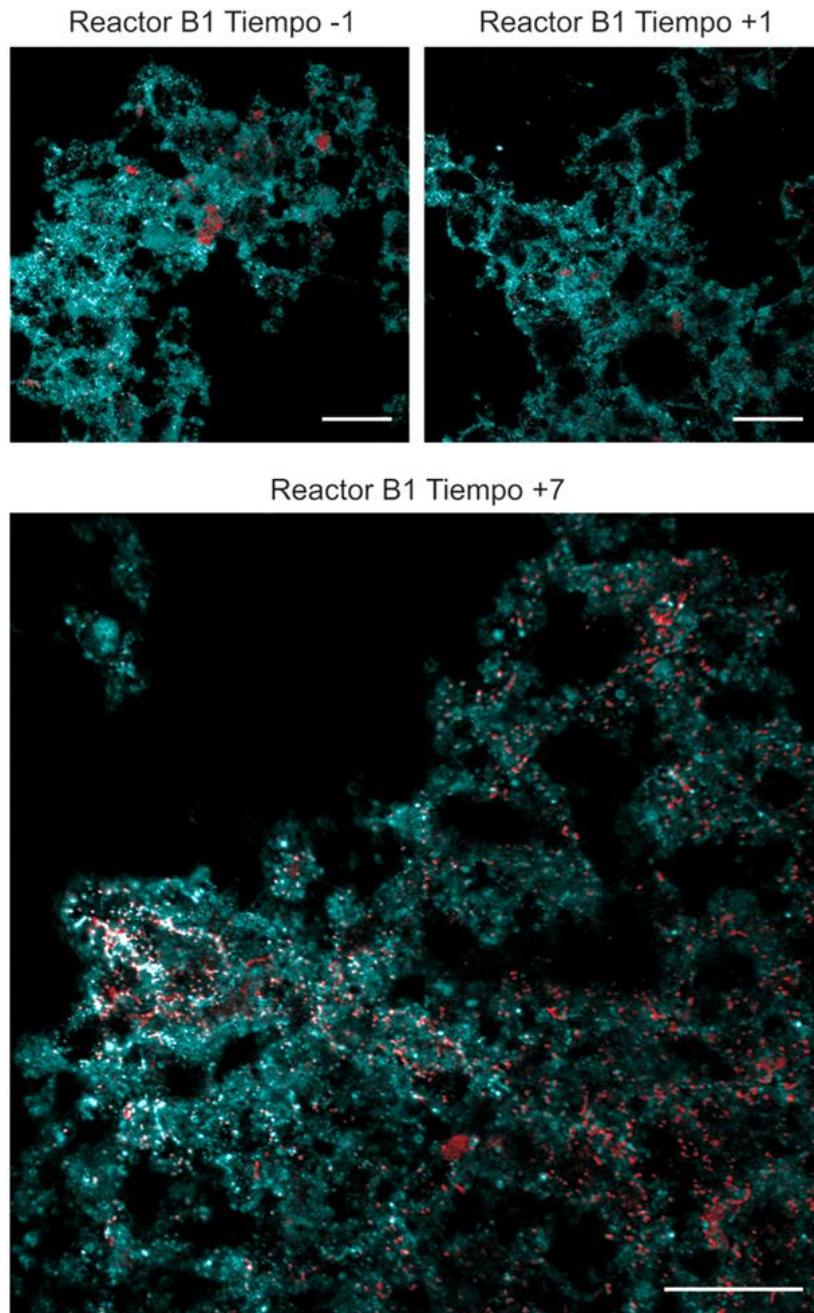
Por ejemplo, se llevaron a cabo cultivos MM4 suplementados con piruvato sobre los cuales se agregaron concentraciones crecientes de fenol. En ningún cultivo se observó crecimiento planctónico, todos los cultivos crecieron de forma floculenta hasta llegar a una concentración 1 mM de fenol por encima de la cual se inhibió completamente el crecimiento. Lo mismo ocurrió agregando agentes estimulantes del estrés oxidativo tales como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o paraquat, donde solamente se detectó crecimiento agregado hasta concentraciones de 5 mM y 0,1 mM respectivamente, las cuales resultaron inhibitorias. Tampoco se observó ningún efecto al agregar estos agentes a las 16 o 24 horas luego del inicio del cultivo.

Para observar el efecto de estos agentes, obligatoriamente se necesitaron emplear cultivos suplementados con piruvato, para que no se genere el crecimiento planctónico debido a las condiciones aeróbicas impuestas por el cultivo. Por lo tanto, esta protección podría estar interrumpiendo también el posible efecto de estos agentes, lo que condiciona la interpretación de estos ensayos.

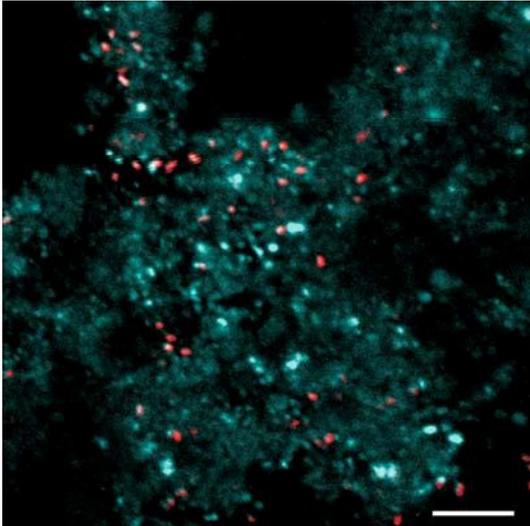
### ***Localización de Sediminibacterium sp. en el floc biológico***

Se realizó el diseño de la sonda SDM1404 específica de *Sediminibacterium sp.* (Ver Materiales y Métodos) para analizar la localización espacial de este taxón en el *floc* biológico mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH, del inglés *fluorescence in situ hybridization*). En la Figura 34 se muestran las imágenes obtenidas para los tres tiempos de estudio en uno de los reactores sometidos a un *shock* de fenol. En las imágenes correspondientes a los días -1 o +1 se observan pocos positivos, confirmando la baja abundancia de esta población en el *floc*. En cambio, en las muestras correspondientes al día +7, se pudieron observar varios positivos en el *floc* biológico lo cual confirma la incorporación de esta especie en el *floc*. Por otro lado, no se pudieron detectar las poblaciones planctónicas de *Sediminibacterium sp.* mediante esta técnica. Es destacable que *Sediminibacterium sp.* parece localizarse preferentemente inmersa en el *floc* biológico, y no en la periferia (Figura 35).

## Localización espacial de *Sediminibacterium* sp. en el *floc* biológico



**Figura 34.** Microfotografías de FISH tomadas a partir de la observación mediante microcopia confocal. Se realizó una tinción inespecífica con DAPI para la observación de las bacterias que conforman el *floc* biológico (azul). La señal fluorescente roja está dada por la emisión de Cy3 de la sonda SDM1404 específica de *Sediminibacterium* sp. Las muestras corresponden al reactor B1, sometido a un *shock* de fenol, durante los tiempos -1, +1 y +7. La barra en escala corresponde a una distancia de 50 µm.



**Figura 35.** Visualización de la localización de *Sediminibacterium* sp. mediante FISH en una sección interna del *floc* biológico, empleando microscopía confocal. La barra en escala corresponde a una distancia de 10  $\mu$ m.

### **Secuenciación del genoma de *Sediminibacterium* sp.**

Debido a las características fisiológicas peculiares del aislamiento de *Sediminibacterium* sp., y su posible importancia en el proceso de tratamiento de efluentes basados en barros activados, decidimos llevar a cabo la secuenciación completa del genoma. Esta información genética fue provechosa para una mejor caracterización filogenética de la cepa, y también para los estudios proteómicos realizados posteriormente. El ensamblado obtenido luego de la secuenciación completa del genoma de la cepa *Sediminibacterium* sp. resultó en un *scaffold* principal de 3.216.888 pb el cual abarcó el 99 % de las secuencias ensambladas, y otros tres *scaffolds* menores de 1.479; 489 y 456 pb. La totalidad de genoma ensamblado consta de 3.219.312 pb, con un contenido de GC del 39,24 %, y una región codificante del 93,3 %. La secuencia genómica ensamblada fue incorporada a la base de datos *Integrated Microbial Genomes Expert Review* (IMG-ER), con el nombre *Sediminibacterium* sp. C3 (IMG ID 2519103028), y fue anotada automáticamente empleando el DOE-JGI *Microbial Annotation Pipeline* (Mavromatis et al. 2009).

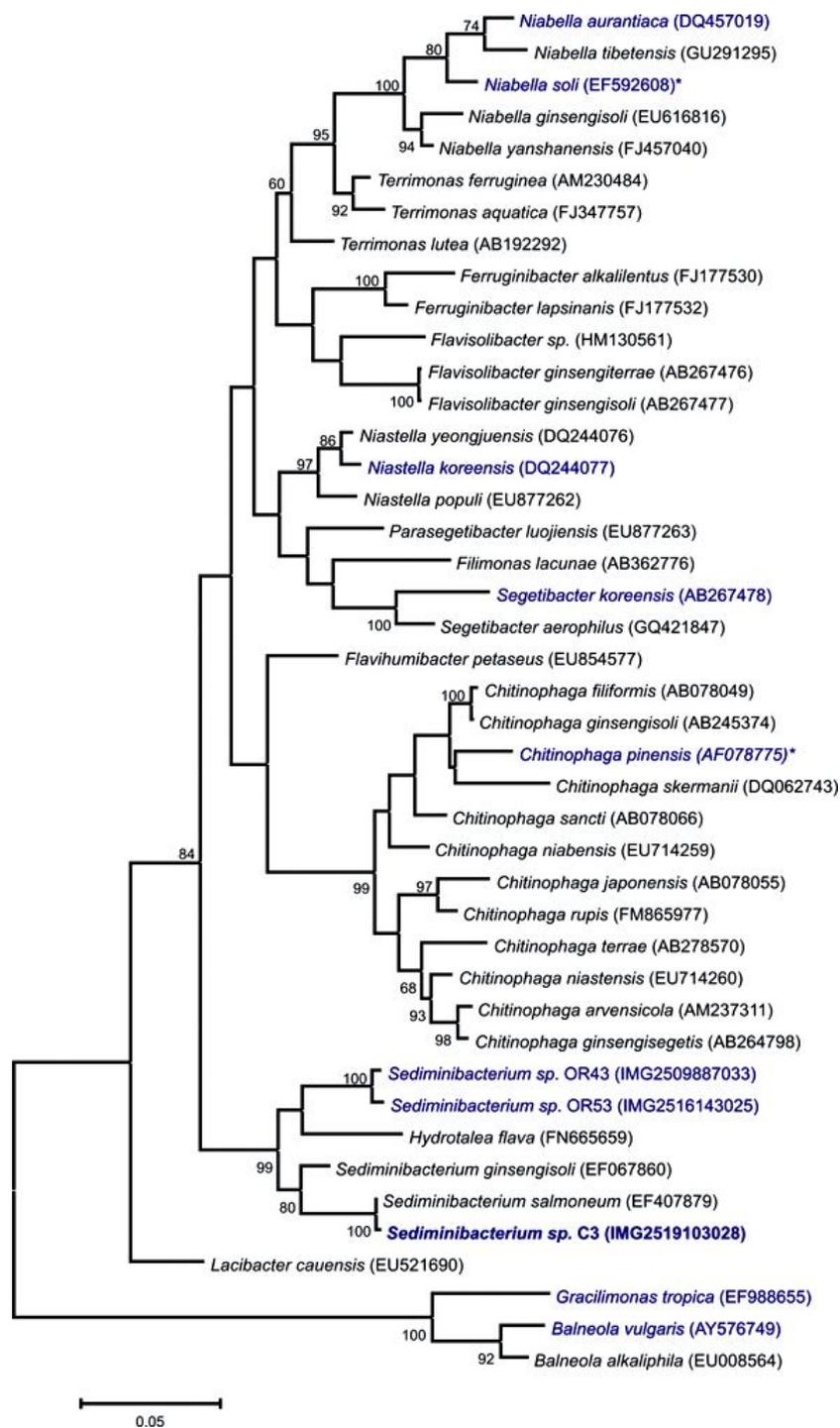
A partir de esta base de datos, se obtuvo la información de genomas anotados pertenecientes a especies relacionadas filogenéticamente (Tabla 5). Las cepas más relacionadas con *Sediminibacterium* sp. C3, pertenecen a *Sediminibacterium* sp. OR53 y OR43, los cuales representan a aislamientos realizados a partir de sedimentos contaminados (Bollmann et al. 2010). Si bien el tamaño del genoma de *Sediminibacterium* sp. C3 es similar respecto a estas cepas, se observó que el contenido de GC fue notablemente menor (39 % vs. 45-46 %). Otra característica saliente del genoma de *Sediminibacterium* sp. C3 es la abundante cantidad de genes que codifican ARN que posee, exceptuando los ARNr y ARNt, los cuales pueden tener funciones regulatorias (Tabla 5).

**Tabla 5.** Características de los genomas de *Sediminibacterium* sp. C3 y de las especies más relacionadas filogenéticamente extraídas de la base de datos IMG-ER.

Nombre	Tamaño (kb)	% G	% cod	Genes	Genes	Genes	ARNr	ARNt	Otros ARN
<i>Sediminibacterium</i> sp. C3	321	39	93	3011	2958	53	5	35	13
<i>Sediminibacterium</i> sp.	376	46	93	3327	3284	43	5	36	2
<i>Sediminibacterium</i> sp.	371	45	93	3332	3281	51	6	42	3
<i>Niabella aurantiaca</i>	592	49	88	4964	4895	69	12	49	8
<i>Niabella soli</i>	469	45	88	3931	3882	49	6	40	3
<i>Niastella koreensis</i>	903	45	88	7444	7366	78	9	67	2
<i>Chitinophaga pinensis</i>	912	45	89	7396	7301	95	18	77	0
<i>Segetibacter koreensis</i>	610	37	85	5211	5150	61	6	43	12
<i>Gracilimonas tropica</i>	383	43	91	3426	3373	53	7	43	3
<i>Balneola vulgaris</i>	285	40	93	2521	2465	56	12	41	3

Empleando los datos de secuencia del gen ARNr 16S de *Sediminibacterium* sp. C3, se realizó un árbol filogenético con las especies más relacionadas de las cuales se obtuvieron los datos de secuencia de la base de datos del Ribosomal Data Project (RDP, Cole et al. 2011). Para realizar este árbol se adicionaron las secuencias del gen ARNr 16S de *Sediminibacterium* sp. OR53 y OR43, extraídas de la base de datos IMG-ER. Se observó que *Sediminibacterium* sp. C3 compartió el mismo *cluster* con *Sediminibacterium salmoneum* y *Sediminibacterium ginsengisoli* (con 80 % de *bootstrap*), mientras que *Sediminibacterium* sp. OR53 y OR43 fueron excluidas en un agrupamiento aparte, más cercano al género *Hydrotalea* (Figura 36).

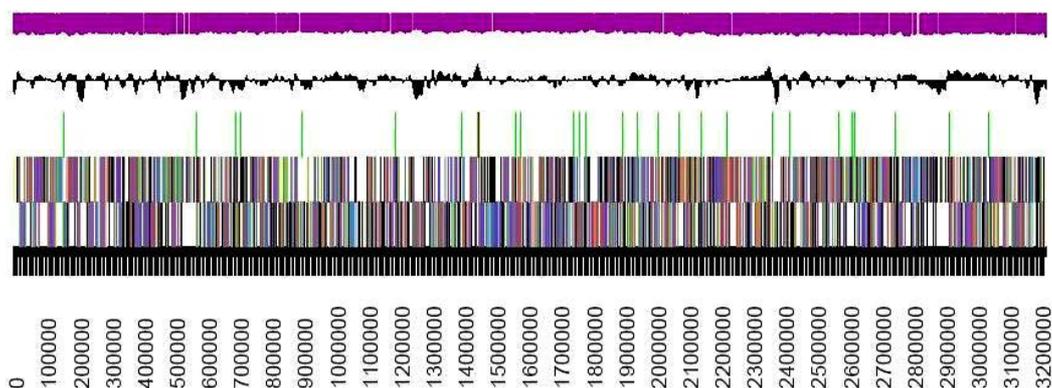
En el genoma de *Sediminibacterium* sp. C3 se identificaron 3011 genes, de los cuales 2958 correspondieron a genes que codifican proteínas y 53 genes que codifican secuencias de ARN. A la mayoría de los genes que codifican proteínas (77,28 %) se les asignó una función, mientras que el resto permanecieron anotados como genes que codifican proteínas hipotéticas. La distribución de genes en las categorías funcionales de grupos ortólogos de proteínas (COG, del inglés *Clusters of Orthologous Groups of proteins*) está presentada en la Tabla 6. En la Figura 37 se muestra una representación gráfica del genoma de *Sediminibacterium* sp. con la posición de los genes anotados, resaltados con distintos colores de acuerdo a la categoría funcional que representan, en ambas cadenas del ADN genómico.



**Figura 36.** Árbol filogenético en donde se resalta la posición de *Sediminibacterium* sp. C3 relativa a las cepas tipo de la familia *Chitinophagaceae* de las cuales se obtuvo las secuencias del gen de ARNr 16S desde de la base de datos RDP (Cole et al. 2009). También se sumaron al análisis las secuencias correspondientes a *Sediminibacterium* sp. OR53 y OR43 extraídas de la base de datos IMG-ER (Markowitz et al. 2009). Entre paréntesis se indican los números de acceso en el GenBank. Los números sobre los nodos indican valores de *bootstrap* resultantes de 1000 replicas (sólo se muestran los valores superiores a 60 %). Las ramas están en escala de acuerdo al número de sustituciones nucleotídicas por secuencia (la barra representa una divergencia del 5 %). Las especies que presentan proyectos de secuenciación de genoma registrados se muestran en azul, de los cuales están marcados con un asterisco los que se encuentran “Completos y publicados” (Anderson et al. 2012; Glavina Del Rio et al. 2010).

**Tabla 6.** Número de genes asociados las distintas categorías funcionales de COG. Para el cálculo de los valores de % de genes, se consideró el total de genes codificantes de proteínas clasificados en COG (2327).

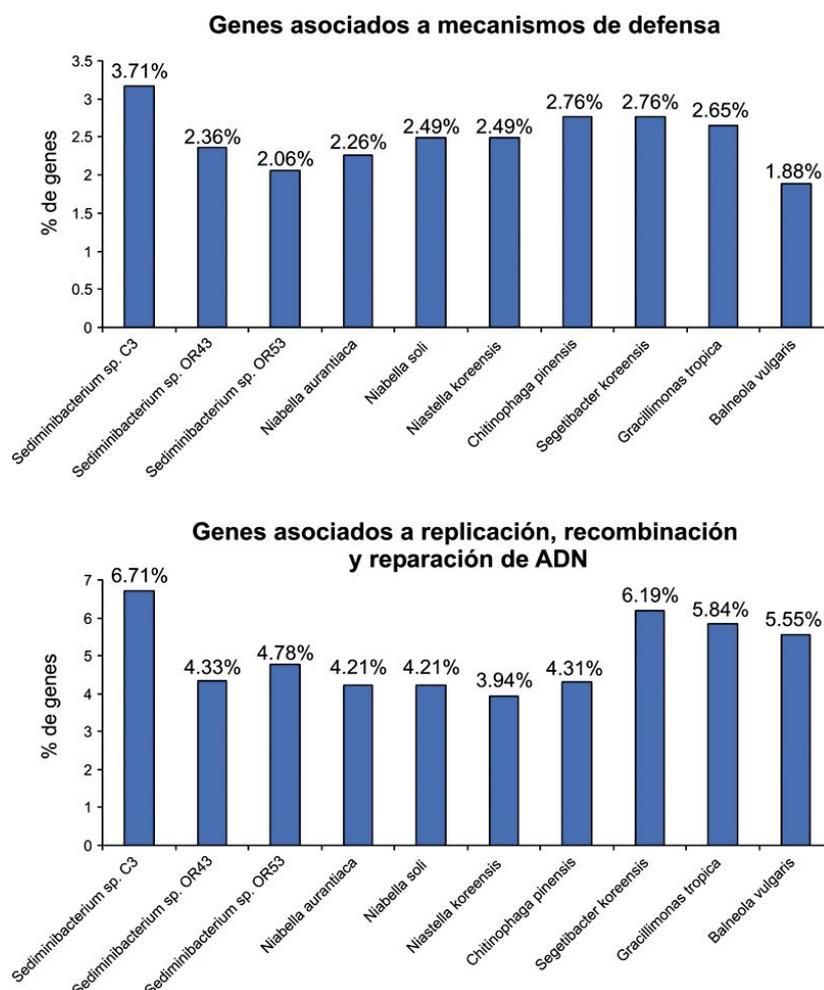
Código	Categoría COG	Nº genes	% genes
NA	No clasificadas en COG	865	28.73
R	Predicción de función general solamente	296	12.72
M	Biogénesis de pared celular, membrana y/o envoltura	197	8.47
E	Transporte y metabolismo de aminoácidos	196	8.42
S	Función desconocida	186	7.99
J	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	148	6.36
L	Replicación, recombinación y reparación	144	6.19
K	Transcripción	141	6.06
T	Mecanismos de transducción de señales	130	5.59
G	Transporte y metabolismo de carbohidratos	128	5.50
C	Producción y conversión de energía	123	5.29
P	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos	111	4.77
H	Transporte y metabolismo de coenzimas	104	4.47
O	Modificaciones post-traduccionales, recambio proteico, chaperonas	93	4.00
I	Transporte y metabolismo de lípidos	90	3.87
V	Mecanismos de defensa	68	2.92
F	Transporte y metabolismo de nucleótidos	65	2.79
U	Tráfico intracelular, secreción y transporte de vesículas	39	1.68
Q	Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios	38	1.63
D	Ciclo celular, división celular, partición del cromosoma	24	1.03
N	Motilidad celular	5	0.21
B	Estructura y dinámica de cromatina	1	0.04



**Figura 37.** Mapa lineal del *scaffold* principal de 3.216.888 pb. De abajo hacia arriba: Genes sobre la cadena codificante (distintos colores de acuerdo a la categoría de COG), genes sobre la cadena molde (distintos colores de acuerdo a la categoría de COG), genes de ARN (ARNt verde, ARNr rojo, otros ARN negro), contenido de GC, desvío GC.

### **Análisis comparativo del genoma.**

Se realizó un análisis comparativo de los porcentajes de genes asignados a las distintas categorías de COG, con las cepas más relacionadas de las cuales se tiene acceso al genoma anotado en la base de datos IMG-ER. De esta manera, se pudo determinar que *Sediminibacterium* sp. C3 tiene la particularidad de tener incrementada la cantidad de genes relacionados con mecanismos de defensa; y a la replicación, recombinación y reparación del ADN (Figura 38).



**Figura 38.** Porcentaje de genes asociados a mecanismos de defensa; y a replicación, recombinación y reparación del ADN en *Sediminibacterium* sp. y especies relacionadas. Para el cálculo de los valores de % de genes, se consideró el total de genes codificantes de proteínas clasificados en algún subsistema de COG con función asociada (2146).

### ***Sediminibacterium* sp. pertenece a la especie *Sediminibacterium salmoneum***

La cepa aislada de *Sediminibacterium* sp. tiene una gran similitud genética y fenotípica respecto a *Sediminibacterium salmoneum*.

Llevamos a cabo cultivos líquidos de la cepa tipo *Sediminibacterium salmoneum* NJ 44 y se observó que esta cepa posee el mismo comportamiento de agregación ante la suplementación del cultivo con piruvato. Por otro lado determinamos un fenotipo catalasa negativo en *Sediminibacterium salmoneum*, contrario a lo reportado anteriormente (Qu and Yuan 2008).

Se realizó la secuenciación del genoma entero de *Sediminibacterium salmoneum* y se procedió a calcular la distancia genómica entre las cepas *in silico*. Este resultado se puede correlacionar con un valor de hibridación ADN-ADN teórico para determinar si el aislamiento de este trabajo corresponde a la misma especie (ver *Materiales y Métodos*). El resultado fue positivo, ya que se obtuvo un porcentaje de hibridación 75,70 %  $\pm$  3,90,

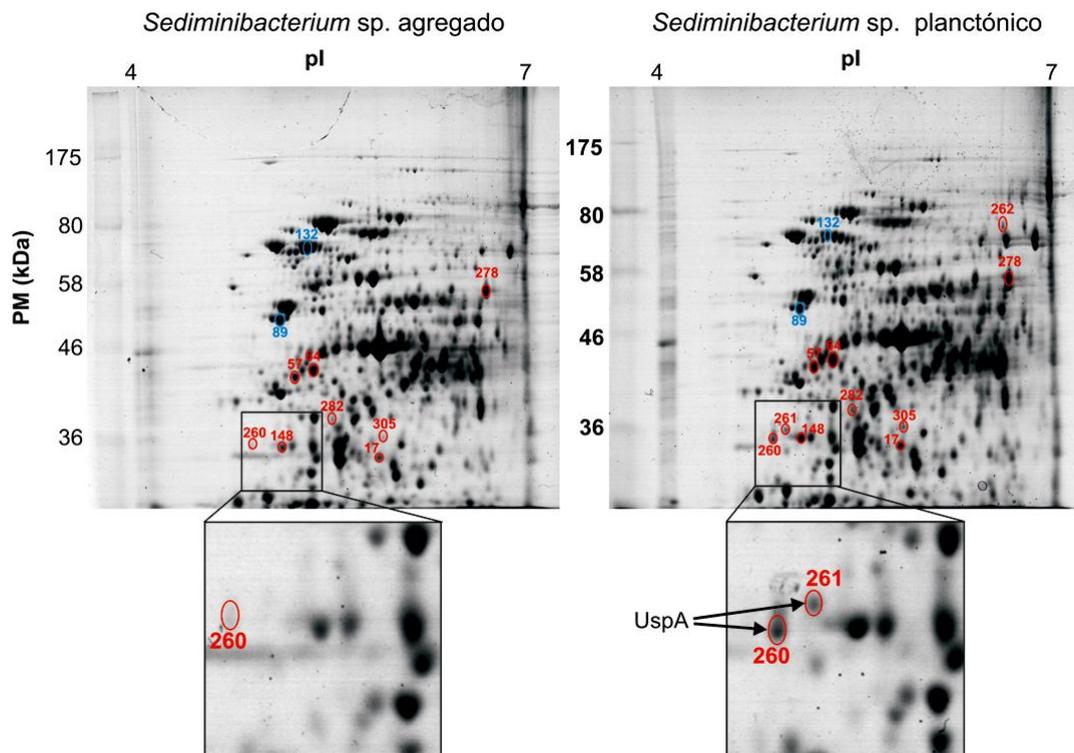
superior al mínimo de 70 % estipulado para especies equivalentes (88,08 % de certeza, calculado vía regresión logística). Por lo tanto, el aislamiento realizado en este trabajo corresponde a una nueva cepa de la especie *Sediminibacterium salmoneum*.

### **Análisis proteómico del crecimiento agregado y planctónico de *Sediminibacterium* sp.**

Se comparó el patrón global de expresión proteica de *Sediminibacterium* sp. creciendo en forma agregada y planctónica, empleando la técnica de electroforesis bidimensional en gel. Se identificaron 10 proteínas que se sobre-expresaron significativamente durante el crecimiento planctónico, de las cuales 5 tuvieron una diferencia de expresión de más de dos veces. En cambio, solamente dos proteínas incrementaron su expresión significativamente durante el crecimiento agregado. Vale la pena mencionar que las proteínas planctónicas sobre-expresadas podrían corresponder a proteínas que disminuyen su expresión bajo el crecimiento agregado, y viceversa.

El resultado más notable de este análisis proteómico fue la identificación de dos *spots* correspondientes a una proteína relacionada con estrés que mostraron una mayor intensidad durante el crecimiento planctónico, lo cual avalaría que este tipo de crecimiento corresponde a un estado estresado. Esta proteína se identificó como perteneciente a la familia de proteínas universales de estrés A (UspA, del inglés *Universal Stress family Protein A*), la cual está clasificada dentro de la categoría funcional COG de mecanismos de transducción de señales (COG0589). A pesar de que se identificaron tres de estos genes en el genoma de *Sediminibacterium* sp. C3, los dos *spots* se relacionaron a un único gen *uspA*. Las dos isoformas identificadas de la proteína UspA tuvieron pequeñas diferencias en masa y pI, posiblemente producto de reacciones de fosforilación y proteólisis (Tabla 7A). La UspA de mayor PM y pI, se encontró solamente durante el crecimiento planctónico, mientras que la otra isoforma se expresó 6 veces más durante este mismo tipo de crecimiento.

La segunda proteína sobre-expresada durante el crecimiento planctónico fue identificada como perteneciente a la familia de las hidrolasas CocE/NonD, la cual registró un incremento de 12 veces en la expresión respecto a lo detectado en el crecimiento agregado. Se reconoce una posible actividad proteolítica de estas proteínas, las cuales están clasificadas dentro del grupo de COG con función general. También se identificó que la proteína tiorredoxina, de conocida acción frente al estrés oxidativo, se expresó dos veces más durante el crecimiento planctónico. Además, también se expresó 1.6 veces más durante el crecimiento planctónico un ortólogo de un regulador transcripcional del microaerófilo *Campylobacter jejuni* (Tabla 7A).



**Figura 39.** Geles bidimensionales representativos del crecimiento agregado (izquierda) y planctónico (derecha). Se marcaron los *spots* que mostraron una intensidad significativamente mayor durante el crecimiento planctónico (en rojo) y durante el crecimiento agregado (celeste). Los números indican el ID de cada *spot* analizado (Tabla 7). El recuadro corresponde a la sección del gel aumentada donde se identificaron los *spots* correspondientes a UspA.

Otras dos proteínas que fueron expresadas mayormente durante el crecimiento planctónico, aunque con menor diferencia respecto de la expresión en la forma agregada, están involucradas en la replicación del ADN. Estas incluyen a la ADN polimerasa III, que actúa directamente en la replicación; y a la SAICAR sintetasa, la cual se involucra indirectamente ya que forma parte de las enzimas que intervienen en la síntesis de purinas. La última proteína significativamente expresada en mayor abundancia durante el crecimiento planctónico, correspondió a la 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, la cual cataliza el segundo paso en la ruta del catabolismo de tirosina.

Por otro lado, las únicas dos proteínas que se sobre-expresaron significativamente durante el crecimiento agregado fueron la proteína ribosomal 30S y la ATP sintetasa F1 (Tabla 7B).

**Tabla 7.** Spots identificados que mostraron una sobre-expresión significativa ( $p < 0,05$ ) durante el crecimiento planctónico (A), o agregado (B) de *Sediminibacterium* sp.

**A**

ID	Cambio	Identidad	Teórico		Gel		Análisis Mascot		
			PM (kDa)	pl	PM (kDa)	pl	score	% cob	expect
261	-	Proteína universal de estrés A	31.5	4.85	29	5.0	106	22	7.6 E-08
262	11.8	Hidrolasa CocE/NonD	70.7	8.26	74	6.6	96	19	7.8 E-07
260	5.9	Proteína universal de estrés A	31.5	4.85	28	4.9	183	22	1.5 E-15
305	3.9	Proteína sin caracterizar	28.7	5.54	30	5.9	69	33	3.6 E-04
282	2.0	Tiorredoxina	34.1	5.36	32	5.5	120	34	3.0 E-09
278	1.8	Proteína hipotética	52.4	8.02	56	6.7	171	22	2.4 E-14
17	1.6	Proteína Cj1172c	26.7	5.38	28	5.9	57	24	5.8 E-03
64	1.5	ADN polimerasa III, subunidad $\beta$	41.4	5.12	40	5.4	278	45	4.8 E-25
148	1.4	SAICAR sintetasa	35.3	4.93	28	5.1	270	67	3.0 E-24
57	1.2	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa	43.5	5.02	39	5.2	201	46	2.4 E-17

**B**

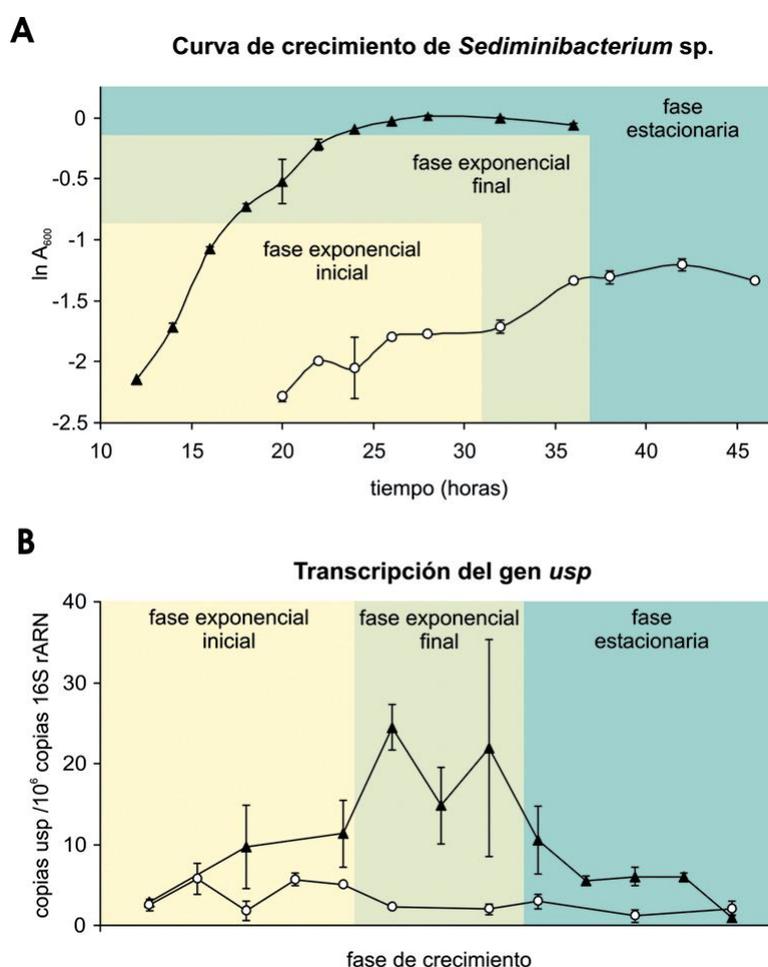
ID	Cambio	Identidad	Teórico		Gel		Análisis Mascot		
			PM (kDa)	pl	PM (kDa)	pl	score	% cob	expect
132	2.5	Proteína ribosomal 30S S1	70.1	5.22	71	5.3	203	29	1.5 E-17
89	2.0	ATP sintasa F1, subunidad $\beta$	53.8	4.98	52	5.2	76	29	8.5 E-05

ID: Número asignado a cada *spot* identificado. Cambio: cociente entre la intensidad promedio del *spot* durante el crecimiento planctónico y floculento, en la tabla A. En la tabla B, corresponde al cociente inverso. Identidad: gen del genoma anotado de *Sediminibacterium* sp. C3 sobre el cual se asignó la identidad del *spot*. PM: Peso molecular. pl: punto isoeléctrico. Teórico: Valores calculados a partir de la secuencia aminoacídica correspondiente al gen anotado. Gel: Valores calculados a partir de la corrida en el gel bidimensional. Análisis con el programa Mascot para determinar la identidad de los *spots*, empleando el genoma anotado de *Sediminibacterium* sp. C3 como base de datos local. Score: número que refleja la cantidad de asociaciones obtenidas entre los espectros de masa y la secuencia aminoacídica de la proteína. % cob: porcentaje de cobertura, el cual representa el porcentaje de secuencias peptídicas identificadas a partir del espectro de masa sobre el total de la secuencia aminoacídica de la proteína. Expect: probabilidad de que la asociación observada entre el espectro de masa y la secuencia aminoacídica sea por azar, valores de *expect* menores a 0,1 generalmente reflejan resultados confiables.

**Transcripción de *usp* durante el crecimiento agregado y planctónico de *Sediminibacterium* sp.**

A partir de la secuencia del gen *uspA*, y tomando como referencia la secuencia

genómica de *Sediminibacterium* sp., se diseñaron cebadores específicos y se cuantificó la transcripción del gen *uspA* mediante RT-PCR en tiempo real durante distintos estadios del crecimiento planctónico y agregado, en cultivos independientes y en forma replicada. Simultáneamente se midió la  $A_{600}$  para trazar la curva de crecimiento, y establecer de esta manera, a qué fase del crecimiento corresponde cada muestra temporal analizada. Así, se asignaron las muestras a las distintas fases de crecimiento alcanzadas a distintos tiempos para ambas formas de crecimiento, y se realizó la comparación. En líneas generales, se observó que la transcripción del gen *uspA* fue considerable solamente durante el crecimiento planctónico, y se activó particularmente durante el final de la fase exponencial del cultivo (Figura 40).



**Figura 40.** Curva de crecimiento de *Sediminibacterium* sp. planctónico (triángulos negros) y agregado (círculos blancos), realizada con cultivos independientes (por duplicado) cosechados a distintos tiempos (A). Sobre estas muestras se cuantificó la cantidad de copias de ARNm correspondientes al gen *usp*, el cual se relativizó por la cantidad de copias de ARNr 16S. Ambas determinaciones se llevaron a cabo mediante RT-PCR en tiempo real (B). Considerando las distintas curvas para el crecimiento planctónico y agregado, se clasificaron diferencialmente las muestras de estudio en distintas fases de crecimiento. De esta forma se realizó un análisis comparativo de la expresión del gen *usp* entre la forma planctónica y

agregada, durante las distintas fases de crecimiento: fase exponencial inicial (amarillo), fase exponencial final (verde), fase estacionaria (azul). Tanto los valores de crecimiento como los de expresión de *usp*, surgen del promedio de ambas réplicas biológicas realizadas para cada punto, y las barras corresponden al error estándar (n=2).

## DISCUSIÓN

### ***Mecanismos de desfloculación***

Mediante el análisis microscópico de muestras de reactores a escala de laboratorio se pudo comprobar la ruptura del *floc* biológico luego de cambios bruscos en la temperatura y concentración de fenol. Además se observó un aumento en la turbidez de la fracción sobrenadante luego de estos *shocks*, lo cual evidenció la presencia de material coloidal incapaz de sedimentar. Esta respuesta coincide con el incremento en la concentración de sólidos suspendidos luego de cambios bruscos de temperatura en reactores a escala de laboratorio reportado por Morgan-Sagastume y Allen (Morgan-Sagastume and Allen 2003). Estos autores postularon que la desfloculación observada se debe a la solubilización de las sustancias poliméricas extracelulares que mantienen unido al *floc* biológico, y que este *shock* térmico no tiene mayor impacto en la lisis y viabilidad celular (Morgan-Sagastume and Grant Allen 2005). El *shock* con una alta concentración de fenol, además de promover la solubilización de EPS, puede inhibir directamente la producción de los mismos; como así también puede alterar las uniones hidrofóbicas que forman parte de la matriz extracelular o incluso provocar la lisis celular (Schwartz-Mittelmann and Galil 2000). Estos pueden ser los motivos de los mayores valores de turbidez obtenidos luego del *shock* de fenol respecto al *shock* térmico.

La estructura de la comunidad bacteriana, determinada mediante DGGE, en las fracciones del *floc* y sobrenadante de los reactores luego del *shock* mostraron patrones muy similares, lo que estaría indicando un desprendimiento masivo e inespecífico de las bacterias que conforman el *floc* biológico hacia la fracción acuosa. Este resultado es similar al reportado por Nadarajah, en el cual se sostiene como hipótesis que los problemas de desfloculación se deben principalmente al desprendimiento de especies bacterianas que normalmente conforman el *floc* biológico, y no por el crecimiento de poblaciones planctónicas (Nadarajah et al. 2010). Este mecanismo se ve reflejado en el comportamiento de *Thauera* sp. Este taxón forma parte de la comunidad estable del *floc* y se desprende luego de *shocks* térmicos y de fenol. Luego de una semana, este taxón prácticamente se pierde del sistema debido a los sucesivos ciclos de sedimentación y decantación, que vuelven a seleccionar a las bacterias capaces de conformar el *floc* biológico, lo cual generalmente se traduce en una clarificación del sobrenadante.

En este trabajo se observó que los altos valores de turbidez observados luego del *shock* se mantuvieron e incluso aumentaron en una semana después del *shock*, lo cual sólo puede explicarse debido a un crecimiento activo de poblaciones planctónicas. En el análisis de DGGE entre las fracciones del *floc* y sobrenadante prácticamente la única diferencia en los patrones de bandas luego del *shock* radicó en la presencia de la banda correspondiente a *Sediminibacterium* sp. en la fracción sobrenadante de todos los reactores. En la fracción del *floc* esta banda es indetectable debido a su baja abundancia, por lo que se percibe que hubo un rápido crecimiento de esta población bacteriana en las 24 horas posteriores al *shock*. Una semana después, se pudo vislumbrar que la banda correspondiente a *Sediminibacterium* sp. aumentó aun más su intensidad. Este incremento de la población *Sediminibacterium* sp. fue cuantificado mediante PCR en tiempo real específica para este taxón. De esta manera quedó demostrado el crecimiento excesivo de *Sediminibacterium* sp. principalmente en la fracción sobrenadante donde alcanza a ser el taxón predominante de la comunidad, y sería el responsable de los altos valores de turbidez observados incluso una semana después del *shock*.

La reproducibilidad del mecanismo de respuesta de *Sediminibacterium* sp. a altas concentraciones de fenol en reactores a escala de laboratorio fue realmente notable. En un trabajo anterior realizado en el laboratorio destinado al estudio de comunidades bacterianas que degradan fenol, se emplearon reactores a escala de laboratorio sometidos a concentraciones crecientes de este compuesto orgánico y se observó un incremento masivo de la turbidez del sobrenadante al pasar a concentraciones correspondientes a 1g/l. Ante este acontecimiento se analizó la estructura de la comunidad bacteriana en la fracción floculenta y planctónica mediante DGGE. Llamativamente, se detectó la presencia de una única banda con una mayor proporción en la comunidad planctónica respecto a la floculenta y la misma correspondió a *Sediminibacterium* sp. (Basile 2009). También es destacable que en las pruebas posteriores, en donde se realizaron repeticiones con *shocks* de fenol en reactores a escala de laboratorio inoculados con el barro de la misma planta petroquímica pero con dos años de diferencia respecto al experimento original, siempre se desencadenó el crecimiento excesivo de *Sediminibacterium* sp. Además, en estos ensayos se pudo determinar que el crecimiento activo por parte de esta población ocurre en horas subsiguientes al *shock*.

Existe un único reporte que indica la presencia de un crecimiento activo de poblaciones planctónicas degradadoras de fenol, representadas principalmente por *Aquaspirillum delicatum* y *Variovorax paradoxus*, ante el incremento de la dosificación de fenol hasta una concentración de 1.5 g/l, ocasionando el colapso del funcionamiento de reactores basados en barros activados (Watanabe et al. 1999).

A partir de los resultados obtenidos podemos destacar que el mecanismo de desfloculación observado en este trabajo incluye la desfloculación masiva del *floc* biológico y

un posterior crecimiento excesivo de la comunidad planctónica, representada mayormente por *Sediminibacterium* sp.

### ***Sediminibacterium* en otros ambientes**

El género *Sediminibacterium* sp. se estableció en el año 2008 a partir del aislamiento y caracterización de *Sediminibacterium salmoneum*, proveniente de un reservorio eutrófico situado en Beijing, China (Qu and Yuan 2008). Hasta el momento se caracterizó solamente una especie más perteneciente a este género, la cual corresponde a *Sediminibacterium ginsengisoli*, aislada a partir de muestras de suelos pertenecientes a cultivos de ginseng en Corea del Sur (Kim et al. 2013b). Por otra parte existen otros dos aislamientos, OR43 y OR53, realizados a partir sedimentos subsuperficiales contaminados de un campo de pruebas en Oak Ridge, los cuales fueron asignados al género *Sediminibacterium* y mostraron una alta resistencia a metales pesados.

La poca cantidad de aislamientos representativos de este género implica que se tenga poco conocimiento sobre la fisiología de *Sediminibacterium* sp. Sin embargo, existen diversos reportes en los cuales mediante técnicas independientes de cultivo se determinó la presencia de taxones pertenecientes a este género ocupando una gran diversidad de ambientes, naturales o manipulados por el hombre, y exhibiendo en muchos casos un aumento repentino en su abundancia. De esta manera, se encontraron representantes de *Sediminibacterium* en reactores anaeróbicos de flujo ascendente (Khemkhao et al. 2011), como así también en reactores aeróbicos empleados para tratar suelos contaminados con hidrocarburos poliaromáticos, en los cuales se registra un incremento hasta llegar al 12 % del total de la comunidad durante un estadio aparentemente anóxico (Singleton et al. 2011). Durante el seguimiento de la remediación de un acuífero contaminado con nitratos empleando la técnica de bioestimulación, se determinó que poblaciones relacionadas a *Sediminibacterium* aumentan su abundancia ante el agregado de pirita y se encuentran mayoritariamente en la fase acuosa (Torrentó et al. 2011). También se encontraron poblaciones relativas a *Sediminibacterium* formando parte de biopelículas que intervienen en la corrosión de tuberías de hierro, y se las catalogó como pertenecientes a la familia de las bacterias oxidantes de Hierro (Wang et al. 2012). Quizás por la misma razón, en un estudio realizado en Alemania se reveló que el filotipo más abundante encontrados en agua de grifo, de acuerdo a la técnica de *fingerprinting* SSCP (del inglés, *single-strand conformation polymorphism*) basada en la secuencia del gen ribosomal 16S, corresponde a *Sediminibacterium* (Kahlisch et al. 2012).

Por último, se puede advertir que se encontraron bacterias de este género tanto en fases sólidas (lodos, sedimentos, biopelículas) como en fases acuosas. La capacidad de crecer en forma planctónica o formando parte de biopelículas de *Sediminibacterium* quedó evidenciada

en un estudio de la formación de biopelículas en cursos de agua naturales, donde se manifestó una considerable abundancia y actividad de *Sediminibacterium* sp. tanto en la comunidad en suspensión como en la correspondiente a biopelículas (Besemer et al. 2012).

### ***Bacterias microaerófilas***

La característica más sustancial de la fisiología de *Sediminibacterium* sp., que encontramos mediante el aislamiento y los consecuentes cultivos puros de esta cepa, fue su naturaleza microaerófila, la cual se determinó a través de cultivos semisólidos. Las bacterias microaerófilas tienen un crecimiento óptimo a presiones de oxígeno inferiores a la atmosférica. Estas condiciones están dadas en diversos ambientes en la naturaleza, y es en ellos donde pueden tener una ventaja adaptativa respecto a organismos aerófilos.

Mediante el cultivo en medios semisólidos con distinta concentración de peptona se observó que la aerotolerancia de *Sediminibacterium* sp. aumenta a medida que se incrementa la concentración de este sustrato. Esta observación es compatible con el mecanismo de comportamiento microaerófilico regulado por bajo sustrato como una respuesta a estrés (LSRMB del inglés *Low-Substrate Regulated Microaerophilic Behavior as a Stress Response*) reportado por Mazumder y colaboradores, el cual plantea que ciertas bacterias ocupan nichos microaerófilos en ambientes oligotróficos con el fin de disminuir la tasa de metabolismo oxidativo que implica la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*). Este mecanismo se diferencia del modelo de microaerofilia clásico ya que sólo se activa en condiciones oligotróficas, y ante la disponibilidad de altas concentraciones de sustrato estas bacterias se comportan normalmente como aerófilos. Cultivos que combinaron medios con baja concentración de sustratos y aerobiosis demostraron estar bajo estrés debido al incremento de la producción de 17:0 ciclopropano, un ácido graso conocido como indicador de estrés (Mazumder et al. 2000).

Sin embargo, a pesar de haberse demostrado esta condición de estrés, el mecanismo de respuesta asociado a un comportamiento microaerófilico que implica una menor tasa metabólica para disminuir la generación de ROS no está del todo claro. Habitualmente se pensaba que la mayor fuente de ROS en organismos aeróbicos se gestaba durante la cadena de transporte de electrones, en cambio mediante el estudio en mutantes deficientes en estas enzimas respiratorias se encontraron los mismos niveles de ROS, llegando a la conclusión de que la mayor fuente de ROS intracelular proviene principalmente de la autooxidación accidental de flavoproteínas no respiratorias en presencia de oxígeno (Imlay 2013). Otros reportes indican el efecto que tiene la composición del medio de cultivo en el crecimiento de bacterias microaerófilas. Generalmente se postula que los sustratos derivados de digestión proteica, por ejemplo peptona o extracto de levadura, actúan

directamente como protectores frente a especies reactivas del oxígeno (Männistö and Puhakka 2002). Por lo tanto, esta es la razón por la cual Mazumder y colaboradores reportaron un estado estresado en condiciones aeróbicas solamente cuando las condiciones fueron oligotróficas, es decir cuando la concentración de sustratos que protegen frente al estrés oxidativo fue baja.

En consecuencia, queda establecido que en condiciones de aerobiosis se obtiene un mejor crecimiento bacterias microaerófilas en medios ricos. Así, la naturaleza microaerofílica de nuevos aislamientos puede verse enmascarada por las prácticas rutinarias de cultivo en el laboratorio. Incluso en cepas de *Campylobacter*, el microaerófilo mayormente caracterizado, se reportó esta dificultad y se propuso un medio de cultivo libre de compuestos derivados de la digestión proteica para la determinación de la tolerancia al oxígeno en cepas de este género (Hodge and Krieg 1994).

Por otro lado, no se observó crecimiento de *Sediminibacterium* sp. en una atmósfera con 6 % de oxígeno, provista por el kit especializado para el crecimiento de bacterias del género *Campylobacter*. De acuerdo a este resultado y a la gran proximidad de la superficie en donde se produce el crecimiento en medios semisólidos, concluimos que *Sediminibacterium* sp. crece óptimamente en concentraciones de O<sub>2</sub> levemente inferiores a la atmosférica, a diferencia de lo que ocurre en los microaerófilos mejor caracterizados los cuales requieren concentraciones aún menores de O<sub>2</sub> (Kaakoush et al. 2007). Igualmente, detectamos que *Sediminibacterium* sp. es catalasa negativa y mostró susceptibilidad frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta característica fenotípica es frecuente en este tipo de bacterias y podría complementarse para la determinación más fiable de la naturaleza microaerofílica (Männistö and Puhakka 2002).

### **Efecto del piruvato frente al estrés oxidativo y agregación**

Los cultivos de *Sediminibacterium* sp. realizados en placa mostraron una llamativa restricción en el crecimiento. En este tipo de cultivos la exposición al oxígeno es máxima, lo cual compromete el crecimiento de esta cepa microaerofílica. El crecimiento observado en la sección donde se comienza el estriado puede deberse al efecto positivo que tiene la densidad poblacional para superar la toxicidad del oxígeno (Krieg and Hoffman 1986). Igualmente, este crecimiento errático fue remediado totalmente mediante la suplementación con piruvato. El efecto estimulante del piruvato en placas estriadas no está reportado, sin embargo este efecto es similar al publicado en cultivos de *Campylobacter fetus* suplementados con norepinefrina, el cual favorece la incorporación del Fe necesario como cofactor en varias enzimas que actúan frente al estrés oxidativo (Bowdre et al. 1976). El piruvato también está clasificado como agente protector frente al estrés oxidativo, y actúa directamente degradando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Krieg and Hoffman 1986). Esta reacción química

espontánea, general para los  $\alpha$ - ketoácidos, involucra su descarboxilación para liberar el ácido carboxílico correspondiente, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Holleman 1904).

La naturaleza microaerófila de *Sediminibacterium* sp., que incluye un fenotipo catalasa negativo, provoca que el cultivo en condiciones de aerobiosis implique una condición de estrés. Por esta razón se observa el efecto positivo del piruvato, que reacciona frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supliendo la falta de actividad catalasa.

En 1951 apareció el primer reporte relacionado con un efecto protector del piruvato, en el cual se informó una mejora en la resistencia de bacterias sometidas a radiación atribuida a la reacción directa y espontánea del piruvato con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado intracelularmente (Thompson et al. 1951). Desde 1965 hasta la actualidad existen numerosos reportes en donde se manifiesta la importancia de la suplementación con piruvato en medios empleados para la recuperación de bacterias estresadas, las cuales pierden la capacidad de detoxificar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Baird-Parker and Davenport 1965). Este estado “viable pero no cultivable” es superado mediante la suplementación con piruvato, lo cual es importante para el recuento de patógenos luego de la aplicación de métodos de desinfección/esterilización en aguas o alimentos. Por ende existen numerosos reportes orientados al estudio del efecto positivo de la suplementación con piruvato, por ejemplo en el cultivo de células estresadas de *Staphylococcus aureus* (Baird-Parker and Davenport 1965; Martin et al. 1976), *Escherichia coli* (Czechowicz et al. 1996; McDonald et al. 1983), *Ralstonia solanacearum* (Imazaki and Nakaho 2009) y *Vibrio parahaemolyticus* (Mizunoe et al. 2000) luego de tratamientos térmicos, como así también en el recuento de bacterias coliformes estresadas químicamente con compuestos clorados (Calabrese and Bissonnette 1990).

Los cultivos líquidos de *Sediminibacterium* sp. exhibieron la capacidad de crecer en forma agregada y planctónica. La proporción de cada forma de crecimiento dependió fuertemente de condiciones que están relacionadas con el estrés oxidativo intrínseco del cultivo en el laboratorio. Se observó que al asegurar una menor oxigenación del medio se favoreció el crecimiento agregado por sobre el planctónico en cultivos puros. Asimismo, la composición del medio de cultivo también influyó en la proporción de crecimiento agregado/planctónico, debido a la presencia de compuestos protectores frente al estrés oxidativo. Cultivos enriquecidos en peptona incrementaron notablemente la proporción de crecimiento agregado/planctónico. Aunque no se conoce el mecanismo de acción, está probado que los productos de digestión proteica empleados en los medios mejoran el cultivo de cepas microaerófilas en condiciones aeróbicas (Hodge and Krieg 1994). No obstante, la suplementación de los cultivos líquidos con un agente protector más efectivo contra el estrés oxidativo como lo es el piruvato, tuvo el efecto más determinante ya que inhibió completamente el crecimiento planctónico. De esta forma, se confirmó una relación entre la protección frente al estrés oxidativo y la agregación de *Sediminibacterium* sp.,

estableciéndose por primera vez el efecto del piruvato sobre la autoagregación de cultivos bacterianos.

### ***Aporte nutricional del piruvato***

El piruvato es empleado comúnmente en medios de cultivo, incluso como fuente de carbono y energía. Si bien puede tener cierto aporte nutricional, muchos autores coinciden en que el efecto fundamental está en su capacidad protectora frente al estrés oxidativo mediante la reacción con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Calabrese and Bissonnette 1990; Martin et al. 1976; Mizunoe et al. 1999; Thompson et al. 1951). McDonald y colaboradores, postulan que el piruvato podría ser empleado como fuente de carbono y energía por *Escherichia coli* a través de la fermentación ácida, lo cual quedó descartado debido a que no se detectó una disminución del pH en el medio de cultivo (McDonald et al. 1983). En este trabajo también se concluyó que la posible fermentación del piruvato es despreciable, debido a que se observa una curva ascendente en los valores de pH en los cultivos suplementados con piruvato (agregados), atribuida principalmente a reacciones de descarboxilación (Figura 31). La otra alternativa de metabolización del piruvato es a través de su descarboxilación mediante la enzima piruvato deshidrogenasa y el posterior ingreso de AcetilCoA en el ciclo de Krebs. Sin embargo, los cultivos suplementados con acetato no mostraron ningún efecto sobre la agregación, por lo que se descarta un efecto inducido por la metabolización del piruvato. También es destacable que en los cultivos sin piruvato, es decir al crecer de forma planctónica, se obtiene un mayor crecimiento. Por esta razón no se cree que el piruvato esté aportando nutricionalmente al cultivo de *Sediminibacterium* sp., de la misma forma que el crecimiento planctónico aparentemente se debe a un mecanismo de división masiva en respuesta a estrés (ver sección *Crecimiento planctónico como respuesta a estrés*). En definitiva, la suplementación con piruvato prevalece en el cultivo de bacterias microaerófilas debido a su capacidad para mejorar la aerotolerancia (Krieg and Hoffman 1986).

La enzima catalasa también se emplea a menudo como suplemento en medios de cultivo como agente protector frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de manera similar al piruvato, pero con la particularidad de que es incapaz de ingresar a la célula bacteriana (Krieg and Hoffman 1986). En consecuencia esta enzima tiene actividad solamente detoxificando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado exógenamente. En cultivos líquidos de *Sediminibacterium* sp. no se observó un efecto agregando catalasa al medio de cultivo, por lo tanto este resultado indica que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que afecta el crecimiento de *Sediminibacterium* sp. se estaría generando intracelularmente y el piruvato, al ser incorporado por la célula, puede tener su efecto detoxificante.

La baja concentración de piruvato empleada en los cultivos de *Sediminibacterium* sp., seguramente cumple un papel importante en la protección frente al estrés oxidativo sin mediar en el metabolismo de *Sediminibacterium* sp., por esta razón atribuimos el

crecimiento planctónico a una forma de crecimiento estresada. Interesantemente, el crecimiento planctónico podría asemejarse un estado “viable pero no cultivable”, ya que se observó una disminución de la proporción de recuperación de células en placa en este tipo de cultivos.

### ***Acción del piruvato intracelular como mecanismo frente al estrés oxidativo***

El piruvato es un compuesto central del metabolismo de carbohidratos, y ubicuo en la célula bacteriana. Como vimos anteriormente, es conocido el efecto positivo del piruvato como suplemento en el cultivo de microorganismos estresados, sin embargo se obvió la posible función fisiológica del piruvato como mecanismo de respuesta a estrés oxidativo (Giandomenico et al. 1997). La reacción del piruvato con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no está mediada enzimáticamente, por lo cual para ser efectiva requeriría la presencia de una concentración por exceso de piruvato. Así, de acuerdo a la concentración en que se encuentre podría ser un eficaz protector frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido de manera endógena. Las rutas metabólicas que involucran al piruvato, tanto de síntesis como degradación, podrían estar reguladas de manera que aumente la concentración de este metabolito como respuesta a estrés oxidativo. Este mecanismo fue propuesto en cultivos de células cancerígenas humanas, en donde se demostró la acción piruvato contra el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular en ensayos *in vitro* e *in vivo*. En estas células se consideran concentraciones micromolares de piruvato (como las empleadas en este trabajo) las cuales son efectivas contra las concentraciones nanomolares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usualmente existentes. También se destaca este mecanismo de detoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por encima de los métodos enzimáticos, como por ejemplo el mediado por catalasa, ya que la reacción química que ocurre con el piruvato genera productos totalmente inocuos para la célula. Contrariamente, una elevada tasa de detoxificación mediada por catalasa produce un incremento local en la concentración de O<sub>2</sub>, liberado como producto de la reacción junto con H<sub>2</sub>O, que puede resultar tóxica para la célula (Nath et al. 1995). Interesantemente, en un reporte reciente se demostró que el peróxido de hidrógeno provoca una reprogramación metabólica en *Pseudomonas fluorescens* que incrementa la concentración intracelular de piruvato (Bignucolo et al. 2013).

### ***Análisis proteómico / Proteína universal de estrés***

El análisis proteómico de ambas formas de crecimiento sustentó la hipótesis de que la forma de crecimiento planctónica corresponde a un estado estresado. La principal diferencia en el perfil proteómico de ambas formas de crecimiento fue debido a una proteína identificada como perteneciente a la familia de proteínas universales de estrés A (UspA, del inglés *universal stress protein*). Esta familia de pequeñas proteínas citoplasmáticas se

encuentra conservada en bacterias, arqueas, hongos, protozoos y plantas. A pesar de que todavía se desconoce su actividad bioquímica y mecanismo de acción, se realizaron avances relativos a la determinación de su función celular (Siegele 2005). Fundamentalmente, la expresión de proteínas pertenecientes a la familia UspA responde a diversas perturbaciones ambientales, entre ellas el estrés oxidativo.

Se demostró que la expresión de UspA se incrementó repentinamente cuando cultivos de *Escherichia coli* creciendo en fase exponencial se expusieron a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además la viabilidad se redujo marcadamente cuando mutantes defectivos en el gen *uspA* fueron sometidos a este oxidante (Nyström and Neidhardt 1994), o a un agente productor de superóxidos (Nachin et al. 2005). También se caracterizó la susceptibilidad a distintos agentes estresantes de cepas mutantes del patógeno *Listeria monocytogenes* carentes de los genes ortólogos de UspA, y también se encontró una mayor susceptibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Seifart Gomes et al. 2011).

Como mencionamos anteriormente, no se conoce el mecanismo de acción por el cual la expresión de las proteínas de la familia UspA permite una mayor resistencia al estrés, entre otras funciones posibles. A partir de la secuencia aminoacídica de la proteína UspA de *Sediminibacterium* sp. también se pudo predecir un dominio de unión a nucleótidos. Por esta razón se especula que esta proteína puede estar involucrada en mecanismos de regulación génica. En *Escherichia coli* se demostró que la sobreexpresión de UspA provocó un cambio el patrón de expresión proteica. Asimismo se observó que se altera el pI de otras proteínas normalmente identificadas, producto de la modificación en el patrón de fosforilaciones (Nyström and Neidhardt 1996). Si bien se identificaron tres genes parálogos de UspA en el genoma de *Sediminibacterium* sp., los dos *spots* identificados como UspA están relacionados a un solo gen de la familia UspA. En los geles bidimensionales se aprecian pequeñas diferencias tanto de pI como de masa entre ambos *spots*. La diferencia de pI puede atribuirse a distintas variantes fosforiladas de esta proteína UspA. La fosforilación de UspA fue reportada en *Escherichia coli* como respuesta a inanición (Freestone et al. 1997). Al mismo tiempo, las diferencias de masa pueden resultar de reacciones proteolíticas. Posiblemente estas reacciones estén regulando post-traduccionalmente la función de UspA en *Sediminibacterium* sp. Aunque en general se observa una expresión significativamente mayor de UspA durante el crecimiento planctónico, existe una variante de esta proteína que es exclusiva de este tipo de crecimiento. Por ende, existe la posibilidad de que esta variante sea la que tiene la función necesaria a desarrollarse durante el crecimiento planctónico. En un estudio proteómico de *Actinomyces naeslundii*, creciendo en forma planctónica y en biopelículas, también se encontró la presencia de dos isoformas de una proteína de estrés con distinta masa. En este caso, un *spot* se expresa con la misma intensidad en ambas formas y el otro es característico del crecimiento en biopelícula. De esta manera, los autores postulan la existencia de un

mecanismo de regulación de la función de una proteína de estrés, mediante reacciones de fosforilación/desfosforilación y posterior proteólisis, que está involucrada en la agregación (Paddick et al. 2006).

Generalmente la expresión de las proteínas de la familia Usp se activa durante un estado de arresto del crecimiento. La expresión de este tipo de proteínas durante la fase estacionaria podría explicar la mayor resistencia a agentes estresantes, como el calor y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que adquieren los cultivos de *Escherichia coli* durante este estadio (Jenkins et al. 1988). De esta manera, la expresión de los genes *usp* aumenta cuando comienza a decaer la tasa de crecimiento máxima determinada por el medio de cultivo. Esta detención puede darse durante la exposición a agentes tóxicos, entre ellos el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o bien por la depleción de nutrientes (Nyström and Neidhardt 1994). En este trabajo se observó un incremento en la expresión de *uspA* hacia el final de la fase exponencial durante el crecimiento planctónico (Figura 40). La tasa de crecimiento para esta forma de crecimiento fue mayor respecto al crecimiento agregado, por lo que podría haber un efecto de expresión de *uspA* por inanición. Sin embargo, en el crecimiento agregado también se alcanzó un detrimento de la tasa de crecimiento y un posterior ingreso a fase estacionaria, seguramente dado por el agotamiento de nutrientes, y no se detectó una expresión considerable de *uspA*. Por este motivo, se considera que la expresión de *uspA* en *Sediminibacterium* sp. sería independiente de la disponibilidad de nutrientes, y que la activación durante el crecimiento planctónico sería debida a un incremento en la concentración intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De esta forma el crecimiento agregado, al estar protegido frente al estrés oxidativo a través de la suplementación con piruvato, no desencadenó los mecanismos necesarios para la expresión de la proteína UspA.

La segunda proteína con mayor aumento en la expresión durante el crecimiento planctónico respecto al agregado, está relacionada con la familia de hidrolasas CocE/NonD, las cuales tienen asignada una actividad proteolítica como función biológica. Una actividad proteolítica exacerbada a nivel intracelular posiblemente esté cumpliendo una función regulatoria (Gottesman 2003), la cual en este caso podría relacionarse con genes clave que distinguen a las dos formas de crecimiento de *Sediminibacterium* sp.

No sólo la expresión de la proteína UspA durante el crecimiento planctónico sustentó la hipótesis de un estado estresado asociado a esta forma de crecimiento, sino que también se observó una mayor expresión de dos proteínas que incluso están relacionadas particularmente con el estrés oxidativo, es decir el tipo de estrés que se considera que actúa sobre los cultivos de *Sediminibacterium* sp. Una de estas proteínas corresponde a la tiorredoxina, la cual responde al estrés oxidativo formando parte de mecanismos de respuesta bien caracterizados. La función que le debe el nombre a esta familia de proteínas es la reducción de puentes disulfuro, la cual puede devolverle la función a proteínas oxidadas bajo condiciones de estrés. Sin embargo, también llevan a cabo otras acciones

directas frente al estrés oxidativo las cuales incluyen la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el secuestro de singletes de oxígeno y radicales hidroxilo. Por otra parte, mediante su acción reductora de puentes disulfuro, también modifican la actividad de reguladores transcripcionales que intervienen en la expresión de genes relacionados al estrés oxidativo. De esta manera, además de su acción directa, las tiorredoxinas también cumplen una función indirecta importante frente al estrés oxidativo (Zeller and Klug 2006). La otra proteína que está relacionada con mecanismos de respuesta a estrés que se encontró mayormente expresada durante el crecimiento planctónico corresponde a la proteína Cj1172c, correspondiente a una proteína ortóloga de un regulador transcripcional del microaerófilo *Campylobacter jejuni*. Un estudio realizado sobre esta cepa reveló una mayor transcripción del gen *cj1172c* bajo estrés nitrosativo, en conjunto con otros genes relacionados a resistencia de estrés oxidativo (Monk et al. 2008).

Por último, el análisis proteómico mostró diferencias en la expresión génica de acuerdo a las características de ambas formas de crecimiento en cultivo. Por un lado se observó una mayor expresión de proteínas relacionadas a la replicación del ADN en el crecimiento planctónico, que se corresponde con la mayor división observada en este tipo de cultivos que se encuentran bajo estrés. En contrapartida, las únicas dos proteínas que se expresaron significativamente en mayor nivel durante el crecimiento agregado corresponden a la proteína ribosomal 30S y a la ATP sintetasa F1. Esto implica un mayor nivel de síntesis proteica y de energía, lo cual está en concordancia con un crecimiento no estresado.

### **Análisis del genoma de *Sediminibacterium* sp.**

En el genoma de *Sediminibacterium* sp. se hallaron tres copias de genes pertenecientes a la familia de proteínas Usp (las tres variantes fueron clasificadas como UspA). Esta familia de proteínas es importante en bacterias expuestas a variaciones ambientales, por lo general existen varias copias de estos genes por organismo. Bacterias parásitas con genomas pequeños, en los cuales la variación ambiental es mínima, generalmente no poseen copias de genes de la familia Usp (Kvint et al. 2003).

Otro aspecto a destacar del genoma de *Sediminibacterium* sp. es que posee una sola copia del gen de ARNr 16S. Esto nos permite inferir en los ensayos de PCR cuantitativa, que una copia detectada de este gen correspondería a la cuantificación de una célula de *Sediminibacterium* sp.

Por otra parte se detectó una mayor proporción de genes relacionados a mecanismos de defensa y replicación, reparación, y recombinación de ADN. Este hallazgo podría estar relacionado con la persistencia de esta cepa en la planta de tratamiento de efluentes petroquímicos. Los genes relacionados a mecanismos de defensa le permiten a las bacterias a sobrevivir en ambientes cambiantes. Por otro lado, un estudio de dinámica

genómica reveló la importancia de la transferencia horizontal de genes relacionados a la replicación, reparación, recombinación de ADN, en bacterias patógenas para superar la presencia de agentes estresantes que puedan dañar el ADN. En consecuencia, estos genes ayudarían a las bacterias a establecerse en ambientes hostiles (Ambur et al. 2009).

El constante avance en técnicas de secuenciación masiva, permite obtener secuencias genómicas en menos tiempo y a un menor costo. Actualmente, el número de cepas bacterianas secuenciadas está ascendiendo de manera exponencial. De esta manera, se abrió un nuevo campo de estudio relacionado a la genómica comparativa, de gran interés sobre todo en el estudio de cepas de una misma especie que muestran una patogenicidad diferencial (Muzzi and Donati 2011).

Las primeras observaciones mostraron que existe un genoma núcleo (*core genome*), compartido por la mayoría de las cepas de una especie, y otra parte del genoma variable (Mira and Martín-Cuadrado 2010). Interesantemente, la dinámica genómica parece estar regulada por componentes estocásticos y determinísticos, al igual que como vimos en el ensamblado de comunidades bacterianas. De esta manera, la presión de selección dada por el ambiente determinará el genoma núcleo, mientras que el genoma variable estaría dictaminado por eventos al azar (Dini-Andreote et al. 2012).

Queda como objetivo a futuro realizar un estudio comparativo del genoma de *Sediminibacterium* sp. y *Sediminibacterium salmoneum*, con el objetivo de estudiar la dinámica genómica de esta especie y analizar los genes presentes en las regiones compartidas y variables.

### ***Crecimiento planctónico vs agregado***

En este trabajo se observó la capacidad de *Sediminibacterium* sp. de crecer en forma agregada o planctónica, y se relacionó a esta última forma de crecimiento con un estado estresado del cultivo. Generalmente se postula que las formas de crecimiento agregadas o en biopelículas corresponden a estructuras de resistencia, en las cuales se observa una mayor expresión de genes relacionados al estrés (Resch et al. 2005; Schembri et al. 2003). Inversamente, en este trabajo se observó una mayor expresión de genes relacionados al estrés durante el crecimiento planctónico debido a la naturaleza microaerófila de *Sediminibacterium* sp. Durante el cultivo en condiciones aeróbicas, *Sediminibacterium* sp. se desarrolló de manera planctónica, y exhibió una expresión aumentada de genes relacionados al estrés oxidativo. La expresión de estos genes disminuyó ante el agregado de piruvato, que brinda protección frente al estrés oxidativo y en consecuencia desencadena la forma de crecimiento agregada. Por esta razón, planteamos que *Sediminibacterium* sp. en su ambiente natural se desarrolla de manera agregada ocupando un nicho microaerófilo dentro del *floc* biológico (Figura 35), y emerge de forma planctónica ante una mayor

exposición al oxígeno. De manera similar, bacterias pertenecientes al género *Leptospirillum* mostraron la capacidad de crecer en biopelículas ocupando nichos microaerófilos o de forma planctónica bajo aerobiosis, activando distintas rutas metabólicas para la obtención de energía (Moreno-Paz et al. 2010).

En cultivos estáticos de *Pseudomonas fluorescens* SBW25 se produce un crecimiento planctónico en el seno del líquido seguido de la aparición de una biopelícula que se aloja en la interfase aire-líquido donde la concentración de O<sub>2</sub> es mayor (Kozá et al. 2011). En este caso, el crecimiento en biopelícula aparece alrededor de los 5 días de cultivo y se atribuye a una variante génica capaz de sintetizar celulosa (Bantinaki et al. 2007). En los cultivos de *Sediminibacterium* sp., tanto el crecimiento agregado como el planctónico emergen en cuestión de horas, el cual no parece ser un tiempo razonable para corresponder al tiempo evolutivo necesario para aparición de una variante genética con una ventaja adaptativa. Además, las colonias de ambas formas de crecimiento de *Sediminibacterium* sp. exhibieron la misma morfología en placa, a diferencia de lo ocurrido para las variantes genéticas de *Pseudomonas fluorescens* SBW25, donde las colonias pertenecientes a la variante de crecimiento en biopelícula exhibieron una textura arrugada (*wrinkly*) característica (Spiers 2007).

Durante el crecimiento desmedido de bacterias planctónicas ante el incremento de la concentración de fenol reportado por Watanabe y colaboradores, una de las poblaciones mayoritarias de esta fracción sobrenadante correspondió a la cepa *Aquaspirillum delicatum* la cual mostró la capacidad de crecer en forma planctónica o agregada en medios suplementados con fenol (Watanabe et al. 1999).

A pesar de que en diversos filotipos bacterianos se atribuyeron las distintas formas de crecimiento a mutaciones en genes clave, la variación entre crecimiento planctónico y agregado en *Sediminibacterium* sp. no parece radicar en una diferencia génica. Una observación clave fue que las distintas formas de crecimiento de *Sediminibacterium* sp. mostraron reversibilidad, dirigiendo su forma de crecimiento exclusivamente por la adición o no de piruvato en el medio de cultivo.

En estudios posteriores intentaremos dilucidar los mecanismos de agregación de *Sediminibacterium* sp. No se observaron diferencias apreciables en el contenido de las EPS (ADN, proteínas y polisacáridos). Posiblemente algún otro tipo de macromolécula esté mediando la agregación, o bien la regulación de la hidrofobicidad de la membrana. Por otra parte, también es interesante estudiar a futuro, los mecanismos moleculares que desencadenan el crecimiento planctónico o agregado, y su relación con el estrés oxidativo. El estudio de esta cepa, podría servir como modelo para el avance en los conocimientos relativos a la agregación bacteriana, la cual suscita un gran interés biotecnológico.

## **Crecimiento planctónico como respuesta a estrés**

En este trabajo se detectó el crecimiento excesivo en forma planctónica de una población bacteriana luego de *shocks* térmicos y de fenol. Este crecimiento se traduce en un incremento considerable de la cantidad de sólidos suspendidos, afectando notablemente la calidad del efluente tratado.

El crecimiento masivo de *Sediminibacterium* sp. podría deberse a un cambio en el ambiente que le provea una ventaja nutricional. En los experimentos realizados por Watanabe y colaboradores en reactores sometidos a concentraciones crecientes de fenol, las poblaciones mayoritarias encontradas en la fracción planctónica corresponden a cepas que degradan fenol. Por este motivo, postularon que esta ventaja nutricional les permite competir favorablemente y prevalecer sobre las poblaciones floculentas (Watanabe et al. 1999). Sin embargo, en este trabajo el crecimiento excesivo de *Sediminibacterium* sp. también se observa luego del tratamiento térmico. Asimismo, si bien los cultivos de *Sediminibacterium* sp. mostraron cierta resistencia al fenol, en el genoma no se han encontrado genes que codifiquen enzimas involucradas en la ruta metabólica de degradación de este compuesto, por lo cual se descarta la posibilidad de su utilización como fuente de carbono y energía. También hay que destacar que las bacterias del género *Thauera* se conocen como buenas degradadoras de compuestos orgánicos, entre ellos el fenol (Silva et al. 2013), sin embargo no se estimuló su crecimiento luego del *shock* de fenol ya que prácticamente se perdieron del sistema.

Por el contrario, el aislamiento de *Sediminibacterium* sp., y el posterior análisis proteómico de ambas formas de crecimiento, nos permitieron aseverar que el crecimiento excesivo en forma planctónica se debe a una forma de resistencia a estrés. Un mecanismo de reproducción masiva como respuesta a estrés se describió en bacterias marinas. Cultivos de un *Vibrio* marino (Ant-300) en baja densidad celular sometidos a inanición, mostraron un aumento repentino en el número celular ante el agregado de nutrientes en baja concentración. Este incremento en el número celular no se consideró un verdadero crecimiento ya que no implicó un aumento sustancial en la cantidad biomasa (Novitsky and Morita 1978). Por esta razón, las células observadas, con un tamaño celular 11 veces menor al normal, se consideraron estructuras relacionadas a estrés (Novitsky and Morita 1976).

También se reconoce el efecto positivo de la densidad poblacional frente al estrés oxidativo, el cual estaría explicado por el aumento en la tasa de respiración que disminuye la concentración de oxígeno local (Krieg and Hoffman 1986). De esta manera, un aumento repentino en el número celular podría implicar un mecanismo de respuesta a estrés.

En el caso de *Sediminibacterium* sp., además de reproducirse masivamente, el hecho de

hacerlo en forma planctónica le permitiría a esta cepa difundir más eficientemente para luego establecerse en un ambiente más favorable, mediante los mecanismos de adhesión involucrados en el crecimiento agregado. Un método similar de resistencia y escape fue propuesto en *Escherichia coli*, donde se analizó el efecto de los genes de la familia *usp* en la resistencia a estrés, motilidad, y adhesión. La expresión de estos genes, además de conferir resistencia bajo distintas condiciones estresantes, son necesarios para autoagregación y motilidad de *Escherichia coli*. Se observó que mutantes de UspC y UspE no fueron capaces de sintetizar flagelos y disminuyeron la expresión de la proteína extracelular Ag43, proteína clave para autoagregación de *Escherichia coli* (Nachin et al. 2005). En observaciones de *Sediminibacterium* sp. mediante de microscopía electrónica de barrido, no se visualizaron flagelos, como tampoco se identificaron genes involucrados en la síntesis de los mismos en el genoma, por lo cual se descarta un mecanismo de motilidad regulado por Usp. Sin embargo, se observó una clara correspondencia entre la expresión de una proteína perteneciente a la familia de UspA y la autoagregación, aunque en este caso inversa. De manera similar a lo que ocurre en *Escherichia coli*, esta proteína de resistencia a estrés identificada en *Sediminibacterium* sp. podría tener implicancia en la expresión de genes relacionados en la agregación o adhesión de esta cepa, a pesar de que no se encontraron genes ortólogos de UspC, UspE ni Ag43. Otro ejemplo de la relación en la expresión de una proteína Usp y la agregación, aunque también inversa a la observada aquí, fue determinada a través del estudio de mutantes defectivos del gen *uspA* de *Porphyromonas gingivalis*, los cuales fueron más susceptibles al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y disminuyeron considerablemente su capacidad de formar biopelículas (Chen et al. 2006).

### ***Estrés directo o indirecto de Sediminibacterium sp.***

El crecimiento planctónico bajo estrés oxidativo descrito en cultivos puros de *Sediminibacterium* sp., posee similitudes respecto al crecimiento de *Sediminibacterium* sp. observado luego de los *shocks* térmicos y de fenol en los reactores a escala de laboratorio. Además de conservar la característica fundamental de crecer en solución, tanto en los reactores como en cultivos puros, se registró el crecimiento excesivo característico de la forma de crecimiento planctónica. En consecuencia, postulamos que el crecimiento planctónico de *Sediminibacterium* sp. en los reactores está relacionado con una respuesta a estrés luego de los *shocks* térmicos o de fenol.

A menudo, la respuesta de cultivos bacterianos frente a la exposición subletal con fenol (Roma-Rodriguez et al. 2010) o calor, desencadena una respuesta propia del estrés oxidativo, induciendo la expresión de proteínas relacionadas con tal fenómeno (Christman et al. 1985). Existe la posibilidad de que el *shock* al que se someten los reactores influya directamente en el estado estresado de *Sediminibacterium* sp., que induce su crecimiento

masivo y de forma planctónica. Sin embargo, los cultivos puros de *Sediminibacterium* sp. sometidos a concentraciones crecientes de fenol o a *shocks* térmicos no mostraron este tipo de respuesta.

Hay que destacar que tampoco se observó una respuesta directa a agentes promotores del estrés oxidativo, como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el paraquat, a pesar de la observación de la influencia del estrés oxidativo intrínseco de las condiciones de cultivo aeróbicas. La suplementación con piruvato fue determinante para evitar dicho estrés oxidativo y el consecuente desencadenamiento del crecimiento planctónico. Por consiguiente, todas las pruebas de estrés sobre cultivos puros de *Sediminibacterium* sp. tuvieron que realizarse en medios suplementados con este agente protector, lo cual podría estar enmascarando el efecto real del estrés ensayado. De esta manera, no podemos descartar la acción directa de agentes tóxicos sobre *Sediminibacterium* sp.

En reactores basados en barros activados, existe una correspondencia entre el tamaño del *floc* y la resistencia a agentes tóxicos (Henriques and Love 2007). Por lo tanto, ante un evento de desfloculación masiva, las bacterias de *Sediminibacterium* sp. están más expuestas a estos compuestos de los cuales normalmente se encuentran protegidas, y por ende podrían responder a este estrés reproduciéndose masivamente. Las imágenes de FISH muestran que la población de *Sediminibacterium* sp. se encuentra mayormente en la sección interna del *floc*, posiblemente ocupando un nicho microaerófilico dentro del mismo (Figura 35). Por esta razón, postulamos que el desprendimiento de *Sediminibacterium* sp. luego del *shock* es independiente de su localización específica en el mismo, y se debe fundamentalmente a un mecanismo de respuesta a estrés que involucra la acción indirecta del agente desfloculante al aumentar su exposición a condiciones aeróbicas. La fragmentación masiva observada, sin dudas expone repentinamente a las poblaciones de *Sediminibacterium* sp. a concentraciones de oxígeno prácticamente equivalentes a las correspondientes al líquido, lo cual condiciona a estas bacterias microaerófilicas a un estrés oxidativo considerable que desencadena el mecanismo de respuesta.

A pesar los altos niveles de oxígeno disuelto en los cuales operan las plantas de tratamiento de efluentes basados en barros activados, se demostró la presencia de bacterias anaeróbicas inmersas dentro del *floc* que llevan a cabo reacciones claves para el tratamiento de aguas residuales. Mediante el empleo de microsensores se determinó la presencia de un gradiente de oxígeno decreciente desde la periferia hasta el centro de un *floc* biológico, quedando demostrada la existencia de nichos anóxicos en los cuales se detectaron poblaciones de bacterias desnitrificantes y reductoras de sulfato mediante FISH (Schramm et al. 1999). En otro trabajo en donde se reconstruyeron genomas enteros de cepas sin cultivar relacionadas al filo TM7 presentes en barros activados, se detectó mediante FISH que estas poblaciones ocupan regiones internas del *floc* que le proveen condiciones microaerófilicas (Albertsen et al. 2013). De la misma manera, las poblaciones de

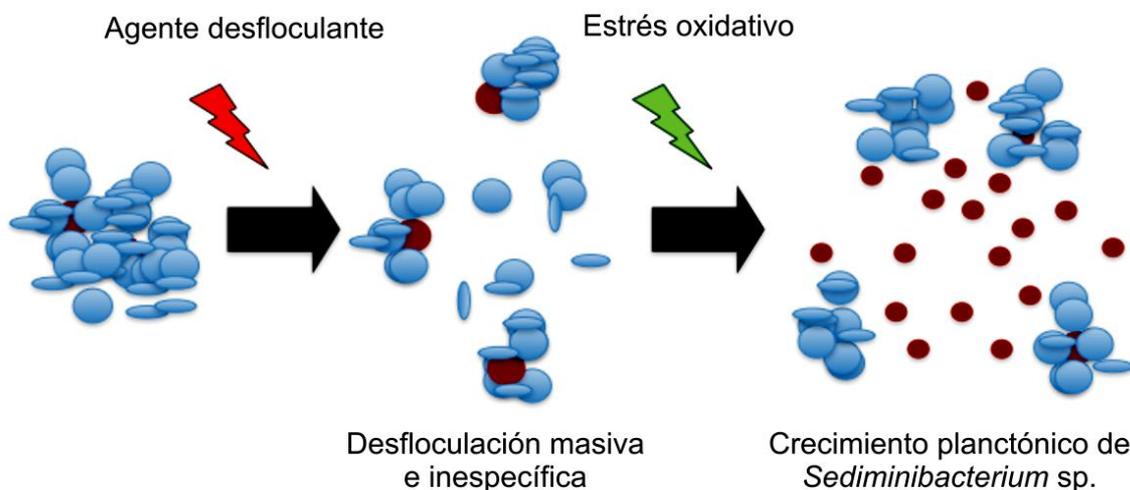
*Sediminibacterium* sp. pueden ocupar regiones internas del *floc* distantes de la periferia de acuerdo a sus necesidades de oxígeno.

Los altos niveles de oxígeno disuelto que establecen en las plantas de tratamiento de efluentes basadas en barros activados pueden implicar un estrés oxidativo en las bacterias que conforman el sistema. De hecho, se detectó que la enzima superóxido dismutasa, de conocida acción protectora frente al estrés oxidativo, es una de las proteínas extracelulares más abundantes en la biomasa de una planta de tratamiento de efluentes a escala real (Park et al. 2008). En un estudio más amplio, se halló que el grupo de proteínas mayormente representado en barros de reactores diseñados para la eliminación de fósforo, está relacionado con respuestas a estrés. Los cambios cíclicos entre condiciones aeróbicas y anóxicas que implica este sistema sería el motivo de esta respuesta. Entre las proteínas identificadas se incluyen dos tipos de peroxirredoxinas, tiorredoxina, y diversas chaperonas (Wilmes et al. 2008).

En definitiva, la desfloculación masiva no sólo implica una mayor exposición al oxígeno u otros compuestos tóxicos, sino que también altera la matriz extracelular donde podrían hallarse enzimas protectoras frente al estrés oxidativo, y de esta manera podría afectar a las poblaciones más susceptibles como *Sediminibacterium* sp.

### **Modelo de crecimiento planctónico como respuesta a estrés en barros activados**

A partir de estas observaciones proponemos un modelo de desfloculación que incluye dos fases: la desfloculación masiva e inespecífica por parte de un agente externo químico o físico, y el posterior crecimiento en forma planctónica de poblaciones del *floc* ante la respuesta a estrés oxidativo (Figura 41).



**Figura 41.** Modelo de crecimiento planctónico inducido por estrés luego de un evento de desfloculación masiva. Las esferas azules corresponden a las bacterias del *floc*, mientras que las marrones representan a la población de *Sediminibacterium* sp.

Bacterias del género *Sediminibacterium* no están presentes en todos los sistemas de barros activados. Sin embargo, el mecanismo indirecto de respuesta a estrés oxidativo aquí propuesto para *Sediminibacterium* sp., podría extenderse a otras poblaciones microaerófilas que forman parte del *floc* biológico. Como ya discutimos, las dificultades existentes en realizar aislamientos bacterianos y en la determinación de la naturaleza microaerófila de filotipos presentes en barros activados podrían implicar que la abundancia de este tipo de bacterias sea mayor al estipulado. Prácticamente no existen reportes sobre el estudio de poblaciones microaerófilas de barros activados, solamente unos pocos estudios se remiten al aislamiento de ambientes naturales, en los cuales se destacó su abundancia.

Por ejemplo se determinó que el comportamiento de LSRMB reportado por Mazumder fue observado en 10–54 % de los aislamientos realizados a partir de una gran diversidad de muestras de agua de lagos, suelos, y barros activados (Mazumder et al. 2000). Por otra parte, en un estudio de aislamientos realizados a partir de aguas subterráneas contaminadas con clorofenol en el Sur de Finlandia, se encontró que la mayoría de las bacterias aisladas fueron microaerófilas, de las cuales más de la mitad fueron catalasa negativas y particularmente sensibles al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Männistö and Puhakka 2002). Esta predominancia de bacterias catalasa negativas en el suelo, reportada tiempo atrás, también puede ser un indicador de la subestimación de las poblaciones bacterianas microaerófilas en este ambiente (Gledhill and Casida 1969; Labeda et al. 1974).

La diversidad bacteriana observada en plantas de tratamiento de efluentes basadas en barros activados proviene en gran medida del ambiente. Por ende, la abundancia de bacterias microaerófilas en diversos ambientes permite pensar la posibilidad de que este tipo de bacterias están ocupando nichos microaerófilos en el *floc* biológico de barros activados en una proporción mayor a la que se cree. El único reporte existente sobre el estudio de la fisiología de aislamientos bacterianos realizados a partir de muestras de barros activados, corresponde a un trabajo de tesis realizado en la Universidad de Clemson, en el cual se caracterizaron las propiedades de autoagregación de 197 aislamientos. El medio de cultivo empleado consistió básicamente en peptona, y no contó con piruvato ni otro agente protector frente al estrés oxidativo dentro de su composición. Es interesante notar que el 65 % de los aislamientos tuvo capacidades intermedias de autoagregación (Chen 2007). Generalmente el índice de autoagregación decreció debido a la aparición posterior de crecimiento planctónico, de manera similar a lo observado en cultivos de *Sediminibacterium* sin piruvato. En ese trabajo no se advirtió que las propiedades de autoagregación pueden depender fuertemente de las condiciones de cultivo, como vimos en nuestros experimentos. Teniendo en cuenta que la mayoría de los aislamientos podría ser

microaerófilo, sería interesante determinar si la coexistencia del crecimiento planctónico y agregado observado en la mayoría de estos aislamientos se modifica ante la suplementación con piruvato. Esta determinación sería clave para establecer si el mecanismo de crecimiento planctónico como respuesta a estrés en barros activados es un mecanismo general de bacterias microaerófilas o solamente está asociado a bacterias relacionadas filogenéticamente con *Sediminibacterium* sp.

En lo que respecta al manejo de plantas de tratamiento, siempre se prioriza tener valores de oxígeno disueltos suficientes para que se puedan llevar a cabo las reacciones aerobias de degradación. Además, están reportados eventos de desfloculación frente a niveles bajos de oxígeno, asociados al detrimento de la actividad metabólica (Wilén et al. 2000a; Zhang 2008). Muchas veces el control de este parámetro es deficiente, por lo que se tienen valores de oxígeno disuelto por exceso. De acuerdo al modelo propuesto, se deberían tomar como posibles medidas disminuir los niveles de oxígeno o la adicionar agentes protectores, sobretodo ante eventos de desfloculación masiva. De esta manera se podría evitar el crecimiento planctónico desmedido como respuesta al estrés oxidativo, el cual incrementa notablemente la concentración de sólidos en la fracción sobrenadante y disminuye la calidad del efluente tratado.

## CONCLUSIONES

Identificamos una cepa del género *Sediminibacterium*, que forma parte del *floc* estable en plantas de tratamiento de efluentes petroquímicos, y que activa un crecimiento en forma planctónica ante un evento de desfloculación masiva, incrementando notablemente la cantidad de sólidos en el efluente tratado. De esta manera, propusimos un mecanismo novedoso de desfloculación, que incluye el crecimiento planctónico de bacterias microaerófilas que normalmente forman parte del *floc* como respuesta a estrés oxidativo, lo cual tiene un efecto negativo sobre el tratamiento basado en barros activados.

Por otra parte, detectamos por primera vez el efecto del piruvato sobre la autoagregación de un cultivo bacteriano, el cual estaría relacionado con la protección frente al estrés oxidativo. Mediante un análisis proteogenómico determinamos que la forma de crecimiento planctónica sobreexpresa varias proteínas de respuesta a estrés. En consecuencia, la respuesta a estrés oxidativo podría desencadenar un mecanismo activo de propagación, en el cual esta forma resistente puede ser útil para difundir y colonizar un ambiente favorable donde se pueda desarrollar de forma agregada.

Queda como objetivo a futuro describir en detalle los mecanismos de agregación y respuesta a estrés de *Sediminibacterium* sp., el cual podría servir como modelo para avanzar en los conocimientos de la agregación bacteriana, que atrae un gran interés biotecnológico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ***Reactores a escala de laboratorio***

#### Dinámica de formación del *floc*

Se estudió la dinámica de formación del *floc* biológico empleando reactores a escala de laboratorio que simulan el funcionamiento de una planta de tratamiento de efluentes basada en barros activados.

Se realizaron tres experimentos independientes, los cuales comprendieron a los reactores denominados A, B y C.

El esquema de funcionamiento de los reactores fue equivalente para los tres experimentos, la diferencia entre los mismos se estableció en que fueron inoculados con distintas muestras de barros activados. Las muestras de barro, con una concentración de sólidos totales de aproximadamente 5 g/l, se tomaron de cámaras de aireación de una planta de tratamiento de efluentes domésticos y de tres plantas que tratan efluentes industriales (alimenticia, textil y petroquímica). Seguidamente, se transportaron al laboratorio en frascos de vidrio (dejando una cámara de aire para prevenir anaerobiosis) en un lapso menor a las dos horas.

Debido a que se pretendió estudiar la dinámica de la floculación, fue necesario disgregar los *flocs* de barros activados durante la aclimatación de la biomasa para enriquecer a la misma en poblaciones planctónicas. Se tomaron 150 ml de barro, los cuales se agitaron vigorosamente y se mezclaron con 150 ml de medio *Synthetic Sewage* (SS) 2X estéril (ver Anexo III). Luego se incubó a 25°C y se agregó diariamente durante 3 días 200 ml de SS 2X estéril, sin eliminación de biomasa.

Para iniciar el experimento, se tomaron 4 alícuotas de 200 ml de la suspensión de biomasa no floculenta y se emplearon para inocular 4 reactores replicados con 600 ml de medio SS estéril (concentración final 1X). Se conservaron muestras de esta suspensión de biomasa inoculante para diversos análisis.

Los reactores con 800 ml de volumen útil se montaron sobre una plataforma de agitación magnética, la cual se estableció en 250 rpm, y dentro de una cabina cerrada (Aqualytic) con control de la temperatura a  $20\pm 1^\circ\text{C}$ . Además, los reactores se airearon con difusores y se alimentaron con medio SS 1X esterilizado empleando una bomba peristáltica automatizada (Figura 42).

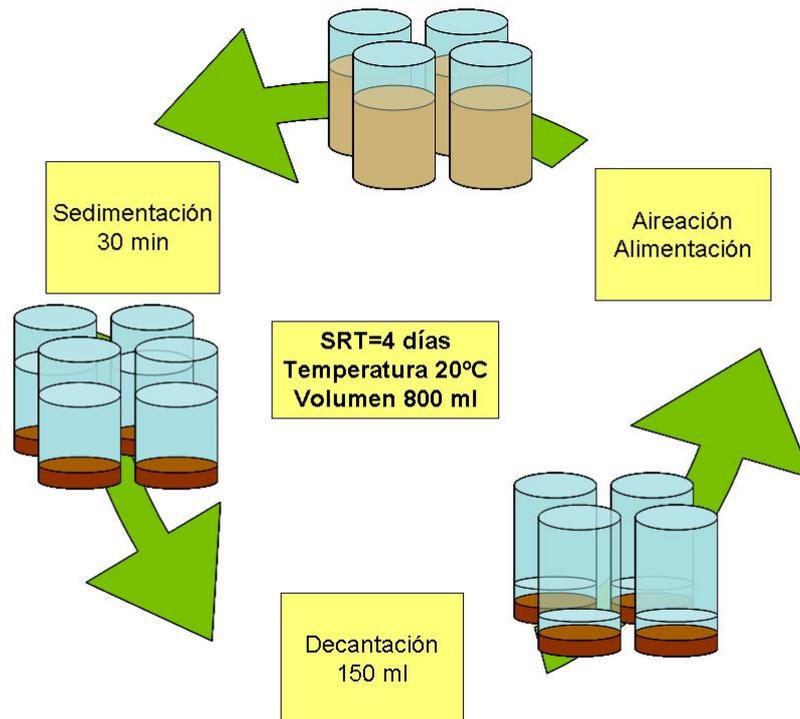
Los reactores se operaron durante 40 días bajo el modo de *batch* secuencial, en el cual la retención de biomasa se lleva a cabo en el mismo reactor y no en un sedimentador aparte. Esta configuración, descrita en la Figura 43, consta de tres pasos

1. Sedimentación: La aireación y la agitación magnética se detuvo una vez por día

- durante 30 minutos para llevar a cabo la sedimentación del barro.
2. Decantación: 150 ml de sobrenadante clarificado fueron decantados manualmente.
  3. Aireación y alimentación: Al reanudarse el mezclado y la aireación cada reactor fue alimentado separadamente con 350 ml de medio SS esterilizado. Los reactores A se alimentaron continuamente con un flujo de 0,3 ml/min, mientras que los reactores B y C fueron alimentados mediante 6 pulsos de 30 minutos separados por 3 horas con un flujo de 2 ml/min, siempre empleando una bomba peristáltica automatizada.



**Figura 42.** Reactores a escala de laboratorio empleados en este estudio. Los reactores se encuentran dentro de una cámara termostatzada, dispuestos sobre una plataforma con agitación magnética. También se observa el sistema automatizado de aireación y alimentación.



**Figura 43.** Esquema de funcionamiento de los reactores a escala de laboratorio. Un ciclo diario incluye los pasos de sedimentación, decantación y alimentación.

El cambio de una alimentación continua hacia una alimentación pulsada, se realizó para evitar el crecimiento de bacterias filamentosas. De todas formas en los tres experimentos el caudal de alimentación por ciclo fue de 350 ml/día. En consiguiente, el tiempo de retención hidráulico (HRT, del inglés *hydraulic retention time*) que resulta de la división del volumen del reactor (800 ml) y del caudal de ingreso (el cual equivale al caudal de salida del efluente tratado y aquí corresponde a 350 ml/día) fue de 2,3 días (54 horas).

$$HTR = V_r / Q$$

Donde,

**V<sub>r</sub>** = volumen del reactor

**Q** = Caudal de ingreso (alimentación) o salida (efluente tratado)

Hacia el final del paso de alimentación (más aireación) se extrajeron cada día 200 ml de barro. La cantidad de barro que se elimina del sistema en cada ciclo determina el tiempo de retención celular o tiempo de retención de sólidos (SRT, del inglés *solids retention time*), que

está dado por la siguiente fórmula:

$$\text{SRT} = V_r X_r / Q_p X_p$$

Donde,

**V<sub>r</sub>** = Volumen de reactor

**X<sub>r</sub>** = Concentración de sólidos en el reactor

**Q<sub>p</sub>** = Caudal de purga

**X<sub>p</sub>** = Concentración de sólidos en la purga

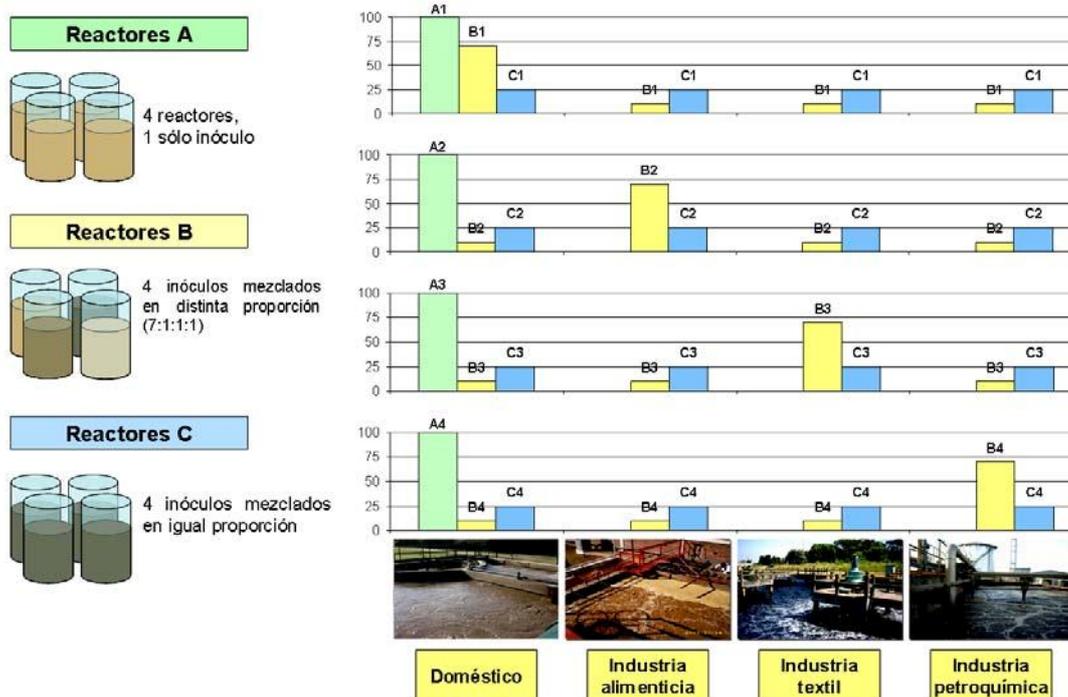
Considerando que la mezcla del barro es homogénea y por ende la concentración de sólidos en el reactor y en la purga es equivalente, el tiempo de retención de sólidos resultará de la división del volumen del reactor (800 ml) y del caudal de purga (200 ml/día), por lo cual fue de 4 días. En consiguiente cada experimento de 40 días comprende una duración equivalente a 10 veces el tiempo de retención celular.

Las muestras se tomaron durante la purga en intervalos regulares de 3 días, se centrifugaron a 7.000 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se congelaron en nitrógeno líquido para luego conservarlas a -70°C hasta su análisis.

Como se mencionó anteriormente, cada tipo de reactor se inoculó con distintas muestras de barro. Los reactores A se inocularon con una única muestra de barro, obtenida de la cámara de aireación de una planta de tratamiento de efluentes domésticos. En cambio, los reactores B y C se inocularon con una mezcla de barros de esta misma planta de tratamiento de efluentes domésticos y tres industriales: una planta de tratamiento de efluentes de procesado de alimentos para mascotas, una textil y una petroquímica. Las cuatro plantas se sitúan en la provincia de Buenos Aires, y en la Tabla 8 se describen los parámetros clave de funcionamiento de las mismas. La diferencia entre los reactores B y C radica en los diferentes porcentajes de los cuatro tipos de barros que inoculan a los reactores. Cada uno de los cuatro reactores B contiene un 70 % de un tipo de barro y 10 % de cada uno de los restantes, en consiguiente no se consideran réplicas. Por otra parte los reactores C (al igual que los A) están cuadruplicados, conteniendo un 25 % de cada barro en los cuatro reactores Figura 44.

**Tabla 8.** Detalles de funcionamiento de las plantas de tratamiento de efluentes de las cuales se tomaron muestras de barro para inocular los reactores a escala de laboratorio.

Tipo de Efluente	Doméstico	Alimenticia	Textil	Petroquímica
Flujo diario (m <sup>3</sup> /h)	700	96	3400	4300
DOB influente (mg/l)	350	1200	400	220
Concentración de sólidos	2500	2350	1950	3400
HRT (h)	12	60	32	30
SRT (d)	16	10	23	49
DOB efluente (mg/l)	28	35	25	46



**Figura 44.** Esquema que detalla el porcentaje de los distintos barros extraídos de plantas que tratan distintos tipos de efluentes (domésticos, industria alimenticia, industria textil, industria petroquímica) que se emplearon para inocular los reactores a escala de laboratorio correspondientes a los tres experimentos realizados (A, B y C).

## Experimento de desfloculación

Para el análisis del efecto de cambios bruscos de temperatura o concentración de fenol sobre la integridad del *floc* biológico, se empleó el mismo sistema de reactores a escala de laboratorio utilizado en el estudio de la dinámica de formación del *floc*. En este caso, el barro elegido para inocular los reactores fue el procedente de la planta de tratamiento de efluentes petroquímicos, debido a que habitualmente en este tipo de efluentes se dan con mayor asiduidad fluctuaciones térmicas y de concentración de fenol.

Se emplearon 800 ml de barro (con una concentración de sólidos de aproximadamente 5 g/l), el cual se diluyó 4 veces con medio SS (concentración final 1X) y se dividió en 4 reactores replicados, dispuestos en una cabina cerrada (Aqualytic) con control de la temperatura a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Los reactores se operaron durante 16 días bajo el modo de *batch* secuencial con retención de biomasa. La aireación y la agitación magnética se detuvo una vez por día durante 60 minutos para llevar a cabo la sedimentación del barro, luego 310 ml de sobrenadante clarificado fueron decantados manualmente. Al reanudarse el mezclado y la aireación cada reactor fue alimentado separadamente con

350 ml de medio SS esterilizado (suplementado con 100 mg de fenol), el cual se dosificó mediante 6 pulsos de 30 minutos separados por 3 horas con un flujo de 2 ml/min. Luego se extrajeron cada día 40 ml de barro, de forma que el tiempo de retención de sólidos fue de 20 días. En este caso se eligió un tiempo de retención celular alto para minimizar los cambios poblacionales independientes del *shock* a realizar.

En el día 9 de operación, luego del paso de decantación, dos reactores (reactores A) fueron sometidos térmicamente alimentando con un pulso de 350 ml de medio SS 0,25 X a  $80^\circ\text{C}$  (la temperatura en el interior de los reactores alcanzó los  $50^\circ\text{C}$ ). Los otros dos reactores (reactores B) fueron expuestos a un *shock* de fenol alimentando con un pulso de 350 ml de medio SS 0,25 X suplementado con 1 g de fenol (resultando una concentración final en el reactor de 1,25 g/l). Nótese que se empleó una concentración baja de medio SS (0,25 X) para evitar un *shock* de nutrientes en los reactores.

La toma de muestras se realizó los días -1, +1 y +7 respecto del *shock* (correspondientes a los días 8, 10 y 16 del experimento). Para los análisis de ADN, las muestras de *floc* fueron tomadas de la purga a partir de 500  $\mu\text{l}$  de mezcla. En cambio, las muestras de sobrenadante fueron tomadas del paso de decantación, a partir de 100 ml de efluente clarificado. Las muestras se centrifugaron, se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

Adicionalmente se conservaron muestras en glicerol (25 % final) a -70°C para aislamientos, como así también se fijaron muestras con paraformaldehído 4 % y se guardaron a -20°C para análisis de FISH.

### **Análisis del tamaño del floc biológico**

Los *flocs* se visualizaron en un microscopio de BX41 (Olympus) empleando luz blanca, o alternativamente por fluorescencia utilizando el kit de tinción LIVE/DEAD *BacLight* (Invitrogen) para determinar viabilidad.

Para cada muestra analizada, se examinaron 100 *flocs* al azar. El área de cada *floc* se determinó delimitando manualmente la superficie del mismo mediante la herramienta *freehand* en el programa ImageJ ([rsbweb.nih.gov/ij/](http://rsbweb.nih.gov/ij/)). Luego se convirtió cada valor de área al valor correspondiente de diámetro asumiendo una forma circular del *floc*. Durante el estudio de la dinámica de formación del *floc* se estableció el promedio de del tamaño del *floc* en cada muestra y se calculó el error estándar asociado a la medición.

Por otra parte, para visualizar el efecto de agentes desfloculantes, se realizó un análisis de la distribución de tamaños de la población de *flocs* de distintas muestras. Cada uno de los 100 *flocs* medidos fue clasificado de acuerdo a su tamaño, obteniéndose así el porcentaje de *flocs* presentes en los distintos rangos establecidos. Para simplificar la comparación entre muestras, se promediaron los valores de porcentajes obtenidos entre los dos reactores replicados de cada tipo, y se calculó el error estándar asociado (n=2).

### **Parámetros funcionales**

Las mediciones de DQO se realizaron con kit IMPEC, bajo recomendaciones del fabricante. Se realizó la medición de la DQO del medio de cultivo empleado para alimentar los reactores, el cual correspondió a un valor promedio de 662 mg/L. De esta forma los resultados expresados en porcentaje de remoción de DQO se refieren a la diferencia porcentual respecto a este valor.

Los valores de turbidez del sobrenadante se obtuvieron a partir de la medición de la A<sub>600</sub> de una muestra representativa del líquido decantado en cada ciclo de los reactores. Los sólidos totales corresponden a valores de peso seco de las muestras de purga. Se tomaron 1 ml de muestra los cuales se secaron en horno hasta peso constante.

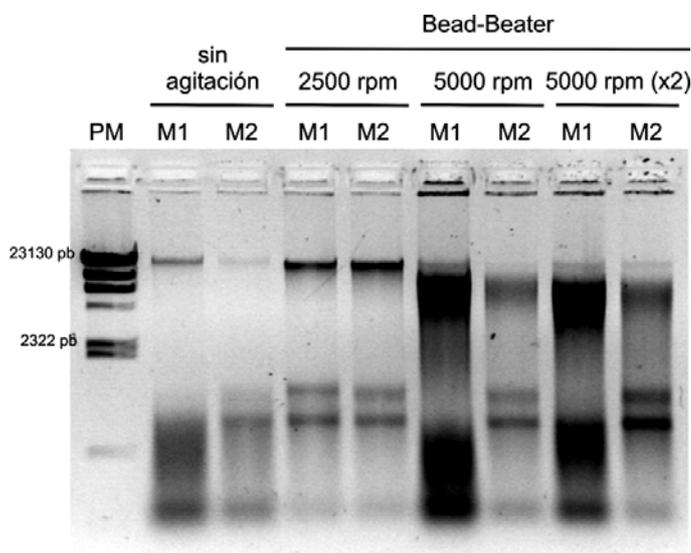
### **Extracción de ADN-ARN**

Se aplicó un protocolo para extraer conjuntamente ADN y ARN de las muestras. Todos los materiales y soluciones empleadas fueron libres de ARNasa.

Los *pellets* de biomasa, tanto de muestras de barro como de cultivos puros, se resuspendieron en 500  $\mu$ l de *buffer* Tris-EDTA (TE) pH 8,0 y se transfirieron a tubos de 2 ml con tapa a rosca con 0,5 g de bolitas de zirconia (Biospec Products). Inmediatamente se adicionaron 250  $\mu$ l de fenol equilibrado con *buffer* TE pH 8, 250  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y 50  $\mu$ l de dodecilsulfato de sodio (SDS) 10 %. Las células se lisaron físicamente mediante agitación a 2500 rpm durante 30 segundos en *Bead Beater* (Biospec Products) y se colocaron inmediatamente en hielo. Alternativamente, en las muestras correspondientes a los reactores de desfloculación, se empleó el equipo Precellys (Bertin Technologies) para lisar simultáneamente todas las muestras en frío.

La velocidad de agitación se eligió luego de probar distintas condiciones en dos muestras aleatorias, en la Figura 45 se observa que con un solo pulso de 30 segundos a 2500 rpm se maximiza la extracción y se minimiza la degradación de los ácidos nucleicos (principalmente ADN). Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 16.100 g, se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se realizó una re-extracción por duplicado con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). A partir de los 150  $\mu$ l de solución resultante, se precipitaron los ácidos nucleicos con 2 volúmenes (300  $\mu$ l) de etanol 100 % y 0,1 volúmenes (15  $\mu$ l) de acetato de sodio 3 M pH 5,2; se mantuvo a -20°C durante 2 horas y se centrifugó durante 40 minutos a 16.100 g. Luego, se realizaron dos lavados con etanol 70 %, se dejó secar el *pellet* bajo lámpara y se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. La integridad del ADN y ARN se corroboró mediante la corrida en geles de agarosa 1 %.

Finalmente, alícuotas de esta solución fueron tratadas alternativamente con ARNasa o ADNasa para obtener soluciones de ADN o ARN respectivamente.



**Figura 45.** Extracción simultánea de ADN-ARN, empleando distintas condiciones de agitación durante el paso de lisis celular. PM: Peso molecular (marcador  $\lambda$  Hind III). M1 y M2: extracciones de ADN/ARN de muestras de barro de reactores a escala de laboratorio replicados.

### ***Tratamiento con ARNasa A libre de ADNasa***

Para la obtención de muestras de ADN, alícuotas de 10 µl de ADN/ARN se trataron con ARNasa A libre de ADNasa (Sigma) en una concentración final de 10 µg/ml durante 1,5 horas a 37°C.

### ***Tratamiento con ADNasa RQ1 libre de ARNasa***

Las muestras de ARN resultan del tratamiento con ADNasa RQ1 libre de ARNasa (Promega). Cada tubo de reacción de 25 µl consistió en 10 µl de ADN/ARN, 1 µl de *buffer* de reacción 10 X, 0,5 U de ADNasa RQ1 y agua libre de nucleasas. La digestión se realizó durante 1 hora a 37°C, y se detuvo con un paso a 65°C durante 10 minutos.

### ***Transcripción reversa del ARN***

Cada reacción para la síntesis de ADNc contuvo 4 µL de *buffer* 5X (Promega), 20 µM de dNTPs, 0,6 µM de cebador R534, 5 µL de solución de ARN y agua libre de nucleasas hasta un volumen de 20 µl. Esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos para desnaturalizar la estructura secundaria del ARN y luego se pasó a 37°C etapa en la cual luego de 10 minutos se agregó 1 µl de Retrotranscriptasa MMLV (Promega) y se dejó incubando durante 50 minutos adicionales. La reacción concluyó con un paso de 10 minutos a 72°C.

En todos los ensayos se incluyeron controles sin molde, y con molde de ARN pero sin RT (para descartar amplificación a partir de ADN).

### ***Amplificación de genes de ARN ribosomal 16S***

La reacción se llevó a cabo en 50 µl con 5 µl de *buffer* Taq polimerasa 10 X (Invitrogen), enzima Taq polimerasa (Invitrogen) 1,25 U, dimetilsulfóxido 5 %, dNTPs 0,2 mM de cada uno, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, BSA 0,1 µg/ml, cada cebador en una concentración de 0,1 µM, y 5 µl de una dilución 1/20 de ADNc o alternativamente 1/50-100 de ADN genómico (entre 2-100 ng aproximadamente). El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación a 55°C y 45 segundos de extensión a 72°C, con un paso de extensión final de 10 minutos a 72°C. Se llevó a cabo la amplificación total del fragmento de 193 pb correspondiente al dominio hipervariable V3 del gen de ARN ribosomal 16S empleando los cebadores F341-GC y R534. La incorporación de una secuencia rica en GC en el cebador directo se utilizó para evitar la desnaturalización completa durante la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (Muyzer et al. 1993).

La cantidad y tamaño de los amplicones obtenidos se verificó mediante la corrida en geles de agarosa 2 %.

### ***Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)***

Empleando la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante, los fragmentos amplificados de 193 pb se separaron de acuerdo a su contenido de GC. Durante la electroforesis, las moléculas de ADN se disocian parcialmente por la acción del desnaturalizante, viéndose afectada su movilidad. La desnaturalización del ADN depende de su contenido de GC, por lo tanto se llevará a cabo una desnaturalización diferencial de los amplicones en distintas regiones del gel a lo largo del gradiente de concentración de formamida-urea. Generalmente las distintas secuencias amplificadas, se corresponden con una variabilidad en el porcentaje de GC, por ende cada banda visualizada en los geles de DGGE se asocia a un taxón, y su intensidad se relaciona directamente con su abundancia relativa.

En el estudio de la dinámica de formación del *floc* biológico nos enfocamos en el análisis de las poblaciones bacterianas metabólicamente activas, por lo tanto se realizó una amplificación del ARNr 16S total, lo que requiere una retrotranscripción total a partir del ARN extraído y la posterior amplificación.

Por otro lado, para efectuar el análisis de las poblaciones bacterianas que muestran un desprendimiento distintivo del *floc* luego de *shocks* térmicos o de fenol, se realizó directamente la amplificación total a partir de muestras de ADN, ya que en este caso el objetivo fue caracterizar las poblaciones bacterianas que muestran este comportamiento más allá de su estado metabólico.

La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante se realizó de acuerdo a los procedimientos establecidos por Muyzer y colaboradores (Muyzer et al. 1993). 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), utilizando un armador de gradiente (Hoefler Scientific Instruments). Los productos de amplificación fueron concentrados en *speed vac* (FTS Systems) hasta 10 µl para ser sembrados en el gel. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo en un equipo de DGGE (CBS Scientific), a 65 V (aproximadamente 15 mA) durante 16 horas a 60°C en *buffer* TAE 1X. Los geles fueron teñidos con *Sybr Gold* (Invitrogen) 1X en TAE 1X durante 30 minutos, lavados en TAE 1X durante 10 minutos y visualizados en transiluminador UV con cámara acoplada (Syngene).

### ***DGGE-Southern Blot***

Se transfirió el DGGE a una membrana *Hybond* (GE Healthcare Life Sciences) mediante

electrotransferencia, 1 hora a 300 mA constantes (sin exceder los 25 V). La desnaturalización se realizó depositando la membrana sobre papeles de filtro embebidos en solución desnaturalizante (NaOH 0,4 M, NaCl 0,6 M) durante 10 minutos. Se lavó ligeramente la membrana con *buffer* SSC 2X, y se secó en estufa a 42°C durante 30 minutos. Por último, el ADN se adhirió covalentemente a la membrana mediante exposición a UV durante 1 minuto.

Durante la pre-hibridación se agregaron 10 ml de solución de pre-hibridación (SSC 5X, *buffer* fosfato de sodio pH 7,2 200 mM, SDS 7 %, Denhardt's 1X, ADN de esperma de salmón 100 µg/ml) y se incubó en horno con agitación rotatoria a 50°C durante 4 horas. Luego se descartó esta solución y se agregaron 10 ml de solución de hibridación (60 µl de oligonucleótido marcado con ATP-γ32P, NaCl 0,9 M, *buffer* fosfato de sodio pH 7,2 50 mM, EDTA 5 mM, Denhardt's 10X), incubando bajo las mismas condiciones durante 18 horas. Se realizó un primer lavado mediante el agregado de 20 ml de *buffer* SSC 1X y SDS 1 %, incubando durante 30 minutos a 50°C. A través de un segundo lavado disminuyendo la concentración salina (SSC 0,5X) y aumentando la temperatura (55°C) se consiguió evitar bandas inespecíficas. La exposición se realizó toda la noche a -70°C empleando placas radiográficas Kodak. La captura de las imágenes se realizó empleando el sistema Storm 820 (Molecular Dynamics).

### ***Análisis de geles de DGGE***

El análisis de los geles de DGGE se llevó a cabo con el programa GelCompar II (Applied Maths), mediante el cual se realizó la detección de las bandas y se determinó su intensidad. De esta manera cada DGGE digitalizado se convirtió en una matriz binaria, en la cual las columnas corresponden a cada muestra y las filas a cada banda registrada, siendo los números los valores de intensidad relativa de las mismas.

Una vez obtenida la matriz, se realizaron diversos análisis de similitud entre las muestras.

### ***Análisis de Moving-Window***

Este análisis refleja la dinámica de cambio de la estructura de la comunidad bacteriana (Marzorati et al. 2008), y consiste en determinar el índice de similitud Bray-Curtis entre muestras temporales consecutivas y graficarlas en el tiempo (Possemiers et al. 2004). Las muestras consecutivas analizadas corresponden a lapsos de 3-4 días, y el índice de similitud de Bray-Curtis se calculó empleando el programa PAST (Palaeontological Statistics, versión 1.85) disponible en el sitio web de la Universidad de Oslo (<http://folk.uio.no/ohammer/past>). Este índice no sólo considera la presencia y

ausencia de taxones entre muestras, sino que también contempla las diferencias en la abundancia relativa de los mismos.

### Índice de similitud de Raup-Crick

El índice de similitud de Raup-Crick (SRC) corresponde a un índice probabilístico empleado para determinar si las similitudes o disimilitudes observadas entre muestras son significativas (con un nivel de confianza del 95 %). Este cálculo tiene en cuenta sólo la presencia o ausencia de especies, es decir que cada número distinto a 0 en la matriz obtenida de los DGGE se considera presencia.

El SRC utiliza un procedimiento de aleatorización (Monte Carlo) para comparar el número observado de especies comunes con la distribución de co-ocurrencias encontradas en 200 repeticiones al azar (Raup and Crick 1979). Valores de SRC superiores a 0,95 indican diferencias significativas respecto a los ensamblados al azar, lo que indica que las dos muestras son significativamente similares. Por otro lado, valores de SRC menores a 0,05 indican que las muestras son significativamente disímiles. El cálculo de los índices SRC también se realizó con el programa PAST versión 1.85.

### Tasa de recambio de especies

Con el objetivo de caracterizar la variabilidad temporal de las comunidades bacterianas de los reactores, se determinó la relación especie-tiempo la cual describe cómo las especies de la comunidad son eliminadas y reemplazadas a lo largo del tiempo T sobre el cual se realizó el análisis (Rosenzweig 1995). La relación especie- tiempo se ajusta a la siguiente función exponencial:

$$S = cT^w$$

Donde,

**S**= riqueza “acumulada”

**c**= constante empírica

**w** = tasa de recambio de especies

El parámetro de riqueza “acumulada” se estableció midiendo el valor de riqueza inicial (número de bandas/taxones) sobre el cual se fue sumando la cantidad de taxones novedosos que fueron detectados a lo largo de las muestras temporales.

La tasa de recambio de especies se estimó a partir de la pendiente de la regresión lineal efectuada sobre gráficos de log T vs log S.

La influencia de la riqueza de la metacomunidad sobre la tasa de recambio de

especies se determinó mediante la prueba de Student.

#### Modelo neutral propuesto para procariotas

Empleamos el modelo neutral desarrollado por Sloan para el análisis del ensamblado estocástico de comunidades procariotas (Sloan et al. 2007; Sloan et al. 2006), que ajusta la relación observada entre la abundancia relativa de los distintos taxones y la frecuencia con la que son encontrados en las muestras de análisis.

En este trabajo empleamos los datos obtenidos mediante DGGE, de los cuales se extrajeron los valores de frecuencia de aparición de cada taxón y su abundancia relativa promedio a lo largo de las muestras temporales analizadas. Cada banda de los geles de DGGE se asumió como un taxón, y su abundancia relativa se determinó a partir de los datos de intensidad. La frecuencia de cada banda se calculó como el número de muestras donde la banda fue encontrada dividido el número de muestras totales analizadas.

El ajuste de cuadrados mínimos de las curvas se realizó con el programa *Mathematica* (Wolfram Research, Inc.).

#### Índice de similitud Bray-Curtis

El uso del coeficiente de Bray-Curtis es recomendado cuando se comparan muestras en base a la abundancia de diferentes taxones, ya que no sólo tiene en cuenta la presencia/ausencia sino que también considera las diferencias de abundancias relativas. El índice de similitud de Bray-Curtis entre dos grupos, A y B, se calcula con la siguiente fórmula:

$$BrayCurtis_{A, B} = 2 \frac{\sum_{i=1}^S \min(x_{iA}, x_{iB})}{\sum_{i=1}^S (x_{iA} + x_{iB})}$$

Donde  $x_{iA}$  y  $x_{iB}$  son los valores de la variable  $i$  en las muestras A y B,  $\min(x_{iA}, x_{iB})$  es el menor valor mayor a 0 de cada variable en ambas muestras, y  $S$  es el número de variables. En nuestros análisis, las variables corresponden a los distintos taxones asociados a las bandas en los perfiles de DGGE, y el valor de la variable corresponde a la abundancia relativa del taxón que se obtiene a partir de la intensidad de cada banda.

El análisis de porcentaje de similitud (SIMPER), que analiza la contribución de cada taxón a la diferencia entre grupos, se realizó con el programa PAST.

### **Diseño de sondas específicas de *Sediminibacterium sp.* y *Thauera sp.***

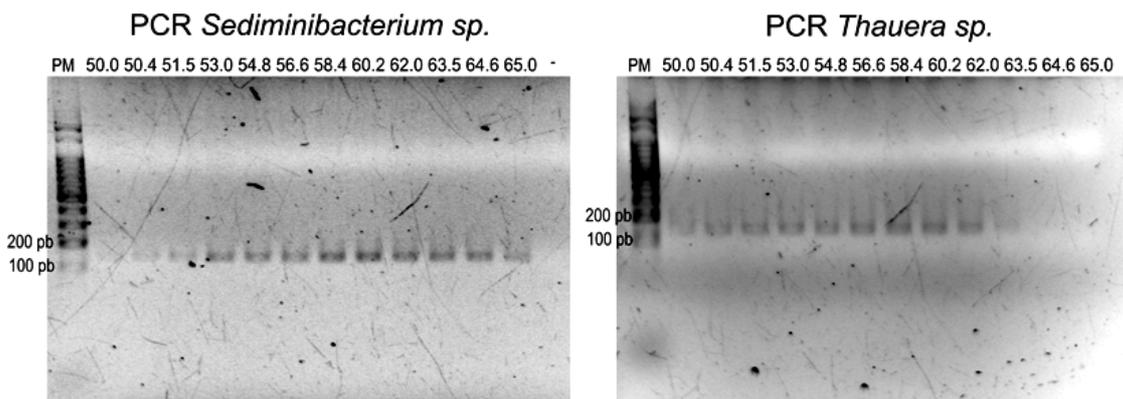
Se cortaron varios representantes de las bandas de interés I y II, y se dejó eluyendo toda la noche en 500 µl de *buffer* TE pH 8,0 a 4°C. Posteriormente se tomó el sobrenadante y se precipitó el ADN mediante el agregado de 10 µl de NaCl 5M, 1250 µl de etanol absoluto e incubación en hielo durante 30 minutos. Se centrifugó a 16.100 g durante 30 minutos a 4°C y se realizaron dos lavados con etanol 70 %. Finalmente se resuspendió el ADN en 50 µl de agua libre de nucleasas.

Luego de la purificación del ADN, se reamplificó la secuencia de 193 pb con los cebadores universales F341 y R534, y se corrió nuevamente en DGGE hasta obtener una única banda. Finalmente, se secuenciaron los fragmentos amplificados a partir de la banda aislada mediante del servicio de Macrogen Inc. ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)). La caracterización taxonómica de las secuencias obtenidas se realizó empleando la herramienta bioinformática *RDP taxonomy classifier* (Wang et al. 2007).

De acuerdo a su posición, estas secuencias abarcan la región hipervariable V3 del gen ARNr 16S, por lo tanto se utilizaron para el diseño de oligonucleótidos específicos de ambos taxones. Se empleó el programa *Primrose* (Ashelford et al. 2002) para buscar regiones específicas en estas secuencias cotejando con la base de datos de secuencias de ADNr 16S del RDP (Cole et al. 2009). La especificidad de las sondas fue corroborada empleando el programa *RDP probematch* (Cole et al. 2009), el cual reveló que sólo 17 de 1048 secuencias pertenecientes al género *Sediminibacterium* de otros estudios ambientales y 6 de 7919 secuencias sin clasificar de la familia *Chitinophagaceae* pueden hibridar con SDM469. Por otro lado se observó que 185 de los 1257 taxones identificados del género *Thauera* podrían ser detectados mediante la sonda THAU468.

En la PCR dirigida al *screening* de las colonias de *Sediminibacterium sp.* y *Thauera sp.* se emplearon las mismas condiciones de reacción establecidas para la amplificación del gen ribosomal 16S, empleando los cebadores F341 y el SDM469 o THAU468 respectivamente. Otra modificación que se efectuó en estas PCR fue la temperatura de hibridación. Se realizó una PCR en gradiente para determinar la temperatura de hibridación óptima, y se pudo determinar que se encuentra entre los 58-60°C en ambos casos (Figura 46).

La especificidad de la sonda SDM469, además de determinarse *in silico*, se comprobó experimentalmente ya que no se observó amplificación a partir de muestras de ADN total provenientes de barros de otras plantas.



**Figura 46.** PCR específica de *Sediminibacterium* sp. y *Thauera* sp. empleando un gradiente de temperaturas de hibridación. El máximo de amplificación se alcanza con una temperatura de hibridación correspondiente a 60,2°C en la PCR específica de *Sediminibacterium* sp., mientras que en la PCR específica de *Thauera* sp. se optimizó la reacción empleando una temperatura de 58,4 °C.

### **Screening, aislamiento y cultivo de *Sediminibacterium* sp**

Los aislamientos fueron realizados empleando como inóculo diluciones seriadas de muestras de biomasa provenientes de los de reactores conservadas en Glicerol 25 %, en los cuales los taxones de interés mostraron una mayor abundancia. De esta forma la incubación en los reactores a escala de laboratorio funcionaron como un cultivo de enriquecimiento de estas cepas previo a su aislamiento.

En cuanto a los medios empleados, se intentó simular las condiciones impuestas en los reactores o las extraídas de bibliografía que se emplearon para el cultivo de cepas relacionadas. De esta forma, los medios empleados fueron el SS, es decir el mismo medio empleado para la alimentación de los reactores pero de forma sólida; y el medio R2A, en el cual se logró aislar a *Sediminibacterium salmoneum*, la primer cepa aislada representante del género *Sediminibacterium* (Qu and Yuan 2008). Para solidificar los medios R2A y SS, se agregó agar en una concentración de 15 g/l. Algunas placas de R2A y SS fueron suplementadas con fenol a una concentración de 0,3 g/L o con el efluente a tratar de la planta petroquímica, en un 25 % del volumen. Las placas se incubaron aeróbicamente durante 10 días a 30°C. También se probaron condiciones anaeróbicas empleando la jarra y el kit de anaerobiosis Oxoid.

El medio R2A suplementado con extracto de barro activado fue preparado de la siguiente manera. Un total de 5 g de barro se lavó dos veces, se diluyó en 500 ml de agua destilada y se calentó hasta ebullición manteniéndolo durante 15 minutos. Posteriormente 350 ml de sobrenadante se mezclaron con 150 ml de una solución estéril con 0,25 g de peptona de carne; 0,25 g de extracto de levadura y 7,5 g de agar.

Este método de preparación fue adaptado del medio empleado para el aislamiento de *Sediminibacterium salmoneum* (Qu and Yuan 2008).

La estrategia de aislamiento consistió en realizar los cultivos por duplicado, de modo de obtener un lisado de las colonias de una placa para realizar el *screening* por PCR y eventualmente ante un resultado positivo, buscar en la otra placa mediante PCR de colonias (Stevenson and Eichorst 2004). Los lisados de los cultivos se obtuvieron agregando 3 ml de solución salina sobre la placa y raspando la superficie con una espátula. Seguidamente se realizó una extracción de ADN y una posterior PCR empleando cebadores específicos de *Sediminibacterium sp.* o *Thauera sp.*

### **ERIC-PCR**

La reacción se llevó a cabo en 50  $\mu$ l con 5  $\mu$ l de *buffer* Taq polimerasa 10 X (Invitrogen), enzima Taq polimerasa (Invitrogen) 1,25 U, dimetilsulfóxido 10 %, dNTPs 0,2 mM de cada uno, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, BSA 0,1  $\mu$ g/ml, los cebadores ERIC1R y ERIC2 con una concentración de 0,1  $\mu$ M, y 5  $\mu$ l de una dilución 1/100 de ADN genómico (100 ng aproximadamente). El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 7 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de hibridación a 52°C y 8 minutos de extensión a 65°C, con un paso de extensión final de 16 minutos a 65°C (Versalovic et al. 1991). El material amplificado se corrió en geles de agarosa 1 % a 60 V y se analizaron los patrones obtenidos con el programa GelCompar II (Applied Maths)

### **Secuenciación del gen de ARN ribosomal 16S**

La amplificación del gen de ARNr 16S casi completo de *Sediminibacterium sp.* se realizó en una mezcla de reacción de 50  $\mu$ l, la cual consistió en 10  $\mu$ l de *buffer* Pfx polimerasa 10 X (Invitrogen), enzima Platinum Pfx polimerasa (Invitrogen) 1,5 U, dNTPs 0,2 mM de cada uno, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, cebador F8 0,2  $\mu$ M, cebador R1509 0,2  $\mu$ M y 5  $\mu$ L de una dilución 1/50 de ADN genómico proveniente de un cultivo de *Sediminibacterium sp.* en R2A. El programa de amplificación incluyó una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de hibridación a 55°C y 1 minuto de extensión a 68°C, con un paso de extensión final de 10 minutos a 68°C. El producto de PCR se corrió en gel de agarosa 1 %, se cortó la banda de 1500 pb y se purificó utilizando un kit comercial (GE Healthcare Life Sciences).

Luego se llevó a cabo la reacción de *A-tailing* para recuperar la Adenina terminal (eliminada por la actividad correctora de la Pfx polimerasa). La misma consistió en una mezcla de *buffer* Taq polimerasa 1 X final (Invitrogen), enzima Taq polimerasa

(Invitrogen) 1 U, dATP 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM, incubada durante 30 minutos a 70°C. Posteriormente se ligó en vector *pGEM-T Easy* (Promega). Cada reacción se llevó a cabo en 10 µl con una relación molar entre inserto y vector de 3 a 1. Se agregaron 5 µl de *Rapid Ligation Buffer 2x*, 0,5 µl (25 ng) de vector pGEM-T Easy; 3,5 µl de ADN (aproximadamente 37,5 ng), 1 µl de ligasa T4 (3 Unidades Weiss), y agua libre de nucleasas. Se dejó incubando 16 horas a 4°C.

Finalmente se emplearon células *E. coli* DH10β electrocompetentes (DO= 0,3 eficiencia de 10<sup>8</sup>) para llevar a cabo la transformación con el vector ya ligado, combinando 50 µl de células y 2 µl de reacción de ligación en celdas de 0,1 cm. Luego del pulso eléctrico Ec1 en un electroporador Micropulser (Bio-Rad) se agregaron 250 µL de SOC y se dejó en estufa a 37°C durante 1 hora. Seguidamente se sembraron 50 µl de una dilución 1/10 en placas LB con Ampicilina (50 µg/ml), IPTG (0,95 mg totales esparcidos en la superficie de la placa) y X-Gal (1,6 mg totales sobre la superficie de la placa). Se incubaron toda la noche a 37°C.

El *screening* de los clones positivos se realizó mediante una PCR específica de *Sediminibacterium sp.* sobre las colonias blancas (contienen vector con inserto interrumpiendo el gen de la β-galactosidasa). Para corroborar la longitud del fragmento clonado se efectuó una PCR con los cebadores universales M13 que hibridan contiguamente a la región de inserción del vector. Los plásmidos purificados se secuenciaron bajo el servicio de MacroGen Inc ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)).

### **Análisis filogenético de *Sediminibacterium sp.***

Las secuencias de ADNr 16S de la familia *Chitinophagaceae* que se incluyeron en el análisis se obtuvieron de la base de datos RDP (Cole et al. 2009). También se sumaron al análisis las secuencias correspondientes a *Sediminibacterium sp.* OR53 y OR43 extraídas de la base de datos IMG-ER (Markowitz et al. 2009). Se alinearon secuencias de 1230 pb utilizando el CLUSTALW, y la clasificación filogenética se llevó a cabo empleando el método de máxima verosimilitud con el programa MEGA versión 5.1 (Tamura et al. 2011)

### **Cultivos puros de *Sediminibacterium sp.***

Los cultivos puros de *Sediminibacterium sp.* en los medios R2A fueron suplementados con soluciones de vitaminas y minerales traza basados en las soluciones de Wolfe (ATCC), ver Anexo III.

Los cultivos líquidos se realizaron mayormente en tubos estériles de poliestireno de 14 ml, los cuales se incubaron a 30°C con una agitación de 180 rpm. También se

realizaron cultivos de 50 ml en erlenmeyers de 250 ml de capacidad, incubados a 30°C con una agitación de 100 rpm.

Los cultivos semisólidos se obtuvieron mediante el agregado de agar 0,3 %. Luego el medio estéril se llevó a ebullición para eliminar el contenido de aire disuelto, y se agregó 10 ml por tubo. Una vez llevado a cabo este procedimiento se mezcló suavemente con el inóculo (1 ml) y se incubó a 30°C pero sin agitación (Evans and Harrell 1977).

Para la diferenciación entre cultivos agregados y planctónicos se empleó el medio nombrado como MM4 que consiste únicamente en peptona (4 g/l), vitaminas y minerales traza (ATCC). En este medios los cultivos se *Sediminibacterium sp.* crecen de forma planctónica, y ante el agregado de piruvato (0,5 g/l) lo hacen de forma totalmente agregada.

### **Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido**

Se utilizó un protocolo de deshidratación independiente de punto crítico (Nation 1983), basado en el solvente 1,1,1,3,3,3,-hexametildisilazano (HMDS). Se partió de alícuotas (1 ml) de cultivos frescos, se centrifugó a 7.000 g y se lavó 2 veces con solución fisiológica. Inmediatamente se agregó 500 µl de solución fijadora (*buffer* cacodilato 0,1 M, 1 % glutaraldehído, pH 7) y se incubó durante 10 minutos. Se enjuagaron las muestras durante 5 minutos con agua destilada y posteriormente se deshidrató siguiendo lavados con concentraciones crecientes de etanol (2 x 15 minutos en 50 % de etanol, 2 x 15 minutos en 70 % de etanol, 2 x 15 minutos en 90 % de etanol, 2 x 15 minutos en 100 % de etanol). Luego se incubaron los *pellets* bacterianos durante 30 minutos en etanol / HMDS (1:1), y posteriormente durante 1 hora en HMDS 100 %. Luego se descartó el HMDS y se dejaron secar las muestras toda la noche a temperatura ambiente. Se tomó una punta de espátula por muestra disecada para el montaje. Tanto el montaje como la visualización de las muestras, fue realizada bajo el servicio de microscopía electrónica de barrido que brinda el Centro de Microscopía Avanzada (CMA) de la Universidad de Buenos Aires (UBA).

### **Hibridación ADN-ADN in silico**

Se adquirió la cepa de *Sediminibacterium salmoneum* NJ-44 del *Biological Resource Center* de Japón (NBRC 103935). Los procedimientos de cultivo, extracción del ADN genómico y secuenciación de *Sediminibacterium salmoneum* fueron análogos a los de *Sediminibacterium sp.*

La secuencia de *Sediminibacterium salmoneum* se empleó como referencia para determinar la distancia genómica respecto a *Sediminibacterium sp.*

Se calculó la distancia genómica *in silico* entre las cepas utilizando el servidor *Genome-genome distance calculator* versión 2.0 (<http://ggdc.dsmz.de/>). El algoritmo

empleado para establecer las similitudes intergenómicas fue el BLAT, y la fórmula empleada para calcular la distancia fue la siguiente:

$$d_0(X, Y) = 1 - \frac{H_{XY} + H_{YX}}{\lambda(X, Y)}$$

Donde X e Y corresponden a los genomas a comparar. H se refiere a la longitud total de todos los segmentos de alta similitud (HSP, *high-scoring segment pairs*) detectados, representados por alineamientos locales considerados estadísticamente significativos al estar asociados al un valor  $e$  lo suficientemente bajo. Mientras que  $\lambda$ , corresponde a la suma total de la longitud de ambos genomas.

El valor de distancia permite predecir un valor teórico de hibridación ADN-ADN, el cual es calculado a través de modelos lineales generalizados, los cuales arrojan resultados validados estadísticamente (Meier-Kolthoff et al. 2013)

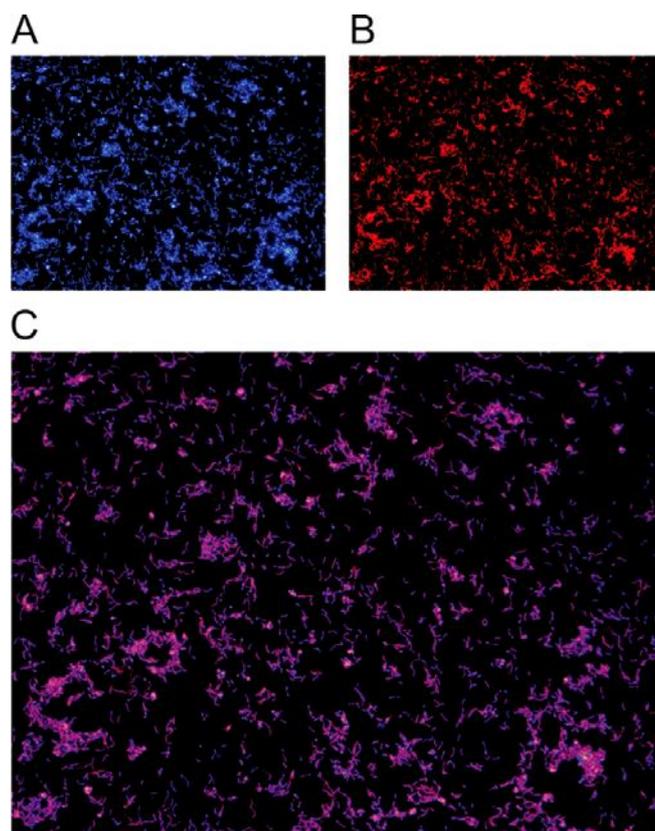
### ***Hibridación in situ fluorescente (FISH)***

#### Diseño de sonda específica para *Sediminibacterium* sp

El diseño de la sonda específica para los ensayos de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se realizó a partir de la secuencia casi completa del ARNr 16S de *Sediminibacterium* sp. Esta nueva sonda se diseñó como una alternativa a la secuencia de SDM469 (utilizada para PCR y *Southern blot*) con la que no se observó una señal fluorescente apreciable en ensayos con cultivos puros de *Sediminibacterium* sp. Esto ocurre porque la posición en la secuencia del ARNr 16S donde hibrida la sonda en los ensayos de FISH puede influir notablemente en la emisión de la señal fluorescente. Este fenómeno se debe principalmente a la estructura secundaria que adopta el ARNr en los ribosomas, que incluye distintas regiones autocomplementarias a lo largo de su secuencia donde se puede interferir la hibridación de la sonda. Existen herramientas bioinformáticas para determinar teóricamente la eficiencia de una sonda a ser empleada en FISH. En este trabajo empleamos el programa mathFISH, el cual predice la eficiencia global considerando no solo la reacción de hibridación (ADN- ARNr), sino también las reacciones de autoplegamiento de la sonda (ADN-ADN) y del ARNr (ARNr-ARNr) que afectan a la misma, basándose en modelos termodinámicos (Yilmaz et al. 2011). De esta manera se confirmó un valor bajo para la sonda SDM469, el cual fue de 0,46. En consecuencia, se diseñó otra sonda específica a ser empleada en los ensayos de FISH, realizada a partir de la secuencia completa del gen de ARNr 16S de *Sediminibacterium* sp. La primer selección de

oligonucleótidos específicos se llevó a cabo empleando el programa *Primrose* (Ashelford et al. 2002), con el cual se buscaron regiones de 18 nt presentes en la secuencia de *Sediminibacterium sp.* y que se encuentren lo menos posible en toda la base de datos de secuencias bacterianas de ADNr 16S del RDP (Cole et al. 2011). También este programa permitió descartar los oligonucleótidos que presentan regiones autocomplementarias, dicho parámetro se ajustó en un mínimo de 3 nt, como así también se estableció un rango de contenido de GC de 50-70 % para asegurar una buena hibridación. Una vez obtenidos varios oligonucleótidos candidatos, se examinó la eficiencia de cada uno mediante la herramienta mathFISH.

El efecto negativo de la estructura secundaria del ARNr 16S también se tuvo en cuenta considerando la selección de las sondas de acuerdo al mapa de brillo de la señal emitida en cada región del ARNr 16S. Este mapa fue realizado experimentalmente empleando más de 200 sondas que cubren la totalidad del ARNr 16S de *E. coli*. Luego se midió la fluorescencia emitida por cada sonda mediante citometría de flujo y se relativizó al valor de la sonda que emitió la mayor fluorescencia, Eco1482 (Fuchs et al. 1998). En definitiva, se optó por el oligonucleótido SDM 1404 marcado con el fluoróforo Cy3 en el extremo 5'. Esta sonda posee una eficiencia de hibridación teórica de 0,99 y se encuentra en una posición que abarca regiones clasificadas como I y II de acuerdo a la fluorescencia emitida (100-61 % de fluorescencia relativa a Eco1482). La especificidad de la sonda SDM 1404 se corroboró con la herramienta *Probe match* del RDP Tools (Cole et al. 2009), comprobando que tiene la capacidad teórica de hibridar con sólo 146/1048 secuencias del género *Sediminibacterium*, y 30/7919 de *Chitinophagaceae* sin clasificar. Por último, se comprobó experimentalmente la utilidad de la sonda SDM1404 llevándose a cabo experimentos de FISH sobre cultivos puros de *Sediminibacterium sp.* bajo distintas concentraciones de formamida, y se comprobó una buena señal fluorescente con una concentración de formamida de hasta 30 % (Figura 47).



**Figura 47.** Ensayo de FISH sobre un cultivo puro de *Sediminibacterium* sp. realizando una tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) e hibridación con la sonda específica SDM1404-Cy3 empleando formamida al 30 %. La figura A corresponde a la imagen tomada con el filtro para UV para visualizar la tinción inespecífica con DAPI, mientras que la B corresponde a la fluorescencia emitida por la sonda específica SDM1404-Cy3. La figura C, corresponde a la superposición de las dos imágenes anteriores.

#### 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 minutos a 5.000 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 5 µl de muestra por pocillo. Una vez seca la muestra, se sumergió en solución de agarosa 0,75 % y se dejó solidificar en frío. Luego se realizó la deshidratación sumergiendo el portaobjetos sucesivamente en etanol 50 % por 3 minutos, en etanol 80 % por 3 minutos y en etanol 100 % por 3 minutos. Se dejó secar a temperatura ambiente (Daims 2009).

#### Hibridación con sondas marcadas

El procedimiento llevado a cabo se ajustó al descrito por Pernthaler y colaboradores (Pernthaler et al. 2001). Se colocaron los portaobjetos a 46°C durante 15 minutos para fundir parcialmente la agarosa. Inmediatamente se agregaron 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 horas 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. Los portaobjetos fueron sumergidos en el *buffer* de lavado correspondiente durante 20 minutos a 46°C. Se enjuagó con agua y se dejó secar en oscuridad. Luego 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 minutos en oscuridad. Se lavó con etanol 80 %, se enjuagó con agua y se dejó secar. Finalmente, los preparados fueron montados con una solución que previene el fotoblanqueo, la cual consiste en 2 % de n-propil galato en glicerol (Giloh and Sedat 1982), y fueron visualizadas en un microscopio confocal Olympus FV1000.

### ***PCR cuantitativa 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. 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.

### **Cuantificación de genes de ARN ribosomal 16S**

La cuantificación de bacterias totales se realizó amplificando el ADNr 16S con los cebadores universales F341 y R534. El programa de PCR en tiempo real consistió en un paso inicial de 15 minutos a 94°C, y 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 20 seg a 53°C, 30 seg a

72°C y 3 seg a 79°C.

La cuantificación del ADNr 16S específico de *Sediminibacterium* sp. se llevó a cabo con los cebadores SDM469 y F341. El programa de PCR en tiempo real en este caso consistió en un paso inicial de 15 minutos a 94°C, y 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 20 seg a 58°C, 30 seg a 72°C y 3 seg a 75°C

Se empleó un plásmido cuantificado que contiene una secuencia bacteriana del ADNr16S para la cuantificación de bacterias totales, y también para la cuantificación del plásmido que contiene la secuencia del ADNr 16S de *Sediminibacterium* sp. empleado en las cuantificaciones de estas poblaciones.

La concentración final de los reactivos empleados en ambas PCR fue la siguiente: *buffer* 1X, 0,2 mM de cada dNTP, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 % de DMSO, 0,1 µM de cada cebador; 0,2x de *SyBR green* (Invitrogen) y 1,25 U de Taq polimerasa *Platinum* (Invitrogen).

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Opticon 2 (MJ Research), y los datos se analizaron con el programa asociado Opticon Monitor, versión 2.02.

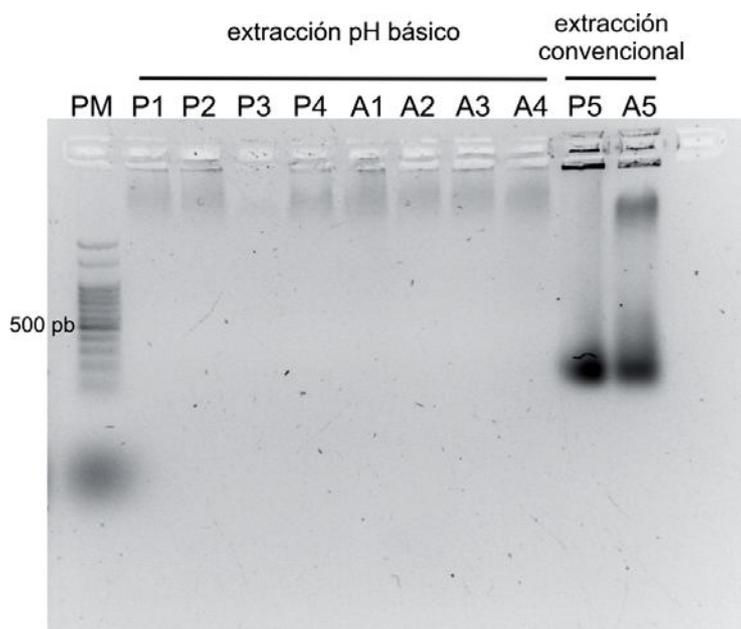
### ***Análisis proteómico - Electroforesis bidimensional***

#### Extracción proteínas con fenol a pH básico

Se empleó un protocolo de extracción de proteínas con fenol que incluye un paso a pH básico para eliminar el DNA adherido a las proteínas que interfiere en la corrida de la primera dimensión de la electroforesis bidimensional (Antonioli et al. 2009). Mediante un gel de agarosa 1 % se observa claramente la eliminación del ADN en las muestras de proteínas purificadas por este método en contraste con extracciones convencionales (Figura 48), las cuales mostraron problemas de rayas (*streaking*) horizontales asociados al contenido de ADN en los geles bidimensionales (no mostrados).

Se realizaron cuatro geles para cada tipo de crecimiento, realizados a partir de cultivos 50 ml replicados, que fueron suplementados o no con piruvato; colectados hacia el final del crecimiento exponencial (43 horas). Luego de una centrifugación, el *pellet* resultante se lavó 2 veces con solución fisiológica para eliminar exopolisacáridos unidos débilmente. Se resuspendió el *pellet* con 750 µl de *buffer* de lisis (25 mM Tris- HCl pH 8, 100 mM NaCl, 0,1 % Tritón X-100). Posteriormente se transfirió a tubos de 2 ml con bolitas de zirconia de 0,1 mm. Se agitó en *Bead-Beater* 30 segundos a 5000 rpm, a razón de 5 ciclos con 1 minuto en hielo entre ciclos. Se centrifugó en frío a 16.100 g, y se transfirieron 500 µl del sobrenadante a un tubo limpio. Sobre el mismo tubo se agregó 500 µl de fenol pH 8 y 500 µl cloroformo/isoamilico (24:1), se agitó y se dejó separar las fases por 5 minutos. Luego de una centrifugación en frío a 16.100 g, se descartó la fase acuosa y la fase orgánica, quedándonos con la interfase proteica. Se lavó 2 veces el *pellet* proteico con 500 µl de

acetona fría. Posteriormente se dejó secar y se resuspendió con 500  $\mu$ l de *buffer* 50 mM Tris pH 10, agitando en *vortex* durante 1 hora. Seguidamente se repitió el procedimiento de extracción proteica para finalmente resuspender el *pellet* en 100  $\mu$ l de *buffer* de isoelectroenfoque (10 mM Tris- HCl pH 8, 1 mM EDTA, 7 M urea, 2 M tiourea, 10 % glicerol, 4 % CHAPS). Se cuantificó la concentración de proteínas mediante Bradford, y se llevaron todas las muestras a una concentración de 2,5  $\mu$ g/ $\mu$ l con *buffer* IEF. Adicionalmente, se normalizó la concentración mediante la corrida de un gel monodimensional.



**Figura 48.** Gel de agarosa 1 %. PM. Peso molecular (marcador 100 pb). P. Contenido de ADN en proteínas purificadas a partir de cultivos planctónicos. A. Contenido de ADN en proteínas purificadas a partir de cultivos agregados.

#### Carga de las tiras comerciales

Se agregó el volumen equivalente a 250  $\mu$ g de proteína en 50 mM DTT, Anfolitos 4-7 0,8 %, 0,01 % de Azul de Bromofenol, en un total de 125  $\mu$ l (completados con *buffer* IEF). Se centrifugó a temperatura ambiente para eliminar agregados insolubles y se cargó el sobrenadante en contenedor con las tiras comerciales *DryStrip Immobiline* pH 4-7, 7 cm (GE Healthcare Life Sciences) y se incubó durante 16 horas a 30°C.

#### Isoelectroenfoque

Se utilizó un programa de 500 V 30 minutos, 1500 V 1 hora, 5000 V 1,5 horas, alcanzando siempre un mínimo de 8500 V totales. Posteriormente las tiras comerciales se equilibraron mediante la incubación en agitación durante 45 minutos en *buffer* de equilibrio

(50 mM Tris-HCl pH 8, urea 6 M, 30 % glicerol, 2 % SDS, 0,01 % azul de bromofenol; 4,5 % iodoacetamida, 1 % DTT).

Se enjuagaron las tiras 3 veces en TGS 1X y se dispusieron en los geles de poliacrilamida 10 %, cubriéndolos con solución de agarosa 0,5 %, *buffer* TG 1 X, SDS 0,15 %, azul de bromofenol 0,01 %. Finalmente se corrieron los geles a 15 mA constantes hasta que el frente de corrida llegara a 1 centímetro del final del gel.

#### Visualización y análisis de los geles

La tinción de los geles se realizó incubando a los mismos en 50 ml de una solución compuesta de 40 ml de *Coomassie brilliant blue* G250 5 % y 10 ml de metanol. Luego del lavado con agua desionizada durante 24-48 horas, los geles fueron escaneados utilizando el *Image Scanner III* (GE Healthcare Life Sciences) con una resolución de 300 dpi en escala de grises. Las imágenes se analizaron utilizando el programa *Image Master 2D Platinum* versión 7.0 (GE Healthcare Life Sciences). Con este programa se detectaron los *spots*, se cuantificaron y se realizó el *match* entre los *spots* de los diferentes geles. Para compensar las posibles variaciones experimentales (por ejemplo cantidad de proteína que se cargó en cada gel o diferencias en la tinción entre geles) se utilizó como parámetro de comparación al volumen normalizado (% vol) de cada *spot*. Con este mismo programa se realizó el análisis estadístico ANOVA incluyendo las cuatro réplicas, para evitar diferencias las propias de la variabilidad entre cultivos.

#### Secuenciación de los spots

Para la identificación de los *spots* de interés se recurrió al servicio de proteómica analítica provisto por el instituto Pasteur de Montevideo (Uruguay). El procedimiento incluyó la digestión con tripsina y el posterior análisis mediante MALDI-TOF MS, y posterior análisis mediante el programa Mascot, empleando las secuencias aminoacídicas de los genes anotados del genoma de *Sediminibacterium* sp. como base de datos para la identificación.

#### ***Secuenciación del genoma de Sediminibacterium sp.***

#### Purificación de ADN genómico de *Sediminibacterium* sp.

Se realizó el cultivo del aislamiento de *Sediminibacterium* sp. en un medio con peptona (10 g/l) suplementado con piruvato (0,5 g/l), vitaminas y minerales. Se incubó a 30°C y con una agitación de 180 rpm durante 48 horas. La purificación del ADN genómico se realizó con el *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega), siguiendo el protocolo estándar recomendado para bacterias gram-negativas recomendado por el fabricante.

## Secuenciación

El genoma fue secuenciado en un equipo Roche 454 GS FLX Titanium, mediante la estrategia de extremos apareados de 8kb en el Instituto de Agrobiotecnología Rosario (INDEAR, Argentina). Se obtuvieron un total de 162.749 lecturas, con un tamaño promedio de 355,61 pb, las cuales se ensamblaron empleando el programa *Celera Assembler* versión 6.1. Como resultado se obtuvo en una secuencia consenso de 3.219.312 pb distribuida en un *scaffold* principal de 3.216.888 pb y otros tres *scaffolds* menores de 1.479, 489 y 456 pb de longitud. En base a las lecturas obtenidas y el tamaño del genoma, se logró alcanzar una cobertura correspondiente a 18X.

## Anotación del genoma

La anotación del genoma de *Sediminibacterium* sp. se realizó dentro del servicio bioinformático provisto por el INDEAR. El procedimiento empleado utiliza distintos programas entre los que se encuentran el Glimmer3, para predecir marcos de lectura abiertos; el *WU-BLAST* para buscar secuencias similares, y el *HMMPFAM* para la búsqueda de dominios proteicos. También utiliza el programa *tRNA-scan* y el *RNAMMER* para predecir secuencias de ARN y realiza otros análisis adicionales para la búsqueda de péptidos señal, regiones transmembrana, reportes GO y números EC. Adicionalmente, el genoma fue anotado automáticamente empleando el procedimiento DOE-JGI *Microbial Annotation Pipeline* (Mavromatis et al. 2009), a través de la incorporación de la secuencia genómica ensamblada de *Sediminibacterium* sp. en la base de datos *Integrated Microbial Genomes Expert Review* (IMG-ER, Markowitz et al. 2009).

## **Análisis transcripcional del gen *usp***

### Diseño de los cebadores específicos del gen *usp*

Para el diseño de los cebadores específicos del gen *usp* se empleó la herramienta *Primer-Blast*, desarrollada por el NCBI (Ye et al. 2012), utilizando la secuencia genómica de *Sediminibacterium* sp. como base de datos de comparación.

La temperatura de hibridación a utilizar en la PCR en tiempo real se determinó mediante una PCR con gradiente de temperatura a partir del ADN genómico de *Sediminibacterium* sp.

### Cultivos planctónicos y agregados

Se realizaron cultivos de 5 ml, planctónicos y agregados, en tubos independientes para cada tiempo de estudio y por duplicado.

Se realizaron dos tandas de cultivos, la primera abarcó las muestras correspondientes a los intervalos de tiempo de 6-12 horas y 24-36 horas; mientras que la segunda tanda, inoculada 10 horas después, incluye las muestras de los intervalos 14-22 horas y 38-46 horas. A cada tiempo de estudio, 2 cultivos planctónicos y 2 agregados fueron cosechados. Se midió la A600 del sobrenadante, y la A600 total, luego de mezclar vigorosamente. Finalmente las muestras se centrifugaron, se congelaron los pellets con nitrógeno líquido y se conservaron a -70°C hasta su análisis (realizado en menos de 7 días).

#### Transcripción reversa del ARNm del gen *usp* y ARNr 16S de *Sediminibacterium* sp.

Las condiciones de reacción empleadas para la retrotranscripción del ARNm correspondiente al gen *usp* fueron equivalentes a las detalladas anteriormente para la retrotranscripción del ARNr 16S de bacteria. La única salvedad es que en este caso se empleó el gen específico USP221R.

Por otro lado para la retrotranscripción del ARNr 16S de *Sediminibacterium*, se empleó el cebador específico SDM469.

En todos los ensayos se incluyeron controles sin molde, y con molde de ARN pero sin RT (para descartar amplificación a partir de ADN).

#### Cuantificación de la expresión del gen *usp*

Se empleó la técnica de PCR en tiempo real para cuantificar los transcritos de *usp* durante distintas muestras temporales de cultivos planctónicos y agregados de *Sediminibacterium* sp. El ADN molde para la reacción en esta ocasión corresponde al ADNc sintetizado mediante la retrotranscripción específica de las muestras de ARN. La concentración final de los reactivos empleados la PCR fue la siguiente: *buffer* 1X, 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 % de DMSO; 0,1 μM de cada cebador (USP23F y USP221R), 0,2x de *SyBR green* (Invitrogen) y 1,25 U de Taq polimerasa *Platinum* (Invitrogen). El programa consistió en un paso inicial de 15 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 20 segundos a 58°C, 30 segundos a 72°C y 3 segundos a 75°C. Para realizar la cuantificación, se empleó un plásmido que contiene la secuencia blanco del gen *usp* (199 pb), el cual fue cuantificado previamente mediante la corrida en gel de agarosa 1 %.

Además se realizó la cuantificación del número de copias de ARNr 16S de *Sediminibacterium* sp. para normalizar los valores de expresión del gen *usp*. De esta

manera, se realizó la PCR en tiempo real tal como se describió anteriormente para la cuantificación de la población de *Sediminibacterium* sp. en las muestras de los reactores, pero esta vez empleando como molde al ADNc resultante de la retrotranscripción específica del ARNr 16S de *Sediminibacterium*.

## **ANEXO I: Soluciones utilizadas**

### *Extracción de Ácidos Nucleicos*

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

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

### *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

### *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 0,9 M, Tris-HCl 20 mM pH 7,2; SDS 0,1 %, 30 % formamida.

*Buffer* de lavado: Tris-HCl 20 mM pH 7,2, SDS 0,1 %, NaCl 112 mM.

## **ANEXO II: Cebadores utilizados**

**Tabla 9.** Listado de cebadores utilizados en este trabajo.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5´-3´</b>	<b>Blanco</b>	<b>Referencia</b>
F341	CCTACGGGAGGCAGCAG	Bacteria (16S)	(Muyzer et al. 1993)
F341 GC	GCCCGCCGCGCGCGGGCGGGG CGGG	Bacteria (16S)	(Muyzer et al. 1993)
R534	ATTACCGCGGCTGCTGG	Universal (16S)	(Muyzer et al. 1993)
F8	AGAGTTTGATCMTGGCTC	Bacteria (16S)	(Godon et al. 1997)
R1509	GNTACCTTGTTACGACTT	Universal (16S)	(Godon et al. 1997)
SDM469	AAGGTACCGTCAGACGAC	<i>Sediminibacterium</i> (16S)	Este trabajo
THAU468	CCGTCATCCAGCGACTAT	<i>Thauera</i> (16S)	Este trabajo
ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC	Sec. rep. intergénic	(Versalovic et al. 1991)
ERIC2	AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG	Sec. rep. intergénic	(Versalovic et al. 1991)
USP23F	CCGATTTTTCTGCTACCGCC	Gen <i>usp</i>	Este trabajo
USP221R	TCAGCCCTGAACTGCAAGAG	Gen <i>usp</i>	Este trabajo

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

#### *Medio synthetic sewage (SS):*

Peptona de carne 160 mg/l, extracto de levadura 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 R2A:*

Extracto de levadura 0,5 g/l, peptona de carne 0,5 g/l, casaminoácidos 0,5 g/l, dextrosa 0,5 g/l, almidón soluble 0,5 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 15 g/l)

#### *Medio de cultivo MM4*

Peptona de carne 4 g/l

#### *Medio de cultivo LB:*

Extracto de levadura 5 g/l, peptona 10 g/l, NaCl 10 g/l (agar 15 g/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

#### *Solución de vitaminas (Wolfe):*

Ácido fólico 0,02 mg/l, clorohidrato de piridoxina 0,1 mg/l, riboflavina 0,05 mg/l, biotina 0,02 mg/l, tiamina 0,05 mg/l, ácido nicotínico 0,05 mg/l, pantotenato de calcio 0,05 mg/l, vitamina B12 0,1 µg/l, ácido p-aminobenzoico 0,05 mg/l, ácido tióctico 0,05 mg/l, fosfato monobásico de potasio 9 mg/l.

#### *Solución de elementos traza (Wolfe):*

EDTA 5 mg/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 30 mg/l, MnSO<sub>4</sub> 5 mg/l, NaCl 10 mg/l, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg/l, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1 mg/l, CaCl<sub>2</sub> (anhidro) 1 mg/l, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg/l, CuSO<sub>4</sub> 0,1 mg/l, AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (anhidro) 0,1 mg/l, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,1 mg/l, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,1 mg/l, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (anhidro) 0,01 mg/l, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,1 mg/l, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,2 mg/l.

## REFERENCIAS

- Albertsen M, Hugenholtz P, Skarshewski A, Nielsen KL, Tyson GW, Nielsen PH (2013) Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nat Biotechnol* 31:533–541.
- Ambur OH, Davidsen T, Frye S, Balasingham SV, Lagesen K, Rognes T, Tonjum T (2009) Genome dynamics in major bacterial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 33:453–470.
- Anderson I, Munk C, Lapidus A, Nolan M, Lucas S, Tice H, Del Rio TG, Cheng J-F, Han C, Tapia R, Goodwin L, Pitluck S, Liolios K, Mavromatis K, Pagani I, Mikhailova N, Pati A, Chen A, Palaniappan K, Land M, Rohde M, Tindall BJ, Göker M, Detter JC, Woyke T, Bristow J, Eisen J, Markowitz V, Hugenholtz P, Kyrpides NC, Klenk HP, Ivanova N (2012) Genome sequence of the flexirubin-pigmented soil bacterium *Niabella soli* type strain (JS13-8(T)). *Stand Genomic Sci* 7:210–20.
- Antonoli P, Bachi A, Fasoli E, Righetti PG (2009) Efficient removal of DNA from proteomic samples prior to two-dimensional map analysis. *J Chromatogr A* 1216:3606–12.
- Ashelford KE, Weightman AJ, Fry JC (2002) PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. *Nucleic Acids Res* 30:3481–3489.
- Baird-Parker A, Davenport E (1965) The effect of recovery medium on the isolation of *Staphylococcus aureus* after heat treatment and after the storage of frozen or dried cells. *J Appl Bacteriol* 28:390–402.
- Bantinaki E, Kassen R, Knight CG, Robinson Z, Spiers AJ, Rainey PB (2007) Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. III. Mutational origins of wrinkly spreader diversity. *Genetics* 176:441–53.
- Baptista JDC, Davenport RJ, Donnelly T, Curtis TP (2008) The microbial diversity of laboratory-scale wetlands appears to be randomly assembled. *Water Res* 42:3182–90.
- Basile L (2009) Estructura y dinámica de comunidades bacterianas en sistemas de barros activados que degradan fenol. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Battin TJ, Sloan WT, Kjelleberg S, Daims H, Head IM, Curtis TP, Eberl L (2007) Microbial landscapes: new paths to biofilm research. *Nat Rev Microbiol* 5:76–81.
- Bell G (2000) The distribution of abundance in neutral communities. *Am Nat* 155:606–617.
- Bell T, Ager D, Song J-I, Newman J (2005) Larger islands house more bacterial taxa. *Science* 308:1884.

- Besemer K, Peter H, Logue JB, Langenheder S, Lindström ES, Tranvik LJ, Battin TJ (2012) Unraveling assembly of stream biofilm communities. *ISME J* 6:1459–68.
- Bignucolo A, Appanna VP, Thomas SC, Auger C, Han S, Omri A, Appanna VD (2013) Hydrogen peroxide stress provokes a metabolic reprogramming in *Pseudomonas fluorescens*: enhanced production of pyruvate. *J Biotechnol* 167:309–315.
- Bollmann A, Palumbo AV, Lewis K, Epstein SS (2010) Isolation and physiology of bacteria from contaminated subsurface sediments. *Appl Environ Microbiol* 76:7413–9.
- Bolton FJ, Wareing DR, Sails AD (1997) Comparison of a novel microaerobic system with three other gas-generating systems for the recovery of *Campylobacter species* from human faecal samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16:839–42.
- Bossier P, Verstraete W (1996) Triggers for microbial aggregation in activated sludge? *Appl Microbiol Biotechnol* 45:1–6.
- Bott C, Love N (2004) Implicating the glutathione-gated potassium efflux system as a cause of electrophile-induced activated sludge deflocculation. *Appl Environ Microbiol* 70:5569–5578.
- Bott C, Love N (2001) The immunochemical detection of stress proteins in activated sludge exposed to toxic chemicals. *Water Res* 35:91–100.
- Bowdre JH, Krieg NR, Hoffman PS, Smibert RM (1976) Stimulatory effect of dihydroxyphenyl compounds on the aerotolerance of *Spirillum volutans* and *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 31:127–33.
- Calabrese JP, Bissonnette GK (1990) Improved membrane filtration method incorporating catalase and sodium pyruvate for detection of chlorine-stressed coliform bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56:3558–64.
- Chen F (2007) Bacterial auto-aggregation and co-aggregation in activated sludge. PhD Thesis. Clemson University, USA.
- Chen W, Honma K, Sharma A, Kuramitsu HK (2006) A universal stress protein of *Porphyromonas gingivalis* is involved in stress responses and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 264:15–21.
- Christman MF, Morgan RW, Jacobson FS, Ames BN (1985) Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* 41:753–62.
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen a S, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM (2009) The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 37:D141–5.
- Cole JR, Wang Q, Chai B, Tiedje JM (2011) The ribosomal database project: sequences and software for high-throughput rRNA analysis. *Handb. Mol. Microb. Ecol.* John Wiley & Sons, Inc., pp 313–324
- Costerton J, Zbigniew L (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711–45.

- Curtis TP, Sloan WT (2006) Towards the design of diversity: stochastic models for community assembly in wastewater treatment plants. *Water Sci Technol* 54:227.
- Czechowicz S, Santos O, Zottola E (1996) Recovery of thermally-stressed *Escherichia coli* O157: H7 by media supplemented with pyruvate. *Int J Food Microbiol* 33:275–284.
- Daims H (2009) Use of fluorescence *in situ* hybridization and the daime image analysis program for the cultivation-independent quantification of microorganisms in environmental and medical samples. *Cold Spring Harb Protoc.* 2009.
- Daims H, Taylor MW, Wagner M (2006) Wastewater treatment: a model system for microbial ecology. *Trends Biotechnol* 24:483–9.
- Davey ME, O'toole G (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:847–67.
- Dini-Andreote F, Andreote FD, Araújo WL, Trevors JT, van Elsas JD (2012) Bacterial genomes: habitat specificity and uncharted organisms. *Microb Ecol* 64:1–7.
- Erijman L, Figuerola ELM, Guerrero LD, Ayarza JM (2011) Impacto de los recientes avances en el análisis de comunidades microbianas sobre el control del proceso de tratamiento de efluentes. *Rev Argentina Microbiol* 43:127–135.
- Evans JB, Harrell LJ (1977) Agar shake tube technique for simultaneous determination of aerobic and anaerobic susceptibility to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 12:534–6.
- Falk MW, Song KG, Matiasek MG, Wuertz S (2009) Microbial community dynamics in replicate membrane bioreactors-natural reproducible fluctuations. *Water Res* 43:842–52.
- Fernández A, Huang S, Seston S, Xing J, Hickey R, Criddle C, Tiedje J (1999) How stable is stable? Function versus community composition. *Appl Environ Microbiol* 65:3697–704.
- Flemming H-C, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8:623–33.
- Freestone P, Nyström T, Trinei M, Norris V (1997) The universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* is phosphorylated in response to stasis. *J Mol Biol* 274:318–324.
- Fuchs BM, Wallner G, Beisker W, Schwipl I, Ludwig W, Amann R (1998) Flow cytometric analysis of the *in situ* accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 64:4973–82.
- Galil N, Schwartz-Mittelman A, Saroussi-Zohar O (1998) Biomass deflocculation and process disturbances exerted by phenol induced transient load conditions. *Water Sci Technol* 38:105–112.
- Ge Y, He J, Zhu Y, Zhang J, Xu Z, Zhang L, Zheng Y (2008) Differences in soil bacterial diversity: driven by contemporary disturbances or historical contingencies? *ISME J* 2:254–64.

- Giandomenico AR, Cerniglia GE, Biaglow JE, Stevens CW, Koch CJ (1997) The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 23:426–434.
- Giloh H, Sedat JW (1982) Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. *Science* 217:1252–5.
- Glavina Del Rio T, Abt B, Spring S, Lapidus A, Nolan M, Tice H, Copeland A, Cheng JF, Chen F, Bruce D, Goodwin L, Pitluck S, Ivanova N, Mavromatis K, Mikhailova N, Pati A, Chen A, Palaniappan K, Land M, Hauser L, Chang Y-J, Jeffries CD, Chain P, Saunders E, Detter JC, Brettin T, Rohde M, Göker M, Bristow J, Eisen J a, Markowitz V, Hugenholtz P, Kyrpides NC, Klenk H-P, Lucas S (2010) Complete genome sequence of *Chitinophaga pinensis* type strain (UQM 2034). *Stand Genomic Sci* 2:87–95.
- Gledhill WE, Casida LE (1969) Predominant catalase-negative soil bacteria. *Appl Microbiol* 18:340–349.
- Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F, Moletta R (1997) Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 63:2802–13.
- Gottesman S (2003) Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:565–87.
- Graham DW, Smith VH (2004) Designed ecosystem services: application of ecological principles in wastewater treatment engineering. *Front Ecol Environ* 2:199–206.
- Head I, Saunders J, Pickup R (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb Ecol* 35:1–21.
- Henriques IDS, Love NG (2007) The role of extracellular polymeric substances in the toxicity response of activated sludge bacteria to chemical toxins. *Water Res* 41:4177–85.
- Hodge JP, Krieg NR (1994) Oxygen tolerance estimates in *Campylobacter species* depend on the testing medium. *J Appl Bacteriol* 77:666–73.
- Holleman AF (1904) Notice sur l'action de l'eau oxygénée sur les acides  $\alpha$ -cétoniques et sur les dicétones. *Recl des Trav Chim des Pays-Bas la Belgique* 23:169–172.
- Hong H, Pruden A, Reardon KF (2007) Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *J Microbiol Methods* 69:52–64.
- Hubbell S, Borda-de-Água L (2004) The unified neutral theory of biodiversity and biogeography: reply. *Ecology* 85:3175–3178.
- Ibarbalz FM, Figuerola ELM, Erijman L (2013) Industrial activated sludge exhibit unique bacterial community composition at high taxonomic ranks. *Water Res* 47:3854–64.

- Imazaki I, Nakaho K (2009) Temperature-upshift-mediated revival from the sodium-pyruvate-recoverable viable but nonculturable state induced by low temperature in *Ralstonia solanacearum*: linear regression analysis. *J Gen Plant Pathol* 75:213–226.
- Imlay JA (2013) The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol* 11:443–454.
- Jenkins D, Schultz J, Matin A (1988) Starvation-induced cross protection against heat or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170:3910–3914.
- Kaakoush NO, Miller WG, De Reuse H, Mendz GL (2007) Oxygen requirement and tolerance of *Campylobacter jejuni*. *Res Microbiol* 158:644–50.
- Kaewpipat K, Grady CJ (2002) Microbial population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors. *Water Sci Technol* 46:19–27.
- Kahlisch L, Henne K, Gröbe L, Brettar I, Höfle MG (2012) Assessing the viability of bacterial species in drinking water by combined cellular and molecular analyses. *Microb Ecol* 63:383–97.
- Karunakaran E, Mukherjee J, Ramalingam B, Biggs CA (2011) “Biofilmology”: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1869–81.
- Khemkhao M, Nuntakumjorn B, Techkarnjanaruk S, Phalakornkule C (2011) Effect of chitosan on UASB treating POME during a transition from mesophilic to thermophilic conditions. *Bioresour Technol* 102:4674–81.
- Kim TS, Jeong JY, Wells GF, Park HD (2013a) General and rare bacterial taxa demonstrating different temporal dynamic patterns in an activated sludge bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:1755–65.
- Kim YJ, Nguyen NL, Weon HY, Yang DC (2013b) *Sediminibacterium ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field and emended descriptions of the genus *Sediminibacterium* and *Sediminibacterium salmoneum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:905–12.
- Konopka A, Carrero-Colon M, Nakatsu CH (2007) Community dynamics and heterogeneities in mixed bacterial communities subjected to nutrient periodicities. *Environ Microbiol* 9:1584–90.
- Koza A, Moshynets O, Otten W, Spiers AJ (2011) Environmental modification and niche construction: developing O<sub>2</sub> gradients drive the evolution of the wrinkly spreader. *ISME J* 5:665–73.
- Krieg NR, Hoffman S (1986) Microaerophily and oxygen toxicity. *Annu Rev Microbiol* 40:107–30.
- Kvint K, Nachin L, Diez A, Nyström T (2003) The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Curr Opin Microbiol* 6:140–145.
- Labeda DP, Hunt CM, Casida LE (1974) Plating isolation of various catalase-negative microorganisms from soil. *Appl Microbiol* 27:432–4.

- Leibold M, Holyoak M, Mouquet N, Amarasekare P, Chase JM, Hoopes MF, Holt RD, Shurin JB, Law R, Tilman D, Loreau M, Gonzalez A (2004) The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecol Lett* 7:601–613.
- Li XY, Yang SF (2007) Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. *Water Res* 41:1022–30.
- Limbergen H Van, Top EM, Verstraete W (1998) Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:16–23.
- Lozada M, Figuerola ELM, Itria RF, Erijman L (2006) Replicability of dominant bacterial populations after long-term surfactant-enrichment in lab-scale activated sludge. *Environ Microbiol* 8:625–38.
- Männistö MK, Puhakka JA (2002) Psychrotolerant and microaerophilic bacteria in boreal groundwater. *FEMS Microbiol Ecol* 41:9–16.
- Markowitz VM, Mavromatis K, Ivanova NN, Chen IM, Chu K, Kyrpides NC (2009) IMG ER: a system for microbial genome annotation expert review and curation. *Bioinformatics* 25:2271–8.
- Martin SES, Flowers RSR, Ordal ZJ (1976) Catalase: its effect on microbial enumeration. *Appl Environ Microbiol* 32:731–734.
- Martins AMP, Pagilla K, Heijnen JJ, van Loosdrecht MCM (2004) Filamentous bulking sludge-a critical review. *Water Res* 38:793–817.
- Marzorati M, Wittebolle L, Boon N, Daffonchio D, Verstraete W (2008) How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environ Microbiol* 10:1571–81.
- Mavromatis K, Ivanova NN, Chen IA, Szeto E, Victor M, Kyrpides NC (2009) The DOE- JGI standard operating procedure for the annotations of microbial genomes. *Stand Genomic Sci* 1:63–67.
- Mazumder R, Pinkart HC, Alban PS, Phelps TJ, Benoit RE (2000) Low-substrate regulated microaerophilic behavior as a stress response of aquatic and soil bacteria. *Curr Microbiol* 41:79–83.
- McDonald LC, Hackney CR, Ray B (1983) Enhanced recovery of injured *Escherichia coli* by compounds that degrade hydrogen peroxide or block its formation. *Appl Environ Microbiol* 45:360–5.
- McDougald D, Rice S a, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S (2012) Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* 10:39–50.
- McGuinness LM, Salganik M, Vega L, Pickering KD, Kerkhof LJ (2006) Replicability of bacterial communities in denitrifying bioreactors as measured by PCR/T-RFLP analysis. *Environ Sci Technol* 40:509–15.
- McMahon KD, Martin HG, Hugenholtz P (2007) Integrating ecology into biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 18:287–92.

- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M (2013) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14:60.
- Mira A, Martín-Cuadrado A (2010) The bacterial pan-genome: a new paradigm in microbiology. *Int Microbiol* 13:45–57.
- Mizunoe Y, Wai SN, Ishikawa T, Takade A, Yoshida S (2000) Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation. *FEMS Microbiol Lett* 186:115–20.
- Mizunoe Y, Wai SN, Takade A, Yoshida S (1999) Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-degrading compounds. *Arch Microbiol* 172:63–7.
- Monk CE, Pearson BM, Mulholland F, Smith HK, Poole RK (2008) Oxygen- and NssR-dependent globin expression and enhanced iron acquisition in the response of *Campylobacter* to nitrosative stress. *J Biol Chem* 283:28413–25.
- Moreno-Paz M, Gómez M, Arcas A, Parro V (2010) transcriptome analysis reveals physiological differences between biofilm and planktonic modes of life of the iron oxidizing bacteria *Leptospirillum* spp. in their natural microbial community. *BMC Genomics* 11:1–14.
- Morgan-Sagastume F, Allen DG (2003) Effects of temperature transient conditions on aerobic biological treatment of wastewater. *Water Res* 37:3590–601.
- Morgan-Sagastume F, Grant Allen D (2005) Activated sludge deflocculation under temperature upshifts from 30 to 45 degrees C. *Water Res* 39:1061–74.
- Morgan-Sagastume F, Larsen P, Nielsen JL, Nielsen PH (2008) Characterization of the loosely attached fraction of activated sludge bacteria. *Water Res* 42:843–54.
- Muyzer G, de Waal EC, 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.
- Muzzi A, Donati C (2011) Population genetics and evolution of the pan-genome of *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Med Microbiol* 301:619–22.
- Nachin L, Nannmark U, Nyström T (2005) Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *J Bacteriol* 187:6265-72.
- Nadarajah N, Allen DG, Fulthorpe RR (2007) Effects of transient temperature conditions on the divergence of activated sludge bacterial community structure and function. *Water Res* 41:2563–71.
- Nadarajah N, Allen DG, Fulthorpe RR (2010) Composition of activated sludge settling and planktonic bacterial communities treating industrial effluent and their correlation to settling problems. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:1205–14.

- Nath KA, Ngo EO, Hebbel RP, Croatt AJ, Zhou B, Nutter LM (1995)  $\alpha$ -Ketoacids scavenge H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro and in vivo and reduce menadione-induced DNA injury and cytotoxicity. *Am J Physiol Cell Physiol* 268:C227–236.
- Nation JL (1983) A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. *Biotech Histochem* 58:347–351.
- Neufeld RD (1976) Heavy metals-induced deflocculation of activated sludge. *J Water Pollut Control Fed* 48:1940–1947.
- Novitsky J a., Morita RY (1976) Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation of a psychrophilic marine vibrio. *Appl Environ Microbiol* 32:617–22.
- Novitsky J a., Morita RY (1978) Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions. *Mar Biol* 48:289–295.
- Nyström T, Neidhardt F (1994) Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Mol Microbiol* 11:537–544.
- Nyström T, Neidhardt FC (1996) Effects of overproducing the universal stress protein, UspA, in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 178:927–30.
- O'Toole G, Kaplan H, Kolter R (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54:49–79.
- Oliver A, Lilley AK, Van der Gast CJ (2012) Species-time relationships for bacteria. *Microb. Ecol. Theory*. Caister academic press, Norfolk, UK, pp 71–86.
- Paddick J, Brailsford S, Rao S, Soares R, Kidd E, Beighton D, Homer K (2006) Effect of biofilm growth on expression of surface proteins of *Actinomyces naeslundii* genospecies 2. *Appl Environ Microbiol* 72:3774–3779.
- Pagaling E, Strathdee F, Spears BM, Cates ME, Allen RJ, Free A (2013) Community history affects the predictability of microbial ecosystem development. *ISME J* 1–12.
- Park C, Novak JT, Helm RF, Ahn Y-O, Esen A (2008) Evaluation of the extracellular proteins in full-scale activated sludges. *Water Res* 42:3879–89.
- Pernthaler J, Glöckner F-O, Schönhuber W, Amann R (2001) Fluorescence *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Mar Microbiol* 30:207–210.
- Possemiers S, Verthé K, Uyttendaele S, Verstraete W (2004) PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol* 49:495–507.
- Preston F (1960) Time and space and the variation of species. *Ecology* 41:612–627. Prosser
- Jl, Bohannan BJM, Curtis TP, Ellis RJ, Firestone MK, Freckleton RP, Green JL, Green LE, Killham K, Lennon JJ, Osborn a M, Solan M, van der Gast CJ, Young JPW (2007) The role of ecological theory in microbial ecology. *Nat Rev Microbiol* 5:384–92.

- Qu JH, Yuan HL (2008) *Sediminibacterium salmoneum* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum *Bacteroidetes* isolated from sediment of a eutrophic reservoir. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2191–4.
- Raup DM, Crick RE (1979) Measurement of faunal similarity in paleontology. *J Paleontol* 53:1213–1227.
- Resch A, Rosenstein R, Nerz C, Götz F (2005) Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol* 71:2663–2676.
- Rittmann BE, Hausner M, Löffler F, Love NG, Muyzer G, Okabe S, Oerther DB, Peccia J, Raskin L, Wagner M (2006) A vista for microbial ecology and environmental biotechnology. *Environ Sci Technol* 15:1096–1103.
- Roeselers G, Zippel B, Staal M, van Loosdrecht M, Muyzer G (2006) On the reproducibility of microcosm experiments - different community composition in parallel phototrophic biofilm microcosms. *FEMS Microbiol Ecol* 58:169–78.
- Roma-Rodrigues C, Santos PM, Benndorf D, Rapp E, Sá-Correia I (2010) Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to phenol at the level of membrane proteome. *J Proteomics* 73:1461–78.
- Rosenzweig ML (1995) Species diversity in space and time. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Sarlin T, Halttunen S, Vuoriranta P, Puhakka J (1999) Effects of chemical spills on activated sludge treatment performance in pulp and paper mills. *Water Sci Technol* 40:319–325.
- Schembri MA, Kjaergaard K, Klemm P (2003) Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 48:253–67.
- Schramm a, Santegoeds CM, Nielsen HK, Ploug H, Wagner M, Pribyl M, Wanner J, Amann R, de Beer D (1999) On the occurrence of anoxic microniches, denitrification, and sulfate reduction in aerated activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 65:4189–96.
- Schwartz-Mittelmann A, Galil N (2000) Biological mechanisms involved in bioflocculation disturbances caused by phenol. *Water Sci Technol* 42:105–110.
- Seifart Gomes C, Izar B, Pazan F, Mohamed W, Mraheil MA, Mukherjee K, Billion A, Aharonowitz Y, Chakraborty T, Hain T (2011) Universal stress proteins are important for oxidative and acid stress resistance and growth of *Listeria monocytogenes* EGD-e in vitro and in vivo. *PLoS One* 6:e24965.
- Sheng G-P, Yu HQ, Li XY (2010) Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnol Adv* 28:882–94.
- Siegele D (2005) Universal stress proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187:6253–6255.
- Silva CC, Hayden H, Sawbridge T, Mele P, De Paula SO, Silva LCF, Vidigal PMP, Vicentini R, Sousa MP, Torres APR, Santiago VMJ, Oliveira VM (2013)

Identification of genes and pathways related to phenol degradation in metagenomic libraries from petroleum refinery wastewater. *PLoS One* 8:e61811.

Singleton DR, Richardson SD, Aitken MD (2011) Pyrosequence analysis of bacterial communities in aerobic bioreactors treating polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Biodegradation* 22:1061–73.

Sloan WT, Lunn M, Woodcock S, Head IM, Nee S, Curtis TP (2006) Quantifying the roles of immigration and chance in shaping prokaryote community structure. *Environ Microbiol* 8:732–40.

Sloan WT, Woodcock S, Lunn M, Head IM, Curtis TP (2007) Modeling taxa-abundance distributions in microbial communities using environmental sequence data. *Microb Ecol* 53:443–55.

Smalla K, Oros-Sichler M, Milling A, Heuer H, Baumgarte S, Becker R, Neuber G, Kropf S, Ulrich A, Tebbe CC (2007) Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results? *J Microbiol Methods* 69:470–9.

Spiers AJ (2007) Wrinkly-spreader fitness in the two-dimensional agar plate microcosm: maladaptation, compensation and ecological success. *PLoS One* 2:e740.

Staley JT, Konopka A (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* 39:321–46.

Stevenson B, Eichorst S (2004) New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl Environ Microbiol* 70:4748–4755.

Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF (2000) Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl Environ Microbiol* 66:4605–14.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739.

Thompson T, Mefferd R, Wyss O (1951) The protection of bacteria by pyruvate against radiation effects. *J Bacteriol* 39–44.

Torrentó C, Urmeneta J, Otero N, Soler A, Viñas M, Cama J (2011) Enhanced denitrification in groundwater and sediments from a nitrate-contaminated aquifer after addition of pyrite. *Chem Geol* 287:90–101.

Valentín-Vargas A, Toro-Labrador G, Massol-Deyá AA (2012) Bacterial community dynamics in full-scale activated sludge bioreactors: operational and ecological factors driving community assembly and performance. *PLoS One* 7:e42524.

Valle A, Bailey MJ, Whiteley AS, Manefield M (2004) N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) affect microbial community composition and function in activated sludge. *Environ Microbiol* 6:424–433.

- van der Gast CJ, Ager D, Lilley AK (2008) Temporal scaling of bacterial taxa is influenced by both stochastic and deterministic ecological factors. *Environ Microbiol* 10:1411–8.
- Van Dierdonck J, Van den Broeck R, Vervoort E, D'haeninck P, Springael D, Van Impe J, Smets I (2012) Does a change in reactor loading rate affect activated sludge bioflocculation? *Process Biochem* 47:2227–2233.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19:6823–31.
- Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP (2009) Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 14:2535–54.
- Wagner M, Loy A, Nogueira R, Purkhold U, Lee N, Daims H (2002) Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:665–80.
- Wang H, Hu C, Hu X, Yang M, Qu J (2012) Effects of disinfectant and biofilm on the corrosion of cast iron pipes in a reclaimed water distribution system. *Water Res* 46:1070–8.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261–7.
- Watanabe K, Teramoto M, Harayama S (1999) An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. *Appl Environ Microbiol* 65:2813–9.
- Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, Greenberg EP (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413:860–4.
- Whitfield J, Bell G, Hubbell S (2002) Neutrality versus the niche. *Nature* 417:480–481.
- Wilén B, Keiding K, Nielsen P (2000a) Anaerobic deflocculation and aerobic reflocculation of activated sludge. *Water Res* 34:3933–3942.
- Wilén B, Nielsen JL, Keiding K, Nielsen PH (2000b) Influence of microbial activity on the stability of activated sludge flocs. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 18:145–156.
- Wilén B-M, Lumley D, Mattsson A, Mino T (2008a) Relationship between floc composition and flocculation and settling properties studied at a full scale activated sludge plant. *Water Res* 42:4404–18.
- Wilén B-M, Onuki M, Hermansson M, Lumley D, Mino T (2008b) Microbial community structure in activated sludge floc analysed by fluorescence *in situ* hybridization and its relation to floc stability. *Water Res* 42:2300–8.
- Wilmes P, Wexler M, Bond PL (2008) Metaproteomics provides functional insight into activated sludge wastewater treatment. *PLoS One* 3:e1778.

- Wittebolle L, Van Vooren N, Verstraete W, Boon N (2009) High reproducibility of ammonia-oxidizing bacterial communities in parallel sequential batch reactors. *J Appl Microbiol* 107:385–94.
- Woodcock S, van der Gast CJ, Bell T, Lunn M, Curtis TP, Head IM, Sloan WT (2007) Neutral assembly of bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 62:171–80.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134.
- Yilmaz LS, Parnerkar S, Noguera DR (2011) mathFISH, a web tool that uses thermodynamics-based mathematical models for *in silico* evaluation of oligonucleotide probes for fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* 77:1118–22.
- Yura T, Nagai H, Mori H (1993) Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 47:321–50.
- Zeller T, Klug G (2006) Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Naturwissenschaften* 93:259–266.
- Zhang Y (2008) Understanding deflocculation of activated sludge under transients of short-term low dissolved oxygen. PhD Thesis. University of Toronto, Canada.
- Zita A, Hermansson M (1994) Effects of ionic strength on bacterial adhesion and stability of flocs in a wastewater activated sludge system. *Appl Environ Microbiol* 60:3041–8.

**Para citar este documento**

Ayarza, Joaquín Manuel (2015). Desarrollo de la comunidad bacteriana del *floc* biológico de barros activados y respuesta a la desestabilización mediada por agentes externos (Tesis de posgrado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina: Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto. Disponible en: <http://ridaa.demo.unq.edu.ar>