

REVISTA AIDIS

de Ingeniería y Ciencias ambientales:
Investigación, desarrollo y práctica.

APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS NITRIFICANTES Y DESNITRIFICANTES ADHERIDOS A ZEOLITAS NATURALES

*APPLICATION OF MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES FOR THE
IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS NITRIFYING AND
DENITRIFYING ATTACHED ON NATURAL ZEOLITE*

Abstract

This study identified microbial populations in nitrifying and denitrifying batch reactors using Chilean natural zeolite with different diameters for microbial support. The microbial populations were analyzed using molecular biology techniques: DGGE and FISH, founding that Gamaproteobacteria are the best adapted to the present nitrification and denitrification conditions. Nitrifying reactors showed similarity in their microbiological composition independent of the support size used, presenting all 80% of Gammaproteobacteria. However, the denitrifying reactors showed a big diversity, finding Bacteria and Archaea in different proportions depending of the diameter utilized. It is recommended DGGE and subsequent FISH analysis with specific probes to determine Gamaproteobacteria and Archaea species involved.

Key words: Denitrification; DGGE; FISH; Nitrification; Zeolite.

¹ Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Técnica Federico Santa María, Chile.

² Departamento de Ingeniería Química, Universidad Santiago de Compostela, España.

³ Departamento de Ingeniería Química, Universidad Santiago de Chile.

⁴ Centro de Ciencias Ambientales, Universidad de Concepción, Chile.

*Corresponding autor: Av. España 1680, Valparaíso – 2390123 – Chile. Tel.: 56-32-2654303– Fax.:56-32-2654478. Email: mery.camila@gmail.com

Resumen

En este estudio se identificaron las poblaciones microbianas presentes en reactores batch nitrificantes y desnitrificantes que utilizan zeolita natural chilena de diferentes diámetros como soporte microbiano. Las poblaciones microbianas se analizaron mediante las técnicas de biología molecular DGGE y FISH, encontrando que las bacterias pertenecientes a la clase Gammaproteobacterias son las mejores adaptadas a las condiciones de nitrificación y desnitrificación presentes. Los reactores nitrificantes presentaron similitud en su composición microbiológica independientemente del diámetro de soporte utilizado, presentando todos un 80% de Gammaproteobacterias. Los desnitrificantes, en cambio, presentaron gran diversidad, encontrando tanto Bacterias como Arqueas en diferentes proporciones dependiendo del diámetro utilizado. Se recomienda realizar análisis de DGGE y posterior FISH con sondas específicas para determinar para determinar las especies de Gammaproteobacterias y Arqueas involucradas.

Palabras claves: Desnitrificación; DGGE; FISH; Nitrificación; Zeolita.

Introducción

La actividad humana está modificando la velocidad de algunos de los procesos involucrados en el ciclo natural del nitrógeno, produciendo acumulaciones de compuestos nitrogenados en las aguas y, en consecuencia, la contaminación de estas (Camargo y Alonso, 2006). Uno de los métodos ampliamente utilizados en la eliminación de nitrógeno presente tanto en aguas residuales urbanas como en gran parte de las aguas industriales, es la combinación de los procesos biológicos de nitrificación y desnitrificación. En la nitrificación el amonio se oxida secuencialmente a nitrito y nitrato mediante la intervención de dos grupos distintos de bacterias autótrofas: las bacterias oxidantes de amonio (BAO) que realizan la oxidación de amonio a nitrito, y las bacterias oxidantes de nitrito (BNO) que llevan a cabo la oxidación del nitrito a nitrato. La desnitrificación, reducción de nitrato a nitrógeno molecular en condiciones anóxicas, es llevada a cabo por diferentes géneros de bacterias, tanto heterótrofas como autótrofas.

El interés por la identificación de las diferentes poblaciones bacterianas presentes en sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales ha ido en aumento durante las dos últimas décadas, ya que permite una mejor comprensión de los procesos involucrados en la depuración de aguas residuales. En este estudio se evaluarán las principales poblaciones microbianas presentes en reactores *batch* nitrificantes y desnitrificantes que utilizan zeolita natural chilena de diferentes tamaños como medio de soporte. Esta evaluación se realizará mediante un análisis cuantitativo a través de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) y cualitativo utilizando electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE). El medio de soporte utilizado es un mineral microporoso capaz de adsorber iones de amonio con una superficie rugosa e irregular y gran área superficial, convirtiéndolo en un excelente soporte para el desarrollo de biopelículas microbianas (Fernández et al. 2007). La constante transferencia de

iones de amonio entre la zeolita y el medio proporciona amonio disponible para los microorganismos que forman la biopelícula, específicamente para los microorganismos nitrificantes (Park *et al.*, 2002).

Metodología

La operación de los reactores *batch* se realizó en la Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile, a través de dos sistemas. Cada sistema se operó con un caldo de cultivo nitrificante y desnitrificante, respectivamente, utilizando diámetros de zeolita de 0.5, 1 y 2 mm en cada caso. Las características de los reactores dependían del tipo de digestión, y estos a su vez del diámetro de soporte utilizado.

Los reactores nitrificantes fueron operados a 20°C, a un pH de 8 y un tiempo de operación de 25 días. Estos reactores utilizaron un medio de cultivo con las siguientes características en g/L: NH₄Cl 0,764; Urea 0,45; Extracto de levadura 0,28; FeSO₄·7H₂O 0,0992; NaHCO₃ 3,12; KH₂PO₄ 0,181 y 1 mL/L de solución salina. Los reactores desnitrificantes, en cambio, fueron operados a 37°C con un pH de 7 y un tiempo de operación de 28 días. En ellos, se utilizó el siguiente medio de cultivo en g/L: CH₃COOK 1,5; MgSO₄·7H₂O 0,08; NaCl 0,3; Extracto de levadura 0,2; KNO₃ 1,56; K₂HPO₄ 5,0; KH₂PO₄ 1,5 y 1 mL/L de solución salina. La composición de la solución salina utilizada en ambos casos es la siguiente: EDTA 0.15 g/L; HCl 1 mL/L; FeSO₄ 2g/L; HBr 0.05 g/L; ZnCl₂ 0.05 g/L; MgCl₂ 0.05 g/L.

De estos reactores se extrajeron muestras de biomasa junto con zeolita al comienzo y final de la experiencia, las que fueron fijadas y refrigeradas en Chile, siguiendo el protocolo descrito por Amann *et al.* (1995). Estas muestras fueron sometidas a ultrasonido durante 30 segundos y al 40 % de amplitud del equipo (Branson Sonifier 150) para desadherir la biomasa y luego fijarla en paraformaldehído al 4% en PBS. Posteriormente, se analizaron mediante las técnicas DGGE y FISH.

Fijación celular. La fijación celular se realizó según el procedimiento descrito por Amann *et al.* (1995) con 4% [peso/volumen] de paraformaldehído en solución salina amortiguada por fosfatos (PBS).

FISH. Se siguió el procedimiento descrito por Amann *et al.* (1995), en el que se distinguen cuatro pasos: fijación de la biomasa, inmovilización sobre el portaobjetos, hibridación y análisis microscópico. La hibridación se llevó a cabo a una temperatura constante de 46°C durante un periodo de 120 minutos, ajustando el porcentaje de formamida a los valores indicados en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias, organismos objetivo y porcentaje de formamida (%FA) utilizados.

Sonda	Fluor.	Secuencia (5'→3')	% FA	Organismo objetivo
EUB338I	Fluos	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	20	Dominio <i>Bacteria</i>
ALF1B	Fluos	CGT TCG YTC TGA GCC AG	20	<i>Alphaproteobacteria</i> , algunas <i>Deltaproteobacteria</i> , <i>Spirochaetes</i>
NIT3*	Cy3	CCT GTG CTC CAT GCT CCG	40	<i>Nitrobacter</i> spp.
NITComp		CCT GTG CTC CAT GCT CCG		
BET42a*	Cy3	GCC TTC CCA CTT CGT TT	35	<i>Betaproteobacteria</i>
BETComp	-	GCC TTC CCA CAT CGT TT		
NSO190	Cy3	CGA TCC CCT GCT TTT CTC C	55	<i>Betaproteobacteria oxidantes de amonio</i>
GAM42a*	Cy3	GCC TTC CCA CAT CGT TT	35	<i>Gammaaproteobacteria</i>
GAMComp	-	GCC TTC CCA CTT CGT TT		
GAOQ431	Cy3	TCC CCG CCT AAA GGG CTT	35	<i>Candidatus Competibacter phosphatis</i>
ARC915	Cy3	GTG CTC CCC CGC CAA TTCCT	40	<i>Archaea</i>
MX825	Cy3	TCG CAC CGT GGC CGA CAC CTA GC	50	Algunas <i>Methanosaetaceae</i>
MS821	Fluos	CGC CAT GCC TGA CAC CTA GCG AGC	40	<i>Methanosarcina</i>
MB1174	Cy3	TAC CGT CGT CCA CTC CTT CCT C	45	<i>Methanobacteriales</i> (menos <i>Methanothermus</i>)

*Sondas usadas con una concentración equimolar de competidor sin fluorocromo.

En cada pocillo de los portaobjetos se realizó la hibridación empleando sondas con los fluorocromos fluoresceína-5-isotiocianato (Fluos), cianina (Cy3) y 4,6-diamidino-2-fenilindol diclorohidrato (DAPI). Este último es un colorante universal que se une al ADN permitiendo visualizar todas las células de la muestra. Las señales de fluorescencia se registraron a través de una cámara digital (Coolsnap, Roper Scientific Photometrics) acoplada al microscopio de epifluorescencia (Axioskop 2 plus, Zeiss) equipado con los filtros correspondientes para visualizar cada fluorocromo empleado dado que cada uno de ellos presenta un espectro de excitación y emisión característico y único.

DGGE. Se realizó análisis DGGE según lo descrito por Alonso-Gutiérrez *et al.* (2009). Las muestras analizadas fueron las del reactor anaerobio con diámetro de zeolita de 1 mm. El ADN se extrajo a través del kit MoBio Power Soil™ siguiendo el protocolo del fabricante. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando el termociclador Veriti. Se empleó la combinación de primers universales F341-GC y R907 (Yu and Morrison, 2004). Los productos de la PCR se cargaron en un gel de poli(acrilamida) al 6% (peso/volumen) formado con un gradiente desnaturante de formamida/urea que variaba desde el 40 al 75%, para ello se utilizó el

equipo INGENY phorU, operado a 60°C y 100 V durante 16 h. Las bandas más intensas se secuenciaron y clasificaron mediante comparación con la base de datos existentes en Gen Bank, utilizando el software computacional Blast (BLASTN, Altschul *et al.*, 1990).

Resultados y Discusión

FISH. Los reactores nitrificantes presentaron diversidad microbiana similar independiente del tamaño de zeolita utilizado como soporte microbiano. En todos los reactores con medio de cultivo nitrificante dominaron las Gammaproteobacterias con un 80%, también se identificaron Betaproteobacterias con porcentajes alrededor de 12%.

Dentro de las Betaproteobacterias se determinó la presencia de Betaproteobacterias amonio-oxidantes, sin embargo no fueron identificadas. Se determinó, también, la presencia de *Nitrobacter* las cuales oxidan el nitrito a nitrato, sin embargo, tampoco fueron identificadas. Los amplios porcentajes de Gammaproteobacterias encontradas y la no identificación de Betaproteobacterias amonio-oxidantes parecerían indicar que tanto las BAO, como las BNO pertenecen a la clase Gammaproteobacterias.

Por otro lado, *In situ*, se pudo observar que los tamaños de zeolita de 0.5 y 1 mm poseían una forma y agrupación similar de Gammaproteobacterias. Situación contraria a la observada en la zeolita de tamaño 2 mm (Figura 1). De lo anteriormente expuesto se podría inferir que se trataría de especies diferentes; sin embargo, hacen falta estudios más exhaustivos para afirmar o rechazar la hipótesis expuesta.

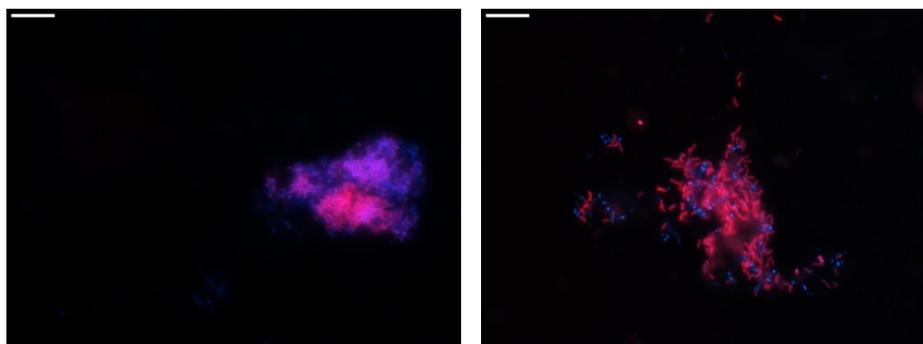


Figura 1. Imagen de FISH. Gammaproteobacterias (Cy3: rojo) sobrepuesto en toda la biomasa (DAPI: azul). Izquierda: Muestra de reactor aerobio con soporte de 0,5 mm. Derecha: Muestra de reactor aerobio con soporte de 2 mm. Barra indica 10 um.

Nogueira *et al.* (2002) en su estudio sobre poblaciones nitrificantes que utilizan polietileno expandido como medio de soporte, señalan que las Betaproteobacterias fueron las bacterias dominantes, mientras que las Gammaproteobacterias fueron prácticamente indetectables. Utilizando polietileno granulado en sistemas de nitrificación, según lo estudiado por Kim *et al.* (2006), un 80% de las bacterias corresponden a Alfaproteobacterias y Betaproteobacterias. Utilizando un medio de cultivo similar al utilizado por ambos autores y zeolita natural chilena como medio de soporte, el presente estudio indica que el 80% de las bacterias corresponde a Gammaproteobacterias, por ende el tipo de soporte influiría en la biodiversidad que lo coloniza, siendo independiente del diámetro de soporte utilizado.

Al igual que en los reactores nitrificantes, todos los reactores desnitrificantes presentaron Gammaproteobacterias, sin embargo la cantidad identificada fue menor. En estos últimos reactores, el mayor porcentaje fue de 70% correspondiente al tamaño de 0.5 mm, mientras que para los diámetros de 1 mm y 2 mm fue de 20% y 30% respectivamente, es decir, mientras menor es el tamaño de zeolita mayor es la cantidad de Gammaproteobacterias.

Se analizó la presencia de Betaproteobacterias sin embargo no fueron identificadas. Estudios recientes sobre en sedimentos marinos (Heath *et al.*, 2008) muestran alta abundancia de *Gammaproteobacterias* en procesos de nitrificación y desnitrificación, atribuibles a un alto nivel de metabolismo de esta clase que permite responder a los rápidos cambios de oxígeno y sustratos que se producen en las arenas del mar.

Dentro de la clase Gammaproteobacterias se identificó la presencia de *Candidatus Competibacter phosphatis* en todos los reactores anaerobios con similar porcentaje, la identificación de estos es importante en procesos de eliminación de fósforo ya que compiten con las bacterias que lo acumulan haciendo menos efectivo este proceso (Gregary *et al.*, 2002). Se analizó la presencia de Arqueas en todos los reactores desnitrificantes, encontrándolas sólo en uno.

El reactor que presentó Arqueas fue el de tamaño de soporte 1 mm, identificándose un 70% de estas (Figura 2, derecha), lo que indicaría que este tamaño de soporte genera las condiciones óptimas para su desarrollo.

La desnitrificación es un proceso anaerobio llevado a cabo por microorganismos filogenéticamente distintos de grupos de bacterias y arqueas (Zumft, 1997; Cheneby *et al.*, 2000) por lo que existe la posibilidad que las arqueas encontradas participen en la eliminación de nitrógeno.

Debido a la fluorescencia natural (Figura 2) de la zeolita el fondo fue demasiado alto como para permitir una cuantificación precisa de los grupos bacterianos hibridados con sondas marcadas con fluorescencia Fluos.

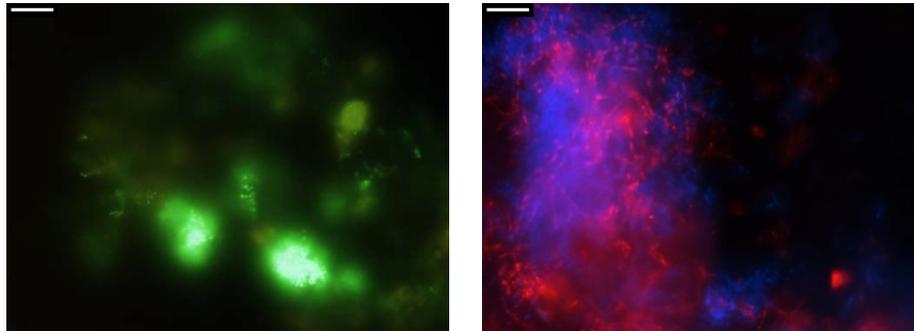


Figura 2. Imagen de FISH. Izquierda. Muestra de reactor aerobio con soporte de 0,5 mm. Eubacterias (Fluos:verde), se observa fuerte fluorescencia de la muestra tras aplicar la sonda fluos. Derecha. Muestra de reactor anaerobio con soporte 1 mm. Arquea (Cy3: rojo) sobrepuesto en toda la biomasa (DAPI:azul); Barra indica 10 um

DGGE. Dado que tras realizar FISH se detectó una mayor diversidad en la muestra del reactor desnitrificante cuyo diámetro de soporte era de 1 mm, se decidió estudiar la evolución de la biodiversidad de dicho reactor mediante DGGE, comparando las principales poblaciones microbianas presentes en el inóculo y en la biopelícula formada tras la operación del reactor, denominadas DNB1 y DNB3, respectivamente.

Los resultados de DGGE muestran un marcado cambio poblacional. Mientras que en el inóculo los organismos predominantes detectados pertenecen a las clases *Flavobacteria* y *Bacteroidetes*, al final de la operación del reactor, todas las secuencias identificadas parecen estar relacionadas con el *phylum Firmicutes*.

Cabe destacar que la mayoría de estas bandas corresponden a bacterias no cultivadas encontradas en plantas de tratamiento anaerobio de aguas residuales. La banda 6, en cambio, corresponde a una bacteria responsable de la desnitrificación en campos de arroz (Ishii *et al.*, 2009). Esto indicaría que la presencia de Arqueas no dificulta el desarrollo de especies microbianas desarrolladas normalmente en sistemas de tratamiento de aguas residuales al igual que especies que lleven a cabo la desnitrificación.

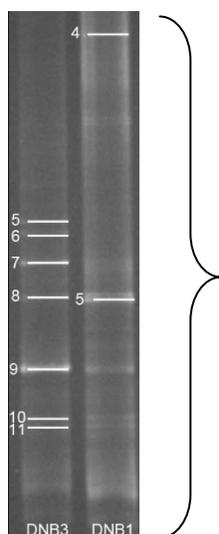


Figura 3. Lado izquierdo.

Gel de técnica DGGE donde se señalan las bandas de muestras DNB1 y DNB3 con sus respectivos cortes enumerados. Lado derecho. Bandas de interés cortadas y los organismos más cercanos filogenéticamente encontrados.

Muestra	Banda	Mejor resultado (Nº de acceso)	Organismo más cercano (% similitud)
DNB1	4	Uncultured bacterium nbw139f01c1 (GQ047959)	Flavobacteria (94%)
DNB1	5	Uncultured bacterium D242_27F_BAC_019 (AB447697)	Bacteroidetes (99%)
DNB3	5	Uncultured bacterium clone LaYa5b-55 (GU291589)	Clostridium (99%)
DNB3	6	Uncultured bacterium clone: TSNIR002_A18 (AB487194)	Clostridium (98%)
DNB3	7	Bacterium enrichment culture clone DPHE06 (GQ377119)	Clostridium (99%)
DNB3	8	Uncultured bacterium clone HAW-RM37-2-B-877d-A14 (FN563219)	Bacteroidetes (99%)
DNB3	9	Uncultured Clostridiales bacterium clone DS166 (DQ234248)	Frigovirgula (100%)
DNB3	10	Uncultured Firmicutes QEDN2BH06 (CU925649)	Firmicutes (99%)
DNB3	11	Uncultured bacterium clone IA-23 (AJ488074)	Firmicutes (99%)

Conclusiones y Recomendaciones

Los reactores nitrificantes mostraron similitud en su composición microbiológica, independiente del tamaño de zeolita utilizado. Cada uno presentó un 80% de Gammaproteobacterias. Considerando el alto porcentaje y la ausencia de Betaproteobacterias amonio-oxidantes y *Nitrobacter*, podría indicarse que las bacterias amonio-oxidantes y nitrito-oxidantes presentes en los reactores estudiados pertenezcan a Gammaproteobacterias.

Los reactores desnitrificantes, en cambio, presentaron gran diversidad microbiológica, encontrando tanto Bacterias como Arqueas en las muestras estudiadas. Cada reactor desnitrificante presentó Gammaproteobacterias y sólo el reactor cuyo diámetro de soporte era 1 mm presentó Arqueas. Las bacterias desnitrificantes se caracterizan por ser microorganismos filogenéticamente distintos, por ello existe la posibilidad de que la Arqueas encontradas sean bacterias desnitrificantes.

En los reactores nitrificantes como desnitrificantes, independientemente del tamaño de soporte utilizado, se identificaron Gamaproteobacterias, lo que indicaría que esta clase de bacterias es la mejor adaptada a las condiciones presentes en el medio, es decir, que el amonio disponible

para los microorganismos que forman la biopelícula podría ser metabolizado por esta clase de bacterias. Sin embargo, se recomienda para posteriores estudios similares la realización de DGGE de bacterias en todos los reactores nitrificantes y desnitrificantes y de DGGE de arqueas en desnitrificantes, con el fin de determinar las especies presentes, para luego aplicar la técnica FISH con la sonda específica que hibride a esa bacteria y de esta forma determinar su metabolismo, y su cuantificación.

La zeolita al ser de origen mineral presenta algunos problemas de autofluorescencia al aplicar la técnica FISH, por ello se recomienda el uso de un protocolo de FISH para suelos en estudios posteriores.

Agradecimientos

Este estudio fue posible gracias al financiamiento del proyecto FONDECYT 1090414, Chile y apoyado en la toma de muestras y fijación celular por Gabriela Valdes y Monserrat Vásquez de la Universidad Técnica Federico Santa María, Chile.

Referencias Bibliográficas

- Alonso-Gutiérrez J., Figueras A., Albaiges J., Jimenez N, Vinas M, Solanas AM, Novoa B (2009). Bacterial communities from shoreline environments (costa de morte, northwestern Spain) affected by the pesticide oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**(11), 3407-3418.
- Amann R., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**(1), 143-169.
- Camargo J.A. and Alonso A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, **32**(6), 831-849.
- Cheneby D., Philippot L, Hartmann A, Henault C., Germon J.C. (2000). 16 rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from tree agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology*, **34**(2), 121-128.
- Fernández N., Montalvo S., Fernández - Polanco F., Guerrero L., Cortés I., Borja R., Sánchez E., Travieso L. (2007). Real evidence about zeolite as microorganisms immobilizer in anaerobic fluidized bed reactors. *Process Biochemistry*, **42**, 721-728.
- Gregory R. Crocetti, Jillian F. Banfield, Jürg Keller, Philip L. Bond and Linda L. Blackall (2002). Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full scale wastewater treatment processes. *Microbiology*, **148**, 3353-3364.
- Heath J. Mills, Evan Hunter, Mike Humphrys, Lee Kerkhof, Lora McGuinness, Markus Huetzel, y Joel E. Kostk (2008). Characterization of Nitrifying, Denitrifying, and Overall Bacterial Communities in Permeable Marine Sediments of the Northeastern Gulf of Mexico. *Applied and environmental microbiology*, **74**(14), 4440-4453.
- Ishii S., Yamamoto M., Kikuchi M., Oshima K., Otsuka S. and Senoo K. (2009). Microbial population responsive to denitrification-inducing conditions in rice paddy soil, as revealed by comparative 16S rRNA gene analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **75** (22), 770-7078.
- Kim D., Lee D., Keller J. (2006). Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by Fish. *Bioresour Technol*, **97**(3), 459-468.

- Nielsen H., Daims H. and Lemmer H. (2009). FISH handbook for biological wastewater treatment, IWA Publishing, London, UK.
- Nogueira R., Melo L., Purkhold U., Wuertz S., Wagner M. (2002). Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon. *Water Research*, **36**(2), 469-481.
- Yu Z.T. and Morrison, M. (2004). Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(8), 4800-4806.
- Zumft W.G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **61**(4), 533-536.