



Universitat Autònoma de Barcelona

## **FACULTAT DE CIÈNCIES**

### ***Secció de Ciències Ambientals***

#### **LA TÈCNICA FISH I EL MICROSCOPI CONFOCAL APLICATS A LA DETERMINACIÓ DE FRACCIONS DE BIOMASSA EN UN REACTOR AEROBI NITRIFICANT**

Memòria del Projecte Fi de Carrera de Ciències Ambientals

presentada per:  
Alexis Marsol i Vall  
i dirigida per na Irene Jubany i  
Güell

Bellaterra, a 21 de febrer de 2007

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| 1. OBJECTIUS                                | 3  |
| 2. INTRODUCCIÓ                              | 4  |
| La tècnica FISH                             | 4  |
| 2.1.1. Fonaments FISH                       | 4  |
| 2.1.2. Aplicació del FISH                   | 5  |
| Microscopi confocal                         | 6  |
| 2.2.1. Principis de la fluorescència        | 6  |
| 2.2.2. El fluorocrom                        | 7  |
| 2.2.3. Principis de la microscòpia confocal | 8  |
| El Nitrogen                                 | 11 |
| 2.3.1. El cicle del nitrogen en les A.R.U.  | 11 |
| 2.3.2. Nitrificació parcial                 | 12 |
| 3. MATERIAL I MÈTODES                       | 15 |
| 3.1. La tècnica FISH                        | 15 |
| 3.1.1. El protocol                          | 15 |
| 3.1.2. La preparació                        | 17 |
| 3.1.3. Les sondes utilitzades               | 18 |
| 3.2. Microscopi confocal Leica TCS SP2 AOBS | 19 |
| 3.2.1. Paràmetres inicials                  | 19 |
| 3.2.2. Paràmetres variables                 | 21 |
| 3.2.3. Altres funcions del software         | 22 |
| 3.2.4. La nostra configuració               | 23 |
| 3.3. El protocol                            | 24 |
| 3.4. La quantificació                       | 25 |
| 3.5. Les mostres                            |    |
| 3.5.1. La planta pilot                      | 26 |
| 3.5.2. Les mostres utilitzades              | 29 |
| 4. RESULTATS                                | 31 |
| 4.1. Resultats de la quantificació          | 34 |
| 5. DISCUSSIÓ                                | 36 |
| 6. CONCLUSIONS                              | 38 |
| 7. BIBLIOGRAFIA                             | 40 |
| ANNEXOS                                     |    |

## **1. OBJECTIUS**

L'objectiu principal d'aquest projecte és aprofundir en l'ús i aplicació de la tècnica FISH i el microscopi confocal en la determinació de fraccions de biomassa en un reactor aerobi nitrificant . A més d'establir un protocol d'ús del microscopi confocal per a la observació de mostres sotmeses a una hibridació in situ.

En cas de que l'experimentació amb la tècnica esmentada doni resultats positius es procedirà a comparar i discutir els resultats obtinguts en les dues sondes específiques i a establir relacions amb les dues mostres analitzades, les característiques de la qual són conegudes.

Com a últim objectiu, caldrà comparar i discutir els resultats obtinguts en la nostra experimentació amb altres treballs realitzats en la mateixa temàtica per tal de poder validar i donar suport als resultats.

## 2. INTRODUCCIÓ

Aquest és un treball de tipus experimental, és a dir, obtenir resultats a partir de l'experimentació en el laboratori. En el nostre cas, el que es busca, és identificar la biomassa present en el reactor aerobi segons les condicions d'operativitat de la planta de tractament d'aigües residuals que es descriu en l'apartat de material i mètodes i també quantificar de forma percentual la proporció dels principals gèneres de bacteris que intervenen en l'activitat biològica del reactor. Degut a que el nombre i l'activitat fisiològica dels microorganismes amonioxidants són generalment paràmetres limitants en l'eliminació de nitrogen de les aigües residuals, és molt important poder fer una identificació d'aquests autòtrofs en els fangs activats (Wagner M. et al. 1995).

D'una forma general, el que es fa és agafar mostres de la biomassa del reactor. Aquestes mostres, un cop fixades, són posteriorment sotmeses a un procés d'hibridació in situ, conegut com a FISH (Fluorescent In Situ Hybridization). Un cop tenim les mostres preparades s'observen amb el microscopi confocal.

Anteriorment, a l'aparició del FISH, l'anàlisi de mostres biològiques en el procés de tractament d'aigües residuals es podia realitzar a partir de l'aïllament de colònies i de tècniques de caracterització fisiològica. Però en aquest cas ens trobem amb diverses limitacions com són: la incapacitat de cultivar la majoria de microorganismes ja que normalment les mostres són molt heterogènies, i en cas de poder-ho fer, l'activitat dels microorganismes diferirà amb tota seguretat de la que tenen quan es troben in situ (Schramm A. 2003).

### 2.1. La tècnica FISH

#### 2.1.1 Fonaments FISH

FISH són les sigles provinents del nom de la tècnica en anglès *Fluorescent In Situ Hybridization*. Aquesta tècnica prové de la ISH, que significa *In Situ Hybridization* amb la diferència que en el FISH, la cadena hibridada conté un fluorocrom a l'extrem que és el que fa que pugem veure fluorescència en el microscopi confocal.

Així doncs, les tècniques d'hibridació in situ, es basen en el fet de que cadenes d'ADN o ARN complementàries a les sondes s'hibriden sense extreure l'ADN de les cèl·lules per formar híbrids estables que després poden ser visualitzats mitjançant

sistemes de detecció. Com es pot deduir, aquesta tècnica té el seu origen en la biologia molecular i en els seus inicis era una tècnica exclusiva dels camps de la virologia i l'endocrinologia on la tecnologia de l'ADN recombinant ha tingut un impacte molt gran en els diferents camps de recerca. Les condicions òptimes per a la hibridació són molt difícils de determinar, ja que hi ha molts factors que poden conduir a unions no específiques de la sonda i que seran la causa de que hi hagi molt soroll de fons. La sensibilitat de la hibridació in situ dependrà dels següents factors:

- La preparació de la mostra en la retenció i accessibilitat a l'ADN.
- El tipus de construcció de la sonda, incloent l'eficiència de l'etiquetatge de la sonda i el mètode utilitzat per la detecció del senyal.
- L'efecte de les condicions d'hibridació en l'eficiència. Aquestes condicions d'hibridació venen determinades principalment per: la temperatura, el pH, la concentració del desnaturalitzant (normalment formamida) i les concentracions de sal en la solució d'hibridació.

A mesura que la ciència ha anat avançant, els camps d'aplicació d'aquesta tècnica també han anat en augment .

### **2.1.2 Aplicació del FISH**

En el nostre cas s'aplica el fonament de la tècnica anteriorment descrita en la determinació de fraccions de biomassa en un reactor aerobi nitrificant per al tractament d'aigües residuals. El principi en què es basa aquest treball és que un cop coneguts els microorganismes que es detecten amb cada sonda podem realitzar la hibridació i si aquesta és positiva, vol dir que hi ha presència d'aquest microorganisme. A més, podem anar més enllà i quantificar la superfície ocupada per cadascun dels microorganismes trobats. Aquests aspectes es van aprofundint en els punts a continuació.

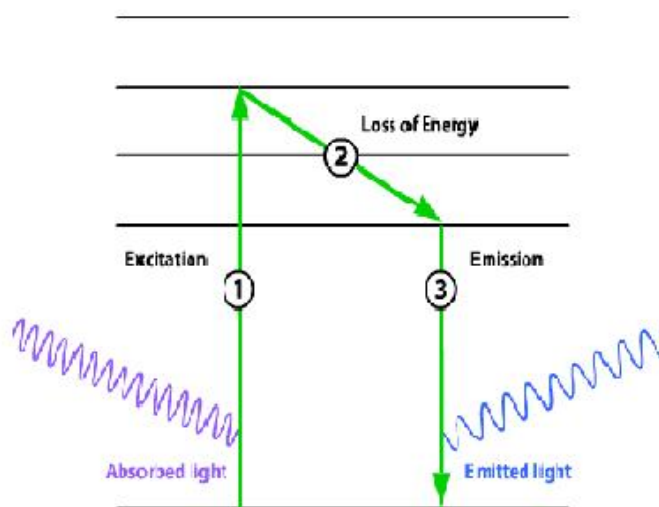
Les sondes juguen un paper molt important en el FISH. Com ja s'ha dit anteriorment, són una cadena de bases nitrogenades complementàries a l'ADN ribosòmic dels microorganismes que volem detectar. En l'Annex 1 es mostra un arbre filogenètic de les sondes utilitzades per a bacteris amonioxidants que és útil per ubicar les diferents sondes amb els microorganismes que permeten detectar.

## 2.2. Microscopi confocal

### 2.2.1. Principis de la fluorescència

La propietat que té el fluorocrom per emetre fluorescència és la que s'utilitza per a visualitzar les mostres que han estat sotmeses al FISH. Així doncs, és convenient explicar en què consisteix aquest fenomen.

Tal i com s'observa en l'esquema de la figura 1, la fluorescència consisteix en excitar una molècula amb energia. Producte de l'augment d'energia, alguns dels electrons d'aquesta molècula passen a un orbital d'energia superior (1). Aquest nivell energètic s'anomena estat d'excitació. De totes maneres, és un estat molt inestable i ràpidament es perd energia en forma de calor. Es poden mantenir en l'estat d'excitació  $1-10 \times 10^{-9}$  segons (2). Finalment, els electrons tornen al seu estat inicial, en la fase coneguda com emissió (3). En aquesta fase la pèrdua d'energia és en forma de llum, però com que ja s'havia perdut una part de l'energia d'excitació en forma de calor en la fase (2) aquesta llum és menys energètica, i per tant, d'una major longitud d'ona. Conseqüentment, la llum emesa és d'un color diferent a l'absorbida. La diferència entre la longitud d'ona de la llum absorbida i la llum emesa s'anomena desplaçament d'Stokes (figura 1). Aquesta llei, que es coneix com a llei d'Stokes, va ser descoberta el 1852 pel científic britànic, Sir George G. Stokes.



**Figura 1:** Esquema de la fluorescència (Diagrama de Jablonsky)

**Font:** <http://www.invitrogen.com/resources/education>

A nivell molecular l'esquema del procés es mostra a continuació:

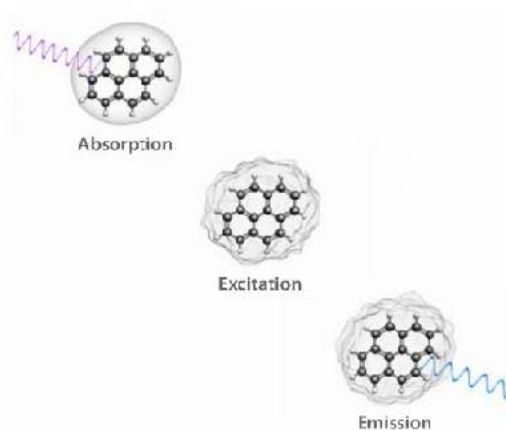


Figura 2: Esquema de la fluorescència a nivell molecular  
Font: <http://www.invitrogen.com/resources/education>

### 2.2.2. El fluorocrom

El fluorocrom és l'apèndix que s'uneix a la cadena d'ADN sintetitzada artificialment per tal de fer possible que la mostra (en cas de que la hibridació sigui positiva) tingui fluorescència i així pugui ser detectada amb el microscopi confocal seguint el principi que s'ha descrit en el punt anterior.

Cal tenir en compte de que en el cas que s'utilitzin diferents sondes en una mateixa mostra caldrà, evidentment, utilitzar fluorocroms de colors diferents perquè sinó a l'hora de mirar la mostra amb el microscopi no podríem distingir una sonda de l'altra.

Els diferents fluorocroms tenen un òptim d'absorció i emissió característic que ja venen especificats pel fabricant. Per tant, coneixent això, sabem quins làsers cal utilitzar en l'excitació del fluorocrom i quin espectre de llum cal captar per poder observar tota la llum emesa per la mostra. Aquest aspecte és clau a l'hora d'observar les mostres en el microscopi confocal, ja que aquest instrument ens permet elegir la longitud d'ona del làser amb la qual volem irradiar la mostra.

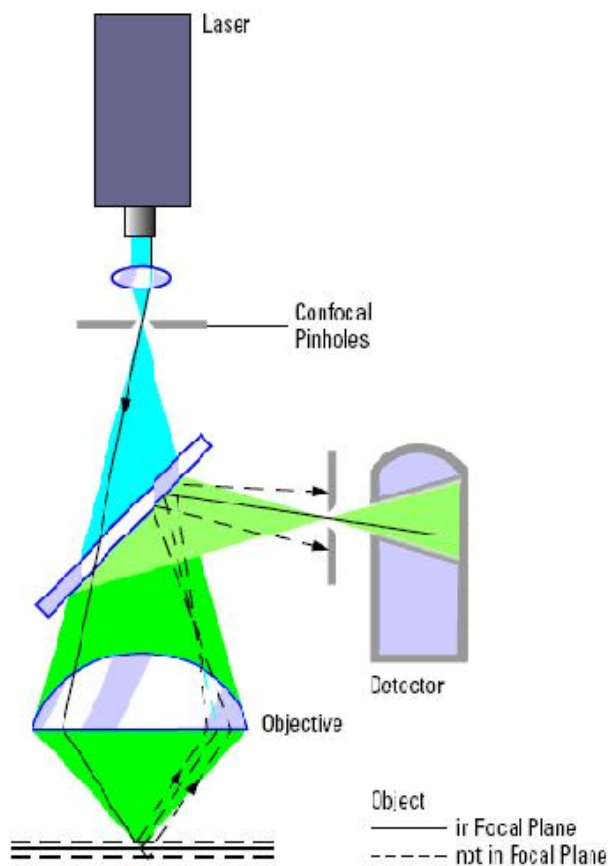
A l'hora d'observar les mostres amb el microscopi cal anar molt en compte a no malmetre el fluorocrom, procés conegut com a *fading* i que ve donat pels dos fenòmens següents:

- a) **Photobleaching:** En l'excitació dels fluorocroms amb llum d'alta intensitat (làser) cal tenir en compte que el fluorocrom perd la capacitat d'emetre fluorescència (photobleaching) al cap de 20 s d'irradiar-lo, ja que es produeix un trencament de la seva estructura degut a un excés de llum. Per tant, s'ha de ser molt curós a l'hora d'irradiar la mostra perquè si es perd fluorescència tot el procés realitzat anteriorment no haurà servit de res.
- b) **Quenching:** Aquest fenomen també fa que la mostra perdi fluorescència. En aquest cas el que afecta és la presència d'agents oxidants i algunes sals. Tot i que també pot ser degut a la interacció de molècules de fluorocrom.

### **2.2.3. Principis de la microscòpia confocal**

La microscòpia de fluorescència és una eina bàsica en l'observació de mostres en les quals s'ha dut a terme una hibridació in situ i s'ha incorporat fluorescència en la mostra. A més, si es tracta de mostres gruixudes, com és el nostre cas, és imprescindible l'ús d'un microscopi confocal, ja que aquest ens permet observar la mostra en plans. Degut a la seva importància, doncs, en aquest punt es detallen els principis generals de funcionament de la microscòpia de làser confocal.

La llum provinent d'un làser és reflectida mitjançant un mirall dicròic, que és un tipus especial de filtre d'interferència, que reflecteix una part específica de l'espectre i transmet la resta, i enfocada en un punt de la mostra mitjançant la lent d'un objectiu. La senyal emesa pel punt il·luminat (ja sigui fluorescència o llum reflectida) torna pel mateix camí òptic, passa a través del mirall dicròic i és enfocada a un fotomultiplicador. Un diafragma o *pinhole* es col·loca davant del fotomultiplicador per eliminar les senyals procedents de la zona fora del focus (Figura 3).



**Figura 3:** Principi òptic de la microscòpia confocal  
**Font:** Curs de confocal del Servei de Microscòpia de la UAB

Un conjunt de filtres en el camí de la llum d'emissió permet seleccionar la longitud d'ona desitjada quan es treballa amb mostres fluorescents.

La utilització d'un làser per il·luminar és més avantatjós que la utilització d'una bombeta ja que permet enfocar la il·luminació en una regió molt petita de la mostra i amb una gran intensitat, a més podem excitar la mostra amb una longitud d'ona concreta. Aquest avantatge però, pot tornar-se amb inconvenient si no es fa un ús correcte del microscopi, ja que un excés de llum d'alta intensitat en la mostra pot fer que aquesta es cremi i no obtinguem bones imatges.

Degut a que amb el làser solament s'il·lumina una petita zona o punt de la mostra, per poder visualitzar la mostra cal un sistema d'escombratge que permeti

mostrejar tots els punts, és a dir, un sistema de formació de la imatge que reculli la informació de cada un d'aquets punts. Normalment, per aquest sistema d'escombratge el làser es desplaça i la mostra queda immòbil, tot i que hi ha microscopis en els que és la mostra la part mòbil. Cal dir, que el camp d'escombratge del làser, coincideix amb el camp d'observació de l'objectiu, per tant, la zona a observar, es pot localitzar utilitzant la microscòpia de fluorescència convencional. D'aquesta manera s'estalvia temps, ja que visualitzar la imatge obtinguda pel làser requereix un major temps d'espera.

A continuació, la fluorescència emesa per la mostra és recollida en el fotomultiplicador que digitalitza la senyal rebuda i permet la visualització de la imatge en un monitor. Aquest fotomultiplicador, com s'explicarà en detall més endavant, amplifica la senyal rebuda i és un dels paràmetres que ens permet millorar la qualitat de la imatge observada.

La microscòpia confocal presenta una sèrie d'avantatges respecte a la microscòpia òptica tradicional que fan que pel tipus de mostres que s'analitza ens sigui obligat l'ús d'aquesta tecnologia, ja que de no fer-ho així seria molt difícil obtenir imatges de la qualitat necessària per a obtenir els resultats desitjats, sobretot, pel que fa referència a l'anàlisi quantitatiu de la mostra. Els avantatges de la microscòpia confocal s'enumeren a continuació:

- Major resolució: Per un objectiu d'immersió podem aconseguir resolucions de  $0,14\ \mu\text{m}$  en horitzontal i  $0,23\ \mu\text{m}$  en vertical.
- Major contrast: Degut a la presència del pinhole, s'elimina la presència de llum procedent de zones fora del focus visualitzant així, gairebé exclusivament, la llum emesa per la mostra.
- Possibilitat de realitzar seccions òptiques: Variant el pla d'enfocament el sistema és capaç de prendre imatges a diferent profunditat, fet que permet, si convé, obtenir informació tridimensional de la mostra.
- Anàlisi d'imatges: A l'obtenir la imatge de manera electrònica és possible digitalitzar-la i aplicar sobre ella tota una sèrie de tècniques d'anàlisi de imatges, com per exemple: realçar les imatges per millorar la seva qualitat, combinació de imatges per comparar canvis en el temps, mesura d'intensitats, etc.
- Reconstrucció 3D: A partir de les seccions òptiques és possible aplicar tècniques de reconstrucció 3D que ens permetran visualitzar les estructures.

A més, en el cas dels microscopis confocals CLSM hi ha una sèrie d'avantatges addicionals com són:

- Possibilitat d'obtenir imatges perpendiculars al pla XY variant l'atura.
- Fixar el làser sobre un punt de la mostra i prendre imatges en diferents temps per tal d'observar els efectes del làser sobre aquest punt.
- Augmentar la resolució mitjançant zoom de l'àrea observada.

La velocitat de formació de la imatge dependrà també del número de punts que vulguem prendre en una imatge. Així doncs, obtindrem imatges més ràpidament si utilitzem una resolució de 256 x 256, que si volem una resolució de 512 x 512 píxels.

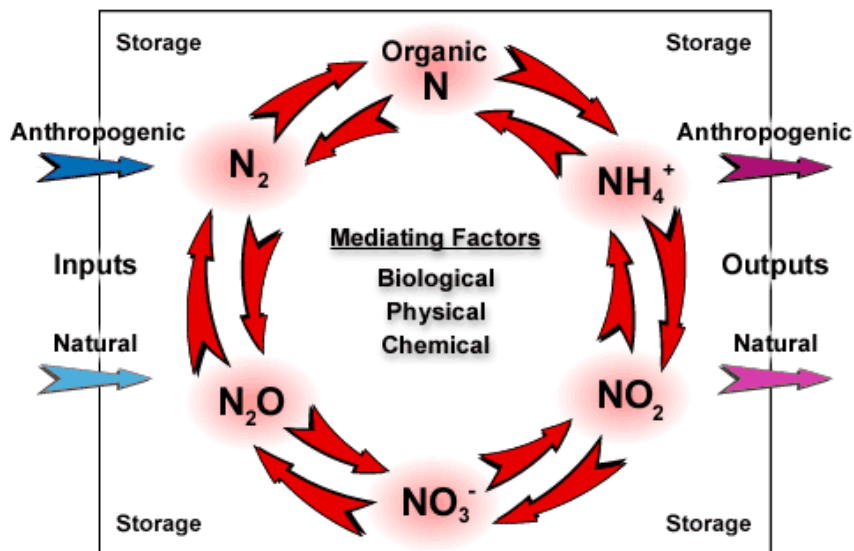
## **2.3. El nitrogen**

### **2.3.1. El cicle del nitrogen en el tractament d'aigües residuals urbanes.**

El productes de nitrogen són un dels principals compostos que cal eliminar en el tractament d'aigües residuals urbanes, ja que sinó, l'abocament d'aigües riques en nitrogen a la llera dels rius podria provocar contaminació per eutrofització. És per aquest motiu que cal buscar sistemes eficients d'eliminació del nitrogen (present sobretot en forma d'amoni ( $\text{NH}_4^+$ )). Les etapes principals del cicle del nitrogen són:

-Nitrificació: en aquesta etapa s'oxida l'amoni a nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), i el nitrit a nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ). Aquest procés es dona sota condicions aeròbies i els bacteris que hi intervenen es coneixen com a amonioxidants (AOB) i nitritoxidants (NOB), respectivament.

-Desnitrificació: Aquest procés que es dona sota condicions anòxiques redueix el nitrit i/o nitrat a monòxid de nitrogen ( $\text{NO}$ ) i òxid de dinitrogen ( $\text{N}_2\text{O}$ ) i, posteriorment, a nitrogen gas ( $\text{N}_2$ ). D'aquesta forma, el nitrogen que estava present en l'aigua en forma d'amoni ha estat eliminat passant a l'atmosfera. En la figura 4 es mostra de forma esquemàtica el cicle del nitrogen.



**Figura 4:** Esquema del Cicle del Nitrogen

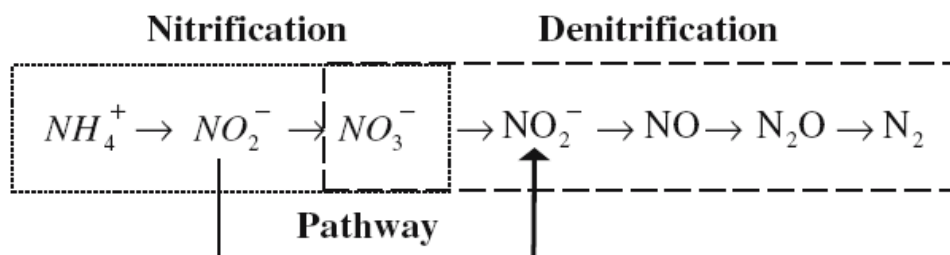
**Font:** Nitrogen Cycles Project (<http://www.sws.uiuc.edu/nitro/biogeo.asp>)

### 2.3.2 Nitrificació parcial

S'ha comprovat que la desnitrificació via nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) té una sèrie d'avantatges respecte la tradicional, que es via nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) (Beccari et al. 1983). Els avantatges d'aquesta via són les següents:

- 25 % de disminució en el consum d'  $\text{O}_2$  en l'etapa aeròbia que implica un 60 % d'estalvi energètic.
- En l'etapa anòxica el requeriment de donadors d'electrons és més baixa.
- El rendiment de la desnitrificació del nitrit és 1,5 – 2 vegades major que el del nitrat.
- Redueix les emissions de  $\text{CO}_2$  en un 20 %.
- Es produeix una disminució del 35 % en la producció de fangs en la nitrificació i un 55 % en la desnitrificació.

Per tant, si som capaços d'aconseguir que es produeixi una nitrificació parcial, podem augmentar l'eficiència del tractament de les aigües residuals. La figura 5 mostra quina seria la via metabòlica utilitzada per tal de que la desnitrificació fos a partir de nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ).

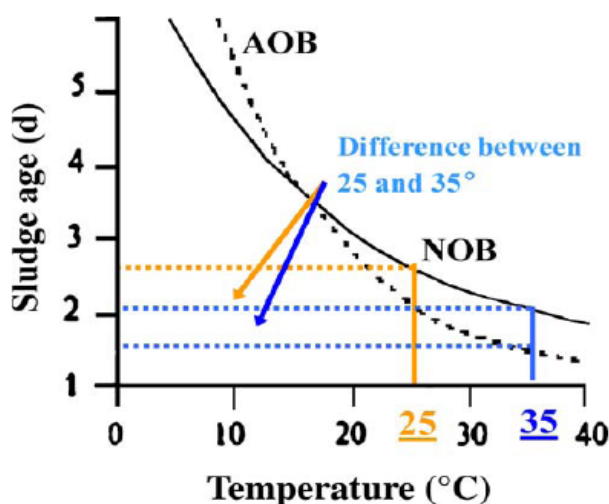


**Figura 5:** Nitrificació i desnitrificació biològica via nitrit

**Font:** Peng Y. et al. 2006

Per aconseguir la nitrificació parcial del reactor cal que els bacteris nitrificants siguin únicament amonioxidants i que no hi hagin, o la seva activitat sigui molt minoritària, bacteris nitrít oxidants. Per què això passi, s'ha experimentat amb diversos factors que inhibirien el creixement dels bacteris nitrít oxidants. Els principals paràmetres que es poden controlar són els següents:

- Temperatura del reactor: Tant els nitrít oxidants com els amonioxidants tenen una temperatura òptima al voltant de 25 °C, per tant, no observarem gaire diferència en el comportament dels dos grups si augmentem la temperatura . Tot i que a temperatures elevades és són més eficients els AOB, tal i com mostra la Figura 6, ja que el temps de residència cel·lular mínim per als AOB és més petit a mesura temperatures més elevades. En el nostre cas la temperatura del reactor es troba al dels 20 °C.



**Figura 6:** Variació de l'activitat dels NOB i AOB amb la temperatura

**Font:** Peng Y. et al. 2006

- pH: L'amoni lliure és un inhibidor de l'activitat de la oxidoreductasa, que es present en la membrana dels NOB. La quantitat d'amoni lliure s'incrementa si el pH es alt. D'aquesta forma un pH alt inhibirà l'activitat dels NOB tot i que no els elimina.

- Oxigen dissolt: Els coeficients de semisaturació per a l'oxigen dissolt són 0.2 – 0.4 mg/l i 1.2 1.5 mg/l pels AOB i els NOB, respectivament. Per tant, una baixa concentració d'oxigen dissolt farà que s'acumuli nitrit (Peng et al. 2004).

- Càrrega i concentració del substrat: Si l'aigua residual a tractar conté altes concentracions d'amoni ( $\text{NH}_4^+$ ), s'aconsegueix fàcilment la nitrificació parcial. De totes maneres, aquestes condicions són difícils de mantenir en aigües residuals urbanes ja que a mesura que el tractament avança disminueix la concentració d'amoni ( $\text{NH}_4^+$ ) (Peng et al. 2004).

### 3. MATERIAL I MÈTODES

Suprimir: 5

En aquest apartat es fa una descripció en profunditat del mètode utilitzat per la realització del treball. Així doncs, s'inclou aquí una descripció en profunditat del protocol utilitzat en el FISH així com les sondes utilitzades i es detalla el funcionament del microscopi confocal i els settings que s'han utilitzat per observar les mostres. S'explica com es realitza la quantificació mitjançant el programa Matlab i finalment es fa una descripció de les mostres utilitzades en l'anàlisi i de la planta pilot, d'on s'han extret les mostres, del departament d'Enginyeria Química de la UAB.

#### 3.1. La tècnica FISH

Suprimir: 1.

##### 3.1.1. El protocol

A continuació s'inclou el protocol utilitzat per a fer el FISH adaptat per Irene Jubany a partir de Hugenholtz et al. (2001) i Manz et al. (1992). Cal dir que en tots els experiments s'ha seguit aquest protocol per tal de dotar el treball d'un major rigor metodològic. De totes maneres, la existència de protocols lleugerament diferents, no ens discuteix la validesa dels resultats obtinguts, ja que les variacions entre els protocols són molt petites i els resultats que podríem haver obtingut amb altres protocols són comparables.

Suprimir: ¶

Suprimir: ¶

##### a) Fixació de la mostra

Per a microorganismes Gram-negatiu, afegir 3 volums de 4% PFA (1,5 mL) per a cada volum de mostra (0.5 mL). La mostra es pot centrifugar en cas de que es necessiti una concentració de biomassa més elevada. Conservar a 4°C durant 1-3 h.

Concentrar les cèl·lules mitjançant centrifugació (5.000 g) i treure el fixador. Rentar les cèl·lules amb 1xPBS i ressuspendre en un volum (0.5 mL) de 1xPBS per cada volum (0.5 mL) de etanol fred i a continuació mesclar. Les cèl·lules fixades es poden pipetejar sobre portaobjectes i/o es poden guardar a -20 °C durant varis mesos.

Suprimir: Pellet

Suprimir: en

## b) Aplicació de la mostra al portaobjectes

Aplicar 5-20 µL (segons la concentració en biomassa de la mostra) de mostra fixada en cada pou del portaobjectes. Deixar assecar en aire sec (màxim 60°C). Deshidratar les mostres en sèries d'etanol ( 3 minuts en cadascuna): 50%, 80% i 98 i deixar assecar en l'aire. Els portaobjectes es poden conservar a temperatura ambient durant un mes ( o a -20 °C durant varis mesos).

## c) Hibridació de la sonda

La solució d'hibridació es prepara en tubs de 2 mL en el moment que s'han d'utilitzar (la composició de la solució d'hibridació es mostra en l'annex 2). És necessari utilitzar guants sense pols de talc (ja que el talc és altament autofluorescent) a l'hora de manipular la formamida. Afegir 8 µL de la solució hibriditzant en cada pou del portaobjectes. La solució sobrant s'aboca en el tub d'hibridació ( és un tub de 50 mL Falcon) que conté paper de cel·lulosa ( o simplement paper de wàter ) per mantenir la cambra del tub humida. Afegir 0.5 µL (o 1 µL) de la dissolució que conté la sonda (en l'annex 3 s'explica com aliquotar les sondes) i mesclar cuidadosament, vigilant de no arrancar biomassa amb la punta de la pipeta. Un cop mesclada la sonda en cadascun dels pous, col·locar el portaobjectes dins el tub de 50 mL que conté el paper de cel·lulosa humit. Tancar i posar en el forn d'hibridació a 46 °C durant 1-2 h ( es recomana 2h). Cal assegurar-se que el forn ha estat preescalfat amb anterioritat, ja que la temperatura ha de ser molt precisa per tal d'evitar unions no específiques de la sonda que ens alterarien els resultats.

Suprimir: lliures

## d) Rentat

Preparar la solució de rentat i escalfar-la al bany maria fins a 48 °C durant el temps que dura la hibridació de la mostra en el forn. En l'annex 4 es detalla la composició de la solució de rentat.

Suprimir: l.

Després de la hibridació, els portaobjectes es treuen amb cura del tub i són rentades amb la solució de rentat que ha estat preparada anteriorment. Un cop rentat, el portaobjectes es posa dins el tub que conté la solució de rentat i es deixa al mateix bany maria (48 °C) durant 10-15 min. És important transferir els portaobjectes ràpidament

evitant que es refredin. D'aquesta forma s'evita que es formin unions no específiques de la sonda.

Després del rentat, el portaobjectes és remullat amb aigua miliQ freda, tenint molta cura de no arrencar biomassa. L'aigua es dirigeix, amb una pipeta Pasteur, per sobre els pous fent que flueixi sobre ells. Cal remullar les dues cares del portaobjectes per rentar qualsevol tipus de sal, ja que és altament autofluorescent. Un cop finalitzat el rentat, cal eliminar totes les gotes que hagin pogut quedar en els pous. Per fer-ho, es pot aplicar aire comprimit directament al costat del portaobjectes, assegurant que totes les gotes han estat eliminades. També es pot deixar assecar a l'aire si volem evitar utilitzar l'aire comprimit, que pot ser arriscat si no hi tenim pràctica o la biomassa no està ben fixada, ja que podríem perdre part de la biomassa i tot el que haguéssim fet anteriorment hauria estat en va.

Suprimir: es

#### **f) Muntatge**

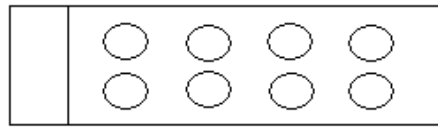
Aplicar petites gotes de Citifluor ( que és tòxic i cal evitar-ne la inhalació i el contacte amb la pell) en els pous del portaobjectes. Cobrir el portaobjectes amb un cobreobjectes assegurant que el Citifluor cobreix tots els pous del portaobjectes. Pressionar el cobreobjectes lleugerament, per retirar l'excés de Citifluor. Un cop el muntatge ja està fet les mostres es poden conservar a -20 °C durant diverses setmanes sense que es produeixi cap pèrdua de fluorescència.

#### **3.1.2. La preparació**

A l'hora de fer la preparació per a mirar al microscopi, es segueix el protocol que ens determina les concentracions de formamida, EDTA i NaCl segons la sonda que estiguem utilitzant (en l'annex 5 es mostra una taula amb les concentracions de formamida òptimes per a cada sonda). Pel que fa a la resta de reactius, les concentracions utilitzades sempre són les mateixes.

Com que disposem de portaobjectes amb vuit pous, la distribució que es fa és normalment posar en el pou número 1, la mostra sense sonda. Aquest pou, és l'anomenat control negatiu i s'utilitzarà per determinar el threshold (llindar) o fluorescència intrínseca de la mostra. En la resta de pous, col·locarem la sonda general,

que sempre serà la EUBmix i la sonda específica. Aquesta sonda específica anirà canviant. En la figura 7 es mostra un esquema del portaobjectes utilitzat.



**Figura 7:** Representació esquemàtica del portaobjectes utilitzat

**Font:** Elaboració pròpia

### 3.1.3. Les sondes utilitzades

En el nostre cas les sondes que s'han utilitzat són la EUB338mix, NSO 190, NEU, Nmo 218, Nsv 443, NIT3. Per poder-les distingir, la sonda general (EUB338mix) sempre porta incorporat un fluorocrom de color blau Cy3, mentre que la resta de sondes, les específiques, que mai s'utilitzen simultàniament porten incorporat un fluorocrom vermell Cy5.

- **EUB338 mix:** Aquesta és la sonda que sempre s'utilitza com a sonda general, és a dir, la que ens marca tots els bacteris presents en la mostra de biomassa. Per tant, aquesta sonda s'utilitza en tots els pous del portaobjectes, excepte en el control negatiu, on no hi posem cap sonda per tal de poder mesurar la fluorescència intrínseca de la mostra (soroll de fons) i que no ha de constar com a fluorescència de la mostra, sinó que és la que servirà per determinar el threshold.
- **Nso 190:** Sonda específica. Ens marca tots els bacteris amonioxidants.
- **NEU:** Sonda específica. Marca els bacteris amonioxidants que pertanyen al gènere *Nitrosomonas*.
- **Nmo 218:** Marca els bacteris que pertanyen al gènere *Nitrosomonas oligotropha*, que també són bacteris amonioxidants.
- **Nsv 443:** Ens serveix per detectar els bacteris pertanyents al gènere *Nitrospira*, que també són bacteris amonioxidants.
- **NIT 3:** Aquesta sonda ens detecta els bacteris nitritoxidants pertanyents al gènere *Nitrobacter*.

En l'annex 6 s'adjunta una fitxa completa per cadascuna de les sondes utilitzades.

### 3.2. Microscopi confocal Leica TCS SP2 AOBS

Suprimir: n

#### 3.2.1 Paràmetres inicials

- **Objectiu:**
  - o **Augments:** 20x, 40x, 63x, 100x
  - o **Obertura numèrica:** Ens determinarà la resolució, és a dir, distància mínima que poden estar dos punts per a que els puguem distingir. Habitualment es considera òptima una resolució de 140 nm.
  - o **Medi:** aquest pot ser sec, immersió en aigua, immersió en oli o immersió en glicerol.
- **Els làsers:** són la font d'emissió de llum quan treballem amb microscòpia confocal. Tenen la particularitat de que irradien un punt molt concret de la mostra i ho fan amb molta energia. Escollir el làser o làsers que s'utilitzaran és molt important, ja que per poder veure els fluorocroms correctament, cal que la longitud d'ona amb que irradiem sigui igual o molt pròxima a la longitud d'ona òptima d'absorció del fluorocrom. Els làsers dels que disposa el microscopi són:
  - o **405 nm:** Làser blau-violeta.
  - o **488 nm:** Làser blau- verd d'argó.
  - o **561 nm:** làser verd d'heli- neó.
  - o **633 nm:** Làser vermell d'heli-neó.

Suprimir: 543

Per escollir un determinat làser s'usa la funció beam.

- **Tipus de llum de captació:** en funció del tipus de mostres que vulguem analitzar també es pot variar aquest paràmetre. Els tipus de llum que pot captar el microscopi confocal són: transmissió, reflexió i fluorescència.
- **Configuració d'excitació/ emissió.**
- **Mode xy o yz:** ens permet analitzar la mostra en plans verticals o horitzontals.
- **Zoom:** el microscopi inclou un zoom òptic que permet ampliar la imatge d'un punt o zona determinat.

- **Format:** Els formats en què podem veure les imatges són: 200 x 200, 512 x 512 o 1024 x 1024. Com més gran és el format, més píxels tindrà la nostra imatge, però el temps necessari per obtenir la imatge també serà més gran així com també ho serà la memòria que ocuparà aquesta imatge en el disc dur. En la taula a continuació es mostra com augmenten el temps de captació i la memòria per una imatge a mesura que augmentem el número de píxels de la imatge.

| Nº de píxels | Memòria per una imatge | Temps de captació |
|--------------|------------------------|-------------------|
| 200 x 200    | 256 kb                 | 2,78 s            |
| 512 x 512    | 1 Mb                   | 4,06 s            |
| 1024 x 1024  | 4 Mb                   | 6,62 s            |

**Taula 1:** Format de la imatge

**Font:** Elaboració pròpia a partir de Sampedro et al. 1995

- **Seqüencial:** És la funció que s'utilitza per a obtenir les imatges de dues o més sondes en una mateixa imatge de forma seqüencial, o sigui, activant els làsers corresponents l'un darrera l'altre. D'aquesta manera podem veure d'una forma quantitativa la superfície de biomassa que està marcada per cada sonda.

**Suprimir:** , simultàniament.

### 3.2.2. Paràmetres variables:

- **Pinhole:** és una de les parts importants del microscopi. Així doncs, una obertura del pinhole petita fa que el microscopi es comporti com un verdader confocal, ja que es limita la informació de la imatge a la que prové d'un únic pla focal, la emesa per la mostra. De totes maneres, a vegades cal augmentar l'obertura del pinhole, ja que tenim una senyal molt dèbil, és a dir, la mostra no emet prou fluorescència. Llavors, com més gran és l'obertura del pinhole, més es perd la confocalitat i més s'assembla el microscopi a un microscopi convencional de fluorescència. A vegades doncs, per tal d'obtenir una bona senyal, cal sacrificar la confocalitat per obtenir una major intensitat de fluorescència en la imatge.
- **AOTF:** La AOTF és una obertura que controla la quantitat de llum emesa pel làser que arriba a la mostra. Per tant, si augmentem la AOTF aconseguirem augmentar la senyal rebuda, per contra, com que arribarà més llum a la mostra el photobleaching també serà superior i caldrà anar molt en compte de no exposar la mostra durant molt temps al làser, ja que com s'ha explicat anteriorment els fluorocroms es degradaran ràpidament i la senyal rebuda empitjorarà.
- **Banda espectral:** determina el rang de longitud d'ona emesa per la mostra que serà captada pel detector. D'aquesta forma, ens interessarà una banda espectral gran per captar tota la senyal emesa pel fluorocrom. De totes maneres, en el cas de que hi hagi més d'un fluorocrom en la mostra, fet molt habitual, caldrà reduir la banda espectral en el cas de que es pugui produir solapament entre els fluorocroms. Si això passés, estariem sobrevalorant la senyal emesa pel fluorocrom que nosaltres volem observar. Dit d'una altra manera, estariem observant els microorganismes que ens interessa més una part que es correspondrien a una altra sonda, ja que estariem captant part de la llum emesa per aquesta altra..
- **Beam expander:** ens serveix per determinar el pas de llum a través de l'objectiu. El valors poden ser 1x, 3x i 6x. Habitualment, s'utilitza 3x com a valor òptim i no s'acostuma a canviar.
- **Fotomultiplicador (PMT):** aquesta part té com a funció amplificar el senyal emès per la mostra per tal de poder obtenir una bona imatge. Així doncs, com

Suprimir: -lo

més alta sigui la fotomultiplicació, major serà la intensitat amb la que veurem la imatge. De totes maneres, per obtenir una bona imatge és necessari no amplificar el senyal en excés perquè la fotomultiplicació de la senyal també comporta un augment del soroll de fons. Cal elegir, doncs, en cada cas un valor que ens doni una senyal òptima amb el mínim soroll de fons.

- **Average:** aquest paràmetre ens indica el número de vegades que el làser recorre un mateix punt a fi d'obtenir una imatge. Finalment, la imatge obtinguda serà la mitjana de la informació obtinguda en cadascun dels punts. Com més alt és l'average, més s'ajustarà la imatge a la realitat, però com a desavantatge tenim que el temps necessari per a obtenir la imatge serà molt més gran. Per tant, cal establir un average que ens permeti una bona imatge amb el mínim temps possible, ja que el temps és una variable molt determinant si volem obtenir una bona quantitat d'imatges.

En resum, a l'hora de captar una bona imatge cal optimitzar els paràmetres (settings) per tal d'obtenir l'equilibri entre: qualitat d'imatge, photobleaching i temps de captació.

### 3.2.3. Altres funcions dels software:

Suprimir: :

- **QLUT:** Ens mostra el negatiu de la imatge. Aquesta funció és molt útil per determinar els settings que utilitzarem en cada sessió, ja que s'observa molt bé si la imatge està molt cremada o hi ha molt soroll de fons. Sempre utilitzarem aquesta funció a l'hora d'establir els settings per a cada mostra.
- **Overlay:** Si s'activa aquesta funció en el seqüencial, podem veure la superposició de les imatges obtingudes en cadascuna de les sondes. Aquesta funció ens serveix per veure de forma qualitativa la composició de la mostra i detectar possibles anomalies en el procés d'hibridació -com podria ser la presència de sonda específica en punts on no s'observa sonda general, fet que en teoria no hauria de succeir-.
- **Continuous:** mostra la imatge a temps quasi real de forma continua. Això significa, que mentre ho tenim activat, la mostra està sent il·luminada pel làser. Juntament amb el QLUT són les funcions més útils per determinar els settings,

Suprimir: pot

ja que podem veure molt bé com millora la imatge si variem els paràmetres de fotomultipliació.

- **Single Scan:** serveix per fer una sola foto.

### 3.2.4. La nostra configuració

El primer que cal fer abans d'observar la mostra al microscopi és establir els paràmetres anteriorment descrits de tal manera que siguin els adequats per obtenir una bona imatge. A continuació es descriu la configuració utilitzada en el nostre cas:

- Objectiu de 63 x. Per utilitzar aquest objectiu és necessari utilitzar l'oli d'immersió, que ha de ser especial perquè no tingui autofluorescència.
- Dels quatre làsers descrits anteriorment s'utilitzen el de 488 nm que excita el Cy5 i el làser de 561 nm que és el que excita el Cy3.
- La llum de captació és la llum de fluorescència.
- Mode XYZ. De totes maneres generalment només s'observaran plans horitzontals .
- Zoom 1,00.
- Format 1024 x 1024. Imatge en 8 bits.
- Beam Expander 3x.
- Banda espectral: Per determinar la banda de l'espectre que captarem cal escollir un interval en que obtinguem la màxima senyal, evitant el solapament entre bandes de diferents sondes.
- Average: Line Average 4. Això vol dir que el làser passarà quatre cops pel mateix punt i la imatge resultant serà la mitjana de les passades que el làser ha fet sobre cada punt.

Pel que fa al fotomultiplicador, l'hem de regular cada vegada que observem una mostra diferent utilitzant els paràmetres de guany i offset. Per fer-ho tenim activades les opcions de QLUT i [continuous](#).

Aquests settings els corroborarem en dos o tres camps de visió diferents, per tal de què siguin més ajustats a la realitat. Un cop decidim quins seran els paràmetres més

adequats, ja no els canviarem més. Si ho féssim alterariem els resultats i a més, es perdria molt temps adequant els settings cada vegada. La imatge 1 mostra un microscopi confocal com l'utilitzat en l'observació de mostres.



**Imatge 1:** Microscopi confocal  
**Font:** Elaboració pròpia

### 3.3. El protocol

Per observar la mostra, el primer que es fa és iniciar la sessió [amb els settings guardats en l'última sessió](#). D'aquesta forma molts dels settings ja estan optimitzats. Un cop fet això observem la mostra amb el microscopi de fluorescència per localitzar un camp que contingui biomassa. Seguidament, activem el confocal i les opcions de continuous i QLUT. Llavors regulem els paràmetres de guany i offset (que són els que s'ha de definir per cada mostra) observant dos o tres camps i guardem la configuració que és la que utilitzarem per aquella mostra. Ocasionalment, si veiem que el valor del guany és superior a 700, caldrà augmentar la intensitat del làser, ja que no es recomanable fotomultiplicar la imatge en excés.

**Suprimir:** predeterminada per a observar mostres en FISH.

A l'hora d'obtenir les imatges, en el nostre cas sempre es fan 50 fotos en cada mostra. Per tant, considerant que el primer pou és el control negatiu, es fan unes 7 o 8 imatges de la resta dels pous. També cal dir, que per evitar repetir camps d'observació, el que es fa és començar per l'extrem superior esquerra del pou i anar avançant de dreta cap a baix.

Suprimir: en cada pou

Les imatges dels pous amb sonda, així com el control negatiu s'utilitzen posteriorment, tal i com s'explica en el punt 3 d'aquest apartat per poder realitzar la quantificació de la superfície ocupada per cada una de les dues sondes utilitzades.

### 3.4. La quantificació

Un cop obtingudes les imatges el següent pas a realitzar és la quantificació que es realitza mitjançant el tractament informàtic de les imatges amb Matlab® (en l'annex 7 es mostra el programa utilitza). D'aquesta forma s'obté el percentatge de superfície de biomassa que ha estat marcada per a cada sonda. Per tant, i considerant sempre el marge d'error, tenim una idea força aclaridora dels bacteris que formen part de la mostra.

Un cop tenim les imatges cal:

- a) **Determinar el threshold:** Aquest valor es determina a partir de les imatges obtingudes en els pous establerts com a control negatiu i és el que ens determinarà la intensitat mínima que ha de tenir un punt per a poder ser considerat com blau o vermell. La importància d'obtenir un valor threshold acurat rau en el fet de que si el threshold és massa baix estarem considerant punts que no són de la mostra en si sinó que es deuen als errors propis de qualsevol tècnica experimental. Per altra banda, si el valor del threshold és massa gran estarem deixant de banda punts que haurien de ser comptabilitzats, i per tant, estem infravalorant la superfície marcada per les sondes.

El threshold es determina com el valor d'intensitat en el qual el 99.9 % dels punts de les imatges del control negatiu tenen una intensitat igual o inferior a aquest valor. Normalment, però, caldrà augmentar una mica el threshold obtingut per tal d'eliminar punts molt poc intensos que no han de ser comptabilitzats, ja que la seva presència es deu a autofluorescència causada per impureses en la mostra.

Suprimir: a partir de la suma dels punts que tenen intensitat zero en el control negatiu fins a tenir el 99.9 % dels punts. El valor obtingut és el threshold.

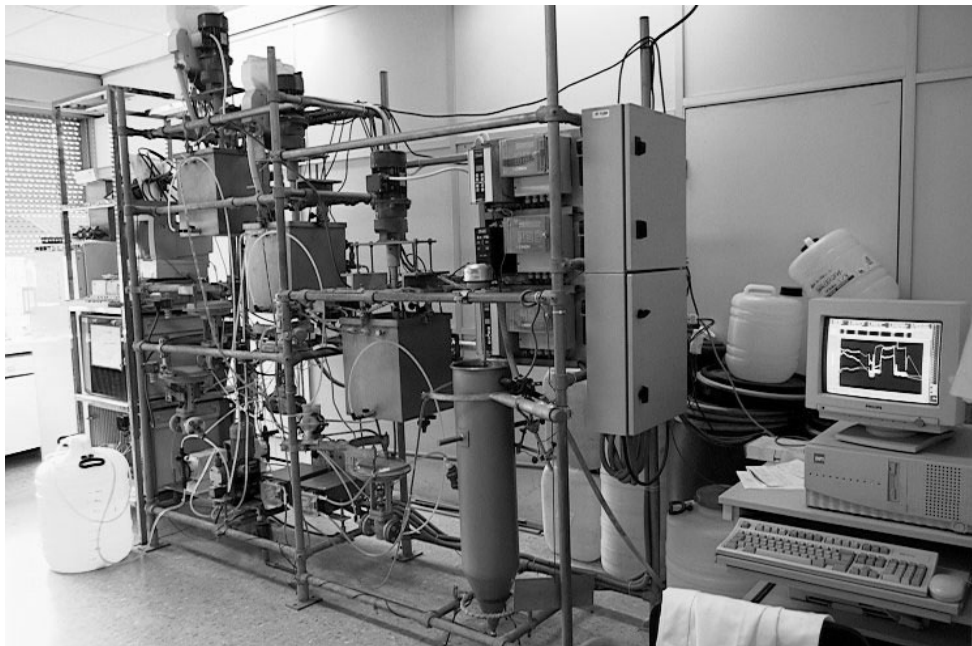
Suprimir: la intensitat mínima

**b) Realitzar la quantificació:** Un cop tenim el valor del threshold, que ens serveix per establir un valor d'intensitat mínima a partir de la qual considerem els punts ja podem quantificar la resta de pous, els que contenen sonda. A més el programa està dissenyat perquè no consideri els punts on hi ha color vermell però no blau degut a que es tracta de punts erronis ja que perquè hi hagi sonda vermella hi ha d'haver també sonda blava, però no al revés. Finalment, la quantificació total ens dona el percentatge de superfície ocupada per la sonda específica (vermell) respecte a la sonda general (blau) i inclou un marge d'error.

### 3.5. Les mostres

#### 3.5.1. La planta pilot

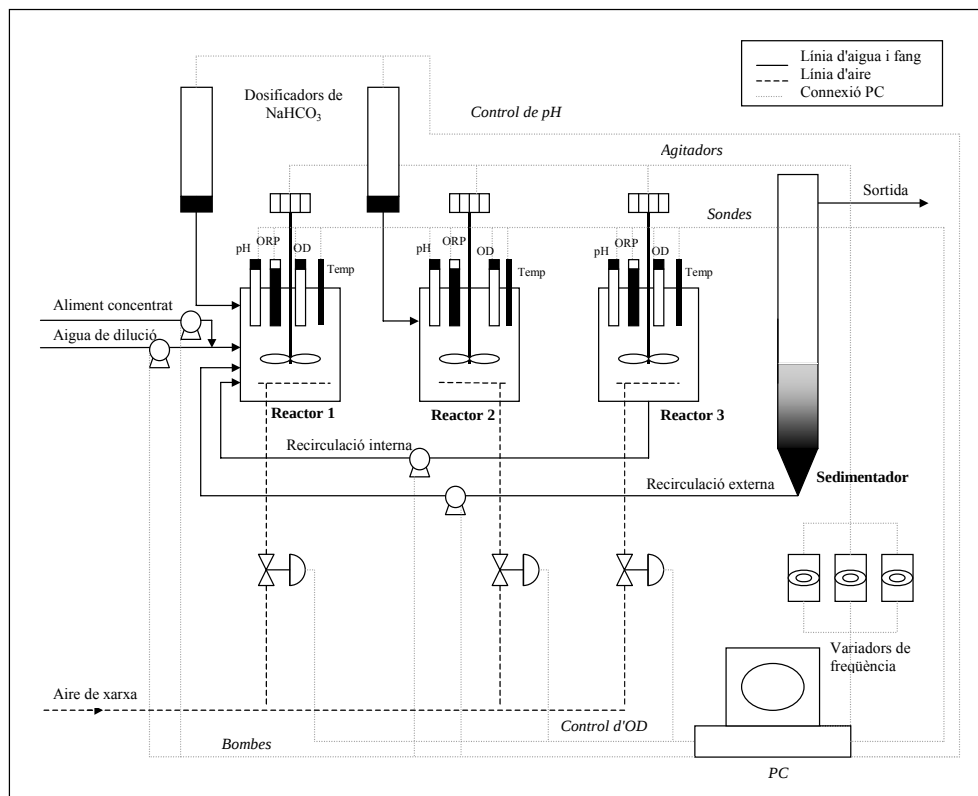
Les mostres que hem tractat en aquest projecte provenen de la biomassa extreta dels reactors de la planta pilot del Departament d' Enginyeria Química. A la figura 8 es pot observar una fotografia d'aquest muntatge i a la figura 9 un diagrama esquemàtic del mateix.



**Figura 8:** Planta pilot. Muntatge experimental

**Font:** Irene Jubany

La planta pilot consisteix en tres reactors aeròbics en sèrie de 26 L de volum útil cada un i un sedimentador de 25 L. La sortida de llots concentrats dels sedimentador retorna al primer reactor (recirculació externa). També hi ha una recirculació interna de líquid del tercer reactor al primer que permet una millor mescla entre els tres reactors.



**Figura 9:** Planta pilot. Esquema

**Font:** Irene Jubany

Cada reactor disposa d'agitació mecànica que proporciona la mescla necessària per tenir un comportament de reactor de mescla completa. També es disposa d'un difusor d'aire a cada reactor per a proporcionar a l'aigua l'oxigen necessari per a la respiració biològica. El pH, la temperatura, l'oxigen dissolt (OD) i el potencial redox

(ORP) es mesuren on-line. El funcionament on/off de les bombes està controlat per un PLC supervisat pel PC. Això permet governar tots aquests elements des de l'ordinador. El sistema disposa de control de pH en el primer i el segon reactor amb dosificació sòlida de carbonat sòdic (dosificador de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) i de control d'OD a cada un dels reactors.

El PC enregistra contínuament les mesures d'OD, pH, T, ORP i la senyal d'obertura de les vàlvules pneumàtiques d'aeració. A més a més, mostra en diferents gràfiques els perfils d'aquestes mesures en l'última hora, l'últim dia o l'última setmana. Aquestes gràfiques ajuden molt a tenir una idea de com està evolucionant el sistema i a detectar qualsevol pertorbació.

En l' operació normal de la planta, l'aigua que es tracta és aigua sintètica que simula una aigua residual amb alta concentració d'amoni. Aquest aliment sintètic està format per dos corrents, un corrent d'aliment concentrat i un corrent d'aigua de l'aixeta per a diluir el concentrat fins a la concentració desitjada. La composició final de l'aliment és:  $11.5 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  ( $3 \text{ g L}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$ ) i els següents compostos (en  $\text{mg L}^{-1}$ ):  $145.0 \text{ CH}_3\text{COONa}$ ,  $20.0 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ,  $16.0 \text{ NaCl}$ ,  $18.0 \text{ MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.4 \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.3 \text{ MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $0.4 \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.2 \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.02 \text{ H}_3\text{BO}_3$ , i  $8.0 \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . La relació DQO/N és de  $0.033 \text{ mg DQO mg}^{-1} \text{ N}$ . Al ser un aliment bàsicament format per amoni i un sistema completament aerobi, el procés que té lloc en els tres reactors és la nitrificació, o sigui, l'oxidació biològica de l'amoni a nitrat passant per nitrit.

Aquest sistema va ser posat en marxa a partir de biomassa d'una EDAR urbana en la qual hi té lloc la nitrificació/desnitrificació i es va convertir en un sistema altament nitrificant augmentant progressivament la càrrega d'amoni.

### 3.5.2. Les mostres utilitzades

Les condicions de la planta en el moment de treure les mostres 6 i 12 estan resumides a la taula següent:

|                            | Unitats                                                              | Mostra 6<br>(13-10-05)<br>Dia 0 | Mostra 12<br>(4-05-06)<br>Dia 203 |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| SST                        | mg SST L <sup>-1</sup>                                               | 2540                            | 1445                              |
| SSV                        | mg SSV L <sup>-1</sup>                                               | 2105                            | 1135                              |
| Cabal                      | mL min <sup>-1</sup>                                                 | 12                              | 10                                |
| Temps residència hidràulic | d                                                                    | 4.5                             | 5.4                               |
| Temps residència cel.lular | d                                                                    | 20                              | 20                                |
| Càrrega entrada            | g N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> g <sup>-1</sup> SSV d <sup>-1</sup> | 0.32                            | 0.49                              |
| Amoni entrada              | mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> L <sup>-1</sup>                    | 3000                            | 3000                              |
| Amoni sortida              | mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> L <sup>-1</sup>                    | 0.7                             | 0.3                               |
| Nitrit sortida             | mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> L <sup>-1</sup>                    | 0                               | 2950                              |
| Nitrat sortida             | mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> L <sup>-1</sup>                    | 3000                            | 50                                |
| pH                         |                                                                      | 7.5                             | 8.4                               |
| Condicions                 |                                                                      | Nitrificació<br>total           | Nitrificació<br>parcial           |

**Taula 2:** Paràmetres d'operativitat de la planta per a les mostres 6 i 12

**Font:** Irene Jubany

El pas de nitrificació total a nitrificació parcial es va fer degut a que entre els dies 70 i 90 es va anar augmentant el pH de 7.5 a 8.4 progressivament (als reactors 1 i 2). L'augment de pH va afavorir la presència de  $\text{NH}_3$  en el primer i el segon reactors. Aquest compost inhibeix tant als bacteris amonioxidants com als nitritoxidants, tot i que pels nitritoxidants és més inhibitori. Per aquest motiu, els nitritoxidants van disminuir la seva activitat més que els amonioxidants i el nitrit es va anar acumulant al sistema fins a tenir només l'oxidació d'amoni a nitrit.

En aquest treball, a partir de la tècnica descrita anteriorment, s'intentarà quantificar aquest descens de microorganismes amonioxidants i s'intentarà determinar quins gèneres han estat més afectats per l'augment de pH produït en la planta de tractament.

Suprimir: produit

#### 4. RESULTATS

En aquest apartat es mostren tots els resultats que ha estat fruit de l'experimentació, seguint el procediment descrit en l'apartat anterior. Cal remarcar que en molts casos no s'ha pogut arribar a quantificar els microorganismes de la mostra ja que sovint s'han produït problemes amb el microscopi confocal i amb la pròpia preparació de la mostra degut a defectes en la conservació d'algun reactiu (en l'Annex 8 s'adjunta la forma adequada de conservació de la formamida) , sobretot la formamida, que ha estat causa, juntament amb el microscopi confocal que en moltes mostres no poguéssim aconseguir la qualitat de imatge suficient per a realitzar la quantificació. Per tant, tot i que pugui semblar que s'han obtingut pocs resultats, en cada fracció de biomassa analitzada hi ha una important i laboriosa tasca de laboratori que sovint no es veu gratificada.

De totes maneres, els resultats obtinguts es poden classificar en dos tipus: el primer fa referència a la hibridació de la sonda específica amb la mostra i es determina de forma qualitativa. Així, si la hibridació ha estat positiva, podem afirmar la presència dels microorganismes detectats per aquesta forma. En aquest cas, el pas següent seria la quantificació de la superfície ocupada per les colònies d'aquest tipus de bacteris. Per altra banda, si la hibridació de la mostra amb la sonda ha estat negativa, podrem afirmar que no hi ha el tipus de bacteris amb els quals s'hibridaria. De totes maneres, també pot passar que dues sondes que han de marcar el mateix tipus de bacteris una sigui positiva i l'altra negativa. En aquest cas caldrà pensar que la biomassa del nostre reactor o el protocol seguit no són aptes per aquesta sonda.

Entre les sondes utilitzades, els resultats obtinguts pel que fa a hibridació positiva o negativa són els que es mostren a continuació en la taula 3:

| Sonda   | Resultat hibridació |
|---------|---------------------|
| Nso 190 | +                   |
| Nsv 443 | -                   |
| Nmo 218 | -                   |
| NEU     | +                   |
| NIT 3   | +                   |

**Taula 3:** Resultats qualitius de le diferents sondes utilitzades  
**Font:** Elaboració pròpia a partir de resultats experimentals

**Formatat:** Tipus de lletra: 12 pt

Així doncs, podem afirmar que en les nostres mostres tenim presència de bacteris del gènere *Nitrobacter* (NIT3), *Nitrosomonas halotolerants* (NEU) i *Betaproteobacteris amonioxidants* (Nso 190).

Aquest resultat concorda amb les condicions del reactor, ja que els bacteris que intervenen en el procés de nitrificació són del gènere *Nitrosomonas* (en el cas dels amonioxidants) i *Nitrobacter* (en el cas dels nitritoxidants).

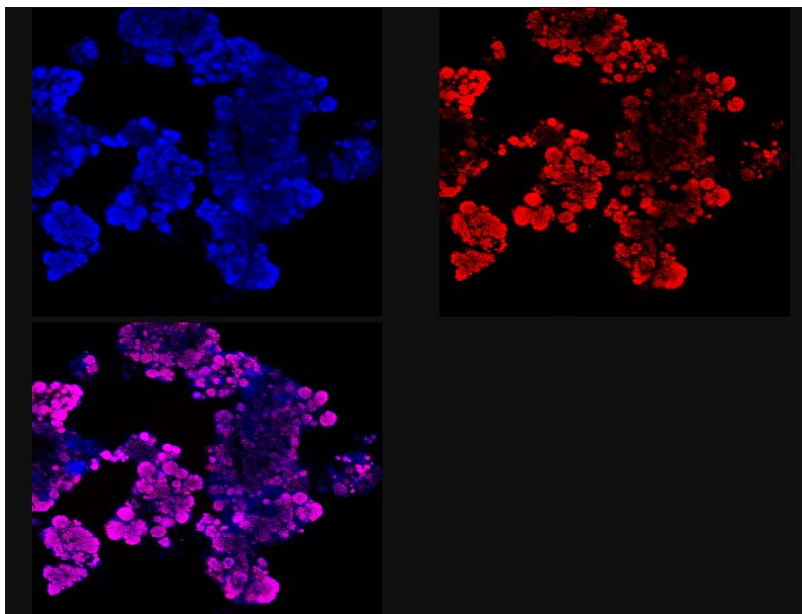
Per contra, per les sondes que han donat negatiu Nsv 443 i Nmo 218 podem afirmar que no hi ha les espècies amb les que s'hibriditzen que en aquest cas són amonioxidants del gènere *Nitrospira* corresponents a la sonda Nsv 443 i amonioxidants del gènere *Nitrosomonas- oligotropha* corresponents a la Nmo 218 . De totes maneres, aquesta afirmació no pot ser categòrica, ja que a vegades pot passar que una sonda no s'hibridi correctament amb el seu microorganisme. Aquest fet pot ser degut a que les característiques de la nostra mostra no s'adeqüen a la sonda o també podria ser degut a un , menys probable, error en el disseny o elaboració de la sonda.

Una selecció d'imatges obtingudes amb el confocal es presenta a continuació:

En la imatge 2: s'observa la sonda EUBmix en blau i la sonda específica NEU en vermell aplicades a la mostra 6. La tercera imatge de la imatge 1 mostra la superposició de les dues fotografies i podem veure qualitativament que les zones en lila corresponen als punts en què les dues sondes coincideixen.

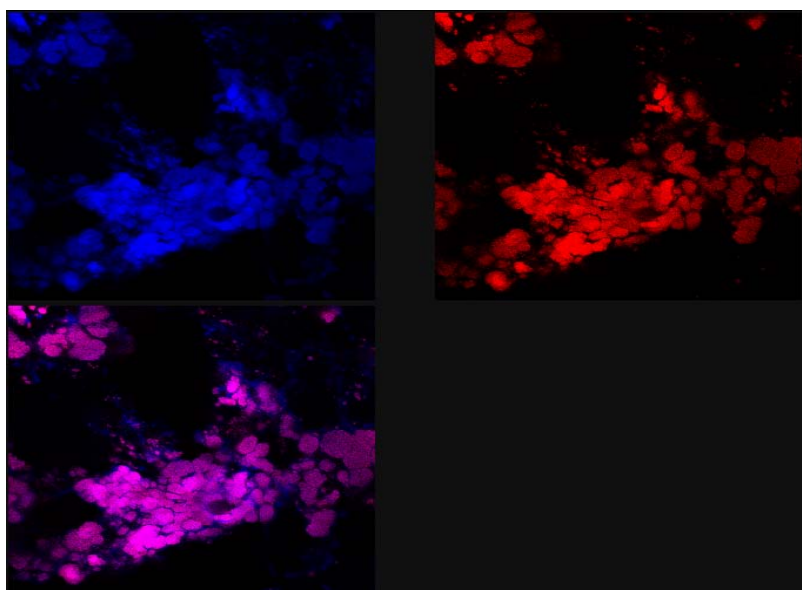
En la imatge 3: tenim les mateixes sondes, en aquest cas aplicades a la mostra 12.

Finalment, en la imatge 4, s'han utilitzat 3 sondes. El color vermell correspon a la sonda general EUB mix, el blau a la sonda específica per a AOB i el groc a la sonda NIT 3 que és la sonda per a NOB. En aquesta imatge es veu clarament que els microorganismes nitritoxidants són minoritaris en la mostra tal i com es pretenia.

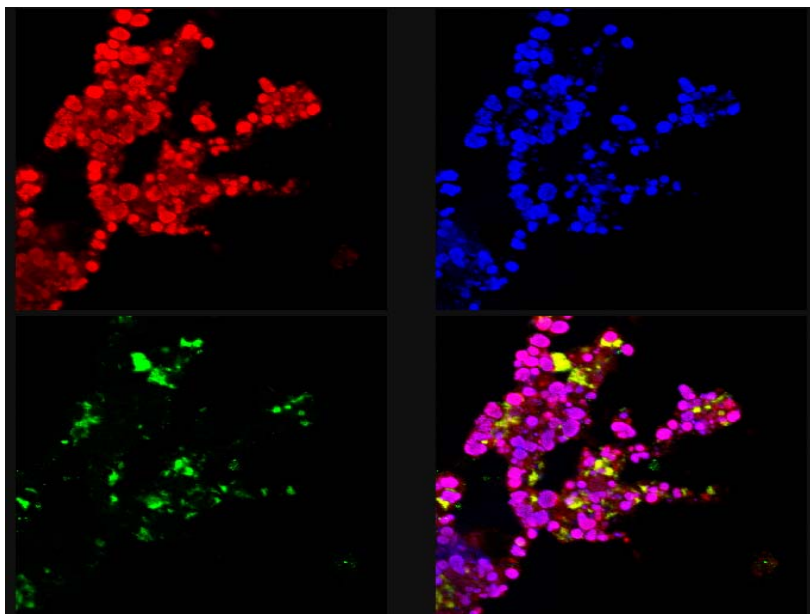


**Imatge 2:** Sondes EUBmix i NEU a la mostra 6  
**Font:** Experimentació

**Formatat:** espanyol (Espanya  
- alfab. internacional)



**Imatge 3:** Sonda EUB mix i NEU en la mostra 12  
**Font:** Experimentació



**Imatge 4:** Sondes EUB mix, NEU i NIT 3 aplicades a la mostra 12  
**Font:** Experimentació

**Formatat:** espanyol (Espanya - alfab. internacional)

#### 4.1. Resultats de la quantificació

En el cas de les sondes en les que la hibridació ha estat positiva, podem realitzar la quantificació de la superfície colonial de cada tipus de bacteri. Cal dir que per arribar a fer la quantificació cal haver obtingut anteriorment unes 50 imatges (el resultat serà el promig de les diferents imatges) i que aquestes siguin de bona qualitat. Sovint ha passat que les imatges no eren suficientment bones com per a poder realitzar la quantificació. Els resultats que s'han pogut obtenir són els següents es mostren en la taula 4:

| Mostra    | Threshold blau i vermell | Núm. de fotos | % sonda específica | % mínim | % màxim |
|-----------|--------------------------|---------------|--------------------|---------|---------|
| 6_Nso190  | 20 i 45                  | 47            | 48                 | 42      | 53      |
| 6_NEU     | 25 i 20                  | 38            | 46                 | 40      | 53      |
| 12_Nso190 | 20 i 30                  | 32            | 65                 | 56      | 74      |
| 12_NEU    | 20 i 25                  | 50            | 69                 | 58      | 79      |

**Taula 4:** Resultats de la quantificació per a les mostres 12 i 6  
**Font:** El.laboració pròpia a partir de dades experimentals

Aquests resultats estan condicionats per l'augment de pH que es va anar produint de forma progressiva en la planta. És a dir, la mostra 6 correspon a les condicions de la planta abans de que es passés el pH de 7.5 a 8.4 mentre que la 12 es correspon a la biomassa present en el reactor quan el pH ja era de 8.4.

Així doncs, tal com veiem, els resultats de la mostra 6 han estat 48% i 46% per la sonda Nso 190 i NEU, respectivament. En aquesta mateixa mostra, els intervals mínim i màxim han estat 42 % - 53 % per la sonda Nso 190 i 40 % - 53 % per la NEU. Per tant, els resultats obtinguts en la mostra 6 són molt semblants per a les dues sondes quantificades.

Per altra banda, en la mostra 12, els resultats de la mitjana de la quantificació són: 65 % per la Nso 190 i 69% per la sonda NEU. Pel que fa als intervals màxim i mínim són 56 % - 74 % per la sonda Nso 190 i 58 % - 79 % per a la sonda NEU. En aquest cas s'aprecia una major diferència entre el valor mitjà de les dues sondes que és d'uns cinc punts percentuals a favor de la sonda NEU. De totes maneres, si considerem l'interval d'error en les dues sondes, no podem dir que la sonda NEU s'imposa a la Nso 190, ja que les dos es troben en intervals d'error molt grans i semblants.

Per tant, com a resultat general podem afirmar que s'ha produït un augment en el percentatge de microorganismes que es detecten amb les sondes Nso 190 i NEU. A més podem concretar dient que l'augment de la biomassa detectada per la sonda NEU ha augmentat més, passant de 46 % a 69 %, és a dir, un increment de 23 %. Per altra banda, la Nso 190 ha passat de 48 % a 65 % que representa un augment del 17 %.

Finalment, podem dir que pràcticament tots els tipus de bacteris amonioxidants de la mostra pertanyen al gènere *Nitrosomonas*, ja que com s'havia dit en l'apartat de material i mètodes la sonda Nso 190 identifica tots els gèneres de bacteris amonioxidants i els valors obtinguts per la sonda Nso 190 i la NEU són pràcticament els mateixos.

## 5. DISCUSSIÓ

Segons Egli et al.(2003) els efectes del pH i la temperatura donen lloc a la formació de cultius de bacteris amonioxidants i a l'absència de cultius nitrít oxidants. Aquest fet, s'observa també en el nostre experiment, ja que, tot i no quantificar els NOB, de forma qualitativa podem veure com la seva presència és molt reduïda. De totes maneres, l'augment de pH provocat en la planta no només fa disminuir l'activitat dels NOB, sinó que també afecta negativament els AOB. Aquest autor, també afirma en la seva experimentació que a pH alt, superior a 7.5 la comunitat d'amonioxidants és gairebé exclusiva de la sonda NEU. Així doncs, concorda amb els nostres resultats de la mostra 12 (pH alt) en què els valors de la quantificació per la sonda Nso 190 i per la NEU eren pràcticament els mateixos. Per tant, podem afirmar que a pH alt, la comunitat amonioxidant està formada gairebé al 100 % per bacteris del gènere *Nitrosomonas*.

Aquest mateix autor, afirma també que a l'inici de l'experiment, observa presència del gènere *Nitrospira* (un altre tipus de AOB) però que experimenten una pèrdua gradual d'activitat i són rentats completament dels reactors. Així doncs, per extrapolació de resultats podríem tenir l'índex de què en la mostra 6, el petit percentatge que quedava perquè la quantificació de la NEU i la Nso 190 tingués el mateix valor pertanyia al gènere *Nitrospira*.

Per altra banda Li et al.(2005) afirmen en el seu article que no detecten res amb la sonda Nsv 443, tal i com ens passava a nosaltres, que de forma qualitativa observàrem que la Nsv 443 donava negatiu. Per contra, Stephen et al. (1996), diuen que la major part dels AOB es detecten amb la Nsv 43. Aquest fet és degut a què la concentració d'amoni usada en la nostra experimentació és molt alta (3.000 mg/L) i la que usava Stephen et al. (1996) era baixa. Així doncs, podem dir que concentracions elevades d'amoni són limitants pel que fa al gènere *Nitrospira*.

Segons Li et al. (2005) el gènere predominant en AOB és el *Nitrosomonas* ja que és un r- estratega amb una alta constant de saturació respecte l'amoni. A més, afirma que la presència de *Nitroacter* és molt baixa degut a l'alta concentració d'amoni lliure que actua com a inhibidor de l'activitat nitrít oxidant.

Així doncs, tot i la laboriositat de la tècnica, podem concloure que la tècnica FISH i l'ús del microscopi confocal per a l'estudi de mostres biològiques en reactors nitrificants és una tècnica útil per caracteritzar de forma aproximada la biomassa ja que

com s'ha anat veient en aquest apartat els resultats concorden força bé amb la teoria, ja que en condicions de nitrificació parcial cal esperar que la fracció biològica sigui pràcticament tota amonioxidant ( gènere *Nitrosomona* ) i que la presència de microorganismes nitritoxidants sigui pràcticament nul·la, tal i com s'observa en les imatges en què em utilitzat la sonda NIT 3 per a la detecció del gènere *Nitrobacter*.

## 6. CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts a partir de l'experimentació mostren que la fracció d'AOB en un reactor aerobi nitrificant canvia lleument segons si estem en un procés de nitrificació total, tal i com era la mostra 6, en què els valors de la quantificació per a la sonda NEU eren de 46 % i de 48 % per a la sonda Nso 190 o en un procés de nitrificació parcial, tal i com corresponia a la mostra 12. En aquest cas els resultats van ser de 69 % per a la sonda NEU i 65 % per a la sonda Nso 190. Com es pot observar a partir de l'apartat de la discussió aquests resultats concorden amb els de la bibliografia en què es realitzaven experiments semblants encaminats a estudiar quins microorganismes intervenen en el procés de nitrificació, d'elevada importància mediambiental pel que fa a la eliminació de nitrogen en aigües residuals urbanes d'una forma més eficient i menys costosa econòmicament.

Pel que fa a la tècnica FISH aplicada a l'estudi dels microorganismes que intervenen en aquest procés, el fet de disposar actualment d'un bon nombre de sondes per a diferents nivells taxonòmics i de bases de dades en què s'identifiquen les sondes amb el corresponent gènere bacterià i la possibilitat d'identificar espècies no conegudes o no cultivades a partir del disseny de noves sondes mitjançant el seu r-RNA fan que el FISH sigui una tècnica àmpliament utilitzada per l'estudi de la fracció orgànica en reactors biològics.

Tot i els avantatges de la tècnica, sobretot degut a que es realitza l'anàlisi in situ, ens trobem també amb alguns inconvenients com són: baixes intensitats en la senyal rebuda i molt soroll de fons, és a dir, fluorescència que es emesa per la mostra però que no pertany als microorganismes hibridats amb la sonda. De totes maneres, podem pal·liar els efectes d'aquests dos inconvenients gràcies a l'ús del microscopi confocal i el software informàtic que porta inclòs. Tal i com es descrivia en l'apartat de material i mètodes, podem ajustar els paràmetres del microscopi en cada mostra, minimitzant així els efectes de baixa senyal i soroll de fons en la mostra.

Un altre dels inconvenients del FISH, i potser el més delicat, és la quantificació de les cèl·lules. En el nostre cas, s'ha utilitzat un programa informàtic dissenyat amb el Matlab<sup>®</sup> que quantifica la superfície ocupada per cadascuna de les sondes a partir de les imatges obtingudes amb el microscopi confocal. Podem realitzar la quantificació basada en la superfície ocupada perquè la majoria dels microbis, inclosos els nitrificants solen

establir-se en superfícies formant colònies, o en el nostre cas en forma de flocs. Aquesta quantificació, tal i com s'observa en els resultats, dona un valor mitjà que va acompanyat d'un interval d'error. Com s'ha vist, aquest marge d'error acostuma a ser molt gran, fet que ens limita molt a l'hora de poder realitzar afirmacions a partir dels valors numèrics de la quantificació. Aquesta deficiència en el procés de quantificació ens porta a pensar que la tècnica té una gran viabilitat pel que fa referència a l'anàlisi qualitatiu de la mostra, però que és molt arriscat obtenir resultats numèrics de la superfície marcada per a cada sonda.

Finalment, també caldria considerar com un desavantatge de la tècnica la dificultat que porta implícit la preparació de mostres, ja que és una tècnica laboriosa en la que sovint no obtenim preparacions prou bones per a realitzar la quantificació. En el nostre cas, per exemple, la metodologia de conservació de la formamida no va ser la correcta i això ens va perjudicar molt les imatges posteriorment obtingudes amb el microscopi confocal.

De totes maneres el FISH sol anar acompanyat d'altres tècniques com són els microsensores o la citometria de flux. D'aquesta forma, quan es vol estudiar la biomassa d'un reactor el FISH és un complement, o una part, de les dades que obtindrem ja que per si sola la tècnica aquí estudiada deixa força incògnites en la composició de la fracció biològica del reactor.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Beccari, 1983. Kinetic of dissimilatory nitrate and nitrite reduction in suspended growth culture. *Water Pollut. Control Fed.* 55: 58-64.

Egli K., Langer C., Siegrist, H.R., Zehnder A., Wagner M., van der Meer, J.R. 2003. Community Analysis of Ammonia and Nitrite Oxidizers during Start-up of Nitrification Reactors. *Applied and Environmental Microbiology*. 3213-3222-.

Hugenholtz P., Tyson G.W., Blackall L.I. 2001. Design and evaluation of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization. In *Methods in Molecular Biology, Gene Probes: Principles and Protocols*. Edited by Aquino de Muro M, Raple R. Totowa: Humana 179:29-42.

Li H., Min Y., Zang Y., Tao Y., Kamagata Y. 2006. Nitrification performance and microbial community dynamics in a submerged membrane bioreactor with complete sludge retention. *Journal of Biotechnology*. 60-70.

Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* 15: 593-600.

Peng Y., Guibing Z. 2004. Nitrite accumulations by aeration controlled in sequencing batch reactor treating domestic wastewater. *Water Science Technology* 50 (10) 35-43.

Peng Y., Guibing Z. 2006. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied Microbiological Biotechnology*. 73: 15-16.

Sampedro A. et al. 1995. Técnicas de fluorescencia en microscopia y citometría. Universidad de Oviedo. Servicio de publicaciones.

Schramm A. 2003. In situ Analysis of Structure and Activity of the Nitrifying Community in Biofilms, Aggregates and Sediments. *Geomicrobiology Journal* 20:313-333.

Stephen J.R., McCrae A.E., Smith Z., Embly T.M., Prosser J.L. 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to P-Sugroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4147-4154.

Wagner M., Rath G., Amann R., Koops H-P., Schleifer K.-H. 1995. In situ Identification of Ammonia-oxidizing Bacteria. *System. Appl. Microbiol.* 18, 251-264.

Wilkinson D.G. 1998. In situ hybridization: a practical approach. Oxford University Press.

**Pàgines web:**

|                          |                                                                                                            |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Database Project II.     | <a href="http://rdp.cme.msu.edu">http://rdp.cme.msu.edu</a>                                                |
| Invitrogen.              | <a href="http://www.invitrogen.com/resources/education">http://www.invitrogen.com /resources/education</a> |
| Nitrogen Cycles Project. | <a href="http://www.sws.uiuc.edu/nitro/biogeo.asp">http:// www.sws.uiuc.edu/nitro/biogeo.asp</a>           |
| Probe Base.              | <a href="http://www.probebase.net">http://www.probebase.net</a>                                            |
| Leica.                   | <a href="http://www.leica-microsystems.vom">http://www.leica-microsystems.vom</a>                          |