

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

**Autor: Alexis Marsol i Vall**  
**Directora: Irene Jubany i Güell**  
**Bellaterra, 21 de febrer de 2007**

## **Introducció**

El projecte es basa en els fonaments teòrics de la tècnica FISH i el microscopi confocal per a determinar quins són els principals microorganismes amonioxidants que intervenen en la nitrificació parcial. Aquest procés és de gran importància mediambiental ja que d'aquesta forma s'aconsegueix eliminar el nitrogen de les aigües residuals urbanes d'una forma més eficient energèticament i menys costosa econòmicament que la tradicional via nitrat.

## **Material i mètodes**

Per a dur a terme l'experimentació es disposa d'un laboratori del Departament d'Enginyeria Química de la UAB. És aquí on es realitza el FISH, que consisteix bàsicament en unir una sonda que conté un fluorocrom que emet fluorescència amb l'rRNA dels bacteris. Posteriorment, les mostres són observades mitjançant un microscopi confocal Leica TCS del Servei de Microscòpia de la UAB. Les imatges obtingudes amb el microscopi ens serveixen posteriorment per a realitzar la quantificació de la superfície ocupada per a cada tipus de microorganisme amonioxidant.

Cal dir que pel que fa a l'utilització del microscopi confocal en l'observació de mostres tractades amb FISH s'ha elaborat un protocol d'actuació que serà vàlid per a posteriors investigacions en aquest camp.

## Resultats i discussió

Els resultats consten d'una part qualitativa segons si la sonda s'ha hibridat amb la mostra o no. Els resultats són els que es mostren en la taula 1.

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

**Taula 1:** Resultats qualitius de les diferents sondes utilitzades

**Font:** Elaboració pròpia a partir de resultats experimentals.

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

Així doncs, podem afirmar que en les nostres mostres tenim presència de bacteris del gènere *Nitrobacter* (NIT3), *Nitrosomonas halotolerans* (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.

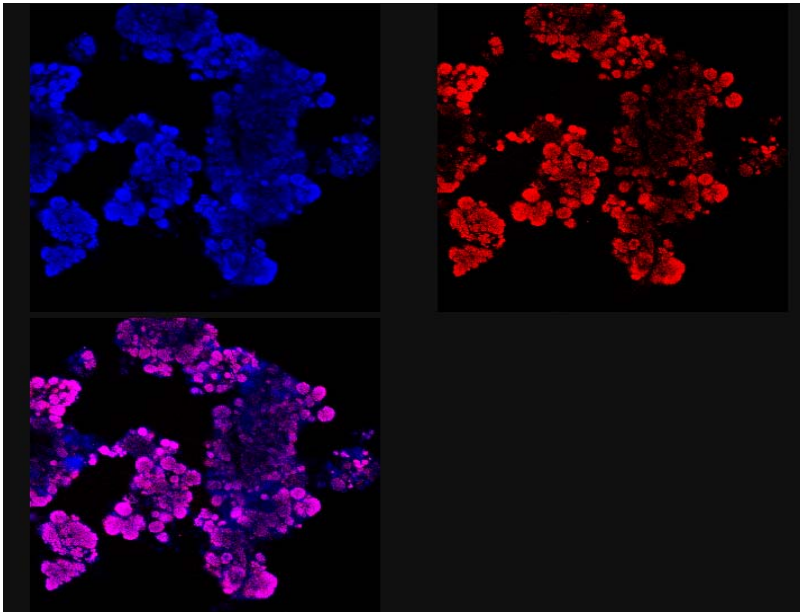
Una selecció d'imatges obtingudes amb el confocal es presenta a continuació:

En la imatge 1: 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 2: tenim les mateixes sondes, en aquest cas aplicades a la mostra 12.

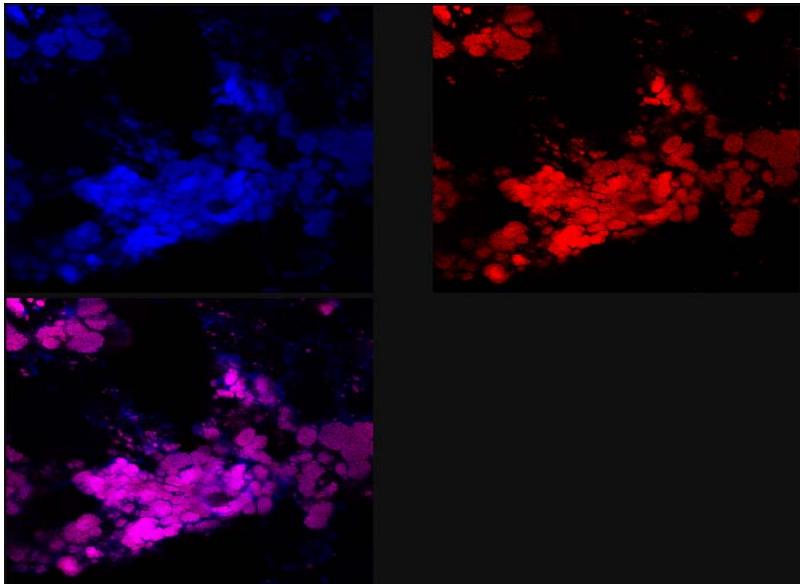
Finalment, en la imatge 3, s'han utilitzat 3 sondes. El color vermell correspon a la sonda general EUB mix, el blau a la sonda específica per a AOB i el groc a la sonda NIT 3 que és la sonda per a NOB. En aquesta imatge es veu clarament que els microorganismes nitritoxidants són minoritaris en la mostra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



**Imatge 1:** Sondes EUBmix i NEU a la mostra 6

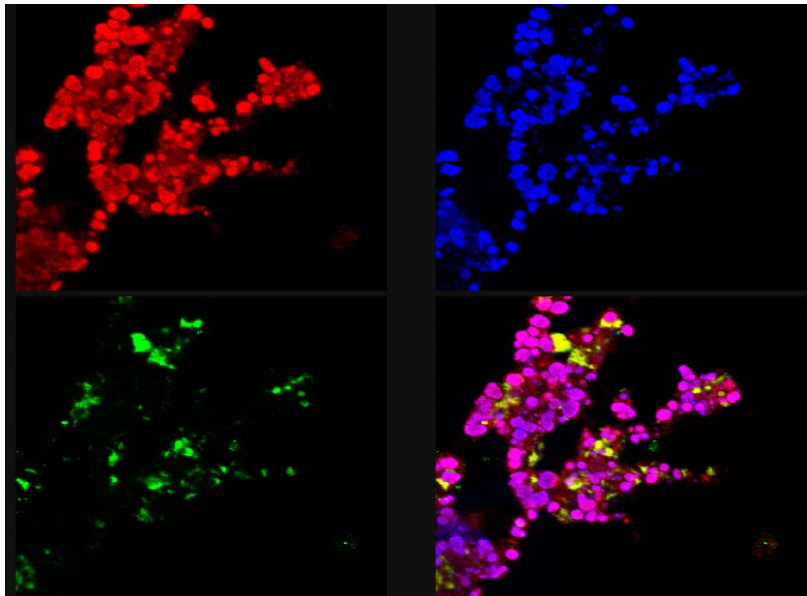
**Font:** Experimentació

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



**Imatge 2:** Sonda EUB mix i NEU en la mostra 12

**Font:** Experimentació



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

**Font:** Experimentació

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

Pel que fa als resultats de la quantificació, que realment han estat pocs degut a les diverses dificultats que em tingut (mal estat de conservació de la formamida i problemes amb el microscopi confocal, és mostren de forma numèrica en la taula 2:

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

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 %.

## Conclusions

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 floccs. 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 microsensors 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.