



UNIVERSIDAD DE SONORA



POSGRADO EN BIOCIENCIAS

MICROBIOLOGÍA MOLECULAR (2442)

**UNIDAD 5. Reacción en Cadena de la Polimerasa
(PCR)**

Elaboró: Dra. Kadiya del C. Calderón Alvarado

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

- Técnica más importante y revolucionaria en biología molecular.
- Permite obtener **in vitro** millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula.
- En Procariotas al menos 12 proteínas actúan en la síntesis de dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde (template).

En la célula

- 1) Identificación del sitio de origen de la replicación
- 2) Desenrollamiento de la doble hélice
- 3) Estabilización de la estructura desenrollada
- 4) Generación de cadenas iniciadoras complementarias con un extremo 3' libre que sirve de iniciador para que la ADN polimerasa comience su actividad catalizadora
- 5) Avance de la bifurcación replicadora por desenrollamiento.
- 6) Ensamblaje de dos cadenas complementarias
- 7) Identificación de los sitios de terminación
- 8) Superenrollamiento de las dos nuevas moléculas de ADN

¿In vitro...qué necesita la PCR? Mínimo.....

-Termociclador

-ADN molde con el gen de interés

-Buffer → mantener pH

-dNTPs (ATCG)

-primers (Reverse and Forward 15-30bp)

-MgCl₂ → cofactor necesario para la taq

-taq polymerasa

-ddH₂O

Opcional--Aditivos

-BSA → captura inhibidores de PCR

-DMSO → disminuye la estructura secundaria del ADN

-T4 gp32

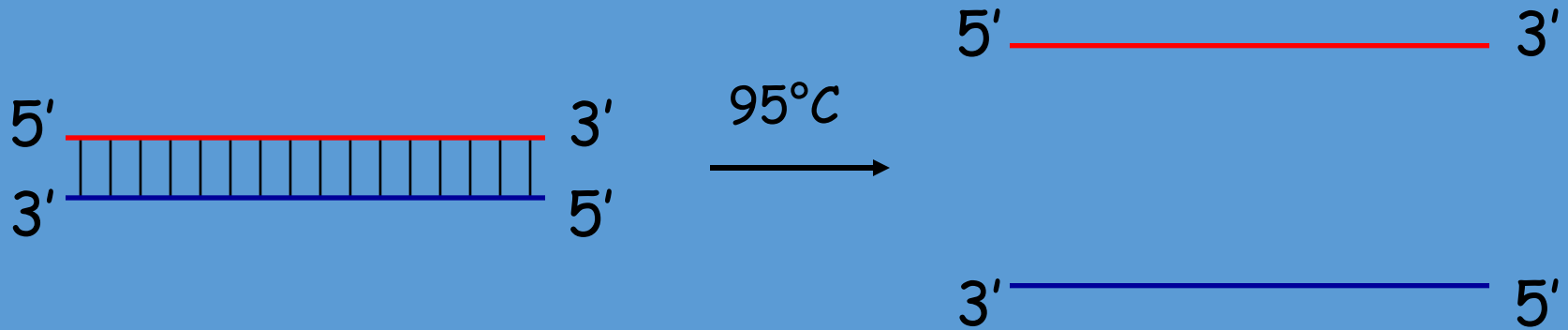
-Glicerol: incrementa la estabilidad térmica de la taq

Betaina → mejora la amplificación

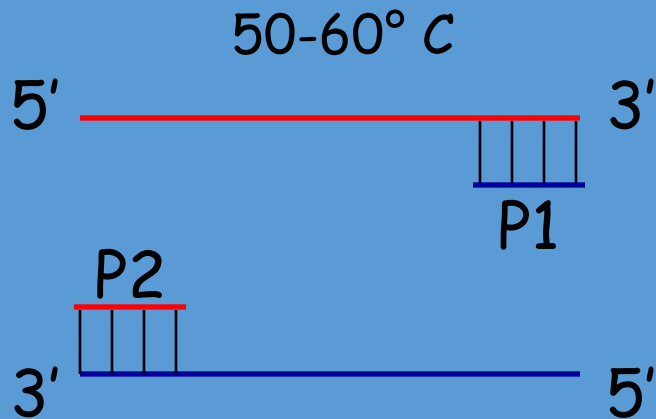
Triton X-100 inhibe formación de estructuras secundarias del ADN

Temperaturas de la PCR, pasos necesarios

1° Desnaturalización



2° Annealing



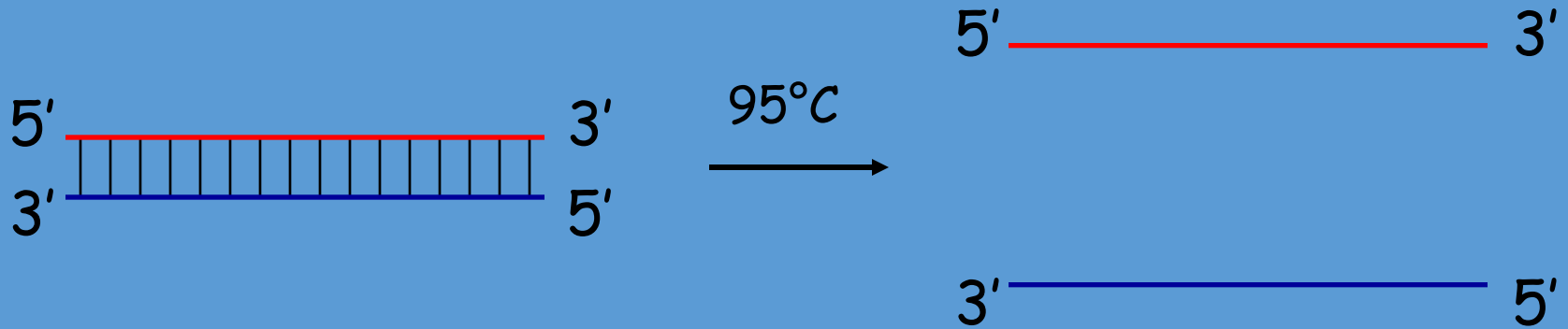
Primers en exceso en comparación con el ADN a ser amplificado.

Los primers hibridan con la cadena complementaria de ADN y están orientados mirando hacia su extremo 3'

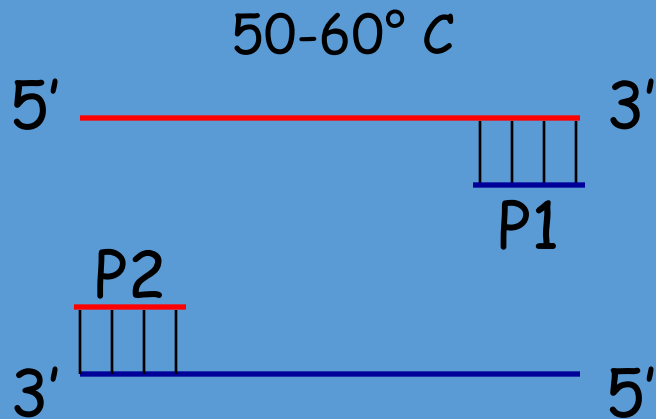
Así, la taq polimerasa cataliza la síntesis de la nueva cadena en sentido 5' – 3'

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

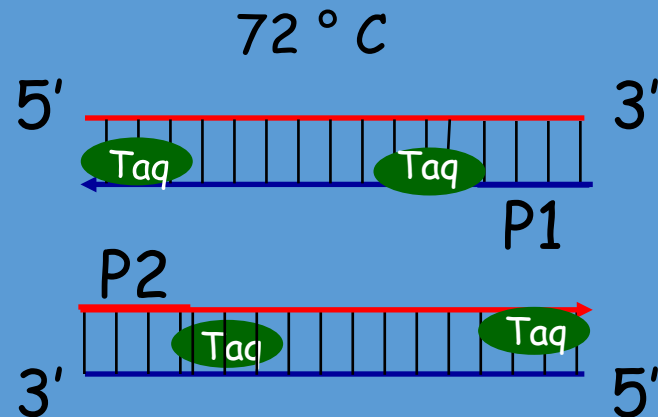
1° Desnaturalización



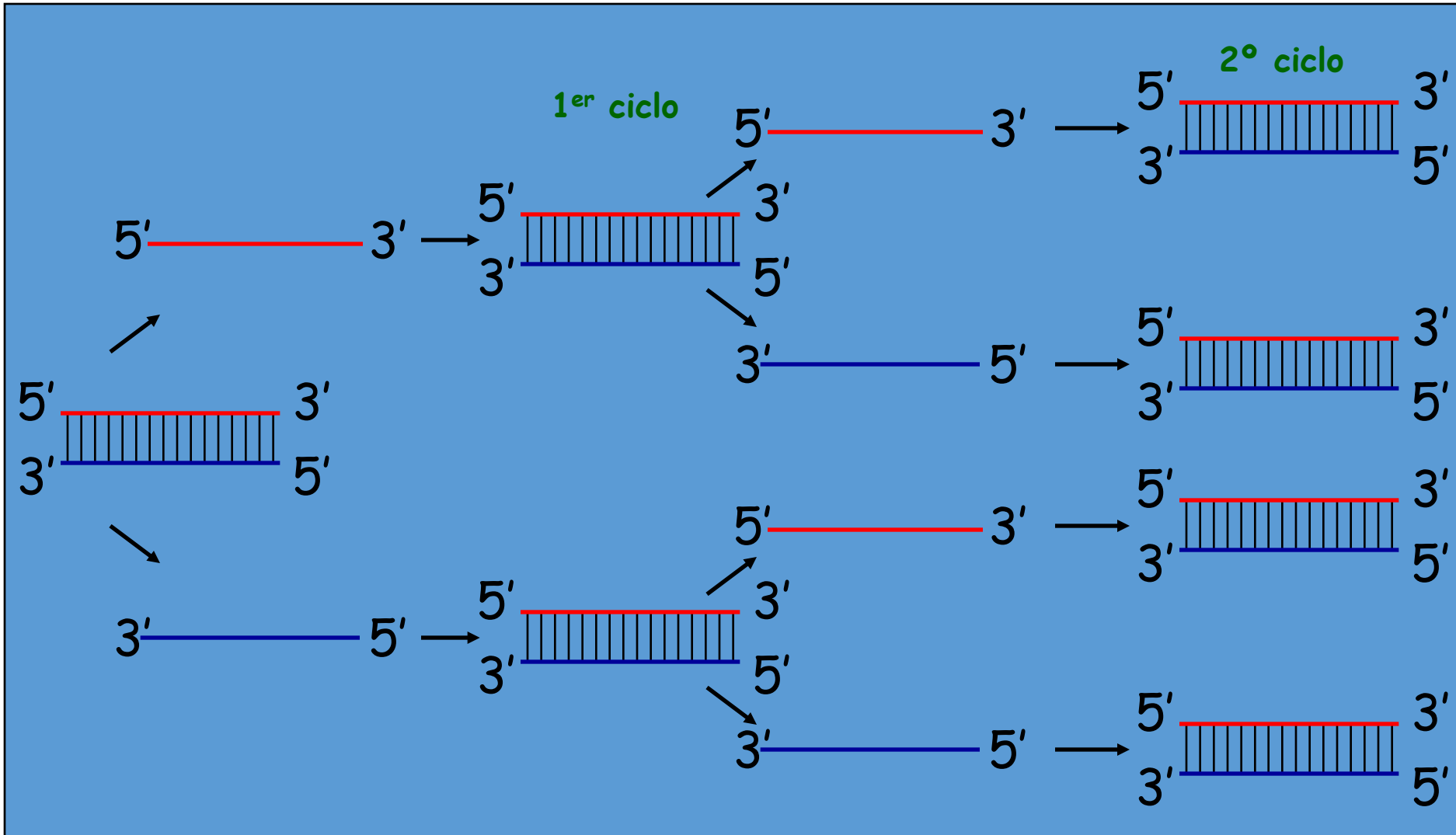
2° Annealing



3° Extensión



PCR

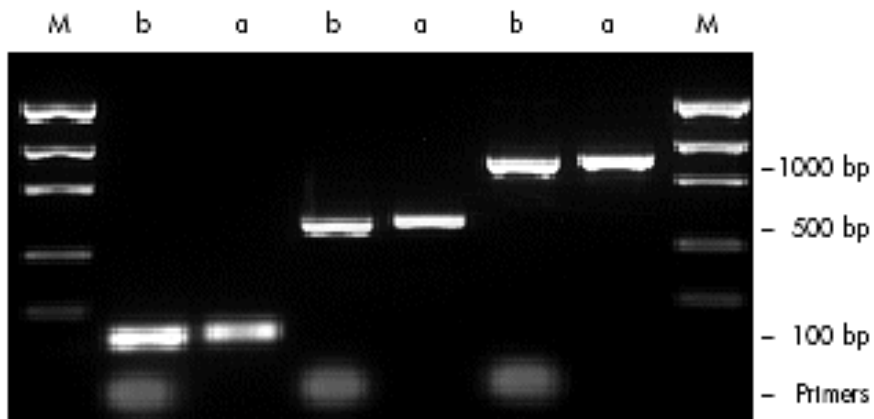


$$N_F = N_I 2^c \quad c = \text{n}^\circ \text{ de ciclos}$$

Comprobación del producto PCR punto final

Gel de agarosa

0.8-2.5% para productos de PCR



Algunas recomendaciones.....

- control positivo
- Siempre un control negativo
- Limpieza de pipetas
- Puntas con filtro
- Preparar la mezcla en una campana donde no haya ADN ni RNA
- ddH₂O
- UV
- Material autoclavado

¿Dónde encuentro los primers?

The image shows a web browser with two tabs. The top tab is the Bio-Rad website at www.bio-rad.com/es-mx/applications-technologies/pcr-troubleshooting. The page features the Bio-Rad logo, navigation menus for 'Investigación Científica', 'Diagnóstico Clínico', 'Spectroscopy', 'Cromatografía de Procesos Industriales', 'Food Science', 'BioEducación', and 'Información de la empresa'. A search bar contains the text 'Palabras clave, nombre o número de producto'. The main content area is titled 'PCR Troubleshooting' and includes a 'Visión general' section and a 'Consultar a un experto' box with contact information: 'Llámenos al +52 (55) 5488 7670' and options to 'Enviar por correo electrónico una pregunta rápida' and 'Obtener soporte de producto'.

The bottom tab is the PCRonline.com website at www.pcronline.com/Lectures/2011/Think-don-t-panic-Vanishing-carotid-artery-flow-before-actual-intervention. The page features the PCRonline logo, a 'EuroIntervention' banner, and a navigation menu with 'FOCUS ON', 'PUBLICATIONS', 'JOURNAL CLUB', 'CASES', 'NEWS', 'COURSES', 'LECTURES', 'VIDEOS', and 'SEARCH'. The main content area is titled 'Think, don't panic! Vanishing carotid artery flow before actual intervention' and includes a session description: 'Session: Occlusion after internal carotid stenting' and 'Speaker: J. Lee'. A registration form is visible with fields for 'Email address' and 'Password', and a 'Register now for FREE' button. The form lists benefits: 'Access all the lectures from the PCR courses', 'Watch the sessions' videos', 'Discuss cases', and 'And more...'. A footer contains a cookie consent message: 'By using this website, you agree to our use of cookies.' and a 'Mostrar todas las descargas...' link.

RT-PCR (Transcriptasa Reversa-PCR)



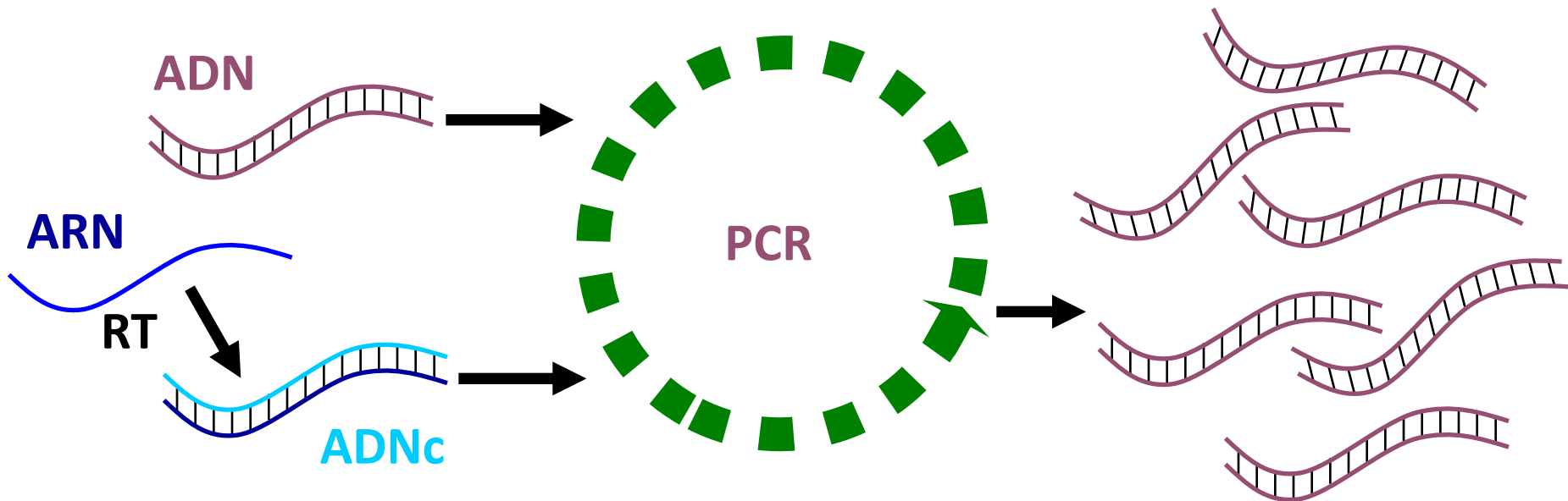
Se utiliza para analizar la expresión del ARNm de algún gen de interés.

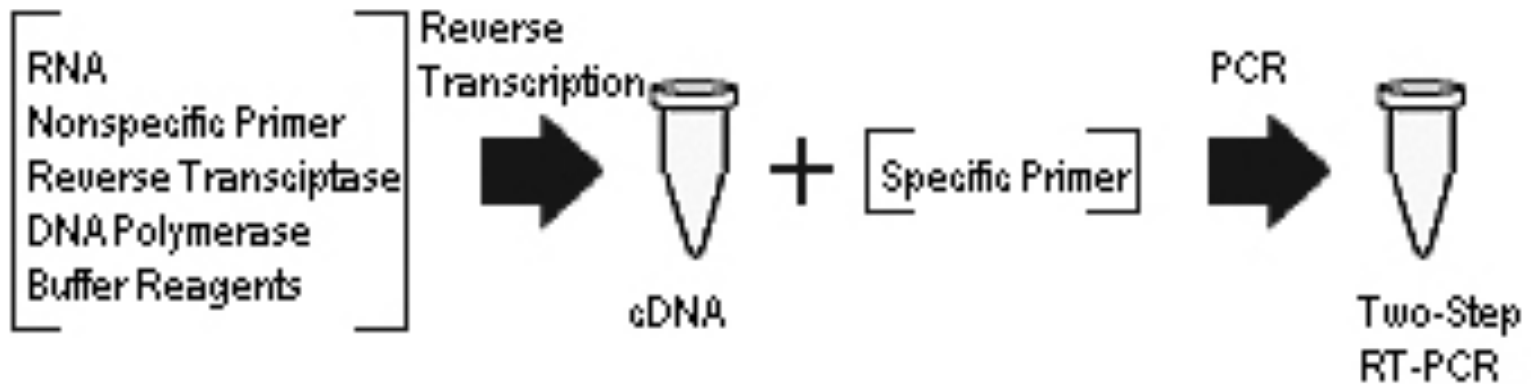
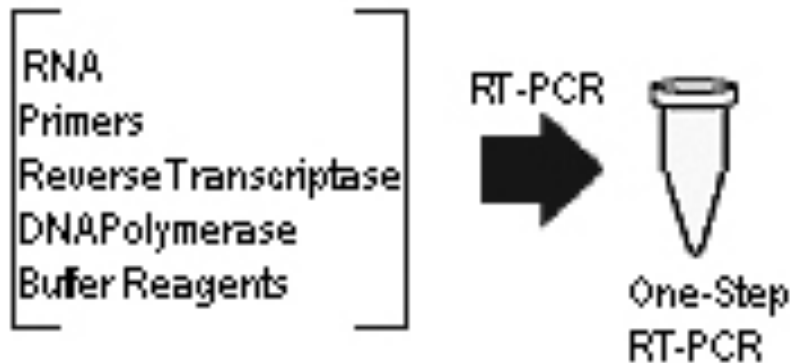
Reacción en Cadena de la Polimerasa Combinada con Retrotranscripción (RT-PCR)

Variante de la técnica de PCR que permite la detección y amplificación de copias de **ARN** presentes en una muestra.

Se basa en el aislamiento de ARN y su conversión en ADNc, mediante empleo de la **transcriptasa inversa viral** como paso previo a la reacción de PCR (RT= retrotranscripción).

Las bacterias con altos niveles de ARNr (alto nº de ribosomas) son generalmente las más activas desde el punto de vista funcional.





A: cDNA synthesis and pre-denaturation	B: PCR amplification	C: Final extension-(optional)
Perform 1 cycle of: 45–55°C for 15–30 minutes 94°C for 2 minutes	Perform 35–40 cycles of: Denature, 94°C for 15 seconds Anneal, 55–60°C for 30 seconds Extend, 68–72°C for 1 minute/kb	1 cycle of 72°C for 5–10 minutes For Perkin-Elmer Model 480 cyclor, use 30 second denaturation instead of 15 seconds.

qPCR o Real-Time PCR (PCR en tiempo real)

También denominada qPCR (quantitative PCR)

-Permite **cuantificar el número de copias** de un fragmento de ADN ó ARN presente en una muestra, combinando la técnica de PCR con la detección cuantitativa de la emisión de fluorescencia en cada ciclo.

-El producto es monitoreado conforme transcurre la reacción.

- Es el método más sensible para detectar y cuantificar una región de interés, aún con cantidades de molde muy pequeñas.

Aplicaciones:

- Detección y estudio cuantitativo de **la expresión de genes de interés** en una comunidad mixta.
- **Cuantificación de grupos de microorganismos** en comunidades complejas.

PCR/RT-PCR en tiempo real (qPCR/RT-qPCR)

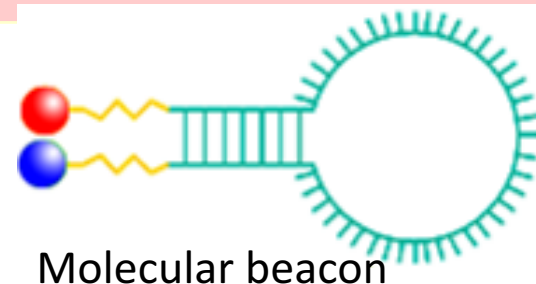
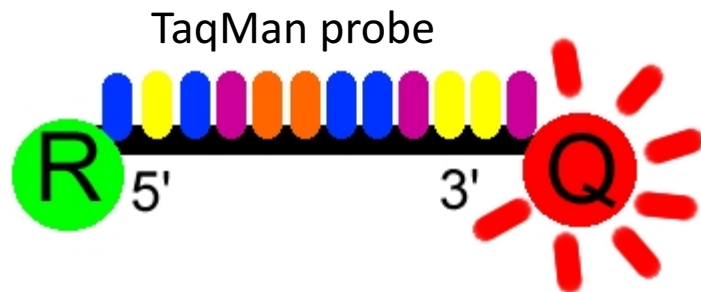
Dos métodos principales:

No específicos;

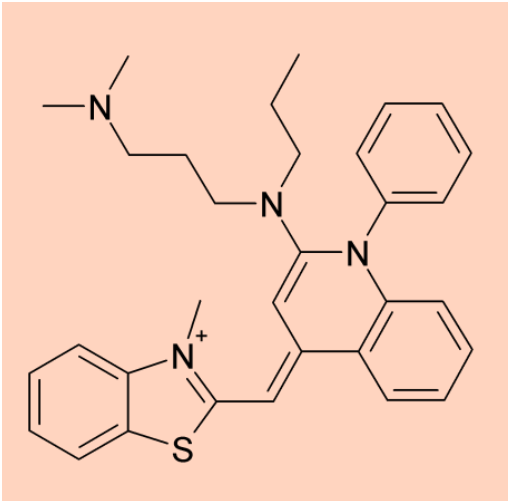
- Detección de copias de ADN bicatenario, mediante su unión **inespecífica** a una molécula emisora de luz

Específicos

- Empleo de sondas **específicas** complementarias de la secuencia del fragmento diana, **marcadas** con moléculas emisoras de luz fluorescente (**reporteros fluorescentes**) mientras se amplifican:
 - TaqMan probes (las más utilizadas)
 - Molecular beacons
 - Scorpions
 - Otros



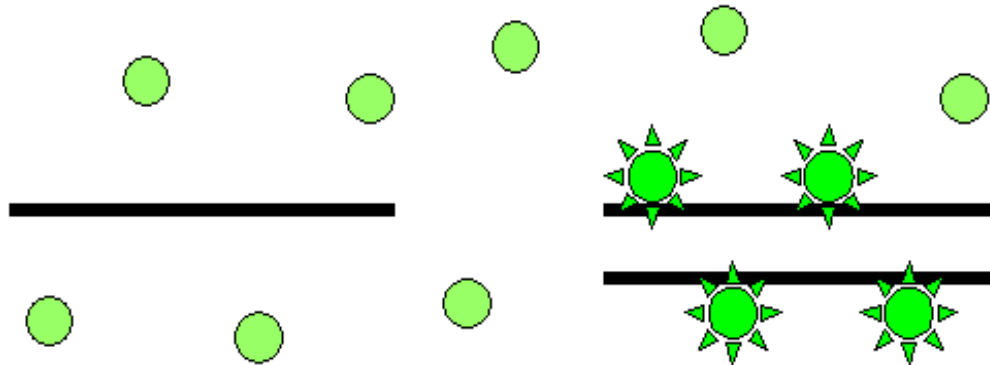
PCR/RT-PCR en tiempo real (qPCR/qRT-PCR)



SYBR Green I

Fluorocromo, se une inespecíficamente al ADN bicatenario

Tras la unión, incrementa la emisión de fluorescencia verde



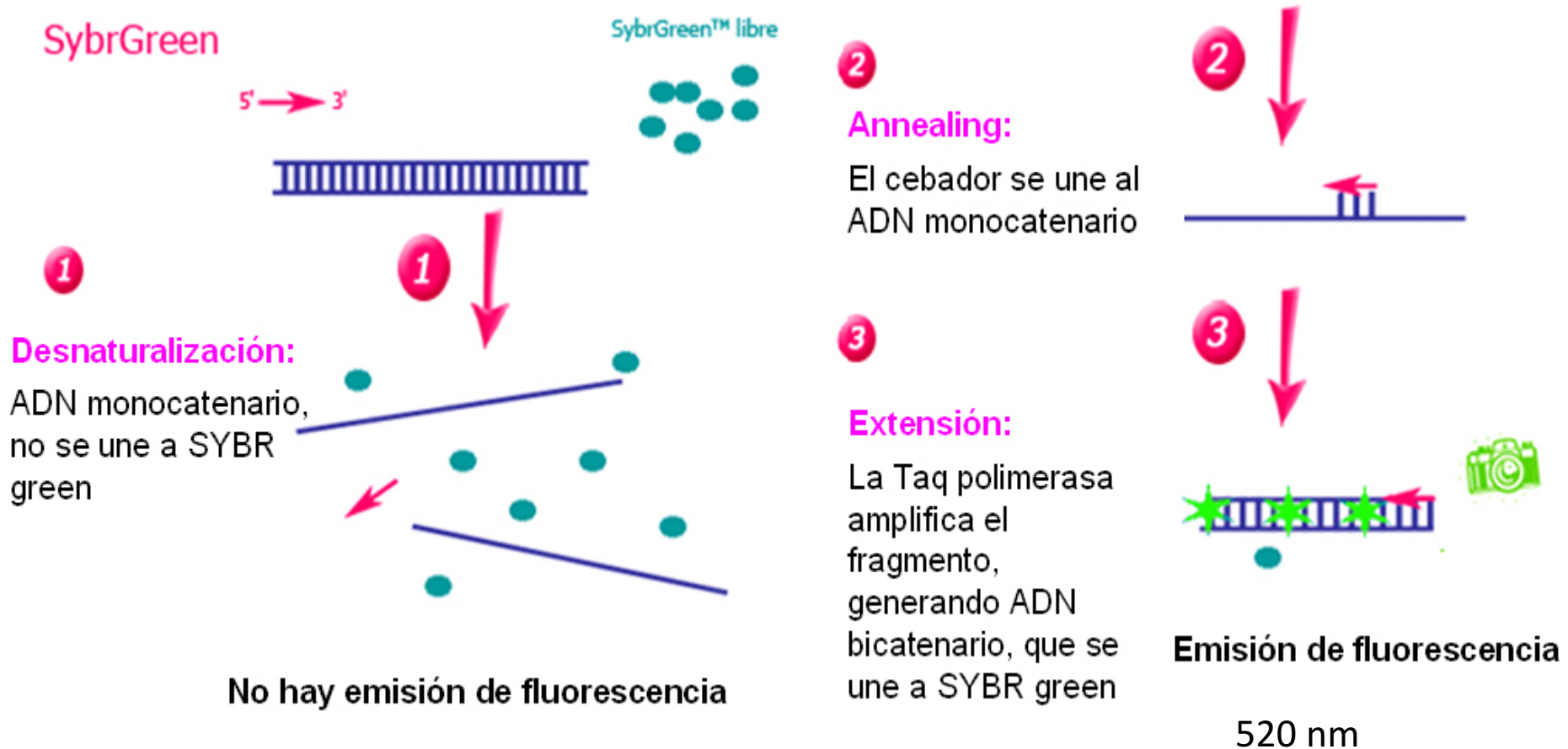
incremento de
la fluorescencia

ADN monocatenario
no se une a SYBR green

ADN bicatenario
se une a SYBR green

PCR/RT-PCR en tiempo real (qPCR/qRT-PCR)

Durante la qPCR:



La fluorescencia se va incrementando exponencialmente en cada ciclo

SYBER Green

Ventajas.... Bajos costos

Desventajas.. Primer dimers... software

PCR/RT-PCR en tiempo real (qPCR/qRT-PCR)



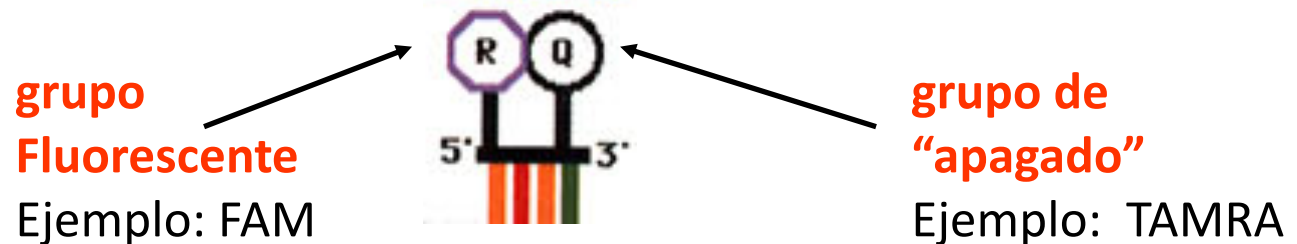
Específicos → Transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET)

La energía se transmite del reporter(donador) al quencher (aceptor)

Sondas:

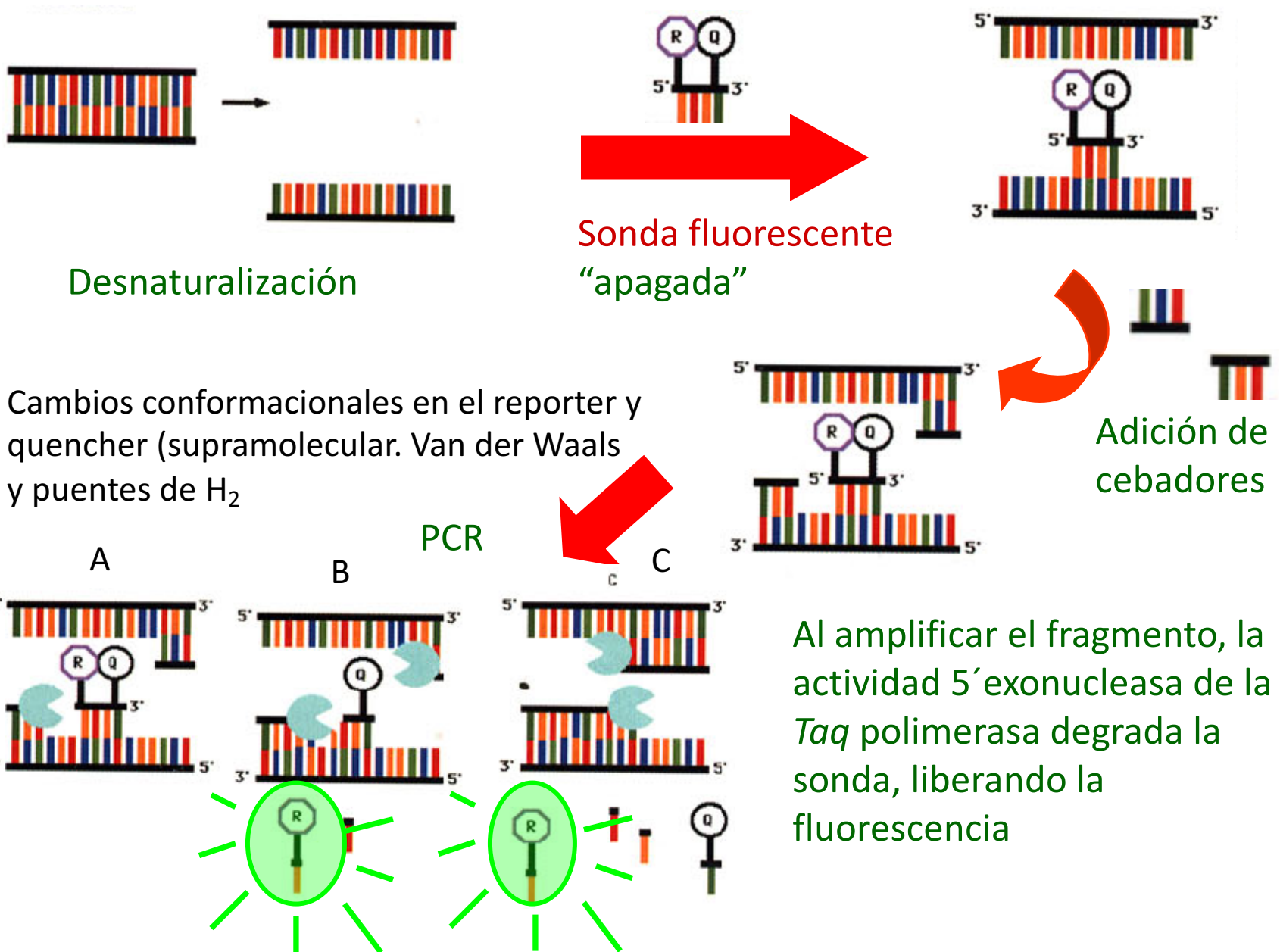
- Hidrólisis
- Hibridación

Sonda fluorescente (Taqman probe) → hidrólisis



- Complementaria al interior del fragmento que se quiere amplificar.
- Extremo 3' bloqueado → no funciona como cebador
- Marcada con un colorante fluorescente y un grupo “quencher” (de apagado).

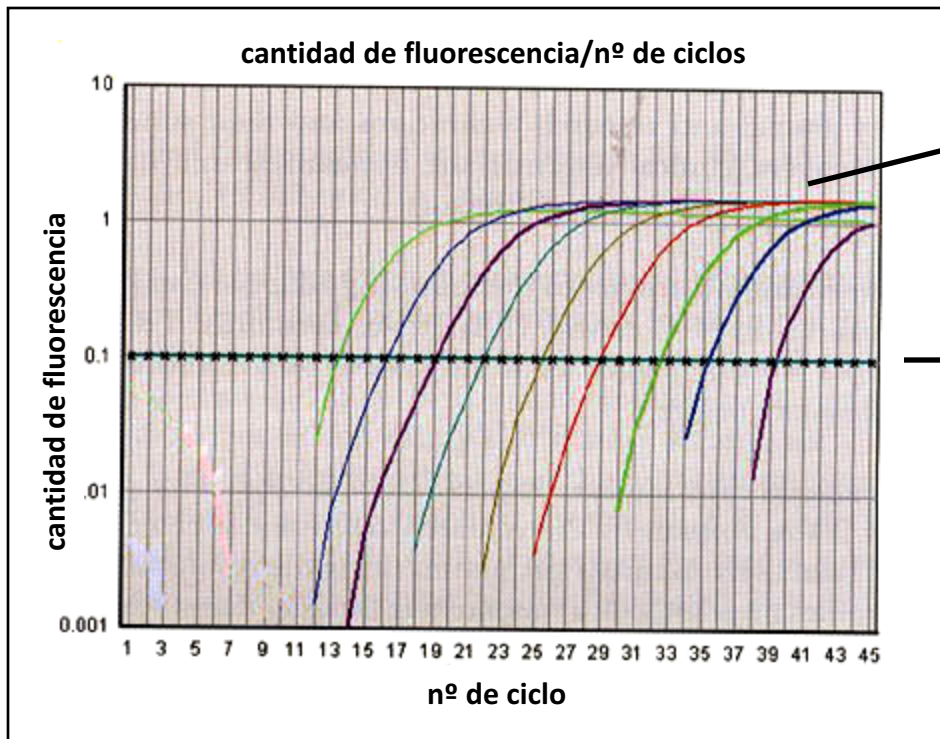
PCR/RT-PCR en tiempo real (qPCR/qRT-PCR)



PCR/RT-PCR en tiempo real (qPCR/qRT-PCR)

Cuantificación: (Ct value)

- Se establece una **concentración de ADN/ARN umbral** como estándar,
- el **número de ciclos** que se necesitan para alcanzarla permite calcular la concentración inicial de ADN/ARN en la muestra original, por **comparación con patrones**.



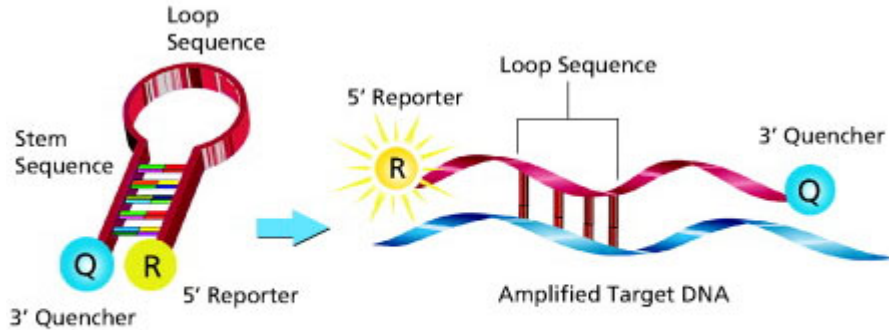
Cada línea representa la fluorescencia de una muestra con distinta cantidad de ADN inicial.

Cantidad de fluorescencia correspondiente a la concentración de ADN umbral.

PCR/RT-PCR en tiempo real (qPCR/qRT-PCR)

Tipos de sondas fluorescentes → Hibridación

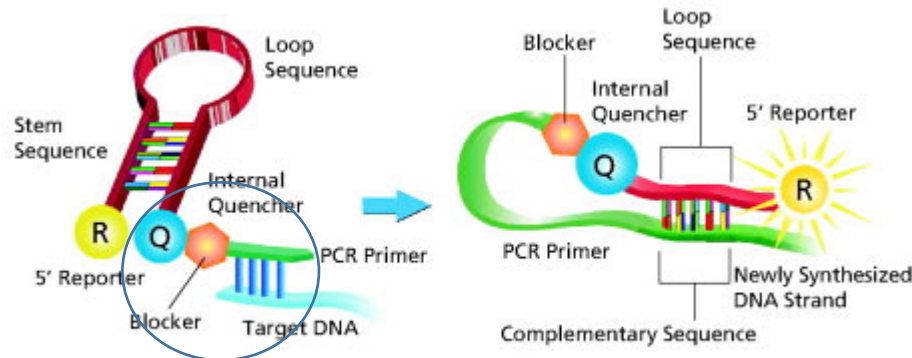
Molecular beacons



La sonda está flanqueada por secuencias complementarias, que mantienen unidos el grupo fluorescente y el quencher. En solución, no emite fluorescencia

La sonda unida al ADN molde se despliega y al separarse el grupo fluorescente y el quencher emite fluorescencia

Cuando las dos sondas **hibridan** al molde, el **reportero** es excitado y la señal emitida es **transferida** al aceptor (**quencher**), generando un aumento en la cantidad de fluorescencia



1. Quenching of the fluorescence

2. Emission of the fluorescence

Scorpions

La sonda está flanqueada por secuencias complementarias, que mantienen unidos el grupo fluorescente y el quencher (no emite fluorescencia). Además, está unida al cebador de PCR por un nucleótido bloqueante.

Tras la amplificación del ADN molde, **se despliega la sonda y se une al ADN recién sintetizado**. El grupo fluorescente y el quencher se separan, emitiendo fluorescencia

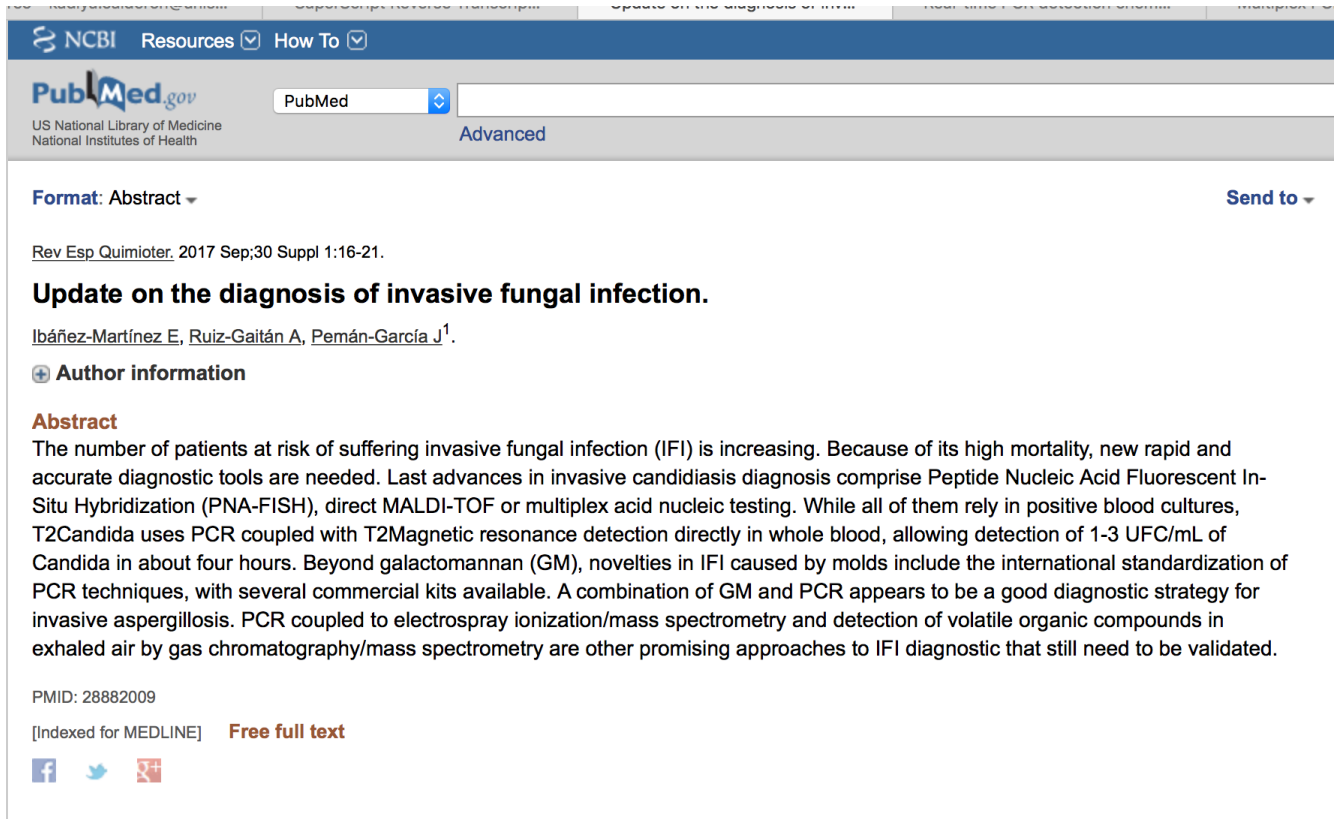
Consideraciones para qPCR

- Triplicados
- Controles negativos
- curva estándar
- control positivo

Multiplex PCR

- Amplificación simultánea en un único tubo distintas secuencias específicas
- Necesita Temperaturas de annealing similares

Discusión en clase....



The image shows a screenshot of a PubMed abstract page. At the top, there is a navigation bar with the NCBI logo and 'Resources' and 'How To' dropdown menus. Below this is the PubMed logo and the text 'US National Library of Medicine National Institutes of Health'. A search bar contains the text 'PubMed' and a dropdown arrow. To the right of the search bar is the word 'Advanced'. Below the search bar, there is a 'Format: Abstract' dropdown menu and a 'Send to' dropdown menu. The main text of the abstract is as follows:

Rev Esp Quimioter. 2017 Sep;30 Suppl 1:16-21.

Update on the diagnosis of invasive fungal infection.

Ibáñez-Martínez E, Ruiz-Gaitán A, Pemán-García J¹.

Author information

Abstract

The number of patients at risk of suffering invasive fungal infection (IFI) is increasing. Because of its high mortality, new rapid and accurate diagnostic tools are needed. Last advances in invasive candidiasis diagnosis comprise Peptide Nucleic Acid Fluorescent In-Situ Hybridization (PNA-FISH), direct MALDI-TOF or multiplex acid nucleic testing. While all of them rely in positive blood cultures, T2Candida uses PCR coupled with T2Magnetic resonance detection directly in whole blood, allowing detection of 1-3 UFC/mL of Candida in about four hours. Beyond galactomannan (GM), novelties in IFI caused by molds include the international standardization of PCR techniques, with several commercial kits available. A combination of GM and PCR appears to be a good diagnostic strategy for invasive aspergillosis. PCR coupled to electrospray ionization/mass spectrometry and detection of volatile organic compounds in exhaled air by gas chromatography/mass spectrometry are other promising approaches to IFI diagnostic that still need to be validated.

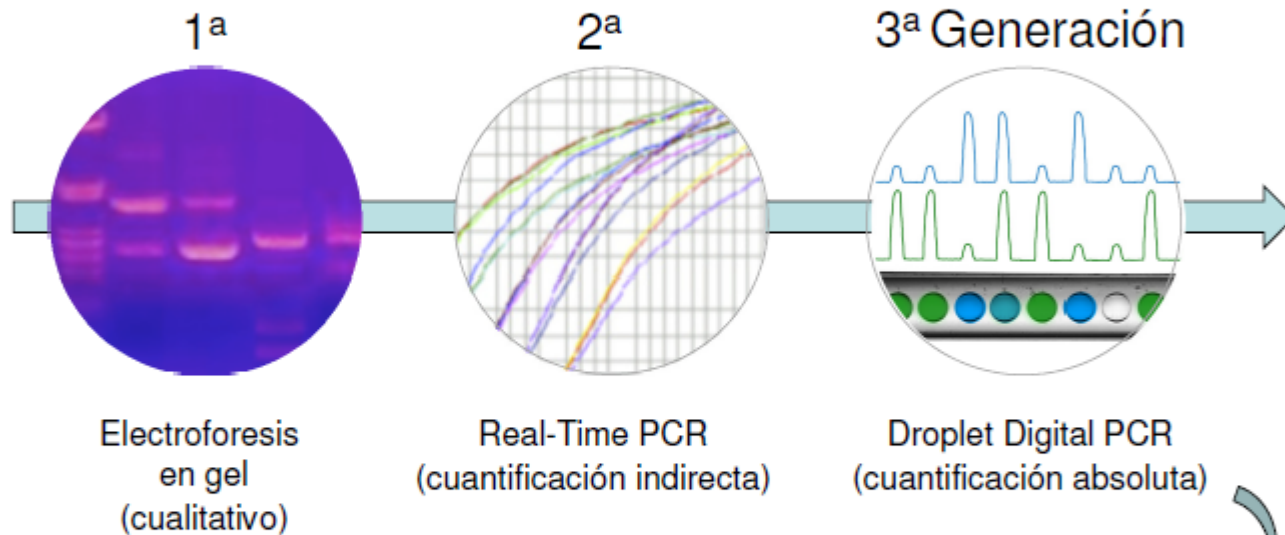
PMID: 28882009

[Indexed for MEDLINE] **Free full text**

At the bottom, there are social media icons for Facebook, Twitter, and a plus sign for additional sharing options.

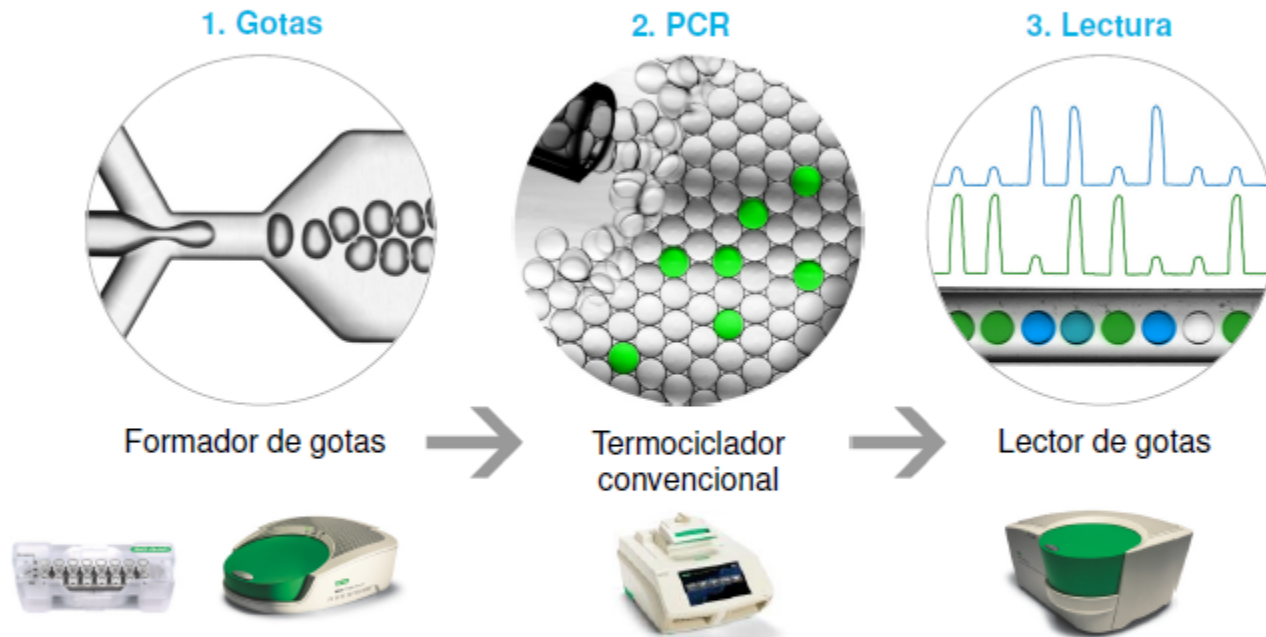
PCR Digital

ddPCR™: La tercera generación de la PCR



- Punto final (0's o 1's)
- Menos sensible a la eficiencia de reacción
- No se requiere curva estándar
- Mayor tolerancia a inhibidores de la PCR

Droplet Digital PCR: Una solución poderosa



- Resultado: copias/ μ l
- Rango dinámico: 1–100,000 copias/pozo

Partición de la muestra



**Una
medición**

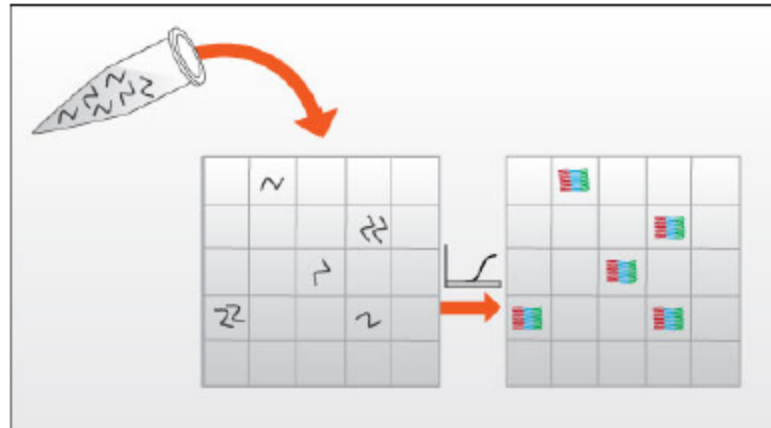


Reacciones de PCR en
nanogotas independientes,
amplificación de eventos
individuales



**Varios miles de
mediciones**

- La división de la PCR en pequeños grupos permite lecturas de “si/no”, las cuales son independientes de la eficiencia del ensayo y de inhibidores comunes.



Bio-Rad QX200™ Droplet Digital PCR System

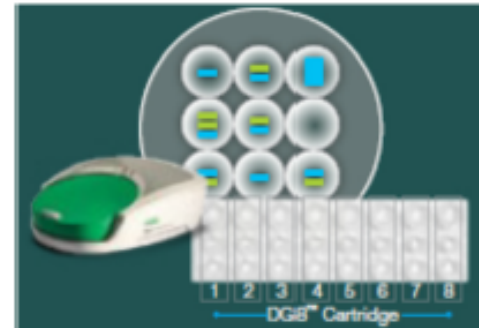


El sistema ddPCR QX200 proporciona una precisión y sensibilidad sin igual en la cuantificación absoluta de ácidos nucleicos con la flexibilidad del uso de sondas o colorante EvaGreen

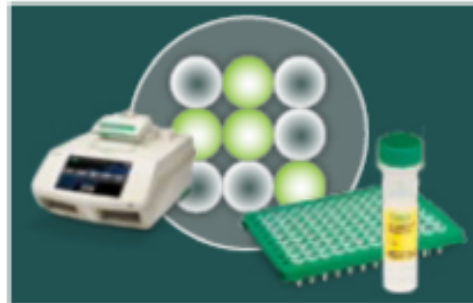
Procedimiento



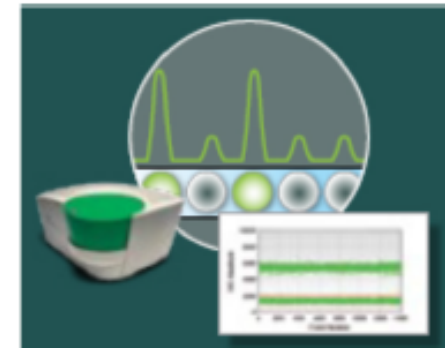
1. Preparación de la reacción



2. Formación de gotas



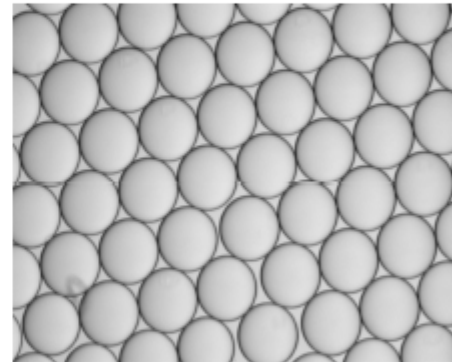
3. PCR en presencia de sondas o Eva Green



4. Lectura y análisis de datos

Aplicaciones

- Cuantificación absoluta (sin curva estándar)
- Análisis de una sola célula
- Detección de patógenos



Escenario 1. **Ventaja**

Poca cantidad de ADN distribuido en miles de eventos (en este caso gotas).

-La **distribución al azar hace que sea muy alta la probabilidad de que una gota tenga solo una copia de DNA de interés**, por lo tanto, al cuantificar las gotas positivas, las puedes correlacionar directamente con el número de copias de DNA que había originalmente en la muestra

Escenario 2. **No es tan fácil**

Alta cantidad de ADN distribuido en miles de eventos. La distribución al azar de las moléculas de DNA resulta en que una gota contiene varias copias del DNA de interés. En este caso, para hacer la correlación del número de gotas positivas con el número de copias del gen de interés, se tiene que aplicar un ajuste matemático.

Se aplica el algoritmo de Poisson, el cual relaciona la fracción de gotas positivas con el número de copias de DNA.

-**baja cantidad de DNA molde, para no saturar las gotas.**

-**funciona bien para eucariotas y muestras poco complejas**

Impact factor:
5.528

Water Research 92 (2016) 208–217



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Water Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres



The ratio of metabolically active versus total Mycolata populations triggers foaming in a membrane bioreactor



P. Maza-Márquez ^{a,*}, R. Vílchez-Vargas ^b, N. Boon ^b, J. González-López ^a,
M.V. Martínez-Toledo ^a, B. Rodelas ^a

^a Department of Microbiology and Institute of Water Research, University of Granada, Granada, Spain

^b Laboratory of Microbial Ecology and Technology (LabMET), Ghent University, Coupure Links 653, 9000 Gent, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2015

Received in revised form

14 December 2015

Accepted 18 December 2015

Available online 2 February 2016

Keywords:

Membrane bioreactor (MBR)

qPCR

RT-qPCR

Mycolata

Foaming

Non-metric multidimensional scaling (MDS)

ABSTRACT

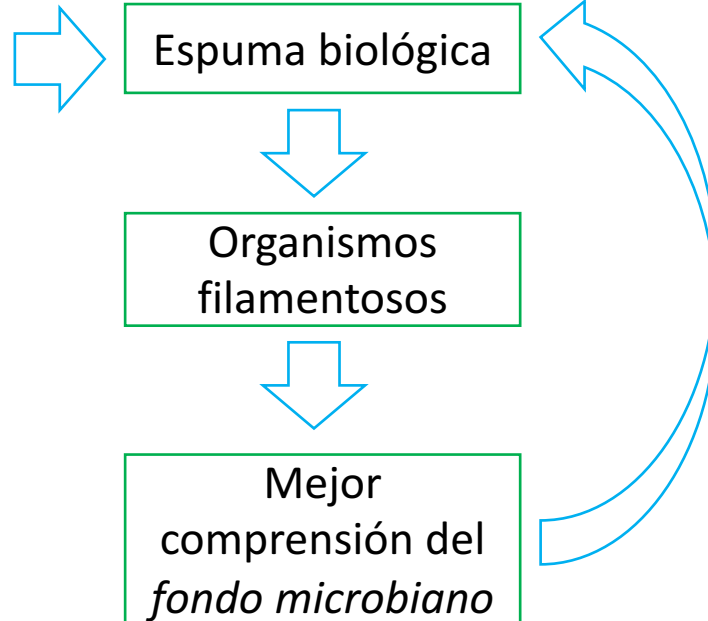
The abundance of total and metabolically active populations of Mycolata was evaluated in a full-scale membrane bioreactor (MBR) experiencing seasonal foaming, using quantitative PCR (qPCR) and retro-transcribed qPCR (RT-qPCR) targeting the 16S rRNA gene sequence. While the abundance of total Mycolata remained stable (10^{10} copies of 16S rRNA genes/L activated sludge) throughout four different experimental phases, significant variations (up to one order of magnitude) were observed when the 16S rRNA was targeted. The highest ratios of metabolically active versus total Mycolata populations were observed in samples of two experimental phases when foaming was experienced in the MBR. Non-metric multidimensional scaling and BIO-ENV analyses demonstrated that this ratio was positively correlated to the concentrations of substrates in the influent water, F/M ratio, and pH, and negatively correlated to temperature and solids retention time. It is the first time that the ratio of metabolically active versus total Mycolata is found to be a key parameter triggering foaming in the MBR; thus, we propose it as a candidate predictive tool.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introducción



Plantas de tratamiento de aguas residuales (WWTPs)



Los actinomicetos nocardioformes
Ácidos micólicos (*Mycolata*)
Suborden *Corynebacterinea*
Orden *Actinomycetales*



Este grupo de microorganismos contiene especies filamentosas que causan problemas de formación de espumas biológicas ("foaming") en plantas de tratamiento de aguas residuales con sistemas de fangos activos.



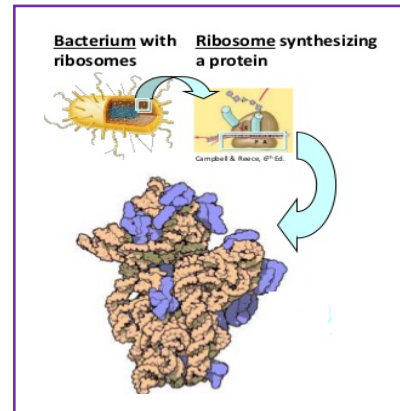
Descrito *Gordonia*; sin embargo existe una mayor diversidad de *Mycolata*.



Mycolata



Biorreactor de membrana



RT – qPCR
16S rRNA

Escalamiento multidimensional no métrico (MDS)

BIO-ENV

PARÁMETROS
TRH, SRT

CONDICIONES AMBIENTALES
Temperatura, pH, biomasa

Materiales y Métodos

BIORREACTOR DE MEMBRANA

AIREADO

ANÓXICO

MBR registra: la temperatura, pH, oxígeno disuelto, nivel de los tanques, presión de la membrana y tasas de flujo.

*Concentraciones de suspensiones de sólidos (total iTSS; volátil iVSS).

*Total de demanda química de oxígeno (COD).

*Demanda de oxígeno biológico total en 5 días (BOD₅).

Verano 2009 (Sm09).

Otoño 2009 (Au09).

Verano 2010(Sm10).

Invierno 2012 (Wn12).

Tiempo de retención hidráulica (HRT).

Tiempo de retención sólidos (SRT).

MUESTREO Y EXTRACCIÓN DE NA

200 ml (MBR aireado, anóxico).

2 réplicas biológicas (DNA /RNA).

Pellet → DNA 4°C (experimentos) 20°C (almacenados).

FASTDNA 2ml SPIN kit for Soil.

Pellet → RNA resuspendido en 1ml RNAProtect Bacteria

Reagen.t

Fast RNA Blue kit.

cDNA

Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen.)

Nanodrop ND-1000.

qPCR

Polimerasa TrueStart Hot Star DNA

SYBR Green I.

Calibración de la Curva → Plásmidos clonados

TOPO TA cloning

Evaluación de Ct y tamaño de bandas por geles de agarosa.

Table 1

Primers used for the quantification of total and active populations of Bacteria and Mycolata in the MBR samples.

Group	Gene marker	Primers		References
		Name	Sequence (5'-3')	
Bacteria	V3- 16S rRNA	P1 (341F)	CCTACGGGAGGCAGCAG	(Muyzer et al., 1993)
		P2 (534R)	ATTACCGCGGCTGCTGG	
Mycolata	16S rRNA	F249	GATGGGCCCGCGGCCTATCA	(de Azeredo et al., 2006)
		R689	TACACCAGGAATTCCAGTCT	

Table 2

qPCR cycling conditions used for the quantification of the abundance of total and active populations of Bacteria and Mycolata in the MBR samples.

		Total bacteria	Mycolata
Amplification (×40 cycle)	Initial denaturalization	95 °C 3 min	95 °C 3 min
	Denaturalization	94 °C 30 s	94 °C 1 min
	Primers annealing	58 °C 40 s	56 °C 40 s
	Elongation	72 °C 40 s	72 °C 40 s
	Melting curve	60°C–95 °C + 2 °C/min Fluorescence measured each 15 s	
	Hold	25 °C	

Estadística

SPSS Statistics v19. Distribución Normal

Primer Software qPCR/ RT-qPCR (número de copias por L de 16S rRNA genes y 16S rRNA de Bacterias y *Mycolata*) evaluados por una matriz de Bray Curtis para el coeficiente de similitud. Basado en la matriz MDS.

Primer 6 software genera vectores para correlaciones logarítmicas (Spearman).

BIO-ENV Correlación de Spearman dos matrices: Bray Curtis - Euclidean (variables abióticas).

Discusión de Resultados

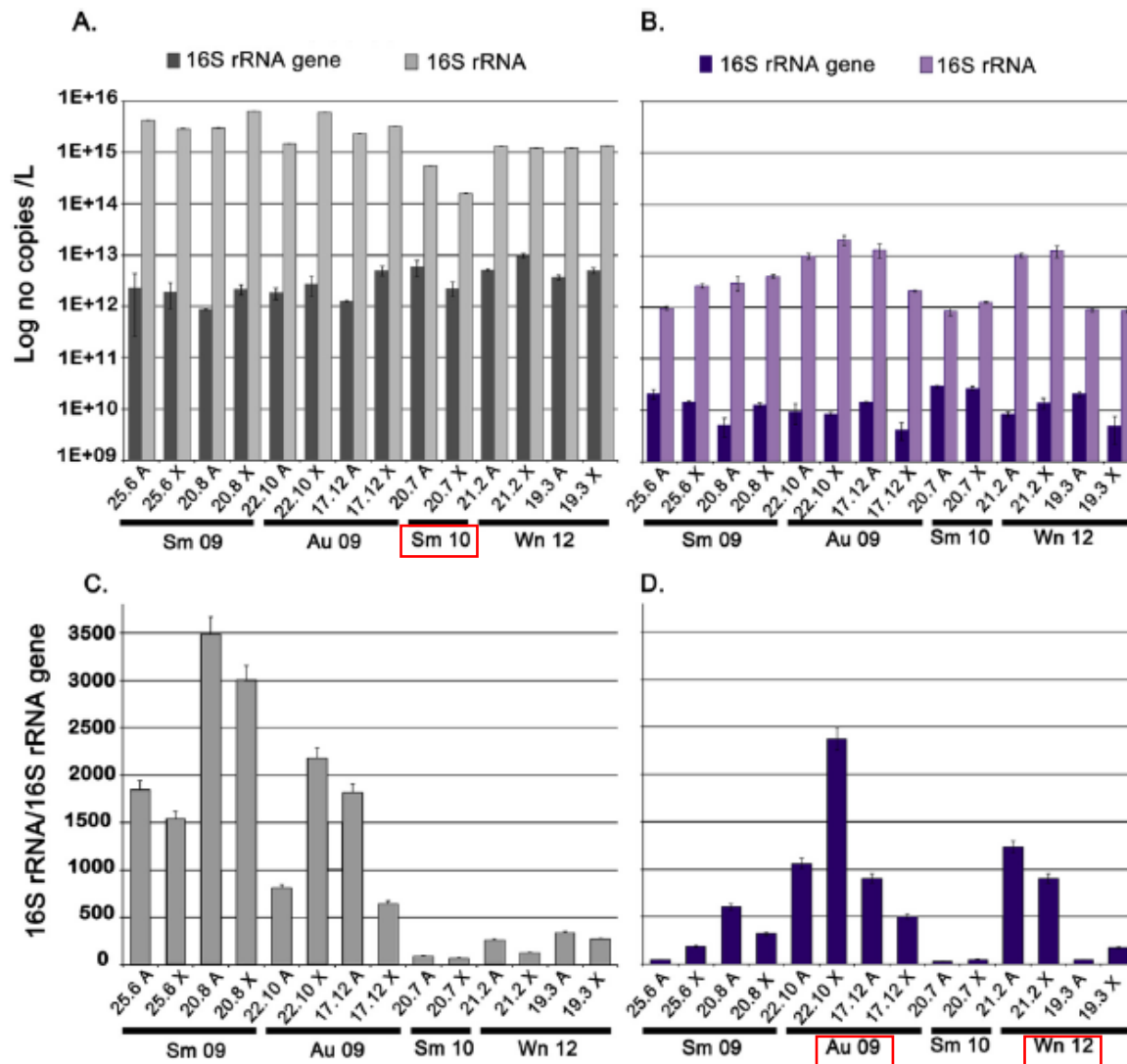


Fig. 1. (A) Numbers of copies of 16S rRNA genes and 16S rRNA of Bacteria (in logarithmic scale), per L of activated sludge, quantified by qPCR in the full-scale membrane bioreactor (MBR) during the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. (B) Numbers of copies of 16S rRNA genes and 16S rRNA of Mycolata (in logarithmic scale), per L of activated sludge, quantified by qPCR in the full-scale membrane bioreactor (MBR) during the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. (C) 16S rRNA/16S rRNA gene ratios of Bacteria. (D) 16S rRNA/16S rRNA gene ratios of Mycolata. The samples in graphics (A) to (D) are named by date and are followed by "A" when retrieved from the aerated bioreactor, or "X" when retrieved from the anoxic bioreactor. (E) Average and standard deviation of the numbers of copies of 16S rRNA genes and 16S rRNA of Bacteria and Mycolata quantified in the MBR in each experimental phase, expressed per L of activated sludge. Data followed by the same lower-case letter do not significantly differ according to the Mann–Whitney

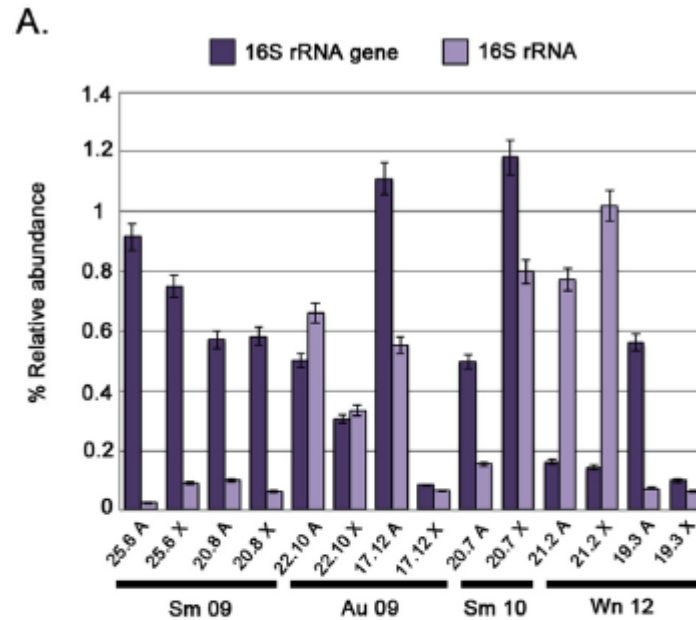
E.

	Bacteria		Mycolata	
	16S rRNA gene	16S rRNA	16S rRNA gene	16S rRNA
Sm 09	$1.8 \times 10^{12} \pm 6.4 \times 10^{11}$ (a)	$4.2 \times 10^{15} \pm 1.6 \times 10^{15}$ (c)	$1.3 \times 10^{10} \pm 2.1 \times 10^9$ (a)	$2.6 \times 10^{12} \pm 1.3 \times 10^{12}$ (ab)
Au 09	$2.7 \times 10^{12} \pm 1.6 \times 10^{12}$ (ab)	$3.2 \times 10^{15} \pm 1.9 \times 10^{15}$ (c)	$9.1 \times 10^9 \pm 1.7 \times 10^9$ (a)	$1.1 \times 10^{13} \pm 7.4 \times 10^{12}$ (c)
Sm 10	$4.0 \times 10^{12} \pm 2.5 \times 10^{12}$ (bc)	$3.5 \times 10^{14} \pm 2.7 \times 10^{14}$ (a)	$2.8 \times 10^{10} \pm 1.8 \times 10^9$ (b)	$1.0 \times 10^{12} \pm 3.0 \times 10^{11}$ (a)
Wn 12	$5.9 \times 10^{12} \pm 2.6 \times 10^{12}$ (c)	$1.3 \times 10^{15} \pm 6.7 \times 10^{13}$ (b)	$1.2 \times 10^{10} \pm 2.3 \times 10^9$ (a)	$6.1 \times 10^{12} \pm 6.0 \times 10^{12}$ (b)
Average	$3.6 \times 10^{12} \pm 9.1 \times 10^{11}$	$2.3 \times 10^{15} \pm 9.5 \times 10^{14}$	$1.4 \times 10^{10} \pm 2.0 \times 10^9$	$5.2 \times 10^{12} \pm 3.5 \times 10^{12}$

F.

	Bacteria	Mycolata
Sm 09	2473 ± 926 (d)	287 ± 237 (b)
Au 09	1363 ± 755 (c)	1212 ± 812 (c)
Sm 10	82 ± 17 (a)	38 ± 12 (a)
Wn 12	246 ± 87 (b)	589 ± 497 (bc)
Average	1041 ± 461	531 ± 354

Fig. 1. (A) Numbers of copies of 16S rRNA genes and 16S rRNA of Bacteria (in logarithmic scale), per L of activated sludge, quantified by qPCR in the full-scale membrane bioreactor (MBR) during the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. (B) Numbers of copies of 16S rRNA genes and 16S rRNA of Mycolata (in logarithmic scale), per L of activated sludge, quantified by qPCR in the full-scale membrane bioreactor (MBR) during the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. (C) 16S rRNA/16S rRNA gene ratios of Bacteria. (D) 16S rRNA/16S rRNA gene ratios of Mycolata. The samples in graphics (A) to (D) are named by date and are followed by "A" when retrieved from the aerated bioreactor, or "X" when retrieved from the anoxic bioreactor. (E) Average and standard deviation of the numbers of copies of 16S rRNA genes and 16S rRNA of Bacteria and Mycolata quantified in the MBR in each experimental phase, expressed per L of activated sludge. Data followed by the same lower-case letter do not significantly differ according to the Mann–Whitney



B.

	16S rRNA gene	16S rRNA
Sm 09	0.70 ± 0.16 (b)	0.07 ± 0.03 (a)
Au 09	0.50 ± 0.44 (b)	0.40 ± 0.26 (b)
Sm 10	0.83 ± 0.48 (b)	0.48 ± 0.45 (b)
Wn 12	0.24 ± 0.21 (a)	0.48 ± 0.48 (b)
Average	0.60 ± 0.32	0.35 ± 0.31

Fig. 2. (A) Relative abundance of Mycolata, expressed as percentage of total Bacteria, based on the quantifications of 16S rRNA genes and 16S rRNA in samples of the full-scale membrane bioreactor (MBR) throughout the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. The samples are named by date and are followed by "A" when retrieved from the aerated bioreactor, or "X" when retrieved from the anoxic bioreactor. (B) Average and standard deviation of the relative abundance (%) of copies of 16S rRNA genes and 16S rRNA of Mycolata versus Bacteria in the MBR in each experimental phase. Data followed by the same lower-case letter do not significantly differ, according to the Mann–Whitney U test ($p < 0.05$).

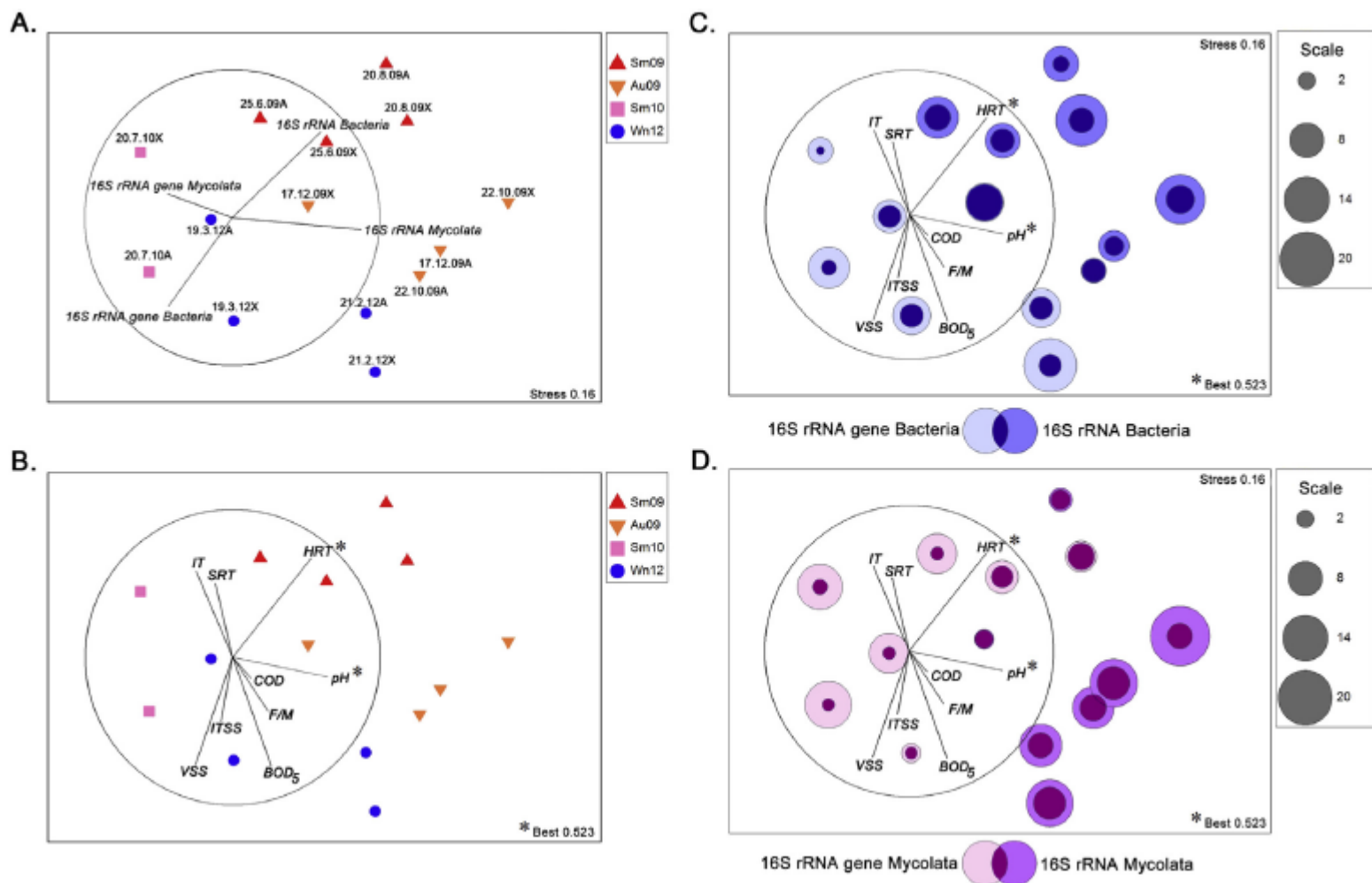


Fig. 3. Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots, illustrating the ordinations of the activated sludge samples retrieved from the full-scale membrane bioreactor (MBR) throughout the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases, according to the abundance of copies of 16S rRNA genes and 16S rRNA of Bacteria and Mycolata. The samples are named by date and are followed by "A" when retrieved from the aerated bioreactor, or "X" when retrieved from the anoxic bioreactor. Vectors in plot (A) represent the direction throughout the ordination of each marker gene quantified in the samples. Vectors in plots (B), (C) and (D) represent the strength and directional influence of each operational parameter or environmental variable throughout the ordination. The variables which best explained the distributions of the biological data according to BIO-ENV analysis are marked with an asterisk (*). Bubbles in plots (C) and (D) superimposed over the samples illustrate the quantification of the abundance of copies of 16S rRNA genes and 16S rRNA of Bacteria and Mycolata, respectively. The values of each quantification are standardized by total (expressed in each sample as the percentage of the sum throughout the set of samples).

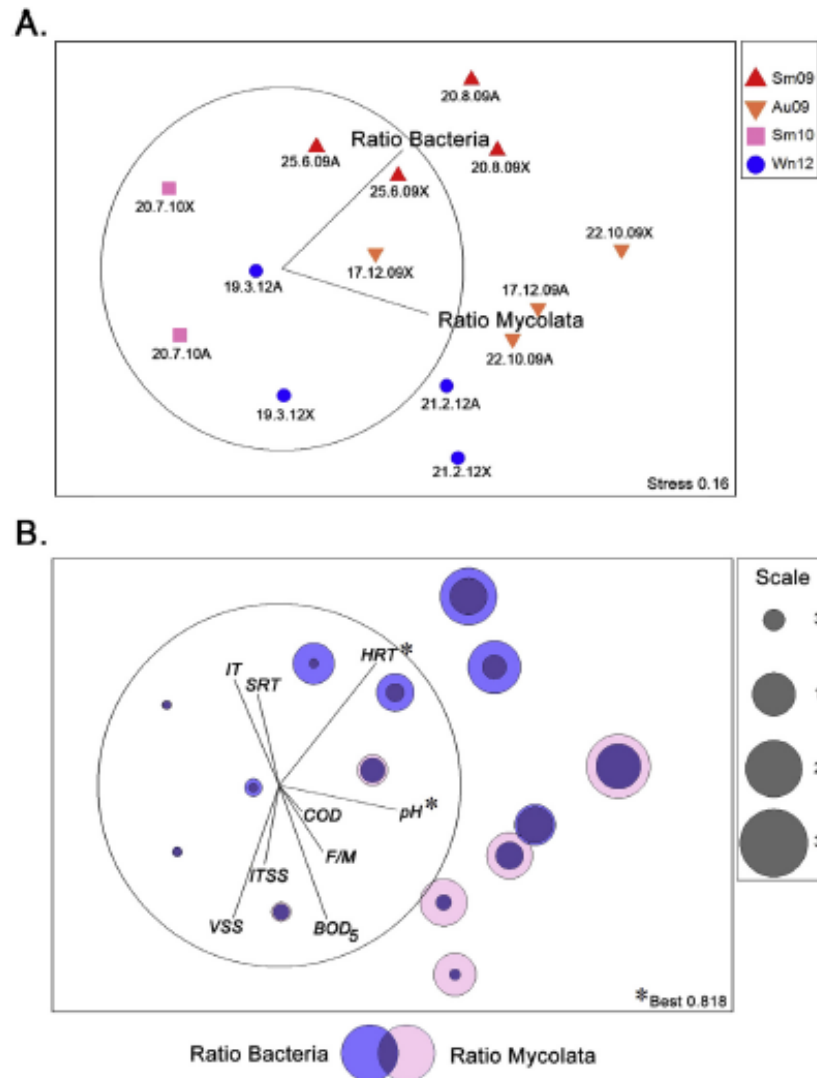
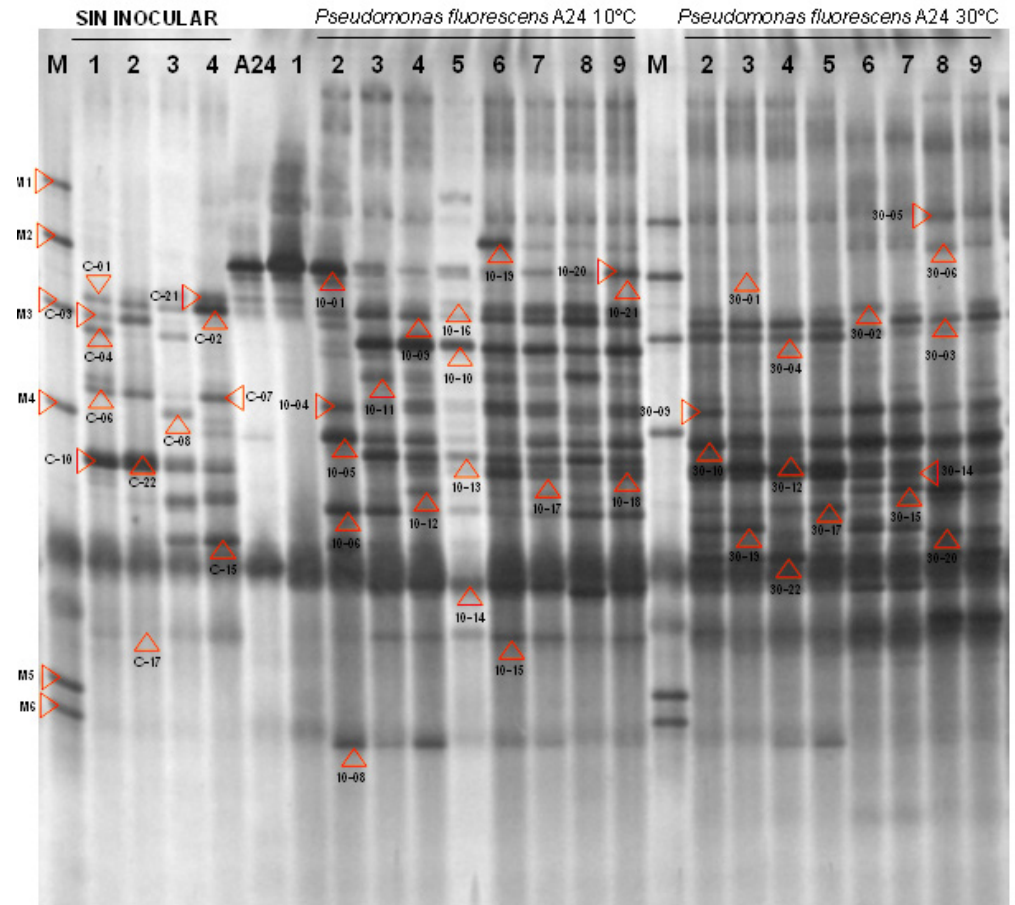
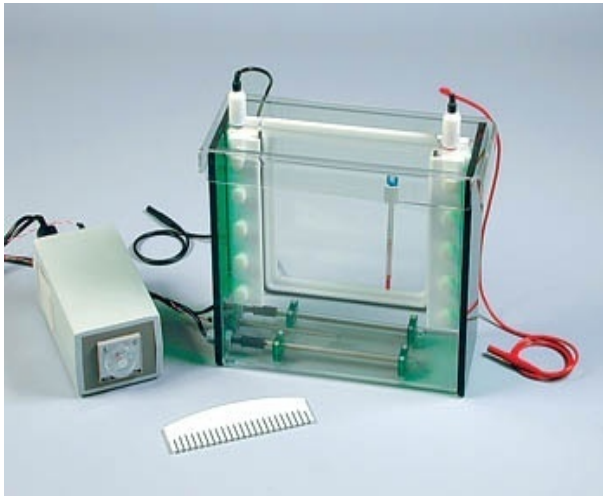
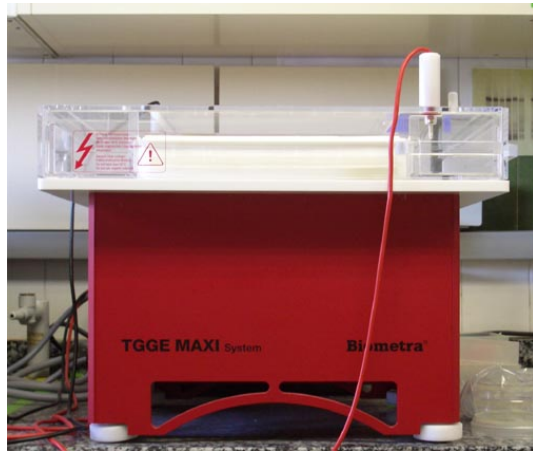


Fig. 4. Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots, showing the vectors representing the direction of the 16S rRNA/16S rRNA gene ratios of Bacteria and Mycolata (A) and the strength and directional influence of each operational parameter or environmental variable throughout the ordination (B). The samples are named by date and are followed by "A" when retrieved from the aerated bioreactor, or "X" when retrieved from the anoxic bioreactor. Vectors in plots represent the strength and directional influence of each biotic and abiotic variable throughout the ordination. In plot (B), the abiotic variables which best explained the distribution of the biological data according to the BIO-ENV analysis are marked with an asterisk (*). Bubbles superimposed over the samples illustrate the quantification of 16S rRNA/16S rRNA gene ratios of Bacteria and Mycolata. The values of each ratio are standardized by total (expressed in each sample as the percentage of the sum throughout the set of samples).

Conclusiones

- El radio de las poblaciones metabólicamente activas de *Mycolata* contra la población total es clave para la formación de espuma en el MBR.
- Para la evaluación del riesgo potencial de la formación de espuma se requerirá la recopilación de un mayor número de datos.
- El uso de un análisis multivariado reveló enlaces sólidos entre las variables operativas, ambientales y la relación de *Mycolata* en el MBR.
- Los resultados del presente estudio permite corroborar su relevancia para la gestión de la diversidad biológica en la formación de espuma en los MBR y proporcionar nuevos conocimientos con respecto a sus papeles en la generación de este problema operativo.

Métodos de *fingerprinting*: Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante o de Temperatura (DGGE/TGGE)



Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante o de Temperatura (DGGE/TGGE)

Metodología que posibilita la separación de fragmentos de ADN del **mismo tamaño pero de distinta secuencia**.

La técnica es tan sensible que ajustando convenientemente las condiciones permite separar secuencias que difieran en un **único par de bases**.

Una limitación es el tamaño de los fragmentos que se pueden resolver electroforéticamente:

- DGGE: 800 bp
- TGGE: 550 bp

No es posible separar el gen del ARNr 16S completo

Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante o de Temperatura (DGGE/TGGE)

Fundamento:

- Las moléculas de ADN de doble cadena se detienen en su migración electroforética cuando se encuentran **parcialmente desnaturalizadas**.
- La desnaturalización de fragmentos ADN de doble cadena se produce bajo distintas condiciones, según la **composición de bases** (coeficiente de G+C).

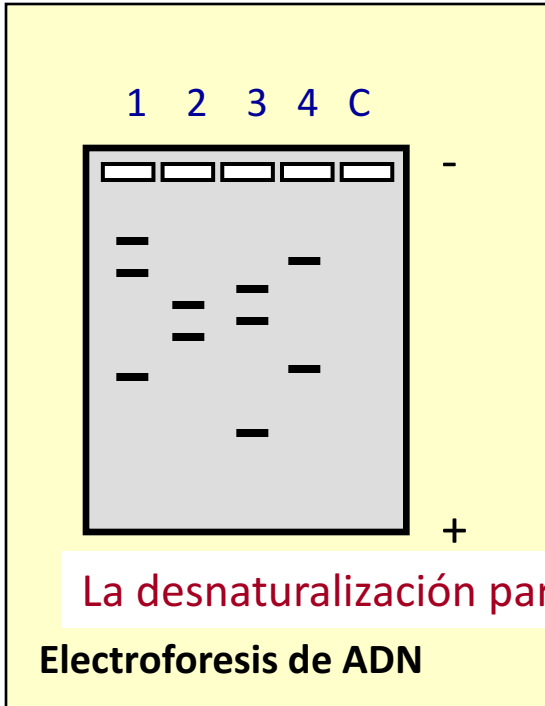
Los fragmentos del **mismo tamaño** se separan durante una electroforesis bajo un gradiente de desnaturalizantes **químicos o de temperatura, en función de su secuencia**.

Composición en bases del ADN:

$$\text{n}^\circ \text{G} = \text{n}^\circ \text{C} \quad \text{n}^\circ \text{A} = \text{n}^\circ \text{T}$$

- La unión G-C es más estable que la A-T
- A **mayor** coeficiente de G+C, se necesita **mayor** temperatura o gradiente químico para desnaturalizar el ADN.

Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante o de Temperatura (DGGE/TGGE)



La desnaturalización parcial se logra gracias a la introducción de una **cola rica en GC**

ADN sin desnaturalizar

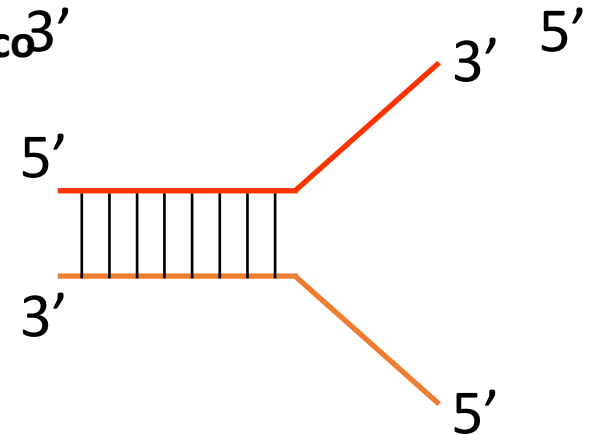
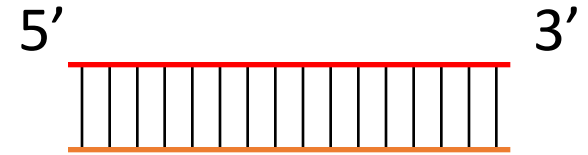
migra en el campo eléctrico

ADN parcialmente desnaturalizado

se detiene en la migración

ADN desnaturalizado

migra en el campo eléctrico, a menor velocidad que cuando está sin desnaturalizar



Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante o de Temperatura (DGGE/TGGE)

Fragmento diana de la amplificación:

5' ATGGCTTATTTTTAGGCGG TAGACTAGACTAGCATAGACTGG 3'
3' TACCGAATAAAAATCCGCC ATCTGATCTGATCGTATCTGACC 5'

Diseño de cebadores complementarios:

5' ATGGCTTATTTTTAGGCGGG TAGACTAGACTAGCATAGACTGG 3'
3' CCGGGCGCGGGCGTACCGAATAA
Cola GC
ATAGACTGG 3'
3' TACCGAATAAAAATCCGCC ATCTGATCTGATCGTATCTGACC 5'

Producto amplificado con cola rica en GC:

5' GGCCCGCGCCCGCATGGCTTATTTTTAGGCGGG TAGACTAGACTAGCATAGACTGG 3'
3' CCGGGCGCGGGCGTACCGAATAAAAATCCGCC ATCTGATCTGATCGTATCTGACC 5'

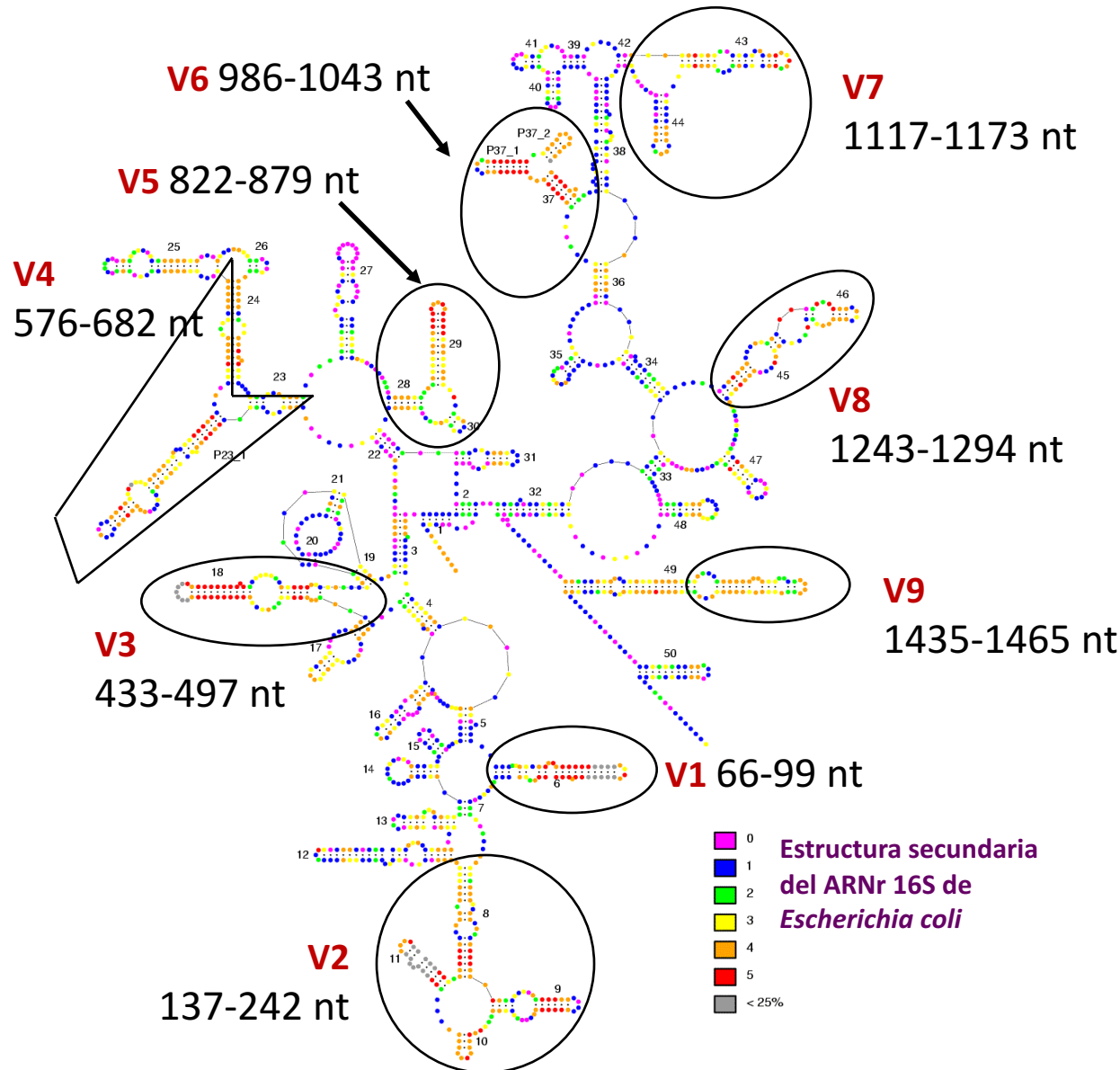

zona de difícil desnaturalización

Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante o de Temperatura (DGGE/TGGE)

El ARNr bacteriano tiene 9 regiones hipervariables (V1-V9)

Las regiones que proporcionan mayor información filogenética son: V3, V1, V2 y V6

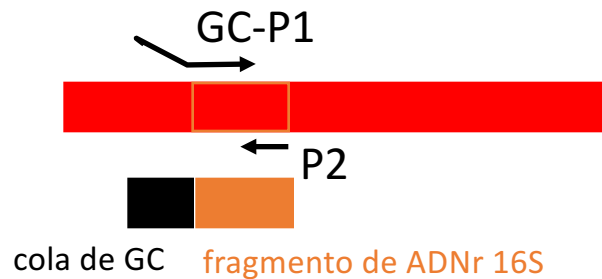
A partir de ADN de una comunidad mixta, es posible amplificar por PCR con cebadores universales, el conjunto de fragmentos correspondientes a una de estas regiones hipervariables



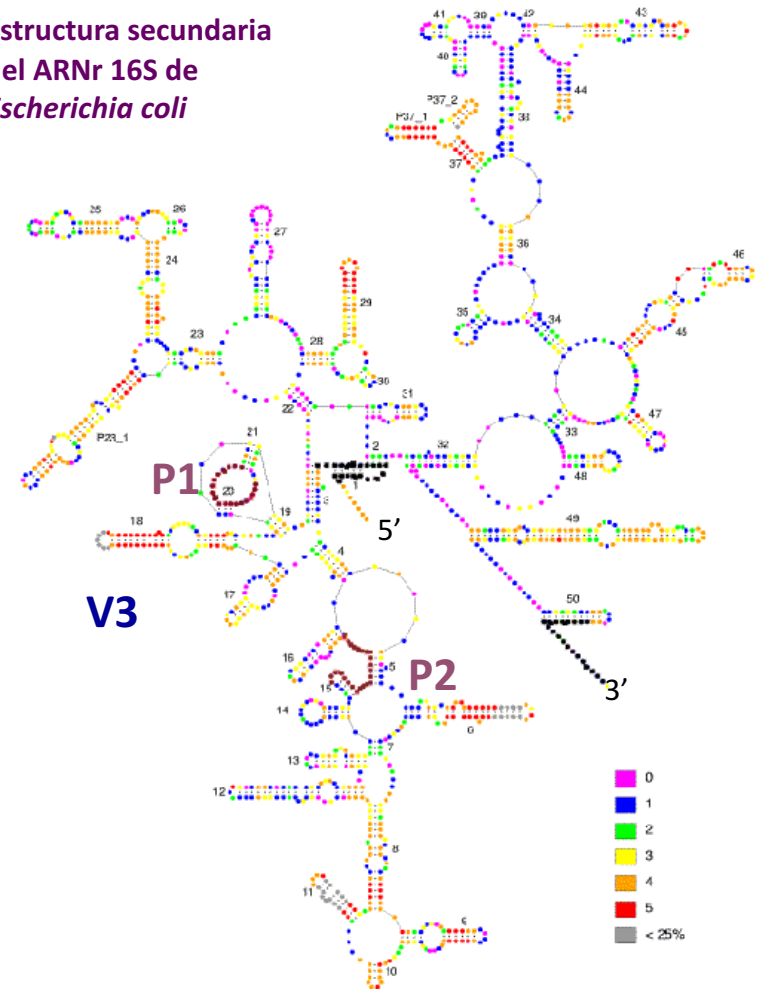
Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante o de Temperatura (DGGE/TGGE)

Amplificación de la región hipervariable V3:

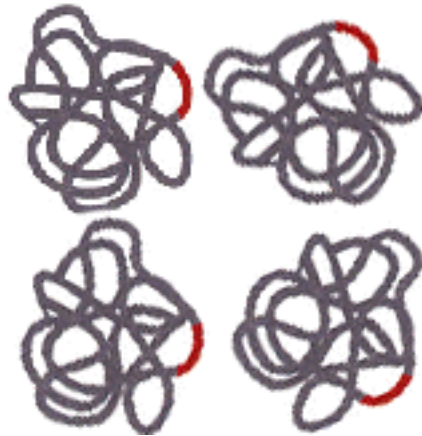
Nucleótidos 341 a 534 (0.2 Kb)
de la secuencia de *E. coli*, con cebadores universales GC-P1 y P2 (Muyzer et al. 1993).



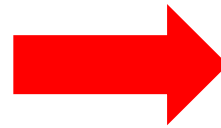
Estructura secundaria
del ARNr 16S de
Escherichia coli



Electroforesis en Gel con Gradiente de Temperatura (TGGE)



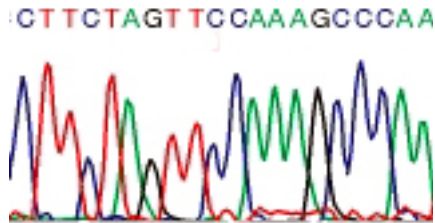
Conjunto de ADNs aislados de comunidad mixta



PCR con GC-P1, P2



Colección de fragmentos <0.5 Kb

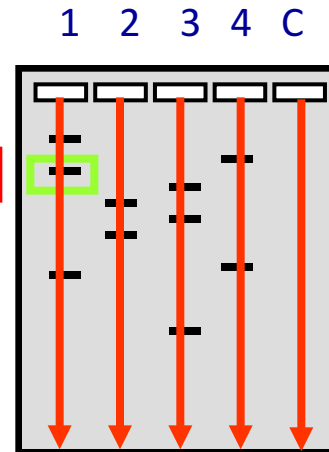
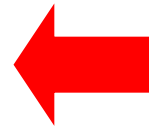


Secuenciación y comparación en banco de datos:
Identificación



Extracción del ADN de las bandas aisladas

Reamplificación por PCR



Separación de fragmentos por TGGE:

Perfiles de biodiversidad

Fingerprinting methods

VENTAJAS

DESVENTAJAS



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech



Exploring the links between population dynamics of total and active bacteria and the variables influencing a full-scale membrane bioreactor (MBR)



C. Gómez-Silván^{a,*}, J. Arévalo^b, J. González-López^a, B. Rodelas^a

^a Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, University of Granada (ugr), Granada, Spain

^b Departamento de Ingeniería Civil, University of Granada (ugr), Granada, Spain

WWT o Tratamiento de aguas residuales

- Procesamiento de desechos sólidos por MBR:
 1. Oxidación de materia biológica rica en compuestos de carbono
 2. Oxidación de materia rica en nitrógeno, principalmente amoníaco
 3. Remoción de nutrientes como fósforo.
- Separación de partículas por filtración de membranas
- Los MBRs evita el uso de un clarificador secundario (permite la sedimentación de partículas)
- Problemas de las MBRs (Biorreactores membranales)
- La comunidad microbiana esta sujeta a las condiciones que impone el sustrato.
 - a. Tasas bajas de crecimiento y reduce el potencial respiratorio
 - b. Afecta la composición de la comunidad.
- El funcionamiento óptimo del biorreactor depende de la composición de la comunidad biológica.

Objetivo

- Evaluar el efecto que tienen sobre la composición de la comunidad bacteriana (Total TP y activada AP) las fluctuaciones de temperatura y la concentración de biomasa en el agua de desecho.
- Se usó agua residual urbana
- 9 meses
- Con fases aireadas y anóxicas
- En etapa previa a la denitrificación
- ¿Cómo?
- Evaluando estructura y dinámica de la población bacteriana mediante TGGE Temperature Gradient Gel Electrophoresis de ADN y ARN

Método

- 1 bioreactor aireado, 1 anóxico y tanque de filtración
- Mediciones de temperatura automatizadas, concentración de nitrógeno, demanda de oxígeno y concentración de sólidos.
- Muestreo
 - Primavera (abril y mayo)
 - Verano (junio, julio, agosto, septiembre)
 - Otoño (octubre, noviembre, diciembre)
- 50 ml de lodo de cada bioreactor, dos veces a la semana (124 en total)
- Para ADN: centrifugar 4 ml por 1 min 14xg
- Para ARN: buffer con inhibidores de RNAsas y estabilizadores de RNA

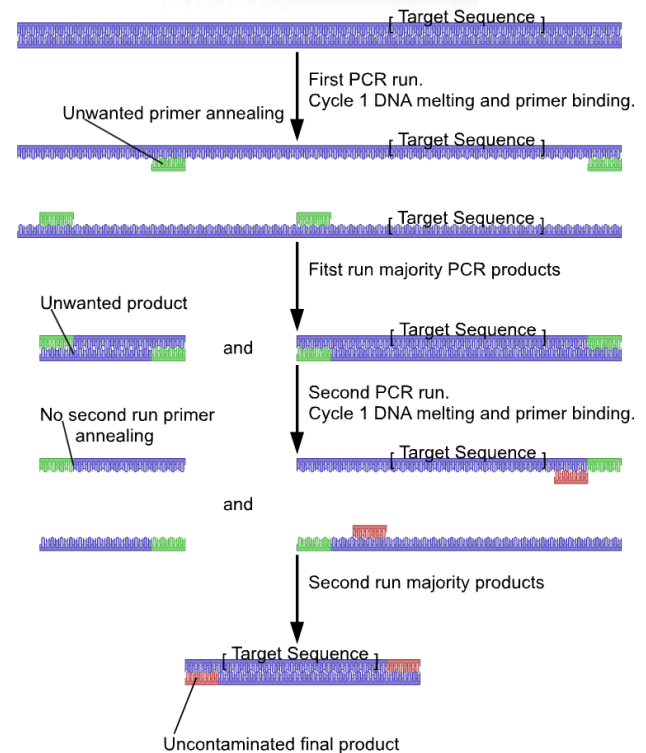
- Extracción de AN
- Transcripción reversa de muestras de RNA primers universales fD1 y rD1
- Amplificación de genes 16s rRNA y región hipervariable V3 para nestedPCR
- TGGE (temp variable)
- secuenciación



Which hyper-variable regions to sequence?

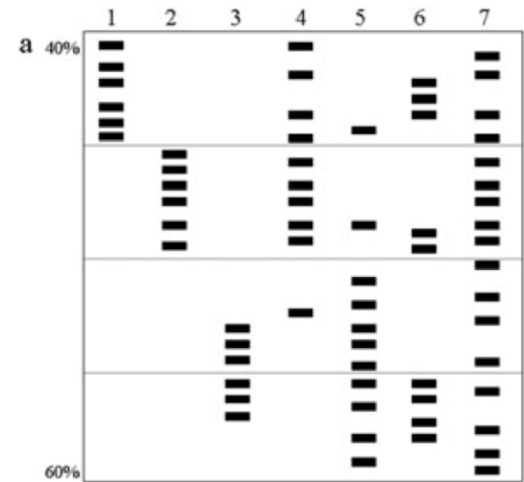
Region	Position	# b.p.
V1	69-99	30
V2	137-242	105
V3	338-533	195
V4	576-682	106
V5	822-879	57
V6	967-1046	79
V7	1117-1173	56
V8	1243-1294	51
V9	1435-1465	30

E.coli 16S SSU rRNA hyper-variable regions



Índices

- **Range-weightened richness index (Rr)** Relación entre el numero de bandas (N), el grado de desnaturalización entre la primera y última banda en un gel (D). Estimado de la habitabilidad del medio. $Rr = (N^2 \times D_g)$



- **Dynamics (Dy)** El numero de especies que en promedio son dominantes (que alcanzan el límite de detección de la técnica) en un hábitat determinado durante un intervalo determinado. Entre más especies diferentes existan por unidad de tiempo se considera que la comunidad cambia mas y la comunidad es mas dinámica.

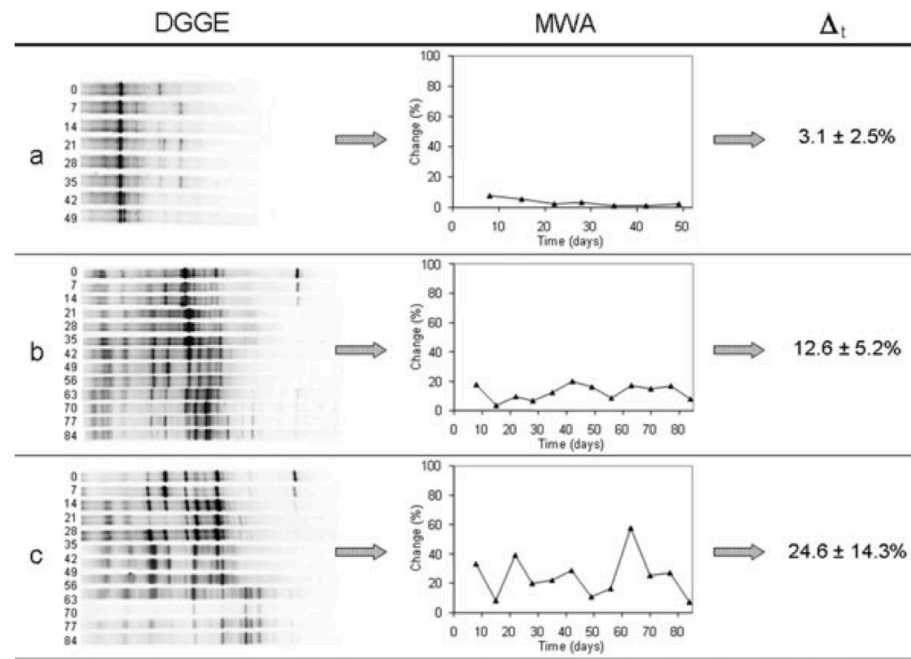


Fig. 2. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles, moving window analyses (MWA) and rate of change (Δ_t) values to evaluate the level of dynamics of betaproteobacterial ammonium oxidizers.

A. A low Dy as observed in a full-scale wastewater treatment plant (Wittebolle *et al.*, 2005).

B. A medium Dy as observed in a nitrifying sequential batch reactor (Wittebolle *et al.*, 2008)

C. A high Dy as observed in nitrifying membrane bioreactor (Wittebolle *et al.*, 2008).

- **Functional organization Fo**
- Los organismos más aptos para las condiciones ambiente-microbiológicas dadas son los dominantes en la estructura de la comunidad.
- X: Bandas independientes en el gel
- Y: Abundancia (ancho de banda) en el gel
- 25% falta de presiones selectivas
- 45% las especies dominantes son las mas aptas
- 80% pocas especies dominantes, comunidad altamente funcional pero fragil ante cambios externos.
- El índice de Shannon cuantifica la incertidumbre en la predicción sobre cuál es la especie de algún individuo que tomemos al azar del conjunto de datos

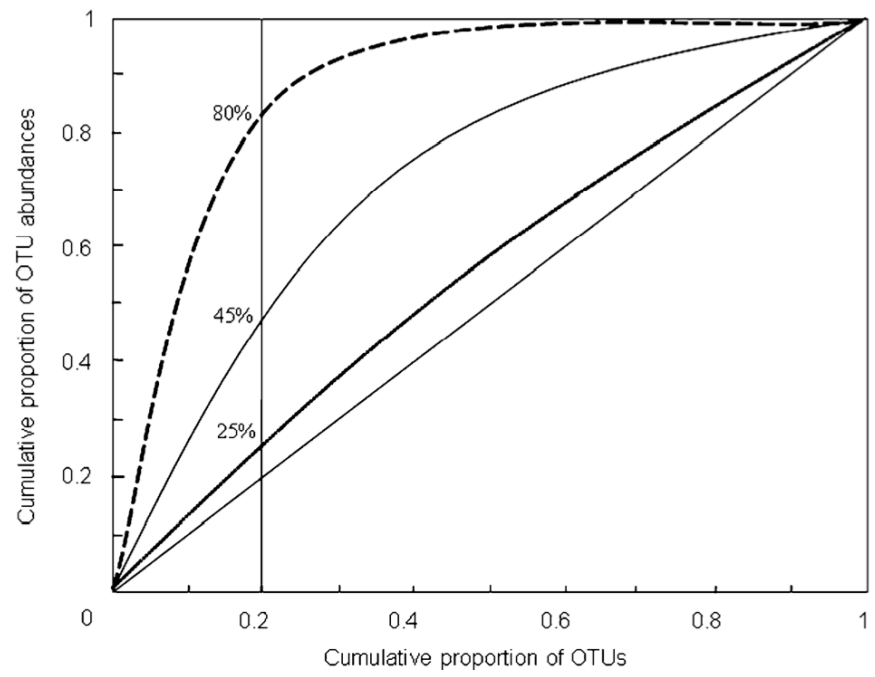


Fig. 3. Pareto–Lorenz curves derived from three hypothetical DGGE patterns. The 25%, the 45% and the 80% curves refer to a low, medium and high functional organization respectively. The 45° diagonal represents the perfect evenness of a community.

Resultados y discusión

Análisis de la estructura de la comunidad bacteriana y la dinámica de poblaciones en el MBR

Análisis Global: 248 muestras de ADN y ARN, mostraron una alta estabilidad de la estructura de la comunidad bacteriana (comparación con fingerprints Similitud > 80%).

Tiempo de retención hidráulica
(HRT = 38 h)

Tiempo de retención de sólidos
(SRT = 20 días)

factores que influyen
en la dinámica
poblacional

Similitud > 80%

Análisis de Similitud (ANOSIM)

ADN-ARN

(R = 0,01)*

BR con O₂-BR sin O₂

(R > 0,24).

Análisis por separados de los
perfiles de ADN y ARN para la
estructura y dinámica
poblacional bacteriana

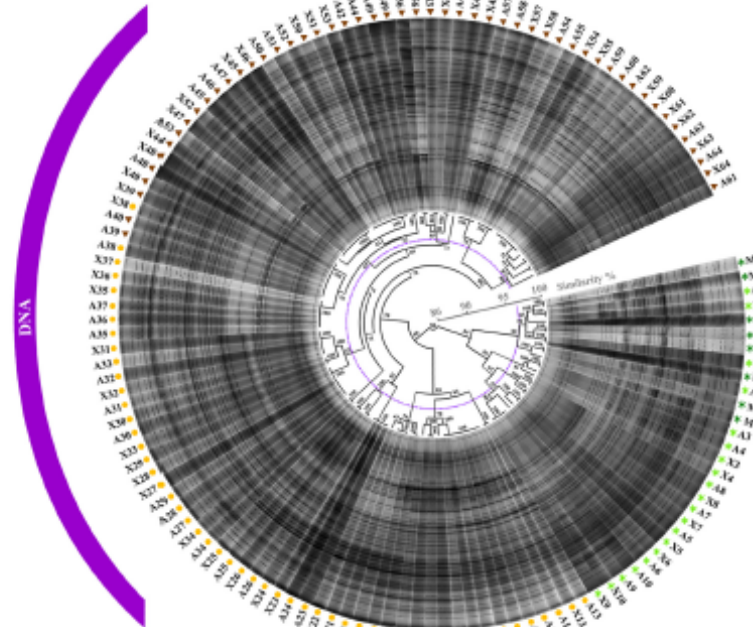
0/1 y Tipo de banda
detectada

Análisis de la estructura y dinámica de la comunidad bacteriana en el MBR

106

C. Gómez-Sáiz et al. / *Bioresour. Technology* 162 (2014) 103–114

I.



II.

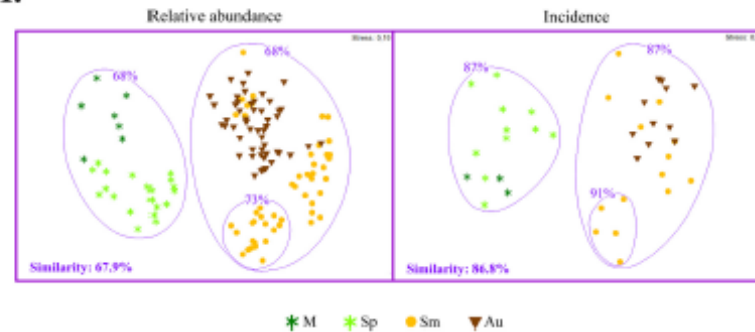


Fig. 1. DNA-based TGEI fingerprints analysis of the full-scale membrane bioreactor (MBR) during the spring, summer and autumn of 2009. (I) Dice coefficient-based clustering. The dotted line marks the clustering similarity level of internal markers, indicating the limit to consider significant difference between samples. The scale bar indicates the percentage of similarity and the numbers in nodes represent the cophenetic correlation coefficient values. (II) Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots based in relative abundance or incidence of the detected band-clones, with its subsequent results of cluster analysis (Ray Curtis coefficient). A: aerobic bioreactor; X: anoxic bioreactor; Sp: Spring; Sm: Summer; Au: Autumn.

DNA-based TGGE fingerprints analyses

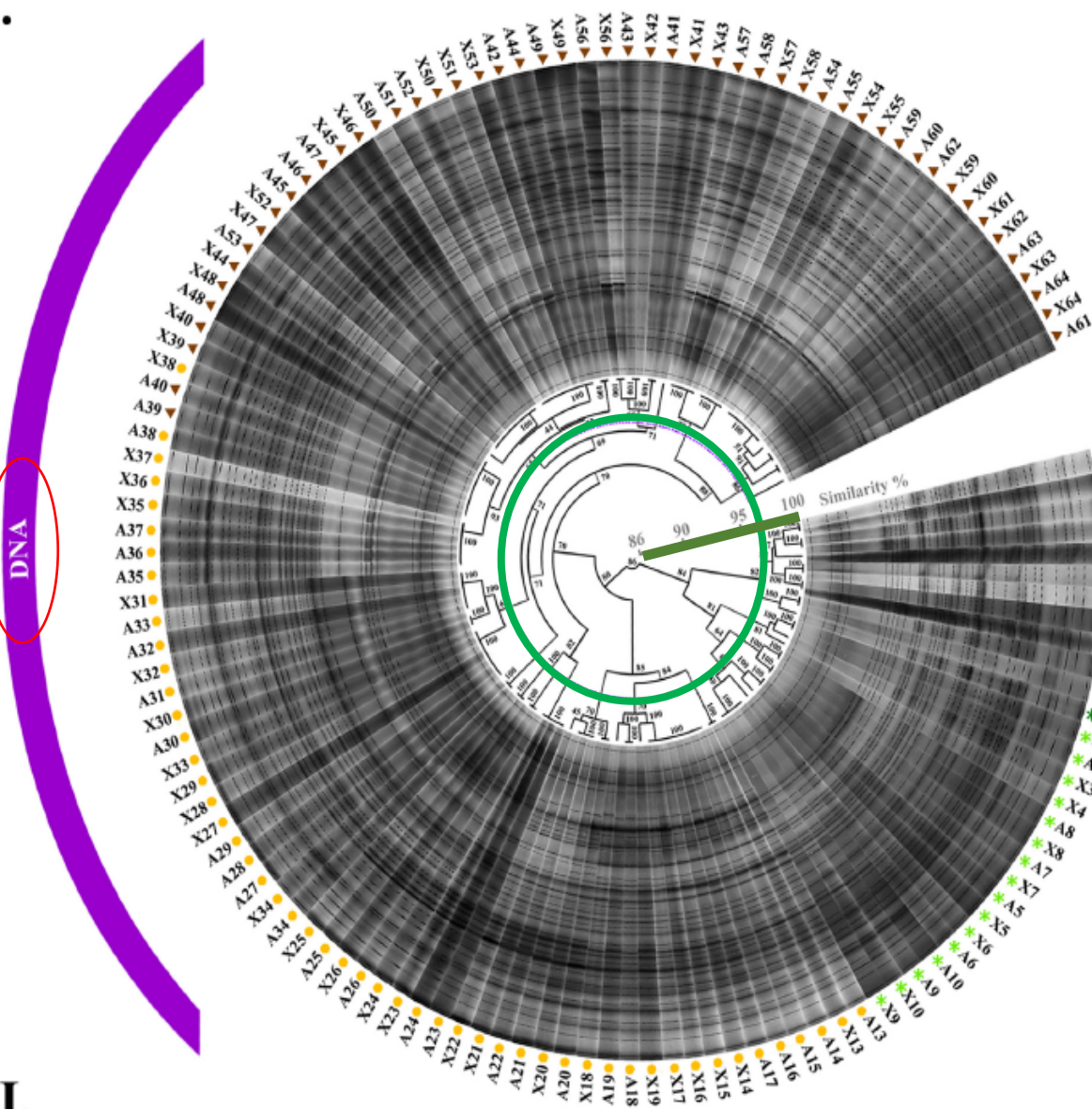
(UPGMA)

Dice coefficient-based clustering.

Perfil de ADN

Scale bar: % de similitud entre el número de nodos

Line marks: limites para considerar diferencias entre las muestras



124 en total
hipervariable V3
Presencia y ausencia
Intensidad e bandas

A: Aeróbico
X: Anóxico
M: control interno (A2)

* M * Sp ● Sm ▼ Au

DNA-based TGGE fingerprints analyses

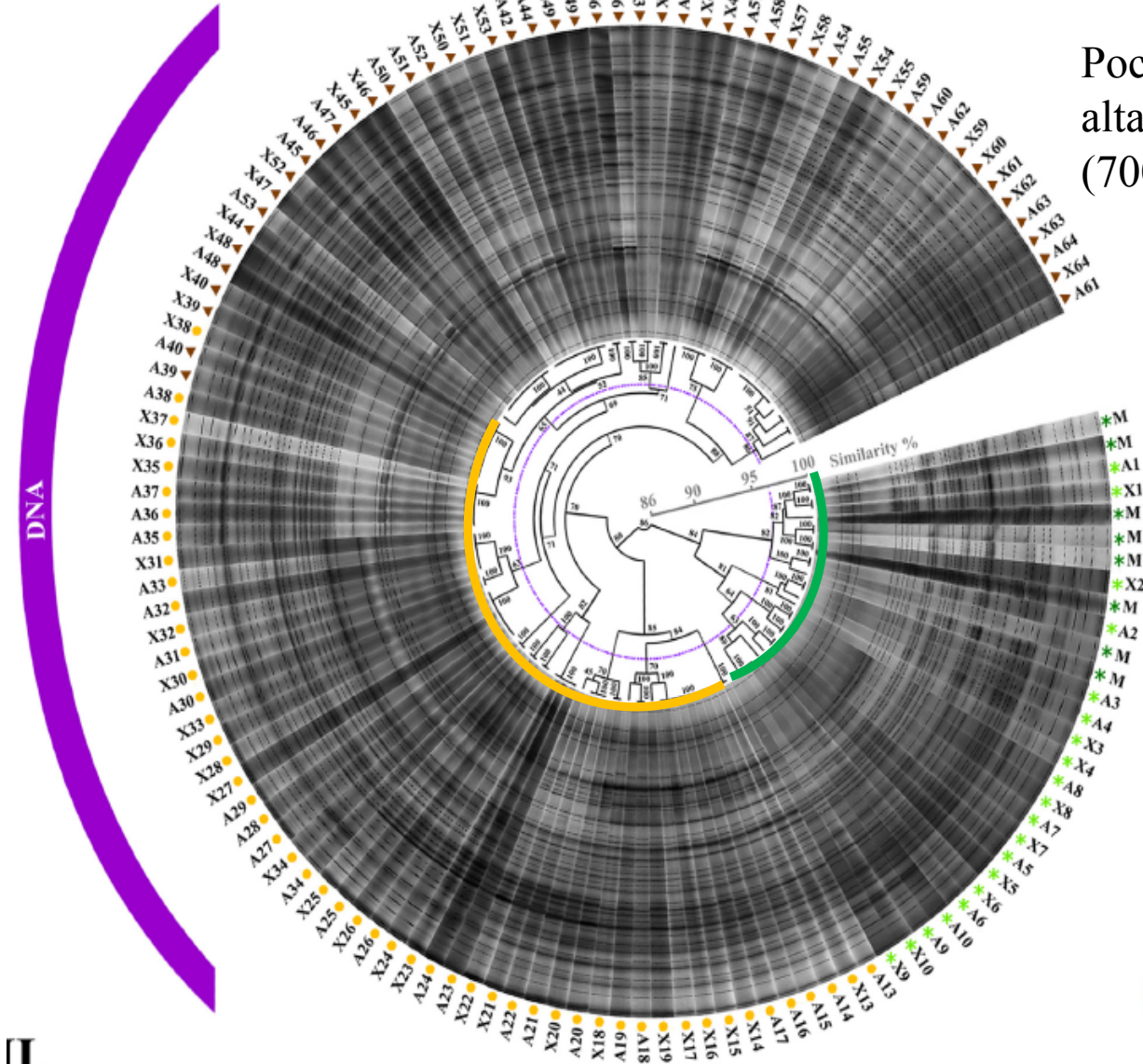
Dice coefficient-based clustering.

A: Aeróbico

X: Anóxico

M: control interno (A2)

L.

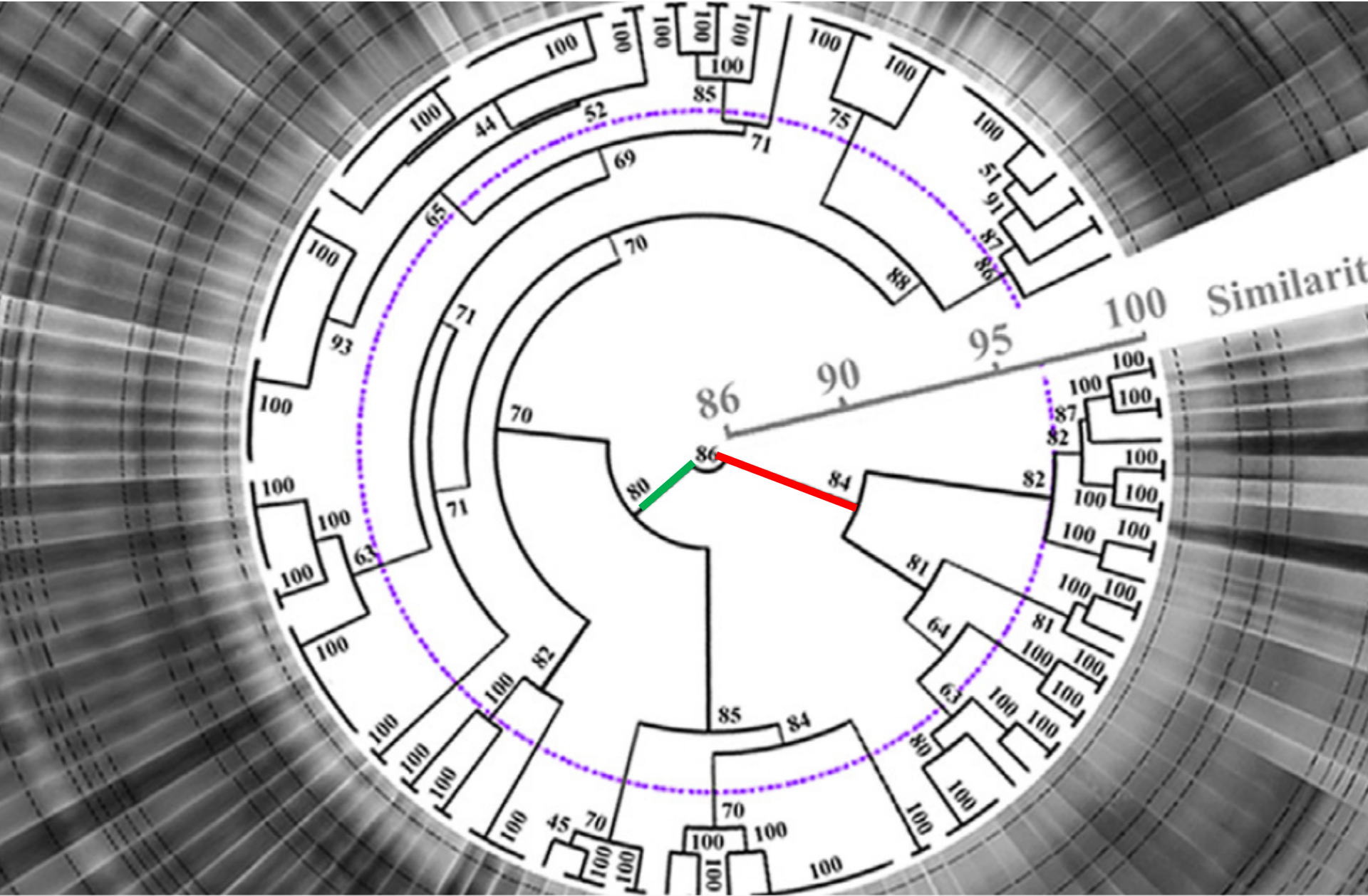


Pocas diferencias entre Sistema A y X
alta tasa de recirculación entre las RB
(700%),

* M * Sp Sm Au

IT

las muestras tomadas el mismo día en cada BR se agrupado junto con un alto porcentaje de similitud



Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots

Perfil de ADN

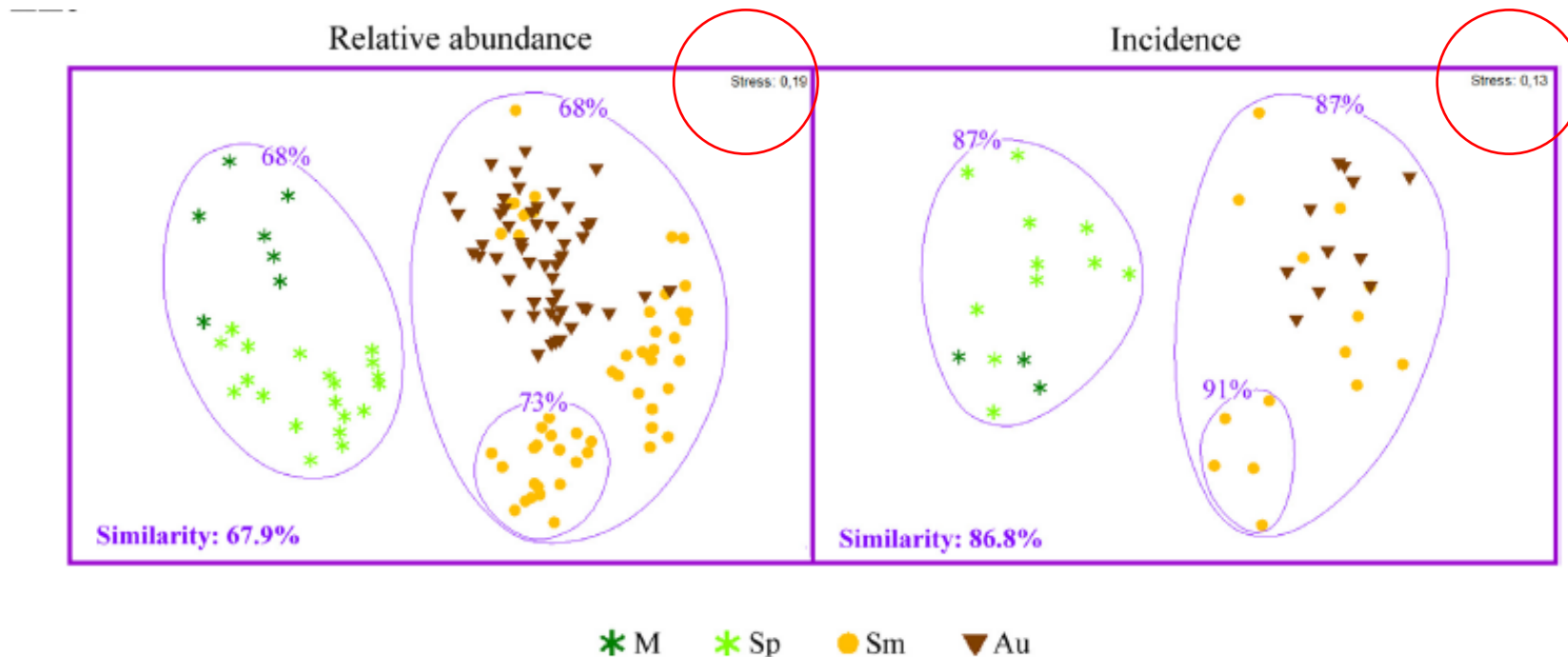


Fig. 1. DNA-based TGGE fingerprints analyses of the full-scale membrane bioreactor (MBR) during the spring, summer and autumn of 2009. (I) Dice coefficient-based clustering. The dotted line marks the clustering similarity level of internal markers, indicating the limit to consider significant differences between samples. The scale bar indicates the percentage of similarity and the numbers in nodes represent the cophenetic correlation coefficient values. (II) Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots based in relative abundance or incidence of the detected band-classes, with superimposed results of cluster analysis (Bray Curtis coefficient). A: aerated bioreactor; X: anoxic bioreactor; Sp: Spring; Sm: Summer; Au: Autumn.

El software Primer

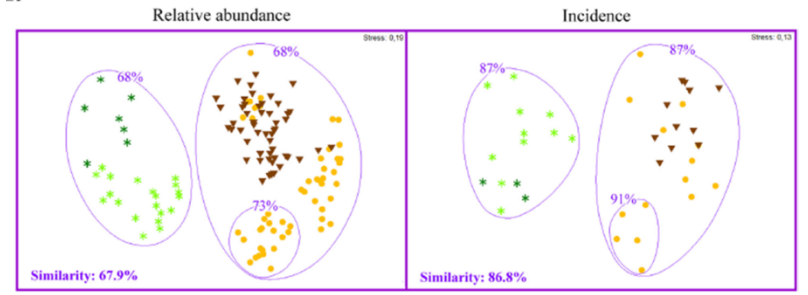
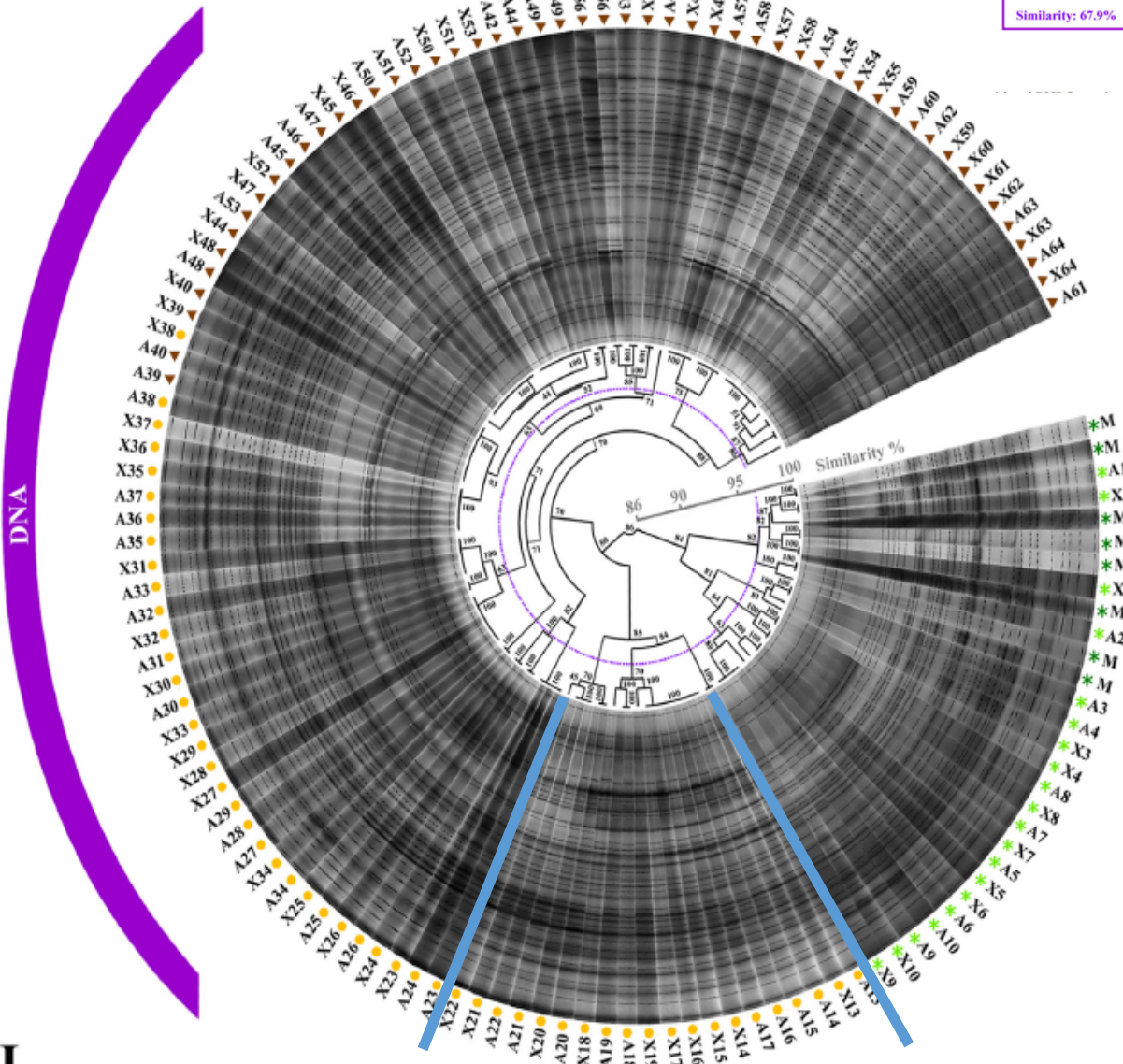
Las parcelas MDS ilustran los patrones de distribución de las muestras de acuerdo con la similitud entre sus perfiles TGGE

Datos transformados con raíz cuadrada
coeficiente de Bray Curtis

L.

DNA

IT

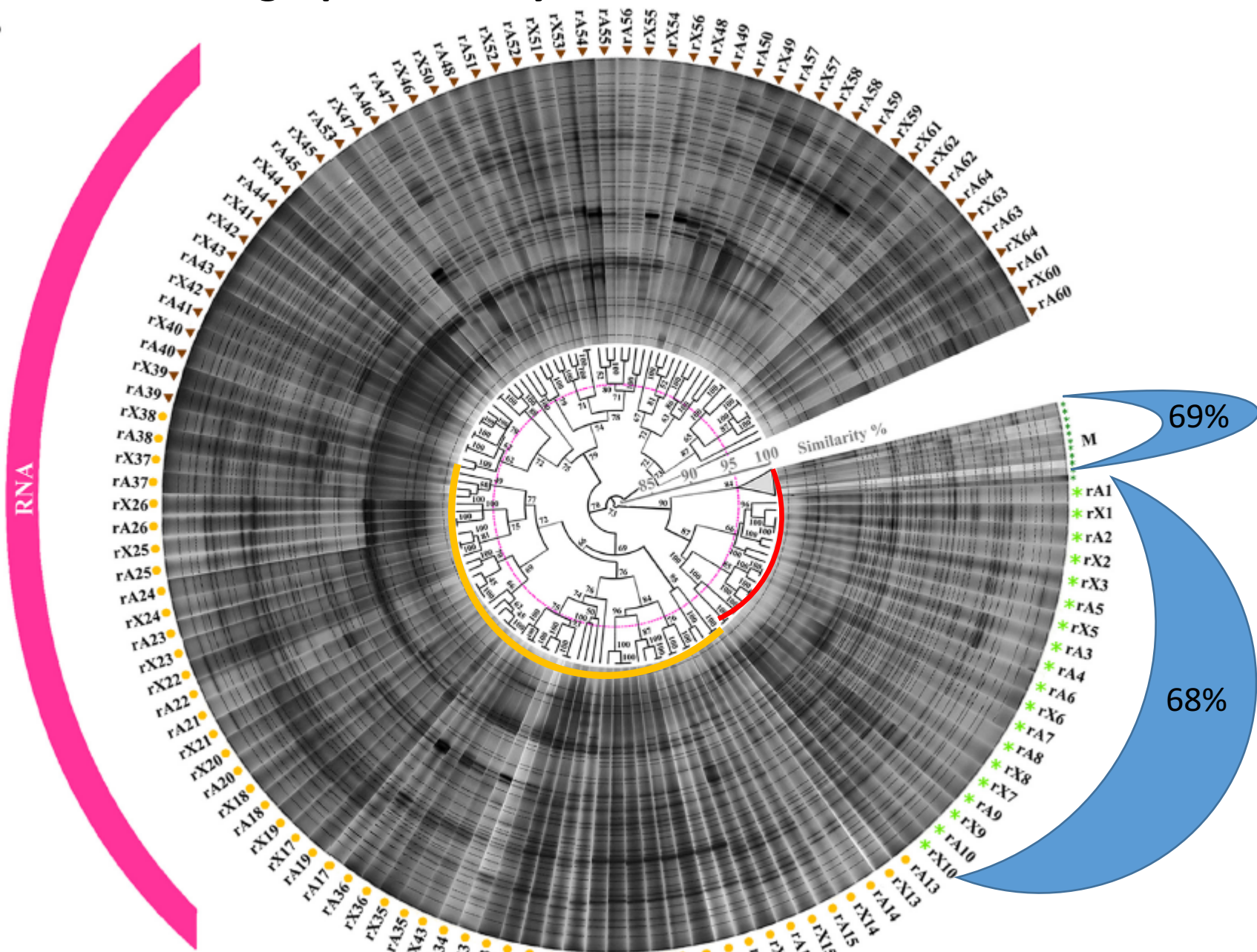


subgrupo (73% de similitud).

* M * Sp ● Sm ▼ Au

RNA-based TGGE fingerprints analyses

I.



II.

Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots

Perfil de ARN

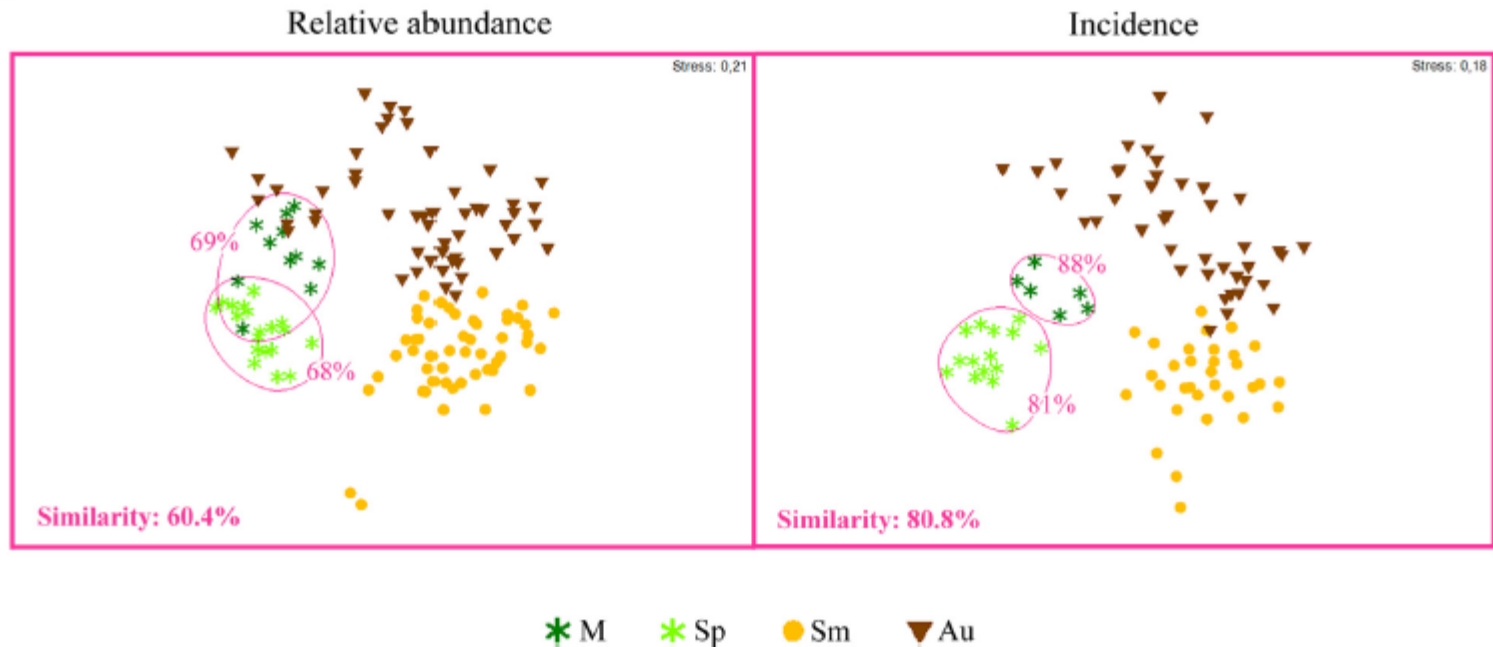


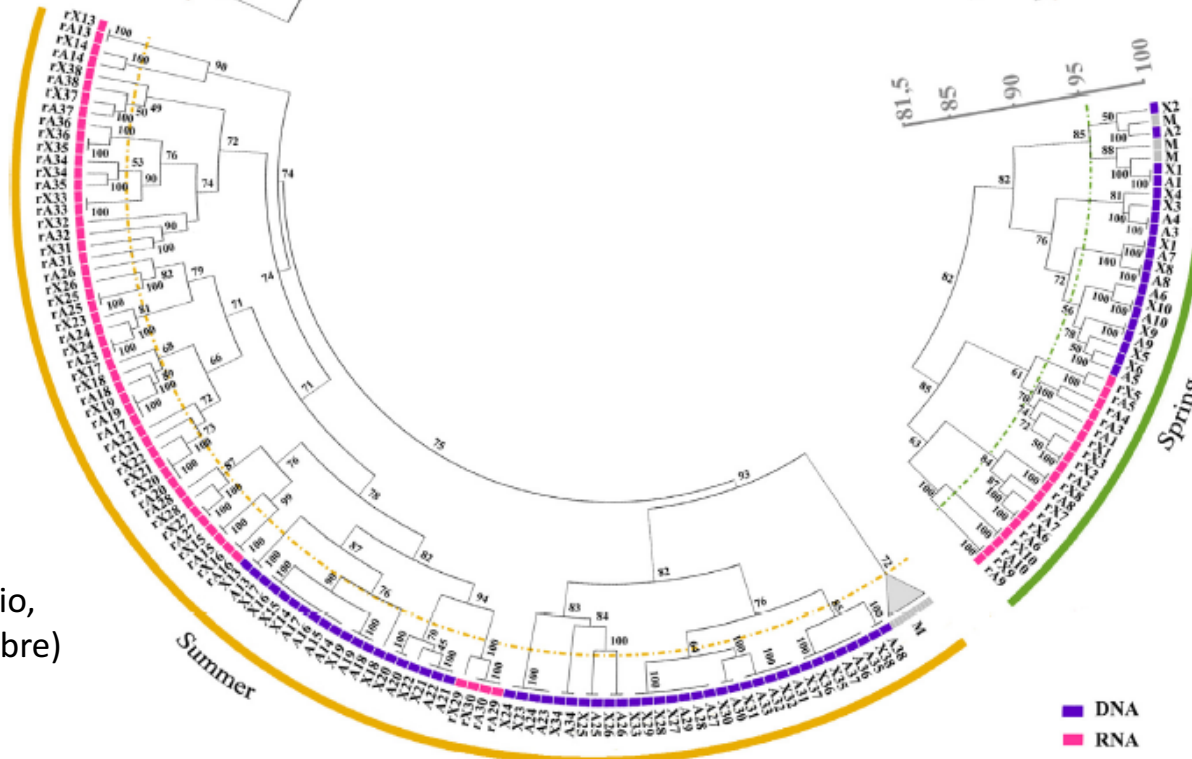
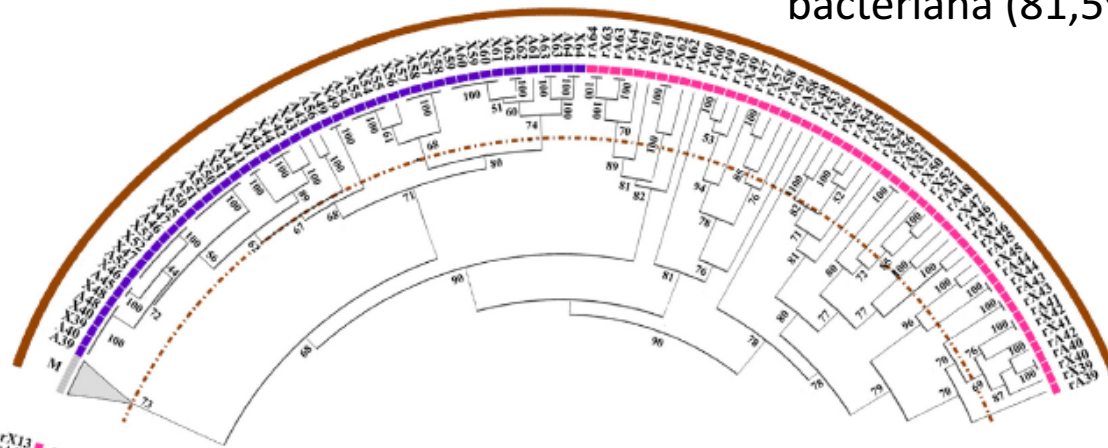
Fig. 2. RNA-based TGGE fingerprints analyses of the full-scale membrane bioreactor (MBR) during the spring, summer and autumn of 2009. (I) Dice coefficient-based clustering. The dotted line marks the clustering similarity level of internal markers, indicating the limit to consider significant differences between samples. The scale bar indicates the percentage of similarity and the numbers in nodes represent the cophenetic correlation coefficient values. (II) Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots based in relative abundance or incidence of the detected band-classes, with superimposed results of cluster analysis (Bray Curtis coefficient). A: aerated bioreactor; X: anoxic bioreactor; Sp: Spring; Sm: Summer; Au: Autumn.

Análisis para cada temporada con los dos
perfiles (ADN y ARN)

otoño (octubre, noviembre y diciembre)

Autumn

Variación estructura de la comunidad bacteriana (81,5%)



87% de similitud

Primavera
(Abril y mayo)

verano (junio, julio,
agosto y septiembre)

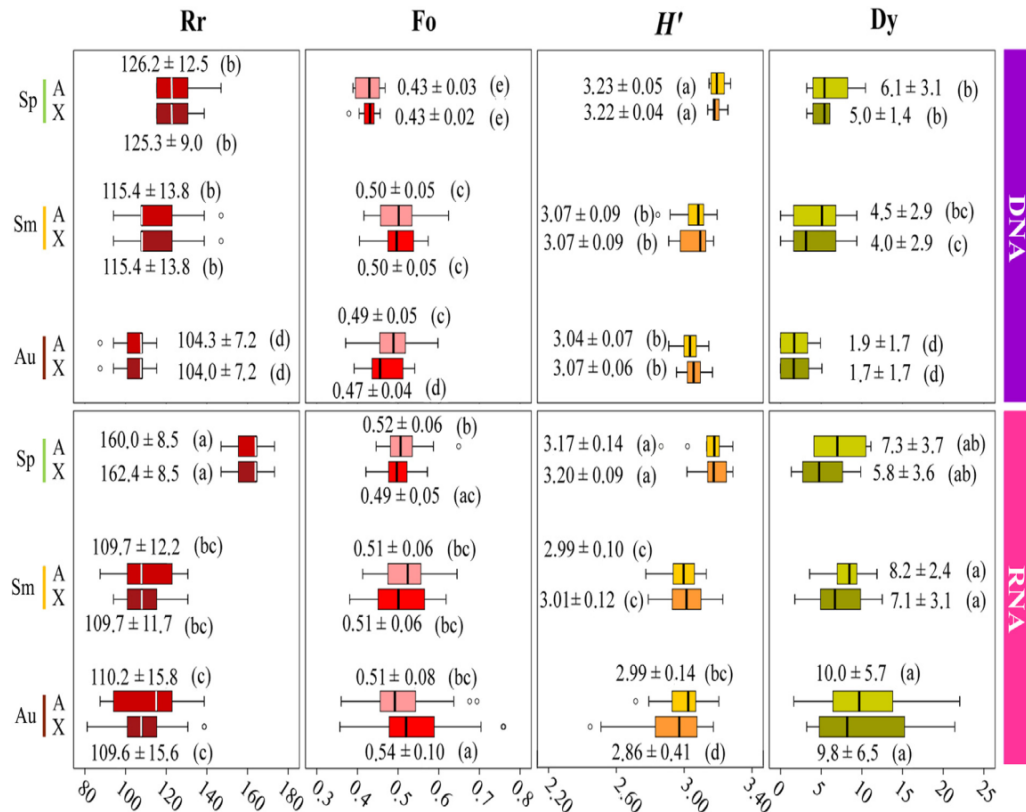
Summer

Spring

■ DNA
■ RNA

Fig. 3. Dice coefficient-based clustering of the TGGE fingerprints of the full-scale membrane bioreactor (MBR) during the spring, summer and autumn of 2009. A: aerated bioreactor; X: anoxic bioreactor; M: internal markers (A2). The dotted lines mark the clustering similarity level of internal markers of each clustering analyses, indicating the limit to consider significant differences between samples. The scale bar indicates the percentage of similarity and the numbers in nodes represent the cophenetic correlation coefficient values.

Box-and-Whisker plots of the descriptive indices of diversity

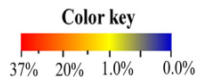
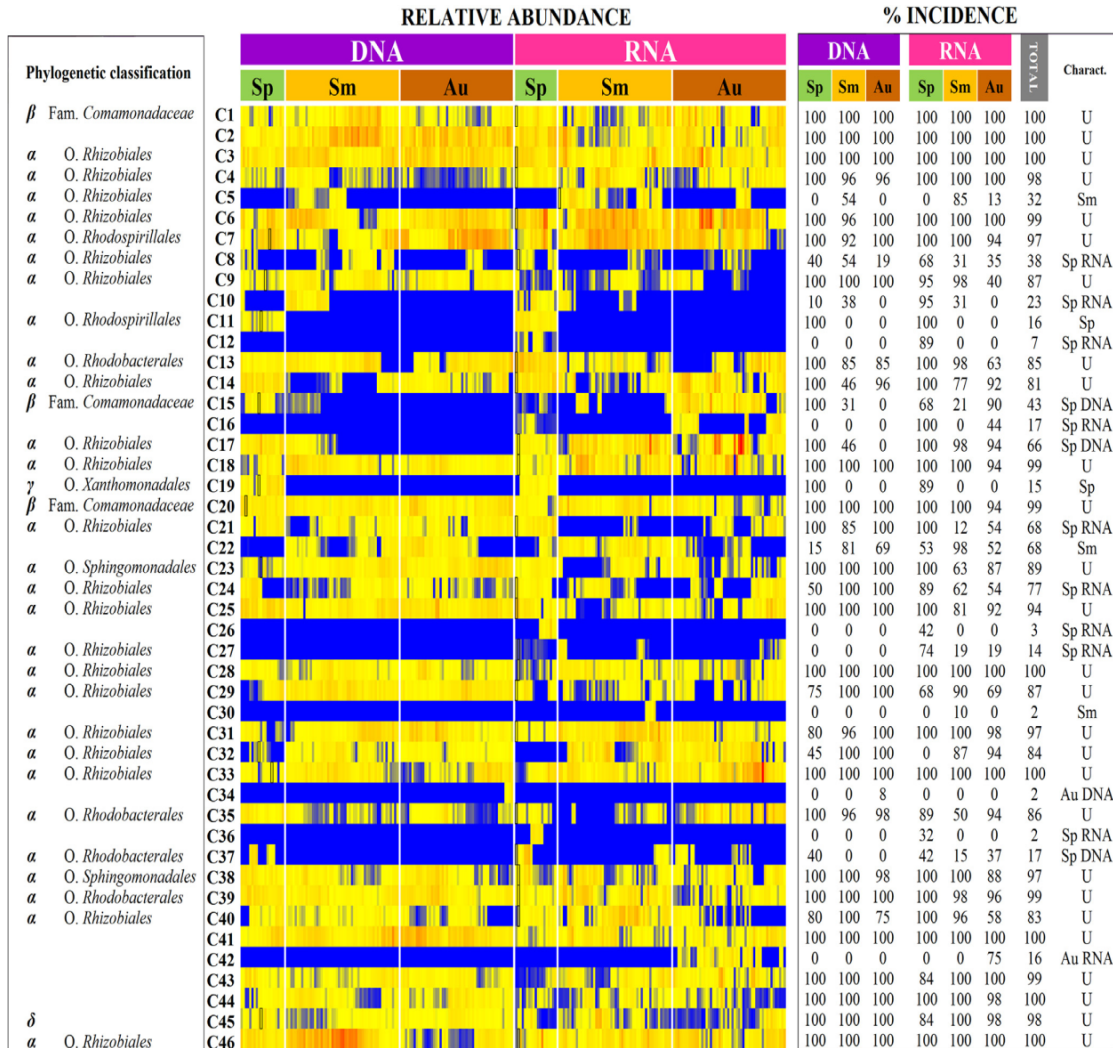


All the MBR samples scored Rr values >30 and the average value of Dy was 6, indices characteristic of a very habitable ecosystem, with a broad carrying capacity and high microbial diversity

The average value of Fo of the microbial communities in the MBR was 0.5, meaning that the 20% most dominant populations in the fingerprints contributed half of the cumulative total relative abundance of populations

The H' index describes the diversity, taking into account both the community species richness and its functional organization, and the values of H' calculated for the samples analyzed in the present study scored an average value = 3.1.

Relative abundances and % of incidence of the band-classes detected in the DNA and RNA-based TGGE fingerprints



Bands representative of 33 out of the 46 TGGE band-classes detected (72%) were successfully reamplified and sequenced.

Characteristic of band-classes: U: detected in over 80% of the samples, Sp: exclusively or predominantly detected in spring, Sm: exclusively or predominantly detected in summer, Au: exclusively or predominantly detected in autumn, DNA: exclusively or predominantly detected in DNA-based profiles, RNA: exclusively or predominantly detected in RNA-based profiles.

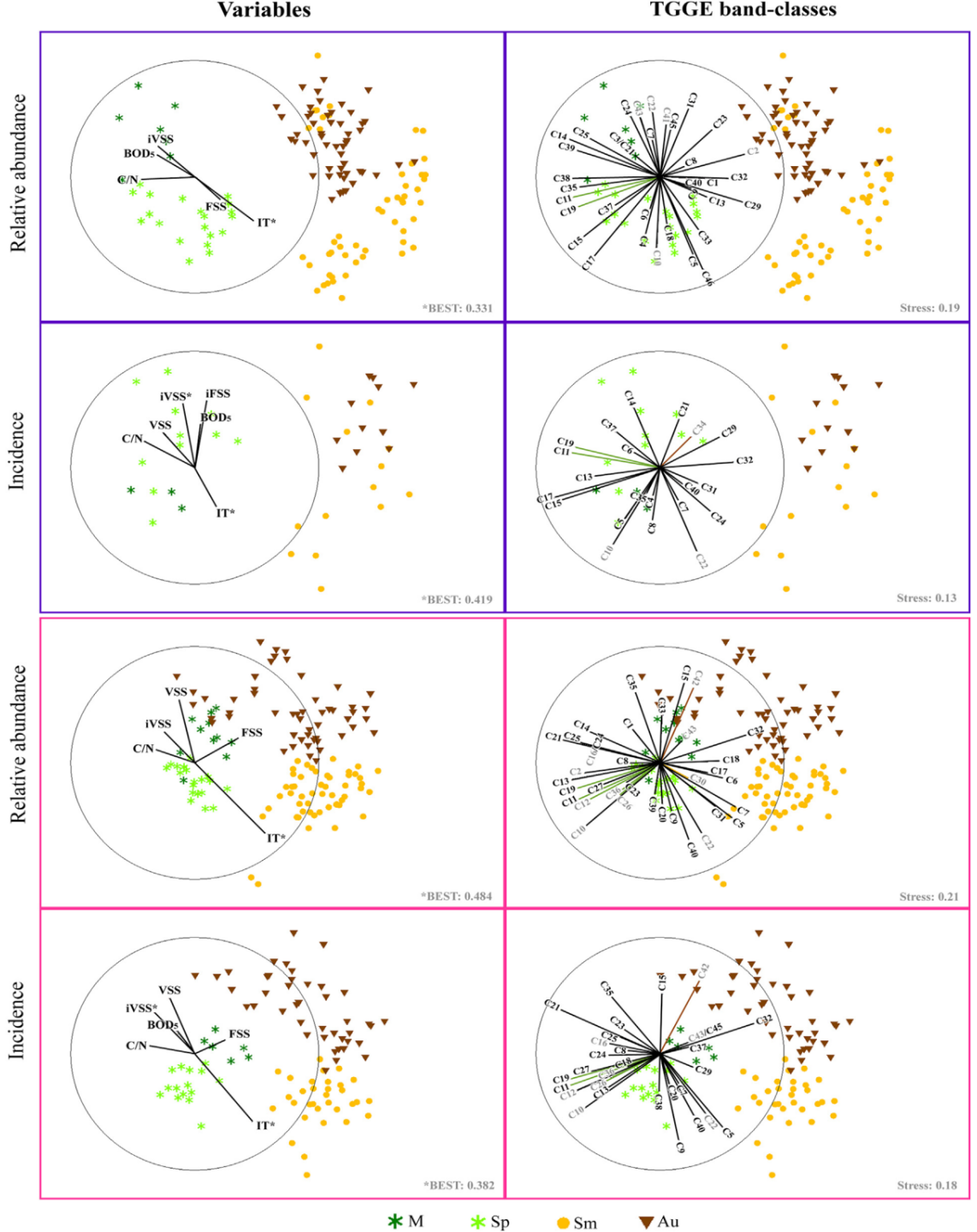
Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots

According to BIO-ENV analysis, IT had strong influence on the bacterial population dynamics in the MBR, being the variable which best explained the global distribution of the relative abundance of band classes in the TGGE profiles based in both molecular templates.

Those band classes detected in all the fingerprints are not shown in the incidence plots, since their incidence was unaffected by the changes of the variables along the sampling period. IT strongly correlated with the incidence and relative abundance of over 50% of the TP and AP detected by fingerprinting. Over 75% of the AP detected in the RNA-based TGGE profiles correlated strongly with the C/N ratio, and over 45% of these correlations were positive.

DNA

RNA



Conclusiones

Conclusions

Fingerprinting combined with multivariate analyses were proven strong tools to monitor long-term bacterial population dynamics in a full-scale MBR, revealing their complex profiles of response to the fluctuations of system variables.

The bacterial community showed characteristics required for the successful and steady contaminant removal from wastewater under real operating conditions.

Community profiles were often mostly explained by temperature, but relevant influences of other variables (concentration of iVSS and C/N ratio) were detected.

These variables were mainly responsible of triggering the shifts between functionally redundant populations, and understanding their influence contributes to predict population responses under changing conditions.

Material suplementario

Influent composition						
	BOD ₅ (mg O ₂ /L)	COD (mg O ₂ /L)	C/N	iTSS (mg/L)	iVSS (mg/L)	
Spring	581 ± 108 (a)	769.3 ± 125.3 (a)	8.0 ± 1.3 (a)	518 ± 242 (a)	419 ± 171 (a)	
Summer	478 ± 94 (c)	536.5 ± 149.6 (b)	5.8 ± 2.1 (c)	242 ± 148 (c)	196 ± 106 (c)	
Autumn	572 ± 142 (b)	729.8 ± 187.6 (a)	6.7 ± 2.4 (b)	380 ± 216 (b)	313 ± 167 (b)	
Aerated BR				Anoxic BR		
	IT (°C)	F/M (day ⁻¹)	TSS (mg/L)	VSS (mg/L)	TSS (mg/L)	VSS (mg/L)
Spring	20.4 ± 3.0 (c)	0.15 ± 0.02 (a)	4196 ± 426 (a)	3231 ± 248 (a)	4537 ± 627 (ab)	3551 ± 421 (b)
Summer	27.9 ± 1.6 (a)	0.17 ± 0.07 (a)	3446 ± 1092 (b)	2304 ± 656 (b)	3692 ± 1244 (b)	2455 ± 750 (c)
Autumn	21.3 ± 3.4 (b)	0.11 ± 0.02 (b)	5316 ± 1493 (a)	3794 ± 1040 (a)	5410 ± 1378 (a)	3889 ± 964 (a)
Effluent composition				Removal % of the system		
	COD (mg O ₂ /L)	BOD ₅ (mg O ₂ /L)	tN (mg/L)	COD	BOD ₅	tN
Spring	26 ± 8 (a)	2.4 ± 1.4 (a)	25 ± 4 (b)	91 ± 3 (b)	99 ± 1 (a)	73 ± 6 (a)
Summer	19 ± 11 (b)	2.8 ± 1.4 (a)	27 ± 6 (a)	93 ± 4 (a)	99 ± 1 (a)	71 ± 7 (a)
Autumn	24 ± 10 (a)	2.4 ± 1.4 (a)	35 ± 13 (ab)	92 ± 3 (ab)	99 ± 1 (a)	68 ± 10 (a)

abundance and incidence of band-classes were analyzed.

		DNA		RNA		
		Relative		Relative		
		abundance	Incidence	abundance	Incidence	
Spring	MDS stress	0.10	0.05	0.09	0.05	
	BEST	Value	0.731	0.787	0.822	0.734
		Variables	IT	IT	IT, <u>iVSS</u> , FSS	IT, BOD ₅ , <u>iVSS</u> , FSS, VSS
Summer	MDS stress	0.10	0.06	0.20	0.14	
	BEST	Value	0.495	0.582	0.406	0.460
		Variables	IT, FSS	IT, <u>iVSS</u> , FSS	<u>iVSS</u> , VSS	IT, <u>iVSS</u> , VSS
Autumn	MDS stress	0.12	0.04	0.16	0.11	
	BEST	Value	0.617	0.580	0.472	0.430
		Variables	IT	IT	IT	IT