

Optimización de metodologías para estudio de diversidad bacteriana asociada a microplásticos

María C Hozbor, Silvia R Peressutti y Rosana Di Mauro

Resumen

Recientemente, se ha comenzado a analizar a nivel mundial el rol de las comunidades microbianas (plástifera) sobre los microplásticos (MP) en ambientes marinos y sus efectos sobre los ecosistemas. El estudio de la composición de estas comunidades es clave para comprender su función potencial en la degradación de plásticos mediada por microorganismos. El objetivo del presente estudio fue poner a punto la toma de muestras de MP conservando los *biofilms* microbianos intactos, y optimizar la técnica de extracción de ADN metagenómico, para estudiar la biodiversidad microbiana asociada a MP en el ambiente marino.

El protocolo de muestreo con el uso del dispositivo MicroFiltro resultó una técnica más simple que las redes de plancton, permitiendo el filtrado de 200 litros de agua y logrando el aislamiento de partículas de MP (fragmentos y filamentos y gránulos) con variaciones en el tamaño de las partículas, y abarcando el espectro completo de tamaño definido para MP. El método de extracción de ADN microbiano optimizado en el presente trabajo brindó resultados positivos, sin observarse diferencia con o sin el agregado de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). En futuros ensayos se debería probar algún *kit* comercial de extracción de ADN, ya que representa la metodología reportada por la mayoría de los autores.





OPTIMIZACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA ESTUDIO DE DIVERSIDAD BACTERIANA ASOCIADA A MICROPLÁSTICOS EN AGUA DE MAR

María C Hozbor¹, Silvia R Peressutti¹ y Rosana Di Mauro^{1,2}

1. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP)
2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)

Resumen

Recientemente, se ha comenzado a analizar a nivel mundial el rol de las comunidades microbianas (plástifera) sobre los microplastos (MP) en ambientes marinos y sus efectos sobre los ecosistemas. El estudio de la composición de estas comunidades es clave para comprender su función potencial en la degradación de plásticos mediada por microorganismos. El objetivo del presente estudio fue poner a punto la toma de muestras de MP conservando los *biofilms* microbianos intactos, y optimizar la técnica de extracción de ADN metagenómico, para estudiar la biodiversidad microbiana asociada a MP en el ambiente marino.

El protocolo de muestreo con el uso del dispositivo MicroFiltro resultó una técnica más simple que las redes de plancton, permitiendo el filtrado de 200 litros de agua y logrando el aislamiento de partículas de MP (fragmentos y filamentos y gránulos) con variaciones en el tamaño de las partículas, y abarcando el espectro completo de tamaño definido para MP. El método de extracción de ADN microbiano optimizado en el presente trabajo brindó resultados positivos, sin observarse diferencia con o sin el agregado de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). En futuros ensayos se debería probar algún *kit* comercial de extracción de ADN, ya que representa la metodología reportada por la mayoría de los autores.

Palabras Clave

Microplásticos, Biofilms, Diversidad bacteriana.

Introducción

La presencia de plásticos en los ambientes marinos ha sido observada durante años, pero sólo recientemente fue reconocida como una amenaza global emergente (Tsiota et al. 2018), junto con el cambio climático, la acidificación oceánica y la depleción de ozono (Jiang et al. 2018). Se ha estimado que los volúmenes de ingreso de residuos de plásticos en el mar alcanza el orden del millón de toneladas al año, por lo que son considerados como los principales contaminantes oceánicos (Cutroneo et al. 2020). A pesar de ser extremadamente persistentes, su exposición a procesos físico-químicos y biológicos resulta en la fragmentación en pequeñas piezas (<5 mm) definidas como microplásticos (MP). Dada su ubicuidad, diversos estudios han documentado efectos adversos de MP sobre organismos marinos a diferentes niveles tróficos (Gall y Thompson 2015, Yagmour et al. 2018).

En el ambiente marino los MP, debido a sus características intrínsecas como pequeño tamaño, elevada área superficial y estabilidad química, son rápidamente cubiertos por un “film de acondicionamiento” compuesto por materia orgánica e inorgánica, que luego es colonizado por una sucesión de comunidades microbianas provenientes de poblaciones planctónicas, transformándose así en *biofilms* (Xu et al. 2019, Jacquin et al. 2019). Estas comunidades fueron definidas como ‘plástifera’ (Zettler et al. 2013) y su composición depende de factores biogeográficos y ambientales como salinidad y concentración de nutrientes, como también el tipo de plástico al que se adhieren (Oberbeckmann et al. 2020).

La plástifera posee una función potencial crucial que es la de biodegradación de los MP (Zhang et al. 2021). La composición de estas comunidades es clave en la degradación de plásticos mediada por microorganismos, ya que la formación de *biofilm* es considerada como el primer paso de este



proceso. En general, las investigaciones para determinar la diversidad de microorganismos que colonizan superficies de plásticos se abordan utilizando las técnicas moleculares modernas de secuenciación masiva del fragmento V3-V4 del gen 16S ARNr, como la tecnología de segunda generación de Illumina (Bryant et al. 2016, Syranidou et al. 2017, Jiang et al. 2018, Oberbeckmann et al. 2021). El primer paso para aplicar esta metodología es lograr purificar el ADN microbiano, mediante técnicas de extracción de ADN genómico a partir de los *biofilms* que cubren las muestras de MP.

Por otro lado, existe una creciente preocupación por desarrollar métodos de identificación y cuantificación de MP que puedan ayudar a asentar las bases para una legislación reguladora de estos micro-contaminantes. La variedad de tipos de plásticos y formas en las que los encontramos en el medioambiente genera una falta de consenso en cuanto a las técnicas de muestreo, identificación y cuantificación, y hace difícil poder legislar adecuadamente para establecer límites que ayuden a combatir el problema. Se necesita adoptar protocolos estandarizados que permitan comparar datos entre diferentes estudios (Toledo Martinez, 2019).

El objetivo del presente trabajo fue poner a punto el método para la toma de muestras de MP en agua de mar, conservando los *biofilms* microbianos intactos, como así también optimizar la técnica para la extracción de ADN metagenómico. Estas metodologías serán utilizadas para estudiar la biodiversidad bacteriana de los *biofilms* asociados a los MP.

Desarrollo del Procedimiento

1. Muestreo y procesamiento a bordo

1.1. Materiales

- Sistema de filtración (1 matraz erlenmeyer con esmerilado macho 40/35 de 2 l, 1 cuerpo con placa porosa para membranas 47 mm, 1 embudo de filtración de 300 ml y 1 pinza de sujeción de aluminio anodizado)
- Bomba de vacío
- Ultra freezer de -70°C
- Cajas de petri de vidrio
- Piseta
- Vaso de precipitado para realizar el enjuague del filtro
- Pinzas para filtros
- Probeta
- Prefiltro de 25 μm y filtro de membrana de 0,22 μm de diámetro de poro (Durapore, PVDF)
- Campana de extracción de gases

1.2. Toma de la muestra

Las muestras de microplásticos (MP) en agua de mar se recolectan mediante un sistema de filtración, denominado MicroFiltro (MF, Figura 1), que se conecta al sistema de bombeo continuo de circulación de agua de mar del buque, cuya entrada de agua se encuentra a 3 m por debajo de la superficie del mar. El MF permite realizar un filtrado secuencial de un gran volumen de agua que fluye primero a través un pre-filtro de acero inoxidable de 300 μm , y luego atraviesa el filtro de 60 μm también de acero inoxidable. El volumen filtrado por el MF queda registrado en el flujómetro y esta expresado en galones (1 galon=3,78541litros).

La maniobra de muestreo de MP comienza junto con el inicio de la maniobra del CTD, la operación inicia con el flujómetro en cero, registrando la hora inicio y abriendo la canilla del



bombeo continuo. Al finalizar esta maniobra, se cierra la canilla, y se registra la hora y el total del volumen de agua filtrada, indicado por el flujómetro.

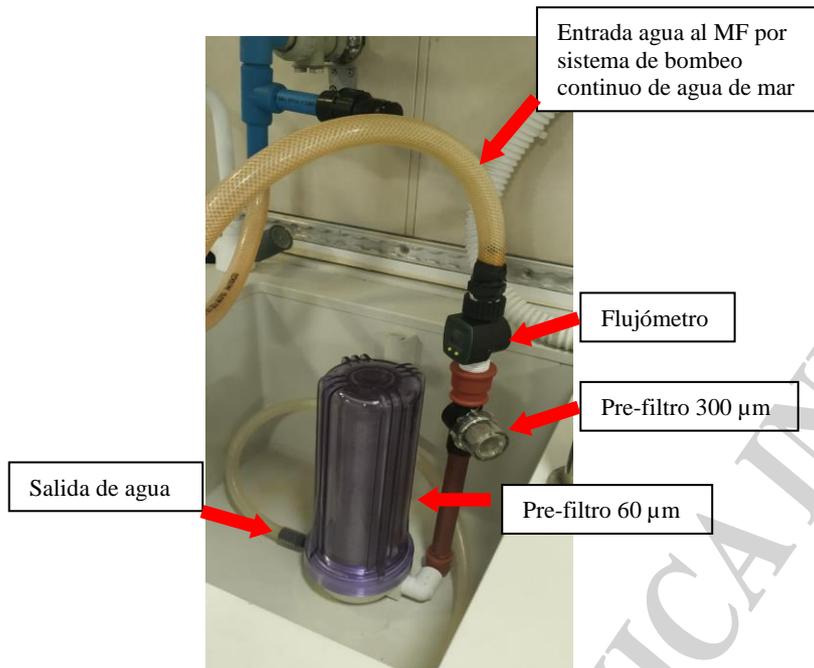


Figura 1. Microfiltro: sistema de filtración secuencial, provisto con dos mallas metálicas de 300 y 60 µm.

1.3 Colecta de la muestra

Los filtros del MF se enjuagan cuidadosamente por separado sobre un recipiente de vidrio y utilizando una piseta con agua destilada filtrada de manera tal de ir arrastrando todo material retenido en cada uno de ellos. El agua de enjuague junto con las partículas retenidas en los filtros del MF que se encuentran en el recipiente de vidrio, se transvasan a una probeta para medir el volumen. En el caso de superar los 200 ml se procede a concentrar el material utilizando un tamiz de 25 µm de tamaño de poro. Luego, el material retenido en el tamiz se arrastra utilizando la piseta con agua estéril. Finalmente, se obtiene volumen ≤ 200 ml, si proviene de la malla de 60 µm entonces se guarda la muestra en una botella color ámbar con 1 ml formol filtrado y a temperatura ambiente. Este material se utilizara para estudio microplásticos. Si la muestra proviene de la malla 300 µm, que es para el estudio de bacterias asociadas a los microplásticos (BMP), se vuelve a concentrar utilizando un filtro 0,22 µm (Durapore, PVDF), mediante filtración al vacío. El filtro se coloca en una caja de Petri estirado, se rotula y se guarda en ultrafreezer a -70°C hasta la extracción de ADN en el Laboratorio del GGMM del INIDEP (Figura 2).



Figura 2. Esquema de recolección de las muestras y procesamiento en laboratorio a bordo del buque.

2. Análisis de muestras en el laboratorio INIDEP

2.1. Inspección visual de la muestra

Las membranas filtrantes contenidas en las cajas de Petri fueron observadas con una lupa Leica S8 APO (80x), para seleccionar las partículas a ser separadas y registrarlas fotográficamente. Se eligieron aquellas partículas que presentaron evidencias de material orgánico sobre sus superficies, característica que fue considerada como indicadora de *biofouling*. Las partículas se extrajeron manualmente con una pinza y se guardaron en tubos *Eppendorf*, los cuales se mantuvieron refrigerados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento posterior de extracción de ADN.

3. Extracción de ADN microbiano a partir de *biofilms* formados sobre microplásticos

El ADN genómico fue extraído a partir de las muestras de MP obtenidos de agua de mar, de acuerdo con un protocolo estándar modificado (Ellis et al., 2003). Se inició adicionando a cada tubo *eppendorf* que contenía los MP aislados 1 ml de buffer CTAB [por 100 ml: CTAB 2% (2g); CINa 1,4 M (35 ml de solución stock 4 M); EDTA 20 mM (4 ml de solución stock 0,5 M); TRIS-CIH 100 mM pH 8,0 (10 ml de solución stock 1 M)], 20 μl de lisozima (1mg/ml) y 20 μl de proteinasa K (20 mg/ml). Se mezcló por agitación en *shaker* a 400 rpm por 20 min, se agregaron 200 μl de SDS 10% y se incubó por 30 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ en *shaker* y a continuación los tubos fueron colocados en hielo por 2 min y centrifugados a 12.000 rpm por 2 min. La fase superior (emulsión de color blanco) conteniendo el ADN fue transferida a un tubo limpio, y la fase inferior líquida y transparente fue sometida a una nueva extracción para recuperar trazas de ADN, pero utilizando 300 μl de buffer CTAB. Se juntaron los sobrenadantes de ambas extracciones y se agregó igual volumen de CIA (cloroformo: isoamílico, 24:1), mezclando suavemente por inversión y centrifugando luego 5 min a 12.000 rpm. Posteriormente, se trasvasó la fase acuosa superior (sin arrastrar interfase) a un tubo limpio y se agregó isopropanol en relación de volumen 1:1. Los tubos fueron guardados en *freezer* a -



20 °C *overnight*. Las muestras fueron centrifugadas durante 30 min a 12.000 rpm, el sobrenadante fue eliminado (por volcado) y el precipitado de ADN fue lavado con 200 µl de etanol frío al 80%. Los tubos se mantuvieron a -20 °C por 15 min y se centrifugaron 30 min a 12.000 rpm. El sobrenadante fue removido y el precipitado fue secado en estufa a 55 °C y resuspendido en 30 a 50 µl de agua MilliQ estéril y almacenado a -20 °C hasta su uso. El ADN extraído fue visualizado mediante la utilización de electroforesis de geles de agarosa al 1% en buffer TBE (108 g de Tris base, 55 g de ácido bórico y 40 ml de una solución de EDTA 0,5M, en 1 l de agua destilada) y 4 µl de bromuro de etidio (ThermoFisher). Se sembraron 4 µl del extracto de ADN y el gel fue corrido a 110 V durante 35 min.

Por otro lado, como control, se aplicó este método a la extracción de ADN ambiental directamente de muestras de agua sub-superficial. Las muestras de agua (1,5 l) se concentraron en un filtro de membrana de 0,22 µm (Durapore). Los filtros fueron enjuagados con 100 ml de buffer estéril para eliminar sustancias húmicas y sales (Rivera et al., 2003) y transferidos a crioviales, congelados inmediatamente en ultrafreezer a -70 °C hasta la extracción de ácidos nucleicos. Durante la puesta a punto también se probó, en una muestra de MP, el agregado de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) previo a la adición de cloroformo:isoamílico (24:1).

El ADN extraído fue cuantificado en un Fluorímetro QuantiFluor™-ST (Promega) utilizando QuantiFluor™ dsDNA System (Promega).

Resumen de pasos del procedimiento

1. Toma de muestra

- 1.1. Conectar el MicroFiltro (MF) al sistema bombeo continuo.
- 1.2. Registrar el tiempo muestreo y flujo de agua filtrada con un Flujómetro.



2. Colecta del material retenido en las mallas filtrantes MF

- 2.1. Bajo campana, enjuagar ambos filtros del MF por separado sobre un recipiente de vidrio utilizando una piseta con agua ultrapura
- 2.2. Malla 60 µm del MF para análisis de MP: Medir el volumen total de líquido recipiente de vidrio, si no supera los 200 ml transvasar a una botella y fijar con 1 ml formol hasta su análisis. Si es mayor a esta medida, concentrar el material en tamiz de 25 µm y enjuagar el mismo con agua ultrapura, para arrastrar las partículas retenidas.
- 2.3. Malla 300 µm del MF para análisis de plastífera: Concentrar el agua de enjuague y todo el material en suspensión utilizando un filtro de 0,22 µm (Durapore, PVDF), mediante filtración al vacío. Colocar el filtro en una caja de Petri, y almacenar en ultrafreezer a -70°C hasta la extracción de ADN en el laboratorio.



3. Inspección visual de la muestra en laboratorio

- 3.1. Observar las membranas filtrantes contenidas en las cajas de Petri con una lupa Leica S8 APO (80x), para seleccionar las partículas a ser separadas y registrarlas fotográficamente.
- 3.2. Seleccionar aquellas partículas que presenten evidencias de material orgánico sobre sus superficies, característica indicadora de *biofouling*.
- 3.3. Extraer las partículas manualmente con una pinza y almacenar en tubos *Eppendorf* a -20 °C hasta su procesamiento posterior de extracción de ADN.



4. Extracción ADN genómico microbiano

4.1. Agregar 1 ml de buffer CTAB 2% + 20 μ l de lisozima (1mg/ml) + 20 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) a eppendorf con MP



4.2. Mezclar por agitación en *shaker* a 400 rpm por 20 min



4.3. Agregar 200 μ l de SDS 10% e incubar 30 min a 65 °C en baño termostatzado o *shaker*



4.4. Colocar los tubos en hielo por 2 min, centrifugar a 12.000 rpm por 2 min y transferir la fase superior con ADN a un tubo limpio



4.5. Juntar los sobrenadantes de ambas extracciones y agregar igual volumen de CIA (cloroformo:isoamílico, 24:1), mezclando por inversión y centrifugar 5 min a 12.000 rpm.



4.6. Transferir la fase acuosa (superior, sin arrastrar interfase) a un tubo limpio y agregar isopropanol volumen 1:1 y guardar en freezer a -20 °C *overnight*.



4.7. Centrifugar las muestras por 30 min a 12.000 rpm, remover el sobrenadante por volcado, lavar el precipitado con etanol al 80% frío y colocar en freezer a -20 °C por 15 min. Centrifugar a 12.000 rpm por 30 min.



4.8. Remover el sobrenadante, secar el precipitado de DNA en estufa a 55 °C y resuspender el precipitado en 30-50 μ l de agua MilliQ y almacenar a -20 °C.



4.9. Visualizar el ADN extraído por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE



4.10. Medición de concentración de ADN en Fluorómetro QuantiFluor™-ST utilizando QuantiFluor™ dsDNA System

Bibliografía

- BRYANT JA, CLEMENTE TM, VIVIANI DA, FONG AA, THOMAS KA, KEMP P, KARL DM, WHITE AE, DELONG EF. 2016. Diversity and activity of communities inhabiting plastic debris in the North Pacific gyre. *mSystems* 1: e00024-16.
- CUTRONEO L, REBOA A, BESIO G, BORGOGNO F, CANESI L, CANUTO S, DARA M, ENRILE F, FORIOSO I, GRECO G. 2020. Microplastics in seawater: sampling strategies, laboratory methodologies, and identification techniques applied to port environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27: 8938-8952.
- ELLIS RJ, MORGAN P, WEIGHTMAN AJ, FRY JC. 2003. Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3223-3230.
- GALL SC, THOMPSON RC. 2015. The Impact Of Debris On Marine Life. *Mar. Pollut. Bull.* 92: 170-179.



- JACQUIN J, CHENG J, ODOBEL C, PANDIN C, CONAN P, PUJO-PAY M, BARBE V, MEISTERTZHEIM AL, GHIGLIONE JF. 2019. Microbial ecotoxicology of marine plastic debris: A review on colonization and biodegradation by the "Plastisphere". *Front. Microbiol.* 10: 865.
- JIANG PL, ZHAO SY, ZHU LX, LI DJ. 2018. Microplastic-associated bacterial assemblages in the intertidal zone of the Yangtze Estuary. *Sci. Total Environ.* 624: 48-54.
- OBERBECKMANN S, LABRENZ M. 2020. Marine microbial assemblages on microplastics: diversity, adaptation, and role in degradation. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 12: 209-232.
- OBERBECKMANN S, BARTOSIK D, HUANG S, WERNER J, HIRSCHFELD C, WIBBERG D, HEIDEN SE, BUNK B, OVERMANN J, BECHER D. 2021. Genomic and proteomic profiles of biofilms on microplastics are decoupled from artificial surface properties. *Env. Microbiol.* 23: 3099-3115.
- RIVERA I, LIPP E, GIL A, CHOOPUN N, HUQ A, COLWELL R. 2003. Method for extraction and application of Multiplex PCR to detect toxigenic *V. cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. *Environ. Microbiol.* 5: 599-606.
- SYRANIDOU E, KARKANORACHAKI K, AMOROTTI F, FRANCHINI M, REPOUSKOU E, KALIVA M, VAMVAKAKI M, KOLVENBACH B, FAVA F, CORVINI PF. 2017. Biodegradation of weathered polystyrene films in seawater microcosms. *Sci. Rep.* 7: 17991.
- TOLEDO MARTÍNEZ MA. 2019. Revisión bibliográfica de los métodos de análisis de micro(nano)plásticos en el medio ambiente y la biota marina. Universidad Nacional de Educación a Distancia, Fac. de Ciencias. Dpto. Química Analítica (Madrid, España).
- TSIOTA P, KARKANORACHAKI K, SYRANIDOU E, FRANCHINI M, KALOGERAKIS N. 2018. Microbial degradation of HDPE secondary microplastics: preliminary results. In: Cocca M, Di Pace E, Errico ME, Gentile G, Montarsolo A, Mossotti R, editors. *Proceedings of the International Conference on Microplastic Pollution in the Mediterranean Sea*. Cham, Switz.: Springer p.181-88.
- XU X, WANG S, GAO F, LI J, ZHENG L, SUN C, HE C, WANG Z, QU L. 2019. Marine microplastic-associated bacterial community succession in response to geography, exposure time, and plastic type in China's coastal seawaters. *Mar. Pollut.* 145: 278-286.
- YAGHMOUR F, BOUSI MA, WHITTINGTON-JONES B, PEREIRA J, GARCÍA-NUÑEZ S, BUDD J. 2018. Marine debris ingestion of green sea turtles, *Chelonia mydas*, (Linnaeus, 1758) from the eastern coast of the United Arab Emirates. *Mar. Pollut. Bull.* 135: 55-61.
- ZHANG K, HAMIDIAN AH, TUBIC A, ZHANG Y, FANG JKH, WU C, LAM PKS. 2021. Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review. *Environ. Pollut.* 274: 116554.
- ZETTLER ER, MINCER TJ, AMARAL-ZETTLER LA. 2013. Life in the "Plastisphere": microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47: 7137-7146.