

UNIVERSIDAD DE GRANADA



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE FARMACIA.

**“Efecto de las variables de un sistema de
biorreactores de membrana sumergida (MBR)
sobre la actividad enzimática y la estructura de
su comunidad microbiana”**

Cinta Gómez Silván

TESIS DOCTORAL 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Cinta Gómez Silván
D.L.: GR 996-2013
ISBN: 978-84-9028-498-8

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD
DE FARMACIA.**

PROGRAMA DE DOCTORADO DE MICROBIOLOGÍA

**“Efecto de las variables de un sistema de
biorreactores de membrana sumergida (MBR)
sobre la actividad enzimática y la estructura de
su comunidad microbiana”**

**MEMORIA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR EN
MICROBIOLOGÍA, CON MENCIÓN INTERNACIONAL, 2012.**

Directores:

**D. Jesús González López
Catedrático en Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada**

**Dña. María Belén Rodelas González
Catedrática en Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada**

ÍNDICE

	INTRODUCCIÓN GENERAL	7
I.	BIORREACTORES DE MEMBRANA	8
I.I.	Historia de los MBRs	8
I.II.	Ventajas de los sistemas de MBR	10
I.III.	Desventajas o problemas de los sistemas MBR	12
II.	COMUNIDAD MICROBIANA	14
II.I.	Eliminación de nutrientes: el nitrógeno	16
II.II.	Formación de espumas: bacterias filamentosas	21
II.III.	Estudio de la comunidad microbiana	23
III.	SITUACIÓN ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN SOBRE MBR	25
	OBJETIVOS	27
	DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA MBR	29
A.	DESCRIPCIÓN DEL MBR	30
B.	MANTENIMIENTO Y CONTROL DEL MBR	34
B.1.	Mantenimiento de la membrana: limpiezas químicas	34
B.2.	Control automático	37
C.	PARÁMETROS OPERACIONALES DEL MBR	37
D.	SEGUIMIENTO ANALÍTICO DEL FUNCIONAMIENTO DEL MBR	41
D.1.	Demanda química de oxígeno (COD)	41
D.2.	Demanda biológica de oxígeno carbonácea (CBOD ₅)	42
D.3.	Sólidos en suspensión	42
D.4.	Nitrógeno total (tN)	42
E.	MUESTREO DE LOS BIORREACTORES DEL MBR	43
F.	ESTUDIO ESTADÍSTICO PREVIO DEL MBR	44
F.1.	Estudio de la eficiencia del proceso	45
F.2.	Estudio de las variables del sistema MBR	46
CAPÍTULO 1	RELACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DEL FANGO ACTIVO CON LAS VARIABLES DEL MBR	51
1.1.	INTRODUCCIÓN	53
1.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	57
1.2.1.	Muestreo para la determinación de las actividades enzimáticas	57
1.2.2.	Determinaciones de las actividades enzimáticas	58
1.2.2.1.	Actividades fosfatasas	58
1.2.2.2.	Actividad α -glucosidasa	59
1.2.2.3.	Actividad proteasa	59
1.2.3.	Análisis estadístico	60
1.3.	RESULTADOS	63
1.3.1.	Variaciones estacionales de las actividades enzimáticas en el MBR	63

1.3.2.	Análisis multivariante de las actividades enzimáticas (MDS) y su relación con las variables del MBR (BIO-ENV)	64
1.4.	DISCUSIÓN	71
1.4.1.	Estudio comparativo de las actividades enzimáticas en el MBR en las diferentes estaciones del año	71
1.4.2.	Distribución de los datos de actividades enzimáticas y su relación con las variables del sistema	73
CAPÍTULO 2	ESTUDIO DE LAS BACTERIAS DEGRADADORAS DE COMPUESTOS NITROGENADOS	79
2.1.	INTRODUCCIÓN	80
2.1.1.	Eliminación del nitrógeno	80
2.1.2.	Técnica de qPCR	83
2.1.2.1.	Fluoróforos: SYBR® Green I	84
2.1.2.2.	Método de cuantificación: ciclo umbral	85
2.1.2.3.	Tipos de cuantificación	86
2.1.2.4.	Aplicabilidad de la técnica de PCR	87
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	89
2.2.1.	Muestreo de los BRs del MBR para el estudio de biología molecular	89
2.2.1.1.	Preparación y almacenaje de las muestras para estudios basados en DNA	91
2.2.1.2.	Preparación y almacenaje de las muestras para estudios basados en RNA	91
2.2.2.	Extracción y purificación de ácidos nucleicos	92
2.2.2.1.	Extracción y conservación del DNA total	92
2.2.2.2.	Extracción del RNA total	93
2.2.2.3.	Purificación y conservación del RNA extraído	94
2.2.2.4.	Recuperación del RNA purificado desde formamida	94
2.2.2.5.	Retrotranscripción del RNA recuperado	95
2.2.2.6.	Purificación del cDNA	96
2.2.3.	Condiciones de amplificación	97
2.2.4.	Puestas a punto	99
2.2.5.	Preparación de patrones	100
2.2.5.1.	Patrones de DNA	101
2.2.5.2.	Patrones de RNA	102
2.2.6.	Cuantificación de genes diana	103
2.2.7.	Análisis estadístico	105
2.3.	RESULTADOS	107
2.3.1.	Fluctuaciones estacionales de las variables del MBR	107
2.3.2.	Cuantificación absoluta	108
2.3.3.	Cuantificación relativa	112

2.3.4.	Variaciones estacionales de la cuantificación relativa	113
2.3.5.	Análisis multivariante de las poblaciones bacterianas del ciclo del nitrógeno (MDS) y su relación con las variables del MBR (BIO-ENV)	115
2.4.	DISCUSIÓN	121
2.4.1.	Tendencias generales de las poblaciones estudiadas	121
2.4.2.	Relación entre poblaciones presentes y activas: rendimiento energético del metabolismo	127
2.4.3.	Distribución de los datos de las poblaciones bacterianas del ciclo del nitrógeno presentes y activas, y su relación con las variables del sistema	128
CAPÍTULO 3	ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y DINÁMICA DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS DEL MBR MEDIANTE FINGERPRINTING	133
3.1.	INTRODUCCIÓN	135
3.1.1.	Análisis de comunidades microbianas complejas mediante métodos de <i>fingerprinting</i> . Electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE)	136
3.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	139
3.2.1.	Muestreo del MBR para el estudio mediante TGGE	139
3.2.2.	Preparación de las muestras para TGGE	140
3.2.2.1.	Amplificación por PCR	140
3.2.2.2.	Concentración y purificación de los productos de PCR	143
3.2.3.	TGGE	143
3.2.3.1.	Composición del gel	143
3.2.3.2.	Condiciones de electroforesis	144
3.2.3.3.	Tinción y conservación de los geles	144
3.2.4.	Secuenciación de las bandas obtenidas	145
3.2.4.1.	Reamplificación de las bandas separadas mediante TGGE	145
3.2.4.2.	Concentración y purificación de los productos de la reamplificación	145
3.2.4.3.	Secuenciación de los fragmentos de DNA reamplificados	146
3.2.4.4.	Análisis informático de las secuencias	146
3.2.5.	Análisis de los patrones de bandas obtenidos por TGGE	146
3.2.6.	Análisis estadístico de los datos obtenidos	149
3.3.	RESULTADOS	151
3.3.1.	Análisis de los perfiles de TGGE	151
3.3.1.1.	Análisis de los perfiles obtenidos a partir de DNA o RNA	155
3.3.1.2.	Análisis de los perfiles por estaciones anuales	156
3.3.2.	Análisis de los índices descriptivos a partir de los perfiles de TGGE	161
3.3.3.	Análisis filogenético de las secuencias de DNA obtenidas a partir de las bandas obtenidas de los TGGEs	164

3.3.4.	Análisis multivariante de los perfiles de comunidad bacteriana según la abundancia relativa de las poblaciones detectadas (MDS) y su relación con las variables de MBR (BIO-ENV).	169
3.3.4.1.	Estudio de la distribución de la abundancia relativa de las poblaciones bacterianas en los biorreactores del MBR en cada estación	170
3.3.4.2.	Estudio de la distribución de la incidencia de las poblaciones bacterianas en los biorreactores del MBR en cada estación	173
3.4.	DISCUSIÓN	182
3.4.1.	Análisis de la estructura de la comunidad bacteriana en el MBR mediante TGGE	182
3.4.2.	Análisis filogenético	184
3.4.3.	Relación de las poblaciones bacterianas presentes y activas con las variables del sistema	186
CAPÍTULO 4	ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES PROCARIOTAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA EN PARALELO	190
4.1.	INTRODUCCIÓN	191
4.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	196
4.2.1.	Muestreo de los BRs del MBR para el estudio mediante Illumina	197
4.2.2.	Preparación de librerías de amplicones del rDNA 16S	197
4.2.3.	Análisis bioinformático de las secuencias parciales del rDNA 16S	198
4.3.	RESULTADOS	201
4.3.1.	Análisis de los parámetros e índices de diversidad en las muestras de fango del MBR a partir de los datos obtenidos de Illumina	201
4.3.2.	Análisis de la biodiversidad de poblaciones bacterianas presentes y activas detectadas en los BRs del MBR mediante secuenciación con Illumina	206
4.4.	DISCUSIÓN	217
	DISCUSIÓN GENERAL	223
	CONCLUSIONES	227
	ENGLISH SUMMARY	230
	ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	259
	GLOSARIO	265
	BIBLIOGRAFÍA	267

INTRODUCCIÓN GENERAL

El problema causado por las aguas residuales se ha incrementado y agravado notablemente en las últimas décadas debido a diversos factores como son el rápido crecimiento industrial, la creciente urbanización, cambios en las prácticas agrícolas, etc. Además, se ha demostrado que los tratamientos convencionales de lodos o fangos activos, tecnología más usada y expandida a nivel mundial en el campo de depuración de aguas residuales urbanas, resultan insuficientes en la eliminación de nutrientes (fósforo y nitrógeno principalmente), microorganismos patógenos, medicamentos activos (Martín *et al.*, 2012) y hormonas (Shafrir and Avisar, 2012). Este panorama unido al creciente endurecimiento de las leyes de vertido (Judd, 2006) han hecho indispensable y urgente la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías de tratamiento más eficientes.

Una de las alternativas en creciente expansión son los biorreactores de membrana sumergida, MBR por sus siglas en inglés. Las ventajas que presenta este sistema son ampliamente conocidas (Judd, 2006, Le-Clech, 2010), siendo las más relevantes la mayor calidad del agua tratada y la posibilidad de reutilización de la misma. Tan solo con unas décadas de vida, actualmente los MBRs se consideran un sistema bien establecido en este campo, compitiendo activa y directamente con el sistema convencional de lodos activos (CAS). Sin embargo aún no se ha alcanzado una madurez suficiente en este uso específico de membranas, siendo necesario el desarrollo de más estudios y experiencias, principalmente a largo plazo (Le-Clech, 2010).

I. BIORREACTORES DE MEMBRANA (MBRs):

I.I. Historia de los MBRs:

La importancia de la depuración de aguas residuales radica tanto en el problema ambiental que crea su vertido bruto sobre los ecosistemas como al problema sanitario por ser fuente de enfermedades contagiosas, afectando en ambos aspectos al ser humano.

El tratamiento de aguas por medio de lodos o fangos activos comenzó su andadura sobre el año 1882, aunque no fue hasta el año 1916 cuando se

construyó la primera planta real, en Worcester, Reino Unido (Coombs, 1992). Desde entonces el proceso básico continúa siendo el mismo con una evolución paulatina sin grandes saltos. La expansión a la mayoría de los países que actualmente utilizan esta tecnología se produjo tras la 2ª Guerra Mundial (Cooper, 2001), consolidándose como el sistema de depuración más empleado y extendido a nivel mundial.

Básicamente, el sistema de lodos activos consiste en la combinación de procesos biológico y físico. En el proceso biológico, el agua a tratar queda estancada, permitiendo el crecimiento de los microorganismos presentes en la misma, gracias al consumo y oxidación de la materia orgánica disuelta, formando flóculos que en conjunto se denominan fangos o lodos activos. Posteriormente se lleva a cabo una separación física de las fases sólida (lodos) y líquida (agua tratada o efluente) por medio de decantación o sedimentación.

Los biorreactores de membrana sumergida (MBR) constituyen una variación de la tecnología anterior, donde el proceso físico de decantación es sustituido por un proceso de filtración a través de una membrana.

Los primeros estudios de la utilización de membranas combinadas con un sistema de fangos activos no están descritos hasta finales de los años 60 (Hardt *et al.*, 1970, Smith *et al.*, 1969). Durante la década de los 70 esta tecnología, poco a poco, se fue abriendo paso en los mercados, desarrollándose variaciones y mejoras. Fue en la década de los 90 cuando los MBR tomaron fuerza y creció notablemente tanto el número de instalaciones como el número de países en los que se encontraban, con gran éxito en aplicaciones industriales y urbanas.

El mercado actual de los MBR está en continuo crecimiento gracias a su alta eficiencia y la disminución de costes de instalación y funcionamiento que se ha ido produciendo (Drews and Kraume, 2005). Se estima que en el año 2005 existían instalaciones en unos 200 países (Parker, 2008) y en el 2009 en torno a 7600 plantas instaladas en todo el mundo (Judd, 2011). En el año 2008, los datos apuntaban a que este mercado era capaz de generar alrededor de 290 millones de dólares, unos 220 millones de euros, (Kraume and Drews,

2010) presentando tasas anuales de crecimiento superiores al 10% (Judd, 2008, Kraume and Drews, 2010). Estas tasas son significativamente más altas que en otras tecnologías avanzadas de tratamiento de aguas, como filtros biológicos aireados y reactores discontinuos secuenciales, e incluso más altas que las de otras tecnologías de membranas (Judd, 2006).

I.II. Ventajas de los sistemas de MBR:

La gran expansión y crecimiento exponencial de estos sistemas de depuración durante los últimos años se debe en gran parte a las enormes ventajas que presenta. Estas ventajas son amplia y sobradamente conocidas y entre las más destacables se encuentran (Le-Clech, 2010):

a. Compactación de las instalaciones:

Gracias a la sustitución de los decantadores secundarios por tanques de membrana, el tamaño de las instalaciones necesario para tratar el mismo volumen de agua disminuye considerablemente (Judd, 2008). Por lo tanto se produce una notable reducción del impacto ecológico, visual y urbano, reduciendo tanto el tamaño de planta como los olores producidos por la misma.

b. Mayor calidad del efluente:

Está ampliamente descrita y demostrada la retención completa de flóculos bacterianos y de la mayoría de sólidos en suspensión, que se produce gracias al uso de membranas de filtración. Posteriormente las investigaciones se han ampliado al estudio de eliminación de nutrientes (compuestos nitrogenados y fosforados), capacidad de desinfección física del agua (Arevalo *et al.*, 2009), y más recientemente a la eliminación de microcontaminantes tanto orgánicos como inorgánicos, metales pesados o disruptores hormonales (Arévalo, 2011, Gómez *et al.*, 2007, Gonzalez *et al.*, 2012). En todos los casos, la eliminación de estos compuestos es mayor en los sistemas MBRs en comparación con los CAS.

c. Control independiente del tiempo de retención de sólidos (SRT):

Gracias a la instalación de la membrana de filtración este parámetro se ve independizado del tiempo de retención hidráulica (HRT). Esta separación de parámetros que en la tecnología de lodos activos se encuentran íntimamente ligados, permite trabajar con mayor cantidad de sólidos en el biorreactor sin que se vea afectado el caudal de agua tratada. El trabajo a mayores SRT está unido a la disminución del tamaño de planta al mismo tiempo que conlleva otras ventajas más importantes:

• *Disminución de la cantidad de lodo residual producido y aumento de la tasa de mineralización del mismo:*

La gestión de este exceso de biomasa producida en una estación depuradora puede llegar a suponer el 60% del total de los costes de operación (Drews and Kraume, 2005). Además, en España, preferentemente se destinan a enmienda orgánica de suelos requiriendo una estabilización previa (USEPA, 1999) con bajas cantidades de materia orgánica biodegradable para evitar daños en la estructura del suelo y contaminaciones del mismo y de las aguas subterráneas.

En sistemas de MBR, el trabajo a alta SRT permite disminuir la cantidad de lodos residuales (Le-Clech, 2010) ya que el crecimiento de nueva biomasa en el interior del biorreactor está limitado por la disponibilidad de nutrientes (Low and Chase, 1999). Además, estas condiciones de trabajo, permiten la transformación prácticamente total de la materia orgánica disuelta biodegradable (Judd, 2006). Un fango se considera estabilizado cuando la concentración de materia orgánica volátil está en torno al 60% en peso seco (EGMASA, 2005), obteniéndose habitualmente porcentajes del 70-75% en instalaciones de MBRs (Laera *et al.*, 2009).

• *Desarrollo de poblaciones de crecimiento lento:*

La retención completa de biomasa que se produce debido al proceso de filtrado permite el desarrollo de microorganismos de crecimiento lento que en otros sistemas son retirados con el resto de biomasa. Dentro de estas poblaciones se encuentran aquellas responsables de la degradación de

contaminantes orgánicos específicos como son los compuestos nitrogenados y/o fosforados. Este tipo de nutrientes vertidos en el medio ambiente son responsables de contaminaciones de aguas subterráneas y procesos de eutrofización de ecosistemas. Su eliminación comprende un ciclo complejo, llevado a cabo por diferentes poblaciones de microorganismos y en diferentes condiciones de oxigenación. La configuración en pre-desnitrificación en los sistemas MBR se ha demostrado como una de las alternativas más eficientes para la eliminación de dichos contaminantes (Le-Clech, 2010). Esta configuración consiste en situar un tanque anóxico previo al tanque aireado y con recirculación entre ambos, logrando una alternancia de fases anóxica-aireada eficiente para la descontaminación de las aguas a tratar (Capítulo 2, Apdo.2.1.1).

I.III. Desventajas o problemas de los sistemas de MBR:

A pesar de todas las ventajas anteriormente descritas, los biorreactores de membrana son una tecnología en desarrollo y crecimiento que presenta aun muchos puntos débiles que mejorar. Entre ellos, los problemas que más atención están captando actualmente son:

a. Ensuciamiento de membranas:

Uno de los inconvenientes que limita las tecnologías de tratamiento de aguas residuales basadas en el uso de membranas es el ensuciamiento progresivo de la superficie filtrante a lo largo de la operación de estos sistemas. El ensuciamiento se debe al crecimiento de biopelículas microbianas y al acumulo de materiales tanto orgánicos como inorgánicos sobre las membranas, lo que disminuye la eficiencia de las mismas (Calderón *et al.*, 2011).

Actualmente, para afrontar este problema, se estudian los diferentes mecanismos de ensuciamiento y las posibles optimizaciones de los procesos operacionales para evitarlos. Así, las partículas responsables del ensuciamiento de membranas se han dividido en tres tipos según su tamaño y efecto:

- Los **sólidos en suspensión**, con un efecto directamente proporcional a su concentración en el interior del biorreactor. Se evita fácilmente por medio de métodos físicos como son la aireación de la membrana, el retrolavado de las mismas o la relajación del flujo de filtración.

- La **fracción coloidal**, produce un ensuciamiento permanente y requiere de limpiezas químicas periódicas (Descripción del sistema MBR , Apdo.B.1). Estas limpiezas químicas terminan dañando las membranas, por lo que se intenta optimizarlas y reducir las.

- Entre la **fracción de solutos**, se encuentran las sustancias extracelulares poliméricas (EPS), principales causantes de los problemas de ensuciamiento de membranas. Se trata de compuestos extremadamente heterogéneos de origen microbiano, y el control de ensuciamiento se enfoca desde el punto de vista operacional, principalmente disminuyendo el tiempo de retención de sólidos en el interior de los biorreactores y el flujo transmembrana (Judd, 2008).

b. Formación de espumas:

Este es un problema común en todos los tipos de plantas de tratamiento de aguas residuales (WWT). Las espumas se producen por excesivo crecimiento de bacterias filamentosas (Apdo.II.II) llevando a la pérdida de biomasa activa y por tanto disminuyendo la eficiencia del proceso depurador. Los microorganismos causantes presentan un morfología en común, pero no una fisiología (Martins *et al.*, 2004). Se han postulado diversas hipótesis para intentar explicar las causas de este fenómeno, pero hasta el momento, no existen pruebas que validen ningún mecanismo general.

c. Oxigenación:

Junto con la enorme ventaja que supone trabajar a altas concentraciones de sólidos en el interior de los biorreactores (SRT), viene añadido el problema de transferencia de oxígeno al fango. Al aumentar los sólidos, la eficiencia de oxigenación disminuye exponencialmente (Judd, 2008), afectando al proceso aeróbico de degradación de nutrientes y oxidación de materia orgánica. Por lo tanto, trabajar a mayores SRT requiere mayores tasas de aireación y por tanto,

mayores costes del proceso. Alrededor del 70% del consumo energético se debe a la aireación del reactor biológico (Kraume and Bracklow, 2003), así el ahorro energético en este parámetro operacional es de suma importancia y prioritario para el futuro de las instalaciones MBR.

d. Costes:

Inicialmente, la instalación de una planta de MBR sigue siendo más cara comparada con una de lodos activos. El desarrollo y abaratamiento del coste de las membranas y el endurecimiento de las leyes que regulan los procesos de depuración han hecho que los MBR sean más competitivos. Sin embargo aún quedan muchos parámetros y procesos que ajustar para que los costes disminuyan y la calidad del agua tratada no se vea comprometida (Le-Clech, 2010).

II. COMUNIDAD MICROBIANA:

En los sistemas de WWTs, los microorganismos son los principales responsables de las transformaciones de la materia orgánica, por lo que son claves en el éxito del proceso de depuración. El componente biológico está ampliamente estudiado y descrito en sistemas CAS, estando formado por una comunidad compleja de bacterias, arqueas, hongos, protozoos y algunos metazoos. Tan sólo la comunidad bacteriana comprende aproximadamente el 95% de la biomasa siendo la principal responsable de la eliminación de materia orgánica y contaminantes del agua residual (Erijman *et al.*, 2011). Por lo tanto, el estudio de dicha comunidad bacteriana permite entender, predecir y optimizar el funcionamiento y eficiencia de los procesos de depuración.

Como se ha comentado anteriormente en esta introducción (Apdo. I), los sistemas MBR constituyen una variación de los procesos de CAS, por lo que, desde el punto de vista biológico, la comunidad en ambos sistemas presenta grandes similitudes. Sin embargo, las condiciones de trabajo son muy distintas, afectando a la comunidad y su estructura. Algunos estudios han demostrado un bajo número, incluso ausencia, de protozoos y metazoos en sistemas de MBR (Rosenberger *et al.*, 2000, Wei *et al.*, 2003), aunque en general, esta fracción de la comunidad no está aún bien descrita.

En ambos tipos de sistemas la comunidad se organiza formando flóculos compuestos de colonias microbianas embebidas en una nube de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Estas sustancias están compuestas por proteínas, hidratos de carbono, sustancias húmicas, ácidos nucleicos y lípidos, que derivan de los propios microorganismos y son producidos por lisis celular o expulsados al exterior por transporte activo (Erijman *et al.*, 2011). Así, se ha descrito que los flóculos de los sistemas de MBR se caracterizan por ser más pequeños y con uniones más débiles en comparación con los flóculos formados en los sistemas de lodos activos. Además, debido a la completa retención de sólidos llevada a cabo por la membrana de filtración, aparecen numerosas células libres en suspensión y la comunidad se ve sometida a un entorno limitado en nutrientes, reduciendo sus tasas de crecimiento y respiración. (Konopka, 2000, Morgan *et al.*, 2002). Todas estas condiciones más restrictivas influyen tanto a la composición en especies de la comunidad como a la actividad biológica y a la capacidad de respuesta frente a cambios ambientales u operacionales.

En general, los sistemas de WWTs son ecosistemas muy complejos en los que ocurren múltiples interacciones biológicas dando lugar a una red alimenticia influenciada por la disponibilidad de recursos y la depredación e interacciones entre los distintos niveles tróficos. Además, esta red trófica se ve afectada por muchos otros factores, tanto físicos como químicos, entre los que se encuentran en primer lugar la temperatura y tiempo de retención hidráulico (HRT) seguidos por el pH, el oxígeno disuelto (DO), la salinidad, la presencia de tóxicos y la concentración de nutrientes orgánicos e inorgánicos. Por lo tanto, en cada sistema, en cada proceso de tratamiento se desarrolla una microbiota característica resultado de todas estas interacciones biológicas, físicas y químicas (Erijman *et al.*, 2011). Sin embargo, a grandes rasgos, se observan características comunes en todos ellos, necesarias a tener en cuenta a la hora de estudiar y entender la compleja comunidad microbiana responsable del proceso depurador:

1. Estas comunidades presentan una enorme y compleja **diversidad** genética y metabólica, capaz de llevar a cabo la degradación de la mayoría de los contaminantes orgánicos y en diferentes condiciones. Algunos sistemas,

como los CAS, están ampliamente estudiados y se han obtenido una gran cantidad de aislados a partir de ellos, sin embargo, no ha sido posible construir una comunidad artificial con la versatilidad necesaria para llevar a cabo una depuración eficiente.

2. La enorme diversidad anteriormente mencionada nos lleva a esta segunda característica, la **redundancia funcional**. La eficiencia del proceso de depuración no depende únicamente de las especies más abundantes, también depende la capacidad de amortiguación de las condiciones fluctuantes del proceso, gracias a la existencia de especies funcionalmente equivalentes capaces de jugar el mismo papel en la depuración bajo distintas condiciones o a distintos niveles.

3. Como la mayoría de ecosistemas, los sistemas de tratamiento no están en equilibrio, presentan cambios y fluctuaciones. Las comunidades presentes en ellos son **dinámicas**, ajustándose y ajustando su actividad biológica en respuesta a dichas variaciones, siendo capaz de llevar a cabo la depuración eficientemente y de forma estable, incluso cuando se producen cambios permanentes en su composición.

En cuanto a la composición de la comunidad microbiana de los sistemas de MBR, el conjunto de los estudios realizados hasta el momento concluye que está claramente dominada por el Phylum *Proteobacteria* seguido por grupos bacterianos como *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi* y *Planctomycetes* entre otros. La proporción y dominancia de unos grupos sobre otros varía según los sistemas MBR estudiados y la metodología aplicada para el estudio de la comunidad (Wang *et al.*, 2012, Xia *et al.*, 2010, Ye and Zhang, 2012).

II.J. Eliminación de nutrientes: el nitrógeno:

El nitrógeno es un elemento fundamental para el crecimiento de todos los organismos, ya que es requerido en grandes cantidades como componente de proteínas y ácidos nucleicos. Aunque este elemento constituye un 80% de la atmósfera terrestre, las formas gaseosas del nitrógeno no son asimilables por

la mayoría de los organismos. En las últimas décadas, las actividades humanas como el uso de fertilizantes nitrogenados, la utilización de combustibles fósiles y la liberación de nitrógeno en aguas residuales han alterado dramáticamente el ciclo del nitrógeno, influyendo en el cambio climático, la química de la atmósfera, la salud humana y el funcionamiento ecológico de los ecosistemas (Martinez-Espinosa *et al.*, 2011).

En ecosistemas acuáticos terrestres y suelos, el aumento de nitrógeno está causando la eutrofización de lagos y ríos, reduciendo la biodiversidad y provocando la pérdida de funcionalidad de los mismos. Además, en el agua potable causa enfermedades en humanos como la metahemoglobinemia y cáncer de colon (Graham *et al.*, 2011). En los océanos, el aumento de este elemento produce eutrofización, es decir, zonas muertas debido al crecimiento excesivo de algas, las cuales consumen el oxígeno y producen hipoxia en el medio.

Por lo tanto, uno de los objetivos potenciados en las últimas décadas en los tratamientos de aguas residuales, ha sido aumentar lo máximo posible la tasa de eliminación del nitrógeno presente en las aguas contaminadas. Una de las formas más utilizada y eficiente es mediante sistemas que permitan llevar a cabo los procesos bacterianos de nitrificación y desnitrificación (Capítulo 2. Ap.2.1.1), transformando el nitrógeno de entrada, mayoritariamente en forma de amonio, hasta formas de nitrógeno gaseosas, que pasen a la atmósfera (Kraft *et al.*, 2011).

a. Nitrificación:

Comprende el proceso de transformación del amonio (NH_4^+) hasta nitrato (NO_3), el cual se produce en dos pasos diferentes. Este proceso es llevado a cabo por bacterias aeróbicas autotróficas y arqueas oxidadoras de amonio (AOA) mayoritariamente, algunas bacterias autotróficas del género *Arthrobacter* y algunos hongos del género *Aspergillus* (Atlas and Bratha, 1998). Las bacterias nitrificantes están ampliamente distribuidas en la naturaleza y, aunque se trata de organismos aerobios, toleran condiciones de muy baja concentración de oxígeno.

En las bacterias nitrificantes, la **primera** oxidación se produce secuencialmente:



La mayoría de las bacterias responsables de esta oxidación son bacterias autotróficas aerobias de los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* (*Betaproteobacterias*) y *Nitrosococcus* (*Gammaproteobacterias*), o se encuentran relacionadas con ellos (Kowalchuk *et al.*, 1997a). El proceso y enzimas que participan, así como su regulación está ampliamente descrito (Kampschreur *et al.*, 2006).

Desde el aislamiento y descripción de genes implicados en la oxidación de amonio en una arquea mesófila (Könneke *et al.*, 2005), la capacidad de oxidación de amonio por parte de este tipo de organismos se ha encontrado en muchos y diversos tipos de ambientes (You *et al.*, 2009). De hecho, en muchos de ellos, las AOA se han descrito como más abundantes o incluso con mayor tasa de activación que las AOB, sin embargo, aun su contribución real al ciclo del nitrógeno es controvertida (Prosser and Nicol, 2008). En estudios realizados en plantas de tratamiento de agua residual urbana, no es frecuente la detección de AOA (Gómez-Silván, *et al.*, 2010; Mußmann, *et al.*, 2011). Un estudio reciente indica que su aporte al proceso de nitrificación en sistemas de ingeniería es cuestionable (Mußmann *et al.*, 2011).

La **segunda** oxidación se lleva a cabo en un solo paso con un rendimiento energético muy pequeño pero a una velocidad mucho más alta:



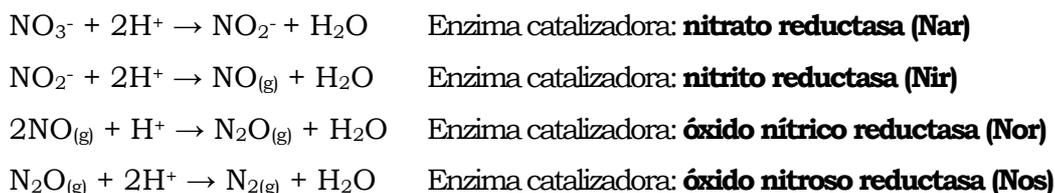
Las bacterias oxidadoras de nitrito (NOB) son organismos quimiolitotróficos diversos filogenéticamente y expandidos en un amplio rango de ecosistemas, tanto terrestres como acuáticos. Se dividen en dos grupos, *Nitrobacter* y organismos relacionados—(*Alphaproteobacterias*) con

aislados cultivables y mejor descritos, y el grupo de *Nitrospira*, peor descrito pero más diverso y abundante en sistemas de tratamiento de aguas residuales (Lücker *et al.*, 2010).

b. Desnitrificación:

Este es un proceso principalmente anaeróbico donde los nitritos y nitratos son reducidos hasta nitrógeno y óxidos de nitrógenos gaseosos, por organismos heterotróficos. También este proceso está muy extendido en la naturaleza y está llevado a cabo por *Proteobacterias* como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* y *Thiobacillus*, y algunas bacterias Gram-positivas como *Bacillus*. Incluso existen algunos eucariotas, algunos hongos y diversos géneros de foraminíferos bentónicos, y arqueas como *Pyrobaculum*, *Haloarcula* y *Haloferax*, capaces de llevarlo a cabo (Kraft *et al.*, 2011).

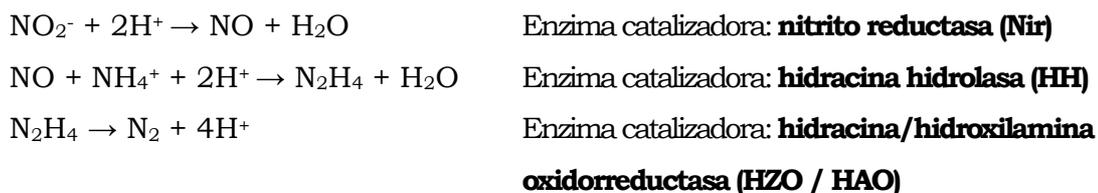
El proceso se produce en diferentes etapas:



La desnitrificación completa puede ser llevada a cabo por un solo microorganismo, o bien por una comunidad de ellos, utilizando las diferentes formas nitrogenadas (Wallenstein *et al.*, 2006).

c. Otras rutas de compuestos nitrogenados:

Existe otra ruta alternativa a la nitrificación-desnitrificación en la que los organismos oxidan anaeróbicamente el amonio (**anammox**):



El proceso de anammox se ha descrito en la mayoría de ecosistemas acuáticos con zonas con baja concentración de oxígeno y se ha mostrado ventajoso sobre otras rutas de utilización de los compuestos nitrogenados en condiciones de anoxia y limitación de sustratos orgánicos. Todos los microorganismos capaces de llevarlo a cabo pertenecen al orden *Planctomycetales* de crecimiento lento como los género *Candidatus Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindua*, *Anammoxoglobus* y *Jettenia* (Kraft *et al.*, 2011).

Sin embargo, estos organismos dependen de la presencia de amonio y nitrato en el medio. Se ha postulado que la fuente de nitrato y nitrito viene dada por la ruta de la nitrificación, llevada a cabo en la interfase óxica/anóxica (Kraft *et al.*, 2011). Una de las fuentes de amonio descritas es la descomposición anaeróbica de la materia orgánica, pero existe otra ruta alternativa como fuente de amonio y nitrito, la **reducción desasimilatoria del nitrato a amonio (DNRA)**.

En la ruta de DNRA el nitrato es reducido a nitrito y parte de éste último se reduce a amonio. Principalmente se ha descrito como un proceso anaeróbico, sin embargo recientemente se ha descrito en condiciones oxigenadas (Morley and Baggs, 2010). Parece ser que esta vía se ve potenciada sobre la desnitrificación cuando la fuente de nitrato es limitante con respecto a la fuente de carbono orgánico, pero aún no se conoce mucho de su regulación ni de los organismos clave que lo llevan a cabo (Kraft *et al.*, 2011). Se ha detectado la enzima NfrA (penta hemo citocromo c nitrito reductasa), responsable de la reducción del nitrito a amonio, en *Gamma*, *Delta* y *Epsilonproteobacterias* y en la membrana de *Bacteroidetes* (Mohan *et al.*, 2004, Smith *et al.*, 2007).

Aún se desconoce mucho de los factores y condiciones que regulan las tasas de activación de unas rutas sobre otras. Parece que el ratio entre los donadores de electrones y el nitrato, el tipo de donadores de electrones disponibles y las condiciones de potencial redox dominantes en el ecosistema son determinantes en dicha regulación (Kraft *et al.*, 2011).

Todas estas vía, más la fijación del nitrógeno atmosférico, la asimilación del amonio hasta proteínas por parte de todos los organismos y el proceso reverso de descomposición hasta amonio (amonificación) cierran el complejo ciclo del nitrógeno (Martinez-Espinosa *et al.*, 2011).

II.II. Formación de espumas: bacterias filamentosas:

Como se ha comentado anteriormente, los problemas de espumas en los sistemas biológicos de WWT están causados por el excesivo crecimiento de bacterias filamentosas. Se ha postulado que las bacterias filamentosas presentan dicha morfología como mecanismo de adaptación a la limitación de nutrientes y que además juegan un papel estructural en los flóculos de los sistemas de WWT (Martins *et al.*, 2004). Pero aún no se conocen las causas físicas y/o químicas que producen el mayor desarrollo de estas comunidades.

El desconocimiento de las bacterias filamentosas se debe principalmente a que tradicionalmente, desde los años 70, se han identificado y clasificado mediante morfotipos. Sin embargo, estos morfotipos no siempre se corresponden con una sola especie y también se han documentado especies que son capaces de variar su morfología en adaptación a cambios en las condiciones ambientales (Seviour *et al.*, 1997). A esta clasificación dudosa, se une el hecho de disponer de pocos representantes cultivables, lo que dificulta el estudio fisiológico y su relación con los parámetros operacionales de los sistemas de depuración, y el hecho de que no exista relación directa entre la morfología filamentosa y la fisiología de la bacteria.

A partir de los años 90 se comenzaron a aplicar las técnicas moleculares en este campo, produciéndose un avance en el conocimiento, permitiendo la correcta identificación de muchas de ellas. Se han identificado siete Phyla bacterianos con representantes filamentosos: *Proteobacterias*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycetes* y el Phylum *Candidatus* TM7. Pero aún existen algunos morfotipos que no se han podido identificar molecularmente.

En los sistemas biológicos de WWT, los grupos bacterianos más habituales son *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Curvibacter* (*Alphaproteobacterias*), TM7 y *Candidatus Microthrix parvicella* (*Actinobacteria*), y bacterias con ácido micólicos, comúnmente denominadas Mycolata (*Actinobacteria*) (Nielsen *et al.*, 2009). El género *Curvibacter* parece estar implicado en la formación de los flóculos del fango. Dentro de los *Bacteroidetes*, los más comunes en lodos activos son *Haliscomenobacter hydrossis* y relacionadas, el género *Cytophaga* y la familia *Flexibacteraceae*, ésta última presente en bajo número. Son muy comunes pero raramente están implicados en problemas de espumas. El phylum *Chloroflexi*, presenta dos clases mayoritarias en este tipo de ecosistemas, *Chloroflexi* y *Anaerolineae*. Normalmente se encuentran en el interior del flóculo, pero en grandes números producen puentes entre diferentes flóculos, promoviendo los problemas de formación de espumas. El género *Candidatus Microthrix* es muy común y es uno de los principales causantes de problemas de espumas a nivel mundial, generalmente en invierno y primavera (Martins *et al.*, 2004, Nielsen *et al.*, 2009).

A pesar de los avances obtenidos, aún se desconoce mucho de la filogenia de este tipo de bacterias y de sus ecofisiologías, por lo que se hace difícil el control de su crecimiento mediante parámetros operacionales de las plantas (Nielsen *et al.*, 2009). Actualmente, para el control de espumas se utilizan métodos no específicos como son cloración, ozonización o aplicación de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, estas metodologías presentan problemas diversos. Ambientalmente, la adición de estos compuestos químicos produce la formación de compuestos halogenados. Desde el punto de vista de la biomasa activa del sistema de depuración, las poblaciones de crecimiento lento, como pueden ser las implicadas en la degradación de compuestos nitrogenados, se ven afectadas y necesitan de más tiempo para recuperarse (Martins *et al.*, 2004).

II.III. Estudio de la comunidad microbiana:

II.III.a. Evaluación de las actividades enzimáticas:

En los WWTs la materia orgánica es eliminada gracias a la acción de una comunidad compleja de organismos heterotróficos (Burgess and Pletschke, 2008). Esta materia orgánica supone de un 40 a un 60% del material en suspensión presente en las aguas residuales y necesita de una ruptura inicial hasta compuestos de menor tamaño para poder ser asimilada por los microorganismos (Goel *et al.*, 1998), siendo éste primer paso clave en la eficiencia del proceso depurador (Burgess and Pletschke, 2008). La comunidad microbiana segrega una serie de enzimas hidrolíticas extracelulares que son las encargadas de esta ruptura inicial. La monitorización de la actividad de las principales enzimas hidrolíticas, como son las fosfatasas, glucosidasas y proteasas (Molina-Muñoz *et al.*, 2010), se ha utilizado para evaluar el proceso de depuración (Macomber *et al.*, 2005) (Capítulo 1, Apdo.1.1).

II.III.b. Caracterización microbiológica: Biología molecular:

Hasta hace un par de décadas, los métodos de estudio de la comunidad bacteriana de los distintos ecosistemas se basaban en técnicas dependientes de cultivo. Sin embargo, hoy en día se conoce que la mayoría de los microorganismos no son cultivables, por lo que estas metodologías no reflejan la diversidad y estructura de las comunidades estudiadas (Erijman *et al.*, 2011).

Desde los años 90 se han venido aplicando las técnicas moleculares al estudio de ecosistemas complejos (Smith and Osborn, 2009). Este tipo de técnicas se basan principalmente en la copia o amplificación de genes de interés utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tras la amplificación de los genes diana de la muestra, existen numerosas técnicas moleculares para el estudio de la diversidad y estructura de la comunidad.

Una de las familias de técnicas más utilizadas son las llamadas “***fingerprinting***” o huella genética. Dentro de esta familia, una de las

metodologías más utilizadas en ecología microbiana es la electroforesis en gel con gradiente de temperatura o desnaturalizante (TGGE/DGGE). Básicamente, estas técnicas permiten obtener un “código de barras” específico de cada muestra, donde cada banda representa una población diferente. Es semicuantitativa, proporcionando una abundancia relativa de cada una de las poblaciones detectadas, en función de la intensidad de cada banda en relación a la intensidad total acumulada de la muestra. Además, las bandas obtenidas en el perfil pueden ser secuenciadas posteriormente, dando información filogenética de las poblaciones presentes. Este tipo de técnicas proporciona la capacidad de monitorizar las comunidades complejas, las variaciones en sus poblaciones a lo largo del tiempo, o en función de diferentes condiciones ambientales y/o experimentales. Sin embargo, no es capaz de proporcionar información sobre la cuantificación absoluta de las poblaciones. A esta desventaja se une el hecho de que tan sólo es capaz de detectar las poblaciones mayoritarias de la comunidad estudiada (más del 1% del total de la población) (Muyzer and Smalla, 1998).

Para **cuantificación** absoluta, la técnica de PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) se ha mostrado como un método robusto, fiable y reproducible. Brevemente, esta técnica es capaz de llevar a cabo el recuento de los genes de interés durante la amplificación de los mismos. Es muy sensible, siendo capaz de detectar una sola copia del gen diana en la muestra analizada. Sin embargo, en muestras ambientales, esta técnica no proporciona información filogenética, por lo que se suele acoplar a otro tipo de técnica que la complemente (Smith and Osborn, 2009).

Con la llegada de la **secuenciación masiva** el concepto de estudio de las comunidades bacterianas ha cambiado por completo. La mayor ventaja de este tipo de técnicas es la capacidad de producir una cantidad enorme de secuencias a partir de una sola muestra y sin necesidad de una inversión económica importante. Esta técnica permite, además, una cuantificación relativa de los grupos detectados. Sin embargo, presenta aún limitaciones en cuanto a la detección de grupos minoritarios dentro de la comunidad.

Como complemento al estudio de las poblaciones bacterianas presentes en la comunidad, acoplando reverso-transcripción (conversión de RNA a cDNA) a las técnicas anteriormente descritas, se obtienen resultados de la expresión de los genes y por tanto de la actividad de cada una de las poblaciones, ayudando a comprender la estructura funcional de dicha comunidad.

III. SITUACIÓN ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN SOBRE MBR:

Actualmente los MBRs constituyen un campo de estudio con un increíble potencial. El hecho de ser una tecnología en crecimiento, junto con el desconocimiento de muchas de sus facetas, genera unas altas posibilidades de investigación.

Uno de los grandes problemas es que la mayoría de la investigación de MBRs en el mundo se lleva a cabo en reactores a escala de laboratorio o pilotos, con bajos tiempos de operación y tratando aguas muy específicas (van Nieuwenhuijzen *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2006). En relación a la escala de la planta de estudio, el problema se presenta a la hora de transferir resultados a plantas más grandes, debido a que las condiciones de operación, hidráulicas e incluso biológicas son o pueden ser diferentes (Judd, 2006). La utilización de tipos muy específicos de agua, sobre todo en casos de agua sintética o agua a la que se le añaden los compuestos a estudiar, ayudan a la comprensión de procesos concretos, pero la transferencia de esos resultados a sistemas tratando agua residual real no es posible, ya que no refleja la enorme cantidad de interacciones existentes. A todo ello se une que habitualmente los procesos se estudian bajo tiempos de operación cortos, lo que pueden llevar a explicaciones simplificadas de las interacciones entre los diferentes factores y el proceso depurador.

El hecho de trabajar con módulos de membranas reales, con volúmenes de agua que permitan un escalado con respecto a la superficie de membrana suministrada, las instalaciones en escala industrial, agua residual urbana real y seguimiento a largo plazo, favorece la aplicación de los resultados obtenidos de forma que resultan útiles en diseño y explotación de instalaciones.

En cuanto al estudio de la comunidad microbiana responsable del proceso depurador, las técnicas de biología molecular han permitido un avance sin precedentes en las últimas décadas. Sin embargo, como se ha mostrado, todas las técnicas presentan diferente aplicabilidad, resolución y limitaciones (Wallenstein *et al.*, 2006). La utilización y acople de los resultados de distintas técnicas conduce a un estudio profundo y completo y permite llegar a conclusiones más afianzadas.

Además, relacionando dichos estudios de actividad y abundancia de las comunidades con las características físico-químicas, variaciones ambientales y/u operacionales del sistema de MBR mediante la utilización de análisis estadísticos uni y multivariantes, se puede llegar a un entendimiento mayor de la funcionalidad en el ecosistema (Milner *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

Con todo lo planteado anteriormente, en este trabajo se estudió a nivel microbiológico el funcionamiento de un sistema de biorreactores de membrana (MBR) a escala real, tratando agua residual urbana procedente de la ciudad de Granada. Dicho sistema fue estudiado durante nueve meses consecutivos, abarcando tres estaciones anuales y el rango anual de temperaturas propias del área (AEMET, 2005).

Para llevar a cabo este estudio nos hemos marcado los siguientes objetivos:

1. Caracterización de las actividades enzimáticas de un sistema MBR aplicado al tratamiento de agua residual urbana: mediante el seguimiento de las principales actividades enzimáticas hidrolíticas y su relación con las variables del sistema.

2. Caracterización de la comunidad microbiana en el fango activo de un sistema MBR aplicado al tratamiento de agua residual urbana:

2.1. Estudio de la abundancia de las poblaciones bacterianas presentes y activas responsables de la eliminación de compuestos nitrogenados del agua residual a tratar, y su relación con las variables del sistema, mediante cuantificación por qPCR.

2.2. Estudio y monitorización de la biodiversidad de las poblaciones bacterianas presentes y activas responsables de la depuración del agua a tratar y su relación con las variables del sistema, mediante la técnica de “*fingerprinting*”, TGGE.

2.3. Estudio en profundidad de la diversidad de las poblaciones bacterianas presentes y activas en relación con las variables del sistema, mediante la técnica de nueva generación, secuenciación masiva en paralelo con MiSeq® System, de Illumina.

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA MBR

El biorreactor de membrana (MBR) experimental utilizado en el presente estudio se encuentra situado en las instalaciones de la estación depuradora de aguas residuales Sur (EDAR Sur) de Granada, dirigida por la compañía EMASAGRA S.A. (Fig. A.1). El MBR fue diseñado y controlado por personal del grupo de investigación “Tecnologías para la Gestión y el Tratamiento del Agua” (TEP-239) del Departamento de Ingeniería Civil de la Universidad de Granada, con el cual se ha trabajado en colaboración para el desarrollo del presente trabajo.



Figura A1. Localización de la EDAR-Sur, Granada. Detalle de la EDAR-Sur y localización del sistema MBR experimental.

A. DESCRIPCIÓN DEL MBR:

El MBR empleado en este estudio (Fig. A.2) es un sistema a escala real, capaz de tratar el agua residual urbana generada por una población de 200-250 habitantes equivalentes. Estas condiciones de trabajo permiten que los resultados obtenidos en el sistema experimental sean válidos, aplicables y extrapolables a plantas de mayor escala, ya que todas las piezas, materiales, sistemas de control, modo de operación y hasta la influencia de las variaciones

de factores no controlables como pueden ser la temperatura o características del influente son idénticos.



Fig. A.2. Vista panorámica del sistema MBR experimental.

El agua empleada para la alimentación del sistema experimental es agua residual urbana real procedente de la ciudad de Granada, tomada directamente tras el pretratamiento en la EDAR-Sur. En el proceso de pretratamiento se lleva a cabo la eliminación de arenas, grasas y residuos sólidos urbanos. Antes de su entrada en el MBR y por recomendaciones del fabricante, este influente se hace pasar por un **tamiz** con un tamaño de malla de 1 mm, previniendo así el deterioro prematuro de las membranas de filtración.

En la figura A.4 se muestra un diagrama del MBR, identificando sus principales componentes, los cuales se describen a continuación. El sistema se compone principalmente de dos biorreactores (BRs) (aireado y anóxico) y un tanque de membranas, funcionando en configuración de pre-desnitrificación. Como se ha comentado en el apartado de introducción general, esta configuración se ha demostrado como una de las alternativas más eficientes para la eliminación de contaminantes (Le-Clech, 2010). Muy resumidamente consiste en la alternancia de fases anóxica-aireada lograda mediante recirculación entre los biorreactores (Capítulo 2, Apdo.2.1.1).

El **biorreactor anóxico** tiene una capacidad total de 10 m³. Dentro del mismo se encuentra instalada una bomba sumergida, la cual lleva a cabo la agitación del lodo activo con dos fines específicos: la mezcla homogénea del fango e influente y el mantenimiento de los flóculos en suspensión, evitando su sedimentación.

Desde el BR anóxico el fango es recirculado hasta el BR aireado por medio de dos mecanismos: o bien mediante la entrada directa a la zona baja por una tubería, o bien mediante un sistema de aspersión situado en la parte superior cuya función es evitar la formación de espumas. Además, también en la parte superior del biorreactor y con el mismo objetivo, se ha instalado un medidor de espumas conectado a una bomba dosificadora de reactivo antiespumante. Este reactivo está compuesto por una mezcla de hidrocarburos ligeros que reducen la tensión superficial y disminuyen la cantidad de espumas presentes en el fango activo (Foamtrol AF 1440E, suministrado por GE Water & Process Technology, Fairfield, USA).

El **biorreactor aireado** cuenta con una capacidad máxima de 25 m³ y tres posibles alturas de la lámina de agua (2,5, 3,75 y 5 m), con **válvulas** manuales en los reboses de cada altura. Además, tiene un rebose de seguridad en la parte superior para evitar derrames de fango. El aire necesario para la oxigenación del lodo activo es introducido en el BR aerobio a través de **difusores** de membrana de burbuja fina. Los difusores se encuentran ubicados en la base del biorreactor para garantizar una mejor transferencia de aire y favorecer la agitación del fango, evitando la sedimentación del mismo.

Alrededor de este biorreactor hay instalado un circuito externo de lodo donde se sitúan **sensores** que controlan en continuo parámetros como el pH, oxígeno disuelto y temperatura del fango. Además, en dicho circuito hay conectada una válvula que permite realizar purgas de lodo programadas manteniendo las condiciones de trabajo fijadas.

Desde la parte superior del BR aireado el fango pasa por rebose a un tanque intermedio de bombeo y de ahí directamente al tanque de membranas. El bombeo del lodo activo se lleva a cabo por la parte inferior del tanque para que su paso a lo largo de las membranas dificulte la fijación de sólidos en su superficie. Es en este paso donde se produce la separación sólido/líquido, lo cual es ayudado mediante una aireación de las membranas para evitar su ensuciamiento.



Fig. A.3. Detalle del tren de membranas con tres módulos.

El **tanque de membranas**, con 2 m³ de volumen, acoge en su interior un tren con tres módulos de membrana de ultrafiltración de fibra hueca (Fig. A.3), con un poro nominal de 0,034 μm y fabricadas con polivinilideno fluoruro (PVDF) (GE Water & Process Technology, Fairfield, USA). En total, presentan una superficie de filtración cercana a los 95 m², filtración que se produce desde fuera hacia dentro, es decir, el fango rodea la membrana y el permeado pasa al interior de la fibra hueca saliendo por las canalizaciones destinadas a tal fin a ambos extremos de la membrana. La succión requerida para la filtración viene dada por una **bomba** reversible conectada a los módulos de membrana. En la base de los módulos, se encuentran instalados dos colectores de aire conectados a una **soplante** encargados de proporcionar la aireación intermitente necesaria para prevenir que el fango activo obture la superficie de las membranas. Además, en este tanque hay instalados **sensores** para la medición de la altura de la lámina de agua en el mismo y la medición en continuo del pH del efluente (permeado).

Tras atravesar la membrana, el permeado producido llega a un pequeño tanque (volumen de 0,2 m³) cuya misión es almacenarlo. Este permeado va a ser utilizado para los contralavados regulares de las membranas, necesarios para evitar el ensuciamiento de las mismas. Los contralavados se llevan a cabo a contracorriente gracias a la misma bomba reversible de filtración. El

agua sobrante sale del tanque por gravedad y mediante una tubería de rebose hacia el lugar de vertido (a la entrada de la EDAR Sur).

El exceso de fango del tanque de membranas vuelve directamente al BR anóxico por gravedad, de forma que se cierra el ciclo dentro de la instalación experimental.

B. MANTENIMIENTO Y CONTROL DEL MBR:

B.1. Mantenimiento de la membranas: limpiezas químicas:

A pesar de la aireación y los ciclos de contralavado, la permeabilidad de las membranas se reduce a medida que aumenta su tiempo de funcionamiento. Por ello es necesario realizar limpiezas químicas de mantenimiento de forma regular. Estas limpiezas consisten en lavar las membranas a contracorriente con soluciones de hipoclorito sódico o de ácido cítrico, añadidas mediante **bombas dosificadoras** (Fig.A.4). Previo a las limpiezas, el tanque de membrana se drena de la biomasa presente en el mismo y se aísla de su conexión a los biorreactores mediante el cierre de una válvula, evitando así el contacto de los compuestos químicos con la biomasa activa.

Las limpiezas con hipoclorito se llevan a cabo inyectando el permeado a contracorriente suplementado con una concentración de 1000-1500 mg/L del químico en periodos de contralavado-paro, de forma que se mantenga la solución en contacto con la membrana un periodo de tiempo antes de incorporar el siguiente contralavado. Dentro de este tipo de limpieza se incluyen a su vez dos variedades según el tanque de membranas esté lleno o vacío de agua limpia. Cuando el tanque está vacío, la limpieza está encaminada a mantener controlada la contaminación microbiana de la cara limpia de la membrana, mientras que la limpieza a tanque lleno está encaminada a reducir el ensuciamiento de la misma en su cara de contacto con los lodos activos. Las limpiezas a tanque vacío se realizan de forma programada semanalmente o cada dos semanas, mientras que las limpiezas a tanque lleno son dependientes del aumento de la presión transmembrana.

En la limpieza ácida, el permeado se suplementa con ácido cítrico hasta obtener una concentración final de 2 g/L en el tanque de membranas. En esta limpieza se busca eliminar las incrustaciones coloidales que se hayan podido producir en la superficie de la membrana, y que se disuelven al disminuir el pH. Tras la inyección de la solución, se mantiene en contacto con las membranas un periodo de tiempo, tras lo cual se drena y se vuelve al funcionamiento cotidiano. Esta limpieza se realiza en paralelo con la de hipoclorito a tanque lleno, dependiendo de la presión transmembrana.

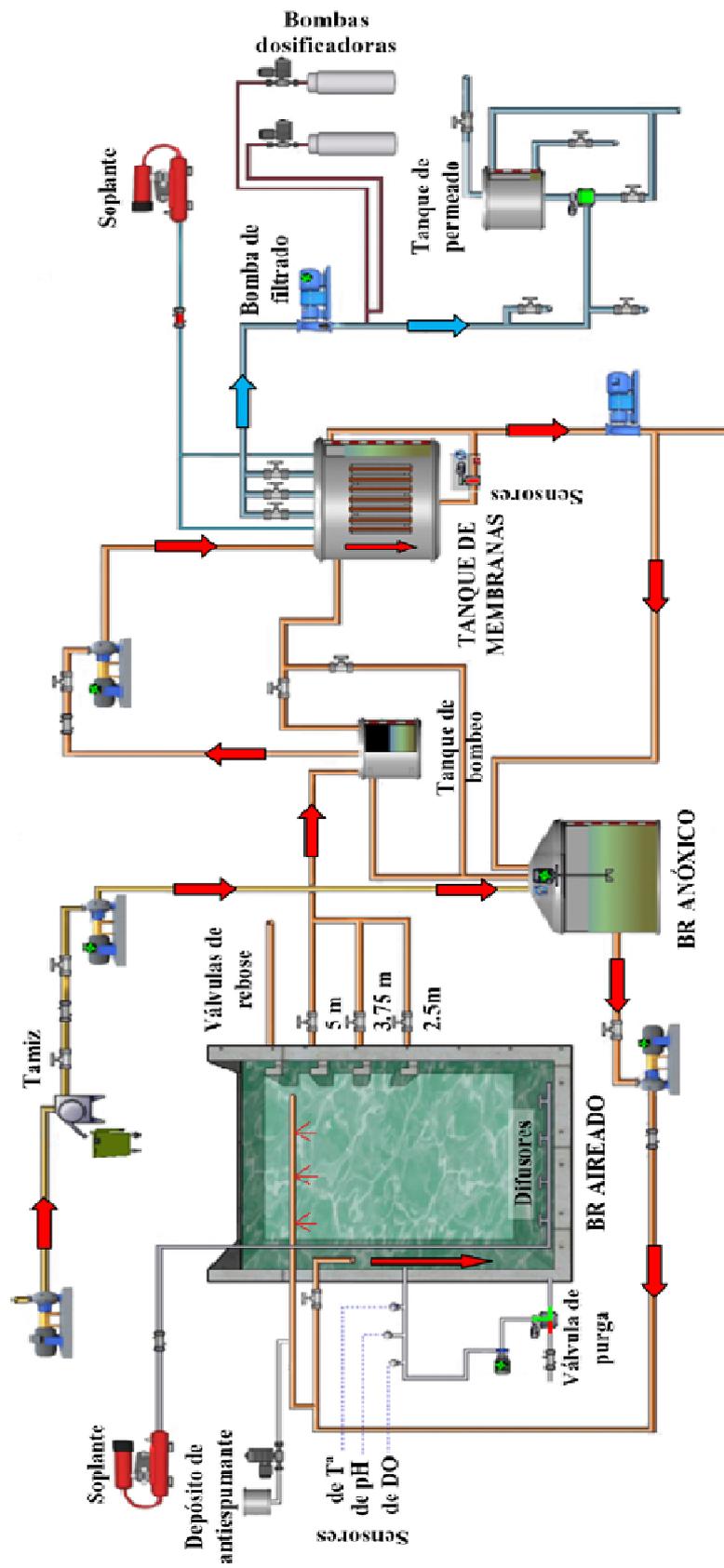


Figura A.4. Diagrama de flujo del sistema de MBR experimental

B.2. Control automático:

Todos los sensores y medidores instalados en el sistema experimental permiten un control en continuo del mismo. Cada uno de ellos obtiene una medición por segundo dando lugar a 86.400 datos por día. Esta enorme cantidad de datos queda almacenada en un gestor de bases de datos, y la programación informática de procedimientos utilizando dichos datos permite el control del funcionamiento del sistema.

El sistema de automatización y control fue instalado por la empresa Wonderware (España). Estos equipamientos van conectados a un PC central desde donde se trabaja, para posibilitar el funcionamiento cotidiano, así como la adquisición y el manejo de datos obtenidos en continuo. El software específico Active Factory v. 9.2 permitió tanto la gestión de los datos como su tratamiento estadístico inicial, facilitando la labor de interpretación.

La total automatización requiere del establecimiento de puntos y lazos de control para asegurar el correcto funcionamiento en todo momento. Por ejemplo, el funcionamiento de las bombas de permeado está programado según tiempos de filtración y contralavados. A su vez presenta un lazo de control con los medidores de presión transmembrana (TMP), así, si esta sube por encima de niveles marcados como de seguridad las bombas de permeado se detienen asegurando la integridad de las membranas.

Como medida de seguridad global, si el sistema detecta algún problema que afecta a su funcionamiento y no se resuelve por propios mecanismos, entra en modo de funcionamiento de “stand-by”. Este modo consiste en parar la filtración, mantener las recirculaciones en marcha y las soplantes en funcionamiento continuo, con el objetivo de proteger los procesos biológicos y las membranas.

C. PARÁMETROS OPERACIONALES DEL MBR:

El biorreactor de membrana sumergida descrito anteriormente ha sido diseñado por el grupo de investigación TEP-239 para llevar a cabo el estudio

del mismo a muy largo plazo. Presenta flexibilidad en la determinación de muchas variables de proceso, con el objetivo de estudiar el efecto de las mismas sobre el proceso depurador y optimizar el funcionamiento del sistema desde el punto de vista técnico e industrial.

Para el desarrollo de la presente tesis, el grupo de investigación de Microbiología Ambiental (RMN-270) de la Universidad de Granada acopló el estudio del sistema desde el punto de vista microbiológico durante un periodo de muestreo de nueve meses (abril-diciembre, 2009). Durante este periodo de muestreo los parámetros operacionales del sistema se mantuvieron estables para el desarrollo de los objetivos presentados y como se describen a continuación.

La puesta en marcha del biorreactor se realizó inoculándolo con fango reflotado procedente de los tanques de sedimentación secundaria de la EDAR-Sur. Este fango fue diluido en el interior del BR aireado con agua residual urbana tomada tras el pretratamiento y filtración por el tamiz de 1 mm, hasta alcanzar aproximadamente una concentración de sólidos en suspensión totales de 4 g/L. Tras 5 días de recirculación entre biorreactores, el sistema comenzó a funcionar regularmente, a excepción de las purgas de fangos que se retrasaron hasta que la biomasa activa en el interior del biorreactor alcanzó el tiempo de retención de sólidos deseado, proceso que llevó aproximadamente un mes.

El tiempo de retención de sólidos (SRT) es un factor de gran importancia e influencia en el funcionamiento de cualquier tipo de instalación de depuración. Este parámetro viene referido al tiempo que los microorganismos responsables de la degradación son retenidos en el interior de los reactores biológicos. El control y fijación de este factor pasa por la fijación del caudal de purga. Durante el periodo de muestreo, el caudal de purga se estableció en 1,4 m³/h y el SRT en 20 días.

Igualmente relevante es el tiempo de retención hidráulica (HRT), que se refiere al tiempo que se mantiene el influente en el interior de los biorreactores. Este factor viene definido por el caudal de purga y el caudal de

permeado producido. En el presente estudio, el HRT establecido fue de 38 horas con un caudal de permeado fijado en $1 \text{ m}^3/\text{h}$, igual al caudal influente.

El siguiente parámetro fijado que a su vez influye en el cálculo de los anteriores es la altura de la lámina de agua en el BR aireado. Este factor influye directamente en la tasa de transferencia de oxígeno y va a determinar los volúmenes operacionales de ambos biorreactores (Arévalo, 2011). El BR aireado se diseñó para poder trabajar a tres alturas diferentes, seleccionándose la altura media (3,75 m) para el presente estudio, resultando en un volumen operacional de $19,4 \text{ m}^3$. La correcta eliminación de contaminantes necesita que el volumen operacional del BR anóxico se mantenga entre un 20 y un 40% del volumen total del sistema, en este caso se ha fijado en torno a un 25%, por lo que su volumen operacional quedó fijado en $6,8 \text{ m}^3$. La concentración de oxígeno disuelto en el interior del BR aireado se mantuvo en un margen de 0,5-1,6 mg/L. Con el objetivo de conseguir una eficiente eliminación de contaminantes orgánicos, compuestos nitrogenados principalmente, se estableció una tasa de recirculación entre biorreactores del 700%, es decir, 7 veces el caudal del influente ($7 \text{ m}^3/\text{h}$).

El funcionamiento del módulo de membranas se fijó en ciclos de filtración de 5 minutos con un caudal de $1 \text{ m}^3/\text{h}$, seguido de un contralavado de 30 segundos con un caudal de $1,5 \text{ m}^3/\text{h}$.

D. SEGUIMIENTO ANALÍTICO DEL FUNCIONAMIENTO DEL MÉR:

El hecho de estar trabajando con un sistema de tratamiento bajo condiciones reales de operación presenta la ventaja de que los resultados obtenidos en el sistema experimental son válidos y aplicables para plantas de mayor escala. Sin embargo, también presenta los inconvenientes propios de plantas reales derivados de los parámetros no controlables, como pueden ser la temperatura del sistema, la carga contaminante presente en el influente o la concentración de biomasa desarrollada en el interior de los biorreactores. Los dos primeros factores afectan directamente al tercero y además presentan grandes variaciones a nivel estacional, diario e incluso a nivel de horarios.

Estas enormes variaciones influyen sobre la eficiencia del proceso de depuración, por lo que se hace indispensable su control y estudio.

En el sistema experimental se instalaron controles en continuo para la medición de algunas de estas variables, como fueron la temperatura y el pH del licor mezcla y el pH del efluente (Apdo.A.).

El control de la carga contaminante del influente, de la eficiencia del tratamiento, así como de la concentración de biomasa alcanzada en los diferentes biorreactores, requirió de una analítica diaria de parámetros físico-químicos. Para ello, se tomaron diariamente tanto muestras puntuales como muestras compuestas del influente y efluente (permeado). En el caso de los biorreactores, se tomaron diariamente muestras puntuales del fango activo de cada uno de ellos. Las muestras compuestas son muestras representativas de las 24 horas del día y se obtuvieron gracias a la programación del sistema informático, el cual controlaba una toma de muestras puntuales cada media hora en un recipiente mantenido a una temperatura de 4°C y en oscuridad, hasta su recogida y procesamiento.

La analítica realizada a cada una de las muestras fue muy amplia y diversa, incluyendo mediciones del color y turbidez, determinaciones químicas de diferentes compuestos y/o procesos, y controles biológicos. Como resultado de todo este procesamiento se obtuvo una gran cantidad de datos que, entre otras cosas, confirmaban el correcto funcionamiento del sistema a lo largo del periodo experimental. Para llevar a cabo los objetivos del presente estudio y basándose en la buena eficiencia del proceso, se han seleccionado aquellos parámetros físico-químicos que potencialmente presentan una influencia directa sobre las comunidades microbianas. A continuación se hace una breve descripción de los parámetros seleccionados y de su metodología experimental.

D.1. Demanda Química de Oxígeno (COD):

La COD de una muestra es la cantidad de oxígeno necesaria para llevar a cabo la oxidación química total de los compuestos orgánicos carbonados presentes en la misma, por lo que representa la cantidad de carbono total.

Se determinó empleando el método de oxidación ácida con dicromato a reflujo cerrado y determinación espectrofotométrica en comparación con patrón de ftalato (APHA, 2005). Para la determinación de la COD disuelta se empleó el mismo método con una filtración previa de la muestra a través de filtros de 0,45 μm .

El análisis de la COD total sólo se pudo realizar para la muestra compuesta del influente, ya que el efluente o permeado ya está filtrado por la misma membrana del sistema. La COD disuelta se realizó tanto para la muestra compuesta del influente como del efluente, expresando los resultados en mg de O_2/L . Para los análisis estadísticos posteriores fue la COD influente disuelta la que se tuvo en cuenta.

D.2. Demanda Biológica de Oxígeno Carbonácea (CBOD₅):

La demanda biológica de oxígeno (BOD₅) de una muestra se refiere a la cantidad de oxígeno que los microorganismos aerobios presentes consumen en 5 días al llevar a cabo la oxidación de los compuestos orgánicos (BOD₅ carbonácea, CBOD₅) e inorgánicos (BOD₅ nitrogenada, NBOD₅) de la muestra.

La NBOD₅ se refiere exclusivamente al oxígeno consumido por microorganismos autótrofos responsables de la nitrificación. La CBOD₅ se refiere tan solo al consumo de oxígeno llevado a cabo por los microorganismos heterotróficos, representando la cantidad de materia orgánica biodegradable en la muestra. Con la finalidad de obtener una medida comparable a la COD, fue la CBOD₅ el parámetro determinado.

Para la determinación de la CBOD₅ se empleó el método manométrico (APHA, 2005), que determina de forma indirecta el consumo de oxígeno en la

muestra, mediante la medida de la caída de presión en un frasco herméticamente cerrado. Como compuesto inhibidor de la nitrificación, a las muestras se les añadió, previamente a su procesamiento, N-alitiourea.

El análisis de la CBOD₅ se llevó a cabo en ambas muestras compuestas, influente y efluente, expresando los resultados en mg de O₂/L. Por simplificación, durante el resto del manuscrito el parámetro de CBOD₅ será referido como BOD₅.

D.3. Sólidos en suspensión:

Para determinar la concentración de sólidos en suspensión se utilizó el método de filtración-secado-pesada (APHA, 2005). El primer paso consiste en una filtración con 0,45 µm de poro para retener y seleccionar las partículas suspendidas de la muestra. Posteriormente se procede a la eliminación del agua retenida introduciendo los filtros en una estufa a 105 °C hasta su total desecación. El peso obtenido por volumen de filtrado (mg/L) son los **sólidos en suspensión totales (TSS)** y representan la concentración de material sólido, orgánico e inorgánico, presente en la muestra. Los filtros utilizados son filtros de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro (MFV1, Filter-Lab, Barcelona, España).

Seguidamente a la determinación de los TSS, los filtros se pasan a un horno mufla (JB 20, Hobersal, Barcelona, España) a 550 °C, de manera que los compuestos orgánicos se volatilizan y la materia inorgánica permanece como materia fija. Al pesarlos, esta medida representa los **sólidos en suspensión fijos (FSS)**, es decir, la concentración de materia inorgánica, y por sustracción de estos datos a los TSS obtenemos la medida de los **sólidos suspendidos volátiles (VSS)**, que representan la concentración de biomasa.

D.4. Nitrógeno total (tN):

Para la determinación del nitrógeno total se procedió a oxidar todas las formas de nitrógeno presentes en las muestras a nitrato (Gomez and Hontoria,

2003). Determinando posteriormente la concentración de este ión por medio de un método colorimétrico.

La oxidación se llevó a cabo mediante una disolución altamente oxidante compuesta por hidróxido sódico (NaOH) 0,35 M, ácido bórico (H_3BO_3) 0,5 M y persulfato potásico ($K_2S_2O_8$) 0,18 M. Tras la oxidación, teniendo ya todas las formas de nitrógeno en forma de nitrato, se procedió al análisis por transformación de nitratos con el DMP (2,6-dimetilfenol) en 4-nitro-2,6-dimetilfenol en medio ácido. Este compuesto tiene un color rosáceo con absorbancia a 340 nm, que se midió en un espectrofotómetro (SPECTRONIC 20D+, ThermoSpectronic, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Una vez obtenida la absorbancia las concentraciones de nitrógeno total se obtienen por medio de extrapolación desde una recta patrón realizada previamente con concentraciones conocidas de NO_3^- .

E. MUESTREO DE LOS BIORREACTORES DEL MBR:

Tras la instalación y puesta en marcha del MBR experimental, se esperó hasta su estabilización antes de comenzar el muestreo necesario para llevar a cabo el presente estudio microbiológico.

El muestreo se realizó a lo largo del año 2009 (Fig. A.5), dividido en tres periodos según estaciones: **primavera** (28 de abril – 29 de mayo), **verano** (22 de junio – 20 de septiembre) y **otoño** (21 de septiembre – 22 diciembre); las cuales englobaron el rango habitual anual de temperatura de la ciudad de Granada (AEMET, 2005). Las muestras se tomaron dos veces por semana y de cada uno de los biorreactores del MBR experimental, resultando en un total de 124 muestras.

Cada muestra se dividió en alícuotas destinadas a los diferentes tipos de análisis, conservando cada una de ellas de manera apropiada y como se describe en cada uno de los apartados correspondientes (Capítulo 1, Apdo.1.2.1; Capítulo 2, Apdo. 2.2.1).

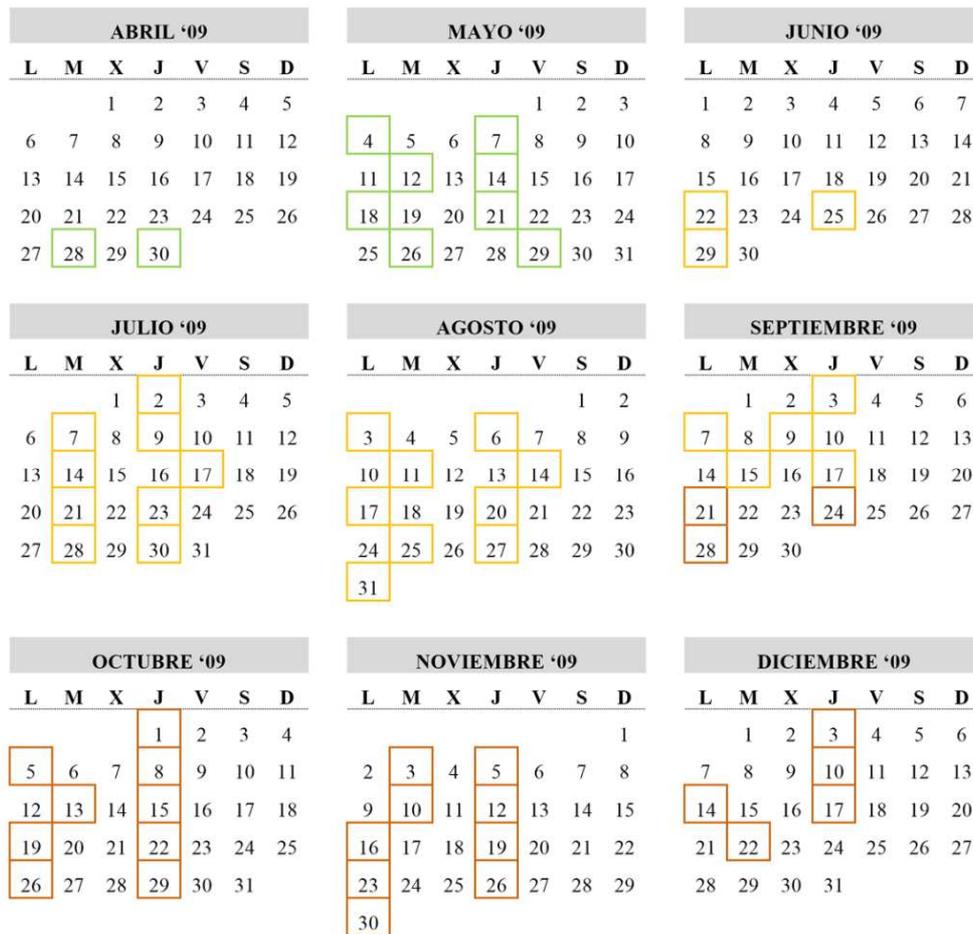


Fig A.5. Calendario de muestreo

F. ESTUDIO ESTADÍSTICO PREVIO DEL MBR

Previo al estudio microbiológico e independientemente del mismo, tanto la eficiencia del proceso depurador como las características fisico-químicas del sistema seleccionadas se han sometido a un estudio estadístico descriptivo. Para ello se ha utilizado el paquete estadístico PASW Statistics 18 (SPSS INC., USA).

Ya que los objetivos del presente estudio están basados en comparativas estacionales, los datos se han dividido según las tres estaciones climáticas que abarcó el periodo de muestreo realizado, es decir, las estaciones de primavera, verano y otoño del año 2009.

En el análisis previo para conocer la distribución de los datos, se observó que la mayoría de los parámetros testados no se ajustaban a la distribución normal, por lo que resto del análisis estadístico se basó en test no paramétricos, concretamente el test de rangos de Wilcoxon para muestras relacionadas. El nivel de significancia se ha establecido en un 90% ($p < 0,10$). Los resultados de dichos análisis se muestran representados en diagramas de cajas (Box-and-Whisker plots).

F.1. Estudio de la eficiencia del proceso:

En la evaluación del proceso de depuración se han considerado el contenido en contaminantes del efluente y el porcentaje de su eliminación (CBOD₅, COD y tN). El porcentaje de eliminación de COD se calculó teniendo en cuenta la COD filtrable del influente y efluente para que fuese comparativo.

En general, el sistema resultó eficiente en la eliminación de la materia orgánica durante todo el periodo de muestreo (Fig.A.6). Los porcentajes de eliminación de BOD₅ y COD se situaron muy por encima de los requerimientos legales (EU, 1991). En cuanto al nitrógeno, la eficiencia de eliminación fue menor, con un tasa media en torno al 70%.

No se ven grandes diferencias netas en los valores medios entre las estaciones, sin embargo sí hay diferencias significativas ($p > 0,1$). El verano se vio caracterizado por una menor entrada de COD y mayor porcentaje de su eliminación, mientras que durante el otoño la entrada de nitrógeno total (tN) fue algo mayor y menor su porcentaje de eliminación, aunque sin diferencias significativas.

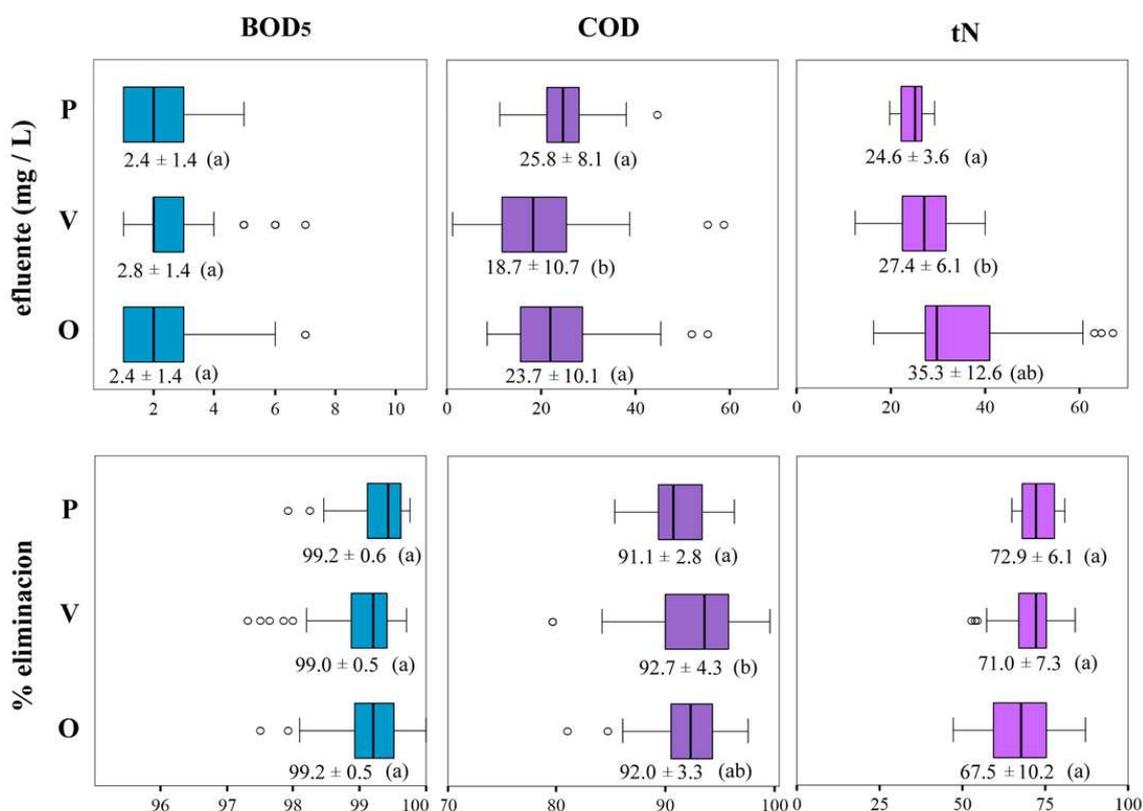


Fig. A.6. Diagrama de cajas (Box-and-Whisker plots) de la carga orgánica en el efluente y el porcentaje de eliminación en el sistema MBR durante la primavera (P), verano (V) y otoño (O) del año 2009. En el gráfico, las cajas recogen el 50% central de los datos (entre los percentiles 25° y 75°), los extremos superiores e inferiores de las barras indican los percentiles 90° y 10°, la línea en el interior de la caja indica la posición de la mediana y los círculos indican valores extremos o atípicos. Bajo las cajas aparece indicada la media ± la desviación estándar en cada caso. Los datos seguidos entre paréntesis por la misma letra no son estadísticamente diferentes, según el test de Wilcoxon ($p < 0,10$).

F.2. Estudio de la variables del sistema MBR:

Las características fisico-químicas seleccionadas son la temperatura media interna del sistema MBR medida en el lodo activo (IT), la BOD₅ del agua influente, la relación carbono-nitrógeno del agua influente (expresada como COD/tN), la concentración de sólidos suspendidos del influente (iTSS, iVSS y iFSS) y la concentración de sólidos suspendidos del fango en los biorreactores aireado y anóxico (TSS, VSS y FSS). Con el objeto de simplificar la representación gráfica, sólo se han reflejado los TSS y VSS tanto para el influente como para ambos biorreactores. El pH del agua influente fue muy estable y cercano a la neutralidad a lo largo de todo el periodo de estudio

(media \pm desviación estándar = $7,4 \pm 0,2$), por lo que no se ha tomado en cuenta como variable.

El estudio estadístico basado en tests no paramétricos para muestras relacionadas mostró diferencias significativas ($p > 0,1$) entre las estaciones para todas las variables consideradas (Fig A.7). La temperatura del fango se mostró mucho más elevada y estable en verano, mientras que los rangos de variación en las otras dos estaciones fueron más amplios y similares entre ellos. La mayoría de las variables que caracterizan la composición del agua influente (la relación C/N y las concentraciones de los sólidos en suspensión) fueron significativamente más elevadas en primavera. La concentración de biomasa presente en ambos biorreactores fue marcadamente más elevada durante el otoño, aunque sus rangos de variación fueron superiores en verano.

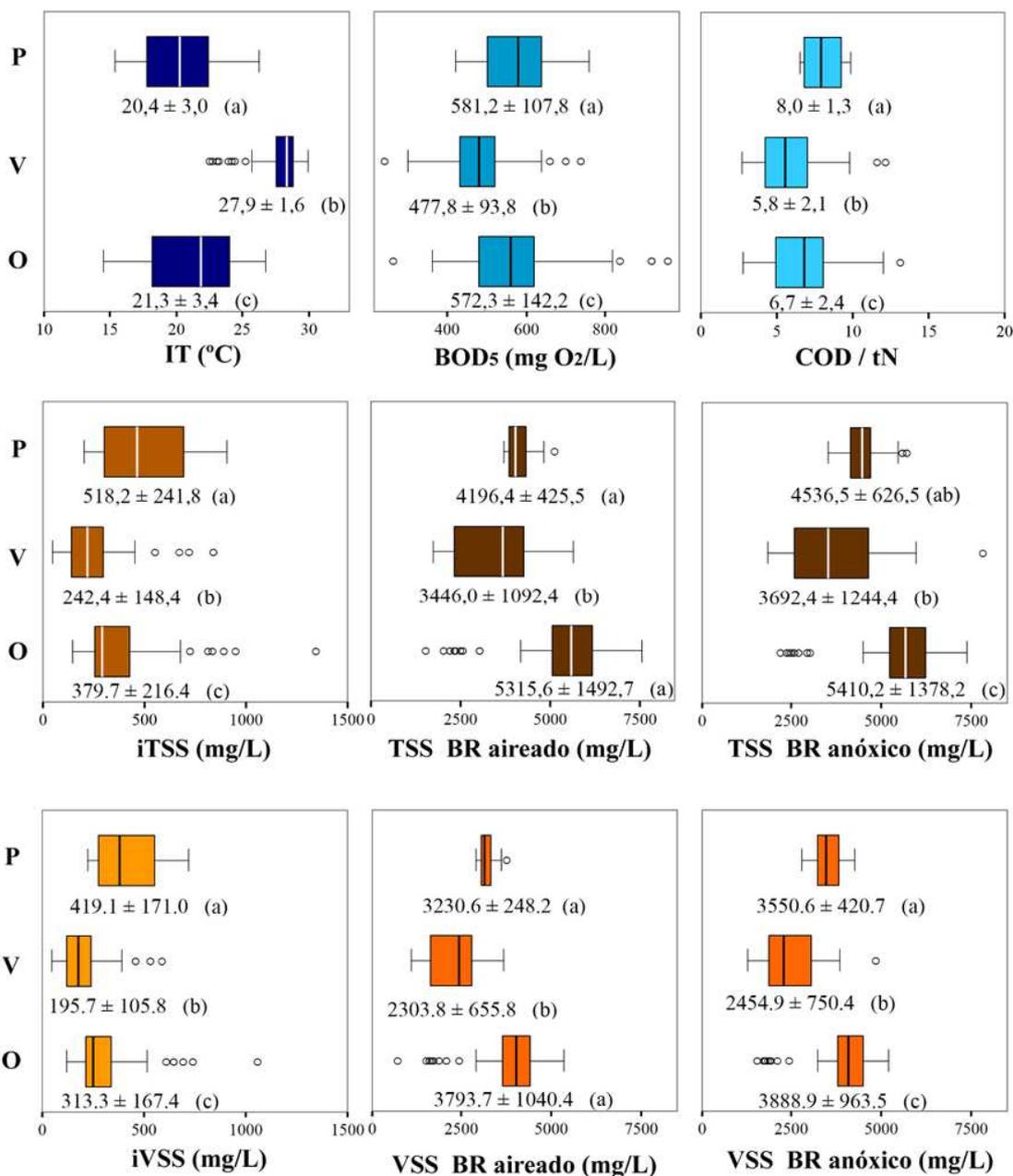


Fig.A.7. Diagrama de cajas (Box-and-Whisker plots) de las variables del sistema MBR durante la primavera (P), verano (V) y otoño (O) del año 2009. En el gráfico, las cajas recogen el 50% central de los datos (entre los percentiles 25° y 75°), los extremos superiores e inferiores de las barras indican los percentiles 90° y 10°, la línea en el interior de la caja indica la posición de la mediana y los círculos indican valores extremos o atípicos. Bajo las cajas aparece indicada la media ± la desviación estándar en cada caso. Los datos seguidos entre paréntesis por la misma letra no son estadísticamente diferentes, según el test Wilcoxon ($p < 0,10$).

Así, analizando cada estación, la primavera se caracteriza por las mayores cargas contaminantes presentes en el agua influente, el verano por la temperatura alta y estable junto con la bajada del resto de parámetros, y el otoño por la subida de la concentración de biomasa en el interior del sistema. De hecho, al analizar la relación nutrientes/biomasa (food/microbial ratio, F/M) (Fig. A.8) se observa que el otoño una relación significativamente menor.

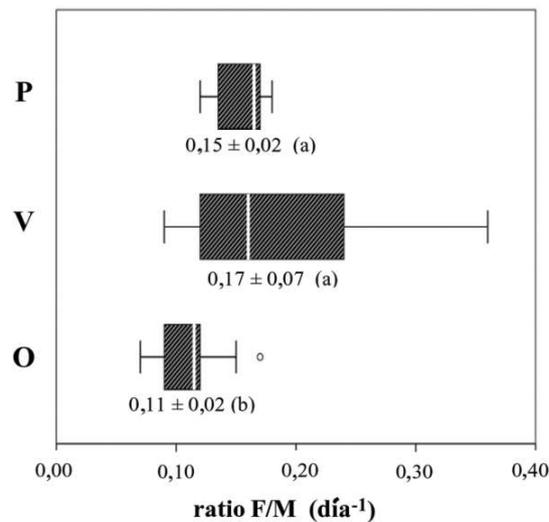


Fig. A.8. Diagrama de cajas (Box-and-Whisker plots) de las relaciones nutrientes/biomasa (F/M) MBR durante la primavera (P), verano (V) y otoño (O) del año 2009. En el gráfico, las cajas recogen el 50% central de los datos (entre los percentiles 25° y 75°), los extremos superiores e inferiores de las barras indican los percentiles 90° y 10°, la línea en el interior de la caja indica la posición de la mediana y los círculos indican valores extremos o atípicos. Bajo las cajas aparece indicada la media \pm la desviación estándar en cada caso. Los datos seguidos entre paréntesis por la misma letra no son estadísticamente diferentes, según el test Wilcoxon ($p < 0,10$). En la parte inferior se muestran las unidades de medida de cada una de las actividades enzimáticas.

CAPÍTULO 1:

RELACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DEL FANGO ACTIVO CON LAS VARIABLES DEL MBR.

Gómez-Silván, C., Arévalo, J., Gómez, M.A. Pérez, J., González-López, J., Rodelas, B.

Linking hydrolytic activity to process variables in a submerged membrane bioreactor (MBR) treating urban wastewater under real operation conditions.

Water Research, en prensa (2012). DOI: 10.1016/j.watres.2012.09.032.

1.1. INTRODUCCIÓN:

En los tratamientos de agua residual (WWTs) basados en procesos biológicos, la eliminación de la materia orgánica depende de la actividad de una compleja comunidad de microorganismos heterotróficos (Burgess and Pletschke, 2008). Esta comunidad lleva a cabo los procesos oxidativos de dicha fracción, utilizando diferentes aceptores terminales de electrones según las condiciones: el oxígeno en condiciones aireadas y el nitrato bajo condiciones anóxicas. De hecho, este último proceso es determinante en la eliminación del nitrógeno contaminante de las aguas mediante nitrificación-desnitrificación (Galvez *et al.*, 2003) (Capítulo 2, Apdo.2.1.1).

La fracción orgánica en las aguas residuales presenta una alta proporción de material particulado (40-60%) el cual requiere una hidrólisis inicial hasta productos de bajo peso molecular antes de su asimilación por los

microorganismos (Goel *et al.*, 1998). La despolimerización de estas moléculas complejas es el primer paso, habitualmente limitante, para que se lleve a cabo la mineralización de la materia orgánica (Burgess and Pletschke, 2008). Las enzimas hidrolíticas extracelulares son las encargadas de esta ruptura inicial y, teniendo en cuenta que los componentes mayoritarios de la fracción orgánica son carbohidratos (25-50%) y proteínas (40-60%) (Bitton, 2010), se considera que las fosfatasas, glucosidasas y proteasas están entre las hidrolasas más relevantes (Molina-Muñoz *et al.*, 2010). El seguimiento de estas actividades enzimáticas da una estimación de la biomasa activa en las plantas de tratamiento de agua residual, e incluso se ha utilizado para la evaluación de la cinética del proceso depurador (Macomber *et al.*, 2005).

El control de la eficiencia de los procesos ocurridos en WWTs pasa por identificar las variables que regulan la actividad hidrolítica microbiana (Nybroe *et al.*, 1992). La actividad de estas enzimas está controlada por diversos mecanismos microbianos, los cuales actúan en respuesta a cambios en las variables que influyen los sistemas de WWTs, como son la disponibilidad de nutrientes, las condiciones de aceptor de electrones, el pH o la temperatura (Boczar *et al.*, 1992, Burgess and Pletschke, 2008, Nybroe *et al.*, 1992). Además, las características inherentes del tipo de tecnología seleccionada para el tratamiento y los parámetros operacionales, como el tiempo de retención hidráulica (HRT) o el tiempo de retención de sólidos (SRT), también afectan a la eficiencia y respuesta de las actividades microbianas hidrolíticas (Morgenroth *et al.*, 2002).

Existen trabajos previos centrados en desvelar cuáles son los factores que influyen directamente las actividades enzimáticas en los sistemas de MBRs, como son la temperatura estacional, la concentración de biomasa en el fango activo y la limitación de nutrientes (Chen and LaPara, 2006, LaPara *et al.*, 2006, Molina-Muñoz *et al.*, 2010, Molina-Muñoz *et al.*, 2007). Estos estudios se han realizado en su mayoría en plantas alimentadas con agua residual artificial o en plantas a escala piloto investigadas durante cortos periodos de tiempo, mientras que los seguimientos y muestreos a largo plazo y en plantas a escala real son escasos. Además, aunque en estudios realizados en entornos naturales como suelos, sedimentos, ríos y otros sistemas

acuáticos es habitual el uso de análisis multivariantes con el objetivo de relacionar las tasas de actividad enzimática con las fluctuaciones de las variables que afectan al ecosistema (Boerner *et al.*, 2005, Frossard *et al.*, 2012, Hoostal *et al.*, 2008, Sinsabaugh *et al.*, 2008), su aplicación en el caso de estudios sobre la biología de sistemas de ingeniería es bastante escaso (Calderón *et al.*, 2012a).

En el presente trabajo se han estudiado las principales actividades hidrolíticas microbianas en la comunidad del MBR y su adaptación a los cambios de las variables que afectan al sistema, durante un periodo largo de muestreo. Con este objetivo, se estudió la evolución de las actividades enzimáticas fosfatasa ácida y básica, α -glucosidasa y proteasa en ambos biorreactores (aireado y anóxico) del MBR experimental, durante la primavera, verano y otoño del año 2009. Para evaluar la influencia de los cambios de la temperatura, carga contaminante del influente y concentración de biomasa en los biorreactores a lo largo del periodo de muestreo, se han utilizado análisis estadísticos multivariantes (MDS y BIO-ENV).

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS:

1.2.1. Muestreo para la determinación de actividades enzimáticas:

La determinación de actividades enzimáticas del lodo activo del MBR experimental comenzó cuando el sistema alcanzó condiciones estables, siguiendo el calendario mostrado en la figura A.5. El muestreo se realizó dos veces por semana de cada uno de los biorreactores del MBR experimental, resultando en un total de 124 muestras. Para cada una de ellas se tomaron 200 ml de fango activo en un recipiente estéril de plástico y se mantuvieron a 4°C desde el momento de su toma y durante todo el transporte hasta el laboratorio, donde se procesaron inmediatamente.

1.2.2. Determinaciones de actividad enzimática:

Las mediciones de las actividades enzimáticas (fosfatasa ácida y básica, α -glucosidasa y proteasa) fueron realizadas por triplicado para cada una de las 128 muestras de fango activo, mediante la metodología previamente descrita por Molina-Muñoz *et al.*, (2010) y como a continuación se resume.

Los sustratos y productos utilizados fueron suministrados por Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), los tampones por AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany), las mediciones colorimétricas se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi U-2900 (Hitachi High Technologies Europe, Krefeld, Germany) y las centrifugaciones en las centrífuga Kokusan 4103N (Kokusan Corporation, Tokio, Japón) y MiniSpin Plus (Eppendorf, Hamburg, Germany). En todas las determinaciones se utilizó como control negativo fango activo autoclavado a 0,5 atm durante 30 minutos.

1.2.2.1. Actividades fosfatasas:

Las enzimas fosfatasas son las encargadas de hidrolizar ésteres de fosfato liberando los grupos fosfato al medio. Ambos tipos de fosfatasas (ácida y básica o alcalina) no sólo se diferencian por su pH óptimo sino por su afinidad preferente a determinados sustratos.

La determinación de ambas actividades fosfatasas se basa en la hidrólisis del compuesto incoloro *p*-nitrofenil-fosfato al compuesto coloreado *p*-nitrofenol, el cual presenta una absorbancia a $\lambda = 410$ nm. La única diferencia entre ambas determinaciones es el tampón utilizado en cada caso, así la actividad fosfatasa ácida se determinó utilizando un tampón acetato-acético 0,1 M a pH 4,8 mientras que para la fosfatasa básica se utilizó un tampón carbonato-bicarbonato 0,1 M a pH 9,6.

Experimentalmente, se tomó 1 ml de fango activo al que se le añadió 2 ml del tampón correspondiente en cada caso y 1 ml de sustrato (*p*-nitrofenil-fosfato al 1% en agua destilada). La mezcla se llevó a incubar a 37 °C en oscuridad durante 30 minutos. Tras la incubación, la reacción se paró añadiendo 2 ml de hidróxido sódico (NaOH) 0,2 M y se centrifugó hasta

separar las fases sólida y líquida. En el sobrenadante se midió el desarrollo del color empleando un espectrofotómetro y los resultados se expresaron en mM de *p*-nitrofenol/min/gVSS. Previamente a la determinación experimental se realizaron las correspondientes rectas patrón con concentraciones conocidas de *p*-nitrofenol.

1.2.2.2. Actividad α -glucosidasa:

Las enzimas α -glucosidasas son las encargadas de hidrolizar los disacáridos procedentes de la degradación de polisacáridos, en concreto la maltosa y sacarosa.

La determinación de esta actividad enzimática se basa en la hidrólisis del compuesto incoloro *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido al compuesto coloreado *p*-nitrofenol, con absorbancia a $\lambda = 410$ nm. En este caso, el tampón utilizado fue Tris-clorhídrico 0,2 M a pH 7,6.

Experimentalmente, el proceso seguido fue igual al descrito anteriormente en el apartado 3.2.4.1 para las actividades fosfatasa con sólo dos variaciones: el tiempo de incubación para la α -glucosidasa se extendió a 1 hora y la reacción se paró mediante incubación de las muestras a 100°C durante 5 minutos.

1.2.2.3. Actividad proteasa:

Las proteasas son enzimas encargadas de romper los enlaces peptídicos de las proteínas dando lugar a péptidos de diferente tamaño.

La determinación de la actividad proteasa se basó en el incremento del color a lo largo del tiempo por hidrólisis del producto utilizado como sustrato, la azocaseína. El producto de dicha hidrólisis presenta absorbancia a $\lambda = 340$ nm.

Experimentalmente, se tomaron 25 ml de fango activo al que se le añadieron 25 ml de azocaseína al 0,2 % en tampón fosfato 10 mM a pH 7,6,

incubándose a temperatura ambiente. A tiempos regulares de 10 minutos, se llevaron alícuotas de 500 µl sobre 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % en agua destilada para parar la reacción. Posteriormente, se centrifugaron para la separación sólido-líquido y en el sobrenadante se midió la evolución del color.

En el caso de la actividad proteasa, no se requirió la preparación de recta patrón, expresando los resultados en Δ Absorbancia/min/gVSS.

1.2.3. Análisis estadístico:

El análisis preliminar de la distribución de los datos de las actividades enzimáticas y los análisis de varianza de los mismos se han realizado con el paquete estadístico PASW Statistics 18 (SPSS INC., USA). Debido a que la mayoría de los datos no se ajustaron a la distribución normal, el resto del análisis estadístico se basó en un test no paramétrico (test de Wilcoxon para muestras relacionadas). El nivel de significancia se ha establecido en un 90% ($p < 0,10$). Los resultados de dichos análisis se muestran representados por diagramas de cajas (Box-and-Whisker plots).

Los patrones de distribución de las actividades enzimáticas a lo largo de las tres estaciones del año se estudiaron utilizando el escalado multidimensional no métrico (MDS) realizado con el software Primer (PRIMER-E, vs. 6.0, Plymouth, USA). Para ello, el set de datos biológicos (actividades enzimáticas) se estandarizó y posteriormente se creó una matriz de similitudes entre muestras basada en la distancia Euclídea, a partir de la cual se generó la ordenación biológica en dos dimensiones (MDS). En los gráficos en los que se muestran burbujas, el tamaño de las mismas es proporcional a la medida de la actividad enzimática representada.

Con el objetivo de estudiar la influencia de las variables del sistema sobre los patrones de actividad enzimática, el set de datos ambientales (variables del sistema) pasó por tres niveles de análisis:

- Análisis de Draftsman's Plot: indica las variables que se encuentran correlacionadas entre sí. Aquellas variables que presentaron

una correlación por encima del 0,90 fueron agrupadas y sólo una de ellas se seleccionó como representante del grupo. Esta selección se realizó mediante un análisis BIO-ENV preliminar incluyendo todas las variables, tomando como representante del grupo aquella variable que independientemente presentó el mayor valor.

- Correlación entre las variables y la ordenación de las actividades enzimáticas: estas correlaciones aparecen representadas en los gráficos como vectores. Se ha utilizado un coeficiente de correlación no paramétrico, la correlación de rangos de Spearman (ρ_s). Cada vector indica la influencia direccional y el papel que juega la variable representada en la explicación de la ordenación de las muestras biológicas. Cuanto más corto es un vector, menor es la correlación de la variable correspondiente con la ordenación. Las variables que generaron vectores con una longitud $< 0,100$ no se muestran en los gráficos, y no se tienen en cuenta en los subsiguientes análisis.

- Análisis BIO-ENV: calcula la correlación que existe entre la matriz de similitudes del set de datos biológicos (actividades enzimáticas) y las matrices de similitudes derivadas de la combinación secuencial de las variables del sistema. El mayor coeficiente obtenido a partir de todas las combinaciones posibles de variables (Best) indica el conjunto de las mismas que mejor explica el patrón adquirido por las muestras en la ordenación biológica (Clarke and Ainsworth, 1993). Al igual que en el nivel de análisis anterior, el coeficiente de correlación empleado ha sido el coeficiente de rangos de Spearman (ρ_s). Para determinar la fiabilidad del análisis de BIO-ENV se realizó un test de permutación global (499 permutaciones) (Clarke *et al.*, 2008).

Previamente, el set de datos ambientales (variables del sistema) se transformó a $\log(x + 1)$ y normalizó para evitar interferencias en el posterior análisis debidas, entre otras, a la diferencias de unidades de medida.

De las variables del sistema descritas en el apartado 1.4, en este capítulo fueron consideradas la IT, BOD₅, relación C/N expresada como COD/tN, la

concentración de sólidos en suspensión en el influente (iTSS, iFSS y iVSS) y la concentración de sólidos en suspensión en ambos biorreactores, aireado y anóxico (TSS, FSS y VSS).

1.3. RESULTADOS:

1.3.1. Variaciones estacionales de las actividades enzimáticas en el MBR:

Antes del estudio estadístico multivariante, se realizaron dos análisis de varianza para ver si existían diferencias significativas entre los niveles de las actividades enzimáticas dependiendo de la estación del año muestreada o del biorreactor muestreado (aireado o anóxico).

El análisis de Wilcoxon reveló que no existían diferencias significativas ($p < 0,10$) en las actividades enzimáticas entre los **biorreactores** (datos no mostrados), sin embargo, sí se encontraron diferencias según la **estación** muestreada (Fig 1.1). Se registraron importantes fluctuaciones en todas las actividades enzimáticas analizadas, especialmente durante la primavera,

denotadas por la mayor longitud de las cajas. La mayor variación entre estaciones se detectó para la actividad α -glucosidasa, mostrando valores significativamente más altos durante esta misma estación.

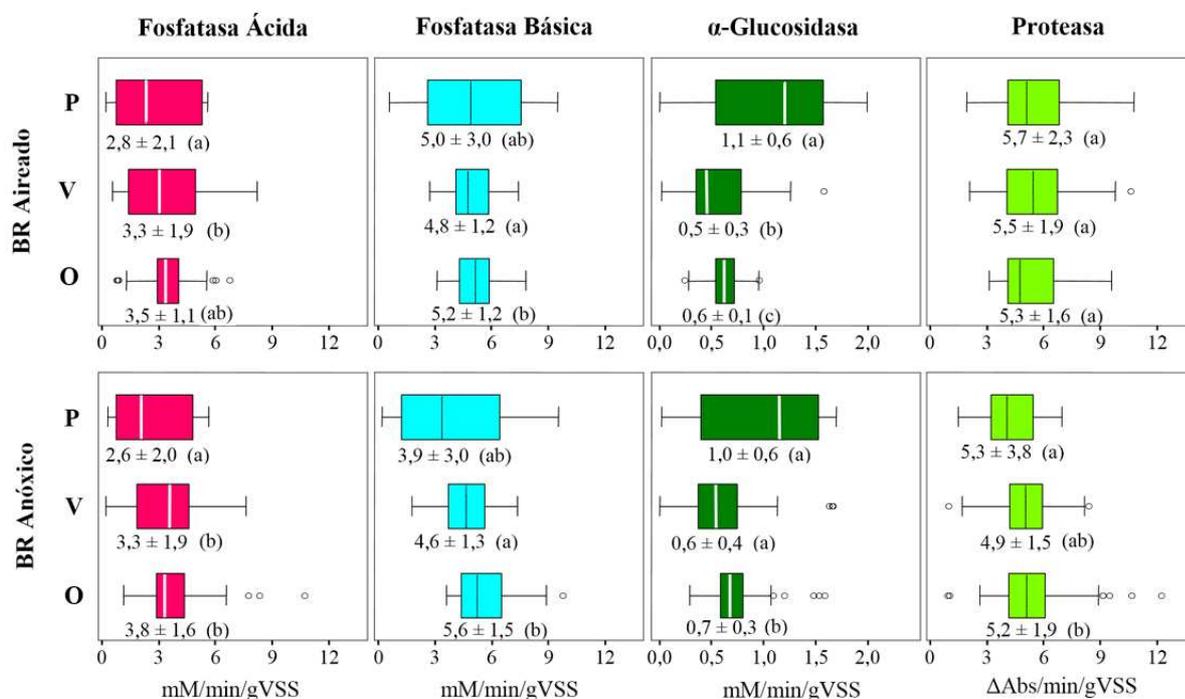


Fig. 1.1. Diagrama de cajas (Box-and-Whisker plots) de las actividades enzimáticas fosfatasa ácida, fosfatasa básica, α -glucosidasa y proteasa en ambos biorreactores (aireado y anóxico) del MBR durante la primavera (P), verano (V) y otoño (O) del año 2009. En el gráfico, las cajas recogen el 50% central de los datos (entre los percentiles 25° y 75°), los extremos superiores e inferiores de las barras indican los percentiles 90° y 10°, la línea en el interior de la caja indica la posición de la mediana y los círculos indican valores extremos o atípicos. Bajo las cajas aparece indicada la media \pm la desviación estándar en cada caso. Los datos seguidos entre paréntesis por la misma letra no son estadísticamente diferentes, según el test Wilcoxon ($p < 0,10$). En la parte inferior se muestran las unidades de medida de cada una de las actividades enzimáticas.

1.3.2. Análisis multivariante de las actividades enzimáticas (MDS) y su relación con las variables del MBR (BIO-ENV):

La figura 1.2 representa los escalados multidimensionales no métricos (MDS) de las muestras de lodo activo en cada uno de los biorreactores (aireado y anóxico) y cada una de las estaciones muestreadas (primavera, verano y otoño). Cada MDS refleja la distribución de las muestras de acuerdo con la

similitud existente entre sus cuatro perfiles de actividad enzimática. Cada vector indica la dirección y la fuerza con la que la actividad enzimática representada se incrementa a lo largo de las muestras. En todos los casos, el vector representante de la actividad proteasa apunta en dirección opuesta al resto de actividades, siendo la α -glucosidasa la que presenta la correlación negativa más clara. El nivel de estrés representado en cada MDS indica lo bien que encajan los datos de actividades enzimáticas en la ordenación en dos dimensiones, considerándose valores por debajo de 0,05 como una excelente representación de su distribución (Clarke and Warwick, 2001).

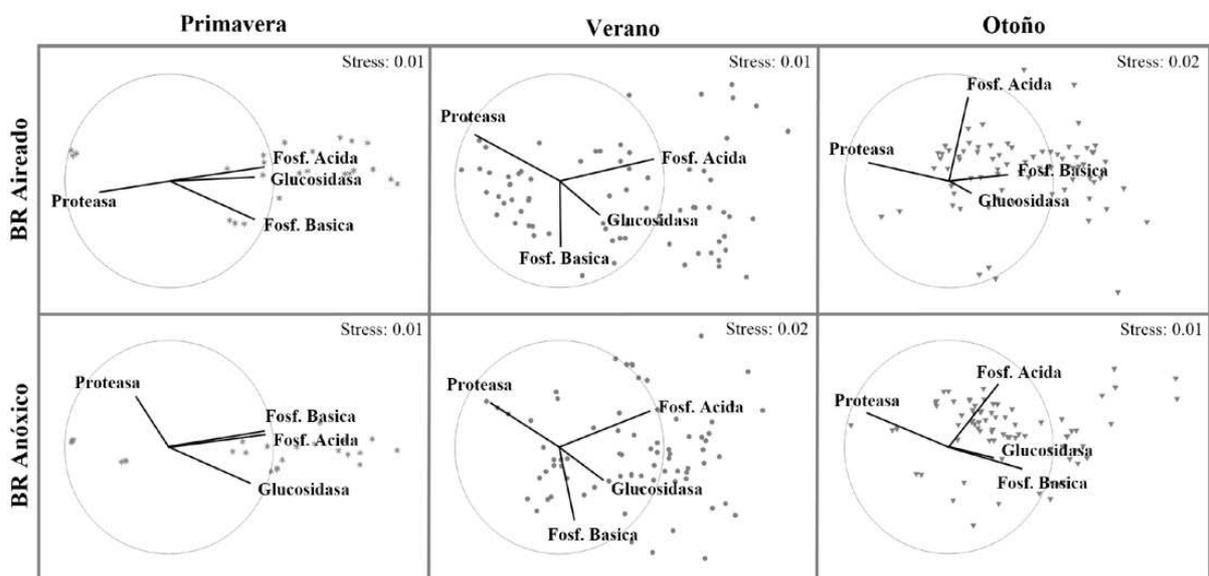


Fig. 1.2. Escalado multidimensional no métrico (MDS) mostrando la distribución de las muestras de lodo de ambos biorreactores (aireado y anóxico) del MBR durante la primavera, verano y otoño del año 2009, según la similitud de sus perfiles de actividades enzimáticas (fosfatasa ácida y básica, α -glucosidasa y proteasa). Los vectores representan la dirección y el incremento a través de las muestras de la actividad representada. El bajo nivel de estrés (estrés < 0,05) representa lo bien que encaja la ordenación de las actividades enzimáticas en dos dimensiones.

Las figuras 1.3 y 1.4 ilustran de nuevo los mismos MDS por estaciones y biorreactores, pero sobre cada una de las muestras se han superpuesto burbujas de tamaño proporcional al valor de la actividad enzimática representada en cada caso. Por claridad, ambas actividades fosfatasas se muestran en la columna de la izquierda (I) mientras que las actividades α -glucosidasa y proteasa se muestran en la columna de la derecha (II). En este

caso, los vectores representan la correlación entre las variables del sistema y la ordenación biológica, como se ha descrito previamente en el apartado 1.2.3 de “Materiales y Métodos”. Las variables marcadas con el asterisco (*) indican la combinación de las mismas que mejor explica el patrón adquirido por las muestras según el análisis BIO-ENV (Best).

En primavera, el análisis de Draftsman’s plot detectó dos grupos de variables muy correlacionadas ($r > 0,90$) en cada uno de los biorreactores. En el BR aireado las variables agrupadas fueron $iVSS/ iTSS/ IT$ y $VSS/ TSS/ FSS$, siendo seleccionadas como representantes de cada grupo la IT y los FSS mediante un análisis BIO-ENV preliminar. En el BR anóxico los grupos fueron $iVSS/ iTSS/ TSS/ IT$ y $iFSS/ FSS$, seleccionándose en este caso la IT y los $iFSS$. De acuerdo con el mejor resultado de BIO-ENV (Best) los $iFSS$ es la variable que mejor explica el patrón de distribución de las actividades enzimáticas en ambos biorreactores, con valores de $\rho_s = 0,469$ para el BR aireado y $\rho_s = 0,604$ para el BR anóxico (Fig. 1.3 y 1.4). Los vectores representativos de las variables muestran una correlación positiva con todas las actividades hidrolíticas excepto la proteasa, con tendencia claramente opuesta. En general se observa que las correlaciones son mayores en el BR aireado en comparación con el BR anóxico.

Cuando se analizaron las variables registradas durante la estación de verano mediante Draftsman’s plot, se detectaron correlaciones superiores a 0,90 entre $iTSS/ iVSS$ y $TSS/ FSS/ VSS$ en ambos biorreactores. El análisis preliminar con BIO-ENV seleccionó como variables representativas a los $iTSS$ y TSS en el BR aireado, e $iVSS$ y VSS en el anóxico. El análisis de correlación de Spearman mostró una escasa influencia de la IT en ambos biorreactores (longitud de vector $< 0,100$), por lo que esta variable no se refleja en las gráficas. La combinación de los sólidos en suspensión totales del influente y del biorreactor ($iTSS$ y TSS) dio la mejor explicación de la distribución de las hidrolasas en el BR aireado ($\rho_s = 0,330$) (Fig. 1.3). En el BR anóxico se obtuvo una menor explicación del patrón de muestras mediante las variables incluidas en el estudio. El mejor resultado para el análisis de BIO-ENV (Best) ($\rho_s = 0,235$) se obtuvo con la combinación de la relación C/N y los VSS (Fig. 3.4). De acuerdo con el mismo análisis, la BOD_5 presenta una escasa

contribución a la explicación de la ordenación biológica en ambos biorreactores ($\rho_s < 0,02$).

Durante el otoño, el análisis con Draftsman's plot detectó una correlación superior al 0,90 para iTSS/ iVSS y TSS/ VSS en ambos biorreactores. El análisis preliminar de BIO-ENV seleccionó los iVSS y VSS como variables representativas de estos grupos en el BR aireado, y los iTSS y TSS en el anóxico. El análisis de correlación de Spearman mostró una baja influencia de la relación C/N en el BR aireado (longitud de vector $< 0,100$). El análisis de BIO-ENV identificó la IT in el BR aireado y la combinación de la IT y la relación C/N en el BR anóxico como las variables más explicativas de la distribución de la hidrolasas ($\rho_s = 0,455$ y $\rho_s = 0,476$ respectivamente). Merece la pena resaltar que en el BR anóxico, la variable IT por sí misma ya da una alto valor de ρ_s (0,449), indicando una importante influencia de las variaciones de la temperatura sobre las actividades enzimáticas en esta estación (Fig. 1.3 y 1.4).

La fosfatasa básica y la α -glucosidasa estuvieron correlacionadas negativamente con la IT ($r < -0,77$ en el BR aireado; $r < -0,78$ en el BR anóxico), mientras que la proteasa mostró una alta correlación positiva con la misma variable ($r = 0,93$ en el BR aireado; $r = 0,86$ en el BR anóxico). En el BR anóxico, las fosfatasas y la α -glucosidasa estuvieron correlacionadas positivamente con la relación C/N ($r = 0,42, 0,99, 1,0$, respectivamente), mientras que la proteasa siguió tendencias opuestas ($r = -0,99$). En relación al resto de variables, la fosfatasa básica y la α -glucosidasa siempre mostraron tendencias opuestas a la BOD₅ ($r < -0,79$ en el BR aireado; $r < -0,85$ en el BR anóxico) y la concentración de sólidos en el agua influente ($r < -0,82$ en el BR aireado; $r < -0,88$ en el BR anóxico). Por el contrario, la actividad proteasa mostró una alta correlación con estas variables en ambos biorreactores (BOD₅, $r = 0,93$; iFSS/ iTSS/ iVSS, $r > 0,94$). En general, ambas fosfatasas y la α -glucosidasa correlacionaron positivamente con las concentraciones de sólidos en suspensión en el lodo de ambos biorreactores, mientras que la proteasa mostró siempre una tendencia opuesta.

BR ANÓXICO

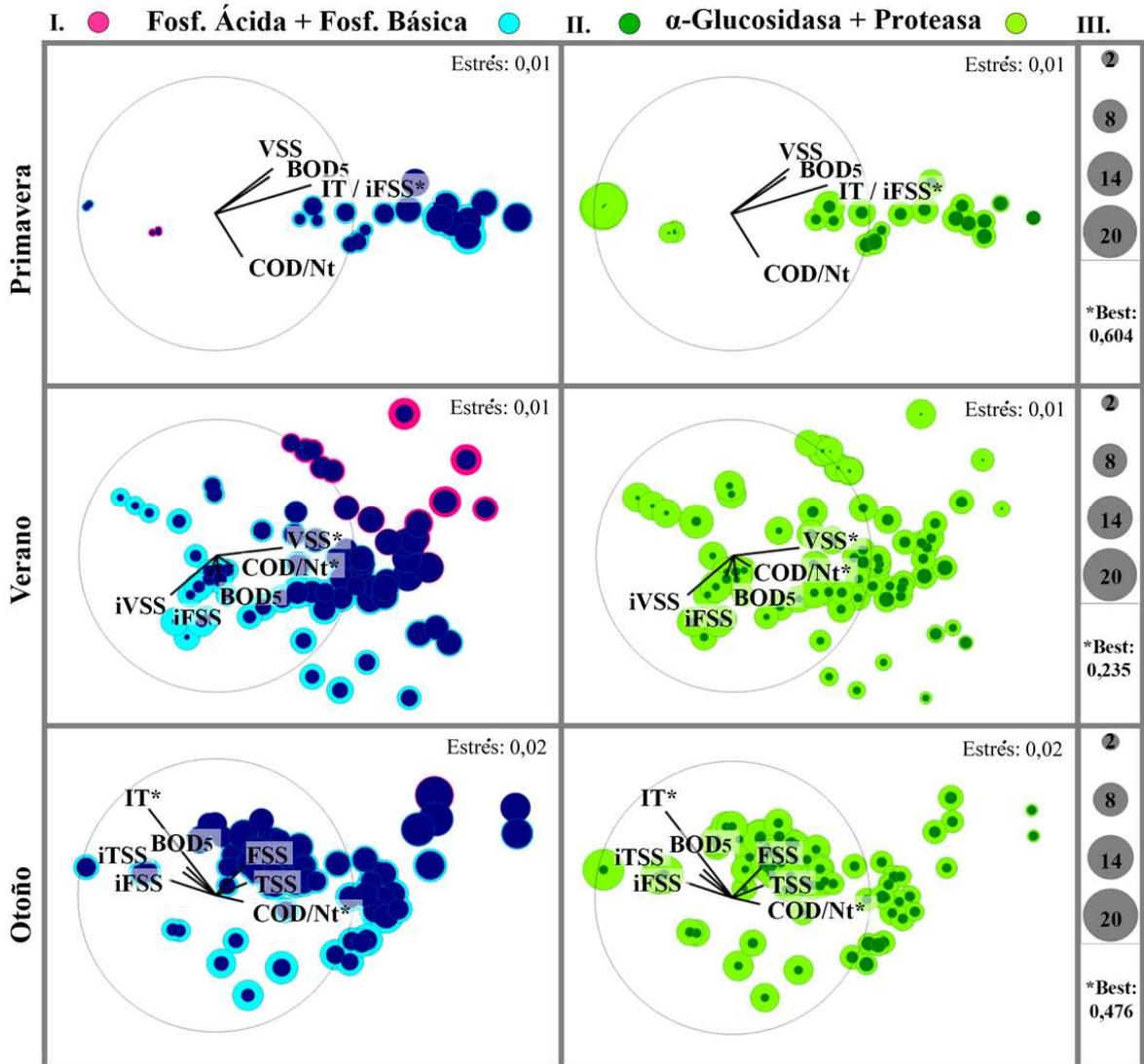


Fig. 1.3. Escalado multidimensional no métrico (MDS) de la distribución de las muestras de lodo del biorreactor aireado del MBR durante la primavera, verano y otoño del año 2009, según la similitud de sus perfiles de actividades enzimáticas (fosfatasa ácida y básica, α -glucosidasa y proteasa). El bajo nivel de estrés (estrés < 0,05) indica que la ordenación de las actividades enzimáticas tiene una buena representación. El tamaño de las burbujas es proporcional al valor de la actividad enzimática representada, expresada en mM p-nitrofenol/min/gVSS para las fosfatasas y α -glucosidasa y Δ AbS/min/gVSS para la proteasa. La escala de las burbujas se muestra en la columna III. Las actividades de las fosfatasas aparecen representadas en la columna I y las de α -glucosidasa y proteasa en la columna II. Los vectores muestran la dirección y fuerza con la que cada variable explica la distribución de las muestras. Los vectores poco explicativos (longitud < 0,100) no se muestran en los gráficos. Las variables que, según el análisis de BIO-ENV, mejor explican la ordenación biológica aparecen marcados con un asterisco (*) y su valor aparece en la columna III (Best).

BR ANÓXICO

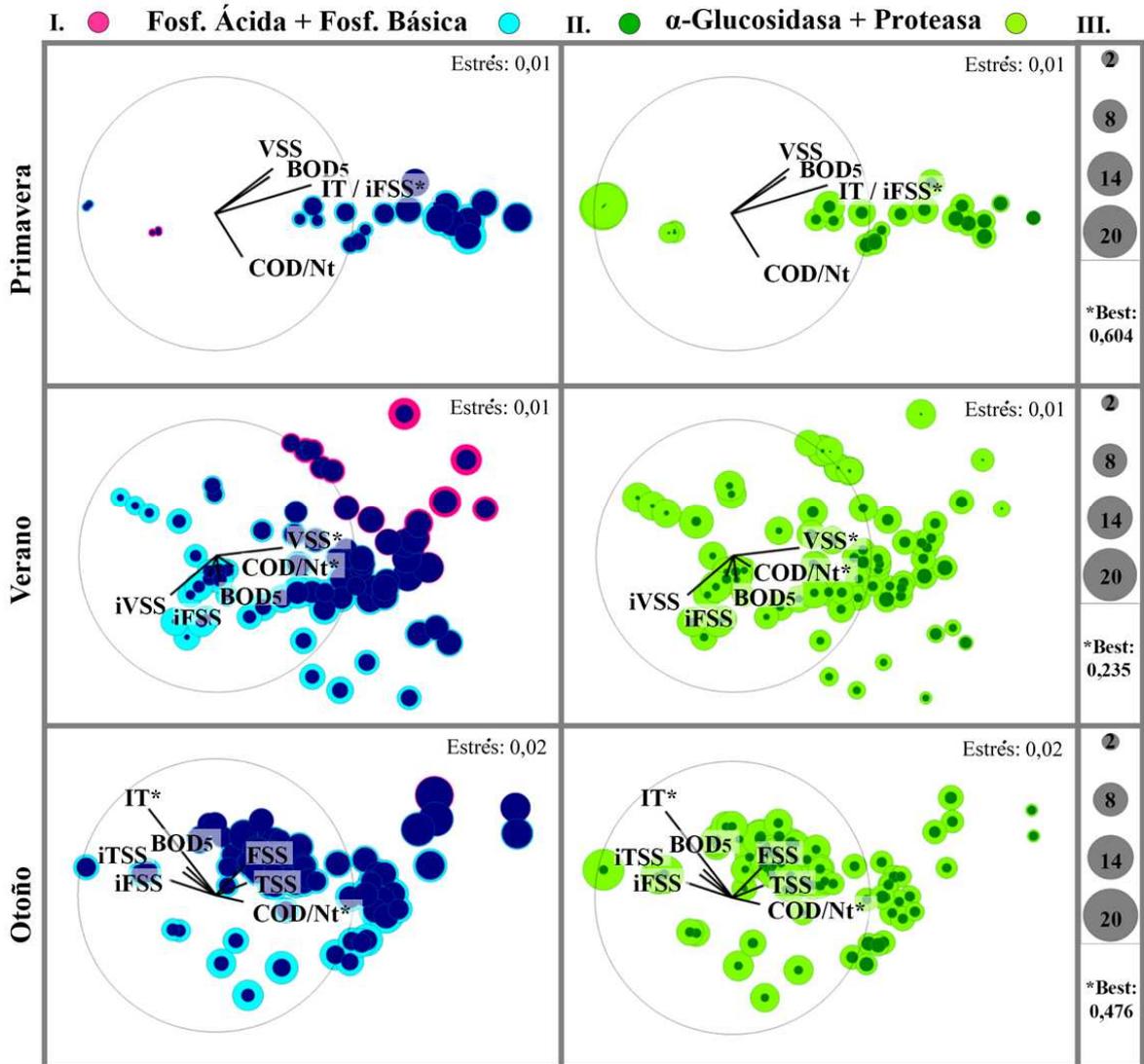


Fig. 1.4. Escalado multidimensional no métrico (MDS) de la distribución de las muestras de lodo del biorreactor anóxico del MBR durante la primavera, verano y otoño del año 2009, según la similitud de sus perfiles de actividades enzimáticas (fosfatasa ácida y básica, α-glucosidasa y proteasa). El bajo nivel de estrés (estrés < 0,05) indica que la ordenación de las actividades enzimáticas tiene una buena representación. El tamaño de las burbujas es proporcional al valor de la actividad enzimática representada, expresada en mM p-nitrofenol/min/gVSS para las fosfatasas y α-glucosidasa y ΔAbs/min/gVSS para la proteasa. La escala de las burbujas se muestra en la columna III. Las actividades de las fosfatasas aparecen representadas en la columna I y las de α-glucosidasa y proteasa en la columna II. Los vectores muestran la dirección y fuerza con la que cada variable explica la distribución de las muestras. Los vectores poco explicativos (longitud < 0,100) no se muestran en los gráficos. Las variables que, según el análisis de BIO-ENV, mejor explican la ordenación biológica aparecen marcados con un asterisco (*) y su valor aparece en la columna III (Best).

1.4. DISCUSIÓN:

1.4.1. Estudio comparativo de las actividades enzimáticas en el MBR en las diferentes estaciones del año:

A lo largo de este estudio, los valores medios de las actividades α -glucosidasa y proteasa en el fango activo del MBR experimental fueron análogos a las descritos previamente en WWT basadas en la misma tecnología, mientras que las fosfatasas presentaron niveles menores (Molina-Muñoz *et al.*, 2010, Molina-Muñoz *et al.*, 2007). Sin embargo, la mayoría de las enzimas hidrolíticas ensayadas presentaron actividades superiores a las descritas en plantas reales basadas en el proceso de lodos activos (CAS) (Cadoret *et al.*, 2002, Frølund *et al.*, 1995, Nybroe *et al.*, 1992, Xie *et al.*, 2011). Cicek *et al.* (1999) llevaron a cabo un estudio comparativo de actividades enzimáticas usando un MBR y una planta CAS a escala de laboratorio, funcionando en

paralelo y alimentadas con el mismo agua residual influente. Llegaron a la conclusión de que, en general, todas las tasas hidrolíticas fueron mayores en el MBR, debido a la retención dentro del biorreactor de enzimas estables que no son capaces de atravesar la membrana.

A lo largo de los tres periodos de muestreo se detectaron grandes fluctuaciones de las actividades enzimáticas, como se muestra en los diagramas de cajas (Fig. 1.1). La naturaleza dinámica de las actividades enzimáticas en las plantas de WWT ya fue señalado por Nybroe *et al.* (1992), quien observó que las tasas de hidrólisis en muestras de fango activo tomadas durante días consecutivos variaban menos del 10%, variabilidad que aumentaba significativamente cuando el muestreo se espaciaba. Frølund, *et al.* (1995) observaron una dinámica similar para la actividad esterasa, estudiada durante tres meses en un sistema real de tipo CAS.

Durante los periodos muestreados, las fluctuaciones temporales de las actividades enzimáticas en el MBR experimental fueron, en la mayoría de los casos, sustancialmente mayores al 10%, incluso entre muestras tomadas en la misma semana. Además la magnitud de la variación temporal depende de la enzima analizada, según su respuesta diferencial a las fluctuaciones de las variables que influyen sobre el sistema. En relación a esto, Cadoret *et al.* (2002) observaron un comportamiento similar en muestras tomadas a lo largo de varias semanas de una estación depuradora municipal basada en fangos activos, obteniendo 25% y 45% de variación para las actividades proteasa y α -glucosidasa, respectivamente.

Al comparar las tasas de actividad hidrolítica en el fango activo del MBR tomado del BR aireado y del BR anóxico, no se encontraron diferencias significativas. Estos resultados están en concordancia con trabajos previos llevados a cabo en reactores secuenciales en discontinuo a escala de laboratorio, al objeto de analizar el efecto de las condiciones de aceptor de electrones sobre las actividades microbianas α -glucosidasa, proteasa y fosfatasas en el fango activo (Goel *et al.*, 1998, San Pedro *et al.*, 1994). Goel *et al.* (1998) encontraron diferencias marginales en las tasas de síntesis de la α -glucosidasa y proteasa, atribuyendo la similitud de tasas hidrolíticas entre la

fase aireada y la fase anaerobia/anóxica al hecho de que las hidrolasas son enzimas extracelulares que permanecen inmovilizadas y acumuladas como parte de la matriz de exopolisacárido de los flóculos de los lodos activos (Frølund *et al.*, 1995). Esto provoca una estabilización entre la síntesis y pérdida de enzimas, especialmente en sistemas con reciclado de biomasa y funcionando a bajos SRT. En este sentido, estudios recientes en ecosistemas lacustres encontraron una larga persistencia de los exoenzimas proteolíticos, en solución o unidos a material particulado, tras la muerte de las bacterias productoras (Kiersztyn *et al.*, 2012). Además, el MBR analizado en este trabajo se operó bajo una tasa de recirculación alta (700%), generando una importante transferencia de la biomasa (y por tanto de las enzimas unidas a las células) entre los biorreactores.

1.4.2. Distribución de los datos de actividades enzimáticas y su relación con las variables del sistema.

Las comunidades microbianas de las plantas de WWT están influenciadas en su composición y su función por los parámetros de operación impuestos y los continuos y simultáneos cambios de factores de difícil control como son el pH, la temperatura o las características del agua a tratar (Boczar *et al.*, 1992, Morgenroth *et al.*, 2002). Las actividades hidrolíticas de los lodos activos son el resultado de la combinación de un conjunto de enzimas originado por una mezcla de poblaciones microbianas, así, es de esperar la existencia de una redundancia funcional y la disponibilidad de enzimas capaces de llevar a cabo la despolimerización del material particulado bajo un amplio rango de condiciones ambientales diferentes (Burgess and Pletschke, 2008).

En este trabajo, se ha utilizado un análisis multivariante para estudiar la distribución de cuatro enzimas hidrolíticas en el MBR experimental a lo largo de tres periodos estacionales, los cuales se diferenciaron considerablemente en cuanto en los perfiles de cambio de las variables que influyen sobre el sistema (Fig. 1.7). A excepción del verano, las variables ofrecieron una buena explicación de las tendencias seguidas por las actividades enzimáticas. En todos los casos estuvieron alta y consistentemente correlacionadas con ellas,

aunque mostrando patrones de correlación muy diferentes según la estación del año. De acuerdo con los resultados del presente estudio, los análisis basados en cortos periodos de muestreo pueden llevar a una explicación simplificada de la influencia de las características del agua influente y de las variables del proceso sobre las actividades enzimáticas en los sistemas de WWT.

En ambientes acuáticos, la variación estacional de la distribución de las enzimas hidrolíticas ha sido clásicamente atribuida al efecto de la temperatura, factor que suele estar ligado a la abundancia relativa de las bacterias en ecosistemas naturales (Cunha *et al.*, 2010). En sistemas de ingeniería, es bien conocido que la temperatura influencia las tasas de reacción enzimática, afectando de manera relevante al funcionamiento del proceso depurador. Como regla general, las reacciones tienen lugar más rápidamente a temperaturas mayores (Burgess and Pletschke, 2008). Estudios previos han demostrado que las tasas de actividad proteolítica en fango activo se incrementan cuatro veces cuando la temperatura cambia de 10 a 25°C (García *et al.*, 1997). Los resultados del presente estudio llevan a la conclusión de que la temperatura es una de las variables más influyentes sobre las tasas de hidrólisis en el MBR experimental. En otoño esta influencia es muy clara (Fig 1.3 y 1.4), sin embargo en primavera, donde la temperatura presenta una correlación elevada con los sólidos en suspensión del agua de entrada, la influencia se ve enmascarada y estadísticamente no se pudo diferenciar su efecto aislado. Durante el verano, la temperatura fue muy estable (Fig. A.7) por lo que su efecto sobre la distribución de las actividades enzimáticas fue menor (Fig. 1.3 y 1.4). En estudios previos de sistemas de MBR tratando agua residual urbana bajo diferentes condiciones de operación, las mayores tasas de actividades fosfatasas, esterases y proteasas se obtuvieron en un rango de temperatura de 17-23°C, mientras que la α -glucosidasa se vio potenciada a temperaturas de 7-13°C (Molina-Muñoz *et al.*, 2010, Molina-Muñoz *et al.*, 2007). En el presente estudio, durante el otoño, estación en la que la temperatura es la variable más influyente, también se ha observado esa misma tendencia, encontrando un incremento de la actividad de la α -glucosidasa a menores temperaturas ($T < 17,5^{\circ}\text{C}$) (Fig. 1.3 y 1.4).

La concentración de sólidos en suspensión del agua influente estuvo muy relacionada con el patrón de distribución de las actividades enzimáticas durante la primavera y el verano, presentando menor influencia en otoño (Fig. 1.3 y 1.4). Tanto en ambientes acuáticos como en sistemas de lodos activos, la producción de enzimas está influenciada por la abundancia y composición de la materia orgánica polimérica (Chróst, 1992, Morgenroth *et al.*, 2002).

La concentración de biomasa alcanzada en los lodos activos del MBR experimental a lo largo de las diferentes estaciones también fue señalada como un factor significativamente relacionado con la distribución de las actividades biológicas, especialmente en verano (Fig. 1.3 y 1.4). Como en el caso de la temperatura, la respuesta de cada actividad hidrolítica a la concentración de biomasa fue diversa. En general, la concentración de sólidos en suspensión en el lodo activo (TSS, VSS o FSS) estuvo positivamente correlacionada en todas las estaciones con la fosfatasa ácida y la α -glucosidasa, en primavera y otoño con la fosfatasa básica, sin efecto sobre ella en verano, y de nuevo en todas las estaciones negativamente con la proteasa (Fig. 1.3 y 1.4). Ya en trabajos iniciales en sistemas de lodos activos se relacionó el incremento de biomasa bacteriana con el incremento de la actividad de enzimas hidrolíticas (Nybroe *et al.*, 1992, Teuber and Brodisch, 1977). Sin embargo, en MBRs la concentración de sólidos en suspensión en el lodo activo no refleja la comunidad microbiana activa, debido al efecto de retención de biomasa sobre la limitación de sustratos disponibles para el crecimiento (LaPara *et al.*, 2006). El número total de bacterias heterotróficas cultivables está negativamente correlacionado con la concentración de VSS en el lodo activo de los MBRs, contrariamente a lo que sucede en los sistemas CAS (Molina-Muñoz *et al.*, 2010). Análogamente, un incremento de la concentración de VSS no está necesariamente asociado a un incremento en los niveles de actividad enzimática (Calderón *et al.*, 2012a, Molina-Muñoz *et al.*, 2010, Molina-Muñoz *et al.*, 2007). De hecho, en estudios previos en MBRs trabajando bajo condiciones de retención total de biomasa, se ha descrito una disminución de las actividades enzimáticas cuando se alcanzan determinados valores umbrales de concentración de VSS (Molina-Muñoz *et al.*, 2007), efecto que se atribuye a la fuerte represión por catabolito que presentan la mayoría de las hidrolasas (Morgenroth *et al.*, 2002).

Comparando los resultados de los análisis multivariantes, es llamativo el hecho de que la influencia direccional de la concentración de sólidos en suspensión del agua influente y la BOD₅ sea contraria en primavera y otoño (Fig. 1.3 y 1.4), resultando su correlación con la fosfatasa básica y la α -glucosidasa opuesta entre ambas estaciones. Se registraron valores significativamente más bajos de estas dos variables en otoño, al mismo tiempo que se incrementaba la concentración de sólidos en suspensión en los biorreactores (Fig.1.7), dando como resultado una relación nutrientes/biomasa (F/M) significativamente menor (Fig. 1.8). En estudios de MBRs funcionando bajo condiciones de creciente limitación de la disponibilidad de sustratos, se han obtenido resultados conflictivos en relación a la respuesta de las actividades enzimáticas a la deprivación de nutrientes. Esto sugiere un ajuste de las capacidades hidrolíticas de la comunidad para optimizar el metabolismo cuando la relación entre los nutrientes y la biomasa (ratio F/M) se vuelve limitante para el crecimiento (LaPara *et al.*, 2006, LaPara *et al.*, 2001). Las bacterias se vuelven más competitivas bajo estas condiciones, aumentando la eficiencia de las enzimas o produciendo diferentes tipos para ser capaces de metabolizar una mayor gama de sustratos (Chen and LaPara, 2006). Además, la presencia de algunos compuestos orgánicos e inorgánicos en el agua, como los ácidos húmicos o metales pesados, influyen la tasa de actividad de enzimas extracelulares por mecanismos de inhibición (Frølund *et al.*, 1995, Teuber and Brodisch, 1977).

En el presente estudio, la actividad proteasa estuvo en todos los casos negativamente correlacionada con el resto de hidrolasas, especialmente con la α -glucosidasa (Fig. 1.2). Estas actividades, de hecho, se vieron influenciadas por las mismas variables pero de manera opuesta (Fig. 1.3 y 1.4). La glucosidasa y la proteasa son enzimas clave en el proceso de despolimerización de carbohidratos complejos y proteínas, las principales fuentes de carbono en la materia orgánica particulada del agua residual (Bitton, 2010, Nielsen *et al.*, 1992). Esta correlación negativa entre las dos actividades hidrolíticas no se ha descrito previamente en sistemas de WWT. Estudios recientes llevados a cabo en ríos, escorrentías y aguas costeras han demostrado la dominancia de la actividad proteolítica sobre la glucolítica en verano, mientras que las tendencias son opuestas en primavera y otoño

(Celussi and Del Negro, 2012, Frossard *et al.*, 2012, Sinsabaugh and Shah, 2010, Tiquia, 2011, Wilczek *et al.*, 2005). Varios autores llegan a la conclusión de que la variación estacional en los patrones hidrolíticos no sólo está determinada por la temperatura, relacionando la alternancia de recursos enzimáticos para la adquisición de carbohidratos y proteínas con los cambios estacionales en el aporte de nutrientes al ecosistema (Sinsabaugh and Shah, 2010, Tiquia, 2011, Wilczek *et al.*, 2005). Análogamente, las variaciones en la composición de la materia orgánica del agua residual pueden estar asociadas a la redistribución estacional de la contribución relativa de cada enzima específica a la actividad hidrolítica total del fango. El agua influente tratada por el MBR utilizado en este estudio procedía de una estación depuradora municipal, donde se recoge agua tanto doméstica como de industrias locales más las escorrentías de las lluvias. Existen grandes variaciones en las precipitaciones a lo largo del año y en la demanda y consumo de agua (AEMET, 2005). Por todo ello, es de esperar que se produzcan variaciones estacionales en la cantidad y composición de materia orgánica presente en el agua. La mayoría de las hidrolasas son inducibles por sustrato (Morgenroth *et al.*, 2002). Nybroe *et al.* (1992) analizaron los perfiles de actividad enzimática en cuatro plantas a escala real de fangos activos, encontrando una importante influencia de la concentración de los sustratos específicos de cada hidrolasa en el agua de entrada. Aguas residuales suplementadas con almidón incrementaban la tasa de actividad α -glucosidasa, mientras que la abundancia de nitrógeno orgánico se relacionó con mayores tasas de actividad proteolítica (Nybroe *et al.*, 1992). Así, altas relaciones C/N son también un indicador de mejores condiciones para los enzimas degradadores de carbohidratos que para los degradadores de proteínas (Wilczek *et al.*, 2005). A lo largo del periodo experimental en el MBR, las relaciones C/N experimentaron grandes fluctuaciones (Fig. 1.7), y dicha variable está positivamente correlacionada con la α -glucosidasa y negativamente con la proteasa en las tres estaciones analizadas (Fig. 1.3 y 1.4). La alternancia de las hidrolasas degradadoras de compuestos carbonados dominantes (proteasa y α -glucosidasa) en respuesta a la temperatura y la disponibilidad de sustratos explica la consistente correlación negativa que se observa entre ellas.

Los primeros estudios de actividades enzimáticas en plantas WWT no encontraron correlaciones evidentes entre los parámetros del proceso y las actividades enzimáticas (Nybroe *et al.*, 1992). Las amplias variaciones diarias de las actividades enzimáticas y su compleja respuesta de adaptación a los cambios en el entorno hacen necesarios estudios a largo plazo y el uso de análisis multivariantes para la adecuada interpretación de los patrones enzimáticos en relación con las variables de los sistemas MBR, particularmente cuando funcionan bajo condiciones reales de operación.

CAPÍTULO 2:

ESTUDIO DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS DEGRADORAS DE COMPUESTOS NITROGENADOS

2.1. INTRODUCCIÓN:

2.1.1. ELIMINACIÓN DEL NITRÓGENO:

El nitrógeno constituye un importante contaminante de las aguas residuales, como se ha mencionado anteriormente en la Introducción General de este trabajo. Por esta razón, uno de los objetivos principales de la investigación llevada a cabo en años recientes para la mejora de las plantas de tratamiento ha sido aumentar la tasa de eliminación de compuestos nitrogenados de los influentes mediante su transformación completa hasta formas gaseosas que se liberan a la atmósfera (Kraft *et al.*, 2011). Se han desarrollado diferentes tipos de tecnologías enfocadas a lograr este objetivo.

En el mismo Apartado (Introducción General) también se ha descrito como la configuración en predesnitrificación de los sistemas de MBR resulta

muy eficiente para la eliminación de este tipo de contaminantes mediante la alternancia de condiciones de aireación (Le-Clech, 2010). Brevemente y como se observa en la Figura 2.1, la materia orgánica es parcialmente consumida en el biorreactor anóxico por bacterias heterótrofas capaces de utilizar el nitrato como aceptor de electrones, reduciéndolo hasta nitrógeno gaseoso (desnitrificación). El amonio presente en el agua de entrada más aquel liberado por los procesos de amonificación (descomposición de la materia orgánica por organismos heterotróficos) pasa al BR aireado donde es oxidado a nitrito por AOB ó AOA, y posteriormente a nitrato por NOB. Estos dos últimos grupos de procariotas son generalmente autotróficos y utilizan estos procesos oxidativos como fuente de energía. Desde el BR aireado el fango activo es circulado hasta el tanque de membrana donde se filtra parte del caudal dando lugar al agua depurada. El resto del caudal es recirculado hasta el BR anóxico donde el nitrato y la materia orgánica restante son puestos de nuevo a disposición de los microorganismos desnitrificantes, cerrando el ciclo.

Una de las principales ventajas de los MBRs sobre los CAS anteriormente descrita (Introducción General, Apdo.I.II) es la posibilidad de modificar el SRT de manera independiente al HRT. Gracias al proceso de filtración, el tiempo de retención de sólidos en el interior del sistema puede aumentarse sin incrementar el tiempo de retención hidráulico. Este hecho permite el desarrollo de las comunidades procariotas de lento crecimiento necesarias para la degradación de compuestos nitrogenados, como es el caso de las nitrificantes (Le-Clech, 2010).

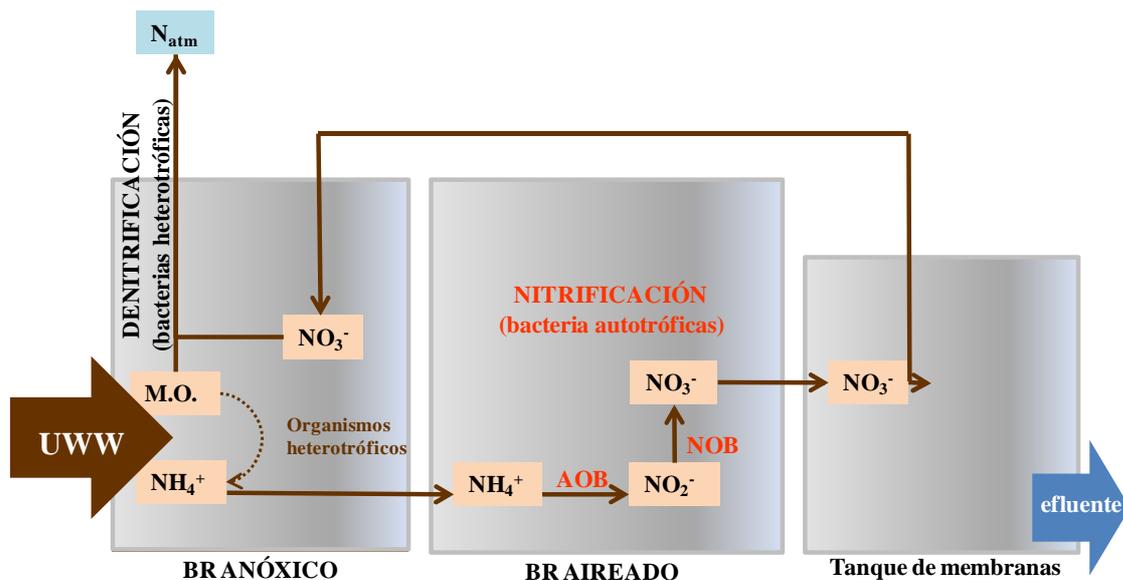


Fig. 2.1. Esquema de la configuración de pre-desnitrificación en un sistema de MBR. UWW: agua residual urbana (urban waste water).

Dentro del ciclo del nitrógeno, la ruta de desnitrificación, junto con las enzimas implicadas, es una de las más conocida y descrita. Sin embargo, en las últimas décadas y gracias al desarrollo de técnicas moleculares, aún se están describiendo nuevos organismos desnitrificantes, nuevos hábitats, e incluso nuevas localizaciones celulares de las enzimas implicadas. Esta enorme diversidad junto con el hecho de que el proceso se puede llevar a cabo por una comunidad en conjunto y no por una sola población, hace que aún se necesite seguir estudiando e identificando aquellos organismos clave en el proceso y su relación con su medio ambiente (Kraft *et al.*, 2011).

En los WWTs, los microorganismos que reducen el N_2O a N_2 son los encargados de cerrar el proceso de eliminación de las especies tóxicas de N hasta la forma molecular inerte, mediante el concurso de la enzima óxido nitroso reductasa (NosZ) (Introducción General, Apdo.II.I). En estudios previos realizados en los WWTs, la amplificación y secuenciación de copias del gen *nosZ* ha revelado una alta similitud con los genes de géneros de bacterias desnitrificantes bien caracterizadas, de las clases Alfa-, Beta- y Gammaproteobacteria (*Achromobacter*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Sinorhizobium*) (Gómez-Villalba *et al.*, 2006, Noda *et al.*, 2003, Sakano *et al.*, 2002). Por el contrario, en estudios

análogos sobre la comunidad desnitrificante de hábitats naturales, a menudo se recuperan copias de *nosZ* con baja similitud con secuencias previamente conocidas (Scala and Kerkhof, 1999).

El proceso de nitrificación, sin embargo, no está tan descrito, habiendo estado limitado su estudio durante mucho tiempo a bacterias cultivables de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. Sin embargo, en los últimos 15 años y de nuevo gracias al desarrollo de técnicas moleculares independientes de cultivo, se está viendo que la diversidad de organismos capaces de llevar a cabo las distintas fases de la nitrificación es mucho mayor de lo que se había pensado (Erijman *et al.*, 2011).

Estudios recientes indican que en los WWTs destinados a tratar aguas no salinas, los oxidadores de amonio prevalentes son AOB evolutivamente relacionadas con un grupo monofilético de la clase Betaproteobacteria que consta de dos géneros, *Nitrosomonas* y *Nitrospira*, en los que se encuadran actualmente un total de 14 especies validadas (Purkhold *et al.*, 2003). Las AOA son abundantes en hábitats naturales, sin embargo su presencia en plantas de WWTs no parece ser frecuente (Gomez-Silvan *et al.*, 2010, Mußmann *et al.*, 2011, Terada *et al.*, 2010).

En cuanto a las NOB, tradicionalmente *Nitrobacter* ha sido considerada como la más importante en las plantas de tratamiento de agua residual; sin embargo, la introducción de las técnicas de estudio independientes de cultivo permitió demostrar la presencia abundante de las bacterias no cultivables del género *Nitrospira* en este tipo de instalaciones (Daims *et al.*, 2001, Juretschko *et al.*, 1998).

2.1.2. TÉCNICA DE qPCR:

La PCR cuantitativa (qPCR, quantitative polymerase chain reaction) o PCR a tiempo real es una técnica independiente de cultivo que permite el recuento de copias de genes en una muestra, y hoy en día se utiliza de forma generalizada en ecología microbiana para cuantificar comunidades. Esta técnica funciona esencialmente igual que la PCR tradicional con la única

diferencia de que el incremento del número de amplicones es seguido a tiempo real durante la PCR mediante la detección de un marcador fluorescente que indica la acumulación de amplicones en cada ciclo (Smith and Osborn, 2009).

En la PCR tradicional, y especialmente al aplicarla a muestras ambientales complejas, la proporción numéricamente dominante de amplicones no necesariamente refleja la abundancia real de secuencias diana presentes en la muestra debido a las limitaciones asociadas con la amplificación, como puede ser la presencia de compuestos inhibidores o la amplificación diferencial (Wintzingerode *et al.*, 1997). Este sesgo aumenta con el número de ciclos de amplificación. En la qPCR se evitan estos problemas determinando el número de secuencias diana durante la fase exponencial de la amplificación, cuando el número de amplicones detectado es directamente proporcional al número de secuencias diana presentes en la muestra ambiental (Smith and Osborn, 2009).

2.1.2.1. Fluoróforos: SYBR® Green I:

Existen una gran variedad de sondas desarrolladas para la cuantificación por qPCR. Existen sondas de hibridación y sondas de hidrólisis que necesitan que las secuencias diana consten de regiones conservadas adicionales a las de los cebadores. También se ha desarrollado toda una familia de sondas con estructura en horquilla. Todas estas sondas presentan gran fiabilidad debido a su alta especificidad, y son capaces de diferenciar entre alelos de un mismo gen. Sin embargo, se trata de sondas caras y se necesitan conocer muy bien las secuencias diana y sus posibles variaciones (Wong and Medrano, 2005), por lo que su uso tiene limitaciones a la hora de cuantificar genes en muestras ambientales complejas.

Una alternativa barata y flexible son los fluorocromos/fluoróforos, moléculas que emiten fluorescencia al intercalarse entre las bases del DNA de doble cadena, siendo el SYBR® Green I el más utilizado. Así, la cantidad de DNA acumulado tras cada ciclo de amplificación será calculada por el aumento proporcional de intensidad de fluorescencia. Sin embargo presenta desventajas frente al uso de sondas más específicas. Al unirse

inespecíficamente al DNA de doble cadena, el SYBR® Green I también se une a productos inespecíficos de la amplificación y a dímeros de cebadores. Por ello es totalmente indispensable ajustar las mezclas y condiciones de amplificación de cada uno de los genes diana y llevar a cabo una serie de controles para asegurarse de que sólo existe amplificación del fragmento diana, evitando la sobreestimación de la cuantificación (Smith and Osborn, 2009).

El primer punto de control de la cuantificación se lleva a cabo justo tras la amplificación, la curva de desnaturalización. Esta curva consiste en someter los productos de la amplificación a un aumento progresivo de la temperatura mientras se mide la fluorescencia. Al llegar a la temperatura de desnaturalización de los fragmentos amplificados, las moléculas de SYBR® Green I son liberadas, produciendo la correspondiente caída en la señal de fluorescencia. Los productos de la amplificación de tamaño similar, secuencias diana, presentarán una temperatura de desnaturalización similar. Temperaturas de desnaturalización cercanas a los 60°C indican la presencia de dímeros de los cebadores. El segundo punto de control, y como para cualquier PCR tradicional, consiste en una electroforesis en gel de agarosa, comprobando que el tamaño de los amplicones obtenidos es el esperado (Wong and Medrano, 2005).

2.1.2.2. Método de cuantificación: ciclo umbral:

A pesar de la diversidad de instrumentos de qPCR, software y algoritmos de cálculo existentes en el mercado, todas las plataformas recogen los datos del incremento de fluorescencia en cada ciclo de amplificación y los representan gráficamente frente al correspondiente número de ciclo. El resultando es una gráfica típica con una curva sigmoideal por muestra, que se puede dividir en cuatro fases:

- a. Ruido de fondo: donde la fluorescencia residual todavía es mayor que la fluorescencia debido al acúmulo de amplicones.

- b. Amplificación exponencial: en esta fase la reacción es muy eficiente. El número de amplicones es proporcional al número de secuencias diana en la muestra. Es en este punto donde se realizará la cuantificación.
- c. Amplificación lineal: los productos se van agotando y la eficiencia de reacción va disminuyendo paulatinamente.
- d. Fase de meseta u horizontal: los productos de reacción se agotan y no se producen más amplicones.

El **ciclo umbral**, Ct o Cp dependiendo de la marca del instrumento, es el número de ciclo en el que la acumulación de fluorescencia debida a amplicones es significativamente mayor que la fluorescencia residual. Se va a producir al inicio de la fase exponencial de la amplificación y va a ser en este punto donde se cuantifiquen el número de copias de secuencias diana presente en cada muestra. A mayor número de secuencias diana en la muestra, antes se acumulará un número de amplicones detectable y menor será el ciclo umbral para esa muestra.

2.1.2.3. Tipos de cuantificación:

En **cuantificaciones relativas**, las variaciones en la secuencia diana se expresan en función a la co-amplificación de un patrón o muestra externa. Este tipo de cuantificación es común para el estudio de regulaciones génicas en eucariotas, utilizando la co-amplificación de genes constitutivos. En muchos estudios llevados a cabo en procariontes la abundancia de copias de genes diana se expresa en relación a la abundancia de copias del gen rRNA 16S. Existe controversia respecto a esta metodología, ya que el número de copias del gen rRNA 16S por operón varía drásticamente entre especies (1-15 copias) (Smith and Osborn, 2009). Por lo tanto el número de copias del gen rRNA 16S en muestras ambientales no puede ser interpretado como número total de células bacterianas.

En la **cuantificación absoluta**, el número de secuencias diana en las muestras se determina en relación a una recta de calibración o recta patrón

obtenida por amplificación de diluciones seriadas de una secuencia diana de la cual se conoce la concentración inicial y el número de copias (patrón). Con los valores del Ct y el logaritmo del número de copias inicial se realiza una regresión lineal que nos permitirá calcular, por interpolación, el número de copias de la secuencia diana en cada una de las muestras. Se ha de incluir los patrones en cada una de las tandas de amplificación.

En cualquiera de las cuantificaciones, es necesario disponer de, al menos, tres repeticiones de cada muestra para poder tratar los resultados estadísticamente (Wong and Medrano, 2005).

2.1.2.4. Aplicabilidad de la técnica de qPCR:

La qPCR ya se ha afianzado como un método robusto, muy reproducible y muy sensible para seguir cambios filogenéticos y/o funcionales a lo largo del tiempo y el espacio, bajo condiciones ambientales o experimentales cambiantes. El uso de la qPCR como descriptivo de la abundancia de bacterias o genes específicos complementando a otras técnicas está creciendo en importancia en la ecología microbiana, ayudando a dilucidar los papeles y las contribuciones de los microorganismos.

En este sentido, la técnica de qPCR está siendo particularmente relevante en el estudio de genes funcionales o grupos bacterianos concretos en el medio ambiente. Para entender el funcionamiento microbiano ambiental a nivel molecular es esencial, no solo saber qué genes hay y su diversidad, sino también su abundancia y distribución. Se han llevado a cabo muchos estudios de genes implicados en la oxidación de amonio (Beman *et al.*, 2012, Mincer *et al.*, 2007), en la reducción de nitrato (Boyd *et al.*, 2011, Smith *et al.*, 2007), desnitrificación y reducción de sulfato (Burgin *et al.*, 2012, Henry *et al.*, 2006, Leloup *et al.*, 2007), metanogénesis (Denman *et al.*, 2007, Ziv-El *et al.*, 2012) y oxidación de metano (Ho and Frenzel, 2012, Kolb *et al.*, 2003), entre otros muchos procesos. Todos estos estudios contribuyen al entendimiento de la distribución del número de genes en los sistemas ambientales, pero el siguiente paso es conseguir relacionar las variaciones en el potencial y/o expresión génicos con las variaciones en los factores que influyen el

funcionamiento microbiano en el ecosistema. Para ello los análisis con reverso transcripción acoplados a qPCR (RT-qPCR), ofrecen un potente herramienta para cuantificar la expresión génica (en término de transcritos) permitiendo relacionar la actividad biológica con la función ecológica. Además, los datos cuantitativos generados pueden ser usados para relacionar los cambios en abundancia o niveles de expresión de genes con variaciones en factores bióticos o abióticos y/o actividades biológicas y tasas de procesos (Smith and Osborn, 2009).

En este capítulo el objetivo fue la cuantificación mediante qPCR de las bacterias presentes y activas implicadas en la eliminación de los compuestos nitrogenados en el agua de entrada al sistema MBR. En dicho estudio se incluyeron aquellas bacterias implicadas en el proceso global de nitrificación-desnitrificación, abarcando las bacterias desnitrificantes, las bacterias oxidadoras de amonio (AOB) y las bacterias oxidadoras de nitrito (NOB).

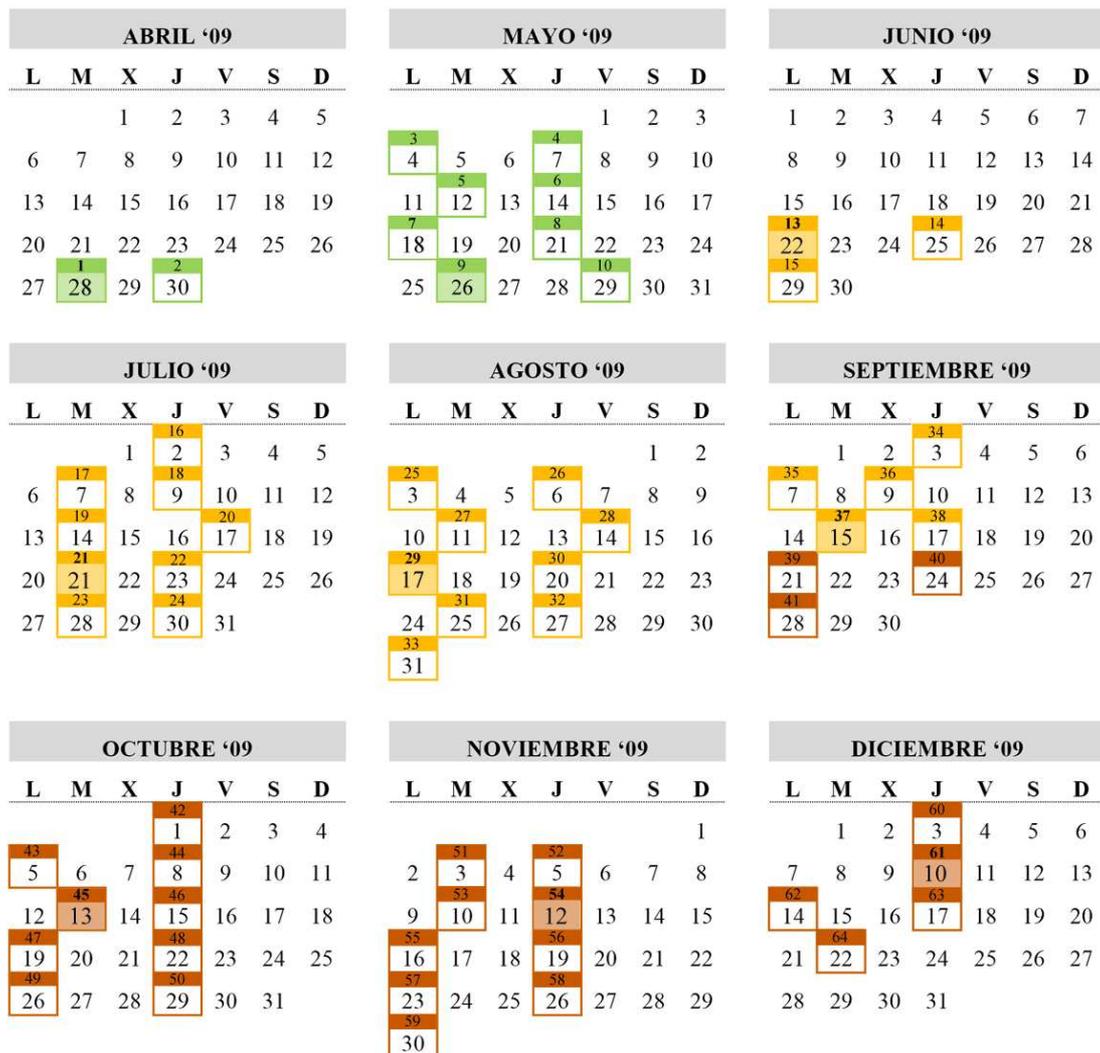
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS:

2.2.1. MUESTREO DE LOS BRs DEL MBR PARA BIOLOGÍA MOLECULAR:

Las condiciones y periodo de muestreo del sistema MBR están detalladas previamente en la Descripción del sistema MBR, Apdo E. Para cada una de las muestras se tomaron 50 ml de fango activo en un recipiente estéril de plástico y se mantuvieron a 4°C hasta que se prepararon para su correcto almacenaje como a continuación se detalla. Todas las muestras se prepararon y almacenaron por duplicado.

Selección de las muestras para cuantificación por qPCR:

Algunos de los grupos bacterianos encargados de la degradación de los compuestos nitrogenados estudiados en este MBR son bacterias de crecimiento lento y su respuesta a los cambios en los parámetros de funcionamiento del sistema y/o de variables ambientales es igualmente lenta. Por ello, de todas las muestras disponibles, se decidió acotar el estudio a una muestra por mes.



Finalmente, el recuento de las copias de los genes de los grupos funcionales de interés (bacterias totales, AOB, NOB y bacterias desnitrificantes) se realizó en los 9 muestreos que aparecen sombreados en la Figura 2.2, incluyendo tanto el biorreactor aireado como el anóxico, y basadas en DNA y en RNA.

2.2.1.1. Preparación y almacenaje de muestras para estudios basados en DNA:

Al llegar al laboratorio, las alicuotas de las muestras, acondicionadas en tubos de plástico estéril de 1,5 ml, se centrifugaron en una minifuga (MiniSpin Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) hasta formar un pellet (1 min a 14.500 rpm), descartando los sobrenadantes. Esta acción se repitió tres veces, precipitando un total aproximado de 4 ml de fango activo por muestra. Los pellets se conservaron a -20°C.

2.2.1.2. Preparación y almacenaje de muestras para estudios basados en RNA:

En las mismas instalaciones del sistema MBR, se tomaron alicuotas de cada muestra en tubos estériles de 2 ml y se centrifugaron en una minicentrífuga Nahita (MBL, Córdoba, España) hasta conseguir un pellet (5 min a 6.000 rpm), descartando los sobrenadantes. Esta acción se repitió dos veces, precipitando un volumen final de 4 ml de fango activo. Tras ello, cada pellet se resuspendió en 1 ml de de RNAprotect® Bacteria Reagent (Qiagen, Hamburgo, Alemania) manteniéndose a temperatura ambiente durante todo el transporte hasta el laboratorio.

Al llegar al laboratorio, las muestras se volvieron a centrifugar en una minifuga (MiniSpin Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) hasta formar un pellet (1 min a 14.500 rpm). Se descartaron los sobrenadantes y los pellets se conservaron a -20°C.

El reactivo RNAprotect® Bacteria Reagent (Qiagen, Hamburgo, Alemania) es capaz de estabilizar el RNA de las muestras previniendo la degradación de

los RNAs transcritos e inhibiendo la inducción de nuevos genes. De esta manera nos aseguramos de mantener el perfil de expresión “in vivo” de la comunidad presente en el fango activo en el momento de muestreo.

2.2.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS:

2.2.2.1. Extracción y conservación de DNA total:

La extracción de DNA de las muestras se realizó con el kit “FastDNA[®] SPIN kit for Soil” y con FastPrep[®]24-Instrument, ambos de MPBiomedicals (MPBio, Santa Ana, CA, EEUU). En general, se siguieron las indicaciones del fabricante con pequeñas modificaciones para mejora del rendimiento. Todas las centrifugaciones se llevaron a cabo en una minifuga (MiniSpin Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a la máxima velocidad, 14.500 rpm.

a. Lisis celular: aproximadamente 200 mg de fango activo precipitado se procesaron en el FastPrep[®]24-Instrument, utilizando una matriz de partículas de cerámica y sílice con gran capacidad de lisis y en presencia de un tampón de fosfato sódico.

b. Eliminación de las proteínas: posteriormente a la lisis, el sobrenadante obtenido se incubó con una solución de precipitación de proteínas, eliminándolas de la muestra.

c. Recuperación de DNA: para la recuperación del DNA con gran pureza el kit dispone de una “Binding Matrix”, matriz que tiene especificidad de unión con el DNA. Tras la unión del DNA de la muestra a la matriz, ésta se recupera por filtración y el DNA se eluye mediante resuspensión en agua estéril libre de DNAsas. Finalmente se obtuvieron 200 µl de DNA total por cada muestra, conservados a -20°C.

d. Comprobación de la extracción de DNA: mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

2.2.2.2. Extracción de RNA total:

La extracción de RNA de las muestras se realizó con el kit “FastRNA® PRO BLUE kit” y con FastPrep®24-Instrument, ambos de MPBiomedicals (MPBio, Santa Ana, CA, EEUU). En general, se siguieron las indicaciones del fabricante con pequeñas modificaciones para mejora del rendimiento. Todas las centrifugaciones se llevaron a cabo en una minifuga (MiniSpin Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 14.500 rpm y a 4°C.

a. Lisis celular: se realizó a partir de aproximadamente 200 mg de fango activo precipitado, análogamente al protocolo seguido para las muestras de DNA, pero en lugar del tampón de fosfato se utilizó una solución de inhibición de las RNAasas (RNAPro™) durante la lisis.

b. Eliminación de las proteínas: en este caso, las proteínas contaminantes se eliminaron mediante su precipitación con cloroformo.

c. Recuperación de RNA: el RNA se precipitó mediante incubación a -20°C en etanol, formando un pellet por centrifugación y su resuspensión en agua DEPC.

d. Comprobación de RNA: mediante electroforesis en gel desnaturizante formaldehído-agarosa (1,2% agarosa). Se utilizó tampón MOPS-EDTA-Acetato sódico 10× (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) para preparar tanto el gel como el tampón de carrera (1×). Este tampón presenta una gran capacidad amortiguadora, para evitar la degradación del RNA a pH básico.

Además, el RNA presenta gran cantidad de estructuras secundarias que afectan al comportamiento electroforético del mismo. Antes de cargar el RNA en el gel, el volumen a cargar se calienta a 65°C durante 5 min para eliminar dichas estructuras secundarias. La adicción de formaldehído tanto en la preparación del gel como en la del tampón de carrera, permite mantener el RNA desnaturizado durante el tiempo que ésta dura. Además, este compuesto inhibe la acción de las RNAasas.

2.2.2.3. Purificación y conservación del RNA extraído:

Tras la extracción del RNA es necesario eliminar el posible DNA y otras sustancias contaminantes que puedan afectar a posteriores procedimientos. Todas las centrifugaciones se llevaron a cabo en una minifuga (MiniSpin Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a temperatura ambiente.

a. Digestión con DNasa:

Para eliminar el DNA contaminante de las muestras se llevó a cabo una digestión con “TURBO DNA-free™ kit” (Ambion®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EEUU), siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, se procedió a la incubación de la muestra con la DNasa y su tampón a 37°C durante 1 hora.

b. Limpieza de RNA:

El proceso de limpieza se realizó con “RNeasy Mini Kit” (Qiagen, Hamburgo, Alemania) siguiendo el protocolo “RNA Cleanup”. El kit dispone de unas columnas de centrifugación con una membrana de sílice a las cuales se une el RNA en las condiciones de pH adecuadas, condiciones generadas por los tampones dispensados.

Finalmente el RNA purificado se eluyó de la columna utilizando formamida (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). En total se obtuvieron 60 µl de RNA por muestra que se conservaron a -20°C.

La formamida inhibe la acción de RNAasas, habiendo sido demostrada su eficiencia para el almacenamiento del RNA a largo plazo (Chomczynski, 1992).

2.2.2.4. Recuperación del RNA purificado desde formamida:

Como se ha comentado anteriormente la formamida inhibe la acción de las RNAasas durante el almacenamiento del RNA. Sin embargo, también actúa inhibiendo la actividad de otras muchas enzimas como polimerasas o retrotranscriptasas. Por esta razón, antes de utilizar el RNA purificado en

reacciones de síntesis, necesitamos recuperarlo desde la formamida y resuspenderlo en agua libre de RNAasas.

Para ello, se tomó un volumen de RNA resuspendido en formamida y se incubó a -20°C durante 1 hora con 3 volúmenes de etanol al 100%. Posteriormente, el RNA se recuperó mediante el protocolo de “RNA Cleanup” del “RNeasy Mini Kit” (Qiagen, Hamburgo, Alemania), resuspendiéndolo en un volumen de agua libre de RNAasas.

Tras la recuperación desde la formamida el RNA se cuantificó mediante medición de absorbancia en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) comprobando además su pureza.

2.2.2.5. Retrotranscripción del RNA recuperado:

Una vez recuperado el RNA de la formamida, es necesario retrotranscribirlo a DNA complementario (cDNA) para que posteriormente las polimerasas puedan reamplificarlo mediante PCR. Se utilizó la enzima “SuperScript™ III Reverse Transcriptase” (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EEUU) y se siguieron las especificaciones del fabricante.

La mezcla final de reacción de la retrotranscripción fue de 20 µl. Esta mezcla se realizó en dos pasos:

<u>1^{er} paso</u>	Concentración	Volumen	Concentración final
Cebadores específicos ¹	100 mM	0,05 µl	0,25 mM
dNTPs ²	10 mM	1 µl	0,5 mM
RNA	150 – 200 ng/µl	4-5 µl	30-40 ng/µl (2-3 µl)
Agua libre de RNAasas		Completar hasta 14 µl	
<u>2^o paso</u>			
First-Strand Buffer	5 X	4 µl	1 X
DTT	0,1 M	1 µl	5 mM
SuperScript™ III RT	200 U/µl	1 µl	200 U

¹Cebadores específicos: se utilizaron en cada caso los cebadores específicos del grupo objeto de estudio (Tabla 2.1; Capítulo 3, Apdo.3.2.2.1; Capítulo 4, Apdo.4.2.1.) Todos los cebadores fueron sintetizados por Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EEUU).

² Los dNTPs utilizados fueron suministrados por MBL (Córdoba, España).

La mezcla de reacción obtenida en el 1^{er} paso se llevó a incubar a 65°C durante 5 min y luego se mantuvo a 4°C durante 1 min. Con este paso previo a la retrotranscripción se consigue eliminar las estructuras secundarias del RNA y facilitar la reacción de síntesis de cDNA.

Posteriormente, se combinaron las mezclas preparadas en ambos pasos y llevaron a un termociclador con el siguiente programa:

- 25°C 5 min
- 55°C 30 min
- 72°C 15 min

El último paso a 72°C es necesario para la inactivación de la enzima.

2.2.2.6. Purificación del cDNA:

Tras la reacción de retrotranscripción (RT) se obtuvo un híbrido cDNA-RNA del gen diana de los cebadores específicos. Este híbrido fue utilizado directamente como molde en la posterior amplificación por PCR.

Previamente a su utilización como templado se procedió a la purificación del híbrido mediante "QIAquick® PCR Purification Kit" (Qiagen, Hamburgo, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, la muestra se mezcló con un tampón fosfato y se pasó a través de una columna de elución que retuvo el híbrido cDNA-RNA. Tras su lavado, éste se resuspendió en agua libre de RNAasa.

El cDNA y el híbrido cDNA-RNA es muy inestable, por lo que todo el proceso desde la finalización de la retrotranscripción ha de ser ágil. Justo tras la purificación, el híbrido fue utilizado como molde en la reacción de amplificación mediante PCR del fragmento de interés.

2.2.3. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN:

Los pares de cebadores seleccionados para el estudio de bacterias degradadoras de compuestos nitrogenados en el sistema MBR están descritos en la Tabla 2.1. El número total de bacterias presente de cada uno de los grupos no proporciona la suficiente información, siendo más indicativo el porcentaje de la comunidad bacteriana que cada grupo supone. Por ello, en el estudio de las bacterias del ciclo de nitrógeno, también se incluyó el recuento total de las poblaciones bacterianas.

Tabla 2.1. Cebadores utilizados para el recuento por amplificación a tiempo real de los fragmentos de interés de bacterias totales y bacterias degradadoras de compuestos nitrogenados.

Grupo bacteriano	Gen diana	Cebadores		Referencia
		Nombre	Secuencia (5'-3')	
Bacteria	V3-16S	P1 (341F)	CCTACGGGAGGCAGCAG	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)
		P2 (534R)	ATTACCGCGGCTGCTGG	
Desnitrificantes	nosZ	Nos1527F	CGCTGTTCHTCGACAGYCA	(Scala and Kerkhof, 1998)
		Nos1773R	ATRTCGATCARCTGBTCGTT	
Oxidadoras de amonio (AOB)	16S rRNA	CTO189fAB	GGAGRAAAGCAGGGGATCG	(Kowalchuk <i>et al.</i> , 1997b)
		CTO189fC	GGAGGAAAGTAGGGGATCG	
		CTO654r	CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC	
Oxidadoras de nitrito (NOB)	nxrA	nxrAF1370	CAGACCGACGIGTGCGAAAG	(Wertz <i>et al.</i> , 2008)
		nxrAR2843	TCCACAAGGAACGGAAGGIC	Grupo <i>Nitrobacter</i>
	nxtB	nxrBF916	GAGCAGGTGGCGCTCCCGC	(Lücker <i>et al.</i> , 2010)
		nxrBR1237	GTAGATCGGCTCTTCGACCTG	Grupo <i>Nitrospira</i>

Para llevar a cabo las amplificaciones de los fragmentos de interés, a partir tanto del DNA como del cDNA, se utilizó una DNA-polimerasa “TrueStart™ Hot Start” (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EEUU). Los cebadores y DMSO fueron provistos por Sigma Aldrich (St.

Louis, MO, EEUU), los dNTPs y NTPs por MBL (Córdoba, España), y la seroalbúmina bovina (BSA) por New England Biolabs, (Ipswich, MA, EEUU).

Las amplificaciones, en general, se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones de las correspondientes referencias (Tabla 2.1). Sin embargo, como ya se ha comentado en un apartado anterior (Apdo.3.1.2), la PCR a tiempo real constituye una técnica muy precisa, por lo que fueron necesarias algunas modificaciones para mejorar el rendimiento y calidad de la amplificación y evitar la formación de dímeros de cebadores. Todas ellas se realizaron en un volumen final de 25 µl y con las composiciones finales indicadas en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Composición de las mezclas de reacción para el recuento por amplificación a tiempo real de los fragmentos de interés de bacterias totales y bacterias degradadoras de compuestos nitrogenados.

	Bacteria (P1-P2)	Desnitrificantes (Nos)	AOB (CTO)	NOB (nxrA)	NOB (nxrB)
Tampón (200mM KCl)	52 mM KCl	20 mM KCl	24 mM KCl	48 mM KCl	48 mM KCl
Mg Cl ₂ (25mM)	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,75 mM	1,75 mM
dNTPs (10 mM)	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Albúmina (BSA) (10 mg/ml)	0,2 µg/µl	0,2 µg/µl	0,2 µg/µl	0,2 µg/µl	0,2 µg/µl
Cebadores (100mM)	0,8 mM	0,8 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,4 mM
DMSO + 2x SYBR®GreenI*	5X + 0,1 X	5X + 0,1 X	5X + 0,1 X	5X + 0,1 X	5X + 0,1 X
TrueStart™ Hot Start (5U/µl)	1 U	1 U	1 U	1,5 U	2,5 U

Igualmente, los programas de amplificación también fueron ligeramente modificados (Tabla 2.3). El ciclo final de extensión fue eliminado de todos los programas ya que aumentaba la cantidad de productos inespecíficos.

Tabla 2.3. Programa de temperaturas para el recuento por amplificación a tiempo real de los fragmentos de interés de bacterias totales y bacterias degradadoras de compuestos nitrogenados.

		Bacteria	Desnitrificantes	AOB	NOB	
		(P1-P2)	(<i>nosZ</i>)	(CTO)	(<i>nxrA</i>)	(<i>nxrB</i>)
Desnaturalización Inicial		95°C			5 min	
Amplificación (X 50 ciclos)	Desnaturalización	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C
		1 min	30 seg	30 seg	30 seg	40 seg
	Anillamiento de	55°C	50°C	57°C	61°C	59°C
	cebadores	1 min	1 min	1 min	45 seg	40 seg
	Elongación	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
		2 min	1 min	45 seg	25 seg	25 seg
Mantenimiento		4°C			∞	

2.2.4. PUESTAS A PUNTO:

Además del ajuste necesario para optimizar las amplificaciones, se realizaron otras pruebas previas al proceso de cuantificación por qPCR.

El estudio de las AOB se realizó basado en el gen rRNA 16S en lugar del gen funcional *amoA*, codificante de la enzima amonio monooxigenasa encargada directa de la oxidación del amonio a nitrito (Introducción General, Apdo.II.I). Inicialmente, se probó a llevar a cabo el presente estudio basado en dicho gen funcional con cebadores y condiciones previamente descritas (Nicolaisen and Ramsing, 2002) y testadas en estudios anteriores en nuestro laboratorio (Gómez-Villalba *et al.*, 2006). Sin embargo, la amplificación de los fragmentos de interés no resultó reproducible ni entre muestras ni para la misma muestra, por lo que se optó por una estrategia diferente.

En cuanto a las condiciones de reacción, se probó la amplificación con un kit comercial para qPCR “Maxima® SYBR Green qPCR Master Mix (2x)”

(Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las cuantificaciones realizadas con kits comerciales facilitan el trabajo, disminuyen el error manual y los resultados obtenidos deben ser más reproducibles. Sin embargo, impiden el ajuste fino de las concentraciones de los diferentes reactivos de amplificación necesarias especialmente para muestras complejas, además de suponer un coste mucho más elevado.

La prueba de amplificación con el kit comercial se llevó a cabo con algunas muestras del presente estudio y con distintas parejas de cebadores mencionados en la Tabla 2.1. Posteriormente fue comprobada en electroforesis en gel de agarosa, observándose amplificaciones inespecíficas además de la del fragmento de interés, o amplificación de un fragmento de distinto tamaño al esperado.

Por ello finalmente se optó por utilizar SYBR® Green I suplementado a las condiciones de PCR manuales ajustables. El SYBR®Green I se adicionó disuelto en DMSO ya que es más estable en estas condiciones que en solución acuosa. El DMSO ayuda a la desnaturalización del DNA durante la amplificación, especialmente en muestras complejas como las analizadas en este estudio. Sin embargo, ambos compuestos tienen la desventaja de que, superando ciertas concentraciones, inhiben la amplificación (Gudnason *et al.*, 2007). Se realizaron pruebas para distintas concentraciones de ambos, buscando el máximo rendimiento de amplificación a la máxima concentración de SYBR®Green no inhibitoria.

2.2.5. PREPARACIÓN DE PATRONES:

En la introducción de este capítulo (Apdo.2.1.2.3) ya se ha comentado que existen diferentes tipos de cuantificaciones, relativas o absolutas. En este estudio, al objeto de poder realizar una cuantificación absoluta, previamente al recuento, se procedió a la preparación de los patrones para cada uno de los genes diana.

2.2.5.1. Patrones de DNA:

De cada uno de los fragmentos diana, se realizó una amplificación por PCR convencional con los cebadores, mezclas de reacción y programas de temperaturas anteriormente descritos (Tablas 2.1, 2.2 y 2.3) pero sin adición de SYBR®Green I ya que, en este caso, el objetivo no era el recuento del número de copias.

Las copias de los genes obtenidas (insertos) se clonaron utilizando el kit “pGEM®-T Vector System II” (Promega, Madison, WI, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este kit contiene el plásmido pGEM®-T, las enzimas necesarias para la transformación y las células competentes (*E. coli* JM109) para la clonación. El plásmido confiere resistencia a la ampicilina a aquellas células transformadas, y permite la búsqueda de clones con el inserto de interés mediante la actividad del gen *lacZ* sobre placas de cultivo con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).

Una vez seleccionados 5 clones, se comprobó la presencia del inserto mediante amplificación y secuenciación del mismo. Para cada grupo bacteriano se eligió un representante, un clon cuyo inserto secuenciado presentó alta homología con bacterias del grupo en cuestión tras comparación con la base de datos GenBank mediante el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

Los clones representantes de cada grupo bacteriano se cultivaron en medio LB líquido (Sambrook *et al.*, 1989) y se incubaron en agitación a 37°C durante, al menos, 16 horas. Se recuperó la masa bacteriana mediante centrifugación y se procedió a la extracción de los plásmidos con “QIAprep Spin Miniprep kit” (Qiagen, Hamburg, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los plásmidos extraídos se linealizaron mediante digestión con una enzima de restricción presente en tan sólo uno de los extremos del plásmido, *SaI*I (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU). Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante y se comprobó el tamaño de vector linealizado más el inserto en electroforesis en gel de agarosa al 1% (80 V, 20

min). Finalmente se procedió a la cuantificación de DNA presente mediante espectrofotometría (BioPhotometer Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y al cálculo del número de copias del vector más inserto por μl (URI, 2004). Los plásmidos linealizados se conservaron a -20°C y se utilizaron posteriormente para las rectas patrón en cada uno de los recuentos por qPCR.

2.2.5.2. Patrones de RNA:

Los patrones para los recuentos de genes transcritos se prepararon a partir de los mismos clones anteriormente seleccionados. El plásmido pGEM®-T también presenta la secuencia del promotor de transcripción de la T7-RNA polimerasa y su lugar de inicio de transcripción (5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGG-3'). La enzima T7-RNA polimerasa (Invitrogen, Life Technolies Corporation, Carlsbad, CA, EEUU) es capaz de amplificar desde DNA a RNA. Se tomaron los plásmidos seleccionados como molde para la siguiente reacción:

Reactivos	Concentración final
Tampón 5X	1X
NTPs (10 mM)	1 mM
T7 RNA polimerasa (50U/ μl)	80 U
DNA molde	100 ng
Volumen final	100 μl

Las reacciones se incubaron a 37°C durante, al menos, 16 horas. Tras la incubación, se procedió a la purificación de RNA amplificado como se describe en el Apdo.2.2.2.3, con la resuspensión final en agua libre de RNasas. En este punto se midió la concentración de RNA obtenido en cada uno de los casos mediante espectrofotometría (BioPhotometer Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Posteriormente se procedió a una nueva purificación, pero esta vez resuspendiendo el RNA en formamida y conservándolo a -20°C .

Este RNA procedente de los plásmidos seleccionados se ha utilizado para las rectas patrón de las qPCRs basadas en RNA.

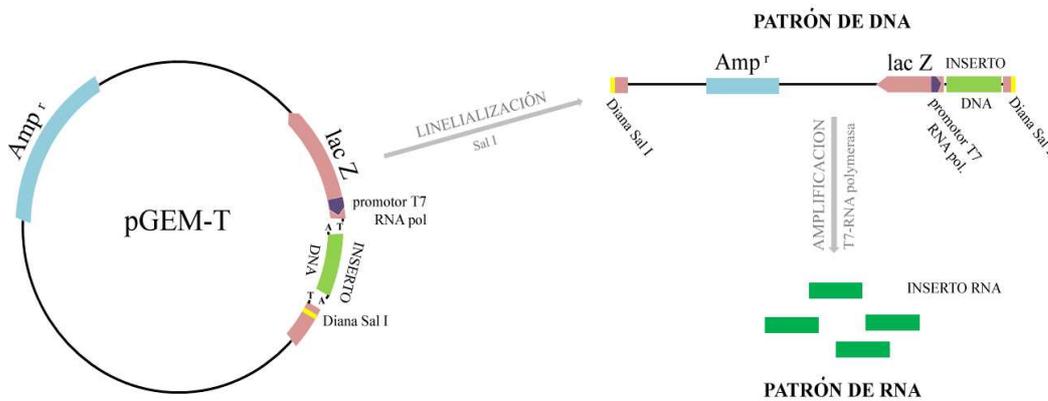


Fig. 2.3. Diagrama de la preparación de los patrones empleados para la cuantificación de genes de interés mediante qPCR.

2.2.6. CUANTIFICACIÓN DE LOS GENES DIANA:

El recuento del número de copias de cada uno de los genes diana en cada una de las muestras (Apado.2.2.1, Fig.2.2) se llevó a cabo en el termociclador “LightCycler® 480 System” (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania).

Para asegurarse de que las cuantificaciones de las copias de los diferentes genes diana fueran fiables, se establecieron diferentes puntos de control:

a. Amplitud de rango de ciclos umbral (Ct) para los patrones: las diluciones de patrones utilizadas en cada tanda de qPCR debían presentar un rango de ciclos umbral mayor que el rango de ciclos umbral de las muestras estudiadas.

b. Ciclo umbral (Ct) de los controles negativos de la amplificación: la amplificación de los controles negativos, si la hubiese, debió de ser al menos cinco Ct superiores a la amplificación de la última dilución del patrón.

c. Recta de calibrado: las rectas de calibrado debían ser de buena calidad, presentando altos coeficientes de regresión ($r^2 \geq 0,99$).

d. Curva de desnaturalización: (“Melting Curve”): al final de la amplificación la temperatura se baja a 60°C permitiendo que todo el DNA presente se encuentre en su estado renaturalizado de doble cadena. Posteriormente se comienza a subir la temperatura 2°C por minuto hasta los 95°C y se va midiendo la intensidad de fluorescencia emitida por SYBR® Green I cada 15 segundos. Lo que se obtiene son picos de desnaturalización, donde la intensidad de fluorescencia cae drásticamente a la temperatura de desnaturalización del fragmento dado.

Cada una de las muestras cuantificadas hubo de presentar un solo pico de desnaturalización a una temperatura dada. La variación entre las temperaturas de desnaturalización de cada muestra dentro de una misma carrera de qPCR tuvo que ser inferior a 2°C. En ninguno de los casos hubo de detectarse picos de desnaturalización en torno a los 60°C, correspondientes a dímeros de cebadores.

e. Geles de agarosa: Todas las amplificaciones se comprobaron en una electroforesis en gel de agarosa al 2%, asegurándose de que el fragmento amplificado en cada caso presentaba el tamaño esperado.

f. Control negativo de DNA: Para las muestras de RNA, se realizó un control adicional para asegurar que no había DNA contaminante. En reacciones independientes, el RNA recuperado de la formamida se sometió a una reacción de amplificación utilizando los cebadores universales para bacterias FD1 y RD1 (Weisburg *et al.*, 1991) y las condiciones descritas en el Capítulo 3, Apdo. 3.2.2.1.

Para cada uno de los genes de interés y por cada ácido nucleico (DNA y RNA) se montó una tanda de amplificación en una placa de 96 pocillos (LightCycler® 480 Multiwell Plates 96), con tres repeticiones por muestra y seis diluciones seriadas del patrón correspondiente en cada caso. El rango del número de copias del gen de interés en los patrones fue previamente testado

para que, en todos los casos, fuese mayor que el rango de copias del mismo en las muestras. Finalmente se incluyeron tres repeticiones de controles negativos sin molde. Con este diseño, se permitió cuantificar simultáneamente en todas las muestras y en una sola placa la abundancia de copias de cada uno de los genes diana, y para cada uno de los ácidos nucleicos (DNA o RNA).

Las mezclas de reacción y condiciones seguidas fueron las descritas previamente en el Apartado 2.2.3, con la adición de la curva de desnaturalización descrita previamente en este apartado.

2.2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó de forma similar a como se ha descrito en el Capítulo 1, Apdo.1.2.3. Brevemente, el análisis estadístico unidimensional se realizó empleando el paquete estadístico PASW Statistics 18 (SPSS INC., EEUU), utilizando el test no paramétrico de prueba de rangos de Wilcoxon para muestras relacionadas. El nivel de significancia se ha establecido en un 90% ($p < 0,10$). Los resultados de dichos análisis se muestran representados por diagramas de cajas (Box-and-Whisker plots).

Los patrones de distribución de la abundancia relativa de los grupos bacterianos del ciclo del nitrógeno a lo largo de las tres estaciones del año se estudiaron utilizando el escalado multidimensional no métrico (MDS) realizado con el software Primer (PRIMER-E, vs. 6.0, Plymouth, EEUU). Existe gran diferencia en el porcentaje del número de copias de genes o transcritos diana detectado en los diferentes grupos, por lo que fue necesario llevar a cabo una transformación severa (raíz cuarta) de estos datos biológicos (Clarke and Warwick, 2001). Posteriormente se estandarizaron y se creó una matriz de similitudes entre muestras basada en el coeficiente de Bray Curtis, a partir de la cual se generó la ordenación biológica en dos dimensiones (MDS). En los gráficos en los que se muestran burbujas, el tamaño de las mismas es proporcional a la abundancia relativa del grupo bacteriano representado.

El set de datos ambientales (variables del sistema) se transformó a $\log(x + 1)$ y normalizó para evitar interferencias en el posterior análisis debidas,

entre otras, a la diferencias de unidades de medida. Posteriormente, este set de datos pasó por los tres niveles de análisis descritos previamente en el Capítulo 1, Apdo.1.2.3.

De las variables descritas en la Descripción del sistema MBR, Apdos. B y D, en este capítulo fueron consideradas la IT, BOD₅, relación C/N expresada como COD/tN, el contenido de NH₄⁺ del agua influente, la concentración de sólidos en suspensión en el influente (iTSS, iFSS y iVSS) y la concentración de sólidos en suspensión en ambos biorreactores, aireado y anóxico (TSS, FSS y VSS).

2.3. RESULTADOS:

2.3.1. Fluctuaciones estacionales de las variables del MBR:

El estudio estadístico de los cambios estacionales de las variables del sistema está detallado anteriormente en la Descripción del sistema MBR, , Apdo.F.2. Adicionalmente, los resultados del análisis por rangos de Wilcoxon para el NH_4^+ en el influente solo revelaron diferencias significativas ($p < 0,10$) entre primavera y verano, con valores de $57,8 \pm 1,3$ mg/l, $40,2 \pm 12,7$ en verano y $46,4 \pm 10,2$ en otoño (Fig. 2.4). La **primavera** se caracterizó por las mayores cargas contaminantes presentes en el agua influente en general, y en concreto la concentración de amonio, que supone un 75% del nitrógeno total de entrada. En **verano** y **otoño** el amonio de entrada supuso un porcentaje mucho menor del nitrógeno total influente, en torno al 40% en ambas.

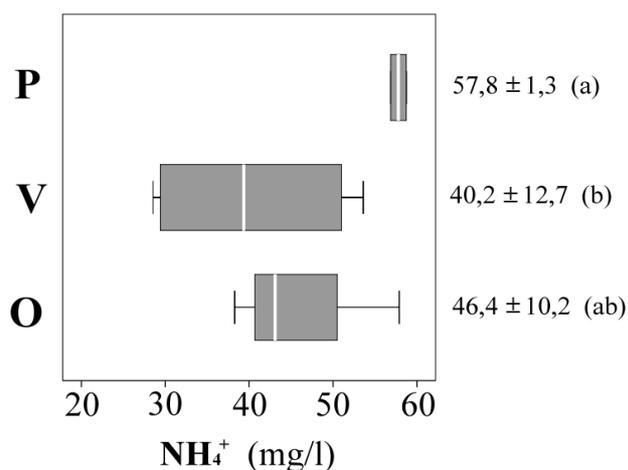


Fig. 2.4. Diagrama de cajas (Box-and-Whisker plots) de la concentración de amonio influente en el sistema MBR durante la primavera (P), verano (V) y otoño (O). En el gráfico, las cajas recogen el 50% central de los datos (entre los percentiles 25° y 75°), los extremos superiores e inferiores de las barras indican los percentiles 90° y 10°, la línea en el interior de la caja indica la posición de la mediana. Junto a las cajas aparece indicada la media \pm la desviación estándar en cada caso. Los datos seguidos entre paréntesis por la misma letra no son estadísticamente diferentes, según el test Wilcoxon ($p < 0,10$).

2.3.2. Cuantificación absoluta:

En la Figura 2.5 está representado, en escala logarítmica, el número de copias totales de la región V3 del gen codificante del rRNA 16S de **Bacteria** (abreviado a partir de ahora como rDNA 16S) o del rRNA 16S, expresadas respectivamente por ng de DNA o RNA, detectado en cada una de las muestras. En ambos casos se observó gran estabilidad a lo largo del tiempo, con una oscilación de las copias de rDNA 16S/ng de DNA o rRNA 16S/ng RNA entre 10^9 y 10^{10} . El test de rangos de Wilcoxon reveló que no existían diferencias significativas entre los dos biorreactores (aireado y anóxico) en cuanto al número de copias de la región V3 cuantificadas basándose en DNA o RNA (p -valor = 0,819 y 0,760 respectivamente), ni diferencias significativas entre cada uno de los ácidos nucleicos tomados como base para la cuantificación (DNA o RNA) en cada uno de los biorreactores (p -valor = 0,360 y 0,234).

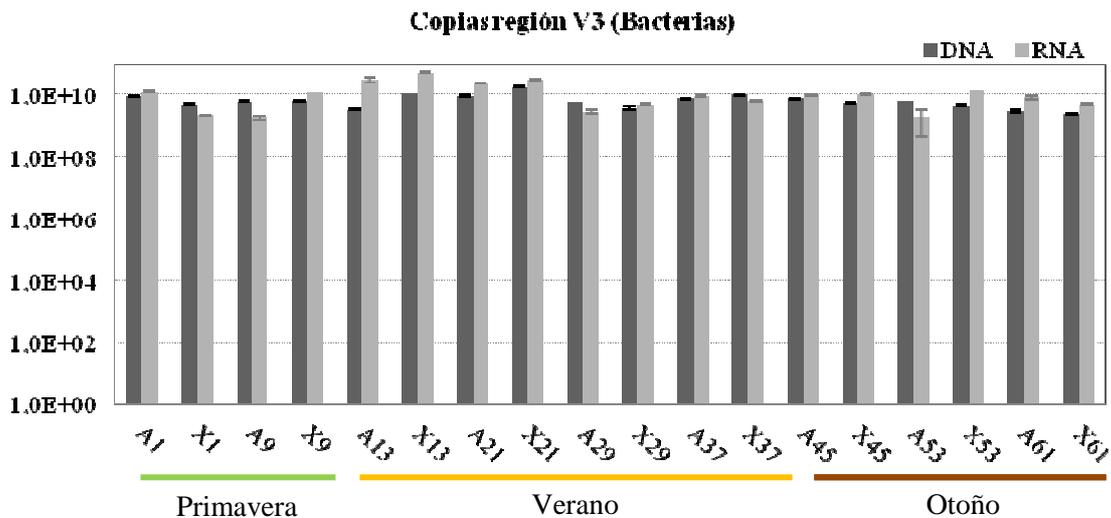


Fig. 2.5. Número de copias de la región V3 del rDNA 16S por ng de DNA y del rRNA 16S por ng de RNA, en escala logarítmica, detectado en cada una de las muestras. A: biorreactor aireado; **X:** biorreactor anóxico. Las barras de error representan la desviación estándar.

En la Figura 2.6 observamos la comparación entre el número de copias detectado de cada uno de los genes diana por ng de DNA total y de sus transcritos por ng de RNA total, para cada uno de los grupos de **bacterias** responsables de la eliminación de **compuestos nitrogenados** del sistema MBR. No se detectó la presencia de los genes *nxrA*, genes diana del grupo de NOB relacionados filogenéticamente con *Nitrobacter*, ni en las muestras de DNA ni en las de RNA.

En el resto de los grupos y en general, el número de copias de los genes diana por ng/DNA presenta pocas fluctuaciones a lo largo del periodo de muestreo. La fluctuación más importante detectada fue el aumento en dos órdenes de magnitud del número de copias del gen *nxB* entre el primer y segundo muestreos, manteniéndose sin grandes cambios posteriormente.

El número de transcritos/ng RNA de los genes diana muestra fluctuaciones mayores, especialmente para las bacterias oxidadoras de amonio (AOB), donde la oscilación máxima llega hasta casi los 5 órdenes de magnitud. Sin embargo, en los otros dos grupos bacterianos la oscilación es menor, en torno a 2 órdenes de magnitud.

Comparando los dos biorreactores, sólo se observaron diferencias significativas en el número de copias del rRNA 16S/ng RNA de las AOB, que fue un 30% superior en el biorreactor anóxico (p-valor = 0,08).

En la misma Figura 2.6 también se puede observar que en el caso de las bacterias desnitrificantes no hubo diferencias marcadas entre el número de copias de *nosZ*/ng DNA y el número de transcritos de *nosZ*/ng RNA, detectándose 4 copias del gen por cada copia del correspondiente mRNA (relación DNA/mRNA = 4). Al estudiar los grupos involucrados en la nitrificación, el test de rangos de Wilcoxon desveló diferencias significativas (p-valor < 0,03) en todos los casos entre la abundancia de copias de los genes diana y sus niveles de transcripción. Para las AOB, se detectó una media de 500 copias del 16S rRNA por cada copia del 16S rDNA en el BR aireado, duplicándose este número en el BR anóxico. En el caso de las bacterias oxidadoras de nitrito (NOB), el número de copias de los transcritos de *nxB* detectadas en las muestras de RNA fue en todos los casos más de un millón de veces superior al de las copias del gen detectadas en las muestras de DNA.

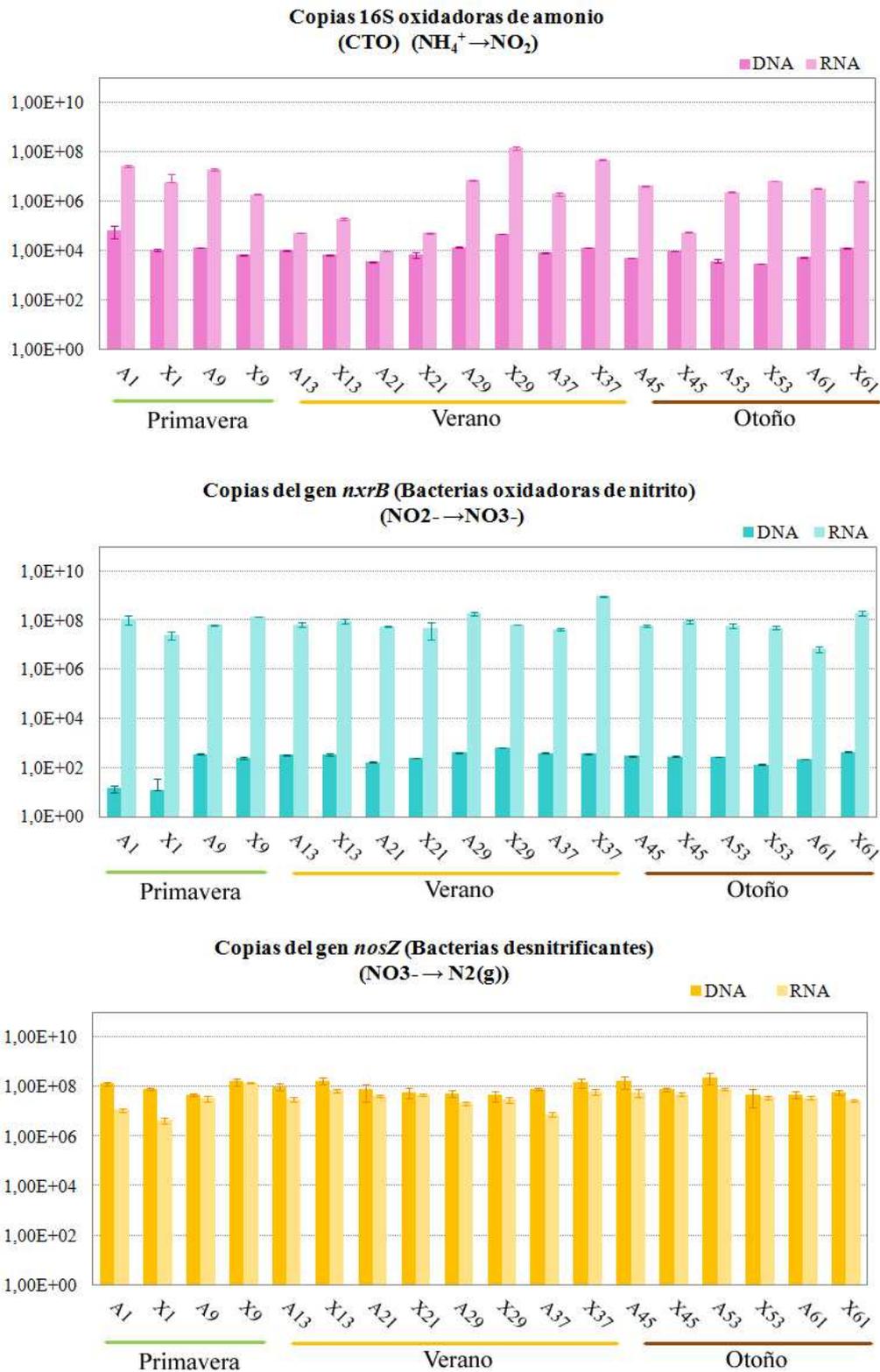


Fig. 2.6. Número de copias/ng de DNA o RNA, en escala logarítmica, para cada uno de los genes diana de las bacterias degradadoras de compuestos nitrogenados detectado en cada una de las muestras. **A:** biorreactor aireado; **X:** biorreactor anóxico. Las barras de error representan la desviación estándar.

2.3.3. Cuantificación relativa:

El número total de copias de los genes diana de bacterias del ciclo de nitrógeno o de sus transcritos en sí es poco informativo, por ello éste se refirió, para cada grupo de bacterias estudiado, como porcentaje de las copias de rDNA 16S o rRNA 16S detectadas en las mismas muestras con los cebadores universales para el Dominio Bacteria. Se ha de tener en cuenta para interpretar estos resultados que, de acuerdo con los datos disponibles, en las AOB *Nitrosomonas* y *Nitrospira* habitualmente sólo existe una copia del operón del RNA ribosomal (<http://rrndb.mmg.msu.edu/>). Asimismo, el gen *nosZ* se encuentra en una única copia en los genomas de las bacterias desnitrificantes estudiadas en este sentido (Palmer *et al.*, 2009). Finalmente, los estudios acerca del genoma de *Nitrospira* indican que es frecuente la presencia de dos copias de *nrxB*, cuyas secuencias son altamente similares (Lücker *et al.*, 2010).

Se observó (Fig.2.7) que el grupo bacteriano del ciclo del nitrógeno con mayor abundancia relativa en relación a las copias de rDNA 16S de las bacterias totales son las bacterias desnitrificantes, constituyendo alrededor del 1,6%, mientras que para ambos grupos responsables de la nitrificación (oxidadoras de amonio y de nitrito) dicha abundancia relativa está muy por debajo del 1% (0,0002 y 0,00001%, respectivamente). Sin embargo, cuando nos centramos en las poblaciones activas (qPCR a partir de muestras de RNA), el grupo más abundante pasa a ser las NOB, con un número de copias de transcritos de *nrxB* equivalente al 2,3% de las copias de la región V3 del rRNA 16S de Bacteria, seguido por las bacterias desnitrificantes (0,7%) y finalmente las AOB (0,3%).

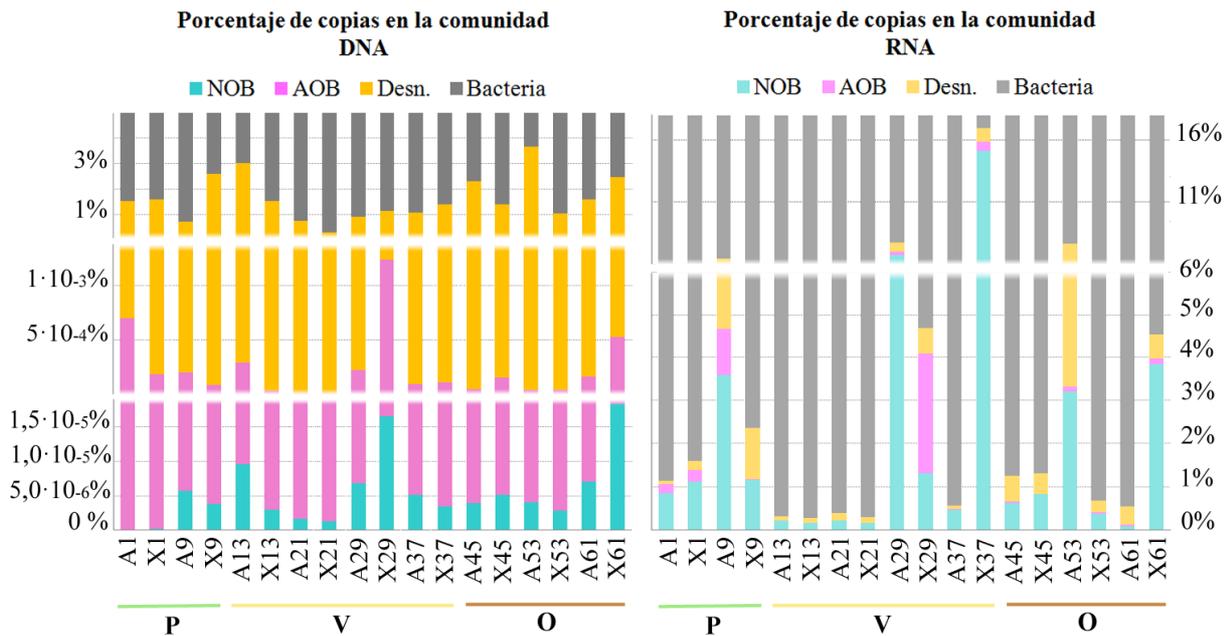


Fig. 2.7. Porcentaje del número de genes diana/ng DNA o transcritos diana/ng RNA de las bacterias degradadoras de compuestos nitrogenados expresado, respectivamente, en relación al total de copias/ng de rDNA 16S ó rRNA 16S de bacterias totales. A: biorreactor aireado; **X:** biorreactor anóxico. **P:** primavera; **V:** verano; **O:**otoño.

2.3.4. Variaciones estacionales de la cuantificación relativa:

Previamente al estudio multivariante, se realizaron análisis de estadísticos univariantes para ver si existían diferencias significativas en los porcentajes de copias de genes o transcritos diana de las poblaciones bacterianas degradadoras de compuestos nitrogenados entre las diferentes estaciones del año, entre los biorreactores del sistema MBR (aireado o anóxico) y entre los ácidos nucleicos tomados como base para la cuantificación (DNA y RNA).

El análisis de rangos de Wilcoxon para muestras relacionadas reveló que no existían diferencias significativas ($p < 0,10$) entre los **biorreactores** (Fig.2.8), excepto para el porcentaje de copias del rRNA 16S de las bacterias oxidadoras de amonio (AOB) detectadas en las muestras cuantificadas a partir de RNA, significativamente mayor en el biorreactor anóxico a lo largo de las tres estaciones anuales muestreadas.

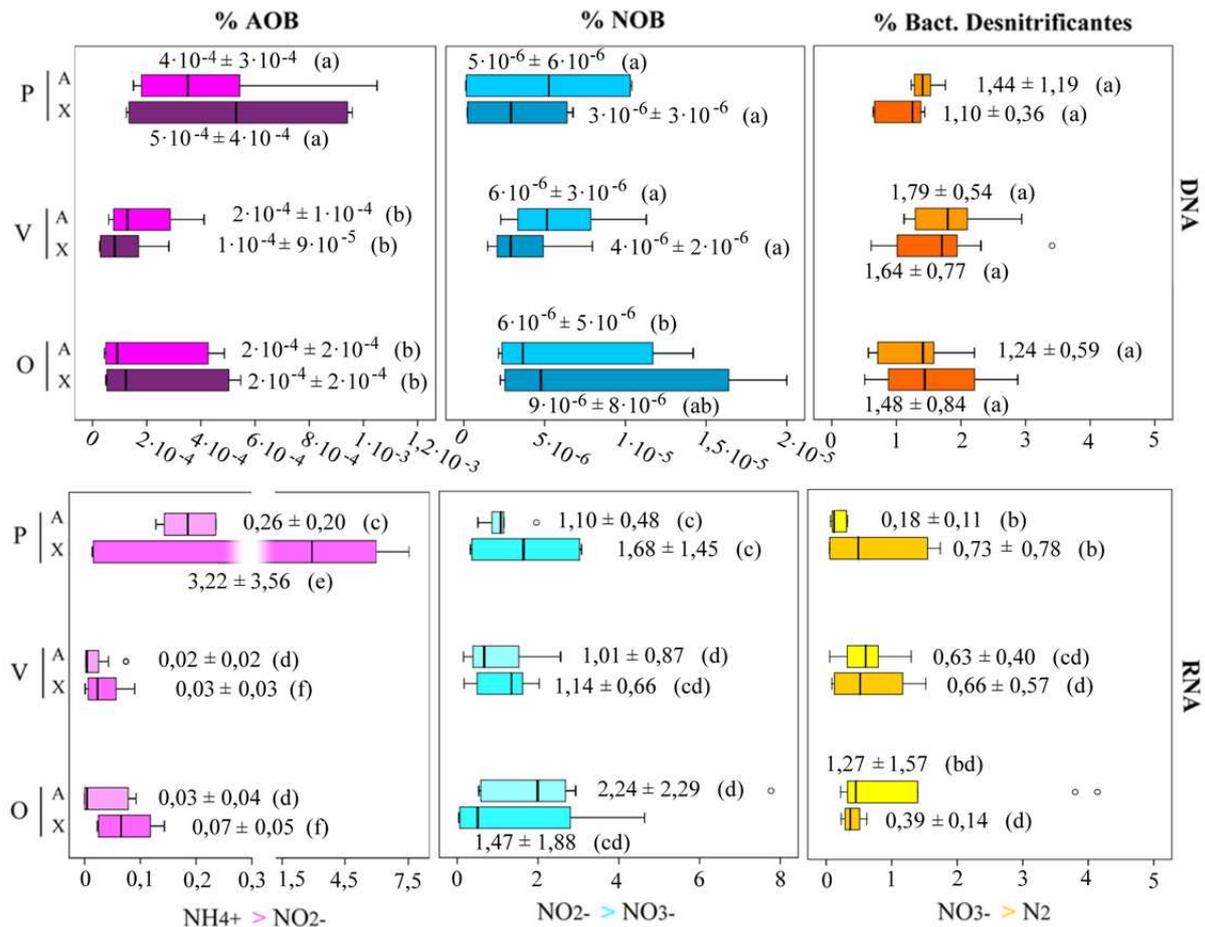


Figura 2.8. Diagrama de cajas (Box-and-Whisker plots) del porcentaje del número de copias de cada uno de los genes o transcritos diana de las bacterias degradadoras de compuestos nitrogenados, expresado respectivamente con respecto al total de copias/ng de rDNA 16S ó rRNA 16S de bacteria totales, en ambos biorreactores (aireado, A y anóxico, X) del MBR y durante la primavera (P), verano (V) y otoño (O). En el gráfico, las cajas recogen el 50% central de los datos (entre los percentiles 25° y 75°), los extremos superiores e inferiores de las barras indican los percentiles 90° y 10°, la línea en el interior de la caja indica la posición de la mediana y los círculos indican valores extremos o atípicos. Bajo las cajas aparece indicada la media \pm la desviación estándar en cada caso. Los datos seguidos entre paréntesis por la misma letra no son estadísticamente diferentes, según el test Wilcoxon ($p < 0,10$).

El análisis también confirmó que hay diferencias significativas en los porcentajes detectados de los distintos grupos bacterianos estudiados en función del **ácido nucleico** tomado como base para la cuantificación (Fig.2.8). Tanto para las AOB como las NOB el número de copias de los transcritos de los genes diana detectados son significativamente mayores que las copias de los propios genes, mientras que es justamente al contrario para las bacterias desnitrificantes.

Al realizar el análisis entre **estaciones** se observa que, en general, no existen diferencias significativas entre las muestras respecto al porcentaje de los genes diana, excepto de nuevo para las AOB, cuyo porcentaje de copias del 16S rDNA es significativamente mayor en primavera. De acuerdo con los porcentajes del número de copias del 16 rRNA, este mismo grupo también representa una proporción significativamente mayor de las poblaciones activas en primavera, en ambos biorreactores. Las bacterias oxidadoras de nitrito (NOB) presentan mayores porcentajes de transcritos del gen funcional *nxB* en otoño en el BR aireado. En cuanto a los porcentajes de transcritos del gen *nosZ*, indicativos de la actividad desnitrificante, en verano es cuando presentan las mayores medianas.

2.3.5. Análisis multivariante de la abundancia de las poblaciones bacterianas del ciclo del nitrógeno (MDS) y su relación con las variables del MBR (BIO-ENV):

La Figura 2.9 representa los escalados multidimensionales no métricos (MDS) de las muestras de lodo activo en cada uno de los biorreactores (aireado y anóxico) y para cada uno de los ácidos nucleicos tomados como base para la cuantificación por qPCR (DNA y RNA). Cada MDS refleja la distribución de las muestras de acuerdo con la similitud existente entre sus tres perfiles de abundancia relativa de copias de los genes o transcritos específicos de los grupos bacterianos del ciclo del nitrógeno. Cada vector indica la dirección y la fuerza con la que el grupo bacteriano representado se incrementa a lo largo de las muestras. El nivel de estrés representado en cada MDS indica lo bien que encajan los datos de abundancia relativa en la ordenación en dos dimensiones, considerándose valores por debajo de 0,05 como una excelente representación de su distribución (Clarke and Warwick, 2001).

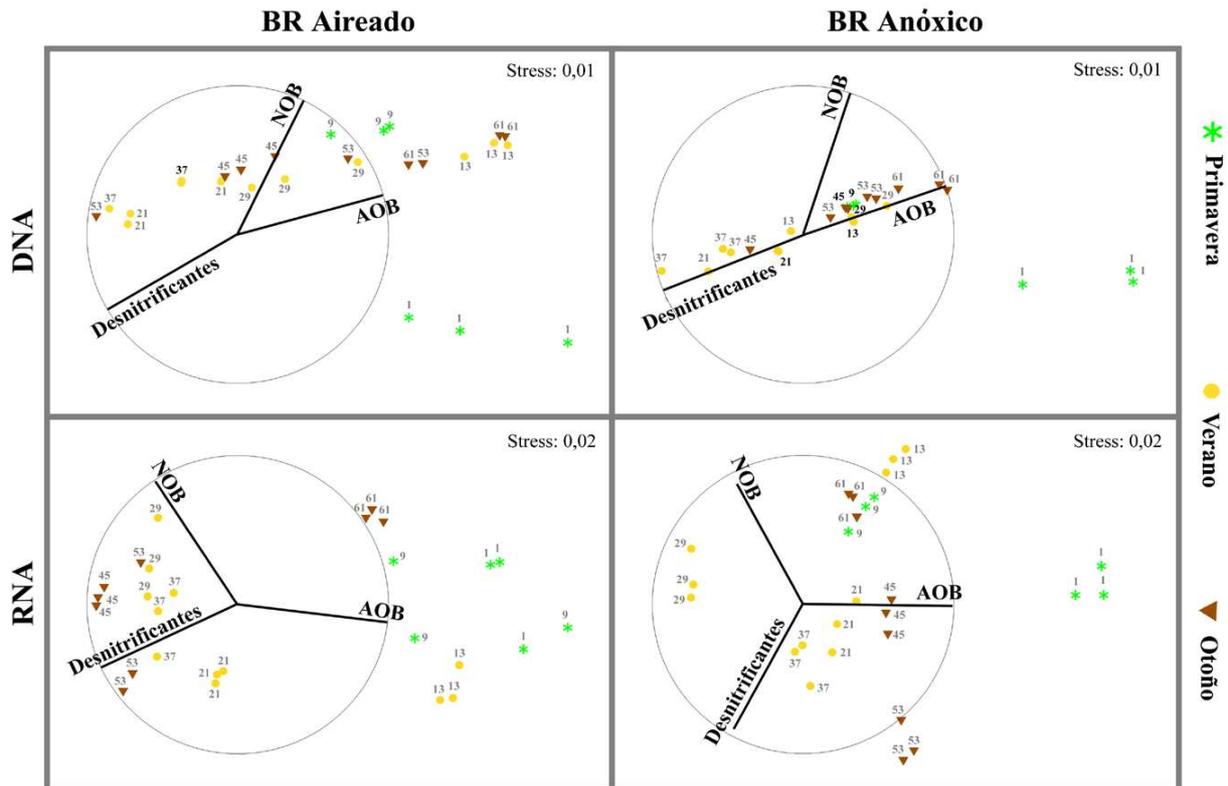


Fig. 2.9. Escalado multidimensional no métrico (MDS) mostrando la distribución de las muestras de lodo de ambos biorreactores (aireado y anóxico) y para la cuantificación por qPCR basada en ambos ácidos nucleicos (DNA y RNA) durante la primavera, verano y otoño del año 2009, según la similitud de sus perfiles de abundancia relativa de cada uno de los grupos bacterianos del ciclo del nitrógeno. Los números representan el mes de muestreo. Los vectores representan la dirección y el incremento a través de las muestras de la actividad representada. El bajo nivel de estrés (estrés < 0,05) representa lo bien que encaja la ordenación de los grupos bacterianos en dos dimensiones.

No se observa una ordenación clara de las muestras según estaciones, aunque en general, las tres repeticiones del primer día de muestreo, realizado en primavera, se sitúan más alejadas del resto de muestras en ambos BRs. Cuando la cuantificación se realizó a partir de DNA, esta primera muestra se caracteriza por la mayor abundancia relativa de copias de genes diana de AOB y la menor en el caso de NOB (Fig.2.10). En el BR anóxico, los datos de recuento de los transcritos del rRNA 16S indican que el número de poblaciones activas de oxidadoras de amonio es especialmente alto, mientras que disminuye posteriormente durante el resto del periodo. En el BR aireado el número de dichas poblaciones activas se mantiene elevado en las tres primeras muestras y la última, mientras que las poblaciones activas de

desnitrificantes se comportan de forma opuesta, dividiendo a las muestras en dos grupos claramente diferenciados. Esta tendencia opuesta entre las AOB y las bacterias desnitrificantes se observa también en los análisis de las muestras cuantificadas a partir de DNA.

La Figura 2.10 ilustra de nuevo los mismos MDS según cada uno de los ácidos nucleicos tomados como base para la cuantificación y el biorreactor, pero sobre cada una de las muestras se han superpuesto burbujas de tamaño proporcional al valor de la abundancia relativa del grupo bacteriano representado en cada caso. En esta Figura, los vectores representan la correlación entre las variables del sistema y la ordenación biológica, como se describió previamente en el Capítulo 1, Apdo.1.2.3. Las variables marcadas con el asterisco (*) indican la combinación de las mismas que mejor explica el patrón adquirido por las muestras según el análisis BIO-ENV (Best) y su valor aparece reflejado en cada MDS en la esquina inferior derecha.

En ambos BRs, el análisis de Draftman's plot detectó dos grupos de variables muy correlacionadas ($r > 0,90$), los $iTSS/ iVSS$ y TSS/ VSS . En todos los casos los representantes de cada uno de ellos, seleccionados mediante un análisis BIO-ENV preliminar, fueron los $iVSS$ y los TSS . En los MDS se han omitido aquellas variables que presentaron una correlación de Spearman inferior al 0,100 (longitud de vector $< 0,100$), estando incluida en este grupo en todos los casos la BOD_5 .

Al analizar los valores de BIO-ENV para cada variable independientemente, entre los tres valores más altos siempre se encuentra la IT y los $iFSS$. La excepción se presenta para el MDS de los datos basados en RNA en el BR aireado, donde los $iFSS$ no están representados debido a su baja correlación de Spearman, y el valor de Best disminuye ($\rho_s = 0,304$). De acuerdo con el mejor resultado combinado de BIO-ENV (Best) la ordenación de los datos biológicos se puede explicar mejor con las variables ambientales consideradas en el biorreactor anóxico, mostrando mayores valores de este índice ($\rho_s = 0,641$ para la qPCR basada en el DNA y $\rho_s = 0,731$ para la qPCR basada en el RNA) (Fig.2.10). En el caso del BR aireado, los valores de Best

son inferiores ($\rho_s = 0,426$ para la qPCR basada en el DNA y $\rho_s = 0,304$ para la qPCR basada en el RNA).

En todos los análisis se observa un comportamiento muy similar de los iVSS, el NH_4^+ y la relación C/N ($r > 0,8$) a través de la ordenación de los datos biológicos, aunque en el análisis preliminar de Draftman's plot no existe correlación directa entre estas variables.

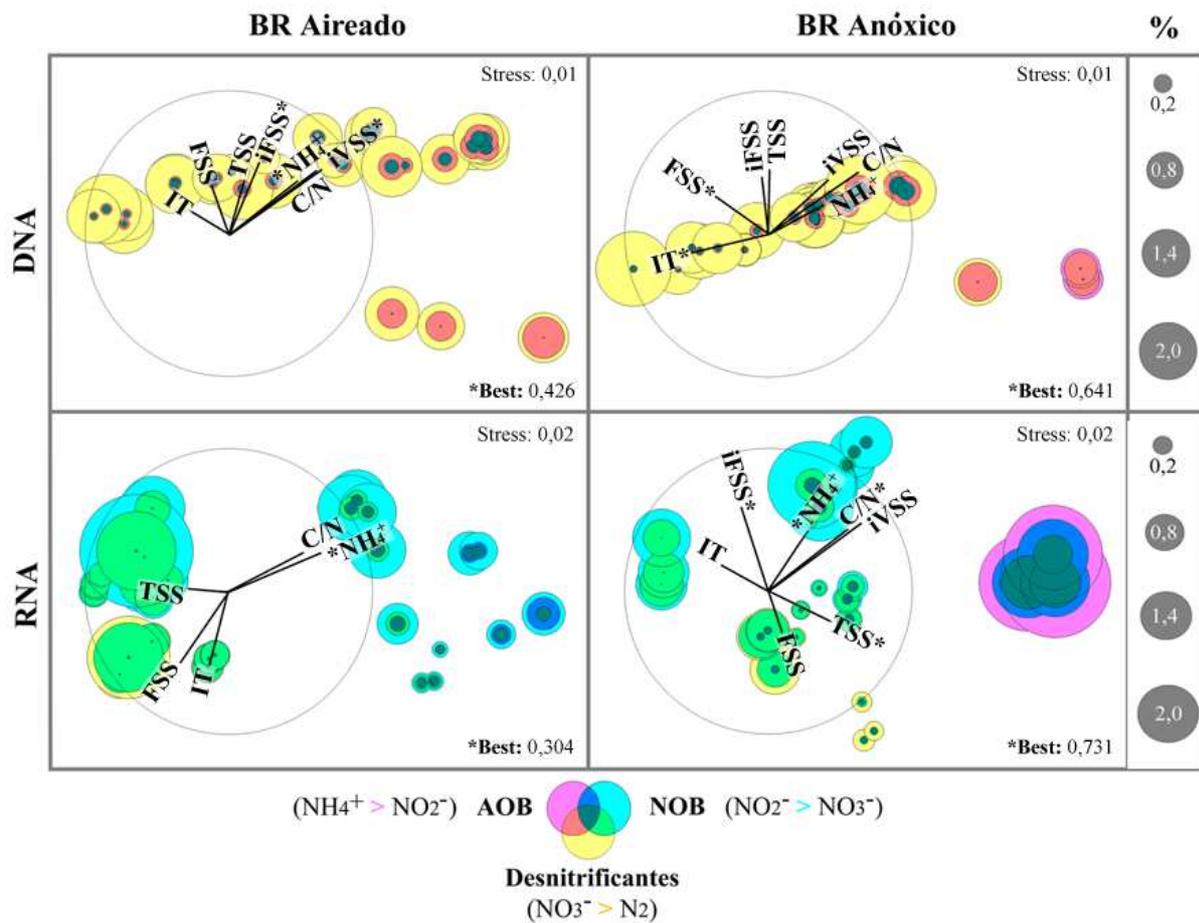


Fig. 2.10. Escalado multidimensional no métrico (MDS) de la distribución de las muestras en cada biorreactor y para cada ácido nucleico empleado para la cuantificación por qPCR, según la similitud de sus perfiles de abundancia relativa de cada uno de los grupos bacterianos del ciclo del nitrógeno. El bajo nivel de estrés (estrés < 0,05) indica que la ordenación de las muestras tiene una buena representación en dos dimensiones. El tamaño de las burbujas es proporcional al porcentaje del número de copias de cada uno de los genes o transcritos diana de las bacterias degradadoras de compuestos nitrogenados, expresado respectivamente con respecto al total de copias/ng de rDNA 16S ó rRNA 16S de Bacteria. La escala de las burbujas se muestra en la columna de la derecha (%). Los vectores muestran la dirección y fuerza con la que cada variable explica la distribución de las muestras. Vectores poco explicativos (longitud < 0,100) no se muestran en los gráficos. Las variables que, según el análisis de BIO-ENV, mejor explican la ordenación biológica aparecen marcados con un asterisco (*) y su valor aparece en la esquina inferior izquierda de cada MDS (*Best).

Se observó que el grupo de las **AOB** siempre presenta una correlación positiva con la concentración de amonio en el agua de entrada (NH_4^+), correlación especialmente marcada en los MDS representando las muestras cuantificadas a partir de DNA ($r > 0,9$) en ambos biorreactores. En el caso de los MDS representando las muestras cuantificadas a partir de RNA, la correlación es positiva en ambos BRs, si bien es mucho más elevada en el BR aireado ($r = 0,87$ en el BR aireado y $r = 0,53$ en el anóxico). Con la relación C/N y los iVSS la correlación de este grupo bacteriano siempre es positiva e igualmente más marcada en las muestras cuantificadas a partir de DNA ($r > 0,9$). Presenta correlaciones negativas con la IT en todos los casos, aunque únicamente es alta para las muestras del BR anóxico ($r < -0,80$).

En cuanto a las bacterias oxidadoras de nitrito (**NOB**), presentan siempre una alta correlación positiva con los iFSS ($r > 0,90$). En el caso de las muestras cuantificadas a partir de DNA, existe correlación positiva de su abundancia relativa con la C/N, concentración de iVSS y amonio en el influente, y los TSS, ($r > 0,70$, $r > 0,85$, $r > 0,70$ y $r > 0,95$ respectivamente).

Las bacterias **desnitrificantes** presentan una correlación negativa muy intensa ($r > 0,9$) con las tres variables con correlación alta entre sí (iVSS, concentración de NH_4^+ y la relación C/N).

2.4. DISCUSIÓN:

2.4.1. Tendencias generales de las poblaciones estudiadas:

Existen numerosos estudios previos de cuantificación de las comunidades de bacterias del ciclo del N en diversos ecosistemas, muchos de ellos realizados en plantas de tratamiento del agua residual. En la Tabla 2.4 se incluyen los valores medios obtenidos en este estudio expresados por litro de fango activo, para facilitar su comparación con la bibliografía preexistente.

El sistema MBR estudiado presenta una **comunidad bacteriana** numéricamente muy estable a lo largo del tiempo, tanto en relación a las poblaciones presentes como activas. Dicha estabilidad se mantiene también entre los biorreactores. Empleando como base la media de 3,6 copias de rDNA 16S por célula calculada en estudios realizados con bacterias en cultivos puro

(Harms *et al.*, 2003), el número total de células bacterianas por litro de fango activo se estima en torno a $1,87 \times 10^{16}$.

Tabla 2.4. Media del número de copias de cada uno de los genes o transcritos diana analizados en este estudio, expresados por litro de fango del sistema MBR

		Bacteria (16S)	AOB (16S)	<i>Nitrospira</i> (<i>nxrB</i>)	Desnitrificantes (<i>nosZ</i>)
Copias/l fango	DNA	$6,75 \times 10^{16}$	$1,31 \times 10^{11}$	$2,72 \times 10^9$	$9,73 \times 10^{14}$
	RNA	$3,82 \times 10^{16}$	$4,16 \times 10^{13}$	$3,50 \times 10^{14}$	$1,22 \times 10^{14}$

El número de copias del rDNA 16S de bacterias totales cuantificado en este estudio es mayor que el descrito en trabajos llevados a cabo en otros ecosistemas, por ejemplo, en zonas pantanosas (Sims *et al.*, 2012) donde la abundancia de la comunidad bacteriana fue 2 órdenes logarítmicos menor (10^{13} copias/kg de suelo). También se encuentran diferencias de 2 a 4 órdenes logarítmicos respecto a estudios realizados en plantas de tratamiento de agua residual de origen tanto industrial como urbano y basadas en diversas tecnologías, en los que se han detectado valores entre 10^{12} - 10^{14} copias de 16S rDNA de Bacteria por litro de fango activo (Baek *et al.*, 2010, Harms *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2011, Xia *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2010).

Las **comunidades** implicadas en el ciclo del **nitrógeno** estudiadas igualmente estuvieron **presentes** en el sistema de MBR, detectándose un número absoluto de copias de los genes diana similar en ambos biorreactores y de forma estable a lo largo de todo el periodo muestreado sin fluctuaciones muy marcadas. Estos grupos bacterianos, especialmente aquellos implicados en la nitrificación, son retenidos en el interior del sistema gracias al proceso de ultrafiltración, permitiendo que se desarrollen a pesar de su lento crecimiento. Las tasas bajas de crecimiento impiden fluctuaciones rápidas de la abundancia de estas poblaciones ante los cambios ambientales; sin embargo, su respuesta en cuanto a actividad se refiere es mucho más rápida, adaptándose de forma más inmediata a las condiciones del sistema (Aoi *et al.*, 2004).

La similitud entre **los biorreactores**, especialmente en relación a la cuantificación de las poblaciones presentes, puede justificarse en gran parte por la alta tasa de recirculación que presenta el sistema MBR (700%, Descripción del sistema MBR, Apdo.1.3). A la alta tasa de recirculación se une la organización estratificada de las poblaciones bacterianas en los flóculos, donde se crean microambientes que permiten el acople y la estratificación de las diferentes rutas metabólicas (Li and Bishop, 2003).

El tamaño medio de los flóculos de los sistemas MBR es inferior a los flóculos desarrollados en los CAS, pero los MBR presentan dos diferentes tipos de flóculos, a su vez con diferente tamaño (Judd, 2011). La presencia de microflóculos (5-20 μm) permite la mejor difusión de los nutrientes y parece estar implicada en mejorar el proceso de nitrificación (Ng and Hermanowicz, 2005). En los macroflóculos (60-240 μm) el oxígeno sólo es capaz de difundir hasta una profundidad de 100-150 μm , creando microambiente anóxicos en el interior (Judd, 2011, Li and Bishop, 2003, Massé *et al.*, 2006). El porcentaje entre ambos tipos de floculación varía según las condiciones operacionales. Uno de los parámetros directamente relacionado con el aumento de la proporción de macroflóculos es el SRT (Judd, 2006). Aunque en el curso de este estudio no se ha realizado la medida del tamaño de los flóculos, como se ha comentado anteriormente el SRT fue fijado en 20 días, superior al habitual (5-15 días) (Judd, 2011), por lo que el fango activo ha de estar dominado por macroflóculos con núcleos que permitan el desarrollo de procesos anóxicos aún en presencia de aireación.

Existen poco estudios previos que cuantifiquen la comunidad **desnitrificante** de WWTs empleando *nosZ* como gen diana. Los datos disponibles (Geets *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2011) indican una presencia de copias de este gen en el rango de 10^5 - 10^{12} por litro de fango, (dos órdenes de magnitud por debajo de la media de este estudio) mientras que la abundancia relativa de copias de *nosZ* respecto a las de rDNA 16S de Bacteria oscila entre el 0,1-4,8% dependiendo del tipo de sistema y naturaleza del agua residual tratada.

La comunidad desnitrificante está mayoritariamente formada por bacterias heterotrófas anaerobias facultativas. En condiciones de anaerobiosis o anoxia, son capaces de llevar a cabo la descomposición de la materia orgánica utilizando los nitratos como aceptor final de electrones, conllevando la expresión del gen *nosZ*, que codifica el último enzima activo de la ruta de desnitrificación. En condiciones de aireación, el núcleo anóxico de los macroflóculos proporciona un ambiente adecuado para que el proceso de desnitrificación pueda seguir llevándose a cabo, con la consecuente expresión del gen *nosZ*. Esto unido a la elevada tasa de recirculación puede justificar que no haya diferencia en la abundancia de poblaciones activas de reductores de N₂O entre los BRs. Adicionalmente, en fangos activos de plantas de tratamiento de aguas residuales con alternancia de las condiciones de aireación se han aislado bacterias capaces de realizar desnitrificación aeróbica (co-respiración con O₂, NO₂⁻ ó NO₃⁻) (Frette *et al.*, 1997), si bien la contribución de este proceso a la eliminación del N del agua residual está poco explorada.

En cuanto a la comunidad de oxidadoras de amonio, **AOB**, a pesar de su rol crucial en la eliminación de los compuestos de N, estas poblaciones están por lo general presentes en números bajos en los sistemas de WWT. El número medio de bacterias oxidadoras de amonio presente en el MBR es similar al descrito en estudios previos, que dan un rango de 10¹⁰-10¹² copias del 16S rDNA de AOB por litro de fango (Baek *et al.*, 2010, Geets *et al.*, 2007, Harms *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2011, Xia *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2010). Estudios basados en detectar el número de copias del gen funcional *amoA* proporcionan valores con una mayor oscilación, en el rango de 10³-10¹¹ copias *amoA*/l de fango (Baek *et al.*, 2010, Geets *et al.*, 2007, Harms *et al.*, 2003, Limpiyakorn *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2010). Sin embargo, cuando los datos de abundancia de las AOB se expresan en relación a la comunidad total de bacterias, éstos oscilan entre 0,0004-3% en diferentes estudios (Geets *et al.*, 2007, Harms *et al.*, 2003), estando los datos calculados en el presente trabajo en el límite inferior de ese rango.

Algunos de los estudios mencionados relacionan la mayor abundancia de las AOB con los SRT largos y la acumulación de sólidos en el bioreactor (Kim *et al.*, 2011, Ozdemir *et al.*, 2011, Yu *et al.*, 2010). Se ha descrito la necesidad

de un SRT de al menos 10 días para que se produzca el crecimiento de una comunidad nitrificante funcional (Huang *et al.*, 2001). En el sistema aquí estudiado el SRT fijado fue del doble, 20 días, favoreciendo el mayor crecimiento de estos organismos.

Hasta la fecha, no se han llevado a cabo muchos estudios de las poblaciones activas implicadas en el ciclo del nitrógeno mediante RT-qPCR, siendo los datos disponibles principalmente relativos a las comunidades de AOB. En experimentos realizados en un biorreactor nitrificante a escala de laboratorio y alimentado con agua residual artificial (Araki *et al.*, 2004), las poblaciones de AOB presentes y activas se detectaron en niveles similares a los del presente estudio (10^4 copias del rDNA 16S de AOB/ng DNA; 10^6 copias del rRNA 16S/ng RNA). La presencia de este alto número de poblaciones detectadas, en particular las poblaciones activas, explica la alta tasa de eliminación de nitrógeno llevada a cabo por el sistema MBR durante todo el periodo de muestreo (Fig.2.6).

No obstante, en comparación con los otros grupos diana estudiados, el número de poblaciones activas de AOB presenta oscilaciones mucho más marcadas a lo largo del tiempo. Además, en este caso sí se dan diferencias en la abundancia relativa de estas poblaciones entre los biorreactores, siendo esta un 30% superior en el BR anóxico. Este fenómeno ya fue observado en otro estudio de sistemas de WWT (Milner *et al.*, 2008), justificándolo a través de la capacidad de llevar a cabo el proceso de desnitrificación por parte de este grupo bacteriano bajo condiciones de limitación de O_2 . En el género *Nitrosomonas*, mayoritario en sistemas de WWT con alta concentración de amonio, se han descrito la presencia de genes homólogos de la nitrito reductasa y óxido nítrico reductasa, enzimas implicados en la desnitrificación (Chandran *et al.*, 2011). En el género *Nitrospira* también se ha descrito la capacidad de reducir el nitrito, sugiriendo que la desnitrificación es universal en las AOB (Kampschreur *et al.*, 2006). De hecho, parece ser que el proceso de desnitrificación constituye un parte importante en el crecimiento de este grupo bacteriano (Chandran *et al.*, 2011). Los cebadores utilizados en este trabajo para el recuento de poblaciones presentes y activas de las AOB son específicos

del gen rRNA 16S (Kowalchuk *et al.*, 1997b), por lo que la cuantificación engloba tanto a las que realicen respiración aeróbica como anaeróbica.

Los estudios disponibles cuantifican las **NOB** en plantas de WWT en el rango de 10^6 - 10^{10} y 10^4 - 10^{10} copias rDNA/l de fango para *Nitrospira* y *Nitrobacter*, respectivamente (Geets *et al.*, 2007, Harms *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2011, Xia *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2010). El cálculo de la abundancia relativa de estas poblaciones indica que fluctúan considerablemente dependiendo del sistema de WWT estudiado, entre 2×10^{-7} -13% en el caso de *Nitrospira* y 3×10^{-5} -0,17% en el caso de *Nitrobacter*. En el curso de este estudio, se ha detectado un número de copias del gen *nrxB* de *Nitrospira* dentro del rango descrito por otros autores (Tabla 2.4), si bien, como en el caso de la AOB, la abundancia relativa se encuentra cerca del límite inferior (1×10^{-5} %). No fue posible detectar copias del gen *nxA* de *Nitrobacter* en ninguno de los ensayos realizados.

Clásicamente se ha considerado a *Nitrobacter* y relacionadas como el grupo de NOB más relevante, sin embargo, los estudios mediante técnicas independientes de cultivo están revelando a *Nitrospira* y relacionadas como el grupo más diverso, abundante y ubicuo (Lücker *et al.*, 2010). De hecho, constituye el principal grupo de bacterias oxidadoras de nitrito en las WWT (Erijman *et al.*, 2011, Winkler *et al.*, 2012). *Nitrospira*, a pesar de su menor tasa de crecimiento, se ha mostrado más competitiva frente a *Nitrobacter* a menores concentraciones de nitrito y de oxígeno (Daims *et al.*, 2001, Juretschko *et al.*, 1998, Winkler *et al.*, 2012). En cuanto a la concentración de nitrito, en los sistemas biológicos de WWT la mayoría del nitrógeno entra en forma de amonio y urea, manteniéndose la concentración de nitrito a bajos niveles. Por otra parte, la estratificación de las poblaciones en la estructura de los flóculos permite la ubicación de las comunidades de *Nitrospira* en micronichos en microaerobiosis, desplazando así a *Nitrobacter* en este tipo de sistemas (Winkler *et al.*, 2012). La alta recirculación entre los biorreactores se apunta como la responsable del mantenimiento de las tasas de actividad del grupo bacteriano *Nitrospira* en el BR anóxico, ya que existe una concentración residual de oxígeno que puede ser utilizado por estas bacterias para continuar desarrollando su metabolismo.

2.4.2. Relación entre presencia y actividad: rendimiento energético del metabolismo:

Los recuentos relativos realizados en el presente estudio indican que, entre las poblaciones involucradas en el ciclo del nitrógeno, las bacterias desnitrificantes constituyen un mayor porcentaje respecto a las bacterias presentes que las poblaciones responsables del proceso de nitrificación. Sin embargo, la comunidad con mayor abundancia relativa de poblaciones activas resultó ser las NOB, seguidas por las bacterias desnitrificantes y las AOB.

Analizando el rendimiento energético de cada una de las rutas metabólicas, la desnitrificación es la más eficiente energéticamente, aportando unos 2662 kJ/mol de glucosa en total (Gerardi, 2006), seguida por la oxidación de amonio (278 kJ/mol de NH_4^+) y finalmente la oxidación de nitrito (82 kJ/mol NO_2^-) (Lam and Kuypers, 2011). En todos los casos, el rendimiento es menor que el de la energía proporcionada por la oxidación aeróbica de la glucosa (2871 kJ/mol) (Gerardi, 2006), explicando que la mayoría de las bacterias heterótrofas realicen la respiración aeróbica y que las nitrificantes sean bacterias de crecimiento lento. Así, el conjunto de las desnitrificantes, AOB y NOB constituye menos del 2% de la comunidad bacteriana total.

Además de poseer el metabolismo del nitrógeno más eficiente de los incluidos en este estudio, las bacterias desnitrificantes son bacterias heterótrofas, obteniendo energía y fuente de carbono a partir de la materia orgánica que oxidan. Por ello, con menor cantidad de enzimas activas, obtienen la energía necesaria para dividirse, siendo las más abundantes en presencia. De hecho, en esta comunidad se detectó 4 veces más copias del gen *nosZ* que transcritos del mismo. Las NOB presentan un metabolismo muy poco eficiente, por lo que necesitan sintetizar mucha mayor cantidad de enzimas activas, nitrito oxidoreductasa (NXR), para obtener la energía suficiente y llegar a dividirse. Este grupo bacteriano presentó un millón de veces más copias de transcritos que copias genómicas del gen *nxrB*. El caso intermedio lo presentan las AOB, con un rendimiento energético a partir de su metabolismo del nitrógeno algo más eficiente que el de las NOB, habiéndose

detectado por encima de 800 veces más copias del rRNA 16S que del gen que lo codifica.

2.4.3. Distribución de los datos de las poblaciones bacterianas del ciclo del nitrógeno presentes y activas, y su relación con las variables del sistema:

En los sistemas WWT las variaciones en los parámetros del proceso como el pH, la temperatura, la concentración de amonio y de nitrito, la disponibilidad de oxígeno disuelto y la presencia de compuestos tóxicos afectan a las poblaciones responsables de la eliminación de compuestos nitrogenados, mostrándose más sensible el proceso de nitrificación que el de desnitrificación (Kim *et al.*, 2011).

En este trabajo, se ha utilizado un análisis multivariante para estudiar la distribución del porcentaje de poblaciones presentes y poblaciones activas de tres grupos bacterianos implicados en la eliminación de compuestos nitrogenados en ambos biorreactores del MBR experimental. En general, las variables incorporadas en el análisis ofrecieron una buena explicación de las tendencias seguidas por las poblaciones. En todos los casos estuvieron alta y consistentemente correlacionadas con ellas, aunque mostrando patrones de correlación muy diferentes según se estudiase las poblaciones presentes (DNA) o activas (RNA).

A pesar de las diferentes características que presentan las tres estaciones anuales muestreadas, las variables del sistema oscilan dentro de un rango relativamente estrecho. Esta estabilidad del sistema hace que las variaciones en las poblaciones no sean tan marcadas y no exista diferencia clara entre las estaciones al estudiar las poblaciones presentes o activas de los tres grupos bacterianos del ciclo del nitrógeno en relación a la población bacteriana total. En general, las variables más explicativas tanto del perfil de las poblaciones presentes como del perfil de poblaciones activas estudiadas son la concentración de amonio y de sólidos fijos en el influente, la temperatura y la relación C/N (Fig. 2.10).

Según el análisis BIO-ENV, la **concentración de amonio** en el influente contribuye a explicar la distribución de las muestras tanto para las poblaciones presentes como activas, contribuyendo en casi todos los casos al valor de Best. La concentración de amonio mostró una correlación positiva y alta con la abundancia de poblaciones presentes tanto de las AOB como las NOB en ambos BRs, y negativa con la de las bacterias desnitrificantes (Fig. 2.10). Entre los muchos factores que influyen sobre la nitrificación en los tratamientos del agua residual, la abundancia de las poblaciones de AOB y NOB depende de la cantidad de sustratos disponibles para la obtención de energía. Las concentraciones de amonio y nitrito determinan la tasa de crecimiento de estos organismos, ya que siguen la cinética de Monod (Bitton, 2010). La relación positiva de la abundancia de AOB con el aporte de amonio en el influente ya ha sido previamente descrita en otros estudios (Horz *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2010)

Las poblaciones activas de AOB, cuantificadas por el número de copias del 16S rRNA, también se correlacionan positivamente con la concentración de amonio, siendo esta correlación más alta ($r= 0,87$) en el BR aireado (Fig. 2.10), que es el que reúne las condiciones teóricamente óptimas para la nitrificación. Araki *et al.* (2004) cuantificaron las poblaciones activas de AOB mediante qPCR tanto del 16S RNA como de los mRNA del gen *amoA* bajo distintas concentraciones de amonio, encontrando que el número de copias de rRNA 16S de las AOB permanecía constante, mientras que la expresión de *amoA* era fuertemente dependiente de la concentración de amonio. Resultados análogos fueron observados por Aoi *et al.* (2004). Es preciso considerar que estos trabajos se realizaron en bioreactores a escala de laboratorio y funcionando durante tiempos muy cortos. Las AOB son bacterias de crecimiento lento y precisan por tanto de estudios a largo plazo para observar cambios significativos en el incremento de su RNA celular, comparados con los cambios en los niveles de mRNA.

En la comunidad de NOB, tanto sus poblaciones presentes como activas aumentan en relación a la **concentración de sólidos fijos en suspensión**. Los sólidos en suspensión fijos engloban a los componentes inorgánicos que entran en el sistema MBR, entre ellos el nitrito, sustrato de estos organismos,

además de otros compuestos que puedan influir en las tasas metabólicas, como ácidos húmicos y tóxicos (Kim *et al.*, 2011). Sin embargo, en la bibliografía preexistente no se hace referencia a la relación entre las NOB y los sólidos en suspensión (Huang *et al.*, 2010).

La nitrificación es un proceso biológico fuertemente influenciado por la **temperatura**, considerándose el factor más determinante junto con el SRT (Gerardi, 2006). No obstante, las AOB y NOB cuantificadas en este estudio no se correlacionaron positivamente con esta variable, e incluso en el caso de las poblaciones presentes de las AOB hay una correlación negativa significativa con la temperatura en el BR anóxico (Fig. 2.10).

La desnitrificación puede tener lugar en amplio rango de temperaturas (5-50°C), con escasa influencia sobre el rendimiento del proceso (Bitton, 2010). Sin embargo, el rango óptimo de temperaturas para la nitrificación es de 25-30°C y la actividad de las bacterias nitrificantes se ve afectada negativamente por temperaturas bajas, en particular por caídas bruscas de este parámetro, más que por su descenso gradual (Bitton, 2010). El rendimiento de las bacterias nitrificantes comienza a disminuir significativamente por debajo de los 15°C (Kim *et al.*, 2006, Smith, 1997), de manera que a 10°C se reduce al 20% (Gerardi, 2006). Durante el periodo de muestreo estudiado en el MBR, la temperatura fluctuó entre los 15,3 y los 28,8°C, manteniéndose por lo tanto por encima de los valores críticos para la nitrificación. Adicionalmente, los SRT largos, como los empleados en el curso de este estudio, así como el aumento de la concentración de biomasa en el biorreactor, minimizan el efecto negativo de las temperaturas bajas al favorecer el incremento en el número de estos organismos, compensando así su menor rendimiento a temperaturas subóptimas (Gerardi, 2006). En relación con esto último, se observó una correlación positiva de las poblaciones de NOB presentes con los TSS (Fig. 2.10).

El número de AOB y NOB presentes en el sistema aumenta en ambos BRs con la **relación C/N** y las **concentraciones influentes de los sólidos en suspensión volátiles**. Las bacterias desnitrificantes sin embargo presentan una tendencia totalmente opuesta frente a las variables que representan la

materia orgánica influente, lo que se opone a lo que hay descrito en estudios previos (Bernet *et al.*, 2000, Kumar *et al.*, 2012). La correlación negativa de las poblaciones desnitrificantes con la C/N no parece tener conexión con una menor disponibilidad de sustratos carbonados biodegradables, pues la BOD₅ (carbonácea) no fue una variable relacionada significativamente con la distribución de las muestras en ninguno de los análisis MDS realizados (Fig. 2.10). La variación de la relación C/N está más conectada con la composición de la materia orgánica que con su abundancia, y la actividad desnitrificante no solo depende de la cantidad de materia orgánica disponible, sino también de su naturaleza (Barnes and Bliss, 1983).

Los estudios realizados en WWTs que eliminan simultáneamente compuestos de C y N demuestran que la materia orgánica no resulta tóxica para las bacterias nitrificantes, que en general la toleran bien. Sin embargo, un aumento de la concentración de los sustratos orgánicos puede provocar una disminución del O₂ disuelto, debido al incremento de actividad de los microorganismos heterótrofos, que muestran mayor afinidad por el O₂ (Bitton, 2010). En el sistema MBR empleado en el presente estudio, esta circunstancia se evita gracias a que la concentración de O₂ disuelto es controlada mediante la regulación automática de la aireación, para que se mantenga constantemente en un rango optimizado que garantice el proceso de nitrificación (Descripción del sistema MBR, Apdo.B.2). Algunos autores describen la estimulación del crecimiento y actividad de las bacterias nitrificantes cuando coexisten con los organismos heterótrofos, ya que éstos liberan factores de crecimiento y reducen los niveles de sustancias que pueden ser tóxicas para las AOB o NOB (Barnes and Bliss, 1983, Neufeld *et al.*, 1980).

En varios trabajos se ha evaluado la influencia de la relación C/N sobre la nitrificación y desnitrificación simultáneas en MBRs de configuración análoga al empleado en este estudio, con fases aireada y anóxica. Kumar *et al.* (2012) determinaron que los rendimientos de la nitrificación y desnitrificación se correlacionaban de manera opuesta con la relación C/N. Así, la nitrificación máxima tuvo lugar a C/N=2,5 y fue bajando el rendimiento a medida que se incrementa esta relación, mientras que la desnitrificación comienza a ser significativa a partir de una C/N=3. Estos autores concluyen que para la

nitrificación-desnitrificación simultánea, es óptima la relación C/N=8, alcanzando un 98% de eliminación de Nt en el efluente. La disminución de la abundancia relativa de las poblaciones de AOB desde C/N= 1 a C/N=9 fue sin embargo de sólo un orden de magnitud logarítmica, indicando menor repercusión sobre la presencia de estas bacterias que sobre su actividad. Otros estudios han demostrado que la relación C/N necesaria para lograr un rendimiento en la eliminación de N $\geq 70\%$ oscila entre 5 y 15 (Carrera *et al.*, 2004, Fu *et al.*, 2009a, Fu *et al.*, 2009b). Estos datos coinciden con los del presente estudio, ya que los valores de la relación C/N se mantuvieron casi siempre en dicho rango, y la eliminación media del N fue del 70%, (Descripción del sistema MBR, Apdo.F.1).

La eliminación biológica del N del agua residual requiere de un cuidadoso equilibrio de los factores que influyen sobre las distintas comunidades de bacterias implicadas. Por ejemplo, aunque la nitrificación es el paso límite del proceso, las tasas de desnitrificación se reducen bajo SRT largos (Barnes and Bliss, 1983). Adicionalmente, los flóculos proporcionan microambientes con gradientes de condiciones físicas y nutricionales variables, por lo que la interpretación de la influencia de las distintas variables del proceso sobre los microorganismos encargados de la eliminación biológica de N es compleja.

CAPÍTULO 3:

ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y DINÁMICA DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS EN EL MBR MEDIANTE *FINGERPRINTING*

3.1. INTRODUCCIÓN:

Como se ha descrito previamente en la Introducción General (Apdo. II), la comunidad bacteriana de los sistemas de WWTs es enormemente diversa y compleja, con gran capacidad de respuesta a los cambios ambientales y/u operacionales (Erijman *et al.*, 2011). Al ser dicha comunidad la directa responsable del proceso de depuración, el estudio y comprensión de su estructura y su respuesta a los cambios en las condiciones ambientales o parámetros de operación se hace indispensable para la optimización del proceso.

3.1.1. Análisis de comunidades microbianas complejas mediante métodos de *fingerprinting*. Electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE):

Las técnicas de “*fingerprinting*” o huella genética TGGE y DGGE son ampliamente utilizadas en ecología microbiana, y en particular se han aplicado con frecuencia al análisis de la estructura y dinámica de las comunidades microbianas en WWTs (Calderón *et al.*, 2012a, Cerrone *et al.*, 2012, Gomez-Silvan *et al.*, 2010). Con estas técnicas, los fragmentos de DNA con la misma longitud pueden ser separados según su secuencia. Dicha separación se basa en la disminución de la movilidad electroforética de una cadena de doble hélice de DNA parcialmente desnaturalizada en un gel de poliacrilamida sometido a un gradiente lineal de temperatura o de agentes desnaturalizantes. Para asegurarse de que la desnaturalización de las secuencias es parcial, se suele añadir una cola de guanina y citosina (G+C) a uno de los extremos de los fragmentos de DNA a separar, impidiendo que las dos hebras del DNA se desnaturalicen por completo. De esta forma, se pueden detectar teóricamente el 100% de las variantes de la secuencia en fragmentos de DNA de unas 500 pb (Muyzer and Smalla, 1998).

Para obtener los fragmentos de DNA de una misma longitud, previamente es necesario llevar a cabo una amplificación por PCR del fragmento de interés, mediante la selección de los cebadores específicos de dicha región. La cola de G+C se añade al extremo 5' de uno de los cebadores utilizados y suele presentar una longitud de 30 a 50 pb. Finalmente, en una comunidad microbiana compleja, lo que se obtiene es un patrón de bandas, un código de barras, donde el número de bandas se corresponde con el número de poblaciones predominantes de la comunidad, que constituyen al menos el 1% de la misma (Muyzer and Smalla, 1998).

Ventajas y desventajas:

Desde su invención, ambas metodologías, DGGE y TGGE, se han instaurado como técnicas fiables, rápidas y reproducibles, muy poderosas para la monitorización y seguimiento del comportamiento de la comunidad en

el tiempo o tras cambios ambientales. Se trata de técnicas semicuantitativas, ya que la intensidad de banda de cada una de las poblaciones detectadas guarda relación con la abundancia relativa de la misma en la muestra de origen (Brüggemann *et al.*, 2000).

Las bandas obtenidas se pueden extraer de los geles, reamplificarse nuevamente por PCR y secuenciar, por lo que proporcionan información filogenética de la composición de especies de comunidades complejas. Con respecto a esta cualidad, se presentan algunas limitaciones. Una de las principales es que el tamaño de fragmento que se puede separar es relativamente pequeño, de hasta unos 500 pb. Este pequeño tamaño hace necesaria la elección cuidadosa de los cebadores utilizados, para que el fragmento de interés proporcione la mayor información filogenética posible. La otra limitación es que a veces se produce co-migración de diferentes fragmentos, por lo que en una sola banda puede existir más de una secuencia diferente impidiendo la identificación de las poblaciones mediante secuenciación.

Otra desventaja de este tipo de técnicas es, como ya se ha comentado, que solo son capaces de detectar las poblaciones dominantes de la comunidad estudiada, concretamente aquellas que constituyen más del 1% de la misma. Sin embargo, seleccionando cebadores de grupos bacterianos específicos o genes funcionales de una determinada ruta se simplifican los perfiles de bandas y aumenta la sensibilidad de detección (Muyzer, 1999).

Debido a la plasticidad que presenta la técnica, se pueden estudiar no sólo las poblaciones presentes sino aquellas más activas. Ya en 1996 se llevó a cabo este tipo de comparación, basándose en el concepto de que los productos de PCR obtenidos del DNA ambiental indican la presencia de las poblaciones, y los productos de PCR derivados de la amplificación del cDNA obtenido por retrotranscripción del RNA ambiental indican las poblaciones bacterianas con mayores tasas de crecimiento y por tanto más activas (Felske *et al.*, 1996).

En este Capítulo, se describe el estudio de la estructura y dinámica de las comunidades bacterianas presentes y activas en el sistema MBR objeto de

este estudio a lo largo de los nueve meses de operación, que se realizó mediante **TGGE** acoplada a la amplificación parcial por **PCR** de los genes codificantes del rRNA 16S, a partir de DNA y RNA totales obtenidos de las muestras de fango de los dos BR del sistema.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS:

3.2.1. MUESTREO DE LOS BRs DEL MBR PARA EL ESTUDIO MEDIANTE TGGE:

Las condiciones del sistema MBR y las fechas del periodo de muestreo están previamente detalladas en la Descripción del sistema MBR, Apdo.E. El proceso de muestreo se llevó a cabo tal y como se describe en el Capítulo 2, Apdo.2.2.1.

La extracción y purificación del DNA y RNA de las muestras y su preparación previa a la amplificación por PCR se detalla previamente en el Capítulo 2, Apdo.2.2.2.

3.2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA TGGE:

3.2.2.1. Amplificación por PCR:

Para poder llevar a cabo el TGGE de cada una de las muestras es necesario realizar la amplificación de un fragmento de interés y disponer de suficiente concentración de producto para que, al separarse las distintas bandas, éstas sean detectables. Por ello, la preparación de las muestras para el TGGE se realizó mediante dos amplificaciones acopladas. En la primera amplificación, el fragmento diana fue el gen del rRNA 16S del dominio Bacteria, amplificado a partir de DNA o del cDNA procedente de la retrotranscripción del RNA. Para ello, se utilizaron cebadores universales para este dominio, que amplifican casi la total longitud del gen. Posteriormente, el producto de esta PCR se utilizó como molde para una segunda amplificación, PCR anidada, cuyo fragmento diana es la región hipervariable V3 del rRNA 16S. Este último fragmento, en *E. coli*, es de 193 pb, tamaño susceptible de ser separado en TGGE.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de **50µl**, con Ampli Taq Gold polymerase (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU), los desoxiribonucleótidos (dNTPs) suministrados por MBL (Córdoba, España), seroalbúmina bovina (BSA) de New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU), dimetilsulfóxido (DMSO) y cebadores de síntesis de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). La segunda amplificación se realizó por triplicado para cada una de las muestras.

Los cebadores utilizados para las amplificaciones fueron los siguientes:

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Longitud del PCR amplicón	Referencia
fD1 (8F)	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGC TCAG	1532 pb	1 ^a (Weisburg <i>et al.</i> , 1991)
rD1 (1540R)	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGC C		
P1-GC (341F-GC)	<u>CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGG</u> <u>GCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG</u>	233 pb	2 ^a (Muyzer <i>et al.</i> , 1993)
P2 (534R)	ATTACCGCGGCTGCTGG		

En el cebador P1-GC aparece subrayada la secuencia de 40 pb de guanina y citosina necesaria para la desnaturalización parcial de los fragmentos durante el TGGE, permitiendo la separación de los mismos.

Las condiciones de amplificación fueron:

Reactivos			Programa			
1ª PCR	Tampón (KCl)	50 mM	Desnaturalización inicial	95°C	7'	× 25 ciclos
	Cl ₂ Mg	1,5 mM				
	dNTPs	0,2 mM	Desnaturalización	94°C	1'10"	
	BSA	8 ng/μl	Anillamiento	56°C	40"	
	DMSO	5 %	Elongación	72°C	2'	
	Cebador FD1	0,4 nM				
	Cebador RD1	0,4 nM	Extensión final	72°C	6'10"	
	Taq	1 U				
	Molde DNA	1μl de dilución 1/10	Mantenimiento	4°C	∞	
	cDNA	2μl				
2ª PCR	Tampón (KCl)	50 mM	Desnaturalización inicial	95°C	7'	× 10 ciclos
	Cl ₂ Mg	1,5 mM	"Touch down"	Desnaturalización	94°C 1'	
	dNTPs	0,2 mM			65°C 1'	
	BSA	8 ng/μl		Anillamiento	-1°C por ciclo	
	DMSO	5 %		Elongación	72°C 2'	
	Cebador GC-P1	0,4 nM		Desnaturalización	94°C 1'	
	Cebador P2	0,4 nM		Anillamiento	55°C 2'	
	Taq	1 U		Elongación	72°C 2'	
	Molde:			Extensión final	72°C 10'	
	producto PCR	1μL		Mantenimiento	4°C ∞	

Tras cada una de las amplificaciones, se comprobó el tamaño de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, al 1% para la primera PCR y al 2% para la segunda.

3.2.2.2. Concentración y purificación de los productos de PCR:

Antes de someter los productos de PCR a TGGE se procedió a la purificación y concentración de los mismos mediante columnas de filtración dotadas con una membrana de corte molecular de 30 kDa (Centrifugal filters, VWR, Radnor, Pensilvania, EEUU), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Tras el proceso, se volvió a comprobar en gel de agarosa (al 2%) y se midió la concentración y calidad del DNA mediante NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Se conservaron a -20°C hasta su procesamiento en TGGE.

3.2.3. TGGE:

3.2.3.1. Composición del gel:

La electroforesis en gel con gradiente de temperatura se realizó empleando el sistema TGGE MAXI (Watman-Biometra, Goettingen, Alemania). Para la separación de los distintos fragmentos, se emplearon geles desnaturalizantes de poliacrilamida, preparados en agua MilliQ, con la siguiente composición:

Reactivos	Concentración
Poliacrilamida-bisacrilamida 37,5:1	6 %
Urea, grado biología molecular	8 M
Formamida desionizada	20 %
Glicerol	2 %
Buffer tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM (TAE) pH 8,0	1×
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamina (TEMED)	0,06 %
Persulfato amonico	0,06 %

Todos los reactivos utilizados fueron suministrados por Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EEUU), excepto el tampón TAE y el TEMED que fueron adquiridos de la casa comercial AppliChem (Darmstadt, Alemania).

3.2.3.2. Condiciones de electroforesis:

Para la electroforesis se empleó tampón TAE (2×). Se cargaron en torno a 4 µg de DNA de cada una de las muestras. El tampón de carga empleado (9×) se preparó con: 0,5 % tritón X-100, 0,05 % azul de bromofenol, 0,05 % xilencianol, EDTA 10 mM, y tampón TAE 10×. Todos los reactivos del tampón de carga fueron suministrados por Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EEUU), excepto el tampón TAE (AppliChem, Darmstadt, Alemania).

Al tratarse de un número de muestras elevado y al objeto de permitir la comparación de muestras analizadas en diferentes geles de TGGE, se utilizó una muestra común como **marcador interno** en todo los geles, que permitiera su posterior normalización. Fue la muestra de DNA tomada del BR aireado en el primer día del análisis (muestra A1) la elegida a tal fin.

Las condiciones de la electroforesis para separar los fragmentos amplificados fueron las siguientes:

Migración inicial de las muestras	Rango de temperatura	20°C – 20°C
	Voltaje	300 V
	Tiempo	18'
Establecimiento del gradiente de temperatura	Rango de temperatura	45°C – 65°C
	Voltaje	0 V
	Tiempo	10'
Electroforesis	Rango de temperatura	45°C – 65°C
	Voltaje	125 V
	Tiempo	

3.2.3.3. Tinción y conservación de los geles:

Tras la electroforesis en gel, existen diversos métodos de tinción y revelado del gel, como el bromuro de etidio o el SYBR® Green I. Sin embargo, la técnica de tinción más sensible es la **tinción con plata**, que además permite conservar los geles teñidos para posteriores observaciones.

En este estudio, fue esta última metodología la utilizada, empleando el kit “Gel Code Silver Staining” (Pierce-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la conservación de los geles tras la tinción, se sumergieron en una solución de glicerol al 0,05 % durante 10'. Se enjuagaron para eliminar el exceso de glicerol y se dejaron secar al aire.

3.2.4. SECUENCIACIÓN DE LAS BANDAS OBTENIDAS:

3.2.4.1. Reamplificación de las bandas separadas mediante TGGE:

Las bandas individuales visualizadas en los geles mediante tinción de plata se punzaron en su parte central con una punta de pipeta estéril, y el fragmento así extraído se suspendió en 10 µl de agua bidestilada grado PCR, en tubos de 0,2 ml para PCR. Partiendo de estos fragmentos como molde, se efectuó la reamplificación de cada banda individual mediante PCR, siguiendo el mismo procedimiento ya descrito en el apartado 3.2.2.1, para la 2ª PCR, pero con el primer P1 sin la cola de GC. Posteriormente se comprobó dicha amplificación en una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

3.2.4.2. Concentración y purificación de los productos de la reamplificación:

Todos los productos procedentes de la reamplificación se purificaron y concentraron mediante el kit comercial “QIAquick PCR purification kit” (Quiagen, Hamburgo, Alemania) resuspendiéndolos en un volumen final de 20 µl. Posteriormente se midió la concentración y calidad del DNA mediante NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y se conservaron a -20°C hasta su secuenciación.

3.2.4.3. Secuenciación de los fragmentos de DNA reamplificados:

Los productos así purificados fueron secuenciados, empleando el cebador P2 (Apdo. 3.2.2.1). La secuenciación de DNA de doble cadena fue efectuada por el Servicio de Secuenciación de la Estación Experimental del Zaidín (eez, Granada) mediante el equipo ABI-PRISM® 3130XI Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU).

3.2.4.4. Análisis informático de las secuencias:

Los datos de secuencia de DNA obtenidos fueron analizados mediante el programa informático de libre distribución *Chromas* v. 1.51.

Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias conocidas indexadas en la base de datos GenBank del servidor web del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2012), mediante la herramienta “BLAST” (Altschul *et al.*, 1997).

Para llevar a cabo los alineamientos de las secuencias se empleó el programa *Clustal X v. 2.0* (Jeanmougin *et al.*, 1998) utilizando los parámetros por defecto.

El cálculo de las matrices de distancia entre las secuencias y la construcción de los árboles filogenéticos mediante el método *Neighbour-Joining* (Saitou and Nei, 1987), se realizó con el software de libre distribución *MEGA4* (Kumar *et al.*, 2001). Los valores de confianza se calcularon mediante el método de muestreo con reemplazamiento (método *Bootstrap*) (Felsenstein, 1985), y los porcentajes superiores al 50% aparecen reflejados en los árboles filogenéticos correspondientes.

3.2.5. ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE BANDAS OBTENIDOS POR TGGE:

Para establecer las relaciones entre los patrones de bandas obtenidos mediante TGGE en las distintas muestras, se realizó un análisis de clústeres.

Las imágenes de los geles se normalizaron, compararon y analizaron con el programa *Gel Compar II v. 5.101* (Applied Maths, Bélgica). Los patrones de bandas se compararon utilizando un índice de similitud dependiente de la asignación de bandas, el Coeficiente de Dice. Este coeficiente establece la similitud de los perfiles teniendo en cuenta la posición relativa de las bandas sin tener en cuenta su intensidad (Lin *et al.*, 2005). En la asignación de las bandas, se permitió una tolerancia del 1% de la longitud total del gel, esto es, el margen máximo permitido para que dos bandas presentes en dos carriles distintos se consideren a la misma altura (es decir, pertenecientes a una misma clase de banda).

Los dendrogramas que relacionan la similitud de los distintos perfiles de bandas de las muestras se construyeron mediante el método UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*). Para la evaluación de la fiabilidad de los dendrogramas, se utilizó el método del coeficiente de correlación cofenética, que expresa la consistencia de un clúster calculando la correlación entre similitudes del dendrograma y la matriz de distancia por pares (Sokal and Rohlf, 1962).

Además, como descriptivos del sistema, se calcularon los diferentes índices descritos para DGGE (Marzorati *et al.*, 2008) y posteriormente adaptados a TGGE (Gomez-Silvan *et al.*, 2010) y el índice de diversidad de Shannon (Shannon and Weaver, 1963). Todos ellos se calcularon a partir de los datos obtenidos en el análisis de imágenes de los geles con el programa *Gel Compar II v. 5.101* (Applied Maths, Bélgica).

El primer índice descrito por Marzorati *et al.* (2008) es el **rango ponderado de riqueza, Rr**, que refleja la capacidad de un sistema para alojar poblaciones, calculado con el número de clases de banda detectadas en cada muestra y el rango de temperatura necesario para separar dichas bandas (Gomez-Silvan *et al.*, 2010):

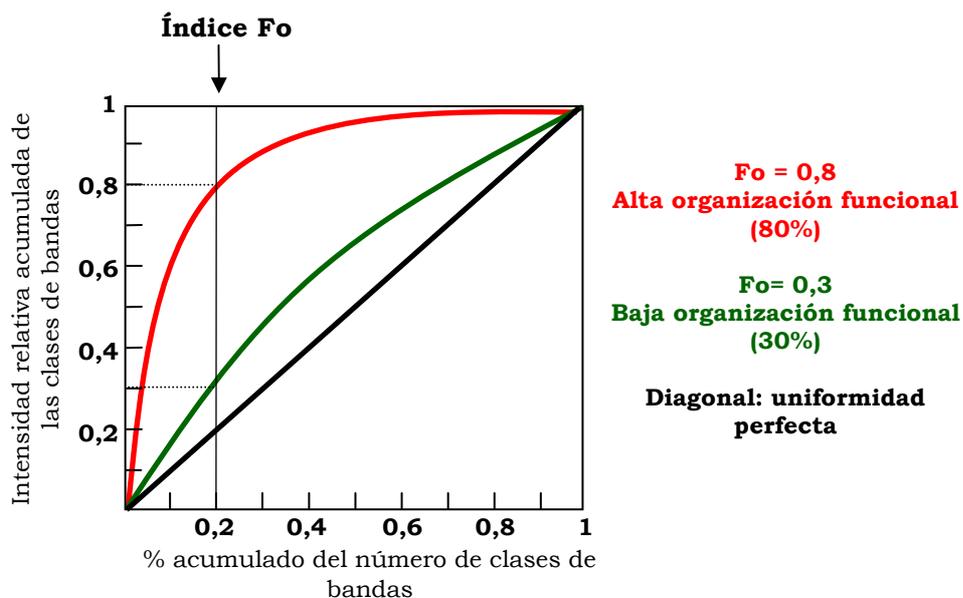
$$Rr = (N^2 \cdot \Delta T) / 100$$

N = número de clases de banda del carril

ΔT = diferencia entre la temperatura final e inicial en °C

El segundo índice de Marzorati es el índice de **organización funcional**, **Fo**, que define la relación entre estructura y funcionalidad de una comunidad microbiana. Este índice da una estimación de lo especializada que está una comunidad compleja de organismos.

El índice Fo se calcula en base a las curvas de distribución de Pareto-Lorenz donde, para cada muestra, se representan las intensidades relativas acumuladas de las clases banda detectadas, ordenadas decrecientemente (eje *y*), frente al porcentaje acumulado del número de clases de banda (eje *x*). El valor de Fo resulta de la proyección en el eje *y* (abundancia relativa acumulada) de la intersección de la curva de Pareto-Lorenz con la línea correspondiente al 20% del número de clases de banda (eje *x*) (Marzorati *et al.*, 2008):



El índice de **diversidad de Shannon**, **H'**, tiene en cuenta ambos parámetros a la vez, tanto la riqueza en especies como la abundancia relativa de cada una de ellas. Es uno de los índices de diversidad más empleado en estudios ecológicos de comunidades, y aplicado al análisis mediante TGGE, para cada muestra se calcula según la siguiente ecuación:

$$H' = - \sum_{i=1}^S (p_i \cdot \ln p_i)$$

p_i = abundancia relativa de cada banda en una misma muestra
 S = número total de bandas en una misma muestra

Por último, el índice de **dinámica** de Marzorati, **Dy**, nos indica la estabilidad de la comunidad microbiana a lo largo del tiempo. Se calcula el porcentaje de cambio de la comunidad en intervalos de tiempo fijos (7 días en este estudio). El porcentaje de cambio se obtiene a partir de la matriz de similitudes entre muestras generada por el programa Gel Compar II. Para cada par de muestras consecutivas se calcula:

$$\% \text{ cambio} = 100 - \% \text{ similitud}$$

En conjunto: $Dy = \frac{\% \text{ cambio}}{\text{intervalo de tiempo}}$

3.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS:

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó de forma similar a como se ha descrito en el Capítulo 1, Apdo.1.2.3. Brevemente, el análisis estadístico unidimensional se llevó a cabo con ayuda del paquete estadístico PASW Statistics 18 (SPSS INC., EEUU), utilizando el test no paramétrico de prueba de rangos de Wilcoxon para muestras relacionadas. El nivel de significancia se ha establecido en un 90% ($p < 0,10$). Los resultados de dichos análisis se muestran representados por diagramas de cajas (Box-and-Whisker plots).

Los patrones de distribución de las poblaciones bacterianas presentes y activas en el fango del MBR a lo largo de las tres estaciones del año se estudiaron utilizando el escalado multidimensional no métrico (MDS) realizado con el software Primer (PRIMER-E, vs. 6.0, Plymouth, EEUU). Se realizaron dos estudios de los datos biológicos: teniendo en cuenta la abundancia relativa de las bandas detectadas, o tan sólo la presencia y ausencia de las mismas (incidencia). En el estudio basado en la abundancia relativa, los datos se transformaron levemente (raíz cuadrada). Los mismos datos se transformaron totalmente en una matriz binaria de presencia y ausencia para el segundo estudio. Tras la transformación indicada para cada uno de los casos, se creó una matriz de similitudes entre muestras basada en el coeficiente de Bray

Curtis, a partir de la cual se generó la ordenación biológica en dos dimensiones (MDS).

El set de datos ambientales (variables del sistema) se transformó a $\log(x + 1)$ y normalizó para evitar interferencias en el posterior análisis debidas, entre otras, a la diferencias de unidades de medida. Posteriormente, este set de datos pasó por los tres niveles de análisis descritos previamente en el Capítulo 1, Apdo.1.2.3.

De las variables de la Descripción del sistema MBR, Apdos.B yD, en este capítulo fueron consideradas la IT, BOD₅, relación C/N expresada como COD/tN, la concentración de sólidos en suspensión en el influente (iTSS, iFSS y iVSS) y la concentración de sólidos en suspensión en ambos biorreactores, aireado y anóxico (TSS, FSS y VSS).

3.3. RESULTADOS:

3.3.1. ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE TGGE:

En una primera aproximación, los perfiles de TGGE se compararon en su totalidad mediante el análisis de clústeres basado en el coeficiente de Dice, independientemente del ácido nucleico empleado para obtener los perfiles (DNA o RNA), de la estación del año (primavera, verano u otoño), o el biorreactor muestreado (aireado o anóxico). En este análisis global, se detectaron un total de 46 clases de banda diferentes.

En este apartado, y con el fin de simplificar, se describen a continuación los análisis de clústeres realizados bajo dos aproximaciones:

- a.** Comparando por separado la estructura de las comunidades bacterianas según el ácido nucleico empleado de partida (DNA o

RNA) para la amplificación parcial por PCR del gen de la región V3 del rRNA 16S.

- b.** Comparando por separado la estructura de las comunidades bacterianas en cada estación del año (primavera, verano u otoño).

3.3.1.1. Análisis de perfiles obtenidos a partir de DNA o RNA:

Al realizar el análisis de clústeres de los perfiles de TGGE obtenidos tanto a partir de DNA como de RNA en el global de las muestras, se reveló una gran estabilidad de la estructura de las comunidades bacterianas en el sistema, con una similitud entre los perfiles de bandas superior al 80%. En general y tanto para el análisis basado en DNA como en RNA, las muestras tomadas un mismo día procedentes de biorreactores diferentes (aireado o anóxico) se agrupan juntas en el análisis y con un porcentaje de similitud muy alto, revelando que no existen diferencias importantes entre los biorreactores, siendo más marcada esta tendencia para las muestras de DNA.

En el análisis basado en el **DNA**, se observó un alto índice de similitud (86%) de los perfiles a lo largo de las tres estaciones entre las muestras estudiadas, así como una división de los mismos en dos clústeres principales que indicó cierto grado de evolución temporal de la composición de las comunidades bacterianas. Dentro del primer clúster, los marcadores internos se agruparon en un subclúster con una similitud por encima del 95% (96,5%), por lo que no se consideró significativa la diferencia entre los perfiles agrupados a ese porcentaje o superior. Las muestras de ambos biorreactores tomadas en la primera semana de muestreo (A/X 1 y 2) se agruparon junto con los marcadores, mientras que el resto de las muestras de la primavera (A/X 3-10) formaron un subclúster separado, con un 90,5% de similitud respecto al de los marcadores.

En el segundo clúster principal se incluyeron los perfiles de todas las muestras de las estaciones de verano y otoño, agrupadas al 88,5% de similitud. Los perfiles obtenidos en las primeras 6 semanas del verano (A/X 13-22) forman un subclúster agrupados al 94,5% de similitud, y los del resto de las muestras de estas dos estaciones se integran en un segundo subclúster (92% de similitud). Dentro de este último, los perfiles de las comunidades de ambos BRs durante las semanas 23 y 24 del muestreo presentaron una similitud del 95%, mientras que el resto de las muestras, tomadas tanto en verano como en otoño, se agruparon al 93% de similitud.

El análisis de Dice de los perfiles de bandas de TGGE procedentes de las muestras de **RNA** mostró una mayor variabilidad de la estructura de la comunidad bacteriana, en comparación con el análisis basado en DNA, si bien en conjunto los perfiles se agruparon con un 81% de similitud. En este caso, no se aprecia claramente la tendencia de la comunidad microbiana a evolucionar en el tiempo; sin embargo si se observó más similitud entre los perfiles de muestras pertenecientes a una misma semana de muestreo, como se verá más adelante. El grupo de perfiles de los marcadores internos presentó un 95,5% de similitud, siendo establecido este porcentaje como límite para considerar diferencias significativas entre la estructura de las comunidades cuando se analizaron a partir de las muestras de RNA.

Al igual que en el caso de los perfiles obtenidos a partir de DNA, se produce una división en dos clústeres principales. Dentro del primer clúster principal, las muestras de la primavera (rA/rX 1-10) formaron un grupo con un 91% de similitud entre ellas y se agruparon con el subclúster de los marcadores al 87%. En el segundo clúster principal, se aprecia que sí existieron diferencias significativas entre las estaciones de verano y otoño. Los perfiles de las muestras tomadas durante el verano forman un subclúster al 86% de similitud y se aprecia el agrupamiento de las mismas en sucesivos subclústeres a lo largo de las semanas 13 a la 38 (rA/rX 13-14; rA/rX 15-16; rA/rX 17-22; rA/rX 23-26; rA/rX 27-30; rA/rX 31-36; rA/rX 37-38). En cuanto a las muestras tomadas en otoño, en parte se agrupan en un subclúster cercano al de las muestras del verano, con un 83,5% de similitud (rA/rX 39-48; rA/rX 51-56). El segundo grupo de muestras de esta estación se agrupó al 86% de similitud en un subclúster separado, y engloba principalmente las muestras de la etapa final del experimento (rA/rX 57-64), junto con un grupo de las mismas tomadas hacia la mitad del otoño (rA/rX 48-50).

3.3.1.2. Análisis de los perfiles por estaciones anuales:

Al analizar los perfiles de TGGE en la estación de **primavera** teniendo en cuenta conjuntamente tanto los resultados obtenidos a partir de DNA como de RNA, se observó nuevamente la gran similitud existente en la estructura de las

comunidades bacterianas (86,5%). Se produce una división clara en dos clústeres principales que agrupan respectivamente los perfiles obtenidos a partir de DNA y RNA, y dentro de cada grupo, se aprecia una evolución temporal de la estructura de las comunidades bacterianas analizadas.

El clúster que agrupa los perfiles obtenidos a partir de DNA englobó a los marcadores internos junto con las muestras de la primera semana (A/X 1-2) de ambos biorreactores, con un 95,5% de similitud, marcando este porcentaje como límite para considerar diferencias significativas entre los perfiles de bandas. El resto de los perfiles de las muestras de DNA se agrupó al 93% (A/X 3-10).

En el análisis de las muestras de RNA también se observó una división de las mismas en dos subclústers diferenciados, el primero englobando las primeras 5 muestras (rA/rX 1-5, 95% de similitud) y el segundo las del resto de la estación (91% de similitud). Dentro de este último subclúster, los perfiles de las muestras de la última semana (rA/rX 9-10) guardan mayor divergencia con el resto.

En **verano**, el global de los perfiles de TGGE se agrupa al 85% de similitud y no se observa una tendencia a la evolución de la estructura de la comunidad a lo largo del tiempo. Las muestras analizadas se dividen en dos clústeres principales. En el primer clúster, los perfiles correspondientes a los marcadores internos se agruparon al 97% de similitud entre ellos, y al 86% de similitud con los perfiles obtenidos a partir de DNA, con la excepción de los pertenecientes a las muestras tomadas en la primeras semanas del verano (A/X13-22). Los perfiles de las muestras A/X13-22 se agrupan en el segundo clúster principal junto con los obtenidos a partir de RNA, con una similitud del 85,5%.

En **otoño**, los perfiles de las muestras se agruparon al 80% de similitud, siendo la estación del año donde se encontraron mayores divergencias en la estructura de la comunidad bacteriana. Los marcadores internos se agruparon al 95% de similitud, estableciendo este porcentaje como el límite para considerar diferencias significativas en este análisis. Los perfiles obtenidos a

partir de DNA indican una estabilidad muy alta de la estructura de las comunidades bacterianas, agrupándose al 93% de similitud. En el caso de los perfiles obtenidos a partir de RNA, éstos presentaron una mayor variación y no se encontró una relación clara entre la evolución de la estructura de la comunidad y el tiempo. De hecho, los perfiles de las muestras de los últimos días (rA/rX 59-64) se agrupan en el mismo subclúster que los obtenidos a partir de las muestras de DNA (86% de similitud), mientras que los perfiles de las muestras rA/rX 48-50 y 57-59 se agruparon con los de las muestras de DNA al 86,5% de similitud. El resto de las muestras de RNA formaron un subclúster independiente, con un 85% de similitud entre ellas.

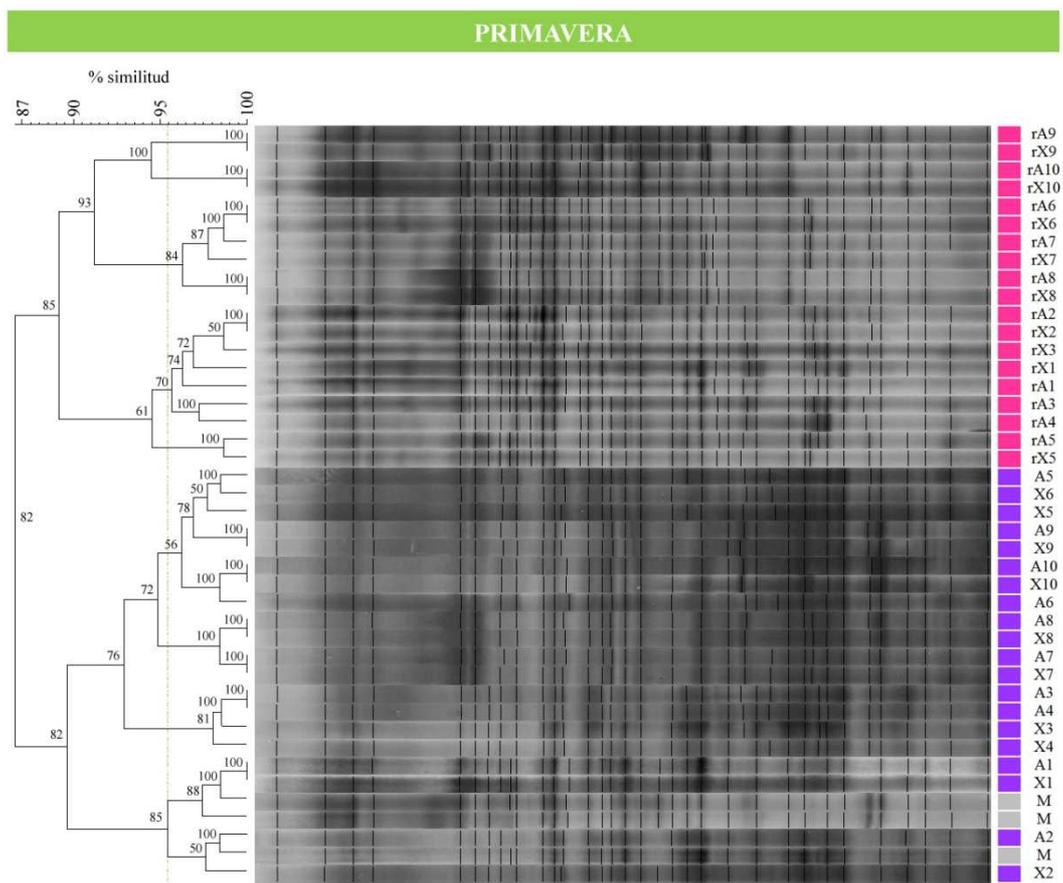


Fig.3.3. Comparación mediante el coeficiente de Dice de los perfiles de TGGE de las muestras de primavera del sistema MBR. A: Biorreactor aireado; X: Biorreactor anóxico; **Gris:** marcadores internos; **Morado:** muestras de DNA; **Rosa:** muestras de RNA. La línea punteada marca el porcentaje de similitud máximo para considerar significativas las diferencias entre muestras.

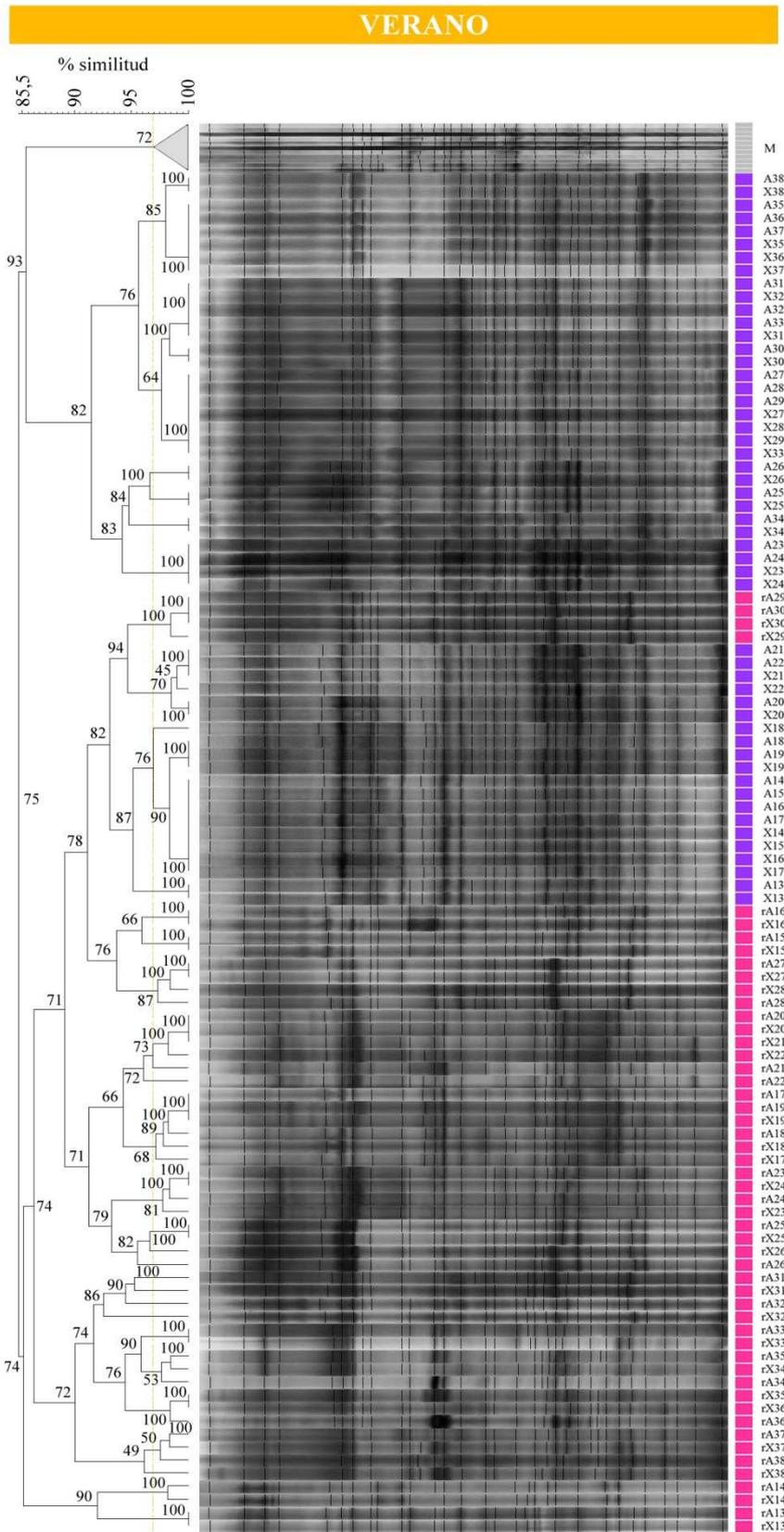


Fig.3.4. Comparación mediante el coeficiente de Dice de los perfiles de TGGE de las muestras de verano del sistema MBR. A: Biorreactor aireado; X: Biorreactor anóxico; Gris: marcadores internos; Morado: muestras de DNA; Rosa: muestras de RNA. La línea punteada marca el porcentaje de similitud máximo para considerar significativas las diferencias entre muestras.

OTOÑO

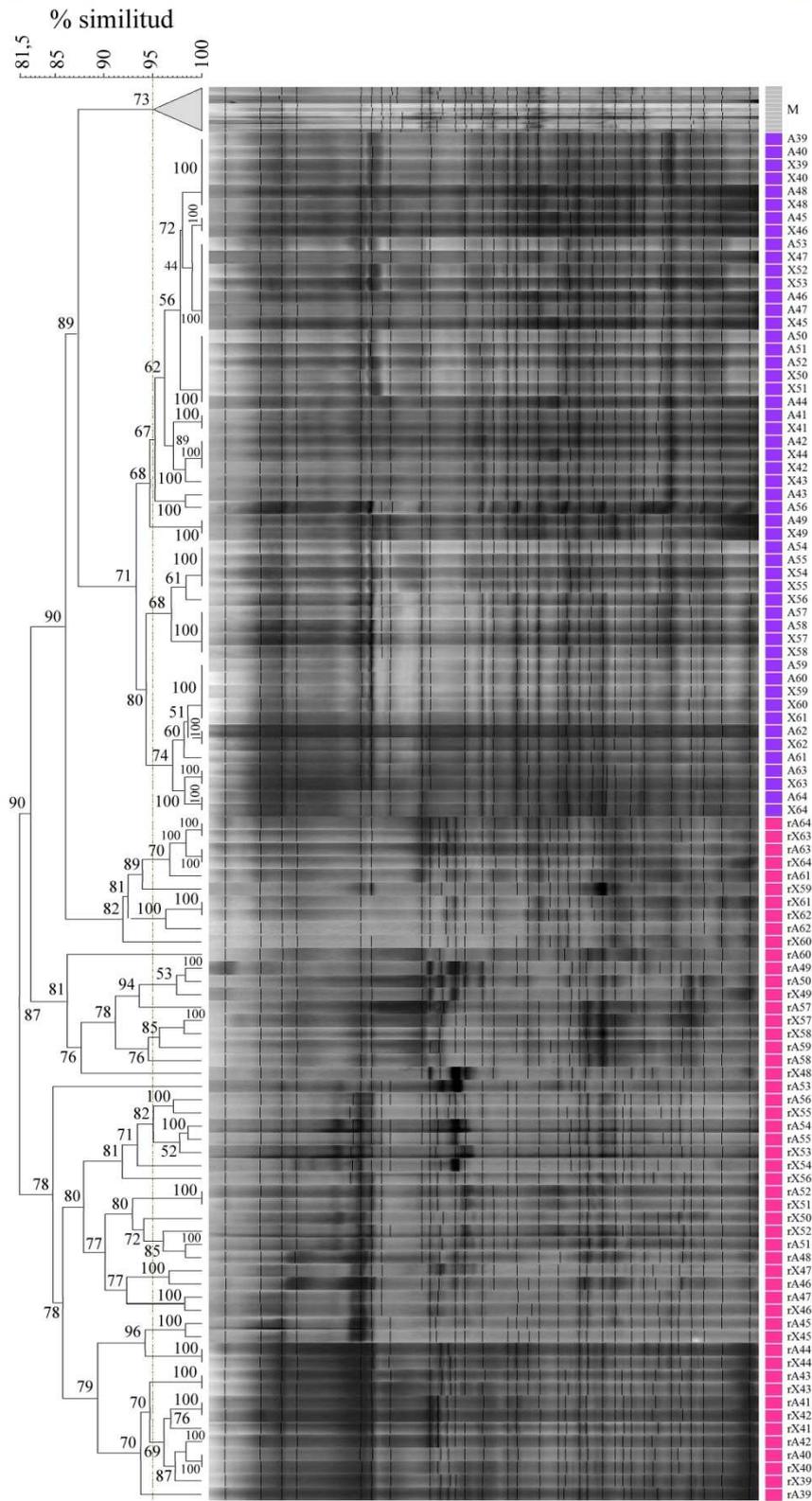


Fig.3.5. Comparación mediante el coeficiente de Dice de los perfiles de TGGE de las muestras de otoño del sistema MBR. A: Biorreactor aireado; X: Biorreactor anóxico; **Gris:** marcadores internos; **Morado:** muestras de DNA; **Rosa:** muestras de RNA. La línea punteada marca el porcentaje de similitud máximo para considerar significativas las diferencias entre muestras.

3.3.2. Análisis de los índices descriptivos a partir de los perfiles de TGGE:

a. Rango ponderado de riqueza, Rr:

Los valores del índice Rr para todas las muestras del sistema MBR fueron muy superiores a 30, valor mínimo que caracteriza a ecosistemas muy habitables, con gran capacidad de carga y con gran diversidad de especies (Marzorati *et al.*, 2008).

El análisis estadístico basado en el test de rangos de Wilcoxon no reveló diferencias significativas entre los valores de Rr detectados en ambos biorreactores (Fig. 3.6). En la comparación entre estaciones, se observó que en los perfiles de TGGE obtenidos a partir de las muestras de DNA el índice fue significativamente menor en otoño, mientras que para los perfiles obtenidos a partir de las muestras de RNA, Rr fue significativamente mayor en primavera. Estos resultados indican que aunque en otoño la diversidad de poblaciones bacterianas presentes fue menor que en verano, la diversidad de las poblaciones activas fue similar en ambas estaciones. Por el contrario, en primavera se detectó una menor diversidad de las poblaciones bacterianas presentes respecto a las otras dos estaciones, pero fue la estación con una mayor riqueza de poblaciones bacterianas activas.

b. Organización funcional, Fo:

Los valores de Fo detectados en el sistema estudiado presentaron una media de 0,5, lo que significa que el 50% de la abundancia total de poblaciones detectada en el sistema MBR estuvo formada por un 20% de especies dominantes. El otro 50% de la abundancia estuvo formada por el 80% de especies minoritarias. Estos valores son característicos de sistemas con una organización funcional media, con un bajo número de especies presentes en alto número o de especies activas muy especializadas en las condiciones existentes, y un alto número de especies minoritarias o menos activas que aportan al sistema gran capacidad de adaptación ante los cambios ambientales y/u operacionales, conservando su funcionalidad (Marzorati *et al.*, 2008).

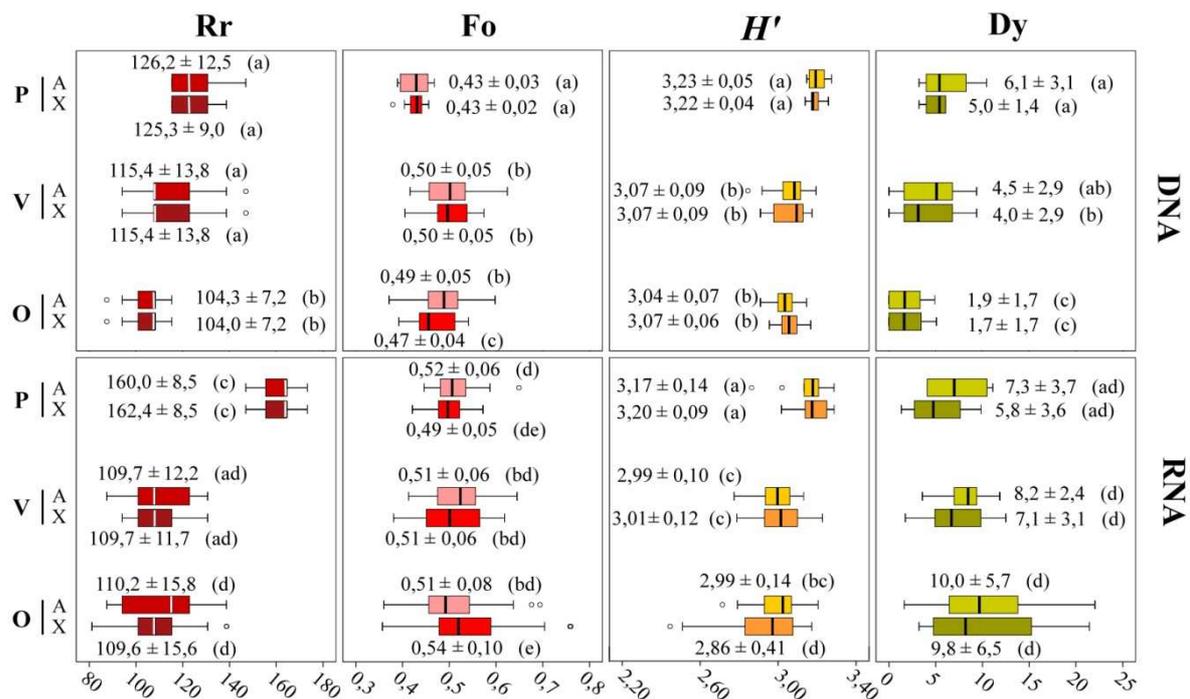


Fig. 3.6. Diagrama de cajas (Box-and-Whisker plots) de los índices descriptivos (rango ponderado de riqueza, Rr; organización funcional, Fo; diversidad de Shannon, H'; dinámica, Dy) de los perfiles de TGGE obtenidos a partir de las muestras de DNA y RNA de ambos biorreactores (aireado, A; anóxico, X) del MBR y durante la primavera (P), verano (V) y otoño (O). En el gráfico, las cajas recogen el 50% central de los datos (entre los percentiles 25° y 75°), los extremos superiores e inferiores de las barras indican los percentiles 90° y 10°, la línea en el interior de la caja indica la posición de la mediana y los círculos indican valores extremos o atípicos. Junto a las cajas aparece indicada la media ± la desviación estándar en cada caso. Los datos seguidos entre paréntesis por la misma letra no son estadísticamente diferentes, según el test Wilcoxon ($p < 0,10$).

El test de Wilcoxon mostró algunas diferencias pequeñas aunque significativas en los valores de Fo detectados en función del biorreactor analizado. En el análisis realizado comparando las estaciones anuales, no se detectaron diferencias significativas para los valores de Fo calculados a partir de los perfiles basados en las muestras de RNA; sin embargo, en el caso de los perfiles obtenidos a partir de las muestras de DNA la primavera presentó una organización funcional significativamente menor. Estos resultados indican que la organización funcional de las poblaciones activas en el sistema MBR se mantuvo estable durante todo el periodo de muestreo, mientras que la organización funcional de las poblaciones presentes fue más baja al inicio del muestreo en primavera y se incrementó con el tiempo hasta estabilizarse en verano y otoño.

c. Índice de diversidad de Shannon, H' :

El índice de diversidad de Shannon tiene en cuenta tanto la riqueza de especies como la organización funcional del sistema. En concordancia con los valores previos, se obtuvieron valores altos de este índice con una media total de 3,1.

El test de Wilcoxon no reveló diferencias significativas de los valores medios de H' entre los biorreactores, a excepción de los calculados para los perfiles obtenidos a partir de las muestras de RNA en otoño, que presentaron diferencias pequeñas aunque significativas. En primavera, y en relación con la significativamente menor organización funcional de la comunidad de bacterias presentes, el valor medio del índice de Shannon fue también significativamente mayor. Análogamente, en los perfiles basados en las muestras de RNA de esta misma estación, el aumento significativo en el número de especies activas produce un aumento significativo en el valor medio de H' . Se amortiguan las diferencias anteriores y, en las muestras de primavera, el índice de biodiversidad de Shannon no presenta diferencias significativas entre los perfiles obtenidos a partir de DNA o RNA.

Dinámica, Dy :

La comunidad microbiana en el sistema de MBR presentó un índice de dinámica medio de casi 6, lo que según Marzorati *et al.* (2008) es signo de un sistema estable. El estudio estadístico no reveló diferencias significativas en la evolución temporal de las muestras entre los dos biorreactores. En los perfiles de la comunidad basados en las muestras de DNA se observó que durante el otoño, la dinámica de las poblaciones se hizo mínima. En los perfiles basados en las muestras de RNA no se detectó diferencia significativa entre las diferentes estaciones del año.

Comparando los resultados de este índice obtenidos para los perfiles de comunidad basados en los diferentes ácidos nucleicos, los mayores valores se presentaron para las muestras de RNA, con diferencias significativas en verano y especialmente en otoño. En esta última estación la dinámica de poblaciones fue de nivel medio (Marzorati *et al.*, 2008), indicando la capacidad

de activar nuevas especies en respuesta a cambios en las condiciones del sistema sin que el proceso final se vea afectado.

3.3.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS DE DNA OBTENIDAS A PARTIR DE LAS BANDAS DE LOS TGGEs:

De las 46 clases de banda detectadas en los análisis de los perfiles de TGGE obtenidos, se logró reamplificar y secuenciar bandas correspondientes a 33 de ellas, lo que constituye casi un 72% del total, quedando por tanto un 28% de poblaciones sin identificar. Todas las secuencias analizadas se relacionaron con *Proteobacterias* (Fig.3.7), detectándose representantes de *Delta* y *Gammaproteobacterias*, constituyendo cada una un 3% de las clases de banda secuenciadas/2% del total, *Betaproteobacterias* (9%/6,5%), y por último y como grupo más abundante, *Alphaproteobacterias* (84%/60%). Dentro de este grupo mayoritario, se identificaron representantes de cuatro órdenes diferentes: *Sphingomonadales* (6% de las clases identificadas/4,3% del total), *Rhodospirillales* (6/4,3%), *Rhodobacterales* (12%/8,6%) y *Rhizobiales* (60%/43%). La Fig. 3.8 muestra la abundancia relativa de cada una de las clases de banda detectadas en el global de las muestras, representada en forma de *heatmap*.

Se detectó una clase de banda (C34) únicamente presente en los perfiles obtenidos a partir de las muestras de DNA. En el caso de los perfiles obtenidos a partir de las muestras de RNA se detectaron 7 clases de banda (C32, C36, C26, C27, C30, C36, C42) que no estuvieron presentes en los perfiles obtenidos a partir de DNA. De todas ellas, únicamente se dispuso de la secuencia y estudio filogenético de la clase de banda C27, estando agrupada con representantes del orden *Rhizobiales*.

Las clases de banda C2 y C3 están presentes en todas las muestras analizadas, siendo muy dominantes en los perfiles obtenidos a partir de las muestras de DNA, y no tanto en los perfiles obtenidos a partir de las muestras de RNA.

En **primavera** se detectaron dos clases de banda exclusivas de esta estación (C31 y C39), identificadas filogenéticamente en dos órdenes diferentes, *Rhodospirillales* y *Xanthomonadales*. Estas clases de banda se detectaron tanto entre las poblaciones presentes (perfiles obtenidos a partir de muestras de DNA) como entre las poblaciones activas (perfiles obtenidos a partir de muestras RNA). La clase C37, correspondiente a una población evolutivamente relacionada con el orden *Rhodobacterales*, se detectó exclusivamente en esta estación cuando el análisis se realizó a partir de DNA; sin embargo, al analizar las poblaciones activas se detectó también en diferentes momentos del muestreo. Una de las clases de banda (C21), que se identificó con una población incluida dentro del orden *Rhizobiales*, estuvo presente a lo largo de todo el periodo de estudio, sin embargo el análisis basado en RNA indicó que su actividad fue más estable durante la primavera. Tres clases de banda más (C32, C26 y C36) caracterizaron esta estación, pero únicamente se detectaron en el análisis basado en RNA, no siendo detectables en ninguna de las muestras de DNA.

En los perfiles basados en DNA, se observa que la clase de banda C35, correspondiente a una población evolutivamente relacionada con el género *Curvibacter*, presentó su mayor abundancia relativa en primavera (Fig.3.8), comenzando a disminuir al final de la estación y desapareciendo por completo de los perfiles en verano. Sin embargo, el análisis de TGGE basado en RNA revela que la actividad de esta población en primavera es muy leve, haciéndose más relevante en otoño. La clase de banda C22 fue detectable durante todo el muestreo, excepto en los perfiles basados en las muestras de DNA de primavera. Algo similar ocurrió con la clase de banda C32, correspondiente a una población filogenéticamente agrupada en el orden *Rhizobiales*, cuya presencia fue llamativamente menor en primavera, no detectándose entre las poblaciones activas durante dicho periodo.

Las muestras de **verano** se caracterizaron por la presencia dominante de la clase de banda C46, identificada como representativa de una población incluida dentro del orden *Rhizobiales*. No fue dominante entre las poblaciones activas pero sí permaneció como miembro de la comunidad de manera estable a lo largo del tiempo. En cuanto a clases de banda exclusivamente detectables

en los perfiles basados en las muestras de RNA, la C30 solo se presentó durante este periodo, justo al contrario de lo que ocurrió con la C36, detectable en primavera y otoño, pero no en verano.

La clase C5 solamente se detectó en los perfiles de TGGE basados en DNA durante el verano, sin embargo se trata de una población activa (según el análisis basado en las muestras de RNA) que se detectó también en algunas de las muestras de otoño. Esta clase de banda fue identificada como representante de una población del orden *Rhizobiales*. Algo similar ocurre con la clase C30, ya que el análisis basado en DNA indica que su presencia fue mayoritaria en verano y en la primera muestra de la primavera; sin embargo se detectó en ambas estaciones entre las poblaciones activas.

En **otoño** se detectaron dos clases de banda exclusivas de esta estación, C34 y C42. La primera sólo fue visible en los perfiles obtenidos a partir de DNA correspondientes a los dos últimos días de muestreo. Justamente en esos días, en el sistema MBR se detectaron problemas de espumas lo que podría estar relacionado con la presencia de esta población. La clase de banda C42 tan solo fue detectable en los perfiles obtenidos a partir de las muestras de RNA del otoño.

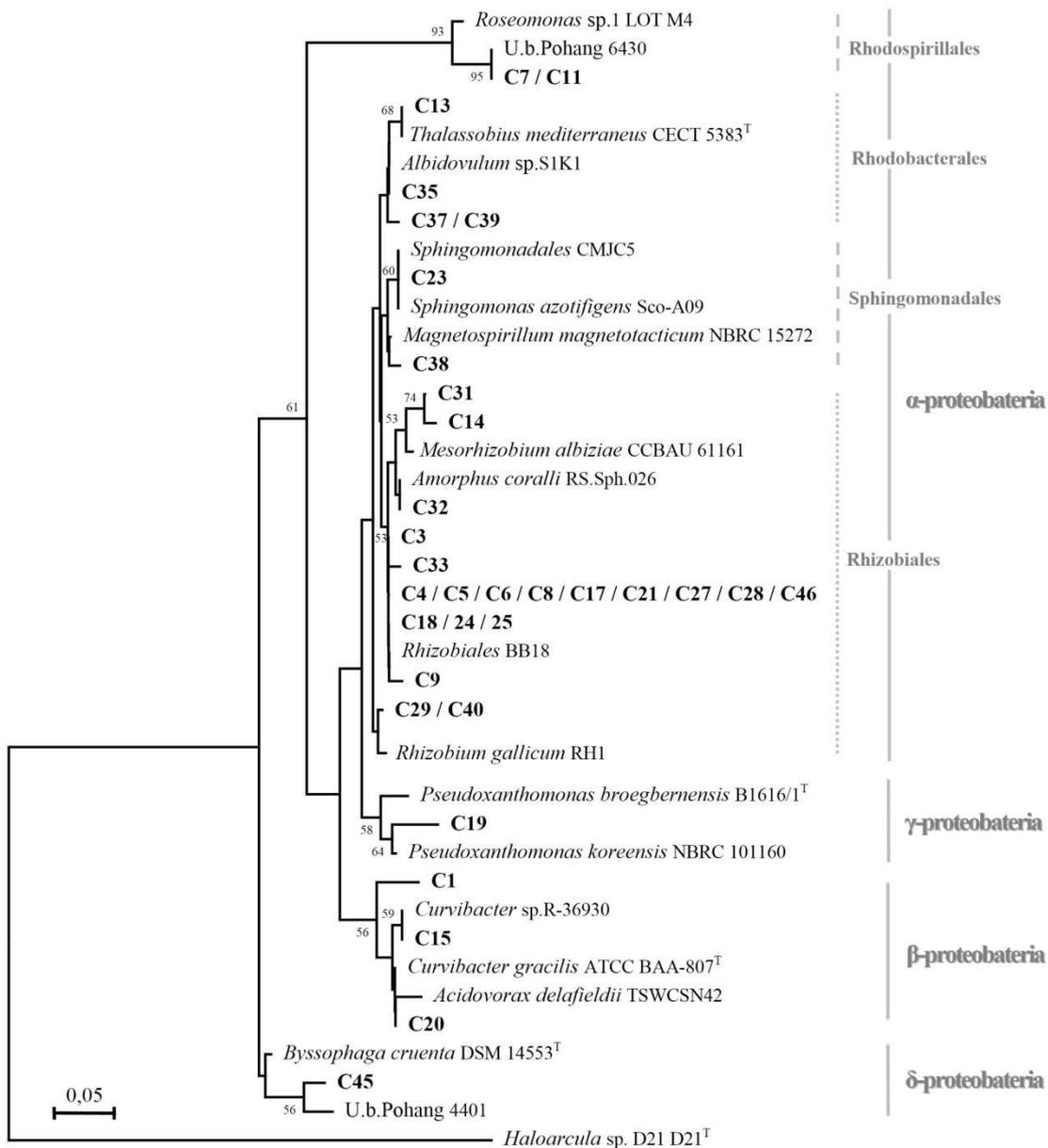


Fig.3.7. Árbol filogenético de las bandas secuenciadas de los perfiles de TGGE, basado en una longitud de secuencia de aproximadamente 100pb. *Acidovorax delafieldii* TSWCSN42, GQ284414; *Albidovulum* sp. S1K1, FJ222605; *Amorphus coralli* RS.Sph.026, NR 043544; *Byssophaga cruenta* DSM 14553, AJ833647; *Curvibacter gracilis* ATCC BAA-807, AB109889; *Curvibacter* sp.R-36930, FR691424; *Haloarcula* sp. D21 D21, AM982816; *Magnetospirillum magnetotacticum* NCBR35272, AB680822; *Mesorhizobium albiziae* CCBAU 61161, DQ311088; *Pseudoxanthomonas broegbernensis* B1616/1, AJ012231; *Pseudoxanthomonas koreensis* NBRC 101160, AB681402; *Rhizobium gallicum* RH1, FR728933; *Roseomonas* sp. 1 LOT M4, AY624051; *Sphingomonas azotifigens* Sco-A09, FN386703; *Thalassobius mediterraneus* CECT 5383, AJ878874; Uncultured bacterium GB7N87002C2SG0, HM705714; Uncultured bacterium Pohang 4401, HQ466779; Uncultured bacterium Pohang 6430, HQ509896; Uncultured *Rhizobiales* BB18, FR693288; Uncultured *Sphingomonadales* CMJC5, AM935865.

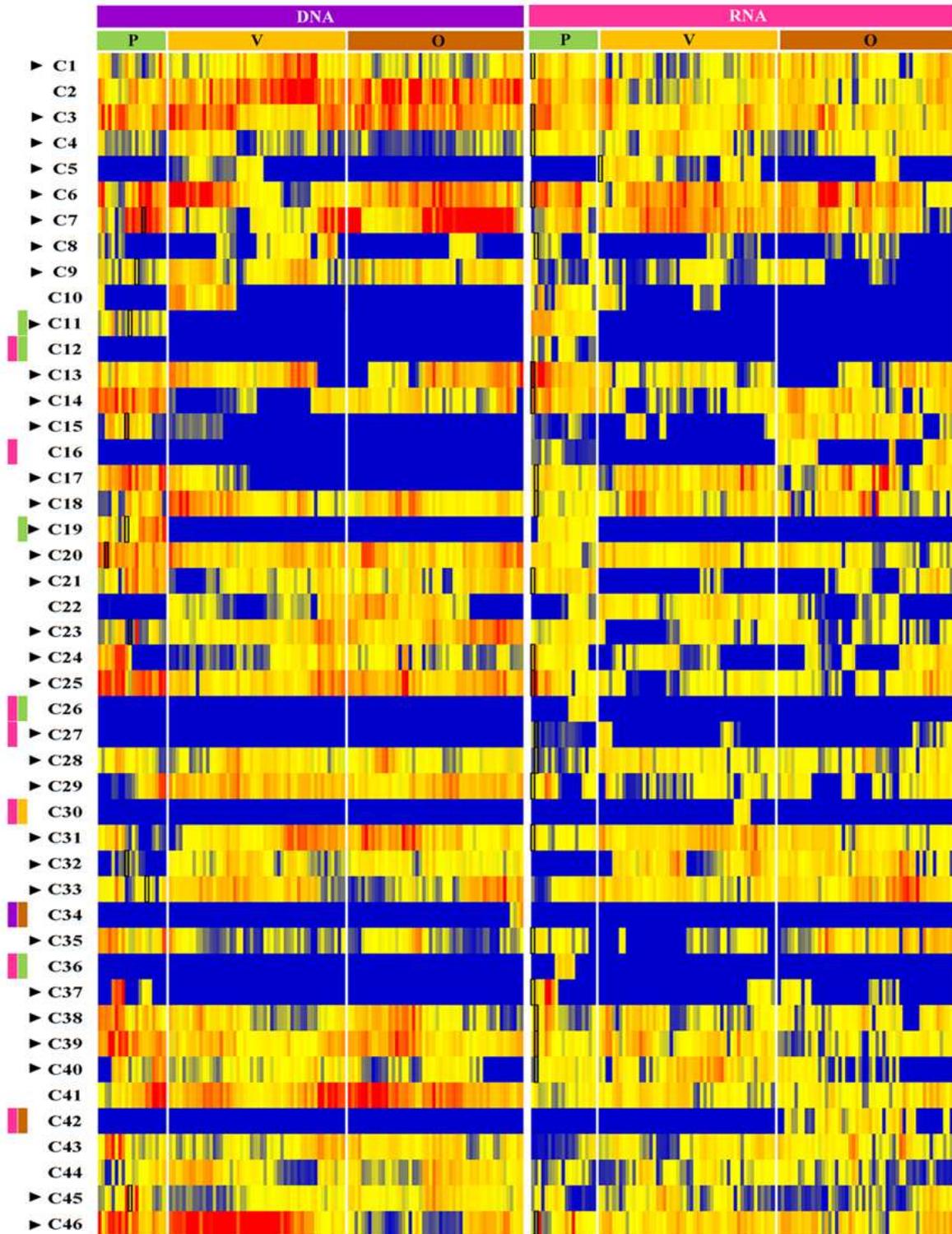


Fig.3.8. Heatmap de las abundancias relativas de las clases de banda. Las muestras están ordenadas por biorreactor (aireado-anóxico) y día de muestreo durante la primavera (P), verano (V) y otoño (O). Los colores del *heatmap* van de azul a rojo según el incremento de abundancia relativa. Las clases de banda secuenciadas e identificadas aparecen marcadas con un triángulo y la banda reamplificada aparece marcada con un recuadro negro. Los cuadros de colores junto al nombre de las clases de banda identifican, según el color de cabecera, aquellas clases exclusivas de un grupo de muestras.

3.3.4. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS PERFILES DE COMUNIDAD BACTERIANA SEGÚN LA ABUNDANCIA RELATIVA DE LAS POBLACIONES DETECTADAS (MDS) Y SU RELACIÓN CON LAS VARIABLES DEL MBR (BIO-ENV):

Con el fin de ver la distribución general de las muestras de lodo analizadas en función de la similitud de sus perfiles de comunidad bacteriana, se hizo un análisis MDS previo para cada uno de los biorreactores (BR aireado y BR anóxico) y cada uno de los ácidos nucleicos empleados para la amplificación por PCR (DNA y RNA), teniendo en cuenta la abundancia relativa de las clases de banda detectadas (Fig.3.9). Se observó que en todos los casos las muestras de la primavera forman un grupo con un 90% de similitud de los perfiles basados en DNA, y un 85% para los basados en RNA. Además engloban en dichos grupos a las muestras correspondientes a los marcadores, que en todos los casos se agrupan al 95% de similitud. Las muestras de verano y otoño aparecen agrupadas conjuntamente en cuanto a la similitud de los perfiles de DNA. En el caso del RNA, las muestras de ambas estaciones también se agrupan; sin embargo, las correspondientes a la última mitad del otoño se separan en un grupo independiente. Se obtuvo una distribución similar de las muestras basando el análisis MDS en la incidencia de las clases de banda (presencia y ausencia) (datos no mostrados).

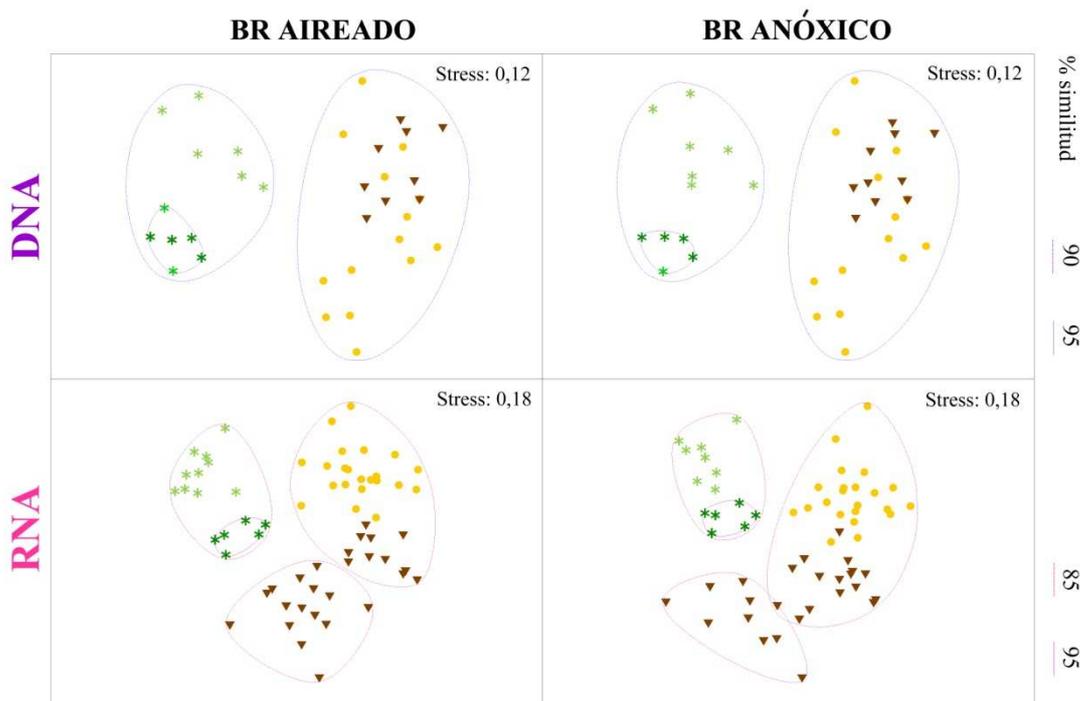


Fig.3.9. Escalado multidimensional no métrico (MDS) mostrando la distribución de las muestras de lodo del MBR, según la abundancia relativa de las poblaciones bacterianas detectadas en los perfiles de comunidad obtenidos mediante TGGE, para ambos biorreactores (aireado y anóxico) y en función del ácido nucleico empleado para la amplificación por PCR (DNA y RNA). El nivel de estrés es medio (estrés < 0,2) considerándose una representación válida de la ordenación de los perfiles de las muestras en dos dimensiones. **Verde oscuro:** marcadores internos; **verde claro:** muestras de primavera; **amarillo:** muestras de verano; **marrón:** muestras de otoño.

3.3.4.1. Estudio de la distribución de la abundancia relativa de las poblaciones bacterianas en los biorreactores del MBR en cada estación:

a. Perfiles de TGGE basados en DNA:

En la figura 3.10 se observan los MDS mostrando la distribución de la abundancia relativa de las poblaciones bacterianas del MBR detectadas en los perfiles de TGGE obtenidos a partir de DNA, en ambos biorreactores y en cada una de las estaciones del año estudiadas. A grandes rasgos se observa que es la primavera la estación del año donde la distribución de los perfiles de abundancia relativa de las poblaciones (clases de banda) está mejor explicada por las variables del sistema estudiadas (Best = 0,729 y 0,679 para el BR aireado y BR anóxico respectivamente) y en verano donde menos (Best=0,537 y 0,487). La temperatura del interior del sistema (IT) siempre juega un papel

importante en dicha explicación, formando parte del Best en todos los casos. Todos los MDS representaron bien la distribución de los datos en dos dimensiones (estrés < 0,1) (Clarke and Warwick, 2001). No se observan diferencias marcadas entre biorreactores, ni en el patrón adoptado por las muestras ni en los valores del Best logrados con las variables del sistema.

En **primavera** y atendiendo a aquellas clases de banda detectadas con tendencias similares en ambos biorreactores, hay un grupo cuya abundancia relativa presenta correlación positiva con la carga contaminante del influente y la temperatura (C6, C7, C18, C19, C21, C29, C41 y C44), mientras que el grupo formado por las clases C20, C24, C31, C38 y C43 presenta correlación negativa.

Durante el **verano**, hay cuatro clases de banda (C13, C32, C33 y C46) que se correlacionan directamente con la IT, clases que fueron identificadas como poblaciones pertenecientes al orden *Rhizobiales* a excepción de la primera, agrupada con el orden *Rhodobacterales*. Las clases C7, C22 y C41 presentaron correlación negativa con esta variable. De las tres clases, sólo se consiguió identificar mediante secuenciación la C7, estando relacionada filogenéticamente con el género *Roseomonas*.

Las clases de banda C5 y C18 presentaron correlación positiva con los FSS y negativa con la BOD₅, mientras que la C8, C24, C25 y C43 se comportaron de manera completamente opuesta. Todas ellas representan poblaciones clasificadas dentro del orden *Rhizobiales*, sin embargo muestran comportamientos opuestos en relación a la ratio F/M del sistema, reflejada por la contraposición de los vectores de los sólidos en suspensión de los BRs y de la BOD₅. Las variables IT y FSS forman parte del Best en los dos BR. En el BR anóxico, dentro del grupo de variables incluidas en el Best también se encuentran los iTSS, con los que el grupo de clases C1, C21, C40 y C45 presentan correlación positiva en ambos BRs. Opuestamente se posicionan las clases de banda C3, C4, C6, C10, C15, C17, C38 y C44, con correlación negativa con los iTSS y positiva con la ratio C/N.

En **otoño** es la temperatura la variable más explicativa y con ella están positivamente correlacionadas las clases de banda C22, C31 y C38 y negativamente C13, C23, C29, C33 y C46. Las clases de banda C6, C7, C8, C44 y C45 presentan correlación positiva con los sólidos en suspensión totales del interior del sistema (TSS), y correlación negativa con los sólidos en suspensión y la BOD₅ del influente. Opuestamente se comportan las clases C14, C18, C24, C28, C35 y C39, de nuevo reflejando comportamientos diferenciales en relación a la ratio F/M. Finalmente y en relación a la ratio C/N, las clases C9, C20, C21 y C34 presentan correlación positiva mientras que la C40 la presenta negativa.

b. Perfiles de TGGE basados en RNA:

Igualmente, en los MDS de la distribución de la abundancia relativa de las poblaciones bacterianas del MBR detectadas en los perfiles de TGGE obtenidos a partir de las muestras de RNA (Fig.3.11) es la primavera la estación del año donde las variables del sistema MBR son capaces de explicar mejor el patrón adoptado por las muestras (Best=0,794 y 0,900 para el BR aireado y BR anóxico respectivamente). Entre los biorreactores no se observan diferencias marcadas en dicho patrón, mientras que sí existen en cuanto a la explicación aportada por las variables del sistema (valores de Best), siendo mucho mayor para el BR anóxico. En todos los casos, los niveles de estrés también se encuentran por debajo de 0,2, considerándose buenas representaciones en dos dimensiones de la abundancia relativa de las poblaciones activas. Además se observa, a excepción del otoño, que la IT no juega un papel explicativo tan relevante, dejándose a los sólidos en suspensión de los BRs del sistema.

En **primavera** se observa que las variables forman dos grupos: las relacionadas con la carga contaminante del influente (C/N, BOD₅ y los sólidos en suspensión), y la temperatura y los sólidos en suspensión de los biorreactores (IT y FSS/TSS). Con el primer grupo de variables, están positivamente correlacionadas las clases C7, C44 y C46, mientras que presentan correlación negativa las clases C3, C8, C11, C13, C17 y C29. Las clases de banda C21, C22, C26, C33 y C43 presentan correlación positiva con la temperatura y los sólidos en suspensión de los biorreactores, mientras que

C16, C20, C38 y C45 están correlacionadas negativamente con estos parámetros. Del primer grupo de clases de banda tan solo se tienen clasificadas la C21 y C33, ambas correspondientes a poblaciones del orden *Rhizobiales*, mientras que del grupo de poblaciones representadas por las clases de banda que se sitúa opuestamente, ninguna ellas se clasifica dentro de este orden.

En **verano**, las clases de banda que presentan correlación positiva con la IT son C24 y C45, mientras que la correlación es negativa para la C37. Con la ratio C/N presenta correlación positiva las clases C15 y C18, clasificadas dentro de las β -Proteobacterias y el orden *Rhizobiales*, respectivamente. Los sólidos en suspensión del sistema están positivamente correlacionados con las clases C28 y C41 y negativamente con C25, C35 y C43. Sin embargo, con los sólidos en suspensión del influente, las clases con correlación positiva son la C20, C27, C29 y C31 y con correlación negativa, C15 y C38.

En **otoño**, las clases C3, C9, C20, C22, C23, C31, C37 y C40 presentan correlación positiva con IT, mientras que las clases C4, C13, C33, C35 y C39 se correlacionan negativamente. Las clases C1, C2, C14 y C16 presentan correlación positiva con la BOD₅ y negativa con la concentración de los sólidos en ambos BRs, como respuesta a los diferentes niveles de limitación de nutrientes (ratio F/M).

3.3.4.2. Estudio de la distribución de la incidencia de las poblaciones bacterianas en los biorreactores del MBR en cada estación:

A continuación se muestran los resultados del análisis MDS mostrando la distribución de la incidencia de las poblaciones bacterianas del MBR detectadas en los perfiles de TGGE. Al considerar únicamente el que una clase de banda esté presente o no en los perfiles de TGGE, se representan en los gráficos un menor número de clases de banda, ya que sólo se verán reflejadas aquellas que alternen presencia y ausencia a lo largo de la estación del año estudiada. No aparecerán representadas aquellas clases de banda que estén presentes o ausentes durante toda la estación.

a. Perfiles de TGGE basados en DNA:

En el estudio multivariante de los perfiles de TGGE basados en DNA y teniendo en cuenta únicamente la presencia o ausencia de las bandas detectadas (Fig.3.12), la primavera continúa siendo la estación del año donde la distribución de la incidencia de las poblaciones bacterianas es mejor explicada por las variables del sistema MBR (Best=0,800 y 0,766 para el biorreactor aireado y anóxico, respectivamente). Los niveles de estrés de los MDS bajan en relación a los MDS de abundancias relativas, acercándose más al nivel de representación considerada excelente (estrés $\leq 0,05$). Nuevamente, no se observan diferencias marcadas entre biorreactores.

En **primavera** se observa una agrupación de las muestras por semanas. Además se vuelve a producir la división en dos grupos de las variables del sistema, el primero englobando los parámetros relacionados con la carga contaminante del influente, y el segundo a la temperatura y los sólidos en suspensión en los BRs. Con la carga contaminante del influente, es la clase C37 la que está correlacionada positivamente, y negativamente la clase C31. Ambas clases de banda corresponden a poblaciones que están identificadas filogenéticamente como pertenecientes a los órdenes *Rhodobacterales* y *Rhizobiales* respectivamente.

Las clases de banda C29 y C40, que corresponden a poblaciones relacionadas filogenéticamente con *Rhizobium gallicum*, presentan correlación positiva con la temperatura y los FSS, mientras que C24, también relacionada con el orden *Rhizobiales*, está negativamente correlacionada con estas variables.

En **verano** las variables más explicativas son los sólidos en suspensión, tanto los influentes como los que se acumulan en el interior de los BRs. Con los sólidos en suspensión influentes, las clases C14 y C21, correspondientes a poblaciones incluidas dentro del orden *Rhizobiales*, están correlacionadas positivamente, y las clases C15 y C35, que representan poblaciones relacionadas con el género *Curvibacter* y el orden *Rhodobacterales* respectivamente, lo están negativamente. A favor de los sólidos en suspensión

de los biorreactores y en contra de la ratio F/M se encuentran las clases de banda C5, C13 y C17, todas clasificadas dentro de las *a-Proteobacterias*.

En **otoño** el peso de la explicación del patrón adoptado por las muestras recae de nuevo en la IT. Con dicha variable están correlacionadas positivamente las clases de banda C22 y C40.

b. Perfiles de TGGE basados en RNA:

Nuevamente, es en la estación de primavera donde la distribución de la incidencia de las poblaciones bacterianas activas es mejor explicada por las variables incluidas en el estudio (Fig.3.13) (Best = 0,744 y 0,709 para el BR aireado y BR anóxico respectivamente). Al igual que en los análisis basados en la abundancia relativa de las poblaciones activas, el BR anóxico presenta mayores valores de Best; sin embargo, en este caso no existe tanta diferencia con los obtenidos para el BR aireado. En todos los casos los niveles de estrés de los MDS son medios, considerando que la representación en dos dimensiones es buena.

En **primavera** se vuelven a formar los dos mismos grupos de variables anteriormente descritos para los perfiles basados en DNA. Con las variables indicadoras de la carga contaminante del influente en el sistema están positivamente correlacionadas las clases C15 y C36, y negativamente las clases C8, C29 y C45. Las clases C19, C22 y C26 están positivamente correlacionadas con la temperatura y los sólidos en suspensión de los BRs, variables con las que está negativamente correlacionada la clase de banda C37, correspondiente a una población perteneciente al orden *Rhodobacterales*.

En **verano**, la temperatura sólo presenta una correlación positiva clara con la clase de banda C10, mientras que es negativa con las clases C37 y C40. Los sólidos en suspensión de los BRs del sistema están positivamente correlacionados con las clases de banda C5 y C24, ambas correspondientes a poblaciones del orden *Rhizobiales*, y negativamente con las clases C8, C14, C23, C25, C30 y C35. De estas clases de banda, la C8, C14 y C30 están muy positivamente correlacionadas con la DBO₅, mostrando de nuevo un comportamiento opuesto al de las clases C5 y C24 en cuanto a la relación

F/M. El resto, presenta mayores correlaciones con los sólidos en suspensión influentes.

En **otoño** sigue siendo la temperatura del sistema la variable que da la mayor explicación del patrón adoptado por las muestras. Con ella aparecen correlacionadas positivamente las clases de banda C9, C20, C22, C37 y C40, y negativamente la clase C24. Esta última clase junto con la C27, pertenecientes a poblaciones clasificadas en el orden *Rhizobiales*, presentan correlación positiva con la BOD₅, correlación que es negativa para las clases C5, C7, C8, C18, C32 y C42. Con los sólidos en suspensión del sistema se encuentran negativamente correlacionadas las clases C16, C29 y C39.

DNA

BR AIREADO

abundancia relativa

BR ANÓXICO

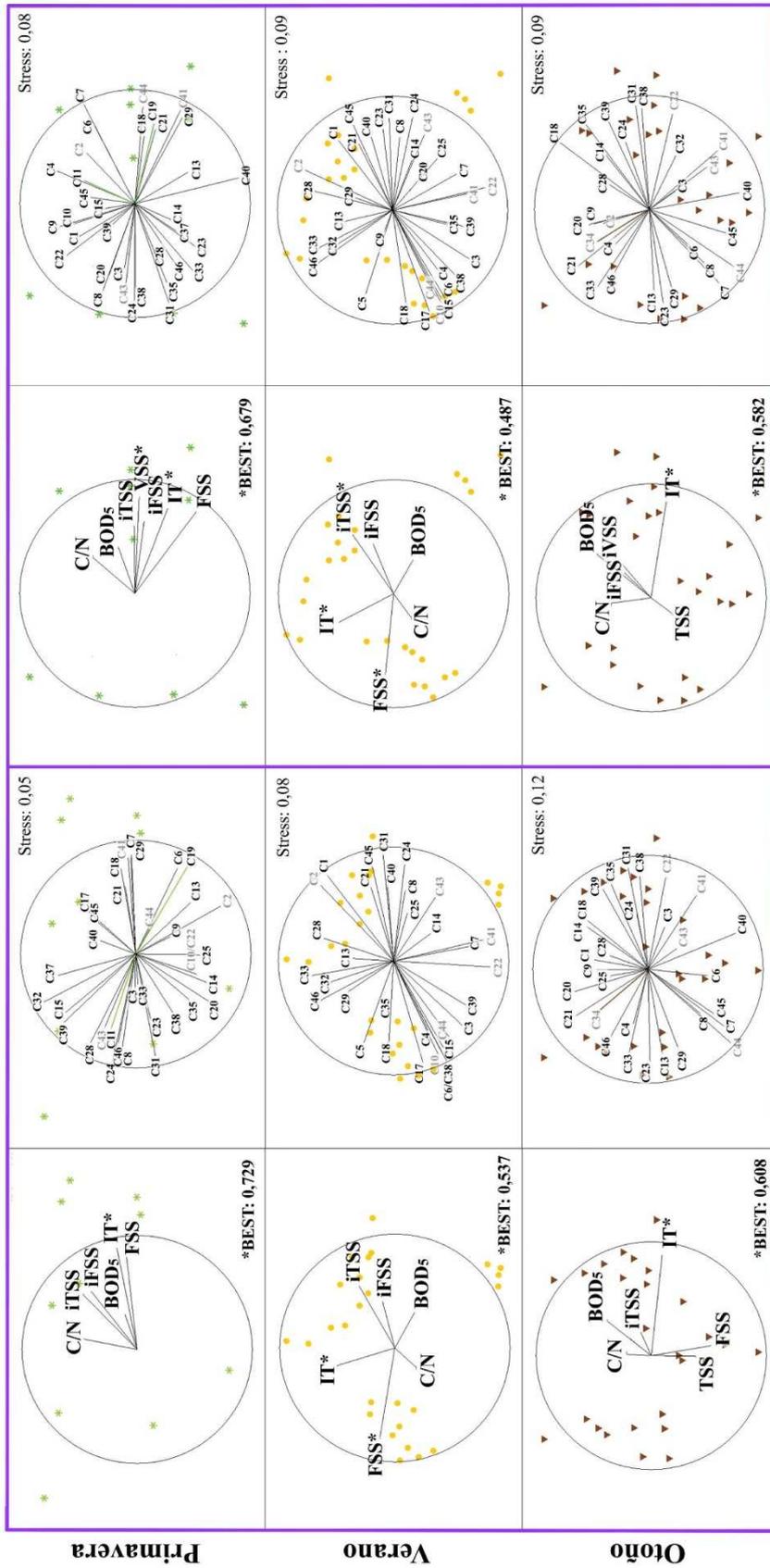


Fig.4.10. Escalado multidimensional no métrico (MDS) mostrando la distribución de la abundancia relativa de las clases de banda en los perfiles de TGGE basados en DNA, en ambos biorreactores (BR) y en las tres estaciones del año. Para cada BR, los vectores representan la dirección y el incremento a través de las muestras de las variables del sistema (columna de la izquierda) y de la abundancia relativa de las diferentes clases de banda detectadas (columna de la derecha). Las variables más explicativas aparecen marcadas con un asterisco (*) y su valor de Best aparece reflejado. Las clases de banda en gris son las no identificadas filogenéticamente. Los vectores de color identifican las bandas exclusivas de la estación.

RNA

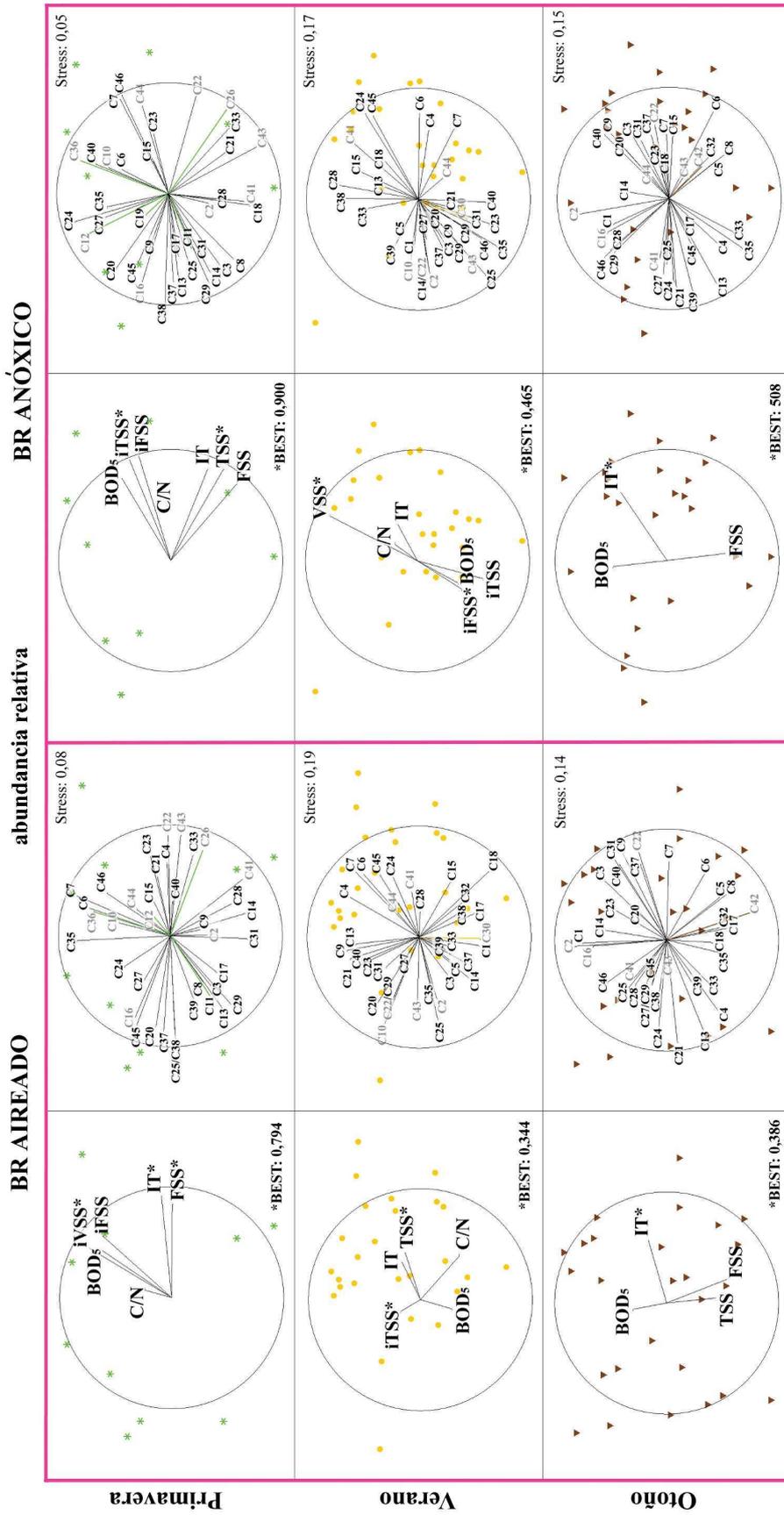


Fig.4.1.1. Escalado multidimensional no métrico (MDS) mostrando la distribución de la abundancia relativa de las clases de banda en los perfiles de TGGE basados en RNA, en ambos biorreactores (BR) y en las tres estaciones del año. Para cada BR, los vectores representan la dirección y el incremento a través de las muestras de las variables del sistema (columna de la izquierda) y de la abundancia relativa de las diferentes clases de banda detectadas (columna de la derecha). Las variables más explicativas aparecen marcadas con un asterisco (*) y su valor de Best aparece reflejado. Las clases de banda en gris son las no identificadas filogenéticamente. Los vectores de color identifican las bandas exclusivas de la estación.

DNA

BR AIREADO

BR ANÓXICO

presencia/ausencia

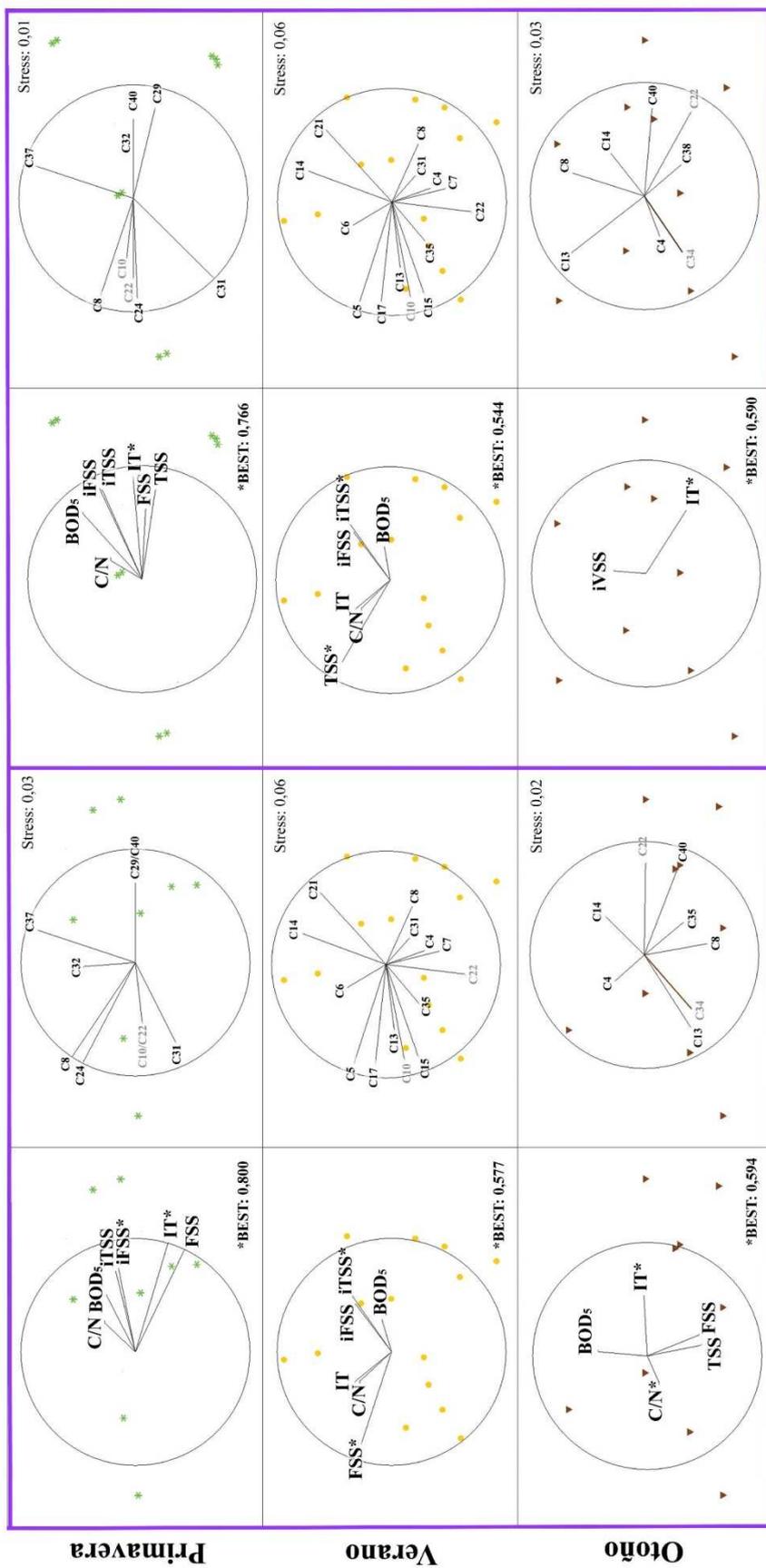


Fig.4.12. Escalado multidimensional no métrico (MDS) mostrando la distribución de la incidencia de las clases de banda en los perfiles de TGGE basados en DNA, en ambos biorreactores (BR) y en las tres estaciones del año. Para cada BR, los vectores representan la dirección y el incremento a través de las muestras de las variables del sistema (columna de la izquierda) y de las clases de banda detectadas (columna de la derecha). Las variables más explicativas aparecen marcadas con un asterisco (*) y su valor de Best aparece reflejado. Las clases de banda en gris son las no identificadas filogenéticamente. Los vectores de color identifican las bandas exclusivas de la estación.

RNA

BR ANÓXICO

presencia/ausencia

BR AIREADO

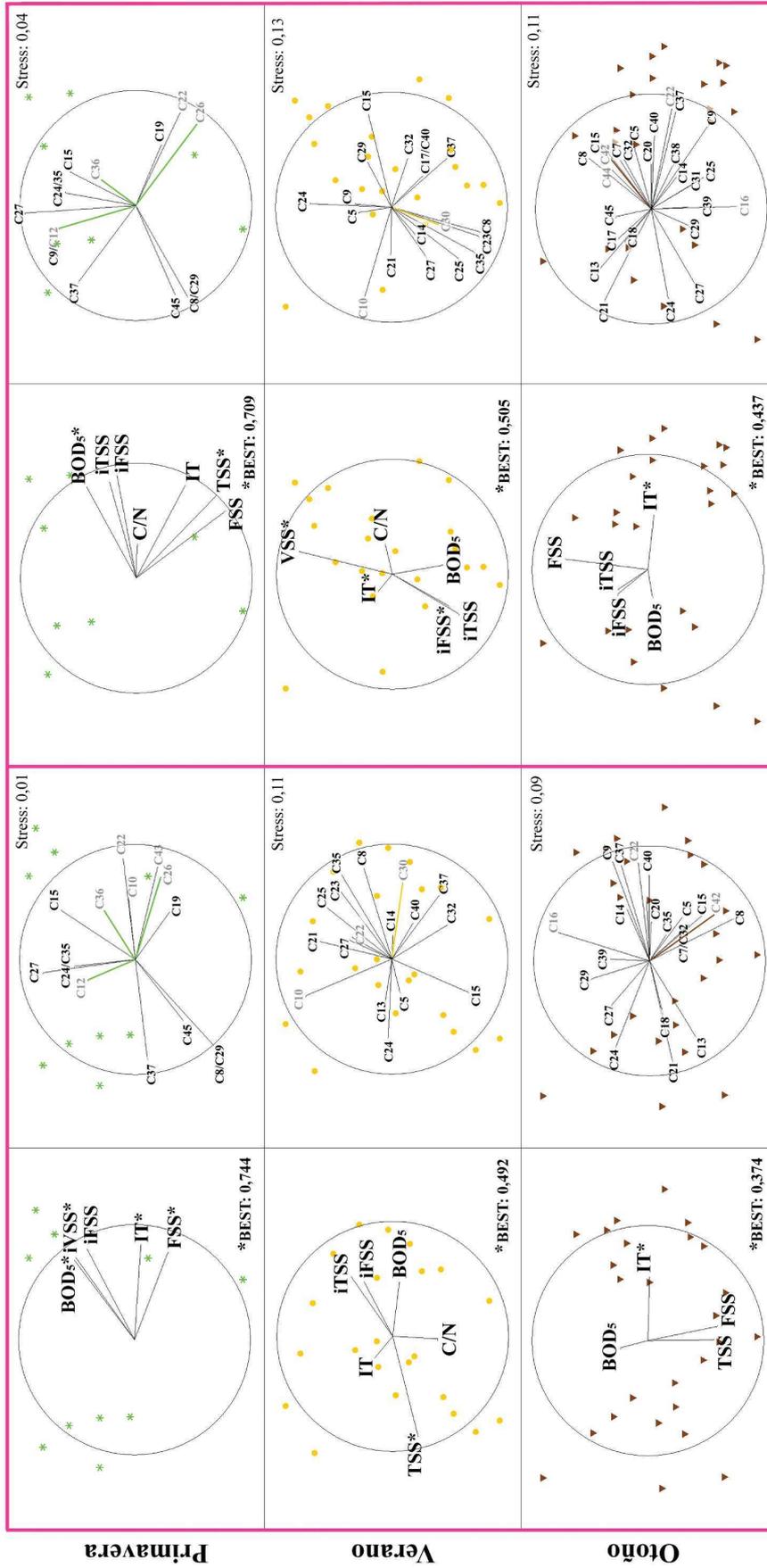


Fig.4.13. Escalado multidimensional no métrico (MDS) mostrando la distribución de las clases de banda en los perfiles de TGGE basados en RNA, en ambos biorreactores (BR) y en las tres estaciones del año. Para cada BR, los vectores representan la dirección y el incremento a través de las muestras de las variables del sistema (columna de la izquierda) y de las clases de banda detectadas (columna de la derecha). Las variables más explicativas aparecen marcadas con un asterisco (*) y su valor de Best aparece reflejado. Las clases de banda en gris son las no identificadas filogenéticamente. Los vectores de color identifican las bandas exclusivas de la estación.

3.4. DISCUSIÓN:

3.4.1. Análisis de la estructura de la comunidad bacteriana en el MBR mediante TGGE:

El análisis de los perfiles de TGGE reveló un sistema fundamentalmente estable durante el periodo de muestreo, sin grandes cambios ni en la composición y estructura de la comunidad presente ni en la de la comunidad activa. Se ha descrito que los factores que más afectan a la estructura de la comunidad son el HRT y el SRT (Judd, 2006, Molina-Muñoz *et al.*, 2009), parámetros que se mantuvieron fijos durante todo el estudio. Debido también a las condiciones de operación, en este caso la alta tasa de recirculación entre biorreactores (700%), la estructura de la comunidad tampoco presentó diferencias significativas entre ellos.

En el sistema estudiado los índices descriptivos de la diversidad bacteriana R_r , D_y , H' y D_y , mostraron un sistema muy rico tanto en especies bacterianas presentes como activas, y una organización funcional media de la comunidad bacteriana capaz de amortiguar los cambios de las variables del sistema. En este estudio, los niveles de riqueza encontrados fueron algo superiores a los descritos en estudios previos mediante técnicas de *fingerprinting*, llevados a cabo en diferentes sistemas de WWT (Ayarza *et al.*, 2010, Calderón *et al.*, 2012a, Falk *et al.*, 2009). Al igual ocurrió con el índice de diversidad de Shannon (Ayarza *et al.*, 2010, Calderón *et al.*, 2012a, Kim *et al.*, 2012). Se ha descrito que un alto grado de diversidad microbiana confiere estabilidad al sistema, ya que garantiza la presencia de diferentes organismos que son capaces de llevar a cabo la misma función en el ecosistema a través de un amplio rango de condiciones ambientales y/u operacionales (redundancia funcional) permitiendo el logro de permeados de gran calidad de manera estable (Ayarza *et al.*, 2010, Miura *et al.*, 2007).

La organización funcional media detectada en el MBR objeto de estudio, fue similar a la encontrada en trabajos previos en sistemas análogos (Calderón *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2010, Wittebolle *et al.*, 2008). Sin embargo, los niveles de dinámica expresados como cambios semanales resultaron inferiores a los descritos en la bibliografía (Ayarza *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2010, Wittebolle *et al.*, 2008). Según Marzorati *et al.* (2008), comunidades con estas características, baja a media dinámica y organización funcional media, están más preparadas para ser sostenibles en el tiempo. En los resultados obtenidos se observó que la dinámica de las comunidades calculada a partir de los perfiles de TGGE basados en DNA es baja durante todo el periodo de muestreo y además disminuye con el paso del tiempo. Estos resultados, junto con los obtenidos por la comparación de los perfiles de TGGE mediante el análisis de clústeres, muestran un sistema estable en cuanto a las poblaciones que están presentes, con cambios paulatinos y progresivos de las mismas. En los perfiles basados en RNA, sin embargo, la dinámica de la comunidad comenzó siendo baja al inicio del muestreo y aumentó con el tiempo, haciéndose media a finales del periodo de estudio. Las poblaciones activas presentan cambios en respuesta a las variaciones del sistema más rápidos y dinámicos. La disminución hasta niveles mínimos de la dinámica de las poblaciones

presentes a finales del muestreo se puede deber a la estabilización de la comunidad y a las ya mencionadas condiciones fijas de funcionamiento (HRT, SRT).

En primavera, la comunidad bacteriana tanto presente como activa, presentó una estructura claramente diferenciada del resto del periodo de estudio. Durante esa estación, las variables del sistema mostraron que la carga contaminante del influente (BOD₅, C/N y los sólidos en suspensión) fue mucho mayor que en las otras dos estaciones anuales. Adicionalmente, aunque el estudio biológico del sistema MBR se inició a los 45 días de su puesta en marcha inicial, cuando desde el punto de vista técnico el sistema mostraba un funcionamiento estable, trabajos previos en sistemas MBR indican que pueden producirse cambios marcados de la estructura de la comunidad bacteriana hasta 100 días después del inicio de la operación, tras los cuales dicha tasa de cambio disminuye. Justifican estos cambios tanto por las fluctuaciones de los parámetros ambientales y de funcionamiento, como por la necesidad de la comunidad del fango de un periodo superior al de estabilización técnica para poder adaptarse por completo a las nuevas condiciones que proporciona el sistema MBR, muy diferentes a las condiciones del CAS de donde proviene el inóculo (Miura *et al.*, 2007).

3.4.2. Análisis filogenético:

En el presente estudio todas las bandas reamplificadas de los geles de TGGE e identificadas filogenéticamente correspondieron al Phylum Proteobacteria. Entre ellas, las *Alphaproteobacterias* fueron las dominantes, englobando los órdenes *Rhizobiales*, *Rhodobacterales*, *Sphingomonadales* y *Rhodospirillales*. Tras ellas, las *Betaproteobacterias* fueron el siguiente Phylum más abundante y todas las poblaciones identificadas pertenecieron a la familia *Comamonadeceae*, representantes del clúster cosmopolita de agua dulce, $\beta 1$ (Glöckner *et al.*, 2000).

La predominancia del grupo de Proteobacterias en aguas residuales está ampliamente documentada. Bramucci *et al.* (2003) describieron esta dominancia gracias a un estudio basado en técnicas dependientes de cultivo y

se ha visto confirmado posteriormente por estudios basados en diferentes técnicas moleculares básicas como *fingerprinting* y librería de clones (Calderón *et al.*, 2012b, Molina-Muñoz *et al.*, 2009, Xia *et al.*, 2010). La reciente introducción de las técnicas de secuenciación masiva en este campo de estudio no han hecho sino confirmar dicha tendencia (Wang *et al.*, 2012, Ye and Zhang, 2012).

Dentro de este Phylum, clásicamente se habían descrito a las β -proteobacterias como el grupo predominante, relacionando a las α -proteobacterias con altas concentraciones de sales en el agua influente (Ye and Zhang, 2012). Sin embargo, recientemente se ha descrito la prevalencia de miembros de esta clase, α -proteobacterias, en MBRs, relacionada con otros factores diferentes a la salinidad del agua. De hecho se ha visto que la distribución de los géneros más abundantes en sistemas biológicos de tratamiento de aguas depende de factores diversos como la región geográfica, la temperatura, salinidad, tipo de tecnología de depuración, pH, SRT, la estación del año y la carga orgánica del agua influente, entre otros (Xia *et al.*, 2012, Ye *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2012).

Sin embargo, es llamativo que en el curso de este estudio tan solo se hayan conseguido identificar Proteobacterias entre las bandas reamplificadas de los geles de TGGE. En sistemas de MBR existen otros grupos bacterianos generalmente menos abundantes que las mencionadas Proteobacterias, pero habitualmente detectados por métodos de *fingerprinting*, como son las *Actinobacterias* y los *Firmicutes* (Calderón *et al.*, 2012a, Calderón *et al.*, 2012b, Molina-Muñoz *et al.*, 2009). Se ha descrito que los Firmicutes forman microcolonias débiles, incapaces de resistir las intensas fuerzas de agitación impuestas a los sistemas de MBR (Hu *et al.*, 2012). En el MBR estudiado concretamente en este trabajo, y como se ha mencionado en apartados anteriores, la tasa de recirculación es muy elevada (700%) contribuyendo a aumentar las fuerzas de agitación a la que se ven sometidas las comunidades. Por otra parte un 28% de las clases de banda detectadas permanecieron sin identificar, debido a la imposibilidad de amplificarlas o de obtener una secuencia única a partir del producto de PCR amplificado. El solapamiento de fragmentos de ADN con el mismo comportamiento electroforético es un

problema frecuente que impide la identificación de la totalidad de las poblaciones prevalentes detectadas mediante DGGE/TGGE (Molina-Muñoz *et al.*, 2009).

3.4.3. Relación de las poblaciones bacterianas presentes y activas con las variables del sistema:

Durante el curso del presente estudio, se identificaron una serie de clases de banda comunes detectadas tanto en los perfiles de las muestras de DNA como de las de RNA en las tres estaciones del año (Fig. 3.8). El análisis BIO-ENV ha permitido comprobar que algunas de estas poblaciones responden de manera muy distinta frente a las variables del sistema, en lo que se refiere a su mera presencia en el lodo de los BRs o su nivel de actividad. Así, por ejemplo, la población representada por la clase C13 (agrupada dentro del orden *Rhodobacterales*), muestra correlaciones altas de su abundancia relativa con la temperatura en los perfiles obtenidos a partir de DNA, mientras que en el caso de las poblaciones activas su abundancia relativa siempre se ve negativamente correlacionada con el aumento de la disponibilidad de compuestos carbonados en el influente (BOD₅). Las variaciones la temperatura también se mostraron como un factor determinante de la abundancia relativa de las poblaciones presentes representadas por la clase de banda C29, agrupada dentro del orden *Rhizobiales*, mientras que la actividad de las mismas se ve más influenciada por la concentración de sólidos en suspensión del influente. Justo al contrario ocurre con la clase de banda C45, correspondiente a una población de δ -Proteobacteria, cuya abundancia relativa entre las poblaciones presentes en el sistema está altamente correlacionada con la concentración de sólidos en suspensión en el influente, mientras que la temperatura es la que explica la mayor o menor abundancia relativa de esta población entre la comunidad bacteriana activa del fango del MBR (Fig. 3.10 y 3.11). Temperatura y disponibilidad de sustratos son factores clave que determinan tanto el crecimiento activo como la supervivencia de las bacterias en cualquier hábitat, incluidos los WWTs (Molina-Muñoz *et al.*, 2009, Molina-Muñoz *et al.*, 2007).

Las clases de banda C11 y C19 fueron detectadas únicamente durante la primavera, estación caracterizada por la mayor carga contaminante del influente. Esta carga mostró influencia negativa sobre la activación de la clase de banda C11, correspondiente a una población perteneciente al orden *Rhodospirillales*. En el caso de la clase C19, población filogenéticamente cercana a *Pseudoxanthomonas*, su abundancia relativa aumenta con el incremento de la temperatura y la concentración de sólidos en suspensión en los biorreactores.

A pesar de la mayor variabilidad que presentan los perfiles de las poblaciones presentes y activas durante la estación de primavera, ésta es, en todos los casos, la estación del año en la que la dinámica de las poblaciones bacterianas está mejor explicada por las variables del sistema incluidas en el análisis. Como se ha mencionado, fue en esta estación donde las cargas **contaminantes del influente** fueron significativamente mayores en comparación con las otras dos estaciones anuales. Está descrito que la composición del agua influente tiene un gran impacto en la estructura de la comunidad bacteriana (Miura *et al.*, 2007). Este mayor impacto se ve especialmente reflejado en la presencia y abundancia relativa de las poblaciones bacterianas que se encuentran activas durante esta estación, siendo la disponibilidad de sustratos carbonados (BOD₅ carbonácea) la que marca que unas poblaciones se activen y otras se inactiven, y los sólidos en suspensión influentes los que afectan a la abundancia relativa de dichas poblaciones. Como ya se ha comentado en apartados anteriores, los sólidos en suspensión además de los compuestos orgánicos que entran en el sistema también engloban componentes inorgánicos, entre los que pueden encontrarse compuestos como ácidos húmicos y tóxicos que puedan influir en las tasas metabólicas (Kim *et al.*, 2011).

En verano, los sólidos en suspensión influentes igualmente fueron un factor determinante de la incidencia de las poblaciones bacterianas, sin embargo, su abundancia relativa estuvo más influenciada por los **sólidos en suspensión** acumulados en el interior de los **biorreactores**. Inversamente ocurrió con las poblaciones bacterianas activas en esta estación, cuya presencia y ausencia se vio marcada por la concentración de biomasa en los

BR del sistema (sólidos suspendidos), mientras que su abundancia relativa lo hizo por los sólidos en suspensión influentes.

La **temperatura** del sistema fue uno de las variables más influyentes en la incidencia y abundancia relativa tanto de las poblaciones presentes como activas, en el global de las muestras analizadas. Este papel es especialmente dominante durante el otoño, cuando la temperatura va disminuyendo paulatinamente, estación donde es la única variable explicativa según el análisis BIO-ENV. En primavera, cuando se da el caso opuesto y la temperatura va en aumento, ésta también constituyó un factor relevante, sobre todo con respecto a la incidencia y abundancia relativa de las poblaciones bacterianas presentes en la comunidad. En verano, cuando la temperatura se mantuvo alta y estable, su influencia se acotó a la abundancia relativa de las poblaciones presentes. Ya en trabajos anteriores (Calderón *et al.*, 2012b, Molina-Muñoz *et al.*, 2009, Molina-Muñoz *et al.*, 2007) se ha destacado que tanto la temperatura como la acumulación de biomasa en los bioreactores juegan un papel importante sobre los cambios que sufre la composición de la comunidad bacteriana en los sistemas MBR.

A pesar de no formar parte de las variables más explicativas de la distribución adoptada por las muestras de fango en las distintas estaciones, la relación F/M juega un papel relevante en el comportamiento de algunas clases de banda detectadas. Este efecto de la relación F/M, que se ve representado por la contraposición en las tendencias de los sólidos en suspensión en el interior del sistema y la fuente de carbono biodegradable del influente (BOD₅), influye especialmente en las estaciones de verano y otoño. Así, por ejemplo, la población representada por la clase de banda C5 siempre incrementa su abundancia relativa a menor valor de la relación F/M, tanto en los perfiles obtenidos a partir de DNA como de RNA, mientras que en el caso de la clase C14 la tendencia es la opuesta. Estas y otras dos clases de banda (C8 y C24), todas ellas agrupadas filogenéticamente dentro del orden *Rhizobiales*, presentan algún tipo de correlación con la ratio F/M. Dicha variable se ha descrito como muy influyente tanto sobre la dinámica de poblaciones de la comunidad bacteriana como sobre la actividad de las mismas en sistemas

MBR, especialmente en ambientes sujetos a limitación de nutrientes como es el estudiado (LaPara *et al.*, 2002, Molina-Muñoz *et al.*, 2007).

La limitación de nutrientes es una condición usual en muchos hábitats microbianos. Los mecanismos que permiten a las bacterias sobrevivir en tales circunstancias son todavía poco conocidos (Thorne and Williams, 1999), sin embargo se conoce que las poblaciones microbianas responden disminuyendo su tasa metabólica y su nivel ribosómico (Kjelleberg *et al.*, 1993). En ecosistemas complejos sometidos a condiciones de estrés ambiental que puedan poner en peligro la funcionalidad de las comunidades microbianas, es frecuente que ciertas poblaciones entren en estos estados caracterizados por hipometabolía y bajas tasas de crecimiento, tales como el desarrollo de células persistentes o la diferenciación a células de resistencia como las endoesporas (Kussell *et al.*, 2005). Estas poblaciones garantizan su supervivencia bajo las condiciones adversas al mismo tiempo que proporcionan un beneficio indirecto a los demás individuos, ya que al reducir sus tasas de crecimiento contribuyen a paliar la competencia por los recursos limitados, por lo que existe la hipótesis de que estas estrategias sean una característica de comportamiento social, expresada por determinadas poblaciones en beneficio de la comunidad (Gardner *et al.*, 2007).

Las diferentes clases de banda detectadas en el análisis de *fingerprinting* realizado en este estudio representan a las poblaciones bacterianas prevalentes en el fango del sistema MBR, cuya dinámica muestra un perfil complejo de adaptación y respuesta a los cambios en las distintas variables estudiadas. Para que se lleve a cabo el proceso de depuración biológica del agua residual, no es sólo necesaria la estabilidad del sistema, sino la dinámica y flexibilidad adecuada de la estructura de la comunidad en su respuesta al entorno (Miura *et al.*, 2007). Este proceso de adaptación y respuesta aún es muy desconocido en los sistemas MBR, haciendo necesarios estudios a largo plazo y el uso de análisis multivariantes para la adecuada interpretación, particularmente cuando funcionan bajo condiciones reales de operación.

CAPÍTULO 4:

ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES PROCARIOTAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA EN PARALELO.

4.1. INTRODUCCIÓN:

Las técnicas moleculares basadas en la denominada secuenciación de primera generación (secuenciación de Sanger) se han mostrado muy eficientes en el estudio y monitorización de la estructura y dinámica de poblaciones microbianas (Molina-Muñoz *et al.*, 2009, Muyzer and Smalla, 1998). Sin embargo, como se comentó anteriormente (Capítulo 3, Apdo.3.1.1), estas técnicas presentan una serie de limitaciones en cuanto al número de poblaciones bacterianas que se pueden identificar, especialmente en ecosistemas complejos (Muyzer and Smalla, 1998).

En la última década se han desarrollado las nuevas tecnologías que permiten la secuenciación de millones de fragmentos de DNA al mismo tiempo y a bajo coste, conocidas como técnicas de secuenciación masiva o *next-generation sequencing* (NGS). Esta nueva metodología de estudio ha cambiado

el enfoque de la investigación científica tanto básica, aplicada como clínica (Metzker, 2010), convirtiéndose en una herramienta destacada para estudios de ecología y biodiversidad (Shokralla *et al.*, 2012).

Desde el lanzamiento en el 2005 de la primera plataforma comercial de NGS (454 Genome Sequencer, Roche Diagnostics Corp., Brandford, CT, EEUU), estas tecnologías se han desarrollado y diversificado rápidamente, existiendo hoy en día múltiples plataformas con diferentes características y aplicaciones (Metzker, 2010, Shokralla *et al.*, 2012). En el campo de la ecología microbiana principalmente compiten dos plataformas, la ya mencionada plataforma de pirosecuenciación (454 Genome Sequencer, Roche Diagnostics Corp., Brandford, CT, EEUU) e Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, EEUU). Ambas tecnologías se basan en la secuenciación de clústeres de fragmentos de DNA amplificados clonalmente y separados físicamente por unión a un soporte. La necesidad de llevar a cabo una amplificación de los fragmentos a secuenciar previa al proceso de secuenciación propiamente dicho viene marcada por limitaciones en los sistemas de imágenes acoplados a las plataformas de NGS, que requieren de una amplificación de la señal (Metzker, 2010).

La primera diferencia entre ambas tecnologías es el soporte utilizado, y por tanto el proceso de amplificación previa. Así, la pirosecuenciación lleva a cabo la amplificación de los fragmentos a secuenciar mediante la denominada PCR en emulsión (emPCR), donde los fragmentos son inmovilizados sobre cuentas o perlas sintéticas y estas se separan físicamente mediante emulsión en agua y aceite. La plataforma Illumina lleva a cabo la denominada amplificación puente en fase sólida, en la cual los fragmentos de DNA quedan inmovilizados por sus dos extremos sobre una superficie plana (Metzker, 2010).

El proceso de secuenciación en sí mismo, en ambos casos se basa en secuenciación por síntesis, el cual consiste en ciclos secuenciales iterativos de extensión mediante la ADN polimerasa y detección de la señal generada. Esta señal, en la pirosecuenciación, es un destello de luz generado indirectamente por la liberación del grupo pirofosfato del nucleótido incorporado a la cadena

de DNA en síntesis. En cada ciclo, un solo tipo de dNTP es añadido (dATP, dTTP, dCTP o dGTP) y más de uno puede incorporarse. En Illumina, cada tipo de dNTP está marcado con un fluorocromo y los cuatro tipos son adicionados a la reacción en cada uno de los ciclos de secuenciación. Además, dichos dNTPs están químicamente inactivados en su extremo 3', por lo que tan sólo una base puede ser incorporada por la polimerasa en cada uno de los ciclos (Shokralla *et al.*, 2012).

Estas últimas características de la plataforma Illumina incrementan la fiabilidad del proceso de secuenciación (Shokralla *et al.*, 2012). Por una parte, la adición de las cuatro bases a la vez en un mismo ciclo permite la competitividad natural entre las mismas para su incorporación a la cadena de nueva síntesis, minimizando incorporaciones inespecíficas (<http://www.illumina.com>). Y por otra parte, la incorporación de un solo dNTP por ciclo de la polimerasa permite una secuenciación más fiable de regiones con bases repetidas (homopolímeros) (Shokralla *et al.*, 2012).

En el Capítulo 3 se ha estudiado la comunidad bacteriana del sistema de MBR mediante la técnica de *fingerprinting* PCR-TGG, metodología que ha permitido la monitorización exhaustiva de las principales poblaciones presentes y activas. Sin embargo, como se ha descrito en la introducción de dicho capítulo (Cap. 3, Apdo. 3.1), este tipo de técnicas presentan limitaciones en cuanto a la profundidad alcanzada en el número de poblaciones identificadas.

En este Capítulo se ha profundizado en el estudio la estructura y dinámica de poblaciones bacterianas presentes y activas en el sistema MBR a lo largo de los nueve meses de operación, mediante la secuenciación en paralelo por amplificación puente a partir de DNA y RNA totales obtenidos de las muestras de fango de los dos BR del sistema, utilizando la plataforma MiSeq Personal Sequencer de Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, EEUU).

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS:

La secuenciación masiva en paralelo de amplicones del 16S rDNA en las muestras de fango de los dos biorreactores del sistema MBR se llevó a cabo empleando la plataforma de secuenciación masiva en paralelo Illumina MiSeq Personal Sequencer (Illumina Inc., San Diego, CA, EEUU). Estos experimentos fueron llevados a cabo gracias a la colaboración con los Dres. R. Vilchez, R. Sandoval y D. Pieper, miembros del Grupo de Investigación “Microbial Interactions and Processes” del Helmholtz Center for Infection Research de Braunschweig, Alemania, que realizaron la preparación de las librerías de amplicones, reacciones de secuenciación y procesado bioinformático de las muestras.

El equipo Illumina MiSeq consta de una lámina de flujo con capacidad para leer 12 índices, y cada índice a su vez puede aglutinar hasta 30 muestras marcadas con una segunda indexación mediante códigos de barras únicos,

obteniéndose así del orden de 50000 secuencias brutas de 150 bp por muestra (R. Vilchez, comunicación personal).

4.2.1. Muestreo de los BRs del MBR para el estudio mediante ilumina:

Las condiciones del sistema MBR están detalladas previamente en la Descripción del sistema MBR, Apdo E. Tanto la metodología del muestreo como la preparación y almacenaje de las muestras y la selección de las mismas se llevó a cabo tal y como se describe en el Capítulo 2, Apdo.2.2.1. En resumen, las amplificaciones se llevaron a cabo a partir del DNA y RNA (mediado por RT-PCR) procedente de las muestras de fango de los biorreactores aireado y anóxico del MBR, al objeto de analizar la diversidad de las poblaciones presentes y activas. Se incluyeron en el análisis muestras mensuales obtenidas de ambos BRs del MBR (18 muestras en total de DNA y 18 de cDNA).

4.2.2. Preparación de librerías de amplicones del rDNA 16S:

Las regiones hipervariables V4 y V5 del gen codificante del 16S rRNA (243 bp) se amplificaron por PCR empleando los cebadores 807F y 1050R:

Nombre	Secuencia 5' – 3'	Referencia
807F	GGATTAGATACCCBRGTAGTC	(Bohorquez <i>et al.</i> , 2012)
1050R	AGYTGDCGACRRCRTGCA	

Estos cebadores están descritos como universales para la amplificación del gen diana de organismos de los dominios Bacteria y Archaea (Bohorquez *et al.*, 2012).

Se prepararon dos librerías que se analizaron separadamente en el equipo MiSeq, la primera conteniendo todos los amplicones procedentes de las muestras de DNA, y la segunda los amplicones de las muestras de cDNA. En cada muestra individual de DNA o cDNA, los amplicones se marcaron con un código de barras único de 8 nt, más un índice que fue común a toda la

librería, introduciéndose también las secuencias adaptadoras y cebadores específicos de Illumina (Camarinha-Silva, 2012). Para ello, cada muestra de DNA o cDNA se empleo como molde, en una serie de 3 amplificaciones consecutivas por PCR, en la que se modificaron de forma conveniente los cebadores 807F y 1050R (Camarinha-Silva, 2012). Todas las amplificaciones se llevaron a cabo con la DNA polimerasa de alta fidelidad PrimeSTAR HS (Takara BioEurope, Saint-Germain-en-Laye, Francia).

Los productos finales de la 3^a amplificación se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa, y se purificaron empleando el kit de placa de 96 pocillos Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se cuantificaron mediante el kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EEUU).

Para preparar cada librería, se mezclaron los amplicones de las 18 muestras de DNA ó cDNA en cantidades equimolares (200 ng). Para eliminar los contaminantes y artefactos de PCR, cada librería se precipitó con 3 volúmenes de etanol absoluto frío y 20 µl de NaCl 3 M, manteniéndose en hielo durante 30 minutos. El DNA precipitado se recuperó por centrifugación a 13.000 g durante 30 minutos a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante, el pellet se secó bajo una corriente de aire, se resuspendió en 30 µl de agua bidestilada y se separó en un gel de agarosa al 2%. Los productos de PCR del tamaño correcto se extrajeron del gel empleando el kit QIAQuick gel extraction (Qiagen, Hamburgo, Alemania). Se incluyeron en el ensayo controles negativos conteniendo agua en lugar de DNA/cDNA, al objeto de comprobar que no existía amplificación en los mismos tras las tres rondas de PCR.

4.2.3. Análisis bioinformático de las secuencias parciales del rDNA 16S:

Aunque la plataforma Miseq permite realizar lecturas de las secuencias desde los dos extremos de los fragmentos de DNA (*pair-end sequencing*), en este estudio, sólo se procesaron secuencias leídas a partir del cebador

forward. Se aplicó en primer lugar un filtro que eliminó los extremos 3' de las secuencias cuyo índice de calidad Q fue inferior a 10, lo que indica que la probabilidad de que una base sea errónea es del 10% (<http://bioinformatics.ucdavis.edu/index.php/Trim.pl>). Después, sólo se continuó el análisis con aquellas secuencias de longitud superior a 115 nt. También fueron descartadas las lecturas truncadas, con nucleótidos indeterminados, errores en los índices o códigos de barras, o con regiones de homopolímeros (>8). Finalmente, dentro de cada librería las secuencias correspondientes a cada una de las muestras se separaron en función de su código de barras específico.

Tras aplicar los filtros mencionados, se obtuvieron un total de 1188656 secuencias de 90 nt (750174 a partir de la librería de DNA, 67,5 Mb; 438482 a partir de la librería de cDNA, 39,5 Mb). El set de datos de cada librería se colapsó al número de lecturas únicas, y posteriormente se definieron las OTUs representativas al 98% de similitud (secuencias con diferencia de 1 nucleótido), usando USEARCH (Edgar, 2010). Finalmente, se empleó un algoritmo (*pseudo-single-linkage clustering algorithm*) para eliminar las secuencias probablemente resultantes de errores de secuenciación (R. Sandoval, comunicación personal). Las OTUs se consideraron en el resto del análisis solamente si:

- a) estaban presentes en al menos una muestra de la librería con una abundancia relativa > 0,1%
- b) estaban presentes en al menos el 15% de las muestras de la librería, independientemente de su abundancia relativa
- c) estaban presentes en al menos el 10% de las muestras de la librería, con una abundancia relativa >0,2%

La afiliación taxonómica de las OTUs se asignó mediante el *RDP Classifier* (Wang et al., 2007). Todas las OTUs se analizaron además manualmente usando la función Seqmatch y frente a la base de datos del NCBI, para definir el poder discriminatorio de cada secuencia.

Las curvas de rarefacción y los índices de diversidad alfa de Shannon (Shannon and Weaver, 1963), Chao 1 (Chao, 1984), ACE y ACE-1 (Chao and

Lee, 1992), así como el índices de equidad de Pielou, *Pielou's evennes* (Pielou, 1966) se calcularon con los paquetes Vegan (<http://vegan.r-forge.r-project.org/>) y Species (Wang, 2011) para *R v. 2.15.1* (<http://www.r-project.org/>). El índice de cobertura de Good (Good, 1953) se calculó para cada muestra con la fórmula:

$$G = [1 - (n/N)] \times 100$$

Donde:

n= número de OTUs presentes una sola vez en una muestra

N= número total de secuencias en una muestra

Para comparar la diversidad procariota en las distintas muestras de fango del MBR a partir de los datos de secuencias obtenidos de las muestras de DNA y RNA, se emplearon las herramientas del programa de libre distribución PAST v 1.90 (Hammer *et al.*, 2001). Se calcularon los coeficientes de similitud de Jaccard, basados en la incidencia de las OTUs compartidas en las muestras. También se realizó un análisis de clústeres jerárquico, basado en una matriz de distancias generada con el coeficiente de Bray-Curtis a partir de los datos de abundancia de secuencias de las distintas OTUs. El correspondiente dendrograma se generó mediante el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*). Para determinar la significancia de los clústeres, se calcularon los valores de confianza mediante el método de muestreo con reemplazamiento (método *Bootstrap*) (Felsenstein, 1985) con 1000 repeticiones.

4.3. RESULTADOS:

4.3.1. Análisis de los parámetros e índices de diversidad en las muestras de fango del MBR a partir de los datos obtenidos de Illumina.

En las tablas Tabla 4.1 y 4.2 se muestra el número total de secuencias finales analizadas en cada muestra, tras pasar todos los filtros mencionados anteriormente (Apado.4.2.3), obtenidas en cada una de las estaciones estudiadas, en ambos biorreactores y según la muestra analizada fuese de DNA o RNA. Junto este número, aparece además el número total de OTUs asignadas, el índice de diversidad de Shannon (H'), y los valores con desviación estándar e intervalos de confianza al 95% de las estimaciones dadas por los índices Chao 1, ACE y ACE-1. También figuran el índice de equidad de Pielou y el índice de cobertura de Good.

Muestra	DNA			Chao 1				ACE				ACE-1				Equidad de Pielou	Cobertura de Good
	S	OTUs	H'	Chao 1	SD	IC 95% (inferior)	IC 95% (superior)	ACE	SD	IC 95% (inferior)	IC 95% (superior)	ACE-1	SD	IC 95% (inferior)	IC 95% (superior)		
A1	35161	453	4,34	512	18,87	485	562	503	12,8	479	529	515	17,13	483	551	0,71	99,81
A9	41801	578	4,74	688	32,69	640	773	634	13,11	609	660	647	17,44	614	683	0,75	99,80
A13	35755	692	5,33	747	17,51	722	793	724	8,33	708	740	728	9,66	709	747	0,81	99,81
A21	40485	716	5,14	752	11,64	736	783	749	8,5	733	766	753	9,77	734	773	0,78	99,83
A29	38729	732	5,01	784	15,13	762	823	772	9,49	754	791	777	10,99	756	799	0,76	99,79
A37	44564	768	5,12	811	13,05	792	845	806	9,21	788	825	811	10,65	790	832	0,77	99,83
A45	47774	818	5,27	841	8,53	829	864	838	6,06	826	850	840	6,56	827	853	0,79	99,89
A53	42084	799	5,34	831	10,93	816	860	824	6,97	811	838	826	7,66	812	842	0,80	99,86
A61	40157	809	5,41	843	11,16	827	872	836	7,23	822	850	838	8	822	850	0,81	99,84
X1	35926	468	4,36	552	24,8	516	616	540	16,49	509	574	564	24,44	519	615	0,71	99,77
X9	37532	612	4,84	704	24,48	668	766	686	15,53	657	718	706	21,39	666	750	0,75	99,74
X13	38893	724	5,32	789	19,83	761	841	762	9,41	744	781	768	11,1	747	790	0,81	99,81
X21	48391	747	5,14	779	10,43	764	806	779	8,21	763	795	782	9,35	764	801	0,78	99,87
X29	51436	751	4,98	803	15,97	780	845	786	8,76	769	803	790	10,12	771	811	0,75	99,86
X37	42530	778	5,19	825	14,17	804	862	815	8,92	797	832	819	10,26	799	839	0,78	99,82
X45	43569	813	5,26	856	13,75	836	892	839	7,19	826	854	842	7,96	826	858	0,78	99,85
X53	39135	812	5,40	846	11,15	830	876	839	7,2	825	853	841	7,91	826	857	0,81	99,83
X61	46252	813	5,40	855	13,48	836	891	842	7,66	827	857	845	8,62	828	862	0,81	99,86

Tabla 4.1. Número de secuencias filtradas (S), número de OTUs, índice de Shannon (H') índices de diversidad Chao-1, ACE, ACE-1, equidad de Pielou y porcentaje de cobertura de Good, calculados a partir de los datos de Illumina obtenidos para las muestras de DNA del fango de los dos BRs (A: aireado; X: anóxico) del MBR.

RNA	Chao 1						ACE				ACE-1				Equidad de Pielou	Cobertura de Good	
	Muestra	S	OTUs	H'	Chao 1	SD	IC 95% (inferior)	IC 95% (superior)	ACE	SD	IC 95% (inferior)	IC 95% (superior)	ACE-1	SD			IC 95% (inferior)
A1	35079	183	1,67	199	10,04	188	233	192	4,6	183	201	193	5,41	183	204	0,32	99,95
A13	31311	459	4,39	498	15,44	477	541	479	6,52	466	492	481	7,49	467	496	0,72	99,86
A21	23992	420	4,18	438	8,39	427	463	432	4,78	423	442	433	5,23	423	444	0,69	99,87
A29	26590	482	4,46	501	7,89	490	523	499	5,69	488	510	500	6,25	488	513	0,72	99,85
A37	30226	501	4,26	537	13,58	519	575	522	6,55	510	535	524	7,35	510	539	0,69	99,84
A45	28437	521	4,52	549	10,55	535	578	546	7,42	532	561	549	8,6	533	567	0,72	99,82
A53	20769	458	4,29	497	15,08	477	539	479	6,7	467	493	482	7,61	467	497	0,70	99,77
A61	17406	447	4,36	487	15,02	466	528	470	7,08	456	484	472	8,22	457	489	0,71	99,72
X1	8212	222	2,9	280	20,35	252	335	272	13,63	248	302	289	20,34	255	335	0,54	99,31
X9	12477	285	3,23	348	22,75	317	410	323	10,98	303	346	133	14,89	306	365	0,57	99,56
X13	12524	325	3,96	342	7,71	332	365	340	5,53	330	351	342	6,15	330	354	0,69	99,73
X21	21571	409	4,09	447	14	428	486	436	8,14	421	453	441	9,76	422	461	0,68	99,76
X29	24887	495	4,45	539	15,21	518	580	524	8,21	509	541	528	9,6	510	548	0,72	99,77
X37	28745	501	4,19	524	8,67	512	548	524	6,96	511	538	527	7,9	512	543	0,67	99,83
X45	21031	512	4,5	540	9,99	527	568	541	7,97	526	557	544	9,17	527	563	0,72	99,73
X53	9455	417	4,27	480	18,91	452	529	462	10,91	442	485	470	13,42	446	498	0,71	99,21
X61	15629	463	4,57	507	16,71	485	554	484	6,58	471	497	486	7,41	472	501	0,74	99,69

Tabla 4.2. Número de secuencias filtradas (S), número de OTUs, índice de Shannon (H') índices de diversidad Chao-1, ACE, ACE-1, equidad de Pielou y porcentaje de cobertura de Good, calculados a partir de los datos de Illumina obtenidos para las muestras de RNA del fango de los dos BRs (A: aireado; X: anóxico) del MBR.

En el global de muestras, se detectaron 914 OTUs en las muestras de DNA y 613 OTUs en las muestras de RNA. Cada una de las muestras de DNA alberga entre 453 y 818 OTUs (74-89.5%), mientras que las de RNA contienen entre 183 y 521 OTUs (29.9-85%).

En el análisis de las muestras del biorreactor aireado durante primavera y basadas en el RNA, para la muestra A9 se obtuvieron menos de 1000 secuencias brutas, por lo que no logró pasar los filtros previos, y no aparece reflejada en el estudio.

Los índices de **Chao-1**, **ACE** y **ACE-1** mostrados en las Tablas 4.1. y 4.2 indican que en todos los casos el análisis de diversidad realizado da una buena representación del número de OTUs total estimado en las muestras. Para el índice de Chao 1, el número de especies estimado teóricamente está siempre en torno a un 10% por encima del detectado.

En todos los casos el índice de cobertura de Good se encuentra por encima del 99% (Tablas 4.1-4.2), indicando igualmente que con el análisis realizado con MiSeq de Illumina se ha logrado obtener una representación mayoritaria de la biodiversidad procariota presente en el sistema durante todo el periodo estudiado. Estos resultados se reflejan además en las **curvas de rarefacción** (Fig.4.1), en las cuales se observa que, para todas las muestras, dichas curvas alcanzan su punto de inflexión, indicando que al aumentar el número de secuencias, el incremento en el número de nuevas OTUs detectadas es mucho menor.

En la Tabla 4.3 se muestra la media, con su desviación estándar, del número total de secuencias finales, tras pasar todos los filtros mencionados anteriormente (Apado.4.2.3) obtenidos en cada una de las estaciones estudiadas, en ambos biorreactores y según la muestra analizada fuese de DNA o RNA. Junto este número, aparece además el número total de OTUs, el índice de diversidad de Shannon (H'), el índice de equidad de Pielou y el índice de cobertura de Good.

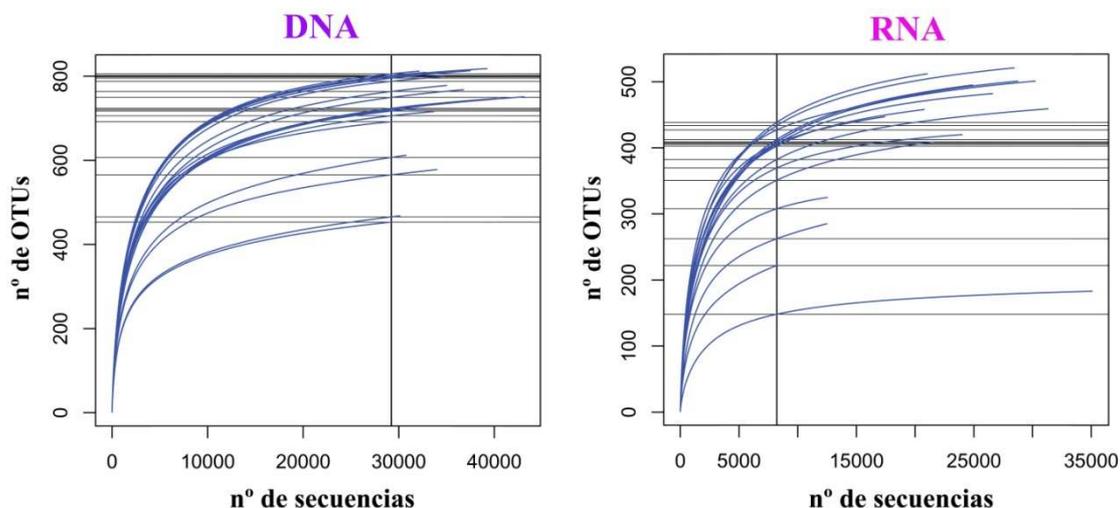


Fig. 4.1. Curvas de rarefacción de las muestras de DNA y RNA analizadas. Se ha utilizado el número de OTUs asignado tras aplicar todos los filtros indicados en el apartado 4.2.3.

Tabla 4.3. Media y desviación estándar de los parámetros e índices de los datos obtenidos por el análisis de Illumina. Los datos seguidos entre paréntesis por la misma letra no son estadísticamente diferentes, según el test Wilcoxon ($p < 0,10$).

		DNA	RNA
Secuencias totales	A	33552 ± 3233 (a)	26726 ± 5804 (b)
	X	35174 ± 4457 (a)	17170 ± 7190 (c)
OTUs totales	A	707 ± 121 (a)	434 ± 106 (c)
	X	724 ± 115 (b)	403 ± 104 (c)
H'	A	5,08 ± 0,34 (a)	4,02 ± 0,95 (b)
	X	5,10 ± 0,33 (a)	4,02 ± 0,58 (b)
Equidad de Pielou	A	0,78 ± 0,03 (a)	0,66 ± 0,14 (b)
	X	0,78 ± 0,03 (a)	0,67 ± 0,07 (b)
Cobertura de Good	A	99,83 ± 0,03 (a)	99,84 ± 0,07 (b)
	X	99,82 ± 0,04 (a)	99,62 ± 0,22 (c)

El análisis de Wilcoxon no reveló diferencias significativas ($p < 0,10$) entre las estaciones para ninguno de los parámetros muestreados (datos no mostrados). Se detectaron diferencias significativas entre las muestras de DNA y las muestras de RNA para todos los parámetros e índices estudiados, siendo casi todos significativamente inferiores en las muestras de RNA (Tabla 4.3).

El **índice de Shannon (H')** indica que hay una gran diversidad en las comunidades de todas las muestras estudiadas, tanto en relación a las poblaciones procariontas que se encuentran presentes como aquellas que están activas. El **índice de equidad de Pielou** revela comunidades procariontas con una uniformidad media en cuanto a la abundancia relativa de las poblaciones, indicando que se trata de un sistema con un nivel de organización funcional medio. La comunidad detectada en las muestras de DNA es significativamente más uniforme que la detectada en las muestras de RNA.

Los coeficientes de Jaccard (Tablas 4.4. y 4.5.) indican mayor similitud entre los datos de comunidad obtenidos a partir de las muestras de DNA que entre las de RNA, ya que oscilan entre 0,457-0,890 para las muestras de DNA y entre 0,271-0,859 para las muestras de RNA. En general, se aprecia que comparten más OTUs las muestras obtenidas un mismo día de ambos BRs del sistema, mientras que la diversidad de poblaciones cambia a lo largo del periodo de muestreo. Estos datos son corroborados por los dendrogramas construidos a partir de la matriz de similitud de Bray-Curtis, que tiene en cuenta la abundancia relativa de las OTUs en las muestras (Fig. 4.2). Las comunidades de las muestras de fango A1 y X1 presentan una mayor divergencia de la diversidad con el resto de las muestras analizadas.

	A1	A9	A13	A21	A29	A37	A45	A53	A61	X1	X9	X13	X21	X29	X37	X45	X53	X61
A1	1.000																	
A9	0.606	1.000																
A13	0.560	0.709	1.000															
A21	0.485	0.613	0.791	1.000														
A29	0.463	0.586	0.732	0.824	1.000													
A37	0.464	0.574	0.700	0.756	0.807	1.000												
A45	0.478	0.592	0.746	0.775	0.796	0.857	1.000											
A53	0.458	0.565	0.696	0.733	0.758	0.820	0.863	1.000										
A61	0.473	0.583	0.710	0.749	0.782	0.829	0.857	0.883	1.000									
X1	0.795	0.627	0.572	0.516	0.494	0.489	0.501	0.477	0.494	1.000								
X9	0.597	0.814	0.729	0.652	0.617	0.614	0.638	0.600	0.617	0.612	1.000							
X13	0.553	0.689	0.861	0.778	0.723	0.719	0.770	0.737	0.748	0.564	0.713	1.000						
X21	0.493	0.630	0.797	0.878	0.815	0.766	0.795	0.759	0.770	0.509	0.663	0.781	1.000					
X29	0.494	0.607	0.760	0.831	0.865	0.808	0.808	0.763	0.789	0.518	0.644	0.756	0.843	1.000				
X37	0.464	0.593	0.717	0.760	0.808	0.899	0.862	0.829	0.841	0.492	0.624	0.732	0.784	0.818	1.000			
X45	0.481	0.593	0.744	0.782	0.794	0.860	0.912	0.855	0.858	0.493	0.634	0.757	0.791	0.800	0.865	1.000		
X53	0.457	0.571	0.694	0.750	0.773	0.824	0.876	0.904	0.870	0.475	0.611	0.734	0.776	0.768	0.832	0.868	1.000	
X61	0.479	0.588	0.710	0.747	0.784	0.828	0.864	0.892	0.910	0.502	0.623	0.745	0.773	0.779	0.835	0.858	0.890	1.000

Tabla 4.4. Matriz de coeficientes de similitud de Jaccard entre las comunidades procariotas de las muestras de fango obtenidas del MBR, calculada en función de la incidencia de las OTUs identificadas a partir de las muestras de DNA.

	A1	A13	A21	A29	A37	A45	A53	A61	X1	X9	X13	X21	X29	X37	X45	X53	X61
A1	1.000																
A13	0.326	1.000															
A21	0.377	0.684	1.000														
A29	0.322	0.680	0.692	1.000													
A37	0.283	0.672	0.633	0.759	1.000												
A45	0.292	0.710	0.660	0.723	0.777	1.000											
A53	0.316	0.658	0.638	0.679	0.665	0.727	1.000										
A61	0.335	0.641	0.597	0.638	0.663	0.716	0.698	1.000									
X1	0.457	0.376	0.411	0.389	0.364	0.363	0.388	0.403	1.000								
X9	0.422	0.494	0.494	0.461	0.432	0.465	0.471	0.476	0.487	1.000							
X13	0.384	0.623	0.549	0.511	0.486	0.527	0.520	0.505	0.417	0.495	1.000						
X21	0.345	0.660	0.734	0.669	0.599	0.626	0.612	0.606	0.390	0.499	0.542	1.000					
X29	0.317	0.691	0.698	0.843	0.772	0.743	0.684	0.638	0.374	0.455	0.510	0.653	1.000				
X37	0.271	0.678	0.639	0.740	0.859	0.774	0.668	0.663	0.356	0.424	0.480	0.611	0.754	1.000			
X45	0.275	0.701	0.652	0.738	0.759	0.848	0.729	0.706	0.369	0.452	0.530	0.624	0.745	0.783	1.000		
X53	0.327	0.613	0.607	0.611	0.613	0.666	0.740	0.665	0.365	0.487	0.543	0.588	0.640	0.599	0.674	1.000	
X61	0.318	0.664	0.605	0.655	0.679	0.732	0.699	0.753	0.395	0.475	0.507	0.600	0.681	0.677	0.723	0.645	1.000

Tabla 4.5. Matriz de coeficientes de similitud de Jaccard entre las comunidades procariotas de las muestras de fango obtenidas del MBR, calculada en función de la incidencia de las OTUs identificadas a partir de las muestras de RNA.

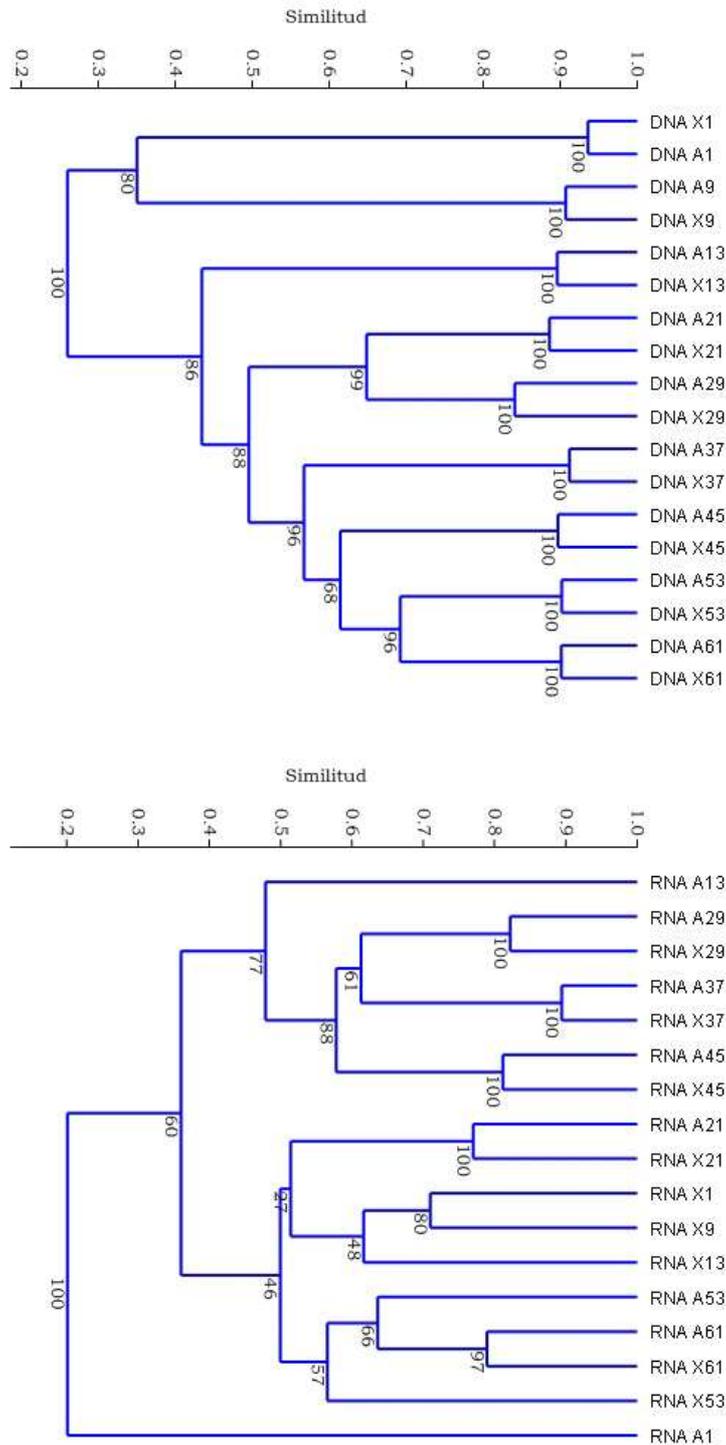


Fig. 4.2. Dendrogramas representando la similitud entre las comunidades procariotas de las muestras de DNA y RNA obtenidas del fango de los bioreactores aireado (A) y anóxico (X) del MBR. El análisis de clústeres se basa en la matriz de distancias de Bray-Curtis, generada a partir de los datos de abundancia de secuencias de cada una de las OTUs identificadas. Los números junto a las ramas indican el valor de *bootstrap*.

4.3.2. Análisis de la biodiversidad de poblaciones bacterianas presentes y activas detectadas en los BRs del MBR mediante secuenciación con Illumina:

En el análisis de los datos procedentes de Illumina se observa que el número de OTUs detectado en las muestras de RNA es inferior al detectado en las muestras de DNA (Fig.4.3). Los cebadores empleados están descritos como universales para los dos dominios de los procariotas; sin embargo, solamente se identificó una OTU clasificada en el Dominio Archaea, en las muestras amplificadas a partir de DNA. Esta OTU, afiliada al orden *Methanosarcinales*, está presente en todas las muestra analizadas de ambos BRs, con una abundancia relativa entre 0,07-0,36 %.

Tanto en las muestras de DNA como en las de RNA, el Phylum bacteriano dominante son la Proteobacterias (Fig.4.3 y 4.4), constituyendo un 33,4% de la comunidad en las muestras de DNA y un 36,5% en las muestras de RNA. En segunda posición se sitúan los Bacteroidetes, con un 12,7% y un 22,6% para DNA y RNA respectivamente. En las muestras de RNA el tercer lugar en abundancia lo ocupan los Firmicutes con un 17,6% de abundancia. Sin embargo, en las muestras de DNA el tercer puesto está ocupado por la Actinobacterias con un 16,4%. Cada uno de los grupos bacterianos restantes detectados en las muestras de RNA constituye menos del 2% de la comunidad. En las muestras de DNA los grupos Chloroflexi y Firmicutes también fueron representativos, ocupando el 4º y 5º puesto en abundancia con un 4,5% y un 3,9% respectivamente.

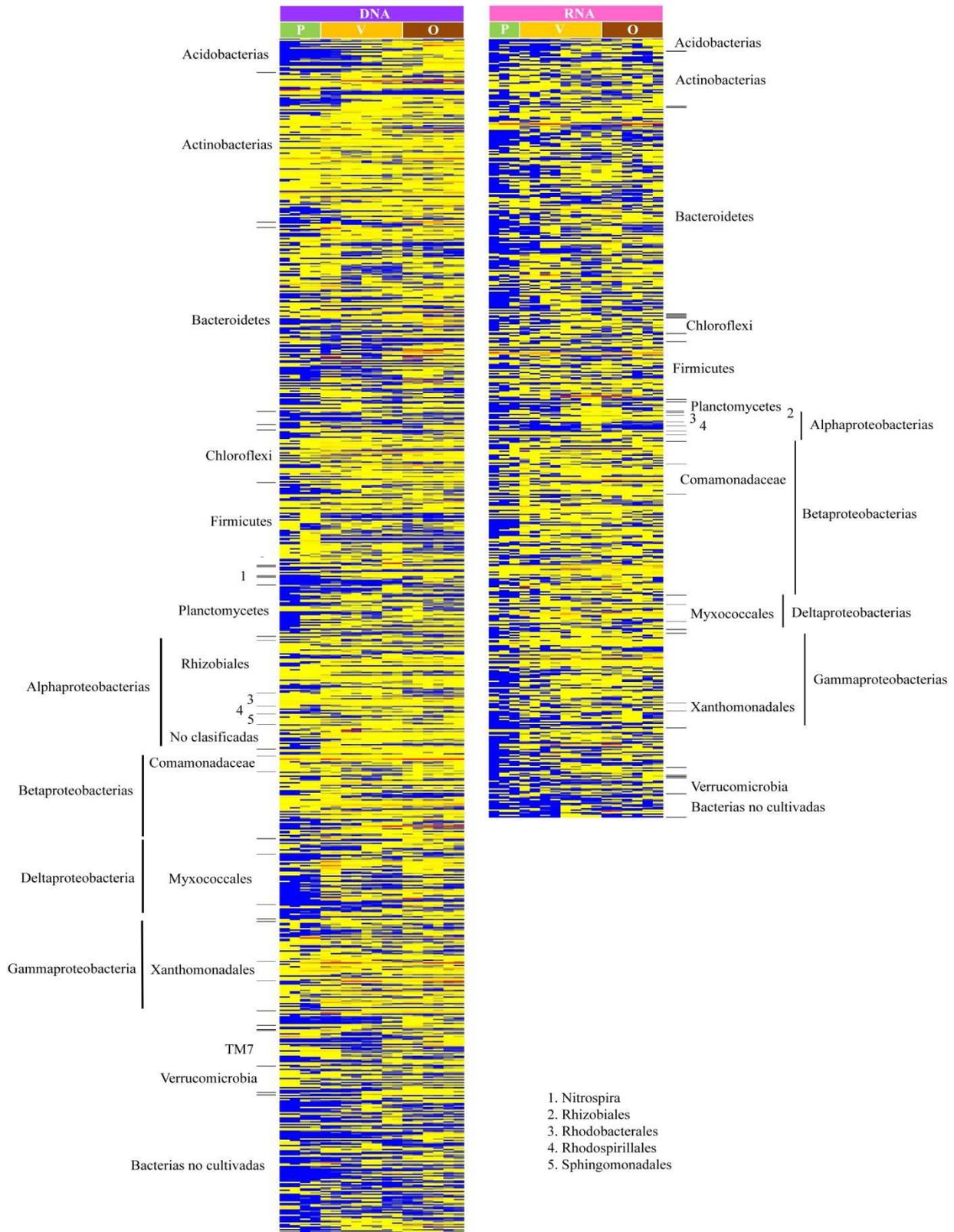


Fig.4.3. Heatmap de las abundancias relativas de los OTUs detectados en la comunidad bacteriana presente y activa del fango del MBR. Las muestras están ordenadas por biorreactor (aireado-anóxico) y día de muestreo durante la primavera (P), verano (V) y otoño (O). Los colores del *heatmap* van de azul a rojo según el incremento de abundancia relativa. En los laterales aparecen los identificados los taxones más abundantes y/o relevantes.

Al analizar el Phylum más predominante, las **Proteobacterias** (Fig.4.3 y 4.4), las Epsilonproteobacterias constituyen un porcentaje muy bajo de la población tanto en las muestras de DNA como de RNA (0,14% y 0,08% respectivamente). El orden de predominancia del resto de las clases sí difiere entre las poblaciones presentes y las poblaciones activas. Así, en las muestras de DNA el orden de mayor a menor abundancia de las diferentes clases fue Gamma, Beta, Alpha y Deltaproteobacterias con 11,4%, 10,7%, 5,7% y 4,2% respectivamente. Sin embargo, en las muestras de RNA la clase más abundante fue la Betaproteobacteria con un 18,8% de la población total, seguidas por las Gamma (8,7%), Delta (4,2%) y en último lugar las Alphaproteobacterias, con tan sólo un 0,86% de la abundancia relativa de la comunidad.

En la Figura 4.5 se observan las gráficas de los porcentajes acumulados de los órdenes de cada una de las clases de Proteobacterias más abundantes. En las gráficas representando las **α -proteobacterias**, se observa que las OTUs correspondientes a bacterias no cultivadas constituyen un alto porcentaje, un 35,3% de las Alphaproteobacterias (2,1% de la abundancia relativa total). Tras ellas, el orden *Rhizobiales* es el más abundante, constituyendo un 33,2 % de esta clase (1,9% de la abundancia total). En las muestras de RNA, la abundancia relativa de las α -proteobacterias no cultivadas disminuye (13,8% de las Alpha, 0,12% del total) y el orden más representado son las *Rhodobacterales* con un 27,3% de la abundancia de la clase (0,23% del total).

En la clase **β -proteobacteria** (Fig.4.5) pasa algo similar al caso anterior con respecto a la abundancia de bacterias no cultivadas, que es mucho mayor en las muestras de DNA que en las muestras de RNA (29,4 y 15,6% de la abundancia de la clase). En ambos tipos de muestras, el orden más abundante dentro de la clase Betaproteobacterias fue el orden *Burkholderiales* constituyendo un 43,7% en las muestras de DNA y un 47,4% en las muestras de RNA (4,58% y 8,9% de la población total). Dentro de este orden, las poblaciones afiliadas a la familia *Comamonadaceae* constituyen una parte muy relevante (34,3% y 22,6%) de las β -proteobacterias detectadas.

La clase **δ -proteobacteria** (Fig.4.5) está claramente dominada por representantes del orden *Myxococcales* tanto en las muestras de DNA como de RNA, constituyendo un 77,4% y 91,4% de la clase (3,25%.y 3,88% de la población total). Sin embargo, en las **γ -proteobacterias** existe una marcada diferencia entre los grupos dominantes de las muestras de DNA y las muestras de RNA. Así, en las primeras, el grupo claramente dominante son las *Xanthomonadales* con un 56,8% de la abundancia total de la clase (6,5% de la abundancia total), mientras que en las muestras de RNA el orden dominante es *Pseudomonadales* con un 59,7% de las poblaciones detectadas de Gammaproteobacterias (5,2% de la comunidad total). Este orden es el segundo en abundancia en las muestras de DNA (19,7% de la clase y 2,2% del la población total) mientras que en las muestras de RNA la segunda posición la ocupa *Enterobacterales* (16,4% de las Gammaproteobacterias y un 1,5% de la población total).

En general, no se observan diferencias marcadas en la diversidad entre biorreactores para los muestreos realizados en un mismo día.

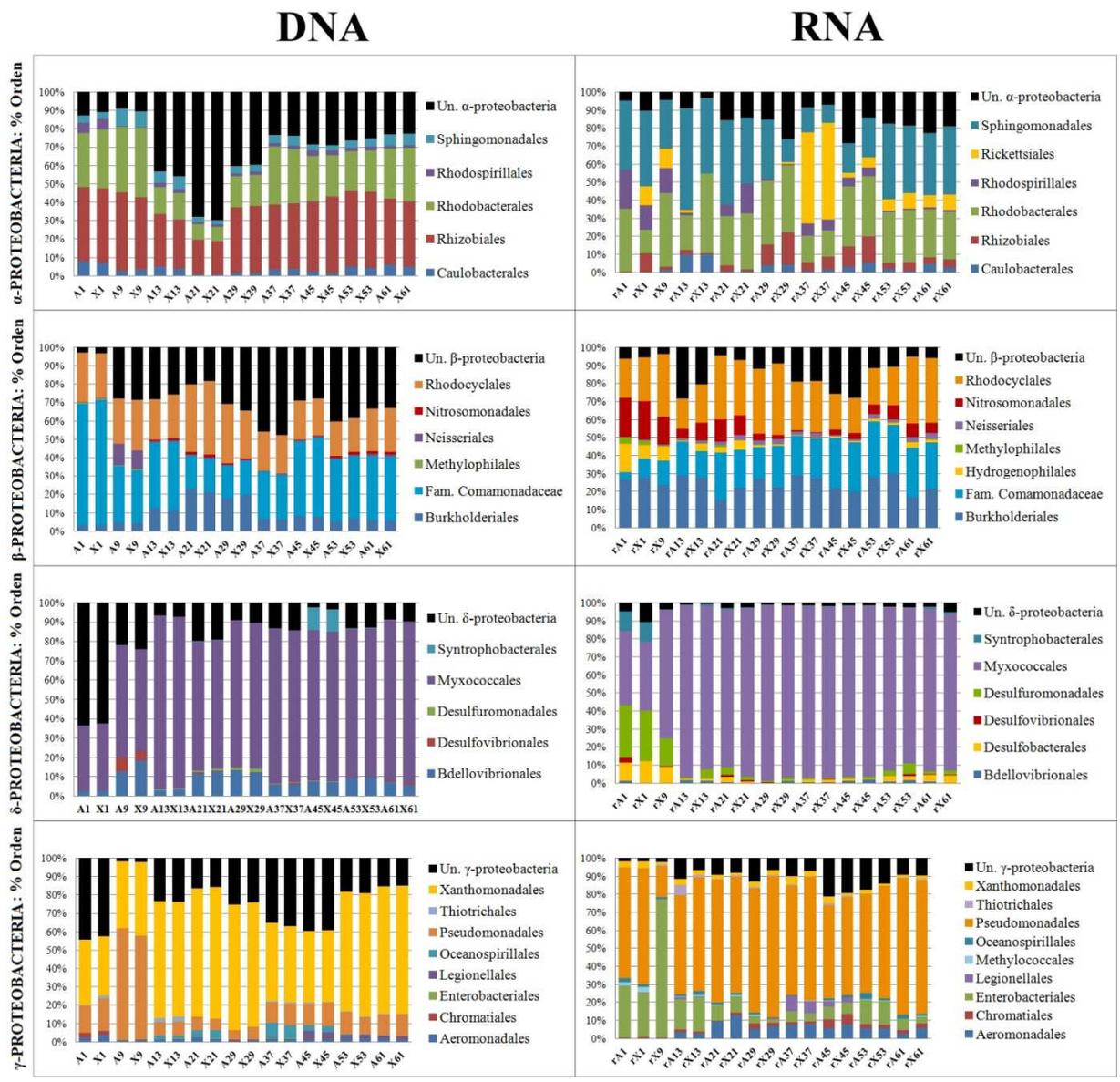


Fig.4.5. Gráfica de porcentajes acumulados de la abundancia relativa de los órdenes de la diferentes clases de Proteobacterias detectados por Illumina en las muestras de DNA y RNA tomadas en ambos biorreactores del sistema MBR (A: aireado; X: anóxico) durante todo el periodo de muestreo.

4.4. DISCUSIÓN:

Las plataformas de secuenciación masiva en paralelo han posibilitado realizar estudios de la diversidad de los microorganismos en ecosistemas naturales o sistemas de ingeniería, con una profundidad mayor de la que permiten los métodos moleculares convencionales como la construcción de bibliotecas de clones, técnicas de *fingerprinting* o FISH, en particular a la hora de detectar los organismos poco abundantes (Wang *et al.*, 2012). De las dos plataformas de secuenciación masiva más empleadas actualmente, la pirosecuenciación por medio de Roche 454 permite obtener secuencias de un tamaño de hasta 600 nt, mientras que la plataforma Illumina proporciona secuencias más cortas (150 nt) pero en mucho mayor número, y a un coste mucho más reducido (Shokralla *et al.*, 2012). Con la selección adecuada de cebadores universales que amplifiquen regiones hipervariables del 16S rDNA, es posible amplificar fragmentos cortos pero de una variabilidad suficiente para evaluar la diferencia en la diversidad de las comunidades bacterianas

(Caporaso *et al.*, 2012). Los fragmentos de las regiones hipervariables del 16S rDNA de menos de 200 nt permiten definir hasta el cuarto nivel taxonómico (generalmente Orden) (Bertolini *et al.*, 2012).

Al igual que ha ocurrido con otros muchos sistemas ambientales, el conocimiento de la diversidad microbiana en los tratamientos del agua residual se ha ampliado considerablemente en los últimos años tras la introducción de los métodos de secuenciación masiva. No obstante, aún existen relativamente pocos estudios, en comparación con el esfuerzo realizado para la identificación de la diversidad en otros ecosistemas (Wang *et al.*, 2012). En la mayoría de los trabajos publicados hasta la fecha se emplea la plataforma Roche 454 para la obtención de datos de secuencias, y se toma como base para la exploración de la diversidad el DNA extraído de las muestras de fango activo (Hu *et al.*, 2012, Sannapareddy *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2012, Ye *et al.*, 2011, Ye & Zhang 2012, Zhang *et al.*, 2011). Los datos disponibles actualmente se han obtenido principalmente a partir de plantas de tratamiento a escala real de la República Popular China y América del Norte, mientras que los datos de plantas en Europa son escasos. Igualmente, se dispone de menos datos en relación a los sistemas MBR que a los fangos activos convencionales.

Como ya se comentó en el Capítulo 3, la prevalencia de las Proteobacterias en los sistemas de WWT está bien establecida mediante los métodos de análisis de comunidades tanto basados en cultivo como independientes del mismo, y la aplicación de la secuenciación masiva en paralelo ha confirmado este predominio de las Proteobacterias. En el primer estudio publicado basado en secuenciación mediante Roche 454, Sannapareddy *et al.* (2009) encontraron que el 70% de las secuencias recuperadas del fango activo de un CAS en California pertenecían a este Phylum. Sólo existe un estudio que compara la diversidad a partir de muestras de DNA y RNA procedentes de un mismo fango activo (Yu & Zhang, 2012). En la Tabla 4.6., se resumen los datos publicados recientemente en tres estudios realizados en un total de 27 plantas de agua residual, ubicadas casi todas ellas en la República Popular China, que indican que la abundancia de las Proteobacterias oscila entre el 21 y el 65% (Wang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011, Yu & Zhang, 2012). Los datos obtenidos en el presente estudio se sitúan

dentro de ese rango (33,4% y 36,5% para los datos obtenidos a partir de las muestras de DNA y RNA, respectivamente).

Tabla 4.6. Abundancia relativa de los diferentes Phyla bacterianos en un total de 27 plantas de agua residual a escala real

Phylum/Clase	Referencia:			
	Wang <i>et al.</i> , 2012	Zhang <i>et al.</i> , 2011	Yu & Zhang, 2012	
			DNA	RNA
Proteobacteria	21-53 %	36-65 %	22,4 %	49,5 %
Alpha	7-48 %	5,6-25,7 %	-	-
Beta	21-52 %	3,8-24,3 %	-	-
Gamma	8-34 %	4,7-18,6 %	-	-
Delta	2-18 %	2,6-12,9 %	-	-
Epsilon	-	0,01-0,5 %	-	-
Firmicutes	-	1,4-4,6 %	3,2 %	3,0 %
Bacteroidetes	11-64 %	2,7-15,6 %	5,7 %	8,1 %
Actinobacteria	-	1,3-14 %	15,0 %	6,0 %
Acidobacteria	1-27 %	0,1-7,5 %	-	-
Chloroflexi	1-17 %	0-0,6 %	-	-

En cuanto a la abundancia relativa de las distintas clases de las Proteobacterias, estos estudios muestran que la distribución es enormemente variable, si bien las Epsilonproteobacteria fueron detectadas en un porcentaje muy pequeño de las secuencias (Tabla 4.6). Estos resultados también coinciden con los observados en el presente estudio, donde la abundancia de esta clase fue <0,2 tanto en el análisis realizado a partir de DNA como de RNA. A pesar de su baja abundancia, las Epsilonproteobacteria pueden tener relevancia en los sistemas de tratamiento basados en la separación de los sólidos del agua residual mediante membranas, particularmente en los tratamientos anaerobios, pues se ha descrito su presencia en las biopelículas de ensuciamiento biológico formadas sobre las membranas en este tipo de sistemas (Calderón *et al.*, 2010).

La clase predominante de las Proteobacterias es generalmente Betaproteobacteria o Alfacaproteobacteria (Sannapareddy *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011). Esta última es particularmente abundante (>25%) en WWTs que tratan aguas con salinidad alta, tales como las ubicadas en Hong Kong, donde se dispone de un sistema dual que emplea agua de mar en los inodoros (Ye & Zhang, 2011, Zhang *et al.*, 2011, Yu & Zhang, 2012), sin embargo no es el único factor relacionado con su predominio. En algunos casos, se ha encontrado que en las plantas basadas en MBR las

Alphaproteobacteria predominan sobre las Betaproteobacteria, en tratamientos de salinidad estándar (Wang *et al.* 2012).

En el curso del presente estudio, las Gammaproteobacterias son la clase dominante entre las poblaciones presentes de Proteobacterias, mientras que las Betaproteobacteria son más abundantes entre las poblaciones activas. La clase Gammaproteobacteria también se ha descrito como la mayoritaria en algunas WWT, tanto por medio de secuenciación masiva (Wang *et al.*, 2012) como por técnicas basadas en el uso de microarrays filogenéticos (Xia *et al.*, 2010).

En cuanto a otros Phyla bacterianos, Bacteroidetes (12,7% en las muestras de DNA; 22,6% en las muestras de RNA), seguidos de Actinobacteria (17,6%, muestras de DNA) o Firmicutes (16,4% muestras de RNA), fueron los siguientes grupos en orden de abundancia relativa después de las Proteobacterias, coincidiendo en gran medida con los resultados de los estudios existentes, resumidos en la Tabla 4.6. Las diferencias encontradas en la abundancia relativa de Firmicutes y Actinobacterias en las muestras de DNA o RNA analizadas en el presente estudio no coincide con los datos anteriormente descritos por Yu & Zhang (2012). No obstante, estos autores comprobaron que la relación 16S rRNA/16S rDNA de muchos Phyla bacterianos es superior a 1 en el fango activo, indicando diferencias entre ellos en la capacidad para expresar el 16S rRNA, y en consecuencia diferencias en sus actividades relativas en el WWT.

En este Capítulo, el objetivo que se perseguía fundamentalmente era el de profundizar en la caracterización filogenética de las poblaciones procariotas en el MBR, usando una herramienta de mayor resolución que la secuenciación de las bandas separadas por medio de la técnica de *fingerprinting* TGGE. En efecto, se logra este objetivo, como demuestra la evaluación de la diversidad bacteriana del sistema mediante el índice de Shannon-Wiener, que es mucho mayor para los datos de secuenciación masiva que para los derivados de *fingerprinting* (Fig. 3.6, Tabla 4.3). Ambas aproximaciones permiten también concluir que la organización funcional de las comunidades es media-alta (Fig. 3.6, Tabla 4.3) y que existe poca divergencia en la composición de poblaciones tanto presentes como activas, entre los biorreactores aireado y anóxico (Fig.

3.1, 3.2 y 4.4, Tablas 4.4 y 4.5). La comparación de los grupos de bacterias con mayor abundancia relativa de secuencias generadas mediante la plataforma Illumina (Figs. 4.4 y 4.5) también corrobora que existen diferencias en la diversidad de las comunidades de bacterias presentes y activas, ya observadas en el análisis mediante TGGE. No obstante, al comparar los datos obtenidos se observan discrepancias en el cálculo de los grupos dominantes de bacterias en el fango del MBR. Estas diferencias se relacionan con la distinta resolución de las técnicas empleadas, aunque el uso de distintos cebadores y la exploración de diferentes regiones hipervariables del 16S rDNA también pueden ejercer influencia.

Los estudios realizados hasta la fecha para evaluar la diversidad bacteriana en sistemas de WWT mediante secuenciación masiva en paralelo son fundamentalmente descriptivos y se han realizado sobre plantas de agua residual ubicadas en diferentes localizaciones geográficas y climáticas, basadas en diferentes diseños y tecnologías, operadas en condiciones muy diversas, y alimentadas con agua residual de origen tanto urbano como industrial, factores todos ellos que influyen enormemente en la diversidad de las comunidades microbianas. Un estudio reciente (Wang et al., 2012) estima que el factor más influyente es la composición del agua residual, seguido de los parámetros operacionales y la localización geográfica/climática. El conocimiento actual es por tanto todavía insuficiente para establecer vínculos sólidos entre dichos factores y la estructura y dinámica de las comunidades en estos sistemas.

DISCUSIÓN GENERAL

Este estudio se ha centrado en la caracterización microbiológica de los lodos activos de un sistema de depuración de aguas residuales urbanas basado en la tecnología de membranas de filtración. En concreto, el MBR estudiado fue un sistema a escala real formado por dos biorreactores configurados en modo de predesnitrificación y tratando muy eficientemente agua residual urbana. Como se comentó en la Introducción General (Apdo.III), la mayoría de los estudios de esta tecnología al alza se han centrado en biorreactores a escala de laboratorio y tratando aguas sintéticas (van Nieuwenhuijzen *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2006), lo que dificulta las aplicaciones directas de los resultados obtenidos a sistemas reales.

Debido a que este tipo de tecnologías de depuración de aguas se basa en un tratamiento biológico, son los microorganismos los que llevan el peso del proceso de eliminación de materia orgánica y otros contaminantes presentes en las aguas residuales. Por ello el estudio de la diversidad microbiana constituye uno de los puntos clave para la mejora y optimización del funcionamiento de los sistemas. En este sentido, la biología molecular ha supuesto una revolución para el ámbito de la ecología microbiana (Erijman *et al.*, 2011), y más concretamente en los estudio de caracterización de las complejas comunidades que constituyen los lodos activos. Sin embargo, menos se conoce de las respuestas de dichas poblaciones ante los factores ambientales u operacionales de los sistemas que afectan a la comunidad. Periodos de muestreo prolongados se hacen indispensables para lograr dicho objetivo, junto con el uso de las herramientas estadísticas apropiadas que permitan correlacionar los parámetros biológicos con los fisico-químicos.

Durante la estación de primavera todas las variables del sistema (temperatura, carga contaminante del influente y acumulación de biomasa en el interior del sistema) van en aumento. Estas características, marcadamente diferentes a las de las otras dos estaciones del año estudiadas, han condicionado el funcionamiento y la estructura de la comunidad del fango, viéndose reflejado en los diferentes estudios realizados. Como se ha referido en la Introducción General (Apdo.II) la comunidad de lodos activos está principalmente constituida por bacterias y, por tanto, son las principales responsables de la degradación de la materia orgánica (Erijman *et al.*, 2011),

en primer lugar mediante la síntesis y liberación de enzimas hidrolíticas extracelulares capaces de lisar la materia orgánica hasta compuestos asimilables por los microorganismos (Burgess and Pletschke, 2008, Goel *et al.*, 1998). Las muestras de primavera en los estudios de biodiversidad bacteriana llevados a cabo mediante técnicas de *fingerprinting* revelaron un perfil de comunidad claramente diferenciado de las otras dos estaciones, tanto al analizar las poblaciones bacterianas que se encontraban presentes como aquellas que se encuentran activas. Estas últimas, las poblaciones activas, presentaron una mayor variabilidad en sus perfiles, ilustrando su capacidad de respuesta frente a los cambios en las variables. Esta capacidad de respuesta de la comunidad del fango también se vio claramente reflejada los perfiles de actividades enzimáticas, los cuales presentaron un mayor rango de variación durante esta estación.

Adicionalmente, como ya se ha comentado en apartados anteriores (Capítulo 3, Apdo. 3.4.1), en estudios previos llevados a cabo en biorreactores de membrana (Miura *et al.*, 2007), se ha descrito que la comunidad de los fangos activos necesita un periodo de adaptación superior al periodo de estabilización técnica de este tipo de plantas de depuración. Las muestras de primavera de este trabajo estuvieron incluidas en el final del periodo que Miura *et al.* (2007) describen como necesario para alcanzar la estabilización de la comunidad, la cual se ve reflejada muy claramente en la disminución progresiva de la dinámica de poblaciones presentes a lo largo de las dos estaciones anuales siguientes (Fig. 4.6). Los estudios de comunidad llevados a cabo mediante secuenciación masiva en paralelo revelan una menor diversidad en las muestras de este periodo (Tabla 4.1 y Fig.4.1) incrementándose y estabilizándose ésta en las muestras de verano. El mayor periodo de adaptación de la comunidad puede venir marcado por aquellas poblaciones bacterianas de crecimiento lento como son las bacterias nitrificantes. De hecho y en este sentido, la cuantificación mediante qPCR de bacterias oxidadoras de nitrito reveló una menor presencia en las primeras muestras del periodo de operación, aumentando su número en las siguientes.

Sin embargo se ha de tener en cuenta que las diferencias anteriormente descritas, aunque significativas, no son muy grandes. Así, en los análisis de

biodiversidad realizados mediante *fingerprinting*, todos los perfiles de poblaciones se ven agrupados por encima del 80% de similitud e incluso para las poblaciones del ciclo del nitrógeno, la similitud entre las muestras está por encima del mismo porcentaje según el índice de Bray-Curtis. El MBR se revela como un sistema estable con una comunidad microbiana muy rica y compleja, con una organización funcional media que le permite ser flexible a la hora de afrontar las variaciones de las diferentes variables y/o parámetros del entorno sin que el proceso de depuración se vea afectado (Erijman *et al.*, 2011, Marzorati *et al.*, 2008).

La temperatura del sistema se revela como una de las variables más influyentes sobre la comunidad del fango a todos los niveles estudiados. Esta variable ha mostrado gran influencia sobre las actividades enzimáticas y sobre la estructura y dinámica de las poblaciones bacterianas que se encuentran mayoritariamente presentes y activas. Esta influencia ha sido especialmente relevante durante la estación de otoño, en la cual la temperatura descendió en 12°C aproximadamente. La influencia de la temperatura sobre los microorganismos y su regulación ha sido ampliamente descrita en la bibliografía previa (Burgess and Pletschke, 2008, Cunha *et al.*, 2010, Gerardi, 2006, Molina-Muñoz *et al.*, 2010, Molina-Muñoz *et al.*, 2007). En varios de estos trabajos también se describe la concentración de sólidos en suspensión en el interior de los biorreactores como una variable muy determinante de los diferentes parámetros biológicos estudiados (Calderón *et al.*, 2012b, Molina-Muñoz *et al.*, 2010, Molina-Muñoz *et al.*, 2007), lo que está en concordancia con lo encontrado en el presente trabajo. La concentración de sólidos en suspensión que aporta el agua de entrada también ha mostrado especial influencia sobre la comunidad del sistema (Chróst, 1992, Kim *et al.*, 2012, Morgenroth *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES:

1. Las actividades fosfatasa ácida y básica, α -glucosidasa y proteasa en el sistema MBR estudiado fueron muy dinámicas, mostrando complejos y diversos patrones de variación al monitorizarse a largo plazo. La actividad media de todas ellas fue similar en las fases aireada y anóxica del MBR experimental, aunque los patrones de distribución y sus correlaciones con las variables del sistema difieren ligeramente. Es recomendable, por lo tanto, el análisis de diferentes enzimas para la evaluación de la capacidad degradadora de plantas de WWT basadas en MBRs.

2. Se ha observado una consistente y alta correlación negativa entre la proteasa y la α -glucosidasa. Las distintas variables del sistema MBR analizadas mostraron influencias contrarias sobre estas actividades, sugiriendo una alternancia entre las principales hidrolasas degradadoras de compuestos carbonados en respuesta los cambios de las mencionadas variables.

3. El sistema MBR experimental estudiado permitió el correcto desarrollo y actividad de las poblaciones bacterianas responsables de la degradación de compuestos nitrogenados (bacterias desnitrificantes, oxidadoras de amonio y oxidadoras de nitrito) de forma estable a lo largo de todo el periodo de operación, reflejados en la alta tasa de eliminación de N detectada.

4. Se observó una correlación negativa entre la abundancia relativa de las poblaciones bacterianas desnitrificantes y de las oxidadoras de amonio en respuesta a la relación C/N influente en el sistema MBR, requiriéndose un equilibrio de dicha variable para que se lleve a cabo la correcta eliminación de los compuestos nitrogenados.

5. Los estudios de la biodiversidad bacteriana tanto presente como activa revelaron un sistema muy rico en poblaciones, con redundancia funcional y dinámica estable, características de una comunidad compleja capaz de responder y amortiguar en gran medida los cambios en las variables ambientales y/u operacionales sin que el proceso de depuración se vea afectado.

6. Ambas metodologías utilizadas para el estudio de la biodiversidad bacteriana presente y activa en el sistema MBR, *fingerprinting* y secuenciación masiva, revelaron que son las Proteobacterias el grupo dominante.

7. La enorme complejidad de la comunidad bacteriana de los lodos activos y diferentes características, limitaciones o sesgos que las diferentes técnicas moleculares presentan hace necesaria la utilización acoplada de diversas metodologías con el fin de desvelar la comunidad presente en este tipo de sistemas y su respuesta a las variaciones de su entorno.

8. Los análisis de escalado multidimensional no métrico (MDS) y BIO-ENV resultaron herramientas muy útiles para la caracterización de la comunidad del fango y para establecer sus relaciones con los cambios en las variables del sistema (temperatura, composición del agua influente y acumulación de biomasa en los biorreactores). Además, dicha caracterización del MBR bajo condiciones reales de operación requiere muestreos a largo plazo para lograr tanto relacionar los diferentes parámetros biológicos con las variables del sistema, como la correlación entre ellas mismas. Estos resultados remarcan la compleja estructura, dinámica y regulación de las comunidades microbianas en el fango activo.

ENGLISH SUMMARY

1. INTRODUCTION:

1.1. Biological wastewater treatment technologies: Membrane bioreactors (MBR)s:

Wastewater generated by anthropogenic activities is usually treated by processes based in the conventional activated sludge (CAS) technology, developed and patented by Arden and Locket in 1914. This classic system has evolved through years, being modified many times with the purpose of improving its efficiency for the removal of organic matter, reducing the space needed for the installation, enhance the elimination of P and N, and minimize the cost of the process.

The CAS technology enhances the natural biological processes of biodegradation and bioaccumulation, through which the mineralization of organic matter takes place after its assimilation by a community of different microbial groups, and their subsequent sedimentation. Because of the characteristics of the process, a decantation system is required, a fact that often limits the efficiency of the technology due to problems such as the production of foams, floatability of the sludge, or the large size required for the installation (Bitton, 2010). At the same time, it must be taken into account the great amount of biomass generated in CAS, which forces to the operations of sludge purge and its separated treatment, which account for up

to a 50% of the total cost of the wastewater treatment (Defrance and Jaffrin, 1999).

In the last 50 years, the technical and social developments have aroused the need for new wastewater treatment (WWT) technologies, more efficient regarding nutrient removal, and able to generate treated water of a better quality. The drawbacks of the CAS technology have been studied in search of solutions in recent years, together with an increasing concern regarding the need of reutilization of the treated wastewaters in dry countries. Tertiary treatments such as macrofiltration, microfiltration, ultrafiltration, and reverse osmosis are the most commonly used methods (Hontoria E *et al.*, 2003), which provide an effluent of high quality, that meets the parameters required for its direct reutilization.

Membrane bioreactors (MBRs) are based on the combination of the activated sludge process and the separation of the particulate material by membrane filtration, avoiding the necessity of a secondary clarifier (Cicek, 2003, Judd, 2008). Since the first introduction of these systems in the 1960s (Hardt *et al.*, 1970, Smith *et al.*, 1969), the MBR market is incessantly growing, due to the high efficiency and the progressive decrease of the cost of this technology (Drews and Kraume, 2005). In 2005, there were MBRs in 200 countries (Parker, 2008) and by 2009 the number of WWT plants based in membrane separation increased to 7600 and was expanded worldwide (Judd, 2011).

After just a few decades of existence, MBRs are currently well established as WWT systems which directly compete with the CAS processes, due to the many advantages which make them a technology of choice for wastewater reclamation and reuse (Le-Clech, 2010). MBRs are compact systems with small necessities of space and improved yields in wastewater treatment, mainly regarding the removal of nitrogen compounds and pathogenic microorganisms (Stamper *et al.*, 2003, Ueda and Horan, 2000). One of the main benefits brought about by the MBRs is the ability to work with high concentrations of volatile suspended solids (VSS) in the sludge, regardless of the organic load in the wastewater (Witzig *et al.*, 2002). Elevated concentrations of VSS enable to work with high cell retention times, favoring

the development of slow-growing bacteria, such as ammonia oxidizers and nitrite oxidizers, which are crucial for the transformation of the toxic nitrogen compounds ammonia and nitrite (Witzig *et al.*, 2002).

The use of the MBR technology also generates some problems, being a main concern the clogging of the membranes, the inefficiency of oxygenation, or the formation of biofilms on the membrane surface, which alters the efficiency of the system. Nevertheless, the advantages of the technique introduce an important change in the concept of urban wastewater treatment and are currently an attractive alternative to the CAS technology.

1.2. Activity and diversity of microbial communities in MBRs.

Microbial communities developed in MBR-based WWT systems are analogous to those present in CAS sludges; however, differences in the biomass yield, composition and structure have been reported (Ng and Hermanowicz, 2005). The microorganisms are exposed to completely different conditions, mainly due to the biomass recycling in MBRs, which leads to changes in the biology of the system. Bacteria are subjected to a substrate-limited environment, which induces low growth rates and reduces the respiratory potential of the microorganisms, hence, influencing the activities and species composition of the sludge community (Konopka, 2000, Konopka *et al.*, 1996, Morgan *et al.*, 2002).

In biological WWT, the removal of organic matter relies on the activity of a mixed community of heterotrophic microorganisms (Burgess and Pletschke, 2008). The oxidative processes can utilize oxygen as the terminal electron acceptor or use nitrate under anoxic conditions, a step which is also of central importance to support nitrogen removal through nitrification-denitrification (Galvez *et al.*, 2003). Organic matter in wastewater is composed of a high fraction (40-60%) of particulate material, which requires an initial hydrolysis into low-molecular weight products prior to being assimilated by microorganisms (Goel *et al.*, 1998). The stepwise depolymerization of these complex molecules is usually the first and overall rate-limiting step for the mineralization of organic matter (Burgess and Pletschke, 2008). In urban wastewater, the major components of the organic fraction are carbohydrates

(25-50%) and proteins (40-60%) (Bitton, 2010), being phosphatases, glucosidases and proteases amongst the most relevant hydrolases (Molina-Muñoz *et al.*, 2010). Monitoring these biological activities gives an estimate of the active biomass in WWTs and has been used for kinetic data evaluation (Macomber *et al.*, 2005).

In order to control the efficiency of the WWT processes, it is important to recognize the variables that regulate microbial hydrolases (Nybroe *et al.*, 1992). The activity of these enzymes in WWT plants is controlled by diverse microbial mechanisms which respond to changes in the variables influencing the system, such as the availability of nutrients, electron acceptor conditions, pH or temperature (Boczar *et al.*, 1992, Burgess and Pletschke, 2008, Nybroe *et al.*, 1992). The inherent characteristics of the type of technology selected for WWT and operational parameters such as hydraulic retention time (HRT) can also influence the performance of the microbial hydrolytic activities (Morgenroth *et al.*, 2002). Previous studies have focused on factors that specifically influence hydrolytic enzyme activities in MBRs, such as seasonal temperature, biomass concentration in the sludge, and nutrient stringency (Chen and LaPara, 2006, LaPara *et al.*, 2006, Molina-Muñoz *et al.*, 2010, Molina-Muñoz *et al.*, 2007). Most of the available studies have been conducted using artificial wastewater or pilot-scale plants operated for short-term periods, while long-term monitoring of hydrolytic enzyme activities on MBR plants conducted under real operating conditions is sparse. Additionally, while studies conducted in soil, sediments, rivers and other aquatic habitats often used multivariate analysis methods to link changes in enzyme activities of complex microbial communities to environmental factors (Boerner *et al.*, 2005, Frossard *et al.*, 2012, Hoostal *et al.*, 2008, Sinsabaugh *et al.*, 2008), few attempts are found in previous literature to use these statistical approaches to understand the relationship between enzyme activities and the different types of variables which influence the biology of engineered systems (Calderón *et al.*, 2012a).

Biological nitrification coupled to denitrification is the most versatile and widely used process in technologies treating nitrogenous wastewater. Nitrification is achieved through a two-step process involving two different chemolithotrophic bacterial groups. First, ammonia is oxidized to nitrite by

ammonia-oxidizing bacteria (AOB). In the second step, nitrite oxidation is carried out by nitrite-oxidizing bacteria (NOB) to produce nitrate. Finally, denitrification involves the reduction of nitrate via nitrite and nitric oxide, to nitrous oxide or dinitrogen gas (Martinez-Espinosa *et al.*, 2011). While few genera are in charge of nitrification, denitrifying bacteria exhibit a high taxonomic diversity, most of them belonging to various subclasses of the Proteobacteria, others to Gram-positive bacteria and even Archaea (Kraft, *et al.*, 2011).

A consistent long-term performance of a WWT plant can only be ensured when the microbial community within the sludge functions optimally. For this purpose, questions about community structure, activity and the population kinetics have to be answered by means of molecular monitoring tools, which allow identifying and quantifying the microorganisms present in the WWT plants. One of the major advances in the field of microbial ecology is the introduction of the molecular biology techniques based on the *in situ* detection of nucleic acids. These methods provide important information about the microorganisms in their natural habitats, and have allowed for the discovery of a wide number of microbial species that were previously unknown, due to the difficulties for their culture and preservation under laboratory conditions. Several methods are available for assessing the abundance or diversity of bacterial communities in ecosystems, such as fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and fingerprinting methods (DGGE/TGGE) (Geets *et al.*, 2007).

To investigate the performance of nitrifiers and denitrifiers in WWTs, a need exists for tools that give an insight in the quantitative distribution of nitrogen-cycling communities in a large number of samples. In this sense, quantitative polymerase chain reaction (qPCR) methods (real-time PCR) have shown a high sensitivity (Smith and Osborn, 2009).

Denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis (DGGE/TGGE) are fingerprinting methods which yield extensive information about the diversity of microorganisms in their habitats, also allowing for the taxonomic identification of community members (Muyzer 1999). These data make possible to monitor variations in the community

profiles due to external factors. Both techniques were often used in recent studies on the ecology of biological processes in WWTs, providing interesting new data in this area (Wagner *et al.*, 2002, Molina-Muñoz *et al.*, 2009, Gómez-Silván *et al.*, 2010).

In recent years, massive parallel sequencing (MPS) has been revealed as a powerful tool for the study of the diversity of biological communities in natural or engineered systems. The complexity of such communities makes difficult the identification of the identity of the involved populations with the level of sensitivity required. Nowadays, there are several MPS platforms available which differ in their characteristics, performance, and cost (Metzker, 2010, Shokralla *et al.*, 2012).

The present work examines the adaptation of the hydrolytic activities of the activated sludge microbial community to changes in variables influencing a full-scale MBR system, comparing the results in three different seasons of the year (spring, summer and autumn). For this purpose, the evolution of the enzyme activities acid and alkaline phosphatase, α -glucosidase and protease, were studied in both the aerated and the anoxic phases of an MBR, operated in pre-denitrification mode and fed real urban wastewater. To further explore the behavior of the communities involved in the elimination of nitrogen, ammonia oxidizing bacteria (AOB), nitrite oxidizing bacteria (NOB) and denitrifying bacteria were quantified by qPCR and RT-qPCR. Finally, the structure and dynamics of the bacterial communities were analyzed by TGGE fingerprinting of both DNA and RNA amplified partial 16s rRNA genes, and sequence analysis of the isolated TGGE bands. Further characterization of the diversity of the bacterial communities was achieved by MPS by the Illumina MiSeq platform.

Multivariate analyses of the biological data (non-metric multidimensional scaling and BIO-ENV) were performed to evaluate the influence throughout the experimental periods of fluctuations in temperature, composition of the influent wastewater and biomass concentration in each bioreactor (BR), aerated and anoxic.

2. MATERIAL AND METHODS:

2.1. Description of the full-scale MBR experimental plant and operating conditions.

The MBR plant used in the study is schematically depicted in Fig. A.4. It was installed in the municipal WWT plant “Estación Depuradora Sur”, located near the city of Granada (Southern Spain) and managed by the company EMASAGRA S.A. The plant consisted of an aerated BR (19.4 m³), an anoxic BR (6.8 m³) and a filtration tank (2 m³) equipped with three ultrafiltration hollow-fiber membrane modules (0.034 μm nominal pore size) made of polyvinylidene fluoride (PVDF) (GE Water & Process Technologies, Fairfield, USA). A fourth tank (0.2 m³) collected part of the treated water, as requirement for periodic backwashing of the membrane modules.

The system was fed urban wastewater taken from the pretreatment of the nearby Estación Depuradora Sur-WWT plant, which was additionally filtered through a 1-mm brush screen in order to ensure the correct operation of the membranes, according to the manufacturer’s recommendations. The plant was operated in pre-denitrification mode, which consisted of three different steps. First, the wastewater entered the anoxic BR, where denitrification took place and a fraction of the organic matter was degraded by heterotrophic populations. Second, the water passed to the aerated BR where nitrification and the degradation of remaining organic matter occurred, and third, the

sludge and the permeate water were separated in the membrane tank while nitrate was supplied into the anoxic zone by partial recirculation.

The system was inoculated with activated sludge coming from the flotation thickener of the Estación Depuradora Sur-WWT plant's second clarifier, which was diluted with raw urban wastewater inside the aerated BR to get an initial TSS concentration of *ca.* 4 g/L. After the sludge was recirculated for 5 days, standard plant operation started. The HRT was fixed at 38 hours and SRT at 20 days, by purging 1.4 m³ of sludge per day. The inflow and outflow rates were both fixed at 1 m³/h and the flow-rate between the BRs was seven times the influent flow-rate (700%). Running conditions involved a 5 minutes production phase (1 m³/h), followed by 30 seconds of backwashing (1.5 m³/h) (Ruiz *et al.*, 2011). Chemical cleaning was carried out weekly using NaClO (100 mg/L). Air was supplied to the aerated BR with a fine bubble membrane diffuser, keeping the dissolved oxygen (DO) concentration in the range of 0.5–1.6 mg/L. The filtration tank was also aerated to control membrane fouling and clogging.

Parameters such as temperature, pH, and DO concentration inside the BRs; level of the tanks, trans-membrane pressure and flow rates were measured automatically and registered continuously in a database, which was analyzed with the aid of Active Factory v.9.2 software (Wonderware, Spain). The daily medium internal temperature measured in the sludge of the MBR system (IT) was calculated by the software from data measured every second.

2.2. Analysis of plant performance:

Concentration of total suspended solids (TSS), concentration of volatile suspended solids (VSS), concentration of total nitrogen (tN), total chemical oxygen demand (COD), and total biological oxygen demand at five days (BOD₅) were analyzed daily in influent and effluent (permeate) water. The influent and effluent water samples were automatically collected through the day using a time controller and a peristaltic pump and were kept refrigerated at 4 °C until taken for analysis (Ruiz *et al.*, 2011). TSS and VSS concentrations were also measured daily in the sludge of both BRs. All the analyses were done in accordance with the Standard Methods for the Examination of Water and

Wastewater (APHA, 2005). The effluent water satisfied the EU regulation legal requirements for effluent discharge to the environment (EU, 1991) (Fig.A.6).

2.3. Sludge sampling for enzyme activity tests and nucleic acid extraction:

The tests of the enzyme activities, qPCR of nitrogen-cycle bacteria, and community structure and dynamics in the sludge of the MBR plant were initiated when the system reached steady state conditions.

The study was divided into three sampling periods during the year 2009, spanning from April 28th to May 21st (spring), June 22nd to September 20th (summer), and September 21st to December 22nd (autumn). Each period presented a markedly characteristic climate and all of them together encompassed the standard annual range of temperatures of the city of Granada (AEMET, 2005). Samples (200 ml) of sludge from both bioreactors (aerobic and anoxic) were collected in sterile plastic containers twice per week. The samples were carried at 4°C from the experimental plant to the laboratory and were immediately processed. Sludge samples (4 ml) for nucleic acid extraction were taken from both MBR bioreactors, centrifuged, and the pellets (*ca.* 200 mg) placed on ice to be immediately taken to the laboratory. Samples for RNA extraction were added of RNa protect® Bacteria Reagent (Qiagen, Hamburgo, Germany).

2.4. Microbial enzyme assays:

The measures of the enzyme activities acid and alkaline phosphatases, α -glucosidase and protease were performed in triplicate for each sample, following the methods previously described by Molina-Muñoz *et al.* (2010). The enzymatic assays were based on the release of a chromogen following the hydrolysis of a synthetic substrate. Briefly, phosphatase activities were calculated by the conversion of *p*-nitrophenyl phosphate (0.1%) to *p*-nitrophenol. Different buffers were used for measuring acid and alkaline phosphatases (acetate–acetic, pH 4.8, or carbonate–bicarbonate, pH 9.6, respectively). Hydrolysis by α -glucosidases was measured using *p*-nitrophenil α -D-glucopyranoside (1%) in Tris–HCl buffer (pH 7.6) as substrate for the

reaction. For phosphatases and α -glucosidase, standard curves were constructed using known concentrations of *p*-nitrophenol. Protease activity was calculated by a colorimetric method using azocasein (0.5%) in phosphate buffer (pH 7.6) as substrate.

All chemicals required for the enzyme activity analyses were provided by Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Colorimetric measures were made in a Hitachi U-2900 spectrophotometer (Hitachi High Technologies Europe, Krefeld, Germany). Autoclaved sludge samples were processed in parallel as negative controls in all the assays. Enzyme activities were expressed as mM *p*-nitrophenol/min/gVSS, except for proteases, calculated as Δ Abs/min/gVSS (Molina-Muñoz *et al.*, 2010).

2.5. DNA and RNA extraction:

Total DNA and RNA were extracted using the FastDNA[®] SPIN kit for Soil and the FastRNA[®] PRO BLUE kit, respectively, in combination with the FastPrep[®]24-Instrument (MPBiomedicals, Santa Ana, CA, USA) and following the manufacturer's instructions. Extracted DNA was kept at -20 °C. Extracted RNA was additionally digested with the TURBO DNA-free[™] kit (Ambion[®], Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) to remove contaminant DNA, cleaned using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hamburg, Germany), and eluted in formamide (Chomczynski, 1992) before being stored at -20°C.

2.6. RT-PCR

RT-PCR of RNA extracted from sludge samples was achieved using SuperScript[™] III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instructions. 150 – 200 ng/ μ l RNA were used in a final volume of 20 μ l. The resulting cDNA was purified using the QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen, Hamburg, Germany).

2.7. qPCR (Real-time PCR):

A qPCR protocol that combined several previously described primer sets targeting the 16S rRNA or functional genes of nitrifiers and denitrifiers was developed in this study. Quantitative amplification of 16S rDNA genes or 16S rRNA transcripts of total bacteria and Betaproteobacterial AOB, *nxrA* of *Nitrobacter*, *nxB* of *Nitrospira*, and *nosZ* of denitrifying bacteria was performed with TrueStart Hot Start DNA polymerase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) and SYBR Green I (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), in a total volume of 25 μ l. Specific reaction conditions are given in Table 3.2. qPCR was performed in a LightCycler[®] 480 System (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Primers and conditions for each amplification were kept as previously described (Muyzer *et al.*, 1993, Scala & Kerkhof, 1998, Kowalchuk *et al.*, 1997, Wertz *et al.*, 2008, Lückner *et al.*, 2010) and are summarized in Tables 2.1 to 2.3.

Absolute quantification was achieved constructing calibration curves generated with standards of each of the target amplicons, which were cloned in *E. coli* JM109 using the pGEM[®]-T Vector System II (Promega, Madison, WI, USA).

2.8. TGGE fingerprinting:

Two-step approaches were used for PCR amplification of DNA or cDNA, using universal primers targeting the hypervariable V3 region of the 16S rRNA gene, as previously described by other authors for TGGE or DGGE fingerprinting (Calderón *et al.*, 2012b). The final PCR products were cleaned and/or concentrated using Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters (Eppendorf, Hamburg, Germany). Eight microliters (60–100 ng DNA) were loaded into each well for TGGE.

TGGE was performed using a TGGE Maxi system (Whatman-Biometra, Goettingen, Germany). The denaturing gels [6% polyacrylamide (37.5:1 acrylamide:bisacrylamide), 20% deionized formamide, 2% glycerol and 8 M urea] were made and run with 2 \times Tris–acetate-EDTA buffer. All chemicals required were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). The

temperature gradient was optimized at 43–63 °C (Molina-Muñoz *et al.*, 2009). Gels were run at 125 V for 18 h. The bands were visualized by silver staining using the Gel Code Silver Staining kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Different PCR reactions were tested and different TGGE gels were run to check the reproducibility of the results.

The band patterns generated by TGGE were normalized, compared and clustered using the Gel Compar II v. 5.101 software (Applied Maths, Belgium). For cluster analysis, the TGGE profiles were compared using a method based on band presence/absence (Dice coefficient). In band assignment, a 1% band position tolerance (relative to the total length of the gel) was applied (Calderón *et al.*, 2012a). Dendrograms relating band pattern similarities were automatically calculated with the unweighted pair group method with arithmetic mean algorithms (UPGMA). The significance of the UPGMA clustering was estimated by calculating the cophenetic correlation coefficients.

The fingerprinting data were processed for the calculation of the following diversity indices: Shannon-Wiener (H'), range-weighted richness (Rr), Dynamics (Dy), and functional organization (Fo) (Shannon & Weaver, 1963; Marzorati *et al.*, 2008).

2.9. DNA reamplification and sequencing of TGGE bands. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses:

Portions of individual bands on silver-stained TGGE gels were picked up with sterile pipette tips, placed in 10 µL of filtered and autoclaved water, and 3 µL of the resulting DNA suspensions were used for re-amplification with the appropriate primers. The PCR products were electrophoresed in agarose gels and purified with the Qiaex-II kit (Qiagen, Hamburg, Germany). The recovered DNA was directly used for automated sequencing in an ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Life Technologies, CA, USA).

The DNA sequences were analyzed and compared using the biocomputing tools provided online by the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The BLASTn program (Altschul *et al.*, 1997) was used for sequence similarity analysis. The ClustalX v. 2.0.3

software (Jeanmougin et al., 1998) was used for the alignment of the DNA sequences. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 4 (Tamura et al., 2007). A p-distance based evolutionary tree was inferred using the Neighbor-Joining algorithm. The bootstrap test was conducted to infer the reliability of branch order, with a round of 1000 reassemblings. Bootstrap values below 50% are not shown in the tree.

2.10. Community analysis by massive parallel sequencing:

The V4 and V5 regions of the 16S rRNA gene were amplified using primers 807F and 1050R, able to amplify both bacterial and archaeal sequences (Bohorquez *et al.*, 2012), with either DNA or cDNA from the sludge samples as templates. The reactions were set as previously described in a series of 3 consecutive PCRs (Camarinha-Silva *et al.*, 2011).

Final PCR amplicons were verified by agarose gel electrophoresis, purified using Macherey-Nagel 96-well plate purification kits (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following manufacturer's instructions and quantified with the Quant-iT PicoGreen dsDNA reagent and kit (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Libraries were prepared by pooling equimolar ratios of amplicons (200 ng of each sample) derived from each sludge sample, all having been tagged with a unique barcode. To remove any contaminants or PCR artefacts, each library was precipitated with ethanol and run on a 2% agarose gel. PCR products of the correct size were extracted and recovered using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hamburg, Germany). Negative controls (non-template controls) using water as template were performed and were free of any amplification products after all rounds of PCR.

For this study, only the forward end sequence reads were processed. A quality filter program that runs a sliding window over the read and calculates the local average score based on the Illumina quality line of the fastaq file, trimmed 3'-ends of the reads that fall below Q=10 (<http://bioinformatics.ucdavis.edu/index.php/Trim.pl>). Only reads of a minimum of 115 nt in length were further analyzed. All truncated reads that had an N character in their sequence, any mismatches within primers and barcodes or more than 8 homopolymer stretches were discarded. All

sequences from each sample were split into different files according to their unique barcode.

A total of 18 DNA and 17 cDNA samples comprising >10000 sequence reads each were further processed, totalling to 1,188,656 sequence reads. This data-set was collapsed into unique representative reads. These reads were pre-clustered into 24,000 unique representative reads using a pseudo-single-linkage algorithm which removes sequences most probably resulting from sequencing errors (R. Sandoval, personal communication). Representative OTUs were then generated by clustering at 98% similarity (1 mismatch) using USEARCH (Edgar, 2010). This reduced the number to 613 OTUs in the DNA library and 914 in the RNA library. All OTUs were assigned a taxonomic affiliation based on naïve Bayesian classification (RDP classifier) (Wang *et al.*, 2007), then were manually analyzed against the RDP database using the Seqmatch function, as well as against the NCBI database to define the discriminatory power of each sequence read.

2.11. Statistics:

IBM SPSS Statics v. 19 (SPSS INC., USA) was used for a preliminary analysis of data distributions and the subsequent statistical tests in search for differences among the groups of samples. As most of the data sets did not fit the normal distribution, a non-parametric analysis for related samples (Wilcoxon signed-rank test) was conducted for each system variable and enzyme activity. A 90% of significance level ($p < 0.1$) was selected. The results of these statistical tests are represented in Box-and-Whisker plots.

The seasonal distribution patterns of the biological data (enzyme activities or biological community data) were studied by ordinations using non-parametric multidimensional scaling (MDS), aided by the Primer software (PRIMER-E, vs. 6.0, Plymouth, USA). The data sets were standardized and sample-resemblance matrices were generated using Euclidean distances. When bubbles of increasing size were superimposed over the MDS plots, their size represented increasing enzyme activity rates. In order to study the influence of the system variables over hydrolytic activity patterns, three different levels of analyses were performed. First, correlations between the

variables were analyzed using Draftsman's Plot. Data subsets with mutual correlation averaging more than 0.90 were replaced by a single representative. Second, Spearman rank correlations (ρ_s) were calculated between the variables and the enzyme activity ordinations. Those correlations are represented in the plots as vectors. Each vector illustrates a process variable's directional influence and its role in explaining the ordination of the enzyme activities. Vectors representing variables with very low influence (length < 0.100), hence with negligible correlation with the ordination of the enzyme activities, are not shown in the plots, and such variables were not considered in the following analyses. Third, detecting the selection of variables that best matched with the distribution patterns of the enzyme activities was carried out using BIO-ENV analysis (Clarke and Ainsworth, 1993). BIO-ENV calculates the correlation coefficients between the biological similarity matrix created by the ordination method (MDS) and the environmental matrix derived from the sequential combination of the measured variables, using the Spearman rank correlation (ρ_s). The highest coefficient obtained from all possible combinations of variables indicates which one best explains the biological ordination (Clarke and Ainsworth, 1993). Global permutation tests (499 permutations) were conducted to determine the significance of BIO-ENV analyses (Clarke *et al.*, 2008).

Prior to the multivariate analyses, the environmental data sets were transformed as required and normalized. The variables initially included were: IT, BOD₅ in the influent wastewater, C/N ratio in influent wastewater (COD/tN), concentration of ammonia in the influent wastewater (NH₄⁺), concentration of suspended solids in the influent wastewater (total, iTSS; volatile, iVSS; fixed, iFSS), and concentration of suspended solids in the sludge of the bioreactors (total, TSS; volatile, VSS; fixed, FSS). The pH of the influent wastewater was highly stable and close to neutral throughout the whole experimental period (average \pm SD = 7.4 \pm 0.2), as such, it was not included as a variable.

Rarefaction curves of Illumina sequencing data, and diversity indices (Shannon-Wiener, Chao-1, ACE, ACE-1, Pielou's Evenness and Good's coverage) were calculated by using the Vegan (<http://vegan.r-forge-r-project.org/>) and Species (Wang, 2011) packages for *R v. 2.15.1*

(<http://www.r-project.org/>). Jaccard indices, Bray-Curtis similarity matrices and the corresponding dendrograms were generated by the *PAST v. 1.90* software (Hammer et al., 2001).

3. RESULTS AND DISCUSSION:

3.1. Seasonal changes of the variables influencing the MBR system:

Fig. A.7 shows the Box-and-Whiskers plots of the variables (IT, BOD₅, C/N ratio, iTSS, iVSS, TSS, and VSS) recorded in the MBR system during the spring, summer and autumn seasons. The Wilcoxon signed-rank test revealed that there were significant differences ($p < 0.1$) amongst the three seasons for all the variables. IT was significantly warmer during the summer, while the highest BOD₅, C/N ratio and concentrations of suspended solids in the influent wastewater were recorded in the spring. Regarding the evolution of the concentration of biomass in the bioreactors, significant differences were found between seasons, although similar average values of both TSS and VSS were measured in the aerated and the anoxic BRs within the same season. Suspended solids in the activated sludge were particularly lower during the summer period, and experienced an important increase in the autumn.

3.2. Linking hydrolytic activities to the variables influencing the MBR:

The seasonal variation of the hydrolytic activities acid and alkaline phosphatase, α -glucosidase and protease, was studied in both the aerated and

anoxic phases of the full-scale membrane bioreactor (MBR). Non-metric multidimensional scaling (MDS) and BIO-ENV analysis were used to study the distribution of enzyme activities in different seasons of the year (spring, summer and autumn) and unveil their relationships with changes in variables influencing the system (composition of influent wastewater, activated sludge temperature and biomass concentration in the bioreactors).

The activities of all the tested hydrolases were remarkably dynamic, and each enzyme showed complex and diverse patterns of variation (Fig. 1.1.). For the duration of this study, the average values of α -glucosidase and protease were analogous to those previously reported for WWT plants using the same technology, while phosphatases had comparatively lower levels of activity (Molina-Muñoz *et al.*, 2010, Molina-Muñoz *et al.*, 2007). However, average α -glucosidase and alkaline phosphatase were at least 100 fold higher than those reported in previous studies conducted in CAS systems. (Cicek *et al.*, 1999) conducted a comparative study of enzyme activities using laboratory-scale MBR and CAS plants which were operated in parallel and fed the same influent wastewater, and found that phosphatases and glucosidases amongst other enzyme activities were consistently higher in the MBR (up to 1.7 times) compared to CAS. These authors concluded that overall hydrolysis rates were higher in the MBR due to the retention of stable enzymes not filterable through the membranes in the system. Comparing hydrolytic activities in the activated sludge of the MBR's aerated and anoxic bioreactors showed no significant differences. These results support previous work on the subject (Goel *et al.*, 1998, San Pedro *et al.*, 1994). Hydrolases are localized mostly floc-bound and are stable and long-persistent enzymes. Additionally, the system analyzed in the present study was operated at a high recirculation rate (700%), generating a high transfer of biomass and hence of the cell-bound enzymes between the bioreactors.

Except in the summer season, the variables included in the study gave a good explanation of those patterns and displayed high and consistent correlations with them; however, markedly different correlation trends were found in each season, indicating dissimilar adaptation responses of the community to the influence of changing conditions (Fig. 1.3 and 1.4).

Temperature was a major process variable influencing enzyme activities in the MBR, particularly in the autumn season (Fig.1.3-1.4). In engineered systems, temperature is well known to influence enzyme reaction rates, exerting important effects on process performance (Burgess and Pletschke, 2008). Higher α -glucosidase activity was observed at lower temperatures ($T < 17.5^\circ\text{C}$), agreeing to previous results by other authors (Molina-Muñoz *et al.*, 2010, Molina-Muñoz *et al.*, 2007). The concentration of suspended solids in the influent wastewater was significantly linked to the distribution of the enzyme activity patterns through the samples in the summer and spring seasons, having a lesser influence during the autumn. As in the case of temperature, the response of specific hydrolytic activities to biomass concentration was diverse. Early work on activated sludge systems related the increase of the bacterial biomass and abundance to enhanced hydrolytic enzyme activities (Nybroe *et al.*, 1992, Teuber and Brodisch, 1977). However, in MBRs the concentration of suspended solids in the activated sludge does not reflect the biologically active microbial community due to the effect of biomass retention, which limits the availability of substrates for growth and favors the accumulation of inert organic particulate matter (LaPara *et al.*, 2006). In previous work, threshold values of VSS concentrations were related to enzyme activities' decay in MBRs operated under complete-biomass retention conditions (Molina-Muñoz *et al.*, 2007), an effect which is also attributed to the strong catabolite repression of most hydrolases (Morgenroth *et al.*, 2002).

A consistent and highly negative correlation between protease and α -glucosidase was revealed in all the experiments (Fig.1.2). The variables included in the study showed contrary influences on these activities, suggesting an alternation of the major groups of carbon-degrading hydrolases in connection to changes in temperature and the availability and composition of nutrients in the different seasons.

Sampling over a long period of time was required to adequately lay down the links between hydrolytic activities and the variables influencing the MBR system. The results highlight the complexity of the regulation of substrate degradation by the mixed microbial sludge communities under real operating conditions.

3.3. Quantification of bacterial groups involved in N elimination by qPCR:

Bacterial populations quantified in the MBR system were kept in stable numbers (10^9 - 10^{10} 16S rDNA/rRNA copies per ng DNA or RNA) throughout the experimental period, showing no significant differences between the bioreactors (aerated or anoxic), nor the season of the year in which the MBR was sampled (spring, summer or autumn) (Fig.2.8). The number of copies per ng DNA of the target genes 16S rDNA of AOB, *nrxB* of *Nitrospira*, and *nosZ* of denitrifiers, were also maintained inside a narrow range, while more fluctuation was recorded of the number of their respective transcripts, particularly 16S rRNA copies of AOB (Fig. 2.6). The *nrxA* gene of *Nitrobacter* was not amplified in any of the samples of DNA or RNA tested. *Nitrospira* populations often prevailed over *Nitrobacter* in WWTs previously investigated (Erijman *et al.*, 2011, Winkler *et al.*, 2012).

Comparing the ratio of copies of the target genes and their respective transcripts detected, the ratio was 1/500 for 16S of AOB and 1/ 10^6 for *nrxB*, and 4/1 for *nosZ*. Denitrifiers were the more abundant N-cycle bacteria present in the MBR system, as *nosZ* copies were 1.6% of the 16S rDNA copies of Bacteria, while AOB and *Nitrospira* target genes amounted to 0,0002 and 0,00001%, respectively. However, the number of transcripts of *nosZ*, 16S rRNA of AOB and *nrxB* were 0.7, 0.3 and 2.3% of the 16S rRNA copies of Bacteria, respectively (Fig.2.7).

The number of copies of bacterial 16S rDNA per liter of activated sludge (Table 2.4) was $6,75 \times 10^{16}$, 2 orders of magnitude higher than reported in other studies conducted on WWT systems (Baek *et al.*, 2010, Harms *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2011, Xia *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2010). Denitrifiers were also quantified in higher numbers than described previously in studies based on qPCR of *nosZ* (Geets *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2011), while AOB and *Nitrospira* were detected in the ranges usually described in WWT plants (Baek *et al.*, 2010, Geets *et al.*, 2007, Harms *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2011, Xia *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2010).

System variables in the MBR were related to the relative quantification by qPCR of the bacteria involved in the N cycle, by MDS and BIO-ENV analysis, showing an important influence of temperature and the characteristics of the influent water (ammonia and suspended solids concentration, and C/N ratio) (Fig.2.10). Ammonia concentration was always related to the relative abundance of present and active populations of AOB and *Nitrospira*, while temperature, which was kept in the 15,3-28,8 °C range, did not correlate positively to the numbers of nitrifying bacteria. NOB were positively correlated to the concentration of fixed solids in the influent and biomass accumulation in the BRs. Strikingly, C/N ratio and volatile suspended solids in the influent correlated positively with the numbers of nitrifying populations, and negatively with the denitrifiers. The presence of organic matter is not deleterious for nitrifiers, provided that O₂ availability is assured (Bitton, 2010). The need for a careful adjustment of the C/N ratio to achieve efficient simultaneous denitrification and nitrification in WWT plants has been pointed out in previous studies (Carrera *et al.*, 2004, Fu *et al.*, 2009a, Fu *et al.*, 2009b, Kumar *et al.*, 2012).

3.4. Analysis of the structure and dynamics of bacterial communities in the MBR by TGGE fingerprinting:

Cluster analysis of TGGE profiles revealed that both the present and active bacterial communities in the sludge of the MBR system remained very stable during the whole experimental period, without experiencing large changes of their structure, as all samples clustered together at over 80% similarity (Fig.3.1-3.2) HRT and SRT are described as major actors influencing the bacterial communities in MBRs (Judd, 2006, Molina-Muñoz *et al.*, 2009), and these parameters were kept stable during the experiments developed here. Additionally, community structure was not significantly different either between the aerated and the anoxic bioreactors, most probably in connection with the high recirculation rate between them (700%).

The diversity indices Rr, Dy, H' and Dy, showed that the biological community was rich in both present and active species, and displayed a medium functional organization, which indicates the ability of the community to overcome changes on the variables influencing the system. Values of Rr and

H' were higher than previously described in earlier studies developed in WWTs by fingerprinting methods (Ayarza *et al.*, 2010, Calderón *et al.*, 2012a, Falk *et al.*, 2009). High bacterial diversity confers stability to WWTs, assuring the availability of different organisms able to perform equivalent functions in the ecosystem under a wide range of environmental/operating conditions (functional redundancy), and allowing the continuous achievement of high quality permeates during long-term operation (Ayarza *et al.*, 2010, Miura *et al.*, 2007).

Fo indices calculated along the different samples of the MBR sludge were similar to those reported earlier in similar WWT systems (Calderón *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2010, Wittebolle *et al.*, 2008). Nevertheless, Dy index values were lower than those described in previous work (Ayarza *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2010, Wittebolle *et al.*, 2008). According to Marzorati *et al.* (2008), communities displaying medium functional organization and low-to-medium dynamics are better qualified to remain sustainable along time.

Cluster analysis of the TGGE profiles revealed a total of 46 band classes, representing the prevalent bacterial populations in the MBR. 33 band classes (72%) were identified by reamplification and sequencing of TGGE bands. All the sequences were affiliated to the Proteobacteria (Fig.4.7), namely *Delta* and *Gammaproteobacteria* (3% of identified band classes/2% of total), *Betaproteobacteria* (9%/6,5%), and the most abundant *Alphaproteobacteria* (84%/60%), mostly *Rhizobiales* (60%/43%). Fig. 3.8 shows the heatmap of relative abundance of the 46 band classes along the whole sampling period, both in DNA and RNA-based TGGE fingerprints. Dominance of Proteobacteria in WWT plants has been thoroughly reported in several studies based on different approaches, both by cultivation dependent methods and molecular techniques (Calderón *et al.*, 2012b, Molina-Muñoz *et al.*, 2009, Xia *et al.*, 2010).

Band classes' dynamics were related to system variables by MDS and BIO-ENV analysis (Fig. 3.10-3.13). These band classes, which represent the prevalent populations in the bacterial community in the sludge, displayed complex profiles of adaptation and response to the fluctuation of the different variables included in the study (Figs. 4.9 to 4.13). Temperature and substrate

availability in wastewater were influent factors best explaining the dynamics of bacterial populations in both BRs. F/M ratio also contributed to the shifting of populations. Wastewater biological treatment requires both system stability and flexibility of the microbial communities in response to the environment (Miura *et al.*, 2007). These adaptation processes still remains incompletely characterized in MBRs, making necessary the use of multivariate analysis and long-term experiments for an adequate interpretation, particularly if the system works under real operating conditions.

3.5. Analysis of prokaryotic communities in the MBR by massive parallel sequencing:

By using the Illumina MiSeq sequencing platform, a total of 1,188,656 trimmed and filtered sequences of 90 nt length were generated (750174 reads in the DNA library 67,5 Mb; 438482 reads in the cDNA library, 39,5 Mb). 35,161 to 51,436 effective sequences were yielded for the DNA samples and 8,212 to 35,079 for the RNA samples. These sequences were assigned to a total of 613 OTUs recovered from the DNA library and 914 OTUs recovered from the RNA library. Individual DNA samples contained 453 to 818 OTUs (74-89.5%), while RNA samples sheltered 183 to 521 OTUs (29.9-85%). Rarefaction curves plotting number of OTUs versus sequence numbers (Fig. 4.1), alpha-diversity estimators (Chao-1, ACE and ACE-1) and Good's coverage index (Tables 4.1 and 4.2) indicate that the depth of the sequencing was enough to adequately explore community diversity in all the samples. The Shannon-Wiener diversity indices were on average 5 and 4 for the DNA and RNA samples, respectively. Pielou's evenness indicated a medium level of functional organization (0.66-0.78) in both the present and active community.

Beta-diversity analysis was performed by calculation of the Jaccard indices (Tables 4.4 and 4.5) indicating that on average the DNA samples shared more OTUs (0,457-0,890) than the RNA samples (0,271-0,859). There were also more similarities between samples from both BRs taken the same day, while diversity changed longitudinally along the experimental period. Dendrograms based on the Bray-Curtis distance matrix corroborated these results (Fig. 4.2.).

Although the primers used are universal for both domains of the prokaryotes, only one OTU was identified as an archaeon in the DNA library. This OTU was present in all the samples with variable abundance (0.07-0.36%.) and was related to the *Methanosarcinales*.

The bulk of the DNA and RNA samples was dominated by Proteobacteria (33.4% and 36.5% of sequences, respectively), followed by Bacteroidetes 12.7% and 22.6%, respectively). In DNA samples, the third group in abundance was Actinobacteria (16.4) while in RNA samples it was Firmicutes (17.6%). In DNA samples, Chloroflexi and Firmicutes were also highly represented (4.5% and 3.9%, respectively).

Within the Proteobacteria (Fig.4.3 y 4.4), Epsilonproteobacteria were the less abundant in both DNA and RNA samples (0.14% and 0.08%, respectively). In DNA samples the more abundant classes were Gamma, Beta, Alpha and Deltaproteobacteria (11.4%, 10.7%, 5.7% and 4.2%, respectively), while in RNA samples Betaproteobacteria prevailed (18.8%) followed by Gamma (8.7%), Delta (4.2%) and Alphaproteobacteria (0.86%). Fig. 4.5 displays the accumulated percent of the abundance of members of the different orders of the Proteobacteria.

The differences of community composition observed between the aerated and the anoxic BRs in a same sampling day were negligible.

4. CONCLUSIONS:

1. Acid and alkaline phosphatases, protease and α -glucosidase activities in the MBR system studied in this work were remarkably dynamic, each enzyme showing particularly complex and diverse patterns of variation when they were long-term monitored. The average activities of all tested hydrolases were similar in the aerated and anoxic phases of the MBR, although their patterns of distribution and their correlations with system variables differed slightly in the aerated and the anoxic bioreactors. The simultaneous use of different enzyme tests is thus advisable for the full evaluation of the biodegrading capacity of MBR-based WWT plants.

2. A consistent and highly negative correlation between protease and α -glucosidase activities was revealed. The system variables analyzed showed contrary influences on these activities, suggesting an alternation of the major groups of carbon-degrading hydrolases in connection to changes of the system variables.

3. The MBR system studied in this work allowed the stable development and activity of the bacterial populations involved in the degradation of nitrogen compounds (denitrifiers, ammonia-oxidizing bacteria

and nitrite-oxidizing bacteria) along the whole experimental period tested, as reflected by the high rate of N elimination achieved.

4. A negative correlation was detected between the denitrifiers and ammonia-oxidizing bacteria as influenced by the C/N ratio of influent water. The correct balance of the C/N ratio is required for the proper elimination of nitrogen compounds.

5. The evaluation of the diversity of the present and active bacterial communities in the MBR revealed high population richness, with stable dynamics and functional redundancy. These traits are characteristic of complex communities which are able to adjust themselves to counteract the changes in environmental or operational conditions, without modifying the efficiency of the depuration process.

6. Both approaches used to analyze the diversity of the bacterial communities in the MBR system, *fingerprinting* and massive parallel sequencing, pointed out the prevalence of Proteobacteria amongst both the present and active populations.

7. The high complexity of the bacterial communities in activated sludge and the characteristics, limitations and bias of the different molecular techniques used to evaluate their diversity make necessary the simultaneous use of a combination of different approaches to understand the links between the shifts in the community structure/dynamics and the changes in the environment.

8. Non-metric multidimensional scaling (MDS) and BIO-ENV analysis were useful tools to characterize the MBR sludge communities and to reveal their relationships with the changes in the variables influencing the MBR system (temperature, composition of influent wastewater, and biomass accumulation in the bioreactors). The characterization of the MBR communities under real operating conditions required sampling over a long period of time to adequately lay down the links amongst the different microbial parameters, as well as their correlation to system variables. These results

highlight the complexity of the structure, dynamics and regulation of the microbial communities in activated sludge.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA MBR	Página
Figura A.1	Localización de la EDAR-Sur , Granada. Detalle de la EDAR-Sur y localización del sistema MBR experimental.	30
Figura A.2	Vista panorámica del sistema MBR experimental .	31
Figura A.4	Detalle del tren de membranas con tres módulos.	33
Figura A.4	Diagrama de flujo de sistema de MBR experimental	36
Figura A.5	Calendario de muestreo .	44
Figura A.6	Diagrama de cajas (Box-and-Whisker plots) de la carga orgánica en el efluente y el porcentaje de eliminación en el sistema MBR durante la primavera (P), verano (V) y otoño (O) del año 2009.	46
Figura A.7	Diagrama de cajas (Box-and-Whisker plots) de las variables del sistema MBR durante la primavera (P), verano (V) y otoño (O) del año 2009.	48
Figura A.8	Diagrama de cajas (Box-and-Whisker plots) de las relaciones nutrientes/biomasa (F/M) MBR durante la primavera (P), verano (V) y otoño (O) del año 2009.	49
CAPÍTULO 1		
Figura 1.1	Diagrama de cajas (Box-and-Whisker plots) de las actividades enzimáticas fosfatasa ácida, fosfatasa básica, α -glucosidasa y proteasa en ambos biorreactores (aireado y anóxico) del MBR durante la primavera (P), verano (V) y otoño (O) del año 2009.	64
Figura 1.2	Escalado multidimensional no métrico (MDS) mostrando la distribución de las muestras de lodo de ambos biorreactores (aireado y anóxico) del MBR durante la primavera, verano y otoño del año 2009, según la similitud de sus perfiles de actividades enzimáticas (fosfatasa ácida y básica, α -glucosidasa y proteasa).	65
Figura 1.3	Escalado multidimensional no métrico (MDS) de la distribución de las muestras de lodo del biorreactor aireado del MBR durante la primavera, verano y otoño del año 2009, según la similitud de sus perfiles de actividades enzimáticas (fosfatasa ácida y básica, α -glucosidasa y proteasa).	66
Figura 1.4	Escalado multidimensional no métrico (MDS) de la distribución de las muestras de lodo del biorreactor anóxico del MBR durante la primavera, verano y otoño del año 2009, según la similitud de sus perfiles de actividades enzimáticas (fosfatasa ácida y básica, α -glucosidasa y proteasa).	67

CAPÍTULO 2

Figura 2.1	Esquema de la configuración de pre-desnitrificación en un sistema de MBR. UWW: agua residual urbana (urban waste water).	82
Figura 2.2	Calendario de muestreo del sistema MBR, muestras seleccionadas para cuantificación por qPCR.	90
Figura 2.3	Diagrama de la preparación de los patrones empleados para la cuantificación de genes de interés mediante qPCR.	103
Figura 2.4	Diagrama de cajas (Box-and-Whisker plots) de la concentración de amonio influente en el sistema MBR durante la primavera (P), verano (V) y otoño (O).	108
Figura 2.5	Número de copias de la región V3 del rDNA 16S por ng de DNA y del rRNA 16S por ng de RNA, en escala logarítmica, detectado en cada una de las muestras.	109
Figura 2.6	Número de copias/ng de DNA o RNA, en escala logarítmica, para cada uno de los genes diana de las bacterias degradadoras de compuestos nitrogenados detectado en cada una de las muestras.	111
Figura 2.7	Porcentaje del número de genes diana/ng DNA o transcritos diana/ng RNA de las bacterias degradadoras de compuestos nitrogenados expresado, respectivamente, en relación al total de copias/ng de rDNA 16S ó rRNA 16S de bacterias totales.	113
Figura 2.8	Diagrama de cajas (Box-and-Whisker plots) del porcentaje del número de copias de cada uno de los genes o transcritos diana de las bacterias degradadoras de compuestos nitrogenados , expresado respectivamente con respecto al total de copias/ng de rDNA 16S ó rRNA 16S de bacteria totales.	114
Figura 2.9	Escalado multidimensional no métrico (MDS) mostrando la distribución de las muestras de lodo de ambos biorreactores (aireado y anóxico) y para la cuantificación por qPCR basada en ambos ácidos nucleicos (DNA y RNA) durante la primavera, verano y otoño del año 2009, según la similitud de sus perfiles de abundancia relativa de cada uno de los grupos bacterianos del ciclo del nitrógeno.	116
Figura 2.10	Escalado multidimensional no métrico (MDS) de la distribución de las muestras en cada biorreactor y para cada ácido nucleico empleado para la cuantificación por qPCR , según la similitud de sus perfiles de abundancia relativa de cada uno de los grupos bacterianos del ciclo del nitrógeno. El tamaño de las burbujas es proporcional al porcentaje del número de copias de cada uno de los genes o transcritos diana de las bacterias degradadoras de compuestos nitrogenados, expresado respectivamente con respecto al total de copias/ng de rDNA 16S ó rRNA 16S de Bacteria.	118
Tabla 2.1	Cebadores utilizados para el recuento por amplificación a tiempo real de los fragmentos de interés de bacterias totales y bacterias degradadoras de compuestos nitrogenados.	97
Tabla 2.2	Composición de las mezclas de reacción para el recuento por amplificación a tiempo real de los fragmentos de interés de bacterias totales y bacterias degradadoras de compuestos nitrogenados.	98

Tabla 2.3	Programa de temperaturas para el recuento por amplificación a tiempo real de los fragmentos de interés de bacterias totales y bacterias degradadoras de compuestos nitrogenados	99
Tabla 2.4	Media del número de copias de cada uno de los genes o transcritos diana analizados en este estudio, expresados por litro de fango del sistema MBR	122
 CAPÍTULO 3 		
Figura 3.1	Comparación mediante el coeficiente de Dice de los perfiles de TGGE de las muestras de DNA del sistema MBR.	153
Figura 3.2	Comparación mediante el coeficiente de Dice de los perfiles de TGGE de las muestras de RNA del sistema MBR.	154
Figura 3.3	Comparación mediante el coeficiente de Dice de los perfiles de TGGE de las muestras de primavera del sistema MBR.	158
Figura 3.4	Comparación mediante el coeficiente de Dice de los perfiles de TGGE de las muestras de verano del sistema MBR.	159
Figura 3.5	Comparación mediante el coeficiente de Dice de los perfiles de TGGE de las muestras de otoño del sistema MBR.	160
Figura 3.6	Diagrama de cajas (Box-and-Whisker plots) de los índices descriptivos (rango ponderado de riqueza, Rr; organización funcional, Fo; diversidad de Shannon, H'; dinámica, Dy) de los perfiles de TGGE obtenidos a partir de las muestras de DNA y RNA de ambos biorreactores (aireado, A; anóxico, X) del MBR y durante la primavera (P), verano (V) y otoño (O).	162
Figura 3.7	Árbol filogenético de las bandas secuenciadas de los perfiles de TGGE, basado en una longitud de secuencia de aproximadamente 100pb.	167
Figura 3.8	Heatmap de las abundancias relativas de las clases de banda.	168
Figura 3.9	Escalado multidimensional no métrico (MDS) mostrando la distribución de las muestras de lodo de ambos biorreactores (aireado y anóxico) y de ambos ácidos nucleicos (DNA y RNA), según la similitud de sus perfiles de abundancia relativa obtenidos mediante TGGE .	170
Figura 3.10	MDS de la abundancia relativa de los perfiles de TGGE basados en DNA , en ambos BR (aireado y anóxico) en las tres estaciones.	177
Figura 3.11	MDS de la abundancia relativa de los perfiles de TGGE basados en RNA , en ambos BR (aireado y anóxico) en las tres estaciones.	178
Figura 3.12	MDS de la presencia/ausencia de bandas de los perfiles de TGGE basados en DNA , en ambos BR (aireado y anóxico) en las tres estaciones.	179
tFigura 3.13	MDS de la presencia/ausencia de bandas de los perfiles de TGGE basados en RNA , en ambos BR (aireado y anóxico) en las tres estaciones	180

CAPÍTULO 4

Figura 4.1	Curvas de rarefacción de las muestras de DNA y RNA analizadas. Se ha utilizado el número de OTUs asignado tras aplicar todos los filtros indicados en el apartado 4.2.3.	205
Figura 4.2	Dendrogramas representando la similitud entre las comunidades procariotas de las muestras de DNA y RNA obtenidas del fango de los biorreactores aireado (A) y anóxico (X) del MBR. El análisis de clústeres se basa en la matriz de distancias de Bray-Curtis, generada a partir de los datos de abundancia de secuencias de cada una de las OTUs identificadas. Los números junto a las ramas indican el valor de <i>bootstrap</i> .	
Figura 4.3	Heatmap de las abundancias relativas de los OTUs detectados en la comunidad bacteriana presente y activa del fango del MBR. Las muestras están ordenadas por biorreactor (aireado-anóxico) y día de muestreo durante la primavera (P), verano (V) y otoño (O). Los colores del <i>heatmap</i> van de azul a rojo según el incremento de abundancia relativa. En los laterales aparecen los identificados los taxones más abundantes y/o relevantes.	207
Figura 4.4	Gráfica del porcentaje acumulado de la abundancia relativa de los taxones detectados mediante Illumina durante todo el periodo de muestreo, en ambos biorreactores (A: aireado; X: anóxico) a partir de las muestras de DNA y RNA	208
Figura 4.5	Gráfica de porcentajes acumulados de la abundancia relativa de los órdenes de la diferentes clases de Proteobacterias detectados por Illumina en las muestras de DNA y RNA tomadas en ambos biorreactores del sistema MBR (A: aireado; X: anóxico) durante todo el periodo de muestreo	211
Tabla 4.1	Número de secuencias filtradas (S), número de OTUs, índice de Shannon (H') índices de diversidad Chao-1, ACE, ACE-1, equidad de Pielou y porcentaje de cobertura de Good , calculados a partir de los datos de Illumina obtenidos para las muestras de DNA del fango de los dos BRs (A: aireado; X: anóxico) del MBR.	202
Tabla 4.2	Número de secuencias filtradas (S), número de OTUs, índice de Shannon (H') índices de diversidad Chao-1, ACE, ACE-1, equidad de Pielou y porcentaje de cobertura de Good , calculados a partir de los datos de Illumina obtenidos para las muestras de RNA del fango de los dos BRs (A: aireado; X: anóxico) del MBR.	203
Tabla 4.3	Media y desviación estándar de los parámetros e índices de los datos obtenidos por el análisis de Illumina. Los datos seguidos entre paréntesis por la misma letra no son estadísticamente diferentes, según el test Wilcoxon ($p < 0,10$).	205
Tabla 4.4.	Matriz de coeficientes de similitud de Jaccard entre las comunidades procariotas de las muestras de fango obtenidas del MBR, calculada en función de la incidencia de las OTUs identificadas a partir de las muestras de DNA.	219

Tabla 4.5. **Matriz de coeficientes de similitud de Jaccard** entre las comunidades procariotas de las muestras de fango obtenidas del MBR, calculada en función de la incidencia de las OTUs identificadas a partir de las muestras de **RNA**.

Tabla 4.6 Abundancia relativa de los diferentes Phyla bacterianos en un total de 27 plantas de agua residual a escala real

GLOSARIO

(i)FSS:	Fixed suspended solids in the BR (i: in the influent)	Sólidos en suspensión fijos en el BR (i: en el influente)
(i)TSS:	Total suspended solids in the BR (i: in the influent)	Sólidos en suspensión totales en el BR (i: en el influente)
(i)VSS:	Volatile suspended solids in the BR (i: in the influent)	Sólidos en suspensión volátiles en el BR (i: en el influente)
A	Aerated bioreactor	Biorreactor aireado
AEMET:	Meteorological national station	Agencia estatal de meteorología
AOA:	Ammonia oxidizing archaea	Arqueas oxidadoras de amonio
AOB:	Ammonia oxidizing bacteria	Bacterias oxidadoras de amonio
APHA:	American public health association	Asociación americana de salud pública
BOD₅:	Biological oxygen demand in 5 days (in the influent)	Demanda biológica de oxígeno en 5 días (en el influente)
BR:	Bioreactor	Biorreactor
C/N	Carbon nitrogen ratio	Relación carbono nitrógeno
CAS:	Conventional active sludge	Sistema convencional de lodos activos
cdNA	Complementary desoxiribonucleic acid	Ácido desoxirribonucleico complementario
COD:	Chemical oxygen demand (in the influent)	Demanda química de oxígeno (en el influente)
Ct	Threshold cycle	Ciclo umbral
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimetil sulfóxido
DNA	Desoxiribonucleic acid	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotides triphosphate	Desoxiribonucleótidos trifosforilados
DO:	Dissolved oxygen	Oxígeno disuelto
DTT	Dithiothreitol	Ditiotreitol
Dy	Dynamic index	Índice de dinámica
EDAR:	Wastewater treatment station	Estación depuradora de aguas residuales
EPS:	Extracellular polymeric substances	Sustancias poliméricas extracelulares
F/M	Food/microbial ratio	Relación nutriente/biomasa
Fo	Functional organization	Organización funcional
H'	Shannon index	Índice de Shannon

HRT:	Hydraulic retention time	Tiempo de retención hidráulica
IT:	Internal temperature in the MBR	Temperatura interna en el MBR
MBR:	Membrane bioreactor	Biorreactor de membrana
MDS	Non-metric multidimensional scaling	Escalado multidimensional no métrico
NOB:	Nitrite oxidizing bacteria	Bacterias oxidadoras de nitrito
NosZ	Nitrous oxide reductase	Óxido nitroso reductasa
Nxr	Nitrite oxidoreductase	Nitrito oxidorreductasa
O	Autumn	Otoño
P	Spring	Primavera
PCR	Polymerase chain reaction	Reacción cadena de la polimerasa
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction	Reacción cadena cuantitativa de la polimerasa
r	Vector correlation	Correlación entre vectores
RNA	Ribonucleic acid	Ácido ribonucleico
Rr	Range-weighted richness	Rango ponderado de riqueza
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid	Ácido ribonucleico ribosomal
RT	Reverse transcription	Transcripción reversa
SRT:	Solids retention time	Tiempo de retención de sólidos
TGGE	Temperature gradient gel electrophoresis	Electroforésis en gel con gradiente de temperatura
TMP:	Transmembrane pressure	Presión transmembrana
tN:	Total nitrogen (in the influent)	Nitrógeno total (en el influente)
V	Summer	Verano
WWT:	Wastewater treatment	Tratamiento de aguas residuales
ρ_s	Spearman correlation	Correlación de Spearman

BIBLIOGRAFÍA

- AEMET, 2005.** Guía resumida del clima en España 1971-2000, Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. 1.Spain
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J., 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25(17), 3389-3402.
- Aoi, Y., Masaki, Y., Tsuneda, S. and Hirata, A., 2004.** Quantitative analysis of amoA mRNA expression as a new biomarker of ammonia oxidation activities in a complex microbial community. *Lett Appl Microbiol* 39(6), 477-482.
- APHA, 2005.** Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st.Washington DC
- Araki, N., Yamaguchi, T., Yamazaki, S. and Harada, H., 2004.** Quantification of amoA gene abundance and their amoA mRNA levels in activated sludge by real-time PCR. *Water Science and Technology* 50(8), 1-8.
- Arevalo, J., Garralon, G., Plaza, F., Moreno, B., Perez, J. and Gomez, M.A., 2009.** Wastewater reuse after treatment by tertiary ultrafiltration and a membrane bioreactor (MBR): a comparative study. *Desalination* 243(1-3), 32-41.
- Arévalo, J., 2011.** Aplicación de biorreactores de membrana al agua residual urbana: consideraciones para la modificación de los parámetros de proceso., Universidad de Granada, Granada.
- Atlas, R.M. and Bratha, R., 1998.** *Microbial ecology: fundamentals and applications*, Addison-Wiley. 4th.NY, USA.
- Ayarza, J.M., Guerrero, L.D. and Erijman, L., 2010.** Nonrandom assembly of bacterial populations in activated sludge flocs. *Microb Ecol* 59(3), 436-444.
- Baek, K., Park, C., Oh, H.M., Yoon, B.D. and Kim, H.S., 2010.** Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge treating different types of wastewater. *J Microbiol Biotechnol* 20(7), 1128-1133.
- Barnes, D. and Bliss, P.J., 1983.** *Biological Control of Nitrogen in Wastewater Treatment.*, E. & F. N. Spon (Eds.). New York, USA
- Beman, J.M., Bertics, V.J., Braunschweiler, T. and Wilson, J., 2012.** Quantification of ammonia oxidation rates and the distribution of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in marine sediment depth profiles from Catalina Island, California. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Bernet, N., Delgenes, N., Akunna, J.C., Delgenes, J.P. and Moletta, R., 2000.** Combined anaerobic-aerobic SBR for the treatment of piggery wastewater. *Water Research* 34(2), 611-619.
- Bertolini, V., Gandolfi, I., Ambrosini, R., Bestetti, G., Innocente, E., Rampazzo, G. and Franzetti, A., 2012.** Temporal variability and effect of environmental variables on airborne bacterial communities in an urban area of Northern Italy. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Bitton, G., 2010.** *Wastewater Microbiology*, Wiley-Lis, John Wiley and Sons. 4.New Jersey, USA

- Boczar, B.A., Begley, W.M. and Larson, R.J., 1992.** Characterization of enzyme activity in activated sludge using rapid analyses for specific hydrolases. *Water Environ Res* 64(6), 792-797.
- Boerner, R.E.J., Brinkman, J.A. and Smith, A., 2005.** Seasonal variations in enzyme activity and organic carbon in soil of a burned and unburned hardwood forest. *Soil Biology and Biochemistry* 37(8), 1419-1426.
- Bohorquez, L.C., Delgado-Serrano, L., Lopez, G., Osorio-Forero, C., Klepac-Ceraj, V., Kolter, R., Junca, H., Baena, S. and Zambrano, M.M., 2012.** In-depth characterization via complementing culture-independent approaches of the microbial community in an acidic hot spring of the Colombian Andes. *Microb Ecol* 63(1), 103-115.
- Boyd, E.S., Lange, R.K., Mitchell, A.C., Havig, J.R., Hamilton, T.L., Lafrenière, M.J., Shock, E.L., Peters, J.W. and Skidmore, M., 2011.** Diversity, Abundance, and Potential Activity of Nitrifying and Nitrate-Reducing Microbial Assemblages in a Subglacial Ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology* 77(14), 4778-4787.
- Bramucci, M., Kane, H., Chen, M. and Nagarajan, V., 2003.** Bacterial diversity in an industrial wastewater bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 62(5-6), 594-600.
- Brüggemann, J., Stephen, J.R., Chang, Y.-J., Macnaughton, S.J., Kowalchuk, G.A., Kline, E. and White, D.C., 2000.** Competitive PCR-DGGE analysis of bacterial mixtures: an internal standard and an appraisal of template enumeration accuracy. *Journal of Microbiological Methods* 40(2), 111-123.
- Burgess, J.E. and Pletschke, B.I., 2008.** Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment: a mini-review. *Water SA* 34, 343-349.
- Burgin, A.J., Hamilton, S.K., Jones, S.E. and Lennon, J.T., 2012.** Denitrification by sulfur-oxidizing bacteria in a eutrophic lake. *Aquatic Microbial Ecology* 66(3), 283-293.
- Cadore, A., Conrad, A. and Block, J.-C., 2002.** Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludges. *Enzyme and Microbial Technology* 31(1-2), 179-186.
- Calderón, K., Rodelas, B., Cabirol, N., González-López, J. and Noyola, A., 2011.** Analysis of microbial communities developed on the fouling layers of a membrane-coupled anaerobic bioreactor applied to wastewater treatment. *Bioresour Technology* 102(7), 4618-4627.
- Calderón, K., González-Martínez, A., Montero-Puente, C., Reboleiro-Rivas, P., Poyatos, J.M., Juárez-Jiménez, B., Martínez-Toledo, M.V. and Rodelas, B., 2012a.** Bacterial community structure and enzyme activities in a membrane bioreactor (MBR) using pure oxygen as an aeration source. *Bioresour Technol* 103(1), 87-94.
- Calderón, K., Reboleiro-Rivas, P., Rodríguez, F.A., Poyatos, J., González-López, J. and Rodelas, B., 2012b.** Comparative analysis of the enzymatic activities and the bacterial community structure based on the aeration source supplied to an MBR to treat urban wastewater. *Bioresour Technol*, Submitted.
- Camarinha-Silva, A., 2012.** Bacterial community structure and temporal dynamics of the human anterior nares, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Germany.
- Carrera, J., Vicent, T. and Lafuente, J., 2004.** Effect of influent COD/N ratio on biological nitrogen removal (BNR) from high-strength ammonium industrial wastewater. *Process Biochemistry* 39(12), 2035-2041.
- Celussi, M. and Del Negro, P., 2012.** Microbial degradation at a shallow coastal site: Long-term spectra and rates of exoenzymatic activities in the NE Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (0).

- Cerrone, F., Poyatos, J., Molina-Muñoz, M., Cortés-Lorenzo, C., González-López, J. and Rodelas, B., 2012.** Prevalence of *Nitrosomonas* cluster 7 populations in the ammonia-oxidizing community of a submerged membrane bioreactor treating urban wastewater under different operation conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, In press.
- Cicek, N., Franco, J.P., Suidan, M.T., Urbain, V. and Manem, J., 1999.** Characterization and comparison of a membrane bioreactor and a conventional activated-sludge system in the treatment of wastewater containing high-molecular-weight compounds. *Water Environment Research* 71(1), 64-70.
- Cicek, N., 2003.** A review of membrane bioreactors and their potential application in the treatment of agricultural wastewater. *Can. Biosyst. Eng.* 45, 637-646.
- Clarke, K. and Warwick, R., 2001.** Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation., Plymouth, USA.
- Clarke, K.R. and Ainsworth, M., 1993.** A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 92, 205-219.
- Clarke, K.R., Somerfield, P.J. and Gorley, R.N., 2008.** Testing of null hypotheses in exploratory community analyses: similarity profiles and biota-environment linkage. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 366(1-2), 56-69.
- Coombs, E.P., 1992.** Activated Sludge Ltd. – The Early Years, Bournemouth, Dorset, UK.
- Cooper, P.F., 2001.** Historical aspect of wastewater, IWA publishing. London, UK.
- Cunha, A., Almeida, A., Coelho, F., Gomes, N., Oliveira, V. and Santos, A., 2010.** Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Mendez-Vilas, A. (ed), pp. 124-135, Formatex Microbiology Series, Badajoz, Spain.
- Chandran, K., Stein, L.Y., Klotz, M.G. and van Loosdrecht, M.C., 2011.** Nitrous oxide production by lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria and implications for engineered nitrogen-removal systems. *Biochem Soc Trans* 39(6), 1832-1837.
- Chao, A., 1984.** Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* 11(265-270).
- Chao, A. and Lee, S.-M., 1992.** Estimating the number of classes via sample coverage. *Journal of the American Statistical Association* 87, 210-217.
- Chen, R. and LaPara, T., 2006.** Aerobic biological treatment of low-strength synthetic wastewater in membrane-coupled bioreactors: the structure and function of bacterial enrichment cultures as the net growth rate approaches zero. *Microbial Ecology* 51(1), 99-108.
- Chomczynski, P., 1992.** Solubilization in formamide protects RNA from degradation. *Nucleic Acids Res.* 20(14), 3791-3792.
- Chróst, R.J., 1992.** Significance of bacterial ectoenzymes in aquatic environments. *Hydrobiologia* 243-244(1), 61-70.
- Daims, H., Purkhold, U., Bjerrum, L., Arnold, E., Wilderer, P.A. and Wagner, M., 2001.** Nitrification in sequencing biofilm batch reactors: lessons from molecular approaches. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* 43(3), 9-18.
- Defrance, L. and Jaffrin, M.Y., 1999.** Comparison between filtration at fixed transmembrane pressure and fixed permeate flux: application to a membrane bioreactor used for wastewater treatment. *Journal of Membrane Science* 152, 203-210.

Denman, S.E., Tomkins, N. and McSweeney, C.S., 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology* 62(3), 313-322.

Drews, A. and Kraume, M., 2005. Process Improvement by Application of Membrane Bioreactors. *Chemical Engineering Research and Design* 83(3), 276-284.

Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26(19), 2460-2461.

EGMASA, 2005.

Erijman, L., Figuerola, E.L.M., Guerrero, L.D. and Ayarza, J.M., 2011. Impacto de los recientes avances en el análisis de comunidades microbianas sobre el control del proceso de tratamiento de efluentes. *Revista argentina de microbiología* 43, 127-135.

EU, 1991. Urban Wastewater Treatment (UWWT) Directive, 91/271/EEC, European Council

Falk, M.W., Song, K.-G., Matiasek, M.G. and Wuertz, S., 2009. Microbial community dynamics in replicate membrane bioreactors – Natural reproducible fluctuations. *Water Research* 43(3), 842-852.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

Felske, A., Engelen, B., Nubel, U. and Backhaus, H., 1996. Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Appl Environ Microbiol* 62(11), 4162-4167.

Frette, L., Gejlsbjerg, B. and Westermann, P., 1997. Aerobic denitrifiers isolated from an alternating activated sludge system. *FEMS Microbiology Ecology* 24(4), 363-370.

Frølund, B., Griebe, T. and Nielsen, P.H., 1995. Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Appl Microbiol Biotechnol* 43(4), 755-761.

Frossard, A., Gerull, L., Mutz, M. and Gessner, M.O., 2012. Disconnect of microbial structure and function: enzyme activities and bacterial communities in nascent stream corridors. *ISME J* 6(3), 680-691.

Fu, Z., Yang, F., An, Y. and Xue, Y., 2009a. Simultaneous nitrification and denitrification coupled with phosphorus removal in an modified anoxic/oxic-membrane bioreactor (A/O-MBR). *Biochemical Engineering Journal* 43(2), 191-196.

Fu, Z., Yang, F., Zhou, F. and Xue, Y., 2009b. Control of COD/N ratio for nutrient removal in a modified membrane bioreactor (MBR) treating high strength wastewater. *Bioresource Technology* 100(1), 136-141.

Galvez, J.M., Gomez, M.A., Hontoria, E. and Gonzalez-Lopez, J., 2003. Influence of hydraulic loading and air flowrate on urban wastewater nitrogen removal with a submerged fixed-film reactor. *J Hazard Mater* 101(2), 219-229.

García, J., Fernández, S., Mirada, F.J. and López, F., 1997. Determination of the protease activity in activated sludges by gelatin hydrolysis. *Journal of Environmental Science and Health . Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology* 32(9-10), 2537-2551.

Gardner, A., West, S.A. and Griffin, A.S., 2007. Is Bacterial Persistence a Social Trait? *PLoS ONE* 2(8), e752.

Geets, J., de Cooman, M., Wittebolle, L., Heylen, K., Vanparrys, B., De Vos, P., Verstraete, W. and Boon, N., 2007. Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* 75(1), 211-221.

- Gerardi, M.H., 2006.** Wastewater microbiology, John Wiley & Sons. Ny, EEUU.
- Glöckner, F.O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A. and Amann, R., 2000.** Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl Environ Microbiol* 66(11), 5053-5065.
- Goel, R., Mino, T., Satoh, H. and Matsuo, T., 1998.** Enzyme activities under anaerobic and aerobic conditions in activated sludge sequencing batch reactor. *Water Research* 32(7), 2081-2088.
- Gomez-Silvan, C., Molina-Munoz, M., Poyatos, J.M., Ramos, A., Hontoria, E., Rodelas, B. and Gonzalez-Lopez, J., 2010.** Structure of archaeal communities in membrane-bioreactor and submerged-biofilter wastewater treatment plants. *Bioresour Technol* 101(7), 2096-2105.
- Gómez-Villalba, B., Calvo, C., Vilchez, R., González-López, J. and Rodelas, B., 2006.** TGGE analysis of the diversity of ammonia-oxidizing and denitrifying bacteria in submerged filter biofilms for the treatment of urban wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(2), 393-400.
- Gómez, M., Garralón, G., Plaza, F., Vilchez, R., Hontoria, E. and Gómez, M.A., 2007.** Rejection of endocrine disrupting compounds (bisphenol A, bisphenol F and triethyleneglycol dimethacrylate) by membrane technologies. *Desalination* 212(1-3), 79-91.
- Gomez, M.A. and Hontoria, E., 2003.** Técnicas analíticas en el control de la Ingeniería Ambiental, Universidad de Granada. Granada, España.
- Gonzalez, D., Ruiz, L.M., Garralon, G., Plaza, F., Arevalo, J., Parada, J., Perez, J., Moreno, B. and Gomez, M.A., 2012.** Wastewater polycyclic aromatic hydrocarbons removal by membrane bioreactor. *Desalination and Water Treatment* 42(1-3), 94-99.
- Good, I.J., 1953.)** The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40, 237-264.
- Graham, J.E., Wantland, N.B., Campbell, M. and Klotz, M.G., 2011.** Characterizing bacterial gene expression in nitrogen cycle metabolism with RT-qPCR. *Methods Enzymol* 496, 345-372.
- Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D.D. and Wolff, A., 2007.** Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Res* 35(19), e127.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. and Ryan, P.D., 2001.** PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontol Electro* 4, 9.
- Hardt, F.W., Clesceri, L.S., Nelson, L.N. and Washington, D.R., 1970.** Solids Separation by Ultrafiltration for Concentrated Activated Sludge. *Journal (Water Pollution Control Federation)* 42(12), 2135-2148.
- Harms, G., Layton, A.C., Dionisi, H.M., Gregory, I.R., Garrett, V.M., Hawkins, S.A., Robinson, K.G. and Sayler, G.S., 2003.** Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ Sci Technol* 37(2), 343-351.
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S. and Philippot, L., 2006.** Quantitative detection of the nosZ gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology* 72(8), 5181-5189.
- Ho, A. and Frenzel, P., 2012.** Heat stress and methane-oxidizing bacteria: Effects on activity and population dynamics. *Soil Biology and Biochemistry* 50(0), 22-25.

- Hontoria E, González J, Gómez M.A. and B, M., 2003.** Reutilización de las aguas residuales urbanas, Granada, España.
- Hoostal, M.J., Bidart-Bouzat, M.G. and Bouzat, J.L., 2008.** Local adaptation of microbial communities to heavy metal stress in polluted sediments of Lake Erie. *FEMS Microbiology Ecology* 65(1), 156-168.
- Horz, H.-P., Barbrook, A., Field, C.B. and Bohannon, B.J.M., 2004.** Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(42), 15136-15141.
- <http://rrndb.mmg.msu.edu/>, 2012. Schmitt Laboratory, Michigan State University, Michigan, USA.
- Hu, M., Wang, X., Wen, X. and Xia, Y., 2012.** Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis. *Bioresource Technology* 117(0), 72-79.
- Huang, X., Gui, P. and Qian, Y., 2001.** Effect of sludge retention time on microbial behaviour in a submerged membrane bioreactor. *Process Biochemistry* 36(10), 1001-1006.
- Huang, Z., Gedalanga, P.B., Asvapathanagul, P. and Olson, B.H., 2010.** Influence of physicochemical and operational parameters on *Nitrobacter* and *Nitrospira* communities in an aerobic activated sludge bioreactor. *Water Research* 44(15), 4351-4358.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1998.** Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 23(10), 403-405.
- Judd, S., 2006.** *The MBR Book: Principles and Applications of Membrane Bioreactors in Water and Wastewater Treatment*, Elsevier Science. 1st Edition. Oxford, UK.
- Judd, S., 2008.** The status of membrane bioreactor technology. *Trends in Biotechnology* 26(2), 109-116.
- Judd, S., 2011.** *The MBR book. Principles and applications of membrane bioreactors in water and wastewater treatment*, Elsevier Science. 2nd Edition. Oxford, UK.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P. and Wagner, M., 1998.** Combined Molecular and Conventional Analyses of Nitrifying Bacterium Diversity in Activated Sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-Like Bacteria as Dominant Populations. *Applied and Environmental Microbiology* 64(8), 3042-3051.
- Kampschreur, M.J., Tan, N.C.G., Picioreanu, C., Jetten, M.S.M., Schmidt, I. and van Loosdrecht, M.C.M., 2006.** Role of nitrogen oxides in the metabolism of ammonia-oxidizing bacteria. *Biochemical Society Transactions* 34, 179-181.
- Kiersztyn, B., Siuda, W. and Chróst, R.J., 2012.** Persistence of bacterial proteolytic enzymes in lake ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology* 80(1), 124-134.
- Kim, D.-J., Lee, D.-I. and Keller, J., 2006.** Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresource Technology* 97(3), 459-468.
- Kim, Y.M., Cho, H.U., Lee, D.S., Park, D. and Park, J.M., 2011.** Influence of operational parameters on nitrogen removal efficiency and microbial communities in a full-scale activated sludge process. *Water Research* 45(17), 5785-5795.
- Kim, Y.M., Chon, D.H., Kim, H.S. and Park, C., 2012.** Investigation of bacterial community in activated sludge with an anaerobic side-stream reactor (ASSR) to decrease the generation of excess sludge. *Water Res* 46(13), 4292-4300.

- Kjelleberg, S., Albertson, N., Flårdh, K., Holmquist, L., Jouper-Jaan, Å., Marouga, R., Östling, J., Svenblad, B. and Weichart, D., 1993.** How do non-differentiating bacteria adapt to starvation? *Antonie van Leeuwenhoek* 63(3-4), 333-341.
- Kolb, S., Knief, C., Stubner, S. and Conrad, R., 2003.** Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel pmoA-targeted real-time PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology* 69(5), 2423-2429.
- Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B. and Stahl, D.A., 2005.** Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437, 543-546.
- Konopka, A., Zakharova, T., Oliver, L., Camp, D. and Turco, R., 1996.** Biodegradation of organic wastes containing surfactants in a biomass recycle reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3292-3297.
- Konopka, A., 2000.** Microbial physiological state at low growth rate in natural and engineered ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 3(3), 244-247.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., De Boer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M. and Woldendorp, J.W., 1997a.** Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol* 63, 1489-1497.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., De Boer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M. and Woldendorp, J.W., 1997b.** Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments.
- Kraft, B., Strous, M. and Tegetmeyer, H.E., 2011.** Microbial nitrate respiration-genes, enzymes and environmental distribution. *J Biotechnol* 155(1), 104-117.
- Kraume, M. and Bracklow, U., 2003.** Das Membranbelebungsverfahren in der kommunalen Abwasserbehandlung – Betriebserfahrungen und Bemessungsansätze in Deutschland. (Membrane technology in the municipal waste water treatment operating experience and design rules in Germany) *Membrantechnik in der Wasseraufbereitung und Abwasserbehandlung*, 5 Aachen, Alemania.
- Kraume, M. and Drews, A., 2010.** Membrane Bioreactors in Waste Water Treatment – Status and Trends. *Chemical Engineering & Technology* 33(8), 1251-1259.
- Kumar, M., Lee, P.-Y., Fukusihma, T., Whang, L.-M. and Lin, J.-G., 2012.** Effect of supplementary carbon addition in the treatment of low C/N high-technology industrial wastewater by MBR. *Bioresource Technology* 113(0), 148-153.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. and Nei, M., 2001.** MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17(12), 1244-1245.
- Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N.Q. and Leibler, S., 2005.** Bacterial Persistence: A Model of Survival in Changing Environments. *Genetics* 169(4), 1807-1814.
- Laera, G., Pollice, A., Saturno, D., Giordano, C. and Sandulli, R., 2009.** Influence of sludge retention time on biomass characteristics and cleaning requirements in a membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Desalination* 236(1-3), 104-110.
- Lam, P. and Kuypers, M.M.M., 2011.** Microbial Nitrogen Cycling Processes in Oxygen Minimum Zones. *Annual Review of Marine Science* 3(1), 317-345.
- LaPara, T.M., Konopka, A., Nakatsu, C.H. and Alleman, J.E., 2001.** Thermophilic aerobic treatment of a synthetic wastewater in a membrane-coupled bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 26(4), 203-209.

- LaPara, T.M., Zakharova, T., Nakatsu, C.H. and Konopka, A., 2002.** Functional and structural adaptations of bacterial communities growing on particulate substrates under stringent nutrient limitation. *Microb Ecol* 44(4), 317-326.
- LaPara, T.M., Klatt, C.G. and Chen, R., 2006.** Adaptations in bacterial catabolic enzyme activity and community structure in membrane-coupled bioreactors fed simple synthetic wastewater. *J Biotechnol* 121(3), 368-380.
- Le-Clech, P., 2010.** Membrane bioreactors and their uses in wastewater treatments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88(6), 1253-1260.
- Leloup, J., Loy, A., Knab, N.J., Borowski, C., Wagner, M. and Jorgensen, B.B., 2007.** Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environmental Microbiology* 9(1), 131-142.
- Li, B. and Bishop, P., 2003.** Structure-function dynamics and modeling analysis of the micro-environment of activated sludge floc. *Wat SciTechnol* 47(11), 267-273.
- Limpiyakorn, T., Sonthiphand, P., Rongsayamanont, C. and Polprasert, C., 2011.** Abundance of amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants. *Bioresour Technol* 102(4), 3694-3701.
- Lin, B., Braster, M., van Breukelen, B.M., van Verseveld, H.W., Westerhoff, H.V. and Röling, W.F.M., 2005.** Geobacteraceae Community Composition Is Related to Hydrochemistry and Biodegradation in an Iron-Reducing Aquifer Polluted by a Neighboring Landfill. *Applied and Environmental Microbiology* 71(10), 5983-5991.
- Low, E.W. and Chase, H.A., 1999.** Reducing production of excess biomass during wastewater treatment. *Water Research* 33(5), 1119-1132.
- Lücker, S., Wagner, M., Maixner, F., Pelletier, E., Koch, H., Vacherie, B., Rattei, T., Sinnighe Damsté, J.S., Spieck, E., Le Paslier, D. and Daims, H., 2010.** A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *PNAS* 107(30), 13479-13484.
- Macomber, J., Cicek, N., Suidan, M.T., Davel, J., Ginestet, P. and Audic, J.M., 2005.** Biological kinetic data evaluation of an activated sludge system coupled with an ultrafiltration membrane. *J. Environ. Eng.* 131(4), 579-586.
- Martín, J., Camacho-Muñoz, M.D., Santos, J.L., Aparicio, I. and Alonso, E., 2012.** Distribution and temporal evolution of pharmaceutically active compounds alongside sewage sludge treatment. Risk assessment of sludge application onto soils. *Journal of Environmental Management* 102(0), 18-25.
- Martinez-Espinosa, R.M., Cole, J.A., Richardson, D.J. and Watmough, N.J., 2011.** Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochem Soc Trans* 39(1), 175-178.
- Martins, A.M.P., Pagilla, K., Heijnen, J.J. and van Loosdrecht, M.C.M., 2004.** Filamentous bulking sludge—a critical review. *Water Research* 38(4), 793-817.
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D. and Verstraete, W., 2008.** How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology* 10(6), 1571-1581.
- Massé, A., Spérandio, M. and Cabassud, C., 2006.** Comparison of sludge characteristics and performance of a submerged membrane bioreactor and an activated sludge process at high solids retention time. *Water Research* 40(12), 2405-2415.
- Metzker, M.L., 2010.** Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11(1), 31-46.

- Milner, M.G., Curtis, T.P. and Davenport, R.J., 2008.** Presence and activity of ammonia-oxidising bacteria detected amongst the overall bacterial diversity along a physico-chemical gradient of a nitrifying wastewater treatment plant. *Water Research* 42(12), 2863-2872.
- Mincer, T.J., Church, M.J., Taylor, L.T., Preston, C., Kar, D.M. and DeLong, E.F., 2007.** Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environmental Microbiology* 9(5), 1162-1175.
- Miura, Y., Hiraiwa, M.N., Ito, T., Itonaga, T., Watanabe, Y. and Okabe, S., 2007.** Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: relationship between community stability and reactor performance. *Water Res* 41(3), 627-637.
- Mohan, S.B., Schmid, M., Jetten, M. and Cole, J., 2004.** Detection and widespread distribution of the *nrfA* gene encoding nitrite reduction to ammonia, a short circuit in the biological nitrogen cycle that competes with denitrification. *FEMS Microbiology Ecology* 49(3), 433-443.
- Molina-Muñoz, M., Poyatos, J.M., Vilchez, R., Hontoria, E., Rodelas, B. and Gonzalez-Lopez, J., 2007.** Effect of the concentration of suspended solids on the enzymatic activities and biodiversity of a submerged membrane bioreactor for aerobic treatment of domestic wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol* 73(6), 1441-1451.
- Molina-Muñoz, M., Poyatos, J.M., Sanchez-Peinado, M., Hontoria, E., Gonzalez-Lopez, J. and Rodelas, B., 2009.** Microbial community structure and dynamics in a pilot-scale submerged membrane bioreactor aerobically treating domestic wastewater under real operation conditions. *Sci Total Environ* 407(13), 3994-4003.
- Molina-Muñoz, M., Poyatos, J.M., Rodelas, B., Pozo, C., Manzanera, M., Hontoria, E. and Gonzalez-Lopez, J., 2010.** Microbial enzymatic activities in a pilot-scale MBR experimental plant under different working conditions. *Bioresour Technol* 101(2), 696-704.
- Morgan, C.A., Hudson, A., Konopka, A. and Nakatsu, C.H., 2002.** Analyses of microbial activity in biomass-recycle reactors using denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA and 16S rRNA PCR products. *Canadian Journal of Microbiology* 48(4), 333-341.
- Morgenroth, E., Kommedal, R. and Harremoës, P., 2002.** Processes and modeling of hydrolysis of particulate organic matter in aerobic wastewater treatment--a review. *Water Sci Technol* 45(6), 25-40.
- Morley, N. and Baggs, E.M., 2010.** Carbon and oxygen controls on N₂O and N₂ production during nitrate reduction. *Soil Biology and Biochemistry* 42(10), 1864-1871.
- Mußmann, M., Brito, I., Pitcher, A., Sinnighe Damsté, J.S., Hatzenpichler, R., Richter, A., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Müller, A., Daims, H., Wagner, M. and Head, I.M., 2011.** Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express *amoA* but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(40), 16771-16776.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G., 1993.** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59(3), 695-700.
- Muyzer, G. and Smalla, K., 1998.** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73(1), 127-141.
- Muyzer, G., 1999.** DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2(3), 317-322.

NCBI, 2012. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>:

Neufeld, R.D., Hill, A.J. and Adekoya, D.O., 1980. Phenol and free ammonia inhibition to Nitrosomonas activity. *Water Research* 14(12), 1695-1703.

Ng, H.Y. and Hermanowicz, S.W., 2005. Membrane bioreactor operation at short solids retention times: performance and biomass characteristics. *Water Research* 39(6), 981-992.

Nicolaisen, M.H. and Ramsing, N.B., 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 50(2), 189-203.

Nielsen, P.H., Raunkjær, K., Norsker, N.H., Jensen, N.A. and Hvitved-Jacobsen, T., 1992. Transformation of wastewater in sewer systems—a review. *Wat. Sci. Technol.* 25(6), 17-31.

Nielsen, P.H., Kragelund, C., Seviour, R.J. and Nielsen, J.L., 2009. Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiol Rev* 33(6), 969-998.

Noda, N., Kaneko, N., Mikami, M., Kimochi, Y., Tsuneda, S., Hirata, A., Mizuochi, M. and Inamori, Y., 2003. Effects of SRT and DO on N₂O reductase activity in an anoxic-oxic activated sludge system. *Water Sci Technol* 48, 363-370.

Nybroe, O., Jorgensen, P.E. and Henze, M., 1992. Enzyme activities in waste water and activated sludge. *Water Research* 26(5), 579-584.

Ozdemir, B., Mertoglu, B., Yapsakli, K., Aliyazicioglu, C., Saatci, A. and Yenigun, O., 2011. Investigation of nitrogen converters in membrane bioreactor. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 46(5), 500-508.

Palmer, K., Drake, H.L. and Horn, M.A., 2009. Genome-Derived Criteria for Assigning Environmental narG and nosZ Sequences to Operational Taxonomic Units of Nitrate Reducers. *Applied and Environmental Microbiology* 75(15), 5170-5174.

Parker, P.M., 2008. The 2009-2014 world outlook for membrane bioreactor (MBR) systems for wastewater treatment, ICON Group International.

Pielou, E.C., 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology* 13, 131-144.

Prosser, J.I. and Nicol, G.W., 2008. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environmental Microbiology* 10(11), 2931-2941.

Purkhold, U., Wagner, M., Timmermann, G., Pommerening-Röser, A. and Koops, H.-P., 2003. 16S rRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(5), 1485-1494.

Rosenberger, S., Witzig, R., Manz, W., Szewzyk, U. and Kraume, M., 2000. Operation of different membrane bioreactors : experimental results and physiological state of the micro-organisms. *Water Science and Technology* 41(10-11), 269-277.

Ruiz, L.M., Arévalo, J., Parada, J., González, D., Moreno, B., Pérez, J. and Gómez, M.A., 2011. Respirometric assays of two different MBR (microfiltration and ultrafiltration) to obtain kinetic and stoichiometric parameters. *Water Sci Technol* 63, 2478-2485.

Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4), 406-425.

- Sakano, Y., Pickering, K.D., Strom, P.F. and Kerkhof, L.J., 2002.** Spatial Distribution of Total, Ammonia-Oxidizing, and Denitrifying Bacteria in Biological Wastewater Treatment Reactors for Bioregenerative Life Support. *Applied and Environmental Microbiology* 68(5), 2285-2293.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2^a ed. Cold Spring Harbor, New York.
- San Pedro, D.C., Mino, T. and Matsuo, T., 1994.** Evaluation of the rate of hydrolysis of slowly biodegradable COD (SBCOD) using starch as substrate under anaerobic, anoxic and aerobic conditions. *Water Sci Technol* 30(11), 191-199.
- Scala, D.J. and Kerkhof, L.J., 1998.** Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. *FEMS Microbiology Letters* 162(1), 61-68.
- Scala, D.J. and Kerkhof, L.J., 1999.** Diversity of Nitrous Oxide Reductase (*nosZ*) Genes in Continental Shelf Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 65(4), 1681-1687.
- Seviour, E.M., Blackall, L.L., Christensson, C., Hugenholtz, P., Cunningham, M.A., Bradford, D., Stratton, H.M. and Seviour, R.J., 1997.** The filamentous morphotype Eikelboom Type 1863 is not a single genetic entity. *Journal of Applied Microbiology* 82(4), 411-421.
- Shafir, M. and Avisar, D., 2012.** Development Method for Extracting and Analyzing Antibiotic and Hormone Residues from Treated Wastewater Sludge and Composted Biosolids. *Water, Air, & Soil Pollution* 223(5), 2571-2587.
- Shannon, C.E. and Weaver, W., 1963.** The mathematical theory of communication. , University of Illinois Press. Urbana, IL, USA.
- Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F. and Hajibabaei, M., 2012.** Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol* 21(8), 1794-1805.
- Sims, A., Horton, J., Gajaraj, S., McIntosh, S., Miles, R.J., Mueller, R., Reed, R. and Hu, Z., 2012.** Temporal and spatial distributions of ammonia-oxidizing archaea and bacteria and their ratio as an indicator of oligotrophic conditions in natural wetlands. *Water Research* 46(13), 4121-4129.
- Sinsabaugh, R.L., Lauber, C.L., Weintraub, M.N., Ahmed, B., Allison, S.D., Crenshaw, C., Contosta, A.R., Cusack, D., Frey, S., Gallo, M.E., Gartner, T.B., Hobbie, S.E., Holland, K., Keeler, B.L., Powers, J.S., Stursova, M., Takacs-Vesbach, C., Waldrop, M.P., Wallenstein, M.D., Zak, D.R. and Zeglin, L.H., 2008.** Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters* 11(11), 1252-1264.
- Sinsabaugh, R.L. and Shah, J.J.F., 2010.** Integrating resource utilization and temperature in metabolic scaling of riverine bacterial production. *Ecology* 91(5), 1455-1465.
- Smith, C.J., Nedwell, D.B., Dong, L.F. and Osborn, A.M., 2007.** Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 73(11), 3612-3622.
- Smith, C.J. and Osborn, A.M., 2009.** Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 67(1), 6-20.
- Smith, C.V., Gregorio, D.O. and Talcott, R.M., 1969.** The use of ultrafiltration membranes for activated sludge separation. Proceeding of the 24th industrial waste Conference, Purdue University, Ann Arbor Science, Ann Arbor, USA.

- Smith, K., 1997.** The potential for feedback effects induced by global warming on emissions of nitrous oxide by soils. *Global Change Biology* 3(4), 327-338.
- Sokal, R. and Rohlf, F., 1962.** The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 11, 33-40.
- Stamper, D.M., Walch, M. and Jacobs, R.N., 2003.** Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 825-860.
- Terada, A., Lackner, S., Kristensen, K. and Smets, B.F., 2010.** Inoculum effects on community composition and nitrification performance of autotrophic nitrifying biofilm reactors with counter-diffusion geometry. *Environmental Microbiology* 12(10), 2858-2872.
- Teuber, M. and Brodisch, K.E.U., 1977.** Enzymatic activities of activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 4(3), 185-194.
- Thorne, S.H. and Williams, H.D., 1999.** Cell Density-Dependent Starvation Survival of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli: Identification of the Role of an N- Acyl Homoserine Lactone in Adaptation to Stationary-Phase Survival. *Journal of Bacteriology* 181(3), 981-990.
- Tiquia, S., 2011.** Extracellular hydrolytic enzyme activities of the heterotrophic microbial communities of the Rouge river: an approach to evaluate ecosystem response to urbanization. *Microbial Ecology* 62(3), 679-689.
- Ueda, T. and Horan, N.J., 2000.** Fate of indigenous bacteriophage in a membrane bioreactor. *Water Research* 34, 2151-2159.
- URI, 2004.** Calculator for determining the number of copies of a template, Rhode Island, USA.
- USEPA, 1999.**
- van Nieuwenhuijzen, A.F., Evenblij, H., Uijterlinde, C.A. and Schulting, F.L., 2008.** Review on the state of science on membrane bioreactors for municipal wastewater treatment. *Water Sci Technol* 57(7), 979-986.
- Wallenstein, M.D., Myrold, D.D., Firestone, M. and Voytek, M., 2006.** Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecological Applications* 16(6), 2143-2152.
- Wang, J.P., 2011.** SPECIES: An R Package for Species Richness Estimation. *Journal of Statistical Software* 40, 9.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. and Cole, J.R., 2007.** Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73(16), 5261-5267.
- Wang, X., Wen, X., Criddle, C., Yan, H., Zhang, Y. and Ding, K., 2010.** Bacterial community dynamics in two full-scale wastewater treatment systems with functional stability. *J Appl Microbiol* 109(4), 1218-1226.
- Wang, X., Hu, M., Xia, Y., Wen, X. and Ding, K., 2012.** Pyrosequencing Analysis of Bacterial Diversity in 14 Wastewater Treatment Systems in China. *Applied and Environmental Microbiology* 78(19), 7042-7047.
- Wei, Y., Van Houten, R.T., Borger, A.R., Eikelboom, D.H. and Fan, Y., 2003.** Minimization of excess sludge production for biological wastewater treatment. *Water Research* 37(18), 4453-4467.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J., 1991.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173(2), 697-703.

- Wertz, S., Poly, F., Le Roux, X. and Degrange, V., 2008.** Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of Nitrobacter-like nxrA sequences in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 63(2), 261-271.
- Wilczek, S., Fischer, H. and Pusch, M., 2005.** Regulation and seasonal dynamics of extracellular enzyme activities in the sediments of a large lowland river. *Microbial Ecology* 50(2), 253-267.
- Winkler, M.K., Bassin, J.P., Kleerebezem, R., Sorokin, D.Y. and van Loosdrecht, M.C., 2012.** Unravelling the reasons for disproportion in the ratio of AOB and NOB in aerobic granular sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* 94(6), 1657-1666.
- Wintzingerode, F.V., Göbel, U.B. and Stackebrandt, E., 1997.** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21(3), 213-229.
- Wittebolle, L., Vervaeren, H., Verstraete, W. and Boon, N., 2008.** Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. *Appl Environ Microbiol* 74(1), 286-293.
- Witzig, R., Manz, W., Rosenberger, S., Krugerb, U., Kraumeb, M. and Szewzyk, U., 2002.** Microbiological aspects of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater. *Water Res* 36(2), 394-402.
- Wong, M.L. and Medrano, J.F., 2005.** Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39, 75-85.
- Xia, S., Duan, L., Song, Y., Li, J., Piceno, Y.M., Andersen, G.L., Alvarez-Cohen, L., Moreno-Andrade, I., Huang, C.L. and Hermanowicz, S.W., 2010.** Bacterial community structure in geographically distributed biological wastewater treatment reactors. *Environ Sci Technol* 44(19), 7391-7396.
- Xia, S., Jia, R., Feng, F., Xie, K., Li, H., Jing, D. and Xu, X., 2012.** Effect of solids retention time on antibiotics removal performance and microbial communities in an A/O-MBR process. *Bioresource Technology* 106(0), 36-43.
- Xie, C.S., Zhao, J., Tang, J., Xu, J.A., Lin, X.Y. and Xu, X.H., 2011.** The phosphorus fractions and alkaline phosphatase activities in sludge. *Bioresource Technology* 102(3), 2455-2461.
- Yang, W., Cicek, N. and Ilg, J., 2006.** State-of-the-art of membrane bioreactors: Worldwide research and commercial applications in North America. *Journal of Membrane Science* 270(1-2), 201-211.
- Ye, L., Shao, M.F., Zhang, T., Tong, A.H. and Lok, S., 2011.** Analysis of the bacterial community in a laboratory-scale nitrification reactor and a wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing. *Water Res* 45(15), 4390-4398.
- Ye, L. and Zhang, T., 2012.** Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- You, J., Das, A., Dolan, E.M. and Hu, Z., 2009.** Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. *Water Research* 43(7), 1801-1809.
- Yu, T., Qi, R., Li, D., Zhang, Y. and Yang, M., 2010.** Nitrifier characteristics in submerged membrane bioreactors under different sludge retention times. *Water Research* 44(9), 2823-2830.
- Zhang, B., Sun, B., Ji, M., Liu, H. and Liu, X., 2010.** Quantification and comparison of ammonia-oxidizing bacterial communities in MBRs treating various types of wastewater. *Bioresource Technology* 101(9), 3054-3059.

Zhang, T., Shao, M.F. and Ye, L., 2012. 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J* 6(6), 1137-1147.

Ziv-El, M., Papat, S.C., Cai, K., Halden, R.U., Krajmalnik-Brown, R. and Rittmann, B.E., 2012. Managing methanogens and homoacetogens to promote reductive dechlorination of trichloroethene with direct delivery of H₂ in a membrane biofilm reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 109(9), 2200-2210.