

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA. INSTITUTO DEL AGUA

“ESTUDIO DE LOS PROCESOS MICROBIANOS IMPLICADOS EN  
EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES URBANAS  
MEDIANTE BIORREACTORES DE MEMBRANA SUMERGIDA”

MEMORIA PARA OBTENER EL DOCTORADO EUROPEO

Fdo. Dña. Marisa Molina Muñoz

Directores:

Fdo: D. Jesús González López  
Catedrático de Microbiología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada

Fdo. Dña. María Belén Rodelas González  
Prof. Contratado Doctor  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada



**Universidad de Granada**



1.	Introducción	1
1.1.	Sistemas de Biorreactores de Membrana Sumergida (BMS)	2
1.1.1.	Evolución histórica e implantación a nivel mundial	2
1.1.2.	Fundamentos de los biorreactores de membrana (BRM)	6
1.1.3.	Clasificación de las membranas	10
1.1.4.	Composiciones y configuraciones de las membranas	13
1.1.5.	<i>Fouling</i>	17
1.1.5.1.	Introducción	17
1.1.5.2.	Factores que afectan al <i>fouling</i>	19
1.1.5.3.	Reducción del <i>fouling</i>	19
1.1.6.	Limpieza de las membranas	20
1.1.7.	MBR anaeróbicos versus MBR aeróbicos	22
1.1.8.	Sistemas comerciales de biorreactores de membrana	22
1.2.	Características biológicas de un BMS	24
1.2.1.	Proceso biológico de un BMS	24
1.2.1.1.	Proceso de Fangos activos	25
1.2.1.2.	Eliminación de nutrientes	26
1.2.2.	Biodiversidad y actividades enzimáticas	33
1.2.2.1.	Aplicaciones de la técnica de biología molecular al estudio de la diversidad microbiana	36
1.2.2.2.	Estudio de las actividades enzimáticas	40
1.2.3.	Capacidad de lo BMS de eliminar patógenos	42
1.2.3.1.	Indicadores de contaminación fecal	42
1.3.	Ventajas e inconvenientes de los BMS	46
2.	Objetivos	49
2.1.	Caracterización microbiológica del fango activo del biorreactor	49
2.2.	Estudio de la capacidad de los sistemas BMS en la eliminación microorganismos indicadores de contaminación fecal	50
3.	Materiales y Métodos	51
3.1.	Ubicación	51
3.2.	Descripción de la planta	51
3.3.	Limpieza de las membranas	55

3.4.	Características del influente	56
3.5.	Muestreo y analítica	57
3.6.	Caracterización físico-química de la planta piloto	58
3.6.1.	Temperatura	58
3.6.2.	pH	58
3.6.3.	Oxígeno disuelto	58
3.6.4.	Sólidos Suspendidos (SS)	59
3.6.5.	Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	59
3.6.6.	Demanda Química de Oxígeno (DQO)	60
3.6.7.	Demanda biológica de Oxígeno (DBO <sub>5</sub> )	61
3.7	Caracterización biológica del biorreactor	62
3.7.1.	Detección y recuento de microorganismos heterótrofos totales a 22 y 37° C	62
3.7.2.	Actividades enzimáticas	62
3.7.2.1.	Actividades fosfatasas	63
3.7.2.2.	Actividades glucosidasas	64
3.7.2.3.	Actividades proteasas	65
3.7.2.4.	Actividades esterases	66
3.7.2.5.	Actividades deshidrogenasas	67
3.7.3.	Estudio de las comunidades bacterianas	68
3.7.3.1.	Extracción del ADN bacteriano	68
3.7.3.2.	Amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S	70
3.7.3.3.	Amplificación de fragmentos del gen estructural de la subunidad $\alpha$ de la enzima amonio-monooxigenasa ( <i>amoA</i> )	74
3.7.3.4.	Concentración del producto de la PCR anidada	76
3.7.3.5.	Separación de las muestras mediante TGGE	77
3.7.3.6.	Reamplificación de las bandas separadas mediante TGGE	80
3.7.3.7.	Purificación y secuenciación de los fragmentos de ADN reamplificados	80
3.7.3.8.	Análisis informático de las secuencias	81
3.7.4.	Estudio de la población microbiana del biorreactor mediante la técnica FISH	82
3.7.5.	Capacidad de eliminación de patógenos	87

3.7.5.1.	Detección y recuento de <i>Escherichia coli</i>	87
3.7.5.5.	Detección y recuento de Colifagos	88
3.8.	Análisis estadístico	90
4.	Resultados	91
4.1.	Caracterización físico-química de la planta piloto en el 1º y 2º experimento	91
4.1.1.	SS y SSV	91
4.1.2.	DQO y DBO <sub>5</sub>	92
4.1.3.	pH, temperatura y oxígeno disuelto	93
4.2.	Caracterización biológica del biorreactor	95
4.2.1.	Microorganismos heterótrofos totales (MHT)	95
4.2.2.	Actividades enzimáticas	97
4.2.3.	Estudio de indicadores de contaminación fecal	100
4.2.3.1.	<i>Escherichia coli</i>	100
4.2.3.2.	Colifagos	102
4.3.	Caracterización físico-química de la planta piloto en los experimentos 3º, 4º, 5º y 6º	103
4.3.1.	SS y SSV	103
4.3.2.	DQO y DBO <sub>5</sub>	105
4.3.3.	pH, temperatura y oxígeno disuelto	108
4.4.	Caracterización biológica del biorreactor	111
4.4.1.	Microorganismos heterótrofos totales (MHT)	111
4.4.2.	Actividades enzimáticas	113
4.4.3.	Estudio de indicadores de contaminación fecal	119
4.4.3.1.	<i>Escherichia coli</i>	119
4.4.3.2.	Colifagos	122
4.5.	Estudios de biodiversidad del biorreactor.	125
4.5.1.	Extracción de ADN, PCR y TGGE	125
4.5.1.1.	Estudio de la población bacteriana del biorreactor utilizando fragmentos amplificados del gen codificante del ARN ribosómico 16S	125
4.5.1.2.	Estudio de la población de las bacterias oxidadoras de amonio del biorreactor utilizando fragmentos amplificados del gen	

	estructural de la subunidad $\alpha$ de la enzima amonio-monooxigenasa ( <i>amoA</i> )	138
4.5.2.	Caracterización de las bacterias nitrificantes mediante hibridación <i>situ</i> con fluorescencia (FISH)	146
5.	Discusión	151
6.	Conclusiones	175
7.	Bibliografía	177
Appendix:	English summary and figure legends	

## 1. INTRODUCCIÓN

Los diferentes usos que el hombre le ha dado al agua a lo largo de su historia han contribuido al empeoramiento de la calidad de la misma. A lo largo de las últimas décadas, el rápido desarrollo industrial, la creciente urbanización y el cambio en las prácticas agrícolas, entre otros factores, han provocado, además de un notable incremento en el consumo de los recursos hídricos, un deterioro de su calidad. Pese a los esfuerzos realizados por las Administraciones para resolver este problema, las tecnologías generadas todavía presentan indudables limitaciones. Así, los tratamientos actuales de fangos activos se han mostrado insuficientes para la eliminación de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y microorganismos patógenos (Tackett *et al.*, 2003).

El nitrógeno en la forma de amonio es muy tóxico para los organismos acuáticos. El amonio es rápidamente oxidado hasta nitrato, lo que provoca una disminución de la concentración de  $O_2$ . El amonio también es el causante de la eutrofización debido a la falta de  $O_2$ , y esto favorece la proliferación de las algas. Esto puede llegar a provocar la muerte de muchos organismos acuáticos (EPA, 2002).

El fósforo al igual que el nitrógeno es un nutriente esencial para los microorganismos, y contribuye a la eutrofización y a la reducción de  $O_2$  disuelto en las aguas superficiales (EPA, 2002).

Teniendo en consideración esta problemática, es importante buscar soluciones alternativas a los procesos actuales de tratamiento de aguas residuales, que permitan no sólo cumplir con los límites de vertido y calidad del agua impuestos actualmente, sino también con los que puedan ser impuestos en un futuro. Además se exige de estos procesos que tengan una alta flexibilidad en cuanto a las variaciones de carga de las aguas residuales, una mínima producción de fango, y la menor superficie posible para ubicar la planta de depuración.

Una opción para el tratamiento de las aguas residuales urbanas (ARUs) es la emergente técnica de los biorreactores de membrana (BRM). Este sistema se basa en la unificación de los fangos activos junto con la tecnología de membrana para la

separación de sólidos. Estos sistemas están especialmente indicados para aplicaciones de reutilización. Los BRMs son una tecnología de depuración de aguas residuales que se ha aplicado con bastante éxito en diferentes plantas depuradoras pequeñas (Crawford *et al.*, 2000).

### **1.1. Sistemas de Biorreactores de Membrana Sumergida (BMS):**

#### **1.1.1. Evolución histórica e implantación a nivel mundial**

Durante las últimas décadas, ha aumentado el número de investigaciones dirigidas al desarrollo del conocimiento de las interacciones entre el tratamiento de las aguas residuales y los procesos de filtración por membrana (Pollice *et al.*, 2004). Estas investigaciones fueron principalmente dirigidas hacia la optimización de la calidad del efluente, de los tipos de membrana, y de las diferentes configuraciones de las plantas piloto (Stephenson *et al.*, 2000, Visvanathan *et al.*, 2000).

Los últimos desarrollos de una nueva generación de membranas de ultrafiltración y microfiltración, más productivas y menos costosas, junto con el endurecimiento de los requisitos de vertido, han hecho que surgiera un nuevo concepto de tratamiento biológico: el biorreactor de membrana (BRM).

Así pues, los biorreactores de membrana son una modificación de los procesos convencionales de tratamiento biológico, donde tiene lugar el reemplazo de los depósitos de sedimentación secundaria por unidades de membranas. El proceso de membrana tiene la ventaja de permitir una mayor concentración de biomasa en el reactor y puede eliminar la necesidad de un proceso de desinfección separado o tratamiento terciario.

A pesar de que la tecnología BRM se presenta como una novedosa forma de depuración de las aguas residuales, la investigación y la comercialización de los biorreactores de membrana comenzó hace unos 35 años, cuando se empezó a considerar la combinación de membranas con un proceso biológico como un sistema óptimo para el tratamiento de las aguas residuales.

A principios de los años 60, Loeb y Sourirajan (1961) inventaron una membrana asimétrica de acetato de celulosa para ósmosis inversa, y desde este momento, las membranas empezaron a tener variados usos para el tratamiento de agua potable y residual. Este desarrollo de los procesos de fabricación de membrana y sus aplicaciones permitieron el reemplazo del tratamiento terciario por etapas por la microfiltración (MF) o ultrafiltración (UF).

La primera idea de sustituir el sedimentador por un proceso de ultrafiltración dentro del proceso convencional de fangos activos fue de Smith *et al.*, en 1969. En la década de los 60, la compañía Dorr-Oliver desarrolló un sistema para el tratamiento de aguas residuales utilizando membranas, llamado MST. En el sistema MST, el agua de alimentación entraba en un biorreactor desde donde se enviaba de forma continua a un módulo de ultrafiltración. Posteriormente, Hardt *et al.*, (1970) utilizaron un biorreactor aerobio de 10 l con una membrana de ultrafiltración para tratar agua residual sintética. La concentración de sólidos era alta comparada con un sistema convencional aerobio.

En la década de los 70, la tecnología entró por primera vez en el mercado japonés, gracias a un acuerdo entre las compañías Dorr-Oliver y Sanki Engineering. En las primeras plantas comerciales MST, las membranas se situaban externamente al tanque de aireación. Estas plantas consumían bastante energía, ya que trabajaban a presión.

También en la década de los 70, Thetford Systems, actualmente parte de Zenon Environmental, lanzó su versión de un sistema externo para el tratamiento aeróbico de las aguas residuales, el proceso fue llamado "Cycle-Let". A finales de los 80 y a principios de los 90, Zenon Environmental desarrolló este proceso con membranas sumergidas en el licor mezcla, obteniendo dos patentes del sistema: Zenon's sistema comercial, y ZenoGem (Stephenson *et al.*, 2000).

En 1982, Dorr-Oliver introdujo el sistema de reactor anaeróbico de membrana (MARS) para el tratamiento del efluente de una industria alimentaria. El proceso contaba igualmente con una unidad de ultrafiltración externa al reactor.

Casi al mismo tiempo, en la década de los 80, se desarrollaron en el Reino Unido dos sistemas BRM con microfiltración y ultrafiltración de membrana. En Sudáfrica se desarrolló un sistema consistente en un digestor anaeróbico, combinado con un proceso de ultrafiltración (Stephenson *et al.*, 2000).

También en la década de los 80 Yamamoto *et al.*, (1989), desarrollaron el primer módulo de membrana inmerso en el biorreactor para la depuración de aguas residuales e industriales. En 1989, el gobierno Japonés, junto con una serie de importantes compañías, acordó invertir en el desarrollo de un sistema que fuese compacto, y que produjese un efluente de elevada calidad, de forma que permitiese la reutilización del agua. La compañía Kubota desarrolló un sistema BRM en el que la membrana de placas estaba inmersa en el reactor (Stephenson *et al.*, 2000).

Ya en el año 1993, treinta y nueve de estos birreactores de membrana con configuración externa se habían difundido y tenían diversas aplicaciones tanto para el tratamiento de aguas sanitarias como industriales (Stephenson *et al.*, 2000). Recientemente Xianghua *et al.*, (2004) aplicaron los BMS para la depuración de aguas hospitalarias.

Actualmente existen más de 1000 BMS comerciales operando en diversas partes del mundo con muchos otros en fase de proyecto o construcción (Cicek, 2003). Los países en los que más se ha extendido esta tecnología son Japón (que cuenta aproximadamente con el 66% de los procesos a nivel mundial), Norte de América y Europa. Más del 98% de los sistemas complementan el proceso de separación de membrana con un proceso biológico aerobio. Aproximadamente el 55% de estos sistemas comerciales tienen la membrana sumergida dentro del biorreactor, mientras que el otro 45% presenta una configuración de membrana externa al biorreactor (Stephenson *et al.*, 2000).

Los BRM aerobios han tratado con éxito efluentes de diversas industrias, como las cosméticas, farmacéuticas, metálicas, textiles, alimenticias, papeleras y químicas. El interés en la tecnología para el tratamiento de aguas residuales mediante un biorreactor de membrana se ha incrementado, debido a las estrictas regulaciones de

calidad del agua, la necesidad de reutilización y reciclaje, y el incremento de la eficiencia en los costes de las tecnologías de membrana. El uso de membranas sumergidas ha reducido significativamente los consumos energéticos en los BRM y ha afianzado el incremento potencial de las membranas en el tratamiento del agua residual.

La tecnología de biorreactores de membrana sumergida (BMS) es apta para el tratamiento tanto de aguas residuales municipales como para el tratamiento de efluentes industriales. Dada la elevada calidad del efluente y lo extraordinariamente compactadas que son las plantas, está particularmente bien adaptada para los siguientes usos (Tazi *et al.*, 2002):

1. Aplicación en áreas de elevada sensibilidad ambiental.
2. Tratamiento de efluentes industriales complejos que requieren un sistema que permita operar a edades del fango elevadas.
3. Aplicaciones específicas donde el proceso convencional de fangos activos no pueda producir un efluente de calidad adecuada a costes razonables.
4. Aplicación en áreas donde existen limitaciones espaciales.
5. Ampliaciones de plantas convencionales.

Sin embargo, la mayor ventaja potencial de esta tecnología está en el campo de la reutilización.

En la actualidad, el uso del agua depurada con diferentes fines supone en España un 0,75% (270 hm/m<sup>3</sup>) de la demanda nacional. El Plan Hidrológico Nacional incluye proyectos de reutilización de aguas residuales que actualmente son vertidas a ríos y al mar, gracias a los cuales, se prevé conseguir un porcentaje de uso del 3% de la demanda nacional en el año 2012, lo que supone cuadruplicar el uso actual.

Con la tecnología BMS se retienen las bacterias, algunos virus y algunos componentes orgánicos e inorgánicos que frecuentemente son encontrados en los efluentes de los tratamientos secundarios convencionales. Por tanto, dependiendo del uso que se le quiera dar, el efluente de BMS puede ser adecuado bien como agua de suministro

para la reutilización directa o como agua de suministro para un proceso de ósmosis inversa. La investigación en este campo está cobrando una importancia extraordinaria, ya que la profundización en los fundamentos de esta tecnología es básica para lograr un óptimo rendimiento. En este sentido, es necesario conocer tanto el proceso de membranas como los procesos microbiológicos que tienen lugar en el BMS.

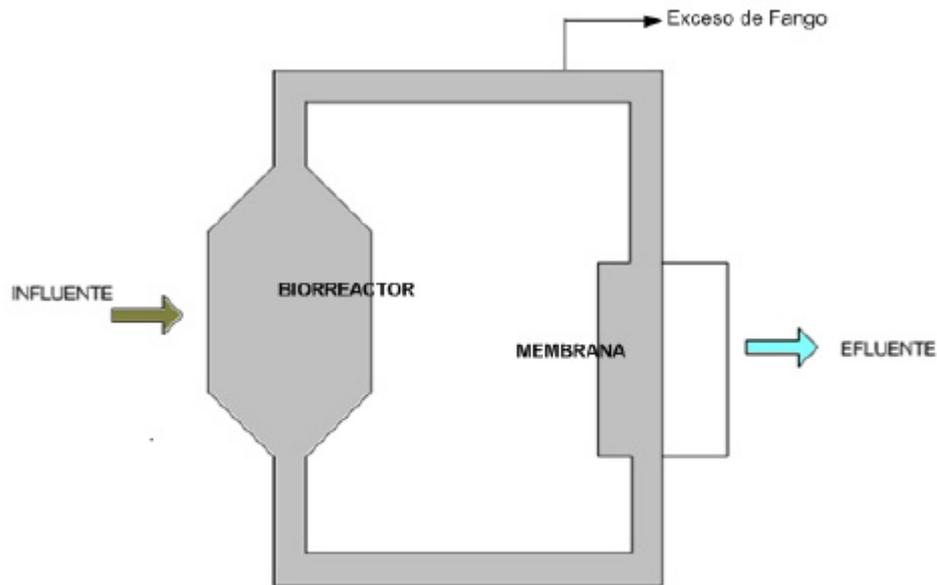
### **1.1.2. Fundamentos de los biorreactores de membrana (BRM)**

Los BRM, como ya hemos indicado, se basan en la utilización de membranas (microfiltración, ultrafiltración) para el proceso de separación sólido-líquido imprescindible tras un tratamiento biológico de fangos activos (Rosenberger *et al.*, 2002). Este tipo de tecnología está por tanto compuesta por dos partes principales, que son la unidad biológica responsable de la degradación de los compuestos presentes en el agua residual, y el módulo de membrana encargado de llevar a cabo la separación física del licor mezcla.

La figura 1.1 muestra la operación general de los BRM. El influente (agua a tratar) entra en el biorreactor, donde es puesto en contacto con la biomasa y donde se producen al igual que en el caso de los fangos activos, las reacciones biológicas que permiten la degradación de la materia orgánica.

Posteriormente, la mezcla es bombeada del biorreactor y luego, bajo presión, filtrada a través de la membrana. El agua filtrada es descargada del sistema, mientras que la biomasa es devuelta al biorreactor. El exceso de fango se bombea y se descarga con el fin de mantener una edad del fango constante.

Las membranas se limpian periódicamente, generalmente mediante lavado a contracorriente o retrolavado, y en algunas ocasiones mediante lavado químico o ambos.

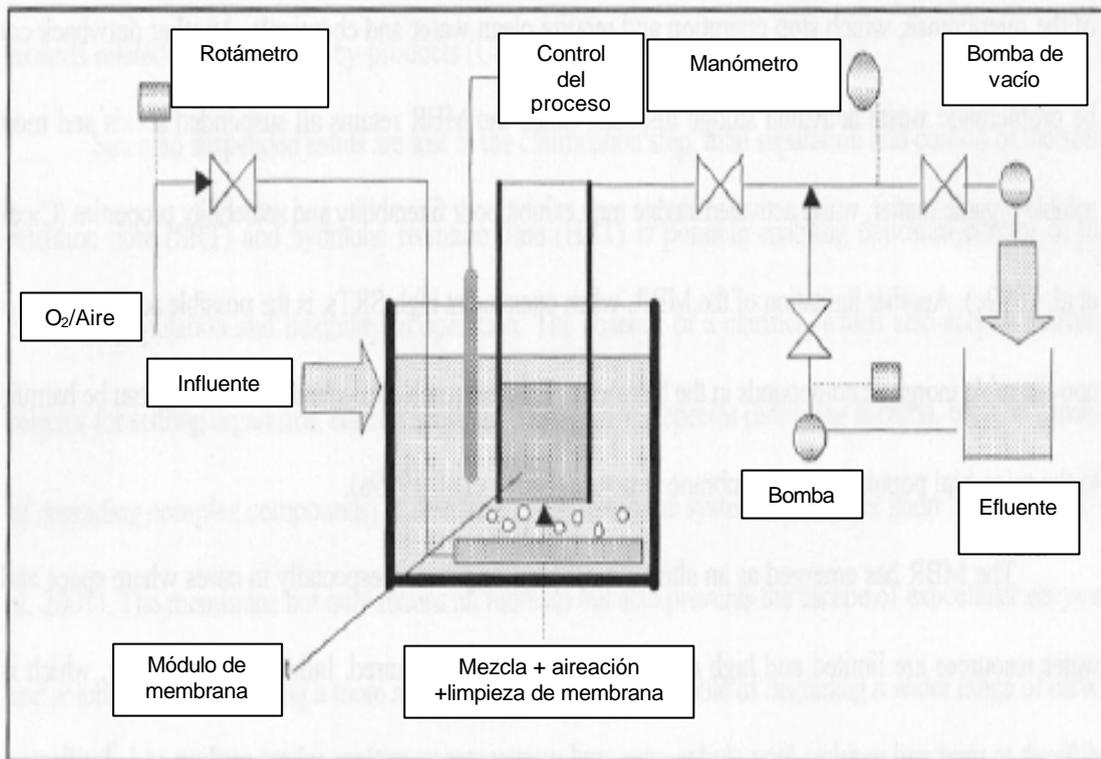


**Figura 1.1. Principio del biorreactor de membrana.**

Dependiendo del diseño, se distinguen dos tipos principales de BRM, que se diferencian fundamentalmente por la disposición de las membranas y por la tecnología utilizada para crear el gradiente de presión entre ambos lados de la misma (fuerza directriz):

Biorreactor con la membrana integrada o sumergida (BMS):

La unidad de membrana que realiza la separación física está inmersa en el tanque biológico. La fuerza impulsora a través de la membrana es alcanzada presurizando el biorreactor o creando presión negativa en el lado permeado de la membrana (Rosenberger *et al.*, 2002). Generalmente, se coloca un difusor de aire justo debajo del módulo de membrana para suministrar el aire necesario para homogeneizar el licor mezcla. Con esto también se consigue crear un régimen turbulento de aire en la capa límite de la membrana, que evita la formación de biopelícula que acaba por atorar la membrana. En la figura 1.2 se muestra un esquema de este tipo de biorreactor de membrana.



**Figura. 1.2. Esquema de un biorreactor de membrana sumergida (BMS).**

En los BMS la fuerza impulsora a través de la membrana es alcanzada presurizando el biorreactor, o bien creando presión negativa en el lado de permeado de la membrana, mediante la aspiración a través de la propia membrana.

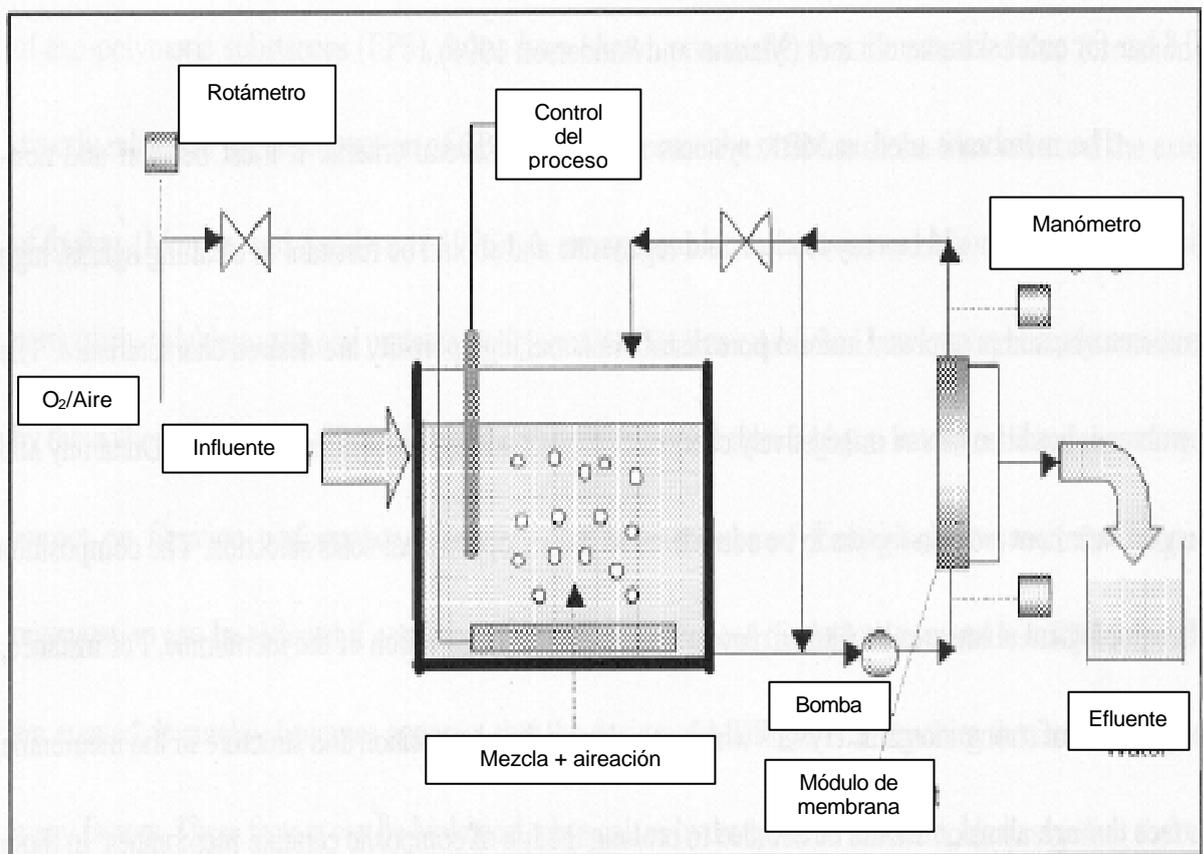
Además, en los BMS, la aireación del licor mixto es aprovechada además de para suministrar el oxígeno necesario para el proceso biológico, para reducir el ensuciamiento sobre la superficie de las membranas. Este ensuciamiento está muy influenciado por las condiciones hidrodinámicas de operación del sistema, como el flujo de permeado, la velocidad de aireación y la concentración de sólidos.

#### Biorreactor con la membrana externa o con recirculación:

En este tipo de biorreactor de membrana, la membrana se encuentra fuera del reactor biológico, y el licor mezcla se recircula desde el biorreactor hasta el módulo de

membrana. El sistema de funcionamiento es el mismo que en el descrito anteriormente. En la figura 1.3 se muestra un esquema de este tipo de biorreactor.

En los BRM con bucle externo, la fuerza impulsora es la presión creada por la alta velocidad del flujo de recirculación a través de la superficie de la membrana (Manem y Sanderson, 1998).



**Figura 1.3. Esquema de un biorreactor con membrana externa.**

El funcionamiento de ambos tipos de diseño es importante, dado que harán variar las consideraciones de operación. En la Tabla 1.1 se comparan ambas configuraciones.

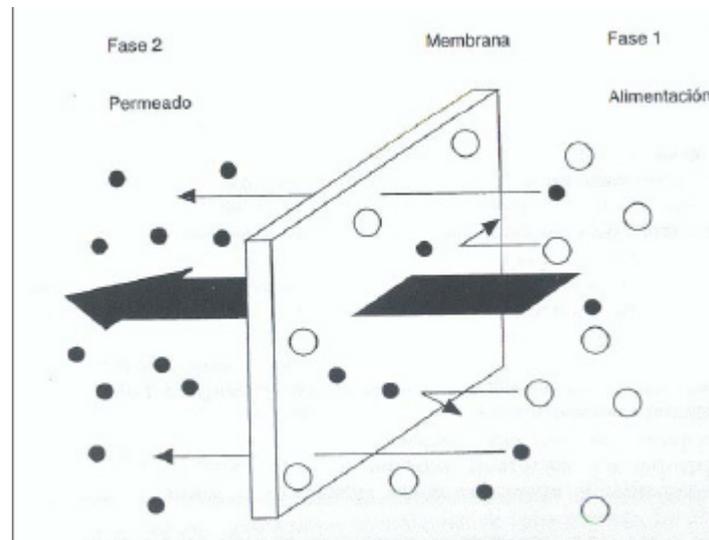
**Tabla 1.1. Comparación entre los BMS y los BRM con configuración exterior (Gander *et al.*, 2000, Stephenson *et al.*, 2000).**

<b>Membrana sumergida</b>	<b>Membrana externa</b>
Costes de aireación altos (90%)	Costes de aireación bajos (20%)
Costes de bombeo muy bajos	Costes de bombeo altos (60-80%)
Flujo bajo de operación (10-60 l/m <sup>2</sup> *h)	Flujo de alto operación (40-120 l/m <sup>2</sup> *h)
Frecuencia de limpieza baja	Requiere mayor frecuencia de limpieza
Costes de operación menores	Costes de operación elevados
Inversión inicial fuerte	Inversión inicial menor
Presiones transmembranales bajas (0.05-0.5 bar)	Presiones transmembranales mayores (0.5-5 bar)

Los últimos desarrollos sobre tecnologías de membrana, que las han hecho menos costosas y más resistentes, unido a los menores requerimientos de presión y menor frecuencia de limpieza, han potenciado el uso a nivel mundial de los BMS.

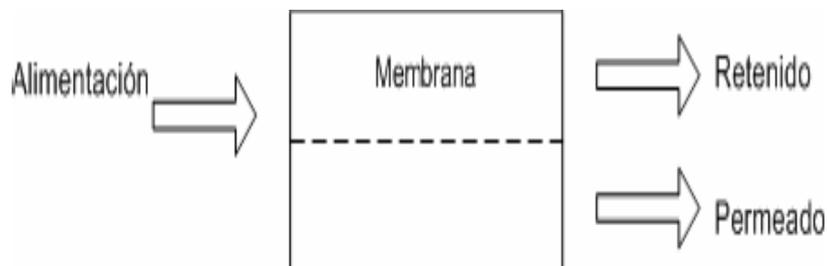
### 1.1.3. Clasificación de las membranas

Una membrana puede definirse como una delgada película que separa dos fases y actúa como barrera selectiva al transporte de materia, tal y como puede observarse en la figura 1.4. Estas membranas que permiten solamente el paso de algunas materias son conocidas como membranas semipermeables (Aptel y Buckley, 1998).



**Figura 1.4. Definición de membrana.**

Una operación de membrana puede definirse como una operación donde una corriente de alimentación está dividida en dos: un permeado, conteniendo el material que ha pasado a través de la membrana, y un retenido, conteniendo las especies que no la atraviesan (figura 1.5).



**Figura 1.5. Principio de una operación de membrana.**

Como para todos los fenómenos de transporte, el flujo a través de la membrana puede describirse mediante la siguiente expresión:

$$\text{Flujo} = \text{Fuerza} \times \text{concentración} \times \text{movilidad}$$

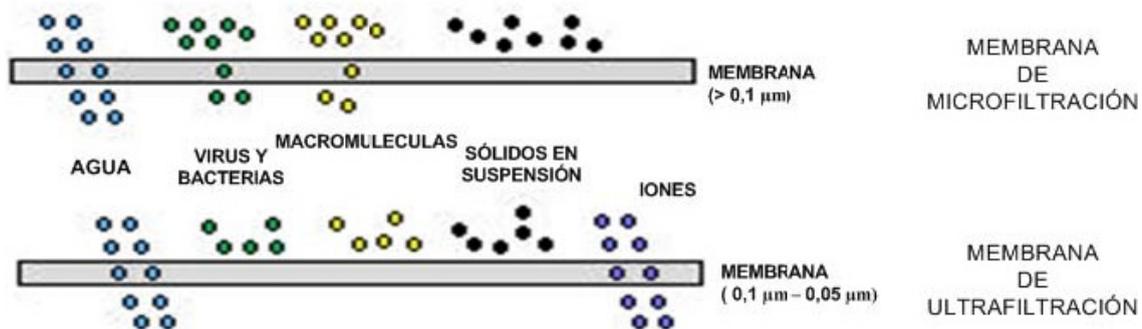
En el caso de los BRM, la fuerza directora o la fuerza actuante es una diferencia de presión a través de la membrana.

Las Membranas de Microfiltración (MF) tienen tamaños de poro de  $0,1 \mu\text{m}$  o mayores, y proporcionan una elevada eliminación de sólidos en suspensión, incluyendo la mayoría de bacterias, así como la eliminación parcial de virus y macromoléculas. La presión de trabajo se mantiene baja y similar a la de las membranas de ultrafiltración.

Las Membranas de Ultrafiltración (UF) tienen tamaños de poro que van desde  $0,1 \mu\text{m}$  hasta menos de  $5 \text{ nm}$  ( $0,05 \mu\text{m}$ ). Este tipo de membranas suelen permitir el rechazo de macromoléculas, todo tipo de microorganismos como virus y bacterias, y otros tipos de partículas. La presión de trabajo se mantiene baja ( $50$  a  $500 \text{ KPa}$ ).

Las Membranas de Nanofiltración (NF) tienen poros de un tamaño inferior a  $0,01 \mu\text{m}$ , lo que permite la eliminación de la mayoría de las especies, excepto de ciertos iones monovalentes y moléculas de bajo peso molecular. Este tipo de membranas raramente son utilizadas en BRM, debido a su alta resistencia hidráulica (Fane y Chang, 2002), pero pueden ser de interés en muchos otros procesos, como el ablandamiento del agua por membranas (eliminación de iones polivalentes de calcio y magnesio del agua).

En la figura 1.6 se muestra un pequeño resumen de los dos tipos de membranas empleados principalmente en los BRM.



**Figura 1.6. Membranas de MF y UF**

#### 1.1.4. Composiciones y configuraciones de las membranas

La composición del agua residual es muy importante a la hora de elegir el tipo de membrana a usar en un BRM. Una mala elección en la composición de la membrana puede hacer que ésta se estropee antes. Así, por ejemplo, en aguas con muchos cristales orgánicos se producen fuertes abrasiones en membranas cerámicas acortando su vida media; para este tipo de aguas residuales convendría más una membrana orgánica.

Para obtener un rendimiento óptimo, las membranas usadas en el BRM deben cumplir una serie de requisitos indispensables (Manem y Sanderson, 1998):

- Deben ser inertes y no biodegradables.
- Deben ser resistentes a las sustancias químicas utilizadas para su limpieza, a altas presiones y elevadas temperaturas.
- La distribución de los poros ha de ser uniforme y la porosidad elevada, ya que así se consigue un mejor rendimiento de filtración.
- Las membranas tiene que ser neutras o bien tener una carga negativa para evitar la adsorción de los microorganismos, y preferiblemente hidrófilas.
- Deben tener una alta vida media para que sean rentables.

Se han usado varios tipos de membrana en el proceso BMS (Visvanathan *et al.*, 2000):

- Atendiendo a la geometría que presenta la membrana, podemos encontrarnos módulos de membranas planas o cilíndricas, y dentro de estas tubulares, de disco rotatorio o de fibra hueca.
- Atendiendo a la composición de las membranas, éstas pueden ser de naturaleza orgánica o inorgánica:
  - Orgánicas: la capa activa puede estar constituida por un polímero o copolímero hidrófilo (poliamidas, poliacrilnitrilo) o hidrófobo (polietileno, polifluoruro de venildeno, politetrafluoretileno, policarbonato isopropileno)
  - Inorgánica: suelen estar constituidas de cerámicas fundamentalmente.

- Atendiendo al mecanismo de separación, se pueden clasificar según el poro de la membrana (porosas, y las no porosas o densas), o según la diferencia de solubilidad y difusividad de los materiales en la membrana.
- Atendiendo a su morfología, se distinguen las membranas isotrópicas y las anisotrópicas (asimétricas y mixtas).

Los sistemas de membranas más usados son los siguientes:

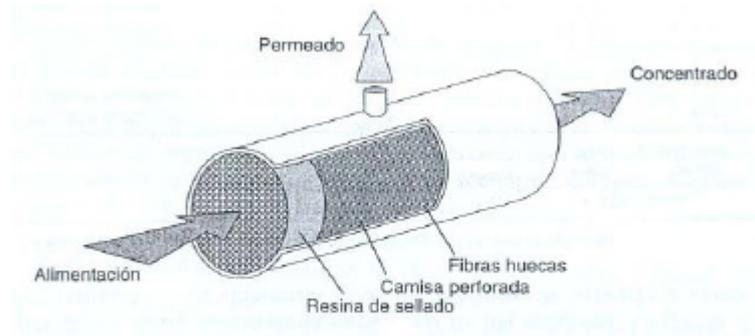
- Sistemas de membranas tubulares
- Sistemas de membrana *Hollow-fiber* (fibra hueca)
- Sistema de *Spiral-wound*
- Sistema de *Plate and Frame*

A continuación se detalla el sistema utilizado en este estudio:

### Sistemas de membrana *Hollow-fiber* (fibra hueca)

Generalmente, se utiliza en aplicaciones de purificación de agua de baja concentración de sólidos. Los elementos de filtración consisten en fibras que pueden ser presurizadas en el interior. La alimentación se introduce en la terminal de fibra. El permeado se filtra a través de la fibra y fluye hacia fuera del contenedor. El material retenido pasa a través del final de la fibra. Estas membranas son más susceptibles de contaminarse y colmatarse. Debido al diámetro interior muy pequeño de las fibras de la membrana, que está entre 0,5 y 1 mm, las partículas grandes y las altas concentraciones de sólidos no pueden procesarse eficientemente en estas membranas. Si son fabricadas de poliéster sulfona, las unidades de membrana pueden esterilizarse con agua a más de 100°C a presión.

Para compensarse el ensuciamiento de las membranas pueden retrolavarse periódicamente. Sin embargo, el fluido de retrolavado debe estar filtrado, para eliminar las partículas que tapen o dañen la pared de la fibra porosa (Hontoria *et al.*, 2003). En la figura 1.7 se observa este tipo de configuración.



**Figura 1.7. Módulo de Fibra hueca (Aptel y Buckley, 1998)**

Las fibras están reunidas en un haz de varios miles, incluso millones. El flujo de alimentación tiene lugar por dentro de las fibras (configuración de dentro – fuera) o bien por fuera de las fibras (configuración exterior – interior). En la configuración dentro – fuera (Figura 1.8), la alimentación ingresa al interior de la membrana y el permeado se obtiene al pasar del interior de la membrana al exterior. En este caso, la hermeticidad del agua entre flujos de alimentación y el permeado viene asegurada por una resina, que forma un plato plano en cada final del haz. Después del endurecimiento de esta resina, el haz se corta de tal manera que los extremos de las fibras aparezcan abiertos.



**Figura 1.8. Configuración de Fibra hueca dentro-fuera**

En la configuración exterior – interior o fuera – dentro (Figura 1.9), la alimentación viene por fuera de la membrana y el permeado se obtiene al pasar del exterior al interior de la fibra (lumen). Además, en esta última configuración, el haz tubular se dispone a menudo en forma de U y las fibras se sellan sólo por un lado o final.



**Figura 1.9. Configuración de fibra hueca fuera-dentro.**

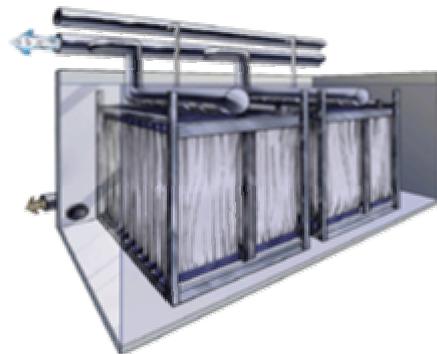
El diseño de los módulos también determina otras características como la demanda de energía, la capacidad para separar los sólidos en suspensión, la facilidad para limpiarlos y reemplazarlos, la densidad de empaquetamiento, entre otros.

En la figura 1.10 (a y b) se muestran membranas de fibra hueca de la casa comercial Zenon de Canadá.

a.



b.



**Figura 1.10. BRM sumergido. A y b. Membranas de Fibra Hueca (Zenon)**  
[http://www.zenonenv.com/inter/Spain/spain\\_index.html](http://www.zenonenv.com/inter/Spain/spain_index.html)

Como se ha comentado con anterioridad, en los BRM, las membranas pueden encontrarse bien sumergidas en el tanque de aireación, bien en un circuito exterior. Este hecho también influirá en la utilización de un tipo de módulo u otro, si bien es cierto que los desarrollos más recientes de BMR se basan en una configuración sumergida, por ello se requiere un módulo que pueda eliminar los sólidos en suspensión, tenga una demanda de energía relativamente baja, y una alta densidad compacta. Estos requerimientos tienden a excluir los módulos tubulares y espirales, pero sugieren el uso de membranas de placa plana o fibra hueca.

Los módulos se diseñan, por lo tanto, para alcanzar tres objetivos esenciales:

- Asegurar a nivel de membrana una circulación suficiente del fluido que va a ser tratado, para limitar los fenómenos de concentración, polarización y depósito de partículas.
- Producir un módulo compacto, por ejemplo, uno que provea máxima superficie de intercambio por unidad de volumen (máxima densidad compacta).
- Evitar cualquier fuga entre los compartimentos de alimentación y permeado.

Los dos primeros tienden a reducir el coste del módulo para producir un volumen determinado de fluido tratado, pero también tienden a aumentar el coste energético de la separación: alta velocidad de circulación y pequeñas secciones de paso producirán una gran pérdida de carga.

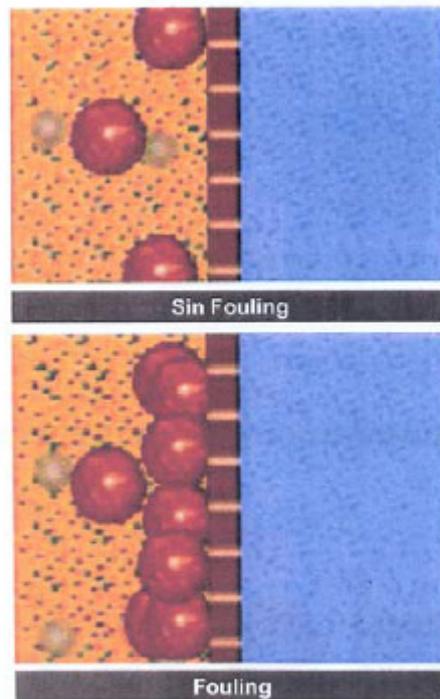
El tercer objetivo puede parecer trivial, pero en la práctica la mayoría de los problemas que ocurren provienen de una fuga debida a un ensamblaje defectuoso, y no a fallos de las membranas (Aptel y Buckley, 1998)

### **1.1.5. *Fouling***

#### **1.1.5.1. Introducción**

*Fouling* es el término dado a la disminución de la capacidad de filtración en la membrana debido a la gran cantidad de partículas presentes en el agua residual. Esto

ocurre por la adsorción (deposición) o intrusión de estas partículas en los poros de la membrana (ver Figura 1.11).



**Figura 1.11 *Fouling* (HERA Amasa, 2004)**

La presencia de estas partículas (sólidos en suspensión y materia disuelta) tiene una gran importancia sobre el flujo de permeado. Una primera disminución del flujo de permeado viene causada por la concentración-polarización, este término se utiliza para describir la tendencia del soluto a acumularse en la membrana. A medida que el permeado atraviesa la membrana, los solutos que contenía se quedan en las proximidades de su superficie, este soluto forma una capa de líquido estancado cuya velocidad tiende a cero.

La presencia de sustancias disueltas en el agua residual puede causar una acumulación de solutos en el lado del retenido de la membrana. Por otro lado, los

sólidos en suspensión son transportados hacia la superficie de la membrana formando una capa que reducirá la permeabilidad hidráulica y el flujo de permeado.

El *fouling* puede ser de dos formas reversible e irreversible. El *fouling* irreversible es el producido por las partículas que penetran en la membrana y quedan retenidas en ella, produciendo una disminución del flujo que no es posible aumentar con lavados físicos de la membrana, y generalmente es parcialmente eliminado bajo regímenes de limpieza con agentes químicos. Mientras que el *fouling* reversible es el formado por la deposición de partículas sobre la superficie de la membrana, pudiendo ser eliminado mediante protocolos de limpieza físicos.

### **1.1.5.2. Factores que afectan al *fouling*:**

Los tres factores principales que afectan al *fouling* son: las características de la membrana, la biomasa, las condiciones de operación.

- Membrana: la configuración, el material, la hidrofobicidad, la porosidad y el tamaño del poro.
- Biomasa: los sólidos suspendidos del licor mezcla (MLSS), la sustancia polimérica extracelular (EPS), el tamaño de los flóculos, y la materia disuelta.
- Condiciones de operación: el flujo cruzado, la aireación, el tiempo de retención celular (TRC), el tiempo de retención hidráulico (TRH), y la presión transmembrana.

-

### **1.1.5.3. Reducción del *fouling***

El *fouling* puede reducirse de tres formas:

- Eliminación de las partículas causantes del *fouling* por medio de un pretratamiento o tratamiento *in situ*.
- Provocar la turbulencia en las membranas.
- Reducir el flujo.

Todas estas operaciones generan costes adicionales al proceso, la operación de generar la turbulencia genera un coste operacional, las operaciones de eliminación de partículas y reducción del flujo generan coste en la inversión. Es esencial optimizar el sistema para eliminar el *fouling*, o reducir los problemas producidos por él sin que esto genere costes excesivos (Stephenson *et al.*, 2000).

En los BRM, no es viable eliminar las partículas causantes del *fouling* por medio de un pretratamiento, debido a que estas constituyen una carga importante de materia orgánica necesaria para el tratamiento biológico (Stephenson *et al.*, 2000).

De las dos operaciones restantes, la generación de turbulencia mediante el sistema de aireación es la forma más propia de los BRM. Por otro, la reducción del flujo, es la técnica utilizada por los BMS, ya que reducir el flujo conlleva operar con PTM inferiores, lo que provoca un menor ensuciamiento de las membranas.

### **1.1.6. Limpieza de las membranas**

Para prevenir la continua acumulación de sólidos sobre la superficie de la membrana, se lleva a cabo el retrolavado (o *backwashing*) de la membrana. El procedimiento del retrolavado es el siguiente: durante el ciclo del proceso de filtración la bomba de succión puede aspirar el agua depurada del interior de la membrana. De esta agua tratada una pequeña parte se almacenará en un depósito (depósito de permeado) para que luego pueda ser utilizada para el retrolavado.

La frecuencia de limpieza dependerá de las condiciones de operación (tiempo de operación, características del agua de alimentación, del flujo de permeado, entre otros). Por lo tanto, el retrolavado es un proceso completamente autocrítico. Para la mayoría de los casos, el retrolavado tiene lugar cada 30-60 minutos de trabajo, se hace durar un tiempo de 1 a 3 minutos (Buckley y Jacangelo, 1998) y se sucede de forma continua cuando el sistema se encuentra en funcionamiento. Si el retrolavado es insuficiente para restaurar el caudal, entonces se lleva a cabo la limpieza química de las membranas. Después de la limpieza química, se alcanza una parcial o plena restauración del caudal (o presión) a través de la membrana. La limpieza química de

las membranas es requerida cada vez que el flujo de permeado disminuye un 20% respecto al original (ACA, 2003), esto viene a ser en la mayoría de los casos una vez cada 3-6 meses (Till y Mallia, 2001). Se utiliza, normalmente, hipoclorito de sodio (NaOCl), aunque es común que se utilicen limpiadores alcalinos para la eliminación del *fouling* orgánico, mientras que la limpieza ácida es requerida para asegurar la eliminación de precipitados inorgánicos.

La limpieza química de las membranas se realiza parando el flujo de alimentación. Ahora bien, parar el flujo de alimentación no implica parar toda la planta, ya que normalmente las plantas de tratamiento de aguas residuales con BRM constan de al menos dos tanques de membranas independientes. Así, cuando en uno de los tanques es requerida la limpieza química de las membranas, se para la alimentación de ese tanque, mientras los otros siguen realizando el ciclo normal de filtración del agua residual.

Llegados a este punto, es importante destacar que una vez se detecte que las membranas están sucias, éstas deben ser limpiadas ya que si una membrana sucia continua trabajando, su deterioro puede ser irreversible haciendo, entonces, necesario el reemplazo de la misma, lo que supone aumentar los costes de inversión y mantenimiento de la planta. Por lo tanto, los costes operacionales se ven significativamente afectados en función de la frecuencia en que las membranas necesiten ser substituidas. Generalmente, las membranas cerámicas duran más (~10 - 15 años) que las poliméricas (~3 - 5 años) ([www.usfilter.com](http://www.usfilter.com)) que son más baratas (una membrana polimérica puede tener un coste de 50-100 €, mientras que una cerámica puede duplicarlo, 200 - 500 € ([www.sterlitech.com](http://www.sterlitech.com))). Pero la diferencia sustancial en el coste de los materiales de las membranas puede compensar el coste de sustitución, haciendo que sea equivalente en los dos sistemas: alrededor del 30% a primera instancia, según Gander *et al.*, (2000).

Cabe destacar finalmente, que durante el reemplazo o inspección de las membranas por lo general, no es necesario parar todo el sistema de biorreactores de membranas, únicamente el tanque de membranas donde se encuentren las membranas a sustituir.

### 1.1.7. MBR anaeróbicos versus MBR aeróbicos:

Los MBR anaeróbicos han sido menos estudiados en comparación con los MBR aeróbicos. Los MBR anaeróbicos son adecuados para el tratamiento de ARUs que contienen principalmente sustancias solubles y biodegradables (Harada, *et al.*, 1994).

Las principales ventajas de los MBR anaeróbicos son la posibilidad de recuperar energía gracias al biogás generado y la baja producción de fangos. Sin embargo presentan una baja tasa de crecimiento de microorganismos, por lo que necesitan tiempos de retención más largos que los MBR aeróbicos para alcanzar la misma efectividad en la depuración. La mayoría de los MBRs anaeróbicos tienen el módulo de membrana externo, por lo que necesitan una alta tasa de recirculación. (Baek *et al.*, 2003)

El principal problema de estos sistemas es el *fouling* generado por las sustancias orgánicas e inorgánicas, debido a su configuración sin aporte de aire en el módulo de membrana, eso afecta a la efectividad del sistema y aumenta los costes de operación (Berube *et al.*, 2004). La mayoría de los MBR aeróbicos trabajan con membranas sumergidas. Este sistema es más costoso debido al aporte de aire.

### 1.1.8. Sistemas comerciales de BRM

No todos los BRM implantados alrededor del mundo poseen las mismas características ni parámetros de operación y diseño. Esto es debido fundamentalmente a dos aspectos. Primeramente, y como en el caso de la mayoría de los tratamientos de agua residual, los parámetros de operación y diseño de la planta dependerán de la calidad que deba obtenerse del efluente, y de la cantidad y tipo de contaminantes del afluente. Y en segundo lugar, dependerán del tipo de BRM comercial empleado. En este capítulo se citarán algunos de los BRM comerciales más conocidos y con mayor experiencia en esta tecnología alrededor de todo el mundo.

De los seis biorreactores de membranas citados en este apartado, cinco son aerobios y uno anaerobio. Los tratamientos anaeróbicos de las aguas residuales se han

aplicado principalmente para el tratamiento de efluentes industriales, especialmente aquellos con alto nivel de productos que fermentan fácilmente. A pesar de las obvias ventajas, por ejemplo, producción de energía aprovechable y de menos fango, tanto el desarrollo como el uso de los procesos anaerobios han estado abandonados en cierta medida, principalmente debido al largo tiempo de retención de la biomasa requerido para mantener las bacterias metanogénicas de crecimiento lento. Sin embargo, debido a esta capacidad de retener metanógenos y a la alta calidad resultante del efluente, los BRM anaeróbicos han suscitado un cierto interés para algunos fabricantes (Manem y Sanderson, 1998).

Además se consideró que los BRM podían tener unidades de membranas sumergidas en el biorreactor o bien externas a éste; cuatro de las compañías comerciales tienen unidades de membranas externas al biorreactor, mientras que las dos restantes y más conocidas (Zenon y Kubota) tienen unidades de membranas sumergidas. Todos estos aspectos pueden ser observados en la Tabla 8.1. Cabe destacar que todos los BRM anaerobios presentan configuración en bucle externo, ya que la falta de aire en el reactor implica que para disminuir el *fouling* es necesaria la recirculación del agua mediante una bomba. Los biorreactores de membranas externas tienden además a funcionar con velocidades de flujo cruzado, presiones transmembranales y flujo de permeado mayores en comparación con las unidades de membranas sumergidos.

En la tabla 1.2 se muestran diferentes tipos de biorreactores de membrana de diferentes casas comerciales.

**Tabla 1.2. Tipos de biorreactores de membranas comerciales (Stephenson *et al.*, 2000)**

Casa Comercial	Biorreactor	Tipo	Membrana	Flujo Permeado (l/m <sup>2</sup> *h)
Kubota (Japón)	Aerobio	Sumergido	Placa Plana	25
Zenon (Canadá)	Aerobio	Sumergido	Fibra Hueca	30
Orelis (Japón)	Aerobio	Bucle Externo	Placa Plana	100
USF (Australia)	Aerobio	Bucle Externo	Tubular	40
Membratex (Sur África)	Anaerobio	Bucle Externo	Tubular	40
Wehrle Werk (Alemania)	Aerobio	Bucle Externo	Tubular	100

Además de las ya citadas, existen otras compañías que trabajan con BMR y los comercializan, como son: Rhodia Pleiade (Francia), Millenniumpore (UK), Degremont (Francia), Koch Membrana System (UK), Millipore (USA), entre otras.

## 1.2. Características biológicas de un BMS

### 1.2.1. Proceso biológico de un BMS:

El proceso biológico está diseñado para la eliminación de la materia orgánica presente en el agua residual. En este proceso están implicados una gran variedad de microorganismos. El papel de estos microorganismos incluye la conversión de los compuestos orgánicos solubles y particulados en biomasa y gases, la generación de productos de deshecho, y la conversión del amonio a nitrato (nitrificación) y el nitrato a nitrógeno gas (desnitrificación) (Stephenson *et al.*, 2000).

### **1.2.1.1. Proceso de Fangos activos:**

Los BMS funcionan de la misma forma que los fangos activos, pero sustituyen el decantador secundario por una membrana de UF o MF (Merlo *et al.*, 2000)

El proceso de fangos activos fue desarrollado por Clark y Gage en 1913 en la estación experimental de Lawrence en Massachusetts, y posteriormente en Inglaterra en 1914 por Arden y Lockett. Su nombre proviene de la producción de una masa activada de microorganismos capaz de estabilizar un residuo por vía aerobia. En la actualidad, existen muchas versiones del proceso original, pero son todas fundamentalmente iguales.

En los fangos activos, el residuo orgánico se introduce en un reactor, donde se mantiene un cultivo bacteriano aerobio en suspensión. El contenido del reactor se conoce con el nombre de "licor mezcla". El ambiente aerobio en el reactor se consigue mediante el uso de difusores o de aireadores mecánicos, que también sirven para mantener el licor mezcla en estado de mezcla completa. Al cabo de un periodo determinado de tiempo, la mezcla de las nuevas células con las viejas se conduce hasta un tanque de sedimentación para su separación del agua residual tratada. Una parte de las células sedimentadas se recircula para mantener en el reactor la concentración de células deseada, mientras que la otra parte se purga del sistema. La fracción purgada corresponde al crecimiento de masa celular, asociado a un agua residual determinada.

La principal restricción de los fangos activos es la limitación del proceso de sedimentación y consecuentemente el mantenimiento de la concentración de biomasa. Los BMS presentan muchas ventajas sobre los fangos activos, de la cual la más obvia es la calidad del efluente. Ciceck *et al.*, (1999) demostraron la mayor eficacia de estos sistemas en la degradación de la materia orgánica respecto a los fangos activos.

### 1.2.1.2. Eliminación de nutrientes.

La eliminación de nutrientes (compuestos de fósforo y nitrógeno) de las aguas residuales es una operación importante, debido a que estos productos juegan un papel crítico, sobre todo en la eutrofización de los lagos.

#### Eliminación de nitrógeno mediante procesos biológicos.

El tratamiento biológico convencional de aguas residuales urbanas está dirigido habitualmente a la biodegradación de la materia orgánica. Sin embargo en algunos casos se requiere que la concentración de nitrógeno amoniacal en el cauce receptor sea baja, debido a que el nitrógeno, junto con el fósforo, juega un papel importante en el proceso de eutrofización. Para el caso de las aguas potables, la presencia de  $\text{N-NH}_4^+$  en un agua residual conduce a la formación de cloraminas y tricloruro de nitrógeno por reacción con el cloro utilizado como desinfectante. Como estos compuestos tienen un poder desinfectante considerablemente inferior al del propio cloro, esta situación resulta indeseable. Más aún, las cloraminas y el tricloruro de nitrógeno pueden ser responsables de olores desagradables en las aguas residuales. Además el  $\text{N-NH}_4^+$  presente en las aguas residuales, es tóxico para la vida acuática. Conforme las reglamentaciones ambientales se hacen más estrictas, se hace más necesaria la eliminación de los compuestos nitrogenados de las aguas residuales con objeto de cumplir los estándares de calidad del efluente.

Para conseguir la eliminación de nitrógeno amoniacal es necesario la presencia en el proceso biológico de microorganismos específicos (nitrificantes) dando lugar a los procesos de nitrificación. Estos procesos producen nitratos, que también pueden ser perjudiciales para el cauce receptor, puesto que potencian su eutrofización. En orden a la eliminación de nitratos surge el proceso de desnitrificación, que combinado con la nitrificación da lugar a los procesos denominados de Nitrificación-Desnitrificación.

- Fase de nitrificación:

La nitrificación es el proceso biológico por el cual el nitrógeno amoniacal es transformado en nitratos a través de dos etapas mediadas por diferentes grupos de microorganismos (Larrea, 2002).

Durante la nitrificación, el  $\text{NH}_4^+$  se oxidan a  $\text{NO}_2^-$  (fase I) y este posteriormente se oxida a  $\text{NO}_3^-$  (fase II). Este proceso parece estar limitado a un número restringido de bacterias autotrofas (Focht y Verstraete, 1977; Hooper, 1990) y arqueobacterias (Prosser, 2007). Solo algunos microorganismos heterótrofos, como algunas bacterias (*Arthrobacter*) y algunos hongos (*Aspergillus*), contribuyen en algún grado a la nitrificación (Atlas y Bartha, 2001), si bien esta nitrificación heterotrófica no parece que tenga un papel destacado en la conversión de amonio a nitrito y a nitrato (Atlas y Bartha, 2001). La existencia de arqueobacterias oxidadoras de amonio ha sido descrita muy recientemente, y aunque ya hay evidencias de la presencia de estos organismos en números significativos incluso en ambientes no extremos, aún no es posible evaluar la magnitud de la contribución global de estos organismos al proceso de nitrificación (Prosser, 2007). La tabla 1.3 indica los distintos géneros de bacterias nitrificantes fase 1 y 2 que se han descrito hasta la fecha.

**Tabla 1.3. Especies bacterianas nitrificantes fase 1 y 2. (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2005; Bases de datos on-line del National Centre for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Taxonomy Browser)**

Clase	Genero	Especie
NITRIFICANTES FASE 1		
Betaproteobacteria	Nitrosomonas	<i>N. europaea</i> (Skerman <i>et al.</i> , 1980)
Betaproteobacteria	Nitrosomonas	<i>N. aestuarii</i> (Koops <i>et al.</i> , 1991)
Betaproteobacteria	Nitrosomonas	<i>N. communis</i> (Koops <i>et al.</i> , 1991)
Betaproteobacteria	Nitrosomonas	<i>N. eutropha</i> (Koops <i>et al.</i> , 1991)
Betaproteobacteria	Nitrosomonas	<i>N. halophila</i> (Sorokin <i>et al.</i> 2002)
Betaproteobacteria	Nitrosomonas	<i>N. marina</i> (Koops <i>et al.</i> , 1991)
Betaproteobacteria	Nitrosomonas	<i>N. mobilis</i> (Koops <i>et al.</i> 1976)
Betaproteobacteria	Nitrosomonas	<i>N. nitrosa</i> (Koops <i>et al.</i> , 1991)
Betaproteobacteria	Nitrosomonas	<i>N. oligotropha</i> (Koops <i>et al.</i> , 1991)
Betaproteobacteria	Nitrosomonas	<i>N. ureae</i> (Koops <i>et al.</i> , 1991)
Betaproteobacteria	Nitrosomonas	<i>N. cryotolerans</i> (Jones <i>et al.</i> , 1988)
Betaproteobacteria	Nitrospira	<i>N. briensis</i> (Winogradsky y Winogradsky, 1933)
Betaproteobacteria	Nitrospira	<i>N. multiformis</i> (Watson <i>et al.</i> , 1971) *
Betaproteobacteria	Nitrospira	<i>N. tenuis</i> (Head <i>et al.</i> , 1995) *
Gammaproteobacteria	Nitrosococcus	<i>N. nitrosus</i> (Skerman <i>et al.</i> , 1980)
Gammaproteobacteria	Nitrosococcus	<i>N. oceani</i> (Kilian, 1998)
Gammaproteobacteria	Nitrosococcus	<i>N. halophilus</i> (Koops <i>et al.</i> , 1990)
NITRIFICANTES FASE 2		
Alphaproteobacteria	Nitrobacter	<i>N. alkalicus</i> (Sorokin <i>et al.</i> , 1999)
Alphaproteobacteria	Nitrobacter	<i>N. hamburguensis</i> (Bock <i>et al.</i> , 2001)
Alphaproteobacteria	Nitrobacter	<i>N. vulgaris</i> (Bock <i>et al.</i> , 2001)
Alphaproteobacteria	Nitrobacter	<i>N. winogradskyi</i> (Skerman <i>et al.</i> , 1980)
Deltaproteobacteria	Nitrospina	<i>N. gracilis</i> (Skerman <i>et al.</i> , 1980)
Nitrospira	Nitrospira	<i>N. marina</i> (Watson <i>et al.</i> , 1986)
Nitrospira	Nitrospira	<i>N. moscoviensis</i> (Erich <i>et al.</i> , 2001)
Gammaproteobacteria	Nitrococcus	<i>N. mobilis</i> (Skerman <i>et al.</i> , 1980)

\*Las especies de *Nitrospira*, *N. tenuis* y *N. multiformis* están validadas, sin embargo el Manual Bergey's en su edición más reciente (2005) ha decidido mantener sus denominaciones como géneros separados, *Nitrosovibrio tenuis* (Harms *et al.*, 1976), y *Nitrosolobus multiformis* (Watson *et al.*, 1971).

Estudios realizados con técnicas independientes de cultivo han revelado una mayor diversidad biológica, incluyendo representantes sin relación con las especies cultivables conocidas hasta la fecha. La relación evolutiva entre los distintos géneros de bacterias nitrificantes, incluyendo los *clusters* que aún carecen de organismos cultivados, se refleja en la figura. 1.12.

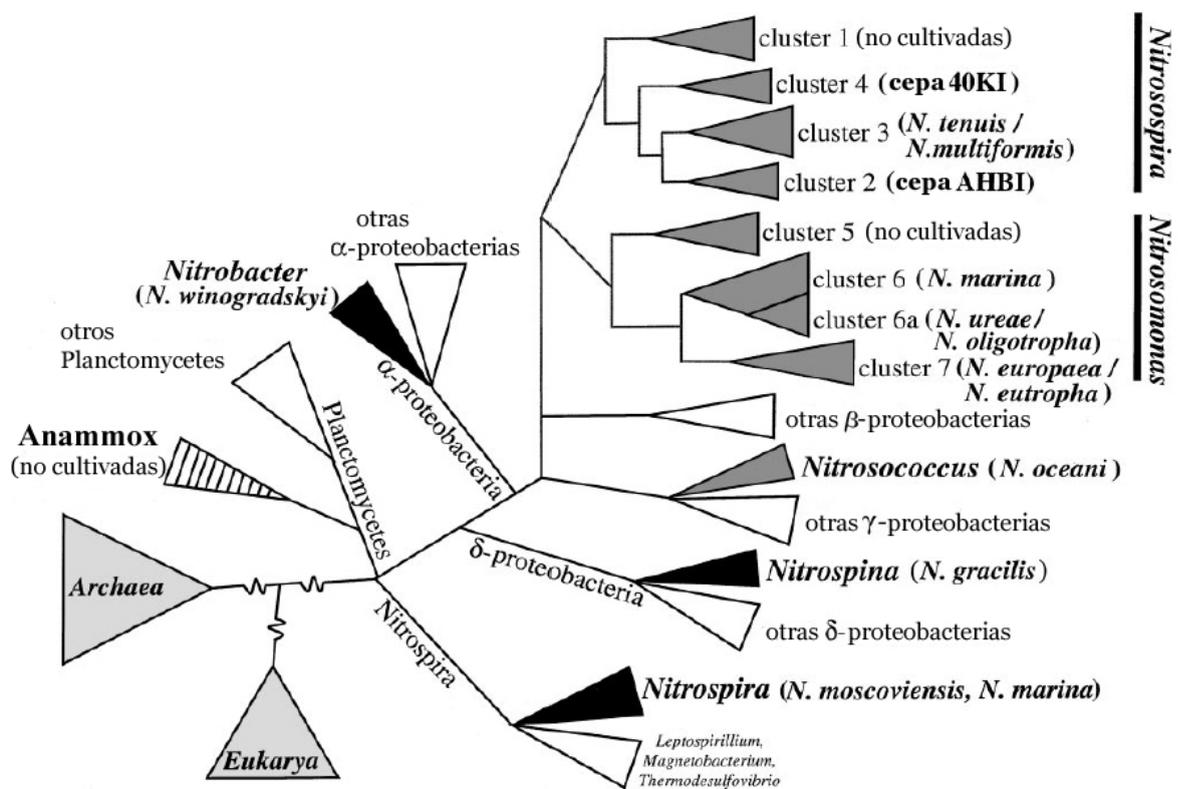
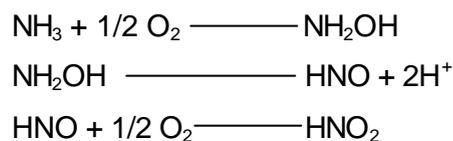


Fig. 1.12. Filogenia de las bacterias nitrificantes autotrofas, basada en la similitud de las secuencias del gen codificante del ARNr 16S. Las oxidadoras de amonio aeróbicas están representadas en color gris oscuro, las oxidadoras de nitrito en color negro, y las oxidadoras anaeróbicas de amonio (anammox) con trama rayada. Se nombran las especies o cepas representativas de cada grupo (*cluster*) de secuencias. Figura adaptada de Kowalchuk y Stephen (2001).

Las bacterias nitrificantes se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, y aunque son aerobias se pueden aislar en los sistemas de alcantarillado y sedimentos marinos, que tienen una extremadamente baja concentración de oxígeno disuelto. Se han aislado de suelos con pH 4, profundidades del océano donde la temperatura es menor de 5°C, y en desiertos donde se alcanzan más de 60°C (Atlas y Bartha, 2001). Se desarrollan muy bien en lagos y en corrientes de agua que reciben aportes de aguas residuales no depuradas (o incluso depuradas) (Madigan *et al.*, 1997).

Para oxidar amonio hasta nitrito (nitrificación fase 1), la bacteria realiza una sucesión de transformaciones por etapas catalizadas enzimáticamente (Payne, 1981):



En la primera reacción, el primer paso, oxidación de amonio a hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH), se cataliza por la enzima amonio-monooxigenasa, y el segundo paso, la oxidación de hidroxilamina a nitrito, se cataliza por la hidroxilamina oxidoreductasa, generándose protones que acidifican el medio. Estos son convertidos en agua por una oxidasa terminal que utiliza oxígeno atmosférico (Atlas y Bartha, 2001).

La reacción de oxidación de nitrito a nitrato (nitrificación fase 2) se ajusta a la siguiente ecuación.



La oxidación del nitrito es un proceso de un solo paso que produce solo una pequeña cantidad de energía (Gálvez, 2001). Las nitrificantes fase 2 requieren tres veces el sustrato necesitado por las nitrificantes fase 1 para obtener la misma cantidad de energía. Esto hace que la población de las primeras sea

menor, así, para la asimilación de 1 mol de  $\text{CO}_2$  deben ser oxidados unos 100 moles de nitrito, mientras que es suficiente la oxidación de 35 moles de amonio para alcanzar el mismo resultado (Atlas y Bartha, 2001; Hernández, 2001; Gálvez, 2001; Larrea, 2002). Por otro lado, la velocidad de la reacción para formar nitritos es sensiblemente menor a la formación de nitratos, aunque ambas ocurren rápidamente (Ossenbruggen *et al.*, 1996). Por ello la reacción global esta delimitada por la primera, con lo que el nitrógeno amoniacal es el sustrato limitante.

- Fase de desnitrificación:

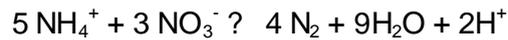
La desnitrificación es un proceso anaerobio en el que los nitritos y nitratos resultantes de la fase de nitrificación, se convierten en presencia de bacterias desnitrificantes (microorganismos facultativos heterótrofos) en nitrógeno gas y óxido de nitrógeno:



La desnitrificación está muy difundida en la naturaleza. Los desnitrificantes son un grupo común de Proteobacterias Gram-negativas como las *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, parococos y tiobacilos. Algunas bacterias Gram-positivas, como los *Bacillus*, pueden producir desnitrificación. Incluso unas pocas arqueobacterias halófilas, como las de la Clase *Halobacteria*, son capaces de desnitrificar. Todos los desnitrificantes son microorganismos quimiotrofos o heterotrofos anaerobios facultativos, lo que significa que alternan la respiración con  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NO}_2^-$  como aceptores de electrones, cuando el  $\text{O}_2$  llega a estar limitado (Rittmann y McCarty, 2001), produciendo principalmente  $\text{N}_2$  (Knowles, 1982; Prescott *et al.*, 1999; Atlas y Bartha, 2001).

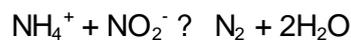
Mulder *et al.*, (1995) observaron pérdidas de amonio en un reactor anóxico desnitrificante que no podían justificarse mediante una cinética típica de desnitrificación. Esto llevó a pensar en un proceso ya postulado con

anterioridad por diversos autores (Winogradsky, 1890, Kluyver y Donker, 1926, Broda, 1977) y que consistía en la oxidación anaeróbica del amonio (anammox) mediante el empleo de nitrato:



Este proceso se había descrito con anterioridad en unas condiciones extremas de pH ácido y con altas concentraciones de amonio y nitrito (Van Cleemput y Baert, 1984). Sin embargo la posibilidad de realizarlo en las condiciones típicas de un proceso de desnitrificación de aguas residuales abría la puerta a su aplicación en la eliminación de nitrógeno de aguas contaminadas.

Estudios realizados por Van de Graff *et al.*, (1995) ponían de manifiesto que el proceso anammox era realizado por microorganismos, y que no solo era posible la oxidación del amonio desde nitrato, sino que también era posible esta oxidación mediante el uso del nitrito como aceptor de electrones. Jetten *et al.*, (1998) confirmaron que el aceptor de electrones preferido en el proceso anammox era el nitrito, de modo que un mol de nitrito y un mol de amonio reaccionan para dar lugar a un mol de nitrógeno molecular, identificando a la hidroxilamina y a la hidracina como importantes intermediarios del proceso (Van de Graff *et al.*, 1997).



El dióxido de carbono es la principal fuente de carbono de las bacterias anammox y en el proceso, parte del nitrógeno es transformado en nitrato, estimándose que la estequiometría del proceso es (Strous *et al.*, 1998):



Diversos planctomicetes capaces de realizar el proceso anammox han sido identificados en aguas naturales y marinas (Jetten *et al.*, 2003). Los microorganismos que efectúan este proceso son de crecimiento

extremadamente lento, no han podido ser obtenidos en cultivo puro hasta la fecha, y están sólo parcialmente caracterizados. Actualmente existen 3 candidatos a nuevos géneros, todos ellos filogenéticamente relacionados con el orden *Planctomycetales*: *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Kueneia*, y *Candidatus Scalindua* (Pynaert *et al.*, 2003, Schmid *et al.*, 2003). Todos ellos poseen un orgánulo específico en su citoplasma denominado anammoxoma que contiene las enzimas hidracina/hidroxilamina oxidoreductasa, responsables del catabolismo del proceso anammox. Este conjunto de bacterias pueden desarrollarse en ambientes tanto anaerobios como microaerobios, con la cooperación en este segundo caso de otros grupos bacterianos como los oxidadores de amonio. Esta asociación permite la transformación completa de amonio en nitrógeno gas en ambientes microaerobios (Jetten *et al.*, 2002).

Aunque la presencia de nitritos y nitratos en un efluente es menos cuestionable que la del nitrógeno amoniacal, se hace necesario disminuirlos si se aplican reglamentaciones estrictas para permitir la evacuación del efluente.

### **1.2.2. Biodiversidad y actividades enzimáticas:**

Los objetivos fundamentales del tratamiento biológico del agua residual son la coagulación y eliminación de los sólidos coloidales no sedimentables y la estabilización de la materia orgánica (Metcalf y Eddy, 2000).

La comunidad microbiana presente en el biorreactor de membrana sumergida (BMS) es parecida a la presente en los fangos activos, ya que se basa en un proceso similar. Es por ello por lo que la comprensión y conocimiento de las actividades bioquímicas y de la población microbiana que componen el fango activo es de vital importancia para entender el funcionamiento de estos sistemas y mejorarlos.

El fango activo del biorreactor se caracteriza por la formación de flóculos de microorganismos. Estos flóculos se mantienen en suspensión por aireación haciendo que el licor mezcla sea homogéneo. El lodo activo se compone de una gran variedad

de microorganismos procariotas y eucariotas: bacterias, protozoos, crustáceos, nematodos, rotíferos y bacteriófagos (Rittmann y McCarty, 2001).

Los flóculos del fango activo de los BMS se caracterizan por ser pequeños, con uniones débiles y abiertos, en comparación con los flóculos formados en los sistemas de fangos activos convencionales (Wei *et al.*, 2003)

Los estudios microscópicos realizados por Rosenberger *et al.* (2000) demostraron una alta presencia de células suspendidas libres y también ocasionalmente solían aparecer altas cantidades de bacterias filamentosas. En cambio el número de protozoos era bastante pequeño en comparación con el sistema convencional de fangos activos. Wei *et al.* (2003) también demostraron en sus estudios la ausencia de protozoos y metazoos en el fango activo de los sistemas de BMS. En general, las diferencias encontradas entre la estructura de la comunidad microbiana de los BMS y de los sistemas de fangos activos convencionales son minoritarias (Gao *et al.*, 2004). Sin embargo, los microorganismos están sometidos a condiciones muy diferentes en el BMS, principalmente debido al reciclado de la biomasa. Las bacterias se ven sometidas a un entorno limitado en sustratos que induce tasas de crecimiento lento y reduce el potencial respiratorio de los microorganismos, influenciando por tanto su actividad biológica y la composición de especies de la comunidad del fango activo (Konopka *et al.*, 1996; Konopka, 2000; Morgan *et al.*, 2002).

Para el estudio biológico de un sistema concreto y establecer cómo determinados factores modifican la eficiencia del mismo, el conocimiento de las comunidades microbianas que integran el sistema, así como los procesos biológicos que se dan en este ambiente, son necesarios y fundamentales. En este sentido, las técnicas de biología molecular y el estudio de las modificaciones de las actividades enzimáticas, son muy útiles.

### Concepto de filogenia y biodiversidad:

*Filogenia* es el nombre que se da al ordenamiento sistemático de especies en grupos mayores, basados en rasgos genéticos hereditarios. La filogenia se enraíza en el

concepto de evolución genética, que establece que cambios con aumentos en las secuencias de ADN cromosómico conducen gradualmente a especies nuevas. Para la comprensión moderna de la filogenia, es fundamental que todas las especies tengan un antepasado que haya evolucionado y constituya la raíz de un árbol filogenético (Rittmann y McCarty, 2001).

El término *biodiversidad* fue acuñado con la intención de englobar toda la diversidad que existe en la naturaleza. Su componente más básico es el número de especies presentes en una unidad geográfica arbitrariamente definida, es decir, la riqueza de especies (Begon *et al.*, 1999).

### Diversidad procariota en las aguas residuales:

Un trabajo publicado por Hugenholtz *et al.*, (1998), en el que los autores analizaron la presencia de los diferentes grupos filogenéticos bacterianos en estudios realizados en diferentes ambientes, nos proporciona una idea de la imagen que nos ofrece la biología molecular sobre la diversidad bacteriana en las aguas residuales. Los grupos bacterianos que se encuentran representados en un 75% en muestras de aguas residuales son: la subclase  $\alpha$ -*Proteobacteria*,  $\beta$ -*Proteobacteria*,  $\gamma$ -*Proteobacteria* y microorganismos Gram-positivos de la clase *Actinobacteria*. Además de estos, aparecen representados en menor número (entre un 25-75%) la subclase  $\delta$ -*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi* y *Planctomyces*. Ciertos grupos filogenéticos bacterianos tienden a predominar en determinados ambientes, e incluso podemos hablar de microorganismos o grupos filogenéticos característicos de un ambiente concreto.

Estudios realizados por Witzig *et al.*, (2002) revelan que el grupo predominante en la comunidad del fango de los BMS pertenece a la subclase  $\beta$ -proteobacteria. Este grupo es frecuente en habitats naturales y artificiales tales como fangos activos (Wagner, *et al.*, 1993, Manz, *et al.*, 1994). En cambio, aparecen en muy baja representación las bacterias Gram-positivas con alto contenido en G+C. El grupo más representativo tras las  $\beta$ -proteobacterias son las  $\alpha$ -proteobacterias y las  $\gamma$ -proteobacteria (Luxmy *et al.*, 2000).

Las bacterias del grupo de las oxidadoras de amonio tales como *Nitrosomonas* y *Nitrosospira* (Bacterias nitrificantes fase I) no aparecen altamente representadas, en cambio son bastante comunes en los sistemas de fangos activos comunes con actividad nitrificante (Wagner *et al.*, 1995). Las especies de *Nitrospira* (nitrificante fase II) están representadas en mayor número que *Nitrobacter*, siendo por lo tanto *Nitrospira* spp. más importante en el proceso de la oxidación del nitrito de los BMS (Witzig *et al.*, 2002, Schramm *et al.*, 1998).

A pesar de que haya una población característica en este tipo de sistemas, la estructura de la población microbiana de los BMS puede variar bastante dependiendo de diferentes condiciones de trabajo, sobre todo al variar las condiciones de limitación de nutrientes (Stamper *et al.*, 2003).

En los BMS anaeróbicos la subclase  $\beta$ -proteobacteria es dominante y en menor proporción están representadas las bacterias del grupo Gram-positivas con bajo contenido en G+C, las subclases  $\delta$ -proteobacteria y  $\epsilon$ -proteobacteria y miembros del cluster *Cytophaga-Flavobacterium* (Ahmed *et al.*, 2007).

### **1.2.2.1. Aplicaciones de las técnicas de biología molecular al estudio de la diversidad microbiana.**

Los conocimientos de la diversidad de los microorganismos procariotas y su papel en el mundo vivo son muy limitados, debido a que las técnicas microbiológicas tradicionales se basan en la observación microscópica y cultivo de los microorganismos en el laboratorio, que con el paso del tiempo se han mostrado insuficientes para su identificación y clasificación.

Debido a las particularidades de los microorganismos, como son su pequeño tamaño y simplicidad estructural, la clasificación basada enteramente en la observación de caracteres morfológicos es muy poco fiable. La clasificación en función de propiedades fisiológicas y bioquímicas es imposible, puesto que se estima que un 99% de la totalidad de los distintos microorganismos que existen en la naturaleza no ha sido jamás aislado ni cultivado en condiciones de laboratorio (Muyzer, 1999). Esto se debe en gran parte a la falta de conocimientos sobre los requerimientos reales de los

mismos en condiciones naturales, que nos impide emular estas condiciones en el laboratorio, así como al desconocimiento de posibles interdependencias entre organismos en sus hábitats naturales (Muyzer y Smalla, 1998). Por tanto, la diversidad procariota conocida representa sólo la punta de un iceberg, y en las últimas dos décadas se ha hecho manifiesta la necesidad de introducir nuevas técnicas que proporcionen el complemento necesario a los métodos microbiológicos tradicionales, para poder obtener información más precisa sobre la importancia de la diversidad bacteriana en el mantenimiento de los ecosistemas.

El desarrollo de la biología molecular ha permitido el estudio de la diversidad procariota desde un punto de vista diferente: el nivel genético. La taxonomía moderna tiende a agrupar los microorganismos en función de la similitud entre sus genes, que a la vez es un reflejo de su proximidad evolutiva (Woese, 1987). Hablando de modo general, los métodos de identificación a nivel de ADN generan una huella dactilar genética de los microorganismos que, de manera similar a un código de barras, resulta útil para su identificación y clasificación. Se han diseñado múltiples métodos agrupados en diferentes categorías, que difieren en su fundamento, poder de discriminación, rango taxonómico al que son aplicables, reproducibilidad y asequibilidad para su interpretación y estandarización (Vaneechoutte, 1996; Savelkoul *et al.*, 1999; Muyzer, 1999).

Una de las aproximaciones más extendida para estudiar la diversidad microbiana a nivel genético se basa en la clonación y secuenciación del gen ADN 16s, que codifica para la subunidad ribosómica bacteriana. Este gen cumple con los requisitos para actuar como una buena sonda evolutiva, al tratarse de un gen de distribución universal que posee una función constante y que cambia con suficiente lentitud como para permitir detectar relaciones muy antiguas y de un tamaño relativamente pequeño (1.5 kb) que ha facilitado su secuenciación, especialmente antes de la introducción generalizada de los métodos de secuenciación automática a partir de mediados de los años 90.

La secuencia del ADNr 16S tiene una estructura de mosaico, presentando una alternancia de regiones altamente conservadas en el reino procariota y regiones

hipervariables que sólo están conservadas entre los individuos evolutivamente muy próximos. Esa estructura ha permitido el diseño de cebadores universales para la aplicación de estrategias de PCR (Weisburgh y col., 1991), que posibilitan la clonación de fragmentos de los ADNr 16S de microorganismos a partir de ADN total extraído de muestras naturales, y de este modo profundizar en el conocimiento de la diversidad de las comunidades microbianas en los ecosistemas naturales (Muyzer y Smalla, 1998).

Una de las técnicas más avanzadas son los estudios de biodiversidad mediante electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) o desnaturalizante (DGGE). Esta técnica fue introducida 1993 por Muyzer *et al.*, y permite la separación de fragmentos de ADN de igual tamaño dependiendo de la composición en bases de los mismos, lo que equivale a decir que separa fragmentos de ADN de igual tamaño pero de distinta secuencia. El fundamento de la técnica se basa en la influencia de la composición de las bases de cada molécula de ADN en la temperatura a la cual dicha molécula se desnaturaliza (temperatura de fusión) y en la disminución de la velocidad electroforética de las moléculas de ADN de doble cadena cuando se encuentran parcialmente desnaturalizadas.

Cuando la electroforesis del ADN se realiza en geles de poliacrilamida bajo un gradiente lineal de temperaturas (TGGE), las moléculas con distinta secuencia se desnaturalizan a distintas temperaturas, y por tanto se detienen en su migración electroforética en distintas posiciones en el gel (Muyzer y Smalla, 1998 *Antonie van Leeuwenhoek* 73:127-141; Muyzer, 1999). La técnica es tan sensible que, mediante previa puesta a punto y ajuste de las condiciones, permite separar secuencias que difieran en un único par de bases.

Este sistema permite investigar la biodiversidad de poblaciones microbianas complejas, sin necesidad de aislar y estudiar individualmente sus componentes, mediante el aislamiento de un fragmento del gen codificante del ARN 16S (ADNr 16S) de los integrantes de la población objeto de estudio. Es una técnica de elección para la caracterización de poblaciones silvestres, en las que un porcentaje elevado de los microorganismos presentes pueden ser no cultivables. La técnica es de una gran versatilidad y admite numerosas variantes en su aplicación. Es posible el estudio de grupos concretos de microorganismos mediante el diseño de cebadores (*primers*)

específicos para amplificar el ADNr 16S de un determinado grupo microbiano (ej: bacterias filamentosas). También es posible diseñar cebadores para la amplificación de un gen exclusivo de un grupo microbiano de interés (ej: bacterias nitrificantes, desnitrificantes, etc). Aún más información puede obtenerse a partir de los patrones de TGGE mediante técnicas de hibridación posteriores, utilizando sondas de oligonucleótidos altamente específicas (Muyzer, 1999).

Los ecólogos microbianos no sólo quieren determinar la filogenia de los microorganismos, sino que también surge un gran interés por su morfología, localización, abundancia y actividad. Esto puede ser investigado mediante la técnica de FISH (hibridación *in situ* con fluorescencia) que utiliza sondas que se unen específicamente a determinadas regiones de moléculas de ARNr (DeLong *et al.*, 1989; Amann *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 2003).

La técnica de FISH utiliza sondas marcadas con fluorescencia para detectar ARNr 16S dentro de la célula. El grado de conservación de la secuencia marcada por la sonda determina la distancia filogenética del grupo de microorganismos. Pueden diseñarse sondas con dominios específicos para especies, géneros, familias y órdenes (Amann, *et al.*, 1995).

La principal ventaja de la técnica de FISH comparada con otras técnicas es que se puede determinar directamente la abundancia de los microorganismos detectados. Además, FISH ha sido aplicado a muchas muestras medioambientales dando muy buenos resultados (Amann *et al.*, 2001).

Esta técnica también presenta una serie de desventajas, como la ausencia de la señal con sondas específicas cuando realmente están presentes los microorganismos diana. Esto puede ser por varias limitaciones de la técnica como: el requerimiento de  $10^3$ - $10^4$  células/ml, para evitar esto se pueden filtrar las muestras acuáticas (Pernthaler *et al.*, 2002) o tratar la muestra con un paso de enriquecimiento para favorecer el crecimiento celular (Fang *et al.*, 2003). Otra limitación de esta técnica viene dada por la aparición de falsos negativos, debidos a la impermeabilidad de la sonda provocada por los pasos de fijación anteriores de la célula. La baja concentración de moléculas de ARNr es otra limitación para esta técnica.

### 1.2.2.2. Estudio de las actividades enzimáticas.

En los sistemas de fangos activos la eliminación de materia orgánica por oxidación biológica depende de la actividad de los microorganismos heterotróficos presentes en las aguas residuales. El proceso oxidativo puede utilizar oxígeno o nitrato como aceptor final de electrones, por esta razón es posible la eliminación de nitrógeno por desnitrificación. Para controlar el proceso de depuración de las aguas residuales, es fundamental conocer los factores que regulan la actividad biológica. Una alternativa a los métodos tradicionales de medida de la actividad biológica es el estudio de las actividades enzimáticas implicadas en la degradación de la materia orgánica (Nybroe *et al.*, 1992).

El conocimiento de las actividades enzimáticas que tienen lugar en un microcosmos como lo es el de los fangos activos es, junto con el conocimiento de la concentración de biomasa (como cuantificación de la densidad de los distintos grupos bacterianos), de vital importancia en la caracterización biológica de un determinado ecosistema. Durante el proceso de génesis de un fango activo, complejas comunidades microbianas usan tanto enzimas extracelulares como intracelulares para hidrolizar y en última instancia mineralizar compuestos orgánicos.

Las enzimas extracelulares están implicadas en la biodegradación de compuestos de alto peso molecular (Dold *et al.*, 1995, García *et al.*, 1997, Henz *et al.*, 1991, McLoughlin *et al.*, 1983, Sanders *et al.*, 2000). La localización de las enzimas extracelulares aún no está clara, algunos estudios han demostrado que estas enzimas extracelulares están asociadas a la sustancia polimérica extracelular (EPS) (Conrad *et al.*, 2000, Frølund *et al.*, 1995, Gessesse *et al.*, 2000, Guellil *et al.*, 2001).

Algunas de las actividades enzimáticas más importantes y aplicadas en los procesos biológicos de depuración son: fosfatasas, glucosidasas, proteasas y estererasas, debido en parte a que la composición química de una agua residual presenta una fracción orgánica mayoritariamente formada por carbohidratos y proteínas, en cuya hidrólisis juegan un importantísimo papel las actividades enzimáticas descritas.

Los valores de ciertas actividades enzimáticas pueden ser aplicados como indicadores de poblaciones específicas, como medida de biomasa activa e indicadores de procesos específicos en el fango activo, como la eliminación de materia orgánica, nitrógeno y fósforo.

Las fosfatasas son enzimas que hidrolizan ésteres de fosfato, liberando grupos fosfato al medio. Existen dos tipos de fosfatasas que presentan diferencias en lo referente al valor de pH óptimo de acción y en cuanto a la preferencia frente a determinados sustratos. Así, existen fosfatasas ácidas y alcalinas (Goel *et al.*, 1998).

Las glucosidasas ( $\alpha$ -glucosidasas y  $\beta$ -glucosidasas) hidrolizan disacáridos procedentes de la degradación de polisacáridos. La primera de ellas hidroliza maltosa y sacarosa, mientras que la segunda hidroliza la celobiosa (Goel *et al.*, 1998).

Las proteasas rompen enlaces peptídicos de proteínas dando lugar a péptidos de distinto tamaño. La determinación de esta actividad enzimática se realiza mediante el método colorimétrico descrito por Goel *et al.*, (1998) utilizando azocaseína al 0.5%.

Las esterases son enzimas bastante inespecíficas involucradas en la degradación de polímeros. Esta actividad se utiliza para determinar la degradación heterotrófica existente en el fango. Aunque se pueden obtener distintas fracciones de esta enzima (esterasa extracelular, periplásmica y particulada) (Boczar *et al.*, 2001).

La deshidrogenasa no es un enzima extracelular como los anteriores, pero en la dinámica de los fangos activos tiene una significativa función, al estar íntimamente relacionada con la oxidación de la materia orgánica y por lo tanto con la biomasa activa. Su determinación, en estos sistemas, da bastante información sobre actividad biológica (Awong *et al.*, 1985).

Los estudios sobre actividades enzimáticas proporcionan datos importantes para el conocimiento de la actividad biológica desarrollada en el biorreactor.

### **1.2.3. Capacidad de los BMS de eliminar patógenos.**

La presencia de patógenos en el agua residual tratada supone una limitación para su reutilización. Este contenido de patógenos en un agua residual, cuya procedencia principal es de tipo fecal, desciende a lo largo de la línea de tratamiento del agua, bien por procesos físicos o por procesos biológicos. Sin embargo, los procesos más eficaces son los tratamientos terciarios, especialmente las tecnologías de membrana. Atendiendo a esto, los BMS son capaces de reducir el número de patógenos gracias la membrana de ultrafiltración que es capaz de retener bacterias y algunos tipos de virus (Madaeni, 1999).

El estudio de la reducción de patógenos se realiza mediante el análisis de indicadores de contaminación fecal (I.C.F.), dada la dificultad de estudiar cada uno de los posibles patógenos presentes en el agua residual urbana. Estos indicadores son de tipo bacteriano, tal como marcan las recomendaciones sobre reutilización de aguas (W.H.O. 1989, USEPA, 1992). Además se incluyen en los estudios, por su importancia y por su diferente morfología y capacidad de resistencia, los indicadores virales.

#### **1.2.3.1. Indicadores de contaminación fecal.**

Hoy día disponemos de técnicas fiables para la determinación de los diferentes patógenos que pueden estar presentes en muestras de agua, sin embargo, la determinación de cada uno de ellos para asesorar la calidad microbiológica puede ser un trabajo muy laborioso y a la vez económicamente poco rentable (Borrego y Figueras, 1997, Calvo *et al.*, 1998, González *et al.*, 2003).

La utilización de los microorganismos coliformes como indicadores es muy común para determinar la presencia de posibles microorganismos patógenos en el agua residual. El aparato intestinal del hombre contiene numerosas bacterias coliformes. Por su número y su facilidad de determinación se han utilizado dichas bacterias como indicador del nivel de contaminación de un agua. Su presencia nos indicará la posibilidad de la existencia de organismos patógenos, y su ausencia indicaría la ausencia de los mismos (González, 2001).

Los organismos patógenos se presentan en las aguas residuales y contaminadas en cantidades muy pequeñas y, además, resultan difíciles de aislar y de identificar. Por ello se emplea el organismo coliforme como organismo indicador, puesto que su presencia es más numerosa y fácil de comprobar (Metcalf y Eddy, 2000).

La determinación de microorganismos intestinales normales como indicadores de contaminación fecal, en lugar de patógenos, es un principio de aceptación universal en la vigilancia y evaluación de la seguridad microbiana en los sistemas de abastecimientos de agua (González-López *et al.*, 2003). Estos microorganismos deben cumplir diferentes requisitos, los cuales aparecen reflejados en la tabla 1.4.

Difícilmente podremos encontrar un indicador de contaminación fecal que nos asesore de la presencia de cualquiera de los posibles patógenos o parásitos que puedan estar presentes en el agua, sin embargo son varios los que se emplean con éxito desde hace algunos años (González-López *et al.*, 2003).

**Tabla 1.4. Criterios para un microorganismo indicador de contaminación fecal (Borrego y Figueras, 1994, González-López *et al.*, 2003).**

1. El microorganismo indicador debe de estar siempre presente cuando lo este el microorganismo patógeno y ausente cuando el patógeno no este presente.
2. La persistencia en el ambiente del indicador y del patógeno debe ser similar.
3. La densidad en la que se encuentra el indicador debe guardar una relación directa con la del patógeno.
4. Preferentemente, el indicador debe de estar presente en la fuente de polución en una concentración mayor a la del patógeno. No debe de multiplicarse en el medio.
5. El indicador debe de ser por lo menos tan resistente a los desinfectantes como el patógeno.
6. El indicador debe de no ser patógeno y deberá ser fácilmente cuantificable.
7. Debe tener como habitat normal el intestino humano o de animales de sangre caliente.
8. El test para el indicador debe ser simple, rápido y económico y debe ser aplicable a todos los tipos de agua.

Las bacterias coliformes incluyen los géneros *Escherichia* y *Aerobacter*. El uso de los coliformes como organismos indicadores es problemático debido a que *Aerobacter* y ciertas cepas de *Escherichia* pueden crecer en el suelo. Por lo tanto, la presencia de

coliformes no siempre es sinónima de contaminación con residuos humanos. No obstante, aunque parece ser que *Escherichia coli* sí son de origen exclusivamente fecal, la dificultad de determinar *E. coli* sin incluir los coliformes del suelo hace que se use todo el grupo de los coliformes como indicador de la contaminación fecal (Metcalf y Eddy, 2000).

Este no es el único problema que plantea a determinación de coliformes totales. Casos como *Klebsiella* que es capaz de multiplicarse en el medio y la mayor resistencia demostrada por patógenos del género *Salmonella* a los procesos de desinfección hace que gane más interés la determinación de coliformes termotolerantes o coliformes fecales, que se diferencian de los anteriores por su capacidad de crecer a 44,5° C (González-López *et al.*, 2003).

Los organismos que han sido propuestos como indicadores de contaminación para esta investigación han sido los siguientes:

### Bacterias coliformes fecales:

Se ha establecido un grupo de bacterias coliformes fecales en función de la capacidad de generar gas (o colonias) a una temperatura de incubación elevada ( $44,5 \pm 0,2$  ° C durante  $24 \pm 2$  horas). En esta investigación se seleccionó en concreto a la especie *Escherichia coli*.

### Bacteriófagos

Normalmente la calidad del agua se define en función del contenido de bacterias indicadoras de contaminación fecal (Servais, 1990). Sin embargo, aunque estos microorganismos son buenos indicadores de contaminación por bacterias patógenas, no lo son para aquella debida a la presencia de virus o parásitos (Goyal *et al.*, 1987; Skraber *et al.*, 2002; Brion, 2002; González-López *et al.*, 2003). Esto obliga a buscar un indicador de contaminación viral que permita asesorar sobre la presencia de estos patógenos. Los bacteriófagos han sido propuestos en los últimos años como buenos indicadores de contaminación viral de un agua, debido a su naturaleza viral, su tamaño y estructura similar, así como a una parecida capacidad de resistencia a los factores ambientales y a los métodos de tratamiento (Calvo *et al.*, 1998; Gómez y Hontoria,

2003; Skraber *et al.*, 2002; Brion, 2002). Recomendándose su análisis en el Reglamento Técnico Sanitario (B.O.E. 1990).

Las células hospedadoras de estos virus suelen ser bacterias entéricas, entre las que destacan *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, siendo por lo tanto su hábitat el intestino humano y de animales, por lo que aparecen altamente concentrados en heces. Debido a esto, s

e les ha llegado a proponer como sustitutos de los indicadores de contaminación fecal bacteriana, obteniendo con ellos información tanto de la calidad viral como bacteriana de una muestra de agua.

En la actualidad hay descritos como indicadores de contaminación viral, tres grupos diferentes (Goyal *et al.*, 1987, Borrego y Figueras, 1997, Skraber *et al.*, 2002, Brion, 2002, González-López *et al.*, 2003): los colifagos somáticos, los bacteriofagos F-RNA y los fagos de *Bacteroides fragilis*. Todos ellos aparecen en alta concentración en muestras de agua residual urbana sin tratar.

Los colifagos somáticos han sido los más empleados. Así, Kenard y Valentine (1974) fueron los primeros en referirse a ellos como indicadores de contaminación por bacterias, al establecer la relación existente entre ambos. Posteriormente, Kott *et al.*, (1981) establecieron las bases de la proposición de los colifagos como indicadores de virus entéricos, las cuales aparecen resumidas en la tabla 1.5.

**Tabla 1.5. Bases para la proposición de los colifagos como indicadores de virus entéricos.**

Los colifagos aparecen en abundancia en el agua residual y contaminada.
La población de colifagos exceda a la de virus entéricos
Los colifagos son incapaces de reproducirse fuera del organismo hospedador
Los colifagos pueden ser aislados y cuantificados por métodos sencillos
El tiempo empleado para su cuantificación es menor que para los virus entéricos
Los colifagos son más resistentes al estrés ambiental y a los métodos de desinfección

### 1.3. Ventajas e inconvenientes de los BMS.

Las técnicas biológicas del tratamiento de las aguas residuales son muy antiguas y se vienen usando desde hace aproximadamente 100 años. Desde la aparición en 1914 de la patente desarrollada por Arden y Lockett sobre el sistema de fangos activos, los tratamientos aplicados en la depuración de aguas residuales urbanas emplean dicha tecnología. A lo largo de los años, el sistema ha sufrido numerosas modificaciones, mediante las cuales se ha pretendido mejorar la eficacia en cuanto a la eliminación de materia orgánica, reducir el espacio necesario para la instalación, eliminar nutrientes como fósforo y nitrógeno, o reducir los costes económicos derivados del proceso.

La tecnología de membrana, en un principio tenía limitado su uso como tratamiento de afino o terciario en el proceso convencional. La microfiltración, ultrafiltración y ósmosis inversa se utilizaban en áreas donde había requerimientos de vertido muy rigurosos o donde se pretendía reutilizar el agua depurada (Metcalf y Eddy, 2000). Los factores principales que limitaron el desarrollo de la tecnología de membrana fueron el elevado coste de inversión y de operación, y un inadecuado conocimiento de las ventajas potenciales de las membranas en el tratamiento de las aguas residuales. Sin embargo, la aparición de módulos de membrana menos costosos y más efectivos, junto con el endurecimiento de los requisitos de vertido, determinó que la tecnología de membrana volviera a cobrar interés.

La aparición de membranas poliméricas menos costosas y más resistentes, junto con los requerimientos de presiones menores y la obtención de un flujo de permeado mayor, ha potenciado el uso mundial de los BMS (Adham *et al.*, 2001). En este sentido, las principales ventajas que presenta la tecnología de BMS son:

- Su estructura es muy compacta y ocupa poco espacio, al no necesitar el proceso una decantación secundaria, ya que el módulo de membrana está incluido en el tanque de fangos activos.
- El reactor biológico puede trabajar con una elevada concentración de biomasa, manteniendo una baja carga másica, lo cual permitirá reducir el exceso de fangos.

- Eficaz retención de sólidos suspendidos y de los compuestos más solubles dentro del biorreactor, lo que proporciona un efluente de excelente calidad capaz de cumplir los requisitos de vertido más rigurosos, y potencialmente utilizable (Chiemchaisri *et al.*, 1992). Esto se puede ver en la tabla 1.6.
- Se consigue una calidad del efluente con baja presencia de microorganismos patógenos, que permitirá su directa reutilización (Ueda y Horan, 2000).
- La ausencia del decantador secundario, que también actúa como un selector natural de la población bacteriana, permite que se desarrollen bacterias de crecimiento lento, como las bacterias nitrificantes, y que persistan en el biorreactor incluso a tiempos de retención de sólidos cortos (Cicek *et al.*, 2001).
- La membrana retiene no sólo toda la biomasa sino también previene el escape de enzimas exocelulares y de oxidantes solubles que crean un licor mezcla más activo respecto a la capacidad de degradar una gama más amplia de compuestos (Cicek *et al.*, 1999).
- La mayoría de las plantas de BMS trabajan a edades de fango de 40 días o superior, consiguiéndose una reducción de hasta el 40% de la producción de fango, reduciéndose así costes de operación. En la tabla 1.7 se compara la producción de fangos en una depuradora convencional de fangos activos y un sistema de BMS.
- El proceso de filtración elimina microorganismos como hongos, bacterias, algas, amebas y protozoos, sin necesidad de añadir reactivos químicos.
- No hay generación de olores debido a que los equipos se encuentran sellados y son compactos.
- Los tratamientos con BMR tienen la capacidad de funcionar correctamente sin la necesidad de que los operarios estén continuamente vigilando. Además no es necesario el conocimiento exhaustivo sobre aspectos microbiológicos del proceso. En los tratamientos convencionales, en cambio, dada la posibilidad de crecimiento de organismos es necesaria una supervisión constante por personal cualificado (Adema y Benson, 1999).

**Tabla 1.6. Ejemplos de rendimientos del proceso de BMR para el tratamiento de ARUs (Manem y Sanderson, 1998)**

Influente (mg/L)			Efluente (mg/L)			Membrana
SS	DQO	DBO	SS	DQO	DBO	
80-460	100-365*	200-1.000	<5	<40	<10	UF
96	89*	349	<5	12	3.7	UF
280	620	230	<5	11	<5	MF
153	79*	176	<1	6	1.5	MF

(\*). La DQO ha sido medida según métodos japoneses, utilizando permanganato potásico; por lo tanto, los niveles de DQO son inferiores a los medidos en Europa y Estados Unidos.

**Tabla 1.7. Comparación de la producción de fangos a edades de fango diferentes para un proceso convencional de fangos activos y un sistema de BMS (Ghyoot y Verstraete, 2000)**

Edad del fango (días)	12	24	102
EDAR Fangos activos (Kg SS/kg DQO eliminada)	0,28	0,26	0,07
BMS (Kg SS/kg DQO eliminada)	0,22	0,18	0,02

Sin embargo, esta tecnología presenta una serie de inconvenientes, como los altos costes ya que requieren una inversión inicial importante, los módulos de membranas son bastante caros, requiere un alto gasto energético para generar las presiones necesarias para generar un flujo (presión transmembrana), y por su mantenimiento ya que precisan de limpiezas periódicas. Otra posible limitación puede ser la acumulación de componentes inorgánicos no filtrables que al aumentar su concentración en el biorreactor puedan ser perjudiciales para la comunidad bacteriana o incluso afectar a la membrana (Cicek *et al.*, 2001).

### 2. OBJETIVOS

El incremento de la demanda de recursos hídricos, hace pensar en la reutilización del agua residual urbana tratada para un determinado número de usos, siempre teniendo en cuenta la calidad necesaria para proteger la salud pública y evitar daños al medio. A esto debemos unirle la necesidad de mejorar los sistemas convencionales utilizados para el tratamiento del agua residual, principalmente los sistemas de fangos activos.

Con este trabajo de investigación se pretende estudiar, a nivel microbiológico, el funcionamiento, a nivel de planta piloto, del sistema de Biorreactores de Membrana Sumergida (BMS) como tratamiento unificado de aguas residuales urbanas, tecnología que garantiza una calidad de agua depurada que cumpla con los requisitos exigibles en materia de reutilización de aguas residuales, a la vez que soluciona los posibles problemas que aparecen en los fangos activados.

Para desarrollar este estudio nos hemos marcados dos objetivos:

#### 2.1. Caracterización microbiológica del fango activo del biorreactor.

- Estudio de la comunidad de microorganismos heterótrofos totales cultivables y de sus variaciones por modificaciones en las condiciones de trabajo de la planta piloto.
- Estudio de la evolución de las actividades enzimáticas en el biorreactor y sus variaciones por modificaciones en las condiciones de trabajo de la planta piloto.
- Estudio de las comunidades bacterianas (análisis de biodiversidad) responsables del proceso depurador y su evolución según las condiciones de trabajo, utilizando técnicas de biología molecular, como PCR-TGGE y FISH.
  - Estudio de la comunidad bacteriana total del fango activo del biorreactor, basado en la secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S.
  - Estudio de la comunidad de las bacterias oxidadoras de amonio, basado en la secuencia del gen *amoA*, complementado con estudios de hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH).

**2.2. Estudio de la capacidad de los sistemas BMS para la eliminación de microorganismos indicadores de contaminación fecal.**

- Análisis de indicadores bacterianos (*E. coli*).
- Análisis de indicadores víricos (bacteriófagos).

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1. Ubicación

La planta piloto se encuentra ubicada en la Estación Depuradora Oeste Puente de los Vados de Granada (estación depuradora de aguas residuales). La situación de la Estación se muestra en la figura 3.1. Esta depuradora es explotada por la Empresa Municipal de Aguas y Saneamiento de Granada, Sociedad Anónima, EMASAGRA, S.A.



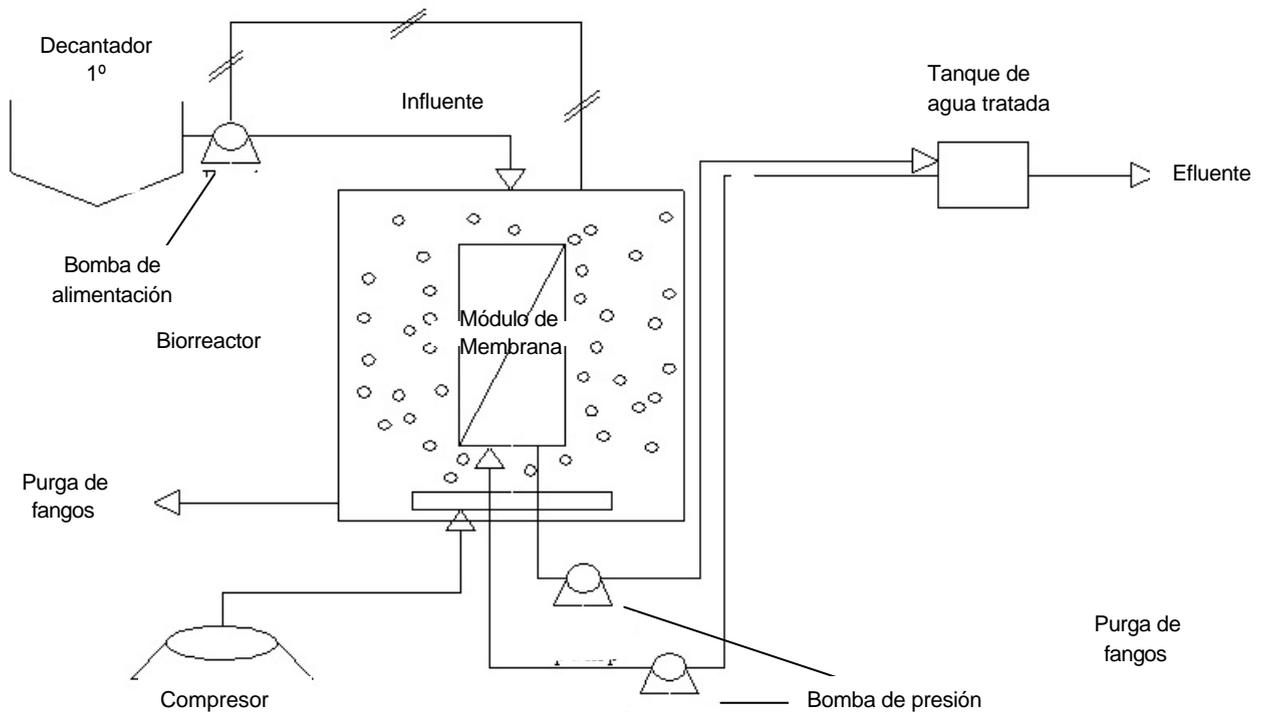
Figura 3.1. Situación geográfica de la planta depuradora.

#### 3.2. Descripción de la planta

La planta experimental (ZeeWeed®10) consta de una membrana de ultrafiltración de tamaño de poro de 0,04  $\mu\text{m}$ , suministrada por ZENON S.A. La unidad ZeeWeed®10 trabaja de forma similar que la de escala real ZeeWeed®500.

El sistema está provisto de un pre-ensamblaje y antideslizante en un cuadro de acero inoxidable. La unidad requiere un espacio de aproximadamente 1 m x 0,9 m x 1,8 m. Los principales elementos del sistema son: el tanque de proceso o biorreactor (0,8 m altura x 0,6 m de diámetro, con un volumen operativo de 225 l), un pequeño panel de

control que está provisto de un cable de alimentación y requiere una conexión simple a 115 V para poder funcionar, una bomba de engranaje, una bomba peristáltica y una soplante, que tiene un indicador de flujo de aire (rotámetro). Además tiene varios dispositivos para controlar la presión que se genera en la membrana por la bomba y un termómetro que indica la temperatura del licor mezcla. A continuación se muestra el esquema de la plata piloto y fotos de la planta en las figuras 3.2, 3.3 y 3.4.



**Figura 3.2. Esquema de la planta piloto.**



Figura 3.3. Planta Piloto ZeeWeed@10.



Figura 3.4. Panel de control.

La alimentación de la planta se realiza mediante una bomba de membrana de impulsos, que se ha colocado en un lateral del decantador primario, como se puede ver en la figura 3.5. El influente llega al tanque de proceso, donde se encuentra inmerso el módulo de membrana.



**Figura 3.5. Decantador primario de la estación depuradora, donde se encuentra situada la membrana de impulsos.**

El módulo de membrana es del tipo *hollow-fiber* y esta compuesta por PVTF (polifluoruro de vinilideno). Esta membrana tiene una superficie de absorción de  $0,93 \text{ m}^2$ .

El sistema de funcionamiento de la planta está dividido en dos periodos; el primero consiste en un ciclo de 9 minutos y 45 segundos en el cual el agua residual es filtrada por la membrana y pasa al tanque de agua tratada; el segundo ciclo tiene una duración de 15 segundos en los que el agua fluye en sentido contrario para limpiar la membrana y así evitar que se atoren los poros.

Para el control del proceso y evitar un eventual secado de las membranas, se instaló un controlador de nivel de agua, así como un compresor para suministrar oxígeno adicional al biorreactor, en el hipotético caso en el que la carga orgánica fuera tal que el oxígeno disminuyera del valor establecido ( $2 \text{ mg/l}$ ). En la Figura 3.6 se muestran los controladores de nivel y módulo de membrana.



**Figura 3.6. Módulo de Membrana y controladores de nivel.**

### **3.3. Limpieza de las membranas**

Las limpiezas de las membranas de la planta piloto se realizaron al comienzo de cada experimento.

El proceso de limpieza se puede realizar de dos formas diferentes:

- Contralavado desde el depósito de agua tratada (con hipoclorito sódico):

Para ello se preparó en el tanque de contralavado una disolución de 200 a 500 mg/l de hipoclorito sódico y se hizo pasar a contra corriente desde este depósito de agua tratada hacia el tanque de proceso donde se encontraba el módulo de membranas. Posteriormente se añadió agua hasta que se tuvo completamente sumergido el módulo de membrana y se dejó durante 46 horas.

- Inmersión del módulo de membranas en el tanque de proceso (sin contralavado - con hipoclorito sódico y/o ácido cítrico):

#### Hipoclorito sódico:

Se llenó el tanque de proceso con agua hasta sumergir completamente el módulo de membrana. Se añadió hipoclorito sódico hasta alcanzar una concentración de 200 a 1.000 mg/l (según calidad del agua y nivel de suciedad) y se dejó actuar entre 4-6 horas.

Este tipo de limpieza se realiza para eliminar incrustaciones de naturaleza orgánica.

#### Ácido cítrico y ácido clorhídrico:

Esta limpieza sólo se realiza en el caso de no recuperarse la presión transmembrana a los valores iniciales del proceso. Este tipo de limpieza se realiza siempre después de la limpieza con hipoclorito sódico y se suele utilizar para eliminar incrustaciones de tipo inorgánico.

El proceso de esta limpieza consiste en que, una vez acabada la limpieza con hipoclorito sódico, se enjuaga bien el tanque de proceso lavándose dos veces con agua limpia. Una vez vaciado el tanque, se vuelve a llenar de agua y se le añade ácido cítrico hasta obtener una concentración entre 2-4 g/l. Posteriormente, se adiciona HCl hasta alcanzar pH 2, y se deja actuar durante 4-6 horas. Transcurrido este tiempo se vacía el tanque y se lava de nuevo con agua.

#### **3.4. Características del influente**

El influente (agua residual urbana) proviene del decantador primario de la Estación Depuradora Oeste Puente de los Vados de Granada.

Este influente se caracteriza por tener unos valores promedios de demanda química de oxígeno (DQO) de 450 mg/l y una demanda biológica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) de 300 mg/l. Los valores son los esperados en un agua residual con un grado de contaminación medio (Hernández Muñoz, 1998).

### 3.5. Muestreo y analítica

La frecuencia de muestreo del agua residual de partida era semanal para las muestras microbiológicas y diaria para las fisico-químicas.

Para las muestras microbiológicas, se utilizaron frascos de 100 ml estériles, que una vez tomada la muestra se transportaban a 4°C. Las muestras eran analizadas las 8 h posteriores a la toma de muestra.

Para el estudio microbiológico del biorreactor de membrana sumergida se plantearon 6 experimentos diferentes que se detallan en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1. Características y parámetros de los diferentes experimentos.**

Exp.	Caudal (l/min)	TRH (h)	Completa retención de biomasa	S.S. máximos (mg/l)	Duración (días)	Fecha de inicio
1º	0,34	11	Sí	7.000	104	14/04/2004
2º	0,34 / 0,5*	11/7,5*	No, purgas variables	16.500	113	01/09/2004
3º	0,5	7,5	No, purgas variables	14.500	48	28/03/2005
4º	0,26	14,4	No, purgas variables	10.000	49	13/06/2005
5º	0,25	15	No, purgas variables	12.500	35	19/09/2005
6º	0,5	7,5	No, purgas variables	11.500	60	24/10/2005

\*El día 2 de noviembre se aumento el caudal a 0,5 l/min.

Entre el 5º y 6º experimento no hubo parada y posterior inicio de la planta, simplemente se realizó un cambio de caudal sin interrupción del funcionamiento del sistema.

A partir del día 18 de noviembre de 2004, se instaló en el biorreactor un segundo módulo de membrana exactamente igual que el anterior. Esta fecha coincide con el

periodo del 2º experimento. La razón de incluir un nuevo módulo de membrana fue por el rápido ensuciamiento de la misma. Este ensuciamiento se debió al aumento de caudal que se hizo en la segunda experimentación, y al aumentar el caudal, se aumentó la carga hidráulica, llegando a trabajar por encima de la carga hidráulica crítica, provocando así un ensuciamiento más rápido de la membrana. Al incluir un nuevo módulo se comenzó a trabajar a una carga hidráulica por debajo de la crítica (Poyatos, 2007).

#### **3.6. Caracterización físico-química de la planta piloto**

Algunos parámetro físico-químicos se midieron *in situ* en el biorreactor, estos fueron el oxígeno disuelto y la temperatura.

##### **3.6.1. Temperatura**

La temperatura se midió diariamente en el biorreactor, gracias a un termómetro incorporado en el mismo.

##### **3.6.2. pH**

La concentración de ión hidrógeno es un parámetro importante de calidad tanto de aguas naturales como residuales. El intervalo de concentración idóneo para la existencia de la mayoría de la actividad biológica es muy estrecho y crítico. Su control se hace ineludible para garantizar los procesos biológicos de depuración, siendo necesario que éste se encuentre entre 6.2 y 8.5 para evitar procesos de inhibición. El pH de los sistemas acuosos se puede medir convenientemente con un pHmetro, en nuestro caso el equipo empleado fue un pHmetro digital portátil de la casa comercial Crison. Este parámetro se midió diariamente en el biorreactor.

##### **3.6.3. Oxígeno disuelto**

Para medir el O<sub>2</sub> disuelto en el biorreactor se utilizó un oxímetro de la casa comercial CyberScan modelo DO-300. Este parámetro también se midió con frecuencia diaria.

Además de estos parámetros se analizaron otros, como los sólidos suspendidos totales (SS) y sólidos suspendidos volátiles (SSV), necesarios para expresar los resultados de las actividades enzimáticas.

#### **3.6.4. Sólidos Suspendidos (SS)**

Los SS son las partículas presentes en el agua que tienen un tamaño superior a 0,45  $\mu\text{m}$ . Para analizar estas partículas se siguió el método descrito por Gómez y Hontoria (2003). El método consistió en la filtración de un volumen conocido de agua, utilizando un sistema de filtrado y un filtro de tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , cuyo peso fue previamente determinado. Una vez filtrado el volumen, el filtro se introdujo en una estufa durante 1 hora a 103°C para evaporar toda el agua. Una vez frío se pesó y se halló la concentración de S.S. por sustracción del peso inicial del filtro antes de haber pasado la muestra por él. El valor se expresó en mg/l. Este parámetro se midió tanto en el biorreactor como a la entrada y salida de la planta piloto.

#### **3.6.5. Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)**

La determinación se basó en la pérdida de peso de la muestra de SS tras su incineración (Dean, 1974). Al someterlo a altas temperaturas, se consigue la volatilización de los compuestos orgánicos pasando a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . El resto que se mantuvo en el filtro fue la materia inorgánica. La cantidad de SSV se expresó como mg/l.

Para la determinación, se utilizaron los mismos filtros que se usaron para los S.S., que se introdujeron en un horno mufla a 550°C durante 20 minutos. Una vez pasado el tiempo se dejaron enfriar y se pesaron. Con la diferencia de pesada entre el peso del filtro tras su evaporación a 103°C y la última a 550°C se calcularon los SSV y se expresaron en mg/l. Este parámetro se midió tanto en el biorreactor como a la entrada y salida de la planta piloto.

#### 3.6.6. Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La DQO es una forma de estimar la materia orgánica presente en una muestra de agua, a través de la determinación por vía química de la cantidad de oxígeno necesario para oxidarla, expresada en mg/l de oxígeno. Con esta técnica se logra la oxidación de la mayoría de los compuestos orgánicos, entre 95-100%. (APHA, 2001)

El proceso se basa en una oxidación fuerte de la materia orgánica, empleando para ello un oxidante como el dicromato potásico en medio ácido (exceso de  $H_2SO_4$ ). Este proceso de oxidación es aplicable a un gran número de muestras siendo a su vez de fácil manipulación. Este parámetro se midió a la entrada y a la salida del biorreactor

#### Reactivos:

- Reactivo ácido sulfúrico: se adicionaron 6,6 g de  $AgSO_4$  de calidad para reactivo o técnica (en cristales o polvo), en 1 l de  $H_2SO_4$  concentrado de una riqueza 98% para obtener una concentración de 0,02 M y se dejó reposar durante 1 día para disolver por completo el  $AgSO_4$ .
- Solución de digestión: se obtuvo disolviendo 40 g de  $HgSO_4$  en 350 ml del reactivo de ácido sulfúrico previamente preparado y se enrasó con  $K_2Cr_2O_7$  41,7 M. Se dejó reposar el reactivo durante 24 horas. La concentración final de cada reactivo fue de 135 mM de  $HgSO_4$  y 14,6 mM de  $K_2Cr_2O_7$ .
- Patrón monopotasio f-talato anhidro: durante 1 hora se secó el ftalato a  $120^\circ C$ . Una vez seco, se adicionó sobre 500 ml de agua destilada en agitación, 8,503 g de ftalato ácido de potasio hasta disolución, y se enrasó hasta 1 l con agua destilada. Esta dilución tenía una concentración de 41 mM que equivale a 10.000 mg/l  $O_2/l$ . Este reactivo se conservó en frigorífico ( $4^\circ C$ ).

#### Procedimiento

Se lavaron los tubos y los tapones con  $H_2SO_4$  al 20% antes de usarlos por primera vez para evitar posibles contaminaciones. Los volúmenes que se emplearon fueron: 3 ml de muestra, 2 ml de solución digestora y 4 ml de reactivo ácido sulfúrico. A

continuación, se colocó el tubo en el bloque digestor precalentado a 150°C, donde se mantuvo durante 2 horas. Después de dejarlo enfriar a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de las muestras a 600 nm, comparándose con la curva de calibrado

#### Preparación de la curva de calibración

Se prepararon 5 patrones de la solución de monopotasio ftalato anhidro con DQO equivalentes que oscilaron entre 20 y 900 mg/l. Se completó el volumen con agua destilada, utilizando los mismos reactivos, tubos, volúmenes y procedimiento de digestión que para las muestras. La curva patrón se preparó de nuevo para cada nuevo lote de reactivos.

#### **3.6.7. Demanda biológica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>)**

La demanda bioquímica de oxígeno es la cantidad de oxígeno que necesitan los microorganismos en 5 días para oxidar la materia orgánica, su valor se expresa en mg O<sub>2</sub>/l. Es una forma de estimar la materia orgánica fácilmente degradable por los microorganismos (Metcalf y Eddy, 2000). Este parámetro se controló a la entrada y a la salida de la planta.

Para medir este parámetro se utilizaron matraces con diferentes volúmenes: para el agua de entrada, se utilizó un matraz aforado con una capacidad de 64 ml, y para el agua de salida, uno con una capacidad de 432 ml.

Estos volúmenes se vertieron en botes opacos especiales y se cerraron con unos tapones Oxitop® (WTW), añadiéndose a los mismos hidróxido sódico (Panreac®) para captar el CO<sub>2</sub> y evitar interferencias con la medida del O<sub>2</sub>. Estos botes se dejaron en un agitador magnético de la casa comercial WWT Oxitop® IS6, durante 5 días a 20°C. Trascorridos los 5 días se tomó la lectura del O<sub>2</sub>.

### 3.7. Caracterización biológica del biorreactor

#### 3.7.1. Detección y recuento de microorganismos heterótrofos totales a 22 y 37°C

Esta técnica se basó en la siembra en placa de 0,1 ml de muestras extraídas del biorreactor, realizando diluciones seriadas 1/10 en solución salina estéril. El medio de cultivo empleado para esta determinación fue Agar Tripticasa Soja (TSA, Oxoid®), a un pH  $7,3 \pm 0,2$ . Para preparar el medio TSA, se suspendieron 40 g del medio en 1 l de agua destilada, se agitó y se esterilizó a 112°C durante 30 minutos. Posteriormente se distribuyó homogéneamente en placas Petri estériles. Después de la inoculación de las placas con las diluciones de las muestras (0.1 ml), se procedió a su incubación durante 24 h a 22°C y 37°C, realizándose posteriormente el recuento de todas las colonias que habían crecido, expresándose los resultados en forma de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).

La composición del medio de cultivo TSA se muestra en la tabla 3.2.

**Tabla 3.2. Composición del medio TSA:**

Componente	Cantidad (g/l)
Peptona de soja	5
Peptona de caseína	15
Cloruro de sodio	5
Agar	15

#### 3.7.2. Actividades enzimáticas

El conocimiento de las actividades enzimáticas que tienen lugar en el biorreactor biológico es de vital importancia para la caracterización biológica del sistema. Las actividades enzimáticas sirven como medida de la biomasa activa, como indicadores de poblaciones específicas, e indicadores de procesos específicos en el fango activo como la disminución de la demanda química de oxígeno (DQO).

Las comunidades microbianas utilizan tanto enzimas extracelulares (fosfatasas, glucosidasas, proteasas, esterases) como intracelulares (deshidrogenasas) para hidrolizar y en última instancia mineralizar compuestos orgánicos.

#### 3.7.2.1. Actividades fosfatasas

Son enzimas que hidrolizan ésteres de fosfato, liberando grupos fosfatos al medio. Existen dos tipos de fosfatasas que presentan diferencias en lo referente al valor del pH óptimo de acción y en cuanto a la preferencia frente a determinados sustratos: fosfatasas ácidas, y fosfatasas básicas o alcalinas.

Las fosfatasas se determinaron por métodos colorimétricos descritos por Richards *et al.*, (1984) y modificados por Goel *et al.*, (1998). El método consistió en utilizar un sustrato incoloro, *p*-nitrofenil fosfato, que transcurrido el tiempo de reacción, por acción de las fosfatasas dan lugar a fosfato y a un compuesto coloreado (*p*-nitrofenol), que es el producto que se determina.

#### Fosfatasa Básica:

- Se tomó 1 ml de fango activo y se mezcló con 2 ml de tampón carbonato – bicarbonato 0,1 M a pH 9.6.
- Para preparar el tampón carbonato – bicarbonato, a pH 9.6, se necesitaron dos soluciones; una de  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  0,1 M (28.62 g en 1 l de agua destilada) y otra solución de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M (8.40 g en 1 l de agua destilada). Para obtener el tampón al pH deseado se mezclaron 33 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  con 67 ml de  $\text{NaHCO}_3$ .
- Se añadió 1 ml del sustrato (*p*-nitrofenilfosfato, sal disódica, Sigma®) al 1%. La mezcla se incubó a 37°C (en oscuridad) durante 30 min.
- Para detener la reacción se añadieron 2 ml de NaOH 0,2 M.
- Se centrifugó a 1.300 g durante 10 min en una centrifuga Kokusan 4103N.
- Se midió el desarrollo de color del producto *p*-nitrofenol en un espectrofotómetro a  $\lambda = 410 \text{ nm}$ .
- La actividad fosfatasa se expresó en mM *p*-nitrofenol/min/gSSV.

- Preparación de la curva de calibración:

Para hacer la recta patrón se prepararon diez concentraciones diferentes de *p*-nitrofenol partiendo de una concentración madre de 0,6 mM. Los valores de los patrones oscilaron entre 0,06-0,6 mM.

La curva patrón se preparó de nuevo para cada nuevo lote de reactivos.

#### Fosfatasa Ácida

Para determinar la fosfatasa ácida se utilizó la metodología descrita previamente para la fosfatasa básica; la única diferencia radicó en la utilización de un tampón acetato – acético (0,1 M) pH 4,8.

- Para preparar este tampón se necesitó una solución de acetato sódico trihidrato 0,1 M (13,61 g de  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  en 1 l de agua destilada) y ácido acético 0,1 M.
- Para obtener el valor de pH deseado, se mezclaron 59 ml de la solución de acetato sódico trihidrato 0,1 M con 41 ml de ácido acético 0,1 M.

- Preparación de la curva de calibración:

La preparación de la recta patrón fue exactamente igual que para la de la actividad fosfatasa ácida.

#### **3.7.2.2. Actividades glucosidasas**

Estas enzimas hidrolizan disacáridos procedentes de la degradación de polisacáridos. En concreto, la  $\alpha$ -glucosidasa hidroliza maltosa y sacarosa.

La determinación se realizó por método colorimétrico descrito originalmente por Awong *et al.*, (1985) y modificado por Goel *et al.*, (1998). Se utilizó como sustrato de la reacción *p*-nitrofenil  $\alpha$ -D-glucopiranosido. La metodología a seguir para determinar esta actividad enzimática fue la siguiente:

- Se tomó 1 ml de fango activo y se mezcló con 2 ml de tampón Tris – HCl 0,2 M con un pH de 7.6
- Para preparar este tampón, se necesitó una solución de Tris-HCl 0,1 M, a pH 7,6. Para ello, se mezclaron 50 ml de una solución Tris 0,1 M (12.11 g en 1 l de agua destilada) con 38.5 ml de HCl (37%) y se enrasó hasta 100 ml con agua destilada.
- Se añadió 1 ml de sustrato al 1%.
- Se incubó a 37°C en oscuridad durante 60 min.
- Para detener la reacción se mantuvieron las muestras en un baño con una temperatura de 100°C durante 5 min.
- Se centrifugó a 1.300 g durante 10 min en una centrifuga Kokusan 4103N.
- Se midió el desarrollo de color del producto de la reacción (p-nitrofenol) en un espectrofotómetro ( $\lambda=410$  nm).
- La actividad  $\alpha$ -glucosidasa se expresó en mM *p*-nitrofenol/min/gSSV.

- Preparación de la curva de calibración:

La preparación de la recta patrón fue exactamente igual que para la de la actividad fosfatasa ácida.

#### 3.7.2.3. Actividades proteasas

Las proteasas son unas enzimas extracelulares que rompen enlaces peptídicos de proteínas dando lugar a péptidos de distinto tamaño. La metodología seguida para la determinación de esta actividad fue la descrita por Cadoret *et al.*, (2002):

- Se tomaron 25 ml de la muestra y se añadieron 25 ml de azocaseína al 0,2% en tampón fosfato 10 mM pH 7.6, y se agitó a 150 rpm en un agitador magnético hasta su completa disolución. Para obtener el tampón, se necesitó una disolución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,74 g/ml) y otra de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (12,4 g/l).
- De la muestra se tomaron alícuotas de 500  $\mu\text{l}$  a tiempos regulares de 10 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 500  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético (TCA) al 10% en agua destilada. La mezcla se mantuvo en hielo durante 10 min.

- Las muestras se centrifugaron a 1.300 g durante 10 min en una centrífuga en una centrífuga Kokusan 4103N.
- El desarrollo del color se midió a  $\lambda=340$  nm.
- La actividad proteasa se expresó en incremento ( $\Delta$ ) Absorbancia /min/gSSV.

Esta actividad no requiere la preparación de recta patrón, porque las unidades de esta enzima se calculan como el incremento de la absorbancia (Cadoret *et al.*, 2002).

#### 3.7.2.4. Actividades esterases

Las esterases son enzimas bastante inespecíficas involucradas en la degradación de polímeros con grupos ésteres. Esta actividad se utiliza para determinar la degradación heterotrófica existente en el fango. La metodología seguida fue la descrita por Bozcar *et al.*, (2001).

- Para preparar el sustrato (ésteres de acetato, butirato, caproato, caprilato, laurato y palmitato) se tomaron 0,1 mg de cada uno de los productos anteriores y se disolvieron en 1 ml de acetona y 1 ml de tritón X-100. Las disoluciones se secaron bajo una corriente de helio. Posteriormente, se mezclaron con 50 ml de tampón fosfato 60 mM, pH 7.2. Para preparar este tampón, se necesitó una solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (71,64 g/l) y otra solución de  $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (31,21 g/l).
  - Se tomó 1 ml de muestra y se le añadió el sustrato preparado previamente, y se mantuvo a 25°C durante 120 min.
  - Se tomó una alícuota de 5 ml y se mezcló con 10 ml de acetona para detener la reacción.
  - Se centrifugó a 10.000 g en una centrífuga Beckman Avanti J 25 durante 3 min y se recogió el sobrenadante.
  - Se midió el desarrollo de color del producto (*p*-nitrofenol) a  $\lambda=400$  nm.
  - La actividad esterasa se expresó en mM *p*-nitrofenol/min/gSSV
- Preparación de la curva de calibración:

Para hacer la recta patrón se prepararon 15 concentraciones diferentes de *p*-nitrofenol, partiendo de una disolución madre de concentración 3 mM. Los valores de los patrones oscilaron entre 0,6-3 mM. La curva patrón se preparó de nuevo para cada nuevo lote de reactivos.

#### 3.7.2.5. Actividades deshidrogenasas

Las deshidrogenasas son enzimas intracelulares que tienen una función muy significativa, íntimamente ligada a la oxidación de la materia orgánica y por lo tanto a la biomasa activa. Su determinación nos da mucha información sobre la actividad biológica dentro del biorreactor. Para determinar esta actividad, se siguió la metodología descrita por Liwarska-Bizukojc *et al.*, (2003):

- Se tomaron 5 ml de muestra y se le añadió 1 ml de INT (Iodo-nitrotetrazolio) formazán al 0,2%.
- La mezcla se calentó en un baño termostático a 60°C durante 20 min.
- Para parar la reacción se añadió 1 ml de formaldehído al 37% de riqueza.
- Se centrifugó a 1.300 g durante 10 min en una centrifuga Kokusan 4103N, y se eliminó totalmente el sobrenadante.
- El fango se resuspendió en 10 ml de tetracloroetileno:acetona (40:60 v/v).
- Se incubó en oscuridad durante 30 min.
- Se midió el desarrollo del color del producto (formazan) a  $\lambda = 490$  nm.
- La actividad deshidrogenasa se expresó en mM formazan/min/gSSV

- Preparación de la curva de calibración:

Para hacer la recta patrón se prepararon 15 concentraciones diferentes de INT formazán, partiendo de una disolución madre de concentración 0,02 mM. La curva patrón se preparó de nuevo para cada nuevo lote de reactivos.

#### 3.7.3. Estudio de las comunidades bacterianas.

Para el estudio de la comunidad microbiana del biorreactor biológico se eligieron 2 genes: el gen codificante del ARN ribosómico 16S, que permitió el estudio de las poblaciones bacterianas totales del biorreactor, y el gen *amoA* (gen estructural de la amonio monooxigenasa, una de las enzimas funcionales para la fase I de la nitrificación), con el fin de estudiar específicamente las poblaciones de bacterias oxidadoras de amonio. Se utilizó la técnica de electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TGGE). Para ello se realizaron unos pasos previos, que consistieron en:

- La extracción del ADN bacteriano total de las muestras procedentes del biorreactor.
- La amplificación específica de los fragmentos del gen codificante del ARN ribosómico 16S (ADNr 16S) y del gen *amoA*, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Separación de los fragmentos de distinta secuencia de ADN mediante TGGE.
- Reamplificación por PCR de los fragmentos separados e identificación de las poblaciones mediante secuenciación de ADN.

##### 3.7.3.1. Extracción del ADN bacteriano

Para la extracción del ADN de las muestras de licor mezcla procedentes del bioreactor, se utilizó un kit comercial desarrollado específicamente para suelos, sedimentos y fangos (UltraClean Soil DNA Isolation Kit, MoBio®). Previamente las muestras se centrifugó a 1.300 g durante 10 min en una centrifuga Kokusan 4103N y se les eliminó el sobrenadante. Las muestras así tratadas se conservaron congeladas a -20°C hasta su análisis.

Los pasos seguidos para la extracción fueron los recomendados por el fabricante del kit:

- Se añadió 1 g de licor mezcla a un tubo de 2 ml, que contenía un *buffer* de suspensión adicionado con perlas de vidrio, y se agitó hasta conseguir su mezcla completa.
- Se añadió 60 µl de solución S1 y se mezcló todo homogéneamente.
- Se añadieron 200 µl de la solución IRS (solución para retirar inhibidores de las ADN polimerasas presentes en las muestras) y se agitaron los tubos en un vortex provisto de un adaptador de tarima plana para acoplar los tubos horizontalmente, durante 10 min. En este paso, la combinación de la solución S1 y la acción mecánica de las perlas de vidrio permite la disgregación correcta de la muestra y la adecuada extracción del ADN de la misma.
- Se centrifugaron los tubos a 10.000 g durante 30 seg en una centrífuga Minispin plus Eppendorf®).
- El sobrenadante se recuperó y se dispuso en tubos limpios. Se añadieron 250 µl de la solución S2, se agitó durante 5 seg, y se mantuvo a 4°C durante 5 min.
- Se centrifugaron los tubos a 10.000 g durante 10 min.
- El sobrenadante se volvió a recuperar y se dispuso en tubos limpios, se añadieron 1,3 ml de la solución S3 y se agitó durante 5 seg.
- Alrededor de 700 µl se transfirieron a unidades de filtración acopladas a un tubo eppendorf, y se centrifugaron a 10.000 g durante 1 min. Este paso se repitió hasta agotar todo el volumen. La membrana de las unidades de filtración tiene afinidad por el ADN, bajo las condiciones de extracción.
- Se añadieron a las unidades de filtración 300 µl de la solución S4. Se centrifugó durante 30 seg. a 10.000 g. y se desechó el líquido que había pasado por el filtro.
- Se volvió a centrifugar a la misma velocidad durante 1 min para eliminar restos de la solución S4, y la unidad de filtración se llevó a otro tubo limpio. Se añadieron después a la unidad de filtración 50 µl de la solución S5, con el fin de eluir el ADN unido a la membrana de la unidad de filtración.
- Se centrifugó de nuevo durante 30 seg y se recuperó el líquido filtrado.

Tras este último paso, se comprobó el ADN extraído mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, y se conservó a -20°C.

#### 3.7.3.3. Amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S

Las muestras de ADN se sometieron a una reacción de PCR anidada, donde se realizaron dos reacciones consecutivas de amplificación. En la primera PCR, se amplificó una región correspondiente a casi la totalidad del gen codificante del ARNr 16S (aproximadamente 1,5-1,6 Kb), y en la segunda PCR, una región interna de menor tamaño (aproximadamente 0,2 Kb) correspondiente a la región hipervariable V3 (nucleótidos 341 al 534, numeración de *Escherichia coli*, Muyzer *et al.*, (1993)). Se empleó la estrategia de PCR anidada con la finalidad de obtener un mayor rendimiento en la amplificación, ya que evita la unión inespecífica de los cebadores, mejora la amplificación de poblaciones presentes en bajo número, y permite obtener patrones de bandas más completos (Nicolaisen y Ramsing, 2002; Ward y O'Mullan, 2002).

Para la primera PCR se emplearon los cebadores universales fD1 y rD1 (Weisburg *et al.*, 1991), para la segunda PCR se emplearon los cebadores universales GC-P1 y P2 (Muyzer *et al.*, 1993). La secuenciación del cebador GC-P1 esta basada en una región conservada del gen a la que se añade una cola de cuarenta pares de bases ricas en GC, necesarias para la separación correcta mediante TGGE (Muyzer *et al.*, 1993). En la Figura 3.7 se muestra un esquema del procedimiento completo seguido. La secuencia de todos los cebadores empleados se muestra en la tabla 3.3.

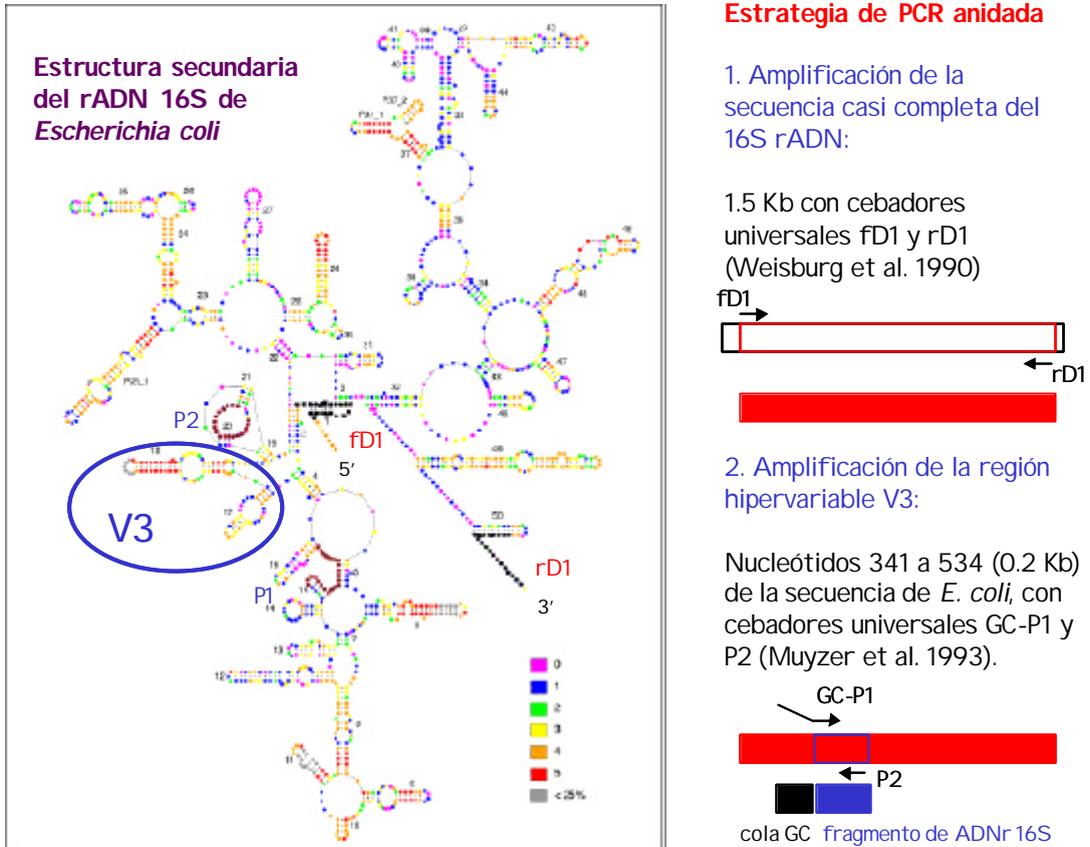


Figura 3.7. Esquema de la reacción de PCR anidada, donde se realizaron dos reacciones consecutivas de amplificación, en la primera se amplificó una región correspondiente a casi la totalidad del gen codificante del ARNr 16S, y en la segunda una región interna de menor tamaño.

Tabla 3.3. Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR anidada

OLIGOS	SECUENCIA ( de 5´a 3´)
fd1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
rD1	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC
GC-P1 <sup>A</sup>	<b>CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGGGCCTAC</b> GGGAGGCAGCAG
P2	ATTACCGCGGCTGCTGG

<sup>A</sup>En negrita se indica la cola rica en GC

La primera reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50  $\mu$ l. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos fueron una modificación de los descritos por Vinuesa *et al.*, (1998). En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos que se indican en la Tabla 3.4.

El programa de PCR se desarrolló empleando el termociclador PE-2400 (Perkin-Elmer®) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 95 °C durante 7 min
2. 25 ciclos que constan de:
  - A: Desnaturalización: 94 °C durante 1 min y 10 s.
  - B: Hibridación de los cebadores sobre el ADN molde desnaturalizado, *Annealing*: 56 °C durante 40 s.
  - C: Extensión: 72 °C durante 2 min.
3. Extensión final: 72 °C durante 6 min y 10 seg.
4. Conservación a 4 °C

**Tabla 3.4. Reactivos empleados en la primera reacción de la PCR anidada, efectuada en un volumen final de 50  $\mu$ l.**

Reactivo	Volumen $\mu$ l
PCR Buffer Gold 10x (Applied Biosystems)	5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM (Applied Biosystems)	3
Seroalbúmina bovina 10 mg/ml (N E Biolabs)	1
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Roche) 10 mM	1
Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma)	2,5
Cebador fD1 100 $\mu$ M (Sigma)	0,2
Cebador rD1 100 $\mu$ M (Sigma)	0,2
Ampli Taq Gold polimerasa (Applied Biosystems)	0,2
ADN molde	1
Agua bidestilada grado PCR	36

Tras la reacción, se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ l y se comprobaron en gel de agarosa al 0,8 %, para confirmar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado (1,5-1,6 Kb). Una vez comprobadas, las muestras fueron sometidas a una segunda PCR con el objetivo de amplificar la región V3. La segunda reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50  $\mu$ l. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos fueron una modificación de la técnica *touch down* descrita por Watanabe *et al.*, (1998). En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos que se indican en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5. Reactivos empleados en la segunda reacción de la PCR anidada, efectuada en un volumen final de 50 ml.**

Reactivo	Volumen $\mu$ l
PCR <i>Buffer</i> Gold 10X (Applied Biosystems)	10
MgCl <sub>2</sub> 25 mM (Applied Biosystems)	6
Seroalbúmina bovina 10 mg/ml (N E Biolabs)	2
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Roche) 10 mM	2
Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma)	5
Cebador GC-P1 100 $\mu$ M, purificado mediante HPLC (Sigma)	0,4
Cebador P2 100 $\mu$ M, purificado mediante HPLC (Sigma)	0,4
Ampli Taq Gold polimerasa (Applied Biosystems)	0,4
ADN molde (producto de la primera PCR)	1
Agua bidestilada grado PCR	36

El programa de PCR se desarrolló empleando el termociclador PE-2400 (Perkin-Elmer®) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 94°C durante 7 min
2. Treinta ciclos que consisten en:
  - Desnaturalización: 94°C durante 1 min

*Annealing*: 65°C durante 1 min

Esta temperatura se disminuyó automáticamente 1° C cada 2 ciclos, hasta alcanzar 55°C, temperatura a la cual se efectuaron 10 ciclos adicionales.

Extensión: 72°C durante 2 min

3. Extensión final: 72°C durante 10 min
4. Mantenimiento a 4°C

Tras la reacción se tomaron alícuotas de 1 µl que se comprobaron en un gel de agarosa al 3 %, para confirmar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado (0,2 Kb).

#### **3.7.3.3. Amplificación de fragmentos del gen estructural de la subunidad $\alpha$ de la enzima amonio-monooxigenasa (*amoA*).**

Para el estudio específico de las comunidades de bacterias nitrificantes, se escogió como marcador el gen *amoA*, que codifica la subunidad  $\alpha$  de la enzima amonio-monooxigenasa, propia de las bacterias nitrificantes de fase I. Este gen ha sido empleado en estudios previos, puesto que ha sido posible diseñar cebadores específicos para la amplificación de este gen en bacterias nitrificantes de fase I pertenecientes a la subclase  $\beta$  de las Proteobacterias, que comprende los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosospira*, englobando este último a los antiguos géneros *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio* (Nicolaisen y Ramsing, 2002). Estos cebadores no amplifican fragmentos de *amoA* de las bacterias nitrificantes de fase I pertenecientes a la subclase  $\gamma$  de las Proteobacterias (*Nitrosococcus oceanus* y *N. halophilus*), descritas únicamente en ambientes marinos (Nicolaisen y Ramsing, 2002).

Las muestras de ADN se sometieron a una reacción de PCR utilizando la estrategia semi-anidada optimizada por Nicolaisen y Ramsing (2002) empleando cebadores exentos de degeneraciones en la secuencia oligonucleotídica, con lo que se consigue una mayor especificidad de la amplificación y mejor calidad de los perfiles de bandas.

Para la primera PCR se emplearon los cebadores AmoA-1F y AmoA-2R, y para la segunda PCR se emplearon los cebadores universales GC-AmoA-1F y AmoA-2R (Nicolaisen y Ramsing, 2002). La secuencia de todos los cebadores empleados se muestra en la Tabla 3.6.

**Tabla 3.6. Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR semi-anidada.**

Cebador	Secuencia ( de 5' a 3')
AMOA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT
AMOA-2R	CCCCTCTGCAAAGCCTTCTTC
GC-AMOA-1F	<b>CGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGTTTCTACTGGTGGT</b>

En negrita se indica la cola rica en GC.

La primera reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos fueron las descritas por Nicolaisen y Ramsing (2002). En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos que se indican en la tabla 3.7.

El programa de PCR se desarrolló empleando el termociclador PE-2400 (Perkin-Elmer®) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 92°C durante 7 minutos.
2. 35 ciclos que constan de:
  - Desnaturalización: 92°C durante 30 segundos.
  - Hibridación de los cebadores sobre el ADN molde desnaturalizado, *Annealing*: 57°C durante 30 segundos.
  - Extensión: 72°C durante 45 segundos, añadiendo 1 segundo adicional por ciclo.
3. Extensión final: 72°C durante 5 minutos.

## 4. Conservación a 4°C.

**Tabla 3.7. Reactivos empleados en la primera reacción de la PCR anidada, efectuada en un volumen final de 50 µl.**

Reactivo	Volumen ml
PCR Buffer Gold 10x (Applied Biosystems)	5
MgCl <sub>2</sub> 25mM (Applied Biosystems)	3
Seroalbúmina bovina 10mg/ml (N E Biolabs)	1
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Roche) 10 mM	1
Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma)	2.5
Cebador AmoA-1F ó GC-AmoA-1F 100µM (Sigma)	0.2
Cebador AmoA-2R 100µm (Sigma)	0.2
Ampli Taq Gold polimerasa (Applied Biosystems)	0.2
ADN molde	1
Agua bidestilada grado PCR	37

Tras la primera reacción, se tomaron alícuotas de 5 µl que se comprobaron en un gel de agarosa al 3%, para comprobar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado (475 bp). Una vez comprobadas, las muestras fueron sometidas a la segunda PCR en idénticas condiciones. La segunda reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 µl. Tras la reacción se tomaron alícuotas de 1 µl que se volvieron a comprobar nuevamente en un gel de agarosa al 3%.

**3.7.3.4. Concentración y purificación del producto de la PCR anidada**

Todos los productos de PCR finales para cada una de las muestras se concentraron aproximadamente 5 veces, empleando membranas Microcon YM-100 (Millipore®), siguiendo las indicaciones del fabricante. Gracias al uso de estas membranas, se

consiguió además purificar los productos de PCR, eliminando las sales y componentes de bajo peso molecular.

Para ello, se tomó el volumen de la PCR y se dispuso en las unidades de filtración, provistas de una membrana de exclusión molecular de corte 100.000 Da. Las unidades se centrifugaron a 500 g durante 15 min para retener el ADN. A continuación, se añadieron de 15 a 20 µl de agua MilliQ estéril y se introdujo la unidad de filtración invertida en un tubo eppendorf nuevo, que se centrifugó a 10.000 g durante 3 min para recoger el ADN purificado y concentrado. La concentración final de ADN de las muestras tras este paso fue de 60-100 ng/µl.

### 3.7.3.5. Separación de las muestras mediante TGGE

La electroforesis en gel con gradiente de temperatura se realizó empleando el sistema TGGE MAXI (Watman Biometra). Para la separación de los distintos fragmentos, se emplearon geles desnaturizantes de poliacrilamida, preparados en agua MilliQ, con la composición que se indica en la Tabla 3.8.

**Tabla 3.8. Composición del gel desnaturizante de poliacrilamida empleado en la TGGE**

Reactivos	Concentración
Poliacrilamida-bisacrilamida 37.5:1 (Sigma)	6 %
Urea, grado biología molecular (Sigma)	8 M
Formamida desionizada (Sigma)	20 %
Glicerol (Sigma)	2 %
<i>Buffer</i> tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM (TAE) pH 8,0	1x
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), grado biología molecular	0,06 %
Persulfato de amonio, grado biología molecular	0,06 %

Los geles se dejaron polimerizar entre 3-24 h antes de llevar a cabo la electroforesis.

Para la electroforesis se empleó *buffer* TAE (2X). Se cargaron 4  $\mu$ l de cada muestra más 1  $\mu$ l de *buffer* de carga (5x) de la siguiente composición: 0,5 % tritón X-100, 0,05 % azul de bromofenol, 0,05 % xilencianol, EDTA 10 mM, y *buffer* TAE 10x.

Las condiciones de la electroforesis para separar los fragmentos amplificados del gen codificante del ARNr 16S fueron las siguientes:

1. Migración inicial de las muestras:
  - Temperatura inicial de gradiente,  $L_0 = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$
  - Temperatura final de gradiente,  $L_{10} = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$
  - Voltaje 300 V
  - Duración 18 min
2. Establecimiento del gradiente de temperatura:
  - Temperatura inicial de gradiente,  $L_0 = 43\text{ }^{\circ}\text{C}$
  - Temperatura final de gradiente,  $L_{10} = 63\text{ }^{\circ}\text{C}$
  - Voltaje 0 V
  - Duración 10 min
3. Separación de muestras:
  - Temperatura inicial de gradiente,  $L_0 = 43\text{ }^{\circ}\text{C}$
  - Temperatura final de gradiente,  $L_{10} = 63\text{ }^{\circ}\text{C}$
  - Voltaje 125 V
  - Duración 18 h

Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con plata, empleando el kit “Gel Code Silver Staining” (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Como patrón de separación para los fragmentos del gen ADNr 16S, se construyó un marcador de seis especies a partir de las cepas de colección que se muestran en la Tabla 3.9. (Gómez-Villalba *et al.*, 2006). El proceso seguido para preparar el fragmento de ADN de los patrones fue idéntico al de las muestras.

**Tabla 3.9. Cepas de colección que se emplearon como marcadores en la TGGE**

Espece	Cepa
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 8750
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 15308
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$
<i>Nocardia corynebacterioides</i>	ATCC 21253
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341

ATCC: American Type Cultura Collection

Para separar los fragmentos amplificados del gen estructural de la subunidad  $\alpha$  de la enzima amonio-monooxigenasa (*amoA*), se siguieron los mismos pasos explicados para la separación de fragmentos amplificados del gen codificante del ARNr 16S, excepto el programa para el TGGE, que varió las temperaturas, y que no se usaron marcadores de especies.

Las condiciones de electroforesis fueron:

1. Migración inicial de las muestras:
  - a. Temperatura inicial de gradiente,  $L_0 = 20\text{ }^\circ\text{C}$
  - b. Temperatura final de gradiente,  $L_{10} = 20\text{ }^\circ\text{C}$
  - c. Voltaje 300 V
  - d. Duración 18 min
2. Establecimiento del gradiente de temperatura:
  - a. Temperatura inicial de gradiente,  $L_0 = 38\text{ }^\circ\text{C}$
  - b. Temperatura final de gradiente,  $L_{10} = 48\text{ }^\circ\text{C}$
  - c. Voltaje 0 V
  - d. Duración 10 min
3. Separación de muestras:
  - a. Temperatura inicial de gradiente,  $L_0 = 38\text{ }^\circ\text{C}$
  - b. Temperatura final de gradiente,  $L_{10} = 48\text{ }^\circ\text{C}$

- c. Voltaje 120 V
- d. Duración 18 h

#### **3.7.3.6. 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  $\mu$ l 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 los apartados 3.7.3.2. y 3.7.3.3., según el origen de la muestra.

#### **3.7.3.7. Purificación y secuenciación de los fragmentos de ADN reamplificados.**

Los productos de PCR reamplificados se corrieron en geles de agarosa al 3% y, tras la tinción con bromuro de etidio, las bandas se escindieron del gel con una espátula estéril, siendo purificadas mediante el kit de extracción Quiaex II (Quiagen), y el ADN fue resuspendido en un volumen final de 20  $\mu$ l de agua MilliQ estéril.

Los productos así purificados fueron secuenciados, empleando como cebadores los mismos utilizados para su reamplificación. La secuenciación de ADN de doble cadena fue efectuada por el centro López Neyra (Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Granada) mediante el método de los terminadores marcados con fluorocromos, usando el kit ABI-PRISM® Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems®) y un secuenciador automático Applied Biosystems 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems®).

**3.7.3.8. Análisis informático de las secuencias.**

Los datos de secuencia de ADN obtenidos fueron analizados y traducidos a secuencia de proteína (en el caso del gen *amoA*) con los programas informáticos de libre distribución *Chromas* v. 1.51. y *Generunner* v. 3.0.5. Para el alineamiento y la comparación de las secuencias de ADN o proteína de los distintos fragmentos obtenidos, se emplearon las herramientas de biocomputación *Align* (Kruskal, 1983) y *WU-BLAST-n* y *WU-BLAST-x*, v. 2.0 (Altschul *et al.*, 1997), todas disponibles en el servidor web del European Bioinformatics Institute ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)). El programa *Clustal X* v. 1.8 (Jeanmougin *et al.*, 1998) fue utilizado para la generación de alineamientos de las secuencias, empleando los parámetros por defecto. Para el cálculo de las matrices de distancia entre las secuencias y la construcción de los árboles filogenéticos mediante el método *Neighbour-Joining* (Saitou y Nei, 1987), se empleó el software de libre distribución MEGA-2.1 (Kumar *et al.*, 2001). Los árboles se calcularon tomando como criterio la no inclusión de los huecos (*gaps*) del alineamiento. 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 correspondientes.

Los patrones de bandas obtenidos mediante TGGE se analizaron con el programa Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Bélgica). Se construyeron dendogramas que relacionasen los distintos perfiles de bandas en función de su similitud, aplicando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y el coeficiente de Dice. Este método establece la similitud entre los perfiles en función de las posiciones relativas de las bandas, pero sin tener en cuenta su densidad (intensidad). Como método para evaluar la fiabilidad del dendograma, se utilizó el método del coeficiente cofenético, que expresa la consistencia de un cluster calculando la correlación entre similitudes del dendograma y la matriz de distancia por pares.

#### 3.7.4. Estudio de la población microbiana del biorreactor mediante la técnica de hibridación in situ con fluorescencia (FISH).

Esta técnica se utilizó sólo en la última fase de la 6ª experimentación. Se puso en práctica para estudiar la comunidad bacteriana completa del biorreactor, y en particular la de las bacterias nitrificantes (oxidadoras de amonio y oxidadoras de nitrito). Estos estudios se realizaron en el Departamento de Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias de la Vida de la Universidad de Viena. Las sondas empleadas en el estudio y sus características están resumidas en la tabla 3.10. Los datos de todas las sondas se encuentran en la base de datos Probase (<http://www.microbial-ecology.net/probase>) (Loy *et al.*, 2003)

La técnica de FISH utilizando sondas unidas a moléculas de ARN ribosómico se basa en los siguientes pasos:

1. Fijación de las muestras.
  2. Deshidratación.
  3. Hibridación de las muestras con las sondas adecuadas y lavado.
  4. Evaluación microscópica.
- 
1. Fijación de las muestras.
    - Se mezcló una muestra de 6 ml de fango activo procedente del biorreactor con 18 ml de una solución de paraformaldehído al 4% en *buffer* PBS, preparado extemporáneamente y previamente mantenido en hielo. PBS: *buffer* fosfato salino: 15% *buffer* fosfato, 390 mM NaCl. El *buffer* PBS se preparó a concentración 3x, a partir de *buffer* fosfato  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$  200 mM, a pH 7,3, y se diluyó como fue conveniente en cada momento
    - Se incubó esta mezcla a 4°C durante 4 h.

- Se centrifugó la muestra fijada, y el sobrenadante se reemplazó con 1 volumen de *buffer* PBS previamente mantenido en hielo. Este paso se repitió 3 veces, con el fin de eliminar el paraformaldehído residual.
- Se resuspendió la muestra en 1 volumen de PBS mantenido en hielo, y se añadió 1 volumen de etanol 96%, también mantenido en hielo.
- Se alicuotó la muestra en volúmenes de 500  $\mu$ l en tubos eppendorf estériles y se conservaron a -20° C hasta su posterior análisis.



**Tabla 3.10. Sondas de oligonucleótidos empleadas en el estudio para hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Se indican los nombres comunes publicados de las sondas, así como la nomenclatura estandarizada propuesta por Alm *et al.*, (1996).**

Sonda	Secuencia (5' ? 3')	Organismos diana	Referencia
EUB338 (S-D-Bact-0338-a-A-18)	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	<i>Bacteria</i> (90%)	Amann <i>et al.</i> (1990)
EUB338II (S*-BactP-0338-a-A-18)	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	<i>Plantomycetales</i>	Daims <i>et al.</i> (1999)
EUB338III (S*-BactV-0338-a-A-18)	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	<i>Verrucomicrobiales</i>	Daims <i>et al.</i> (1999)
EUB mix	EUB338+EUB338II+EUB338III		Daims <i>et al.</i> (1999)
Nso1225 (S-F-bAOB-1224-a-A-20)	CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA	Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio, <i>Nitrosomonas</i> spp. (amplia)	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
Cluster6a192 (S*-Nsm-0192-a-A-20)+ Competidor (C)*	CTT TCG ATC CCC TAC TTT CC CTT TCG ATC CCC TGC TTC C	<i>Nitrosomonas</i> spp.-cluster 6a (linaje de <i>N. oligotropha</i> )	Adamczyk <i>et al.</i> (2003)
NEU (S*-Nsm-0651-a-A-18) + Competidor (CTE)*	CCC CTC TGC TGC ACT CTA TTC CAT CCC CCT CTG CCG	<i>Nitrosomonas</i> spp. halotolerantes/halófilos	Wagner <i>et al.</i> (1995)
NcMob (S-S-Nmob-0174-a-A-18)	TCC TCA GAG ACT ACG CGG	<i>Nitrosomonas mobilis</i>	Pommerening-Roeser <i>et al.</i> (1996)
AOB mix	Nso1225 + (Cluster6a192+C) + (NEU+CTE)	Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio ( <i>Nitrosomonas</i> spp.)	
Nsv444 (S-G-Nsv-0444-a-A-19)	CCG TGA CCG TTT CGT TCC G	<i>Nitrospira</i> spp.	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
Ntspa662 (S-G-Ntspa-662-a-A-18) + Competidor (C)*	GGA ATT CCG CGC TCC TCT GGA ATT CCG CTC TCC TCT	<i>Nitrospira</i> spp. (amplia)	Daims <i>et al.</i> (2001)
Ntspa1431 (S*-Ntspa-1431-a-A-18)	TTG GCT TGG GCG ACT TCA	<i>Nitrospira</i> spp., sublinaje I	Maixner <i>et al.</i> (2006)
Ntspa1151 (S*-Ntspa-1151-a-A-20)	TTC TCC TGG GCA GTC TCT CC	<i>Nitrospira</i> spp., sublinaje II	Maixner <i>et al.</i> (2006)
NIT3 (S-G-Nbac-1035-a-A-18) + Competidor (C)*	CCT GTG CTC CAT GCT CCG CCT GTG CTC CAG GCT CCG	<i>Nitrobacter</i> spp.	Wagner <i>et al.</i> (1996)
AMX820 (S*-Amx-0820-a-A-22)	AAA ACC CCT CTA CTT AGT GCC C	Anammox	Schmid <i>et al.</i> (2001)

\*Oligonucleótidos no marcados con fluorescencia, empleados como competidores. Se añaden al buffer de hibridación en proporción 1:1 con la sonda correspondiente.



#### 2. Deshidratación.

- Se tomaron 10-15  $\mu\text{l}$  de la suspensión de células fijadas y se colocaron en los pocillos de portaobjetos recubiertos de teflón (Marienfeld®)
- Se dejó secar las muestras a temperatura ambiente.
- Se deshidrataron las muestras introduciendo el portaobjetos en una serie de etanol de diferentes concentraciones (50%, 80% y 96%, v/v), manteniendo el portaobjetos con las muestras 3 min en cada concentración.
- Se precalentaron las muestras a 46°C durante 2 min.

#### 3. Hibridación de las muestras con las sondas adecuadas y lavado.

En este apartado, todas las sondas y reactivos se mantienen en hielo hasta su empleo

- Por cada portaobjetos, se preparó 1 ml de *buffer* de hibridación (tabla 3.11). Todas las sondas empleadas funcionan adecuadamente con una astringencia del 35% de formamida, y se disponía de todas ellas marcadas con los fluorocromos Cy3 (sulfoindocianina, rojo) y FLUOS ([5(6)-carboxi-fluorescein-*N*-hidroxisuccinimida éster], verde).
- Se tomó 1  $\mu\text{l}$  de cada una de las sondas a emplear en cada muestra (pocillo), a un tubo eppendorf que contenía 10  $\mu\text{l}$  del *buffer* de hibridación. Se mezcló bien, y se aplicó la solución de hibridación con la combinación de sondas adecuada a las muestras deshidratadas en los pocillos.
- Por cada portaobjetos, se preparó una cámara húmeda, introduciendo una lámina de papel absorbente en un tubo Falcon de 50 ml con tapa de rosca y humedeciendo el papel con el resto de la solución de hibridación preparada anteriormente. Se introdujo el porta en la cámara húmeda en posición horizontal, se cerró el tubo, y se incubó en un horno a 46°C durante 1,5 h.
- Paralelamente se preparó el *buffer* de lavado (tabla 3.12) en un tubo Falcon de 50 ml y se precalentó a 46°C en un baño de agua.
- Tras la incubación, se introdujo el portaobjetos dentro del *buffer* de lavado y se mantuvo durante 10 min a 46°C en el baño de agua. Posteriormente, se

introdujo el portaobjetos en agua destilada mantenida en hielo durante 2" para eliminar restos del *buffer* de lavado, y se secó rápidamente bajo una corriente de aire comprimido.

**Tabla 3.11. Reactivos para preparar la solución de hibridación (1 ml).**

Reactivos	Volumen (µl)	Concentracion en el <i>buffer</i>
5 M NaCl	180	900 mM
1 M Tris-HCl pH 7.5	20	20 mM
Formamida	350	35%
10% SDS	1	0,01%
Agua MiliQ	449	-

**Tabla 3.12. Reactivos para preparar el *buffer* de lavado (50 ml).**

Reactivos	Volumen	Concentracion en el <i>buffer</i>
5 M NaCl	700 µl	70 mM
1 M Tris-HCl pH 7.5	1 ml	20 mM
0.5 M EDTA pH 8	500 µl	5 mM
Agua Bidesilada	Hasta 50 ml	-

#### 4. Evaluación microscópica.

Para observar la muestra al microscopio se utilizó Citifluor AF1 (Citifluor Ltd.) como fluido de montaje. Se empleó un microscopio láser confocal Zeiss LSM-510 META, equipado con un láser HeNe para la detección de Cy3 a 543 nm, y un láser de Ar para la detección de FLUOS a 488 nm. Las imágenes obtenidas se documentaron con el software LSM Image Browser vs. 4.0

### 3.7.5. Capacidad de eliminación de patógenos

Para estudiar la capacidad del sistema para eliminar microorganismos patógenos, se analizaron los indicadores de contaminación fecal: coliformes fecales (*Escherichia coli*) y colifagos.

#### 3.7.5.1. Detección y recuento de *Escherichia coli*

Las bacterias coliformes son bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas, oxidasa negativas y con forma de bastoncillo, que pueden crecer en medio aerobio y anaerobio facultativo en presencia de sales biliares.

*Escherichia coli* es un microorganismo que pertenece al grupo de los coliformes fecales que se caracterizan por su capacidad de crecer a 44.5°C. Este microorganismo es exclusivo del intestino de los mamíferos, que por su fácil y barata determinación se ha convertido en el microorganismo indicador por excelencia tanto en aguas residuales como para aguas limpias (Gómez y Hontoria, 2003).

Además presenta las siguientes características bioquímicas relevantes: la capacidad de producir indol a partir de triptófano, poseer la enzima  $\beta$ -galactosidasa, reaccionar positivamente en el ensayo del rojo de metilo, y la capacidad de descarboxilar el ácido L-glutámico (UNE-EN ISO 9308-1).

En este estudio, se ha empleado el método de filtración por membrana (UNE-EN ISO 9308-1) que se basa en la filtración de una determinada cantidad de agua a través de membranas de filtración con tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y la posterior incubación de las mismas en placas con medios de cultivo selectivos diferenciales.

Para realizar este método, se prepararon diferentes diluciones seriadas de la muestra (1/10) antes de la filtración, al objeto de obtener resultados apreciables en las placas de cultivo (entre 30 y 300 UFC). Las membranas se colocaron en placas Petri de doble capa que contenía dos medios de cultivo diferentes: tripticasa soja agar (TSA, Oxoid®) a pH 7,3  $\pm$  2, y agar con caseína y sales biliares (TBA, Oxoid®) a pH 7,2  $\pm$

0,2. Las muestras se incubaron a 37°C durante 4 horas y luego a 44,5°C durante otras 20 horas más. La composición del medio de cultivo TBA se muestra en la tabla 3.13.

**Tabla 3.13. Composición del medio TBA:**

Componente	Cantidad (g/l)
Triptona	20
Sales biliares	1,5
Agar	15

Para preparar el medio en doble capa, primero se disolvieron 36.5 g de TBA en 1000 ml de agua destilada y se esterilizó a 112°C durante 30 minutos; posteriormente, el medio se distribuyó homogéneamente en placas Petri estériles. Una vez solidificado el medio TBA, se preparó el TSA y se vertió sobre las placas que ya contenían el TBA.

Tras la incubación, se colocó la membrana en un disco de papel de filtro saturado con reactivo indol. Todas las colonias de color rojo se consideraron *Escherichia coli*. El recuento se expresó como unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra (UFC/ml)

#### **3.7.5.2. Detección y recuento de colifagos**

Los indicadores virales empleados en el estudio fueron los colifagos, que se determinaron por el método de la doble capa descrito por Adams (1959), empleando como cepa hospedadora *E. coli* ATCC 13706.

Los colifagos son un grupo heterogéneo de fagos, en cuanto a su morfología, que afectan a cepas del grupo de los coliformes, siendo su hospedador tipo las cepas de *E. coli*. Son frecuentes en heces de humanos y animales, aunque aparecen de modo desigual (Seeley y Primrose, 1980). El pequeño tamaño y la simplicidad estructural son características esenciales de los virus. Su tamaño oscila entre unos 25 nm y 300 nm. (Ingraham e Ingraham, 1998).

El procedimiento (método de la doble capa) consistió en emplear un cultivo de mantenimiento en TSA de *E. coli* (ATCC 13706) para inocular en 8 ml de caldo de tripticasa soja (TSB, Oxoid® pH 7,2 ± 0,2), y posteriormente incubar estos cultivos a 30°C durante las 24 horas previas a la realización del análisis. La composición del medio TSB se describe en la tabla 3.14.

Las muestras del agua de entrada, agua de salida y biorreactor se diluyeron cuando fue necesario hasta un volumen final de 10 ml, se les añadió 5 ml de cloroformo y se agitaron, con el fin de eliminar las bacterias y no los colifagos, capaces de sobrevivir en presencia de cloroformo. A las muestras del biorreactor biológico se les añadió el doble de cloroformo, debido a la mayor cantidad de microorganismos presentes en dichas muestras. Posteriormente, se dejaron las muestras tratadas con cloroformo en reposo durante 20 min a temperatura ambiente, y a continuación se introdujeron en un baño a 47°C durante 10 min. Paralelamente, se fundieron tubos con medio TSA y se mantuvieron a sobrefusión a 47°C en el baño termostato.

**Tabla 3.12. Composición del medio TSB:**

Componente	Cantidad (g/l)
Peptona de Soja	3
D(+)- Glucosa	2,5
Peptona de caseína	17
di-Potasio hidrógeno fosfato	2,5
Sodio cloruro	5

A 10 ml de la muestra (fase acuosa tras el tratamiento con cloroformo) se le añadieron 2 ml del cultivo de *E. coli* en TSB y 10 ml de medio TSA fundido; se agitó para homogeneizar la suspensión, y finalmente se vertió todo el volumen repartido en 3 placas Petri que contenían medio TSA sólido. Tras 3 min de reposo, las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. El recuento se expresó como unidades formadoras de calvas de lisis por mililitro de muestra (UFC/ml).

#### 3.8. Análisis estadístico.

Los datos experimentales obtenidos en los apartados 3.7.1, 3.7.2 y 3.7.5 se sometieron a tratamiento estadístico, empleando el programa *Statgraphics* plus 3.1.

El tratamiento consistió en:

- Análisis de la Varianza (ANOVA) de una vía o multifactorial con interacción, según la naturaleza de cada experimento.
- Test de mínimas diferencias significativas (MDS) entre medias y test de rango múltiple (t de Student) para determinar la influencia por separado de los factores de variación en los análisis multifactoriales.

Los resultados se presentan en gráficas o tablas, indicando en cada caso el número de repeticiones. En todos los casos, se ha calculado la MDS con un nivel de confianza del 95% ( $P < 0,05$ ).

## **4. RESULTADOS**

Para el estudio microbiológico del BMS se plantearon 6 experimentos diferentes que se han detallado en el apartado de material y métodos en la tabla 3.1.

A continuación se va a presentar los resultados de cada parámetro en los dos primeros experimentos.

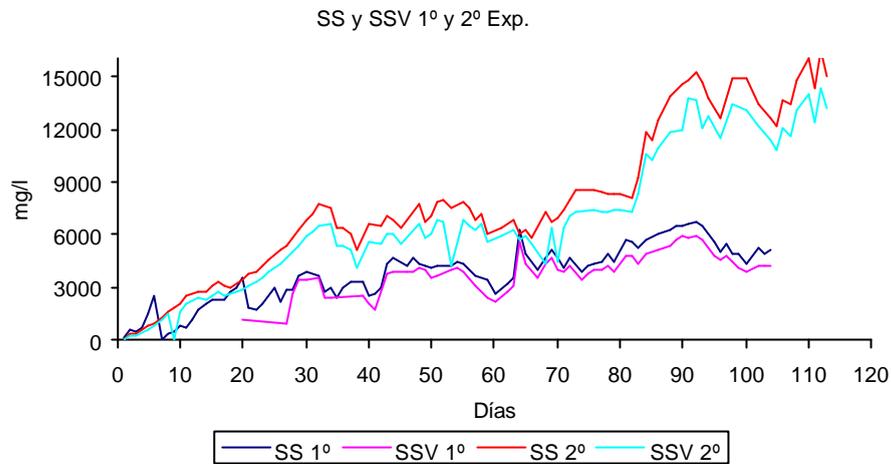
### **4.1. Caracterización físico-química de la planta piloto en el 1º y 2º experimento.**

#### **4.1.1. SS y SSV**

Los parámetros de SS y SSV se utilizaron para diseñar los diferentes experimentos, y su seguimiento y control fue llevado a diario en el biorreactor. Los resultados se muestran en la figura 4.1.

En el 1º experimento, los valores de SS oscilaron entre 115 - 7.500 mg/l y durante este período de tiempo de funcionamiento no se realizaron purgas, para permitir un aumento constante de los SS. En los puntos en los que baja la concentración, como en el día 60, se debió a una pérdida de licor mezcla por generación de espumas.

En el 2º experimento se trabajó aumentando constantemente los SS hasta alcanzar los 6.000 mg/l. Este valor se mantuvo relativamente constante durante 40 días, y en la última fase de la experimentación se alcanzó una concentración máxima de 16.000 mg/l. Para mantener la concentración, se realizaron purgas del licor mezcla, de volúmenes variables. En esta etapa se añadió al biorreactor otro módulo de membrana exactamente con las mismas características que el anterior, como ya se ha especificado en el apartado 3.5. de materiales y métodos.

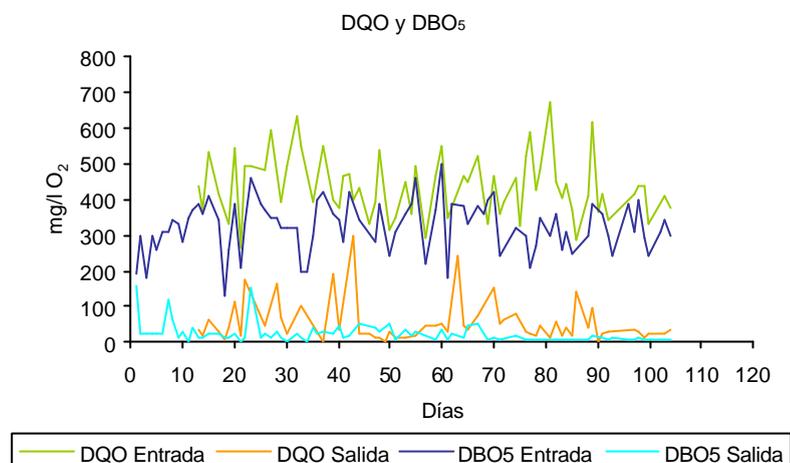


**Figura 4.1. Concentración de SS y SSV (mg/l) en el biorreactor durante el 1º y 2º experimento.**

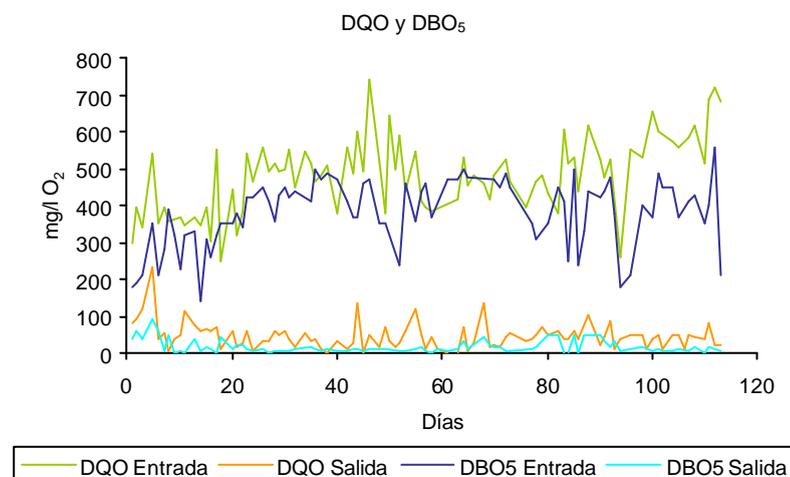
#### 4.1.2. DQO y DBO<sub>5</sub>

Estos parámetros se controlaron diariamente tanto a la entrada como a la salida del BMS para estudiar la calidad del efluente. Los resultados se muestran en las figuras 4.2 y 4.3. Los valores de la DQO y DBO<sub>5</sub> de la entrada oscilaron en los dos experimentos entre 400-800 mg/l, esto es típico de un agua residual de concentración de grado medio (Hernández Muñoz, 1998).

La DQO y DBO<sub>5</sub> del agua de salida está entre los límites de vertido permitidos (25 mg/l para la DBO<sub>5</sub> y 125 mg/l para la DQO Directiva 91/271/CEE) excepto en los primeros días de funcionamiento de la planta en los 2 experimentos, en los cuales la planta aún no había alcanzado la fase estacionaria. En algunos días esporádicos comprendidos entre los días 40-60 del 1º experimento la DQO y la DBO<sub>5</sub> en la salida superan el límite permitido.



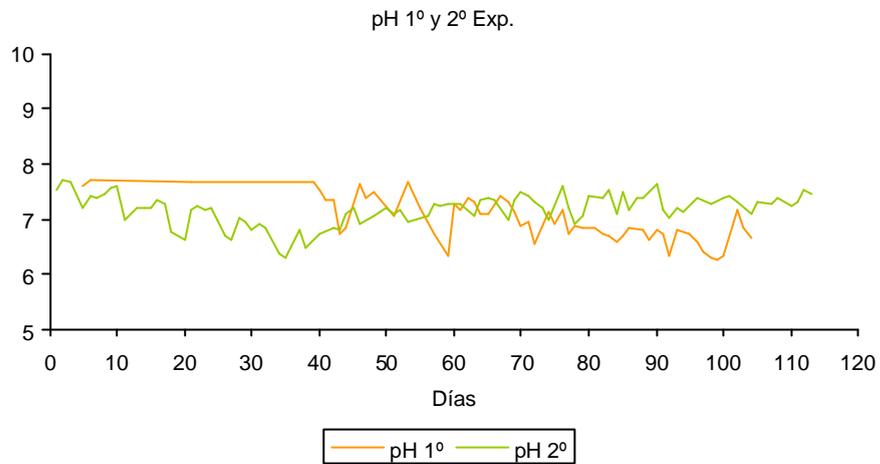
**Figura. 4.2. Concentración de DQO y DBO<sub>5</sub> (mg/l O<sub>2</sub>), en el agua de entrada y agua de salida durante el 1º experimento.**



**Figura. 4.3. Concentración de DQO y DBO<sub>5</sub> (mg/l O<sub>2</sub>), en el agua de entrada y agua de salida durante el 2º experimento.**

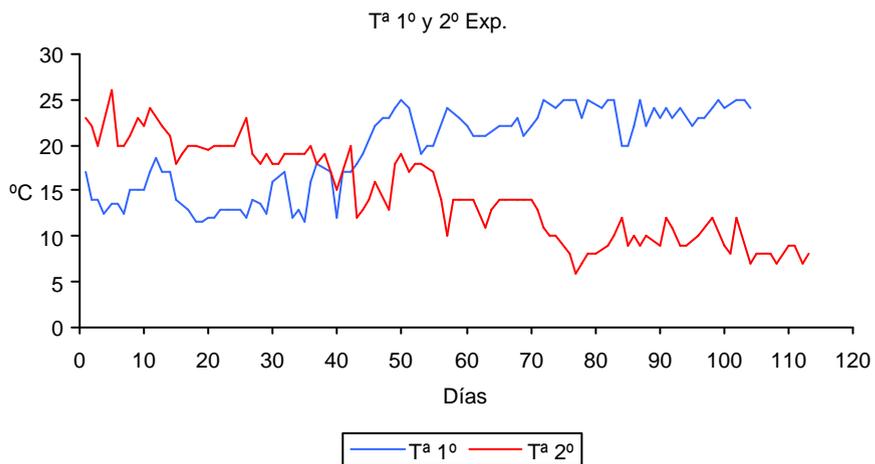
#### 4.1.3. pH, temperatura y oxígeno disuelto

El pH se midió en el biorreactor diariamente, y los valores oscilaron entre 6 - 8 en ambos experimentos. Los resultados se muestran en la figura 4.4.



**Figura 4.4. Medida del pH en el biorreactor durante el 1º y 2º experimento.**

La temperatura también se midió en el biorreactor diariamente, y los resultados se expresan en la figura 4.5. En la primera parte de la investigación la tendencia de la temperatura fue a subir ya que comprendió el periodo de Abril a Julio de 2004. Sin embargo, en la segunda parte de la experimentación la tendencia fue todo lo contrario, porque el periodo de investigación fue de Octubre a Diciembre de 2004.



**Figura 4.5. Medida de la temperatura en °C en el biorreactor durante el 1º y 2º experimento.**

El oxígeno disuelto fue una medida diaria que se tomó en el biorreactor. Este valor osciló entre 0,5 - 5,5 mg/l O<sub>2</sub> en el 1º y 2º experimento, dependiendo entre otros factores de la temperatura del licor mezcla del biorreactor.

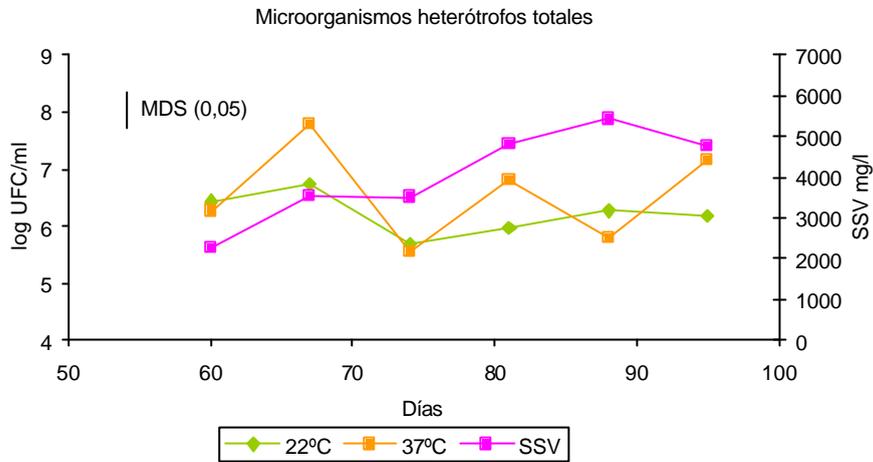
### **4.2. Caracterización biológica del biorreactor**

Para caracterizar biológicamente el sistema BMS se estudiaron los microorganismos heterótrofos totales presentes en el biorreactor, las actividades enzimáticas de la biomasa activa, y la biodiversidad del sistema mediante técnicas de biología molecular.

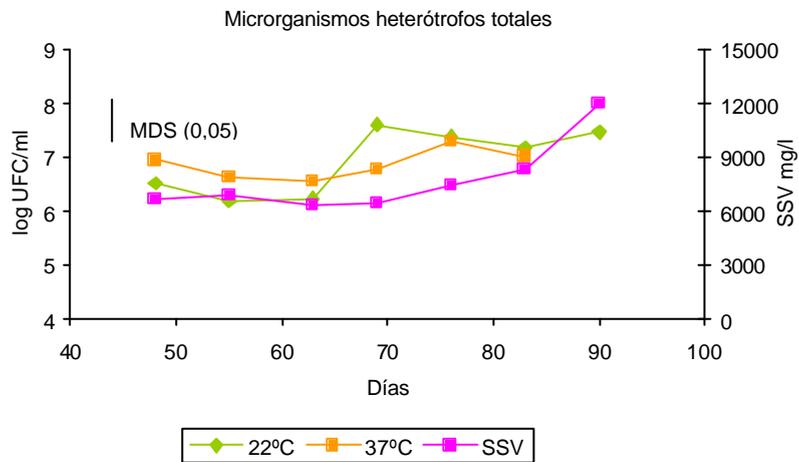
#### **4.2.1. Microorganismos heterótrofos totales (MHT)**

El recuento de MHT se realizó en ambos experimentos incubados a dos temperaturas diferentes, a 22 y 37º C. El período de tiempo de estudio de los MHT fue seleccionado para que hubiera una concentración de SSV en el 1º experimento comprendida entre 2.600-6.200 mg/l (días 60 a 95) y 6.500-8.200 mg/l en el 2º experimento (días 48 a 83). La temperatura del biorreactor durante el 1º experimento fue entre 19-24ºC y durante el 2º experimento entre 5-17ºC.

Los resultados de los MHT se muestran en las figuras 4.6 y 4.7, pudiéndose observar que el número de MHT a 22 y 37ºC fue ligeramente inferior en el 1º experimento



**Figura 4.6.** Número de microorganismos heterótrofos totales detectados a 22 y 37°C en el BMS, en relación con los SSV durante el 1º experimento.



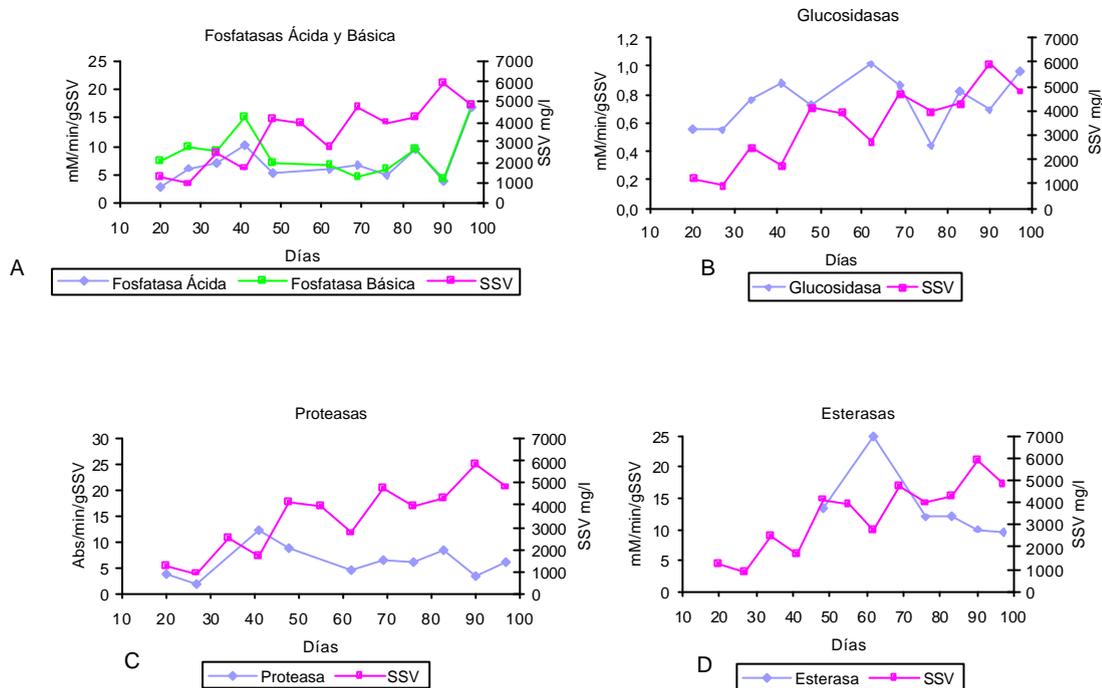
**Figura 4.7.** Número de microorganismos heterótrofos totales detectados a 22 y 37°C en el BMS, en relación con los SSV durante el 2º experimento.

#### **4.2.2. Actividades enzimáticas**

La evolución a través del tiempo en ambos experimentos de las actividades fosfatasa ácida, fosfatasa básica, glucosidasa, proteasa, esterasa y deshidrogenasa se muestra en las figuras 4.8 y 4.9.

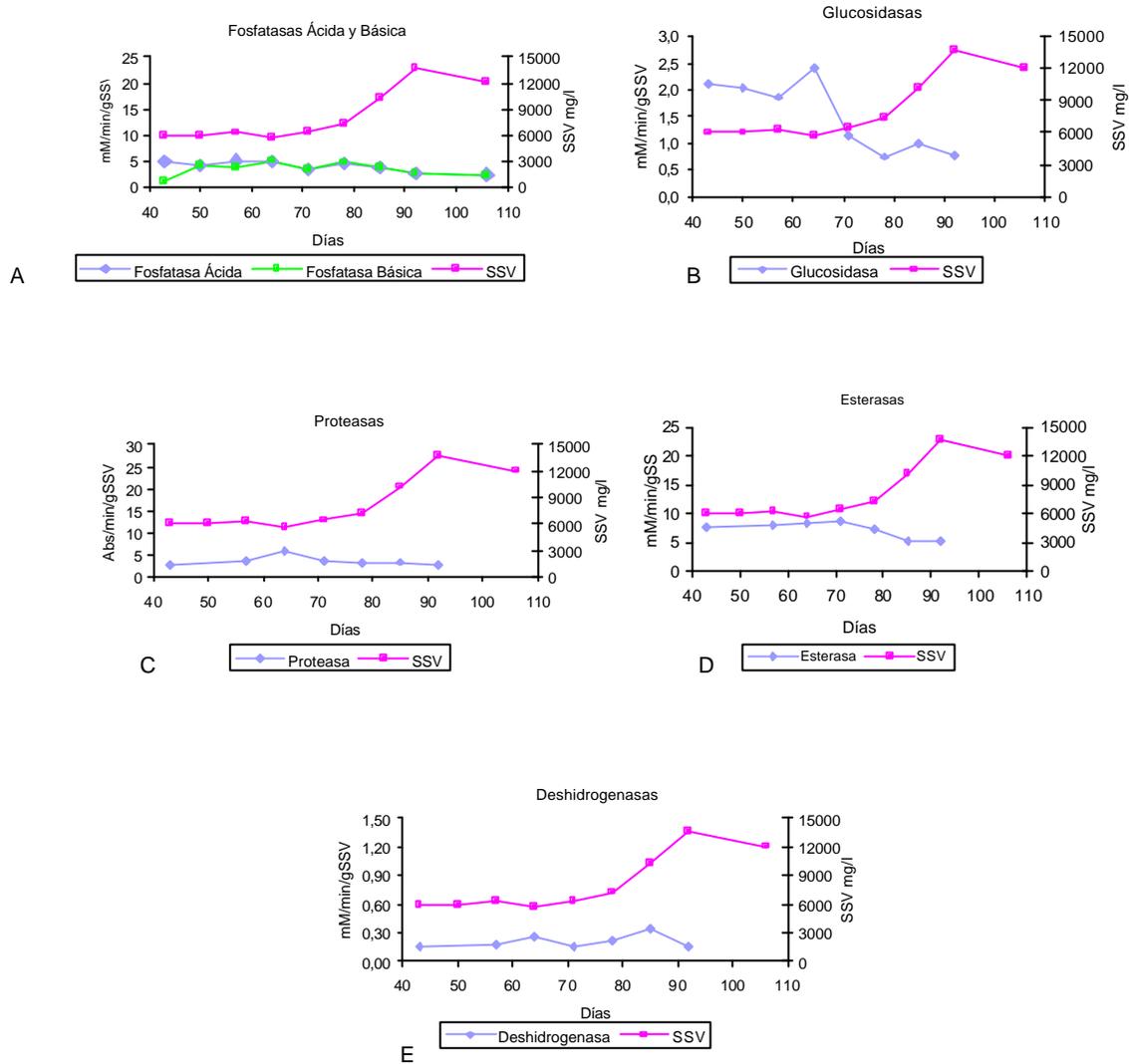
Durante el 1º experimento, las actividades enzimáticas fueron medidas cuando la concentración de SSV oscilaba entre 1.500 – 6.000 mg/l (días del 22 al 99 de funcionamiento de la planta), en cambio en el 2º experimento las actividades se midieron cuando los SSV oscilaban entre 6.000 – 14.000 mg/l (días del 41 al 104).

Se observó que las actividades enzimáticas del 1º experimento fueron significativamente más altas que las del 2º experimento, excepto para la actividad glucosidasa. La media de temperaturas fue considerablemente más baja en el período del 2º experimento (figura 4.5) el cual fue llevado a cabo entre las estaciones de otoño-invierno, influenciando de este modo a la actividad enzimática.



**Figura 4.8. Actividades enzimáticas y SSV en el biorreactor en el 1º experimento. A. Fosfatasa ácida (MDS=0,23), fosfatasa básica (MDS=0,39). B. Glucosidasa (MDS=0,10). C. Proteasa (MDS=0,88). D. Esterasa (MDS=2,3).**

En el 1º experimento, la actividad fosfatasa básica fue ligeramente superior a la ácida. Se produce un incremento de ambas actividades correlacionado con el incremento de la concentración de los SSV, pero sólo durante los días 20-45. Las actividades glucosidasas, proteasas y esterases también se incrementaron junto con la concentración de SSV, pero como se ve en la figura 4.9, las tres tienen una tendencia a bajar después de alcanzarse una cierta concentración de SSV, que sería 4.000 mg/l para la glucosidasa y esterasa, y 3.000 mg/l para la proteasa.



**Figura 4.9. Actividades enzimáticas y SSV en el biorreactor en el 2º experimento. A. Fosfatasa ácida (MDS=0,77), fosfatasa básica (MDS=0,49). B. Glucosidasa (MDS=0,08). C. Proteasa (MDS=0,77). D. Esterasa (MDS=2,2). E. Deshidrogenasa (MDS=0,16).**

Durante el 2º, experimento se produce una fuerte bajada en las actividades glucosidasa, proteasa y esterasa en los últimos 30 días del experimento, que coincidió con una fuerte bajada de las temperaturas (figura 4.5) que oscilaron entre 5-10°C. La actividad deshidrogenasa sólo se midió en el 2º experimento.

Las actividades fosfatasa y deshidrogenasa también decayeron pero solamente en los 20 últimos días de experimentación. La fosfatasa básica fue ligeramente más alta que la ácida, pero la diferencia no fue tan fuerte como en el 1º experimento.

Después de estudiar cada actividad enzimática por separado en ambos experimentos, se pudo observar que cada una de ellas presentaba unas condiciones de actividad óptima diferentes. En la Tabla 4.1 se muestran los valores máximos y las condiciones ambientales que había en el momento de mayor rendimiento para cada actividad.

**Tabla 4.1. Factores ambientales óptimos para las actividades enzimáticas dentro del biorreactor.**

Actividad enzimática	mM/min/gSSV	SSV (mg/l)	T <sup>a</sup> (°C)	pH	Exp.	TRH (h)
Fosfatasa ácida	17,02	4.800	23	6,4	1º	11
Fosfatasa básica	17,33	4.800	23	6,4	1º	11
a-glucosidasa	2,42	5.683	13	7,3	2º	7,5
Proteasa	12,32	1.720	17	7,3	1º	11
Esterasa	24,86	2.733	21	7,4	1º	11
Deshidrogenada	0,33	10.250	9	7,5	2º	7,5

\*Las unidades de las actividades proteasas se expresan en ?Absorbancia/min/ gSSV.

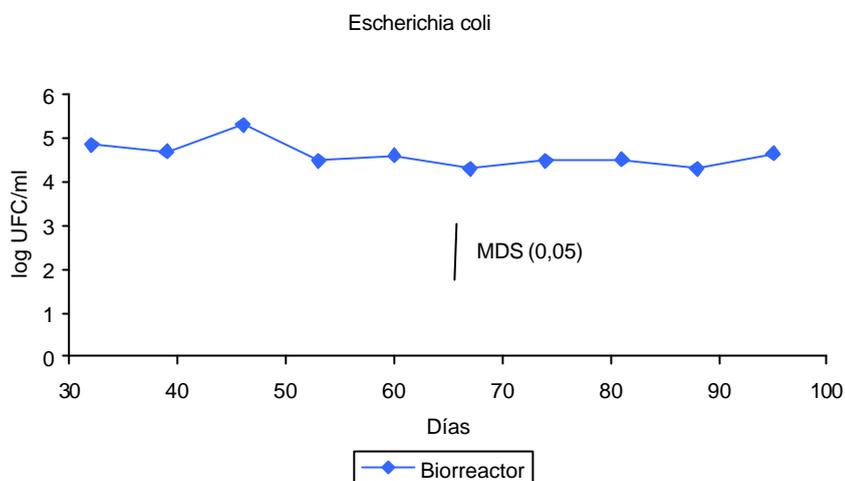
TRH (tiempo de retención hidráulico)

#### 4.2.3. Estudio de indicadores de contaminación fecal

##### 4.2.3.1. *Escherichia coli*

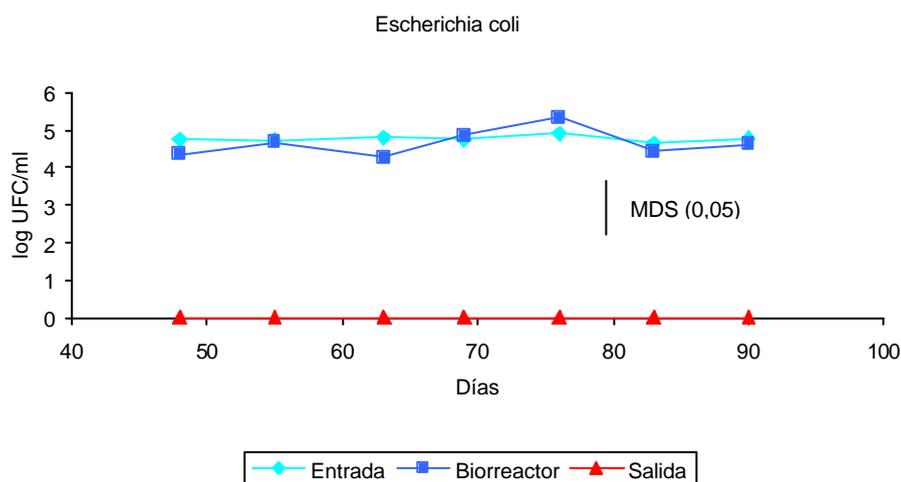
Para estudiar la capacidad del sistema para eliminar microorganismos patógenos, se realizó un recuento semanal del indicador de contaminación fecal *Escherichia coli*.

En el experimento 1 se realizó este recuento sólo en el biorreactor, para conocer en que órdenes de magnitud se presentaba el indicador. El número de *E. coli* en el biorreactor permaneció siempre entre 10<sup>4</sup> y 10<sup>5</sup> UFC/ml, como se puede observar en la figura 4.10.



**Figura 4.10.** Número de *Escherichia coli* detectados en el biorreactor en el 1º experimento.

En la segunda experimentación se estudiaron tres puntos de muestreo; la entrada de la planta piloto, el biorreactor y la salida, para así poder estudiar la capacidad del sistema para eliminar microorganismos patógenos. El resultado se expresa en la Figura 4.11.



**Figura 4.11.** Número de *Escherichia coli* detectados en la entrada, en el biorreactor y en la salida el 2º experimento.

Al utilizar el método de filtración por membrana (UNE-EN ISO 9308-1) se observó que el 93% de la microbiota que crece a 37°C y 44,5°C y resiste a las sales biliares presentes en el medio de cultivo utilizado para el análisis (TBA) corresponde a *E. coli* (prueba del indol positiva).

En este segundo experimento los recuentos de *E. coli* en la entrada y en el biorreactor fueron muy similares y permanecieron en unos órdenes de magnitud semejantes durante toda la experimentación. Así, los porcentajes de colonias que crecen tanto a 37 como a 44,5°C en medio TBA, correspondientes a *E. coli* en la entrada y en el biorreactor, son 97 y 96% respectivamente.

A la salida no se detectó *E. coli* (fig 4.11) aunque si se detectó una microbiota acompañante capaz de crecer en el medio TBA pero que da negativo en la prueba del indol. En la salida el promedio de esta microbiota acompañante fue de 40 UFC/ml. Esta microbiota tan sólo desaparecía al realizar la limpieza química de la membrana con hipoclorito sódico necesaria para el mantenimiento periódico de la misma. La presencia de esta microbiota puede ser debida a la creación de una biopelícula en el interior de la membrana y también a la proliferación de bacterias en el tanque de agua tratada ya que este no tiene condiciones de esterilidad.

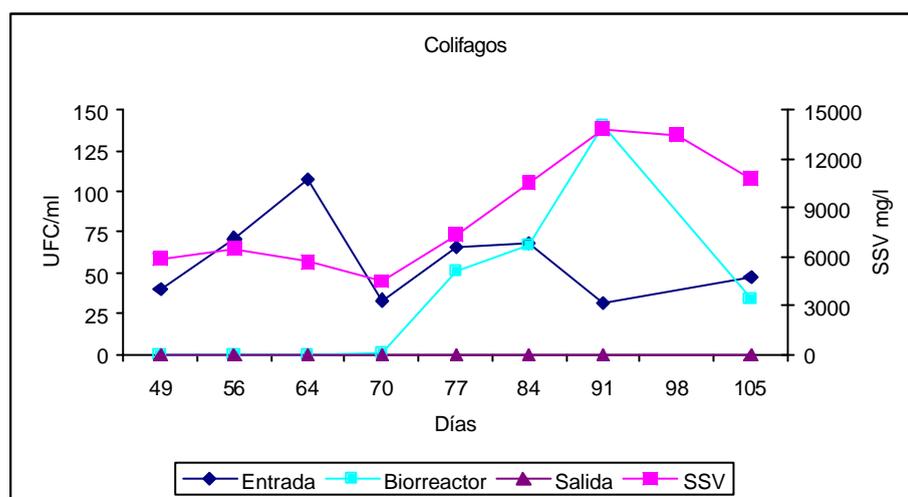
No se produjeron variaciones representativas en el número de *E. coli* al ir aumentando la concentración de SSV en el biorreactor.

### **4.2.3.2. Colifagos**

Para conocer el rendimiento de eliminación de virus por parte del sistema se realizaron recuentos semanales de bacteriófagos en tres puntos de muestreo; la entrada, el biorreactor y la salida. Esta analítica se realizó sólo en el segundo experimento.

En el reactor biológico se observó un aumento considerable de colifagos a partir del día 70. Este hecho también estuvo unido a un aumento en los SSV (figura 4.12).

A la salida del BMS hay una ausencia completa de colifagos. Esto indica que la membrana de ultrafiltración es capaz de retener este tipo de indicadores de contaminación fecal y presumiblemente a la mayoría de los virus, ya que su tamaño oscila entre unos 25 nm y 300 nm (Ingraham y Ingraham, 1998) y el tamaño de poro de la membrana es de 40 nm.



**Figura 4.12. Número de colifagos detectados en la entrada, en el biorreactor y en la salida y SSV del biorreactor durante el 2º experimento. (MDS=62,38).**

Los experimentos 1º y 2º se plantearon de una manera diferente a los experimento 3º, 4º 5º y 6º. En los dos primeros experimentos se estudiaron los diferentes parámetros microbiológicos en períodos escogidos por tener una determinada concentración de SSV, en cambio en el resto de los experimentos se amplió el período de estudio a todo el tiempo que duró cada experimento.

A continuación se van a exponer los resultados de los experimentos 3º, 4º, 5º y 6º.

### **4.3. Caracterización físico-química de la planta piloto en los experimentos 3º, 4º, 5º y 6º.**

#### **4.3.1. SS y SSV:**

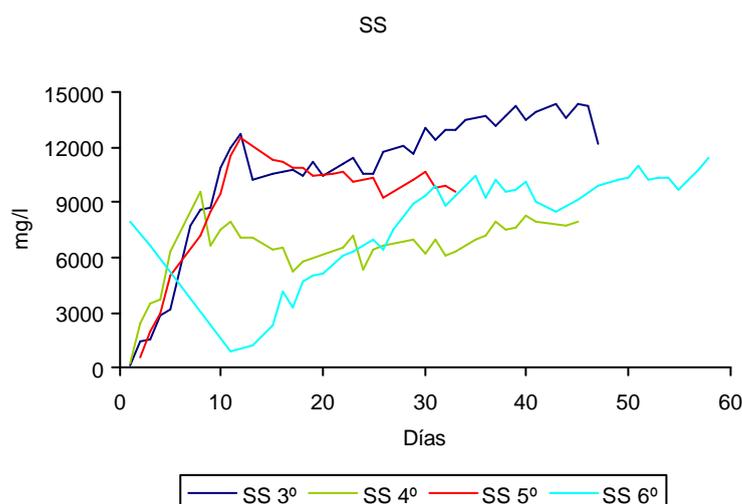
Los valores de SS en el 3º experimento fluctuaron entre 210-15.000 mg/l. En los 10 primeros días la concentración subió rápidamente hasta superar los 12.000 mg/l y en

los 40 días posteriores se mantuvo entre 10.000 – 15.000 mg/l, alcanzándose en esta última etapa la concentración máxima (fig. 4.13). Los SSV del 3º experimento tuvieron un comportamiento semejante a los SS, en los 10 primeros días se produjo una brusca subida de los SSV hasta alcanzar 10.000 mg/l y los 40 días siguientes se mantuvieron entre 9.000 – 11.000 mg/l (fig. 4.14).

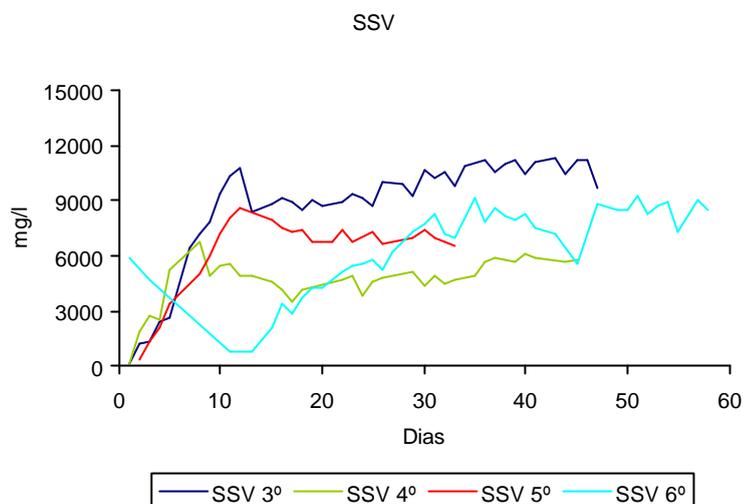
En el 4º experimento los SS alcanzaron un máximo de 10.000 mg/l, subiendo la concentración rápidamente en los 8 primeros días hasta llegar al pico más alto en toda la experimentación y los 30 días siguientes oscilaron entre 5.000 – 10.000 mg/l (fig. 4.13). Los SSV del 4º experimento tuvieron un comportamiento similar a los SS del 4º experimento manteniéndose en los últimos 30 días entre 3.500 – 6.500 mg/l (fig. 4.14).

La concentración de SS y SSV del 5º experimento fue muy parecida al del 3º en los 10 primeros días, pero en los 20 días posteriores la tendencia de los SS fue a bajar. En estos días la concentración varió entre 10.000 y 12.000 mg/l (fig. 4.13)

En el 6º experimento desde el día 3 hasta el día 11 se produjo una fuerte baja de SS y SSV debido a una pérdida del licor mezcla producida por un fallo en la bomba de alimentación de la planta, a partir de este día la tendencia de los SS fue a subir hasta alcanzar los 12.000 mg/l. La subida de los SS fue más lenta que en el resto de los experimentos (fig. 4.13 y 4.14).



**Figura 4.13. Concentración de SS (mg/l) en el biorreactor durante el 3º, 4º, 5º y 6º experimento.**

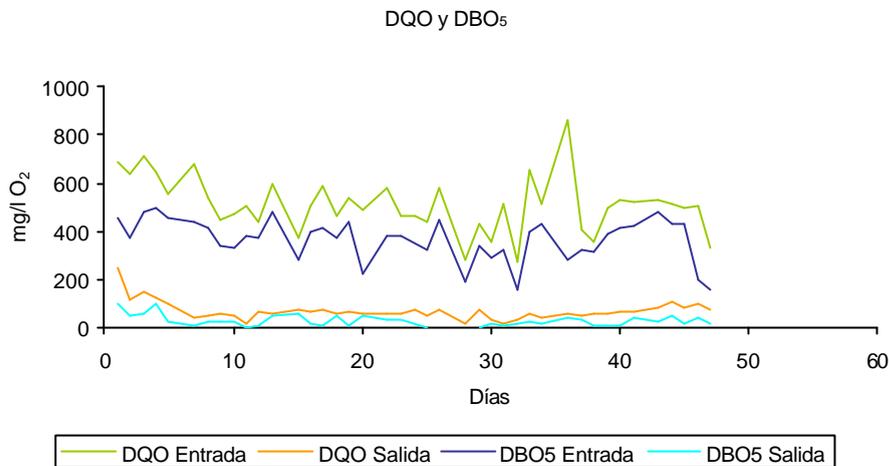


**Figura 4.14. Concentración de SSV (mg/l) en el biorreactor durante el 3º, 4º, 5º y 6º experimento.**

#### 4.3.2. DQO y DBO<sub>5</sub>:

En estos 4 experimentos se controló la DQO y DBO<sub>5</sub> de entrada y salida diariamente. Los resultados se muestran en las figuras 4.15, 4.16, 4.17 y 4.18.

En el 3º experimento (fig. 4.15) el promedio de DQO y DBO<sub>5</sub> del agua de entrada fueron 500 y 360 mg/l respectivamente. Los valores promedio de DQO y DBO<sub>5</sub> de salida durante el experimento fueron de 70 y 30 mg/l respectivamente, la DQO de salida está dentro de los límites permitidos, en cambio la DBO<sub>5</sub> es ligeramente superior, esto se debe a que los 10 primeros días de funcionamiento de la planta se superaron los límites permitidos al no estar la planta en estado estacionario.

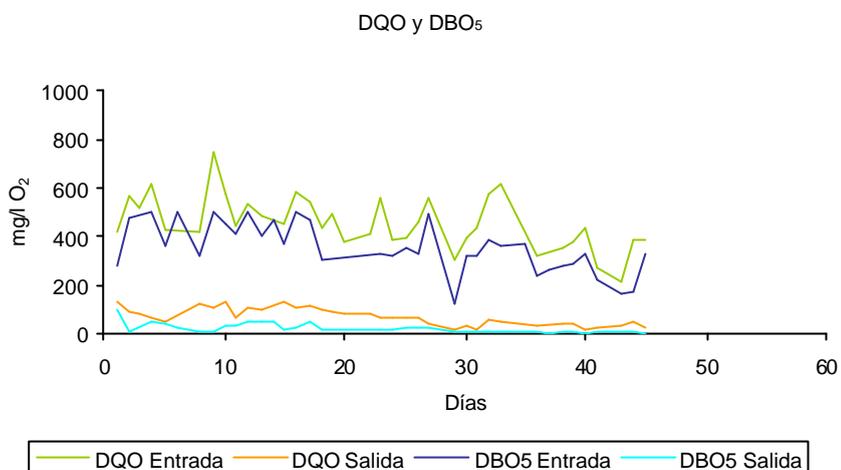


**Figura 4.15. Concentración de DQO y DBO<sub>5</sub> (mg/l O<sub>2</sub>), en el agua de entrada y agua de salida durante el 3º experimento.**

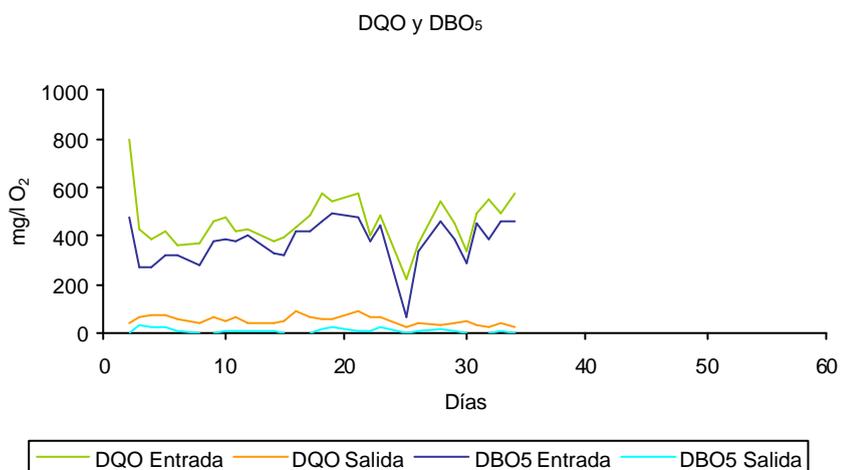
Los valores promedio en el 4º experimento (fig. 4.15) para DQO y DBO<sub>5</sub> de entrada y salida fueron 450, 350, 65 y 20 mg/l. En este experimento el agua de salida cumple los requisitos de límites de vertido permitidos.

En los experimento 5º y 6º los valores fueron muy semejantes al 4º experimento (fig 4.16 y 4.17).

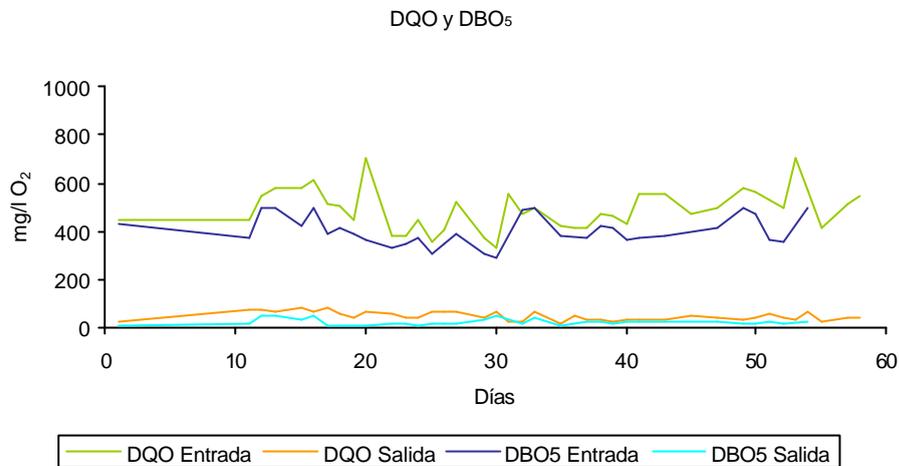
En todos los experimentos el agua de entrada tiene una contaminación de grado medio (Hernández Muñoz, 1998) y el agua de salida cumple los requisitos de la directiva 91/271/CEE, exceptuando los primeros días de funcionamiento en los cuales la planta aún lo había alcanzado el estado estacionario.



**Figura 4.16.** Concentración de DQO y DBO<sub>5</sub> (mg/l O<sub>2</sub>), en el agua de entrada y agua de salida durante el 4<sup>o</sup> experimento.



**Figura 4.17.** Concentración de DQO y DBO<sub>5</sub> (mg/l O<sub>2</sub>), en el agua de entrada y agua de salida durante el 5<sup>o</sup> experimento.



**Figura 4.18. Concentración de DQO y DBO<sub>5</sub> (mg/l O<sub>2</sub>), en el agua de entrada y agua de salida durante el 6º experimento.**

#### 4.3.3. pH, temperatura y oxígeno disuelto

Estos parámetros al igual que en los experimentos 1º y 2º se controlaron diariamente. Los valores se representan en las figuras 4.19, 4.20 y 4.21. En todos los experimentos el valor promedio del pH oscila entre 7,2 y 7,5.(fig. 4.19)

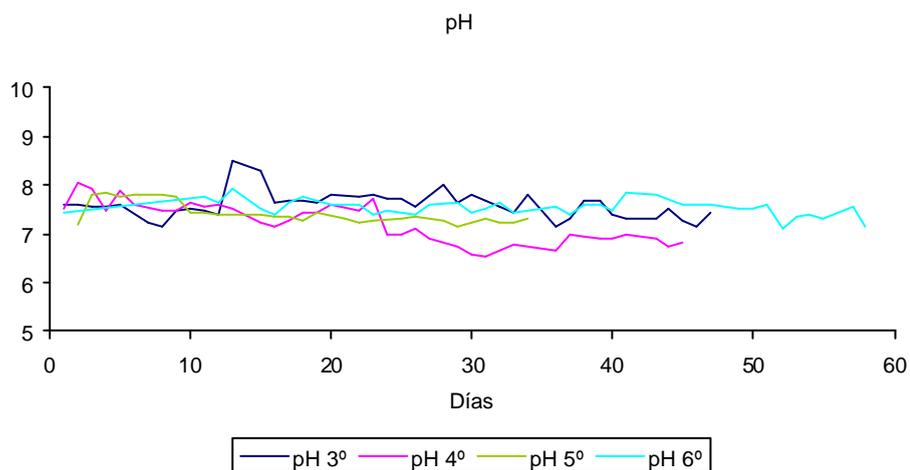
Los valores de temperatura (fig. 4.20) fueron muy diferentes entre los distintos experimentos ya que se realizaron en diferentes épocas del año. En el 3º experimento la temperatura del biorreactor osciló entre 13-26°C, este experimento se realizó durante el período de primavera. En el 4º experimento la temperatura subió gradualmente hasta alcanzar en el punto más alto 27°C, oscilando los valores entre 20-27°C. Este experimento tuvo lugar en el período de verano. Los experimentos 5º y 6º se realizaron en la época de otoño-invierno, por lo cual la temperatura tendió a bajar paulatinamente oscilando en el 5º experimento entre 14-23°C y en el 6º entre 4-19°C. Los valores del oxígeno disuelto en el biorreactor durante los experimentos se muestran en la figura 4.21. Para controlar la cantidad de oxígeno en el biorreactor y tratar de evitar que no disminuyera de 2 mg/l se utilizó un compresor.

En el 3º experimento la concentración varió entre 0,4 y 5,5 apareciendo los valores más altos en los primeros días del experimento en los cuales la concentración de SS fueron las más bajas del experimento (fig. 4.13). Por el contrario los valores más bajos de oxígeno se detectaron en el intervalo de los días 24-28.

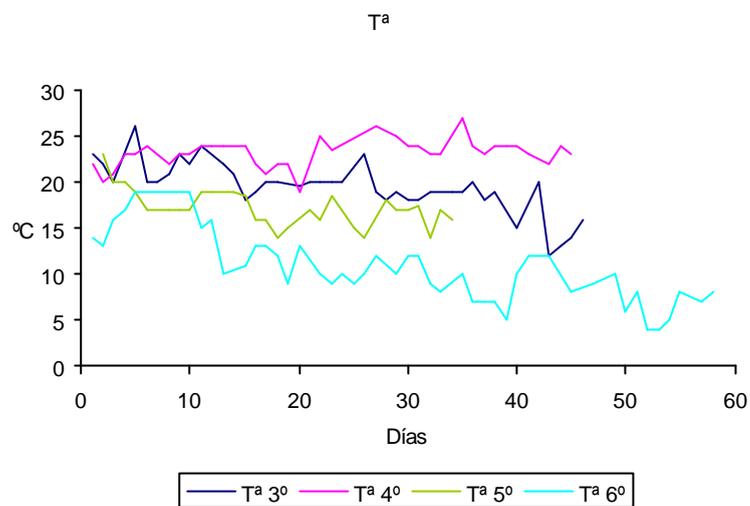
En el 4º experimento los valores de oxígeno fluctuaron entre 0,5-8 mg/l, coincidiendo con los valores más altos de oxígeno con los primeros días del experimento. A partir del día 20 hasta el final del experimento los valores de oxígeno permanecieron entre 1,3 -3,5.

En el 5º experimento también se dieron las concentraciones más elevadas de oxígeno en los primeros 10 días y posteriormente presentó una tendencia a estabilizarse a partir del día 15 hasta el final del experimento oscilando los valores entre 1,5 –3,6.

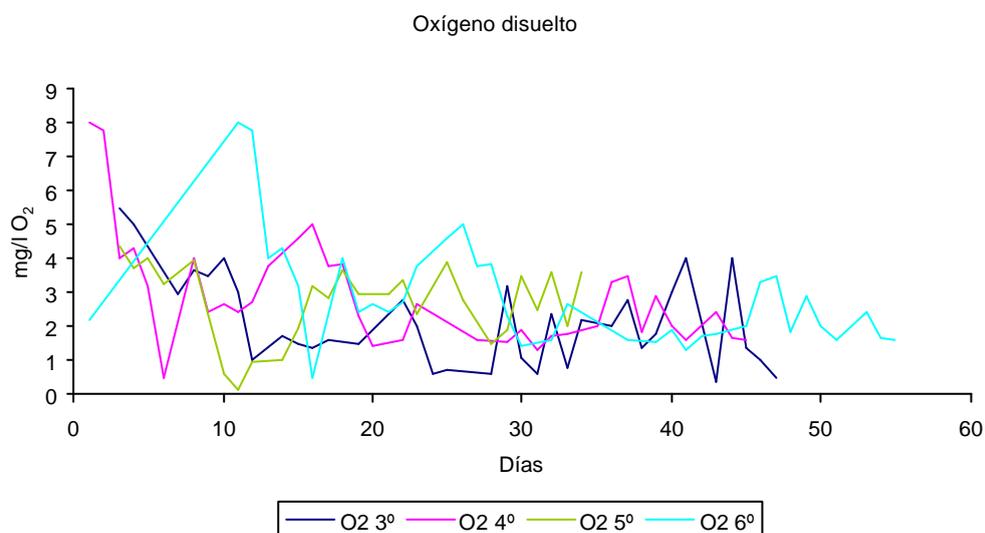
Los valores más altos de oxígeno se dieron en el 6º experimento, presentando de nuevo los valores más altos en los 15 primeros días y tendiendo a estabilizarse a partir del día 30, oscilando entre 1,3-3,8.



**Figura 4.19. Medida del pH en el biorreactor durante el 3º, 4º, 5º y 6º experimentos.**



**Figura 4.20. Medida de la temperatura en °C en el biorreactor durante el 3º, 4º, 5º y 6º experimento.**



**Figura 4.21. Medida del oxígeno disuelto (mg/l) en el biorreactor durante el 3º, 4º, 5º y 6º experimento.**

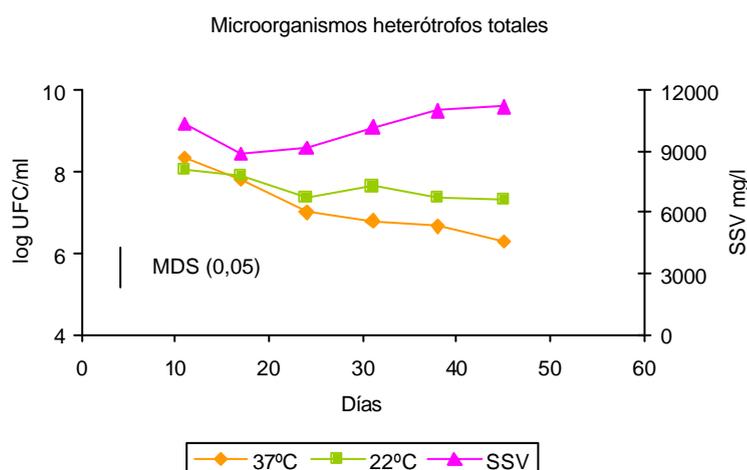
#### 4.4. Caracterización biológica del biorreactor

##### 4.4.1. Microorganismos heterótrofos totales

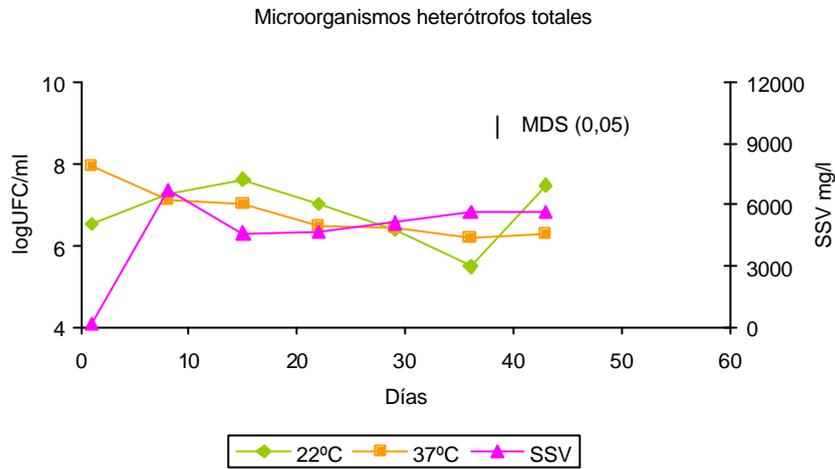
En el 1º y 2º experimento se estudiaron los MHT a unas concentraciones de SS específicas, en cambio en los restantes experimentos se amplió el estudio de los MHT al período completo de cada experimento.

Los valores de los MHT de los experimentos 3º, 4º, 5º y 6º se representan en las figuras 4.22, 4.23, 4.24, 4.25. En todos los casos hay una diferencia significativa entre los MHT que crecen a 22º y a 37ºC. Los valores más pequeños se dieron entre los días 25 y 40, del 4º experimento llegando a unos valores de 5,49 UFC/ml para los MHT que crecen a 22ºC y 6,19 UFC/ml para los de 37ºC. En este período de tiempo las temperaturas fueron las más altas de los 4 experimentos, fluctuando entre 23-27ºC.

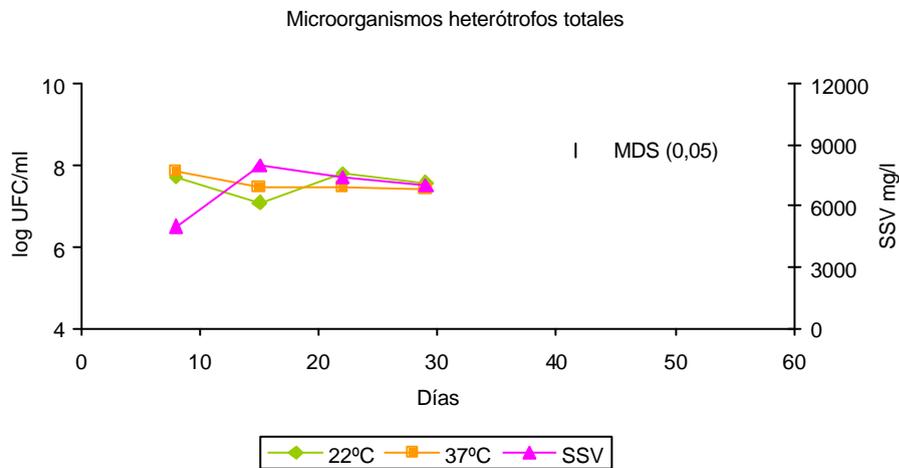
El número de MHT a 22º y 37ºC más elevado se produjo en 6º experimento, el pico más alto se dio entre los días 10-30, durante este período la concentración de SSV tendió a subir rápidamente pasando de 700 mg/l a 8.000 mg/l. La temperatura en esos días osciló entre 10-20ºC. En el 3º y 4º experimento los MHT capaces de crecer a 22ºC fueron superiores a los MHT a 37ºC.



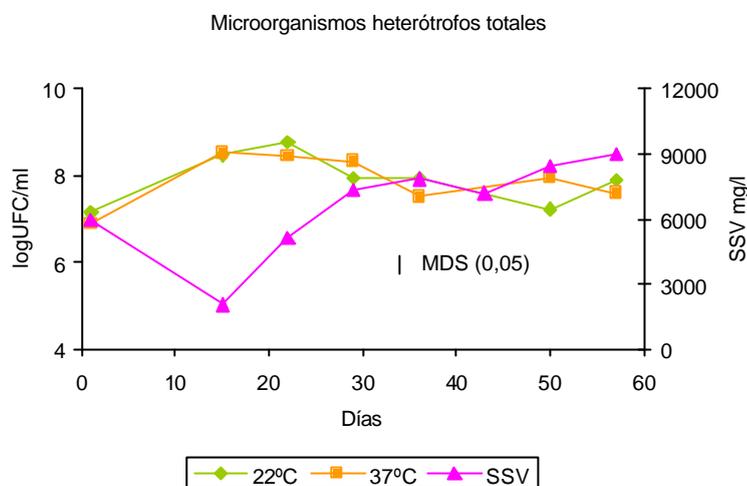
**Figura 4.22. Número de microorganismos heterótrofos totales detectados a 22 y 37ºC en el BMS, en relación con los SSV durante el 3º experimento.**



**Figura 4.23.** Número de microorganismos heterótrofos totales detectados a 22 y 37°C en el BMS, en relación con los SSV durante el 4º experimento.



**Figura 4.24.** Número de microorganismos heterótrofos totales detectados a 22 y 37°C en el BMS, en relación con los SSV durante el 5º experimento.



**Figura 4.25. Número de microorganismos heterótrofos totales detectados a 22 y 37°C en el BMS, en relación con los SSV durante el 6º experimento.**

#### 4.4.2. Actividades enzimáticas

La evolución a través del tiempo en los 4 experimentos de las actividades fosfatasa ácida, fosfatasa básica, glucosidasa, proteasa, esterasa y deshidrogenasa se muestra en las figuras 4.26, 4.27, 4.28 y 4.29.

En el 1º y 2º experimento se estudiaron las actividades enzimáticas a unas concentraciones de SS específicas, en cambio en los restantes experimentos se amplió el estudio de las actividades enzimáticas al período completo de cada experimento.

Se observó que las actividades enzimáticas del 4º experimento fueron significativamente más altas que las de los experimentos 3º, 5º y 6º. La media de temperaturas fue considerablemente más baja en el período del 5º y 6º experimento (figura 4.20) los cuales fueron llevados a cabo entre las estaciones de otoño-invierno, influenciando de este modo la actividad enzimática. En concreto el promedio de las actividades fosfatasa ácida, proteasa y esterasa fueron más altas en el experimento 4º y la actividad deshidrogenasa en el 3º experimento., en cambio el promedio más alto para la glucosidasa y la fosfatasa básica se dio en el 6º experimento. Esta tendencia

de las actividades enzimáticas en relación a la estación del año en la que se realizaron los experimentos también se observó en los experimentos 1º y 2º, siendo las actividades más bajas en las estaciones más frías del año.

La única actividad que no disminuye en relación con la temperatura fue la glucosidasa, que alcanzó sus valores más altos en el 2º y 6º experimento (tablas 4.1 y 4.2).

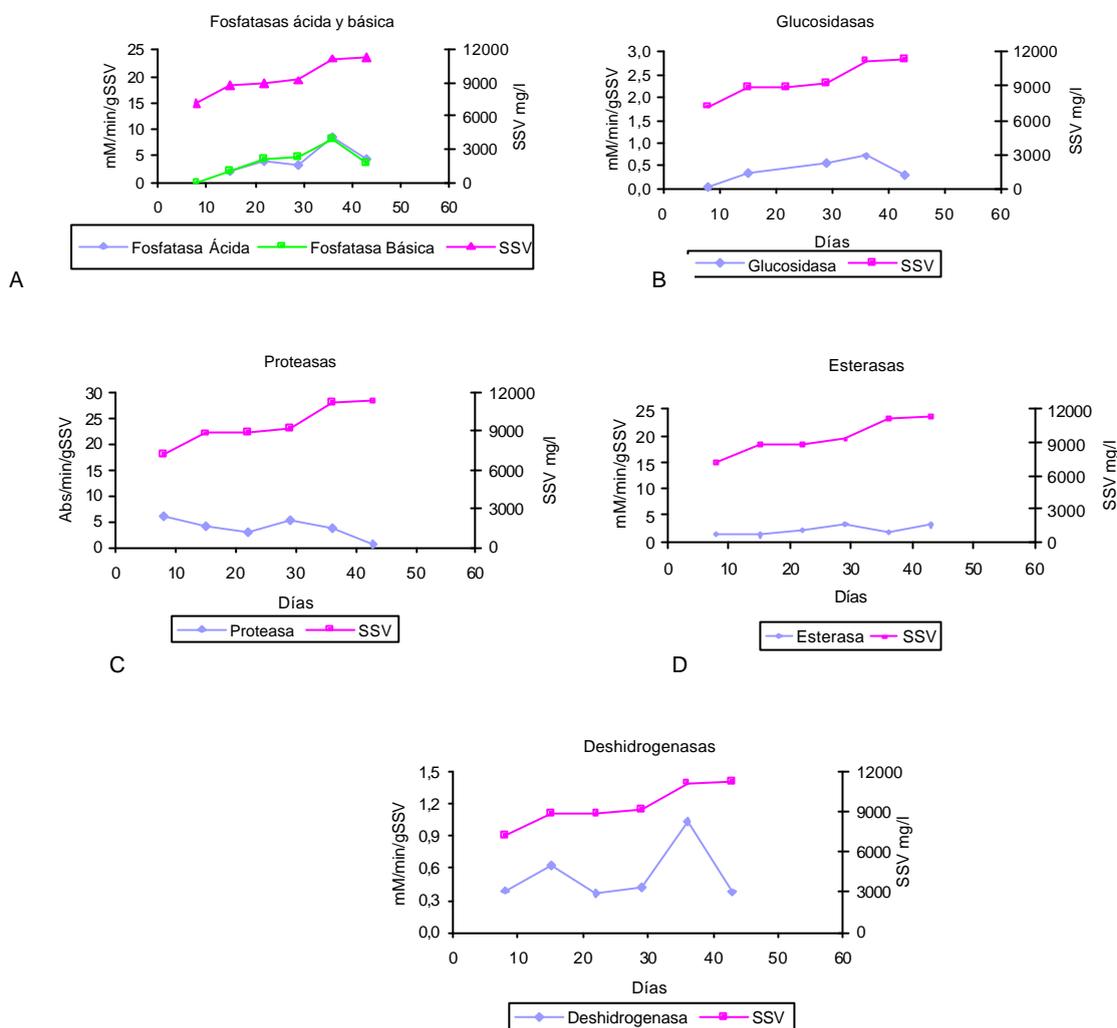
En el 3º experimento (fig. 4.26) las actividades fosfatasa ácida y básica fueron muy similares, siendo un poco más elevada la fosfatasa básica sólo en el día 29. En las actividades fosfatasa ácida y básica, glucosidasa y deshidrogenasa se produce un incremento correlacionado con un aumento de la concentración de SSV durante los días 10-35. Ocurre lo mismo con las actividades proteasa y esterasa que presentan una tendencia a bajar después de cierta concentración de SSV, que sería 7.250 mg/l para la proteasa y 9.250 mg/l para la esterasa.

En el 4º experimento (fig. 4.27) la actividad fosfatasa ácida fue ligeramente superior a la fosfatasa básica.

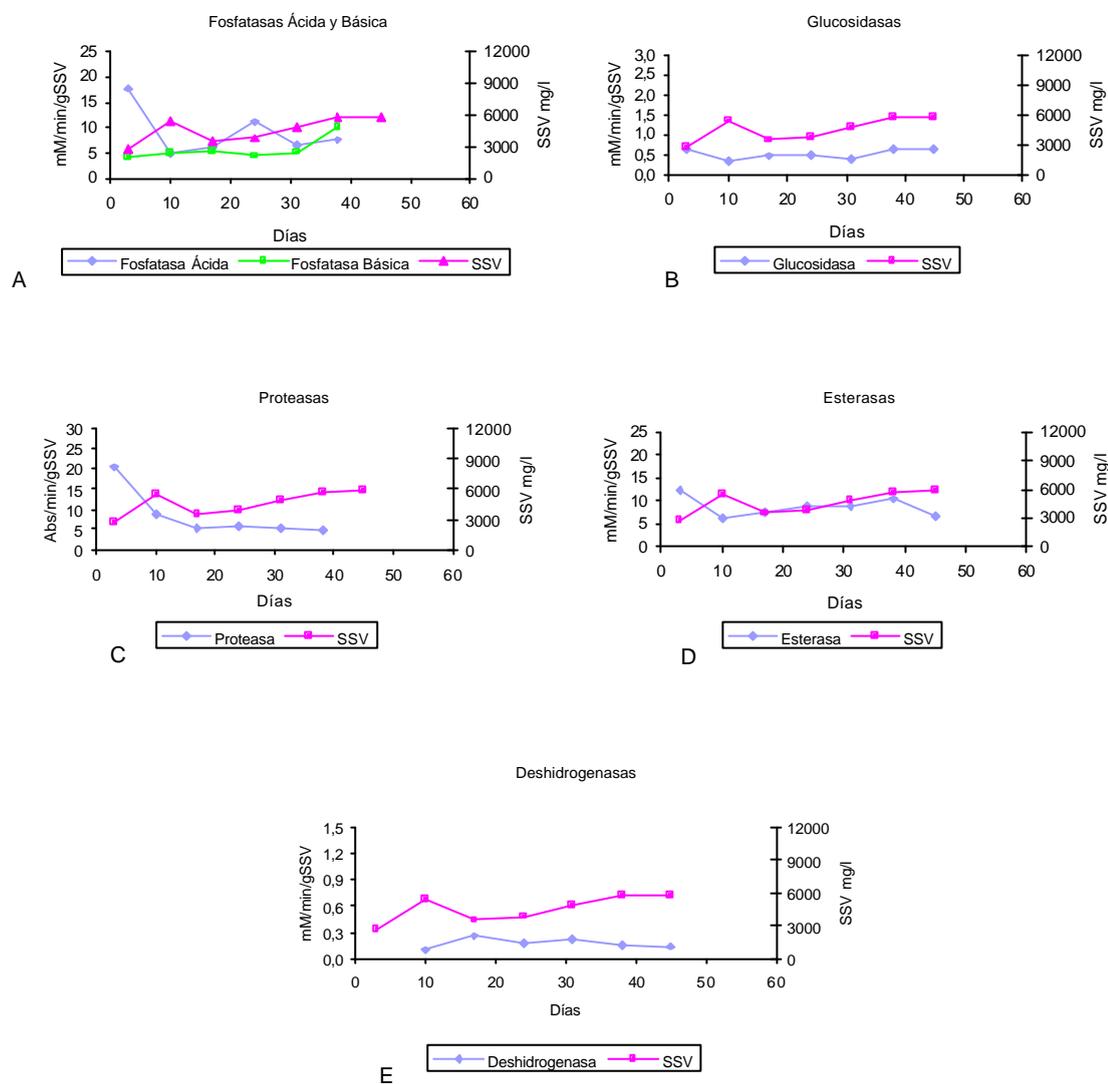
Todas las actividades decayeron a partir del día 10 coincidiendo con una concentración de SSV de 5.467 mg/l, excepto para la actividad deshidrogenasa que se mantuvo sin muchas variaciones durante todo el experimento.

Durante el 5º experimento (fig. 4.28) las actividades fueron más bajas que en los 2 experimentos anteriores. Durante este experimento la concentración de SSV se mantuvo en valores estables entre 7.200 – 7.400 mg/l. En este experimento no se apreciaron fuertes variaciones en las actividades enzimáticas.

En el 6º experimento (fig. 4.29) como ya se comentó anteriormente el primer día de funcionamiento de la planta, los SSV eran altos ya que el único parámetro de funcionamiento de la planta que se cambió fue el caudal, por esta razón las actividades fueron similares a las del 5º experimento. En el día 10 del 6º experimento se produjo una pérdida de licor mezcla, llegando tan sólo a 780 mg/l de SSV. En este día se observa una subida de todas las actividades excepto para la deshidrogenasa. A partir del día 24 todas las actividades decaen coincidiendo con una concentración de SSV de 5.550 mg/l.



**Figura 4.26. Actividades enzimáticas y SSV en el biorreactor en el 3<sup>o</sup> experimento. A. Fosfatasa ácida (MDS=0,30), fosfatasa básica (MDS=0,69). B. Glucosidasa (MDS=0,10). C. Proteasa (MDS=0,59). D. Esterasa (MDS=1,33). E. Deshidrogenasa (MDS=0,14).**



**Figura 4.27. Actividades enzimáticas y SSV en el biorreactor en el 4º experimento. A. Fosfatasa ácida (MDS=0,56), fosfatasa básica (MDS=0,46). B. Glucosidasa (MDS=0,09). C. Proteasa (MDS=6,12). D. Esterasa (MDS=9,27). E. Deshidrogenasa (MDS=0,05).**

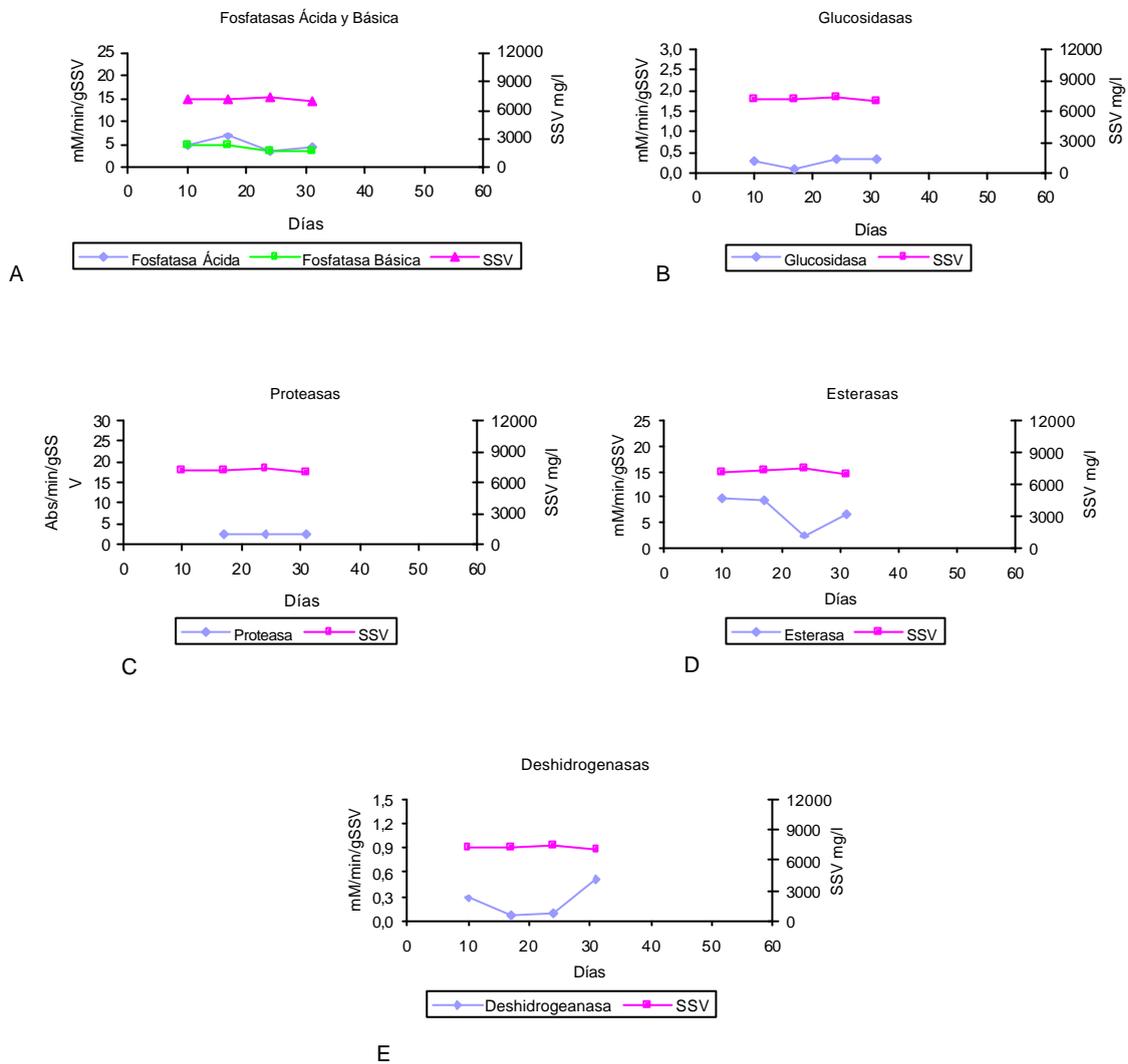
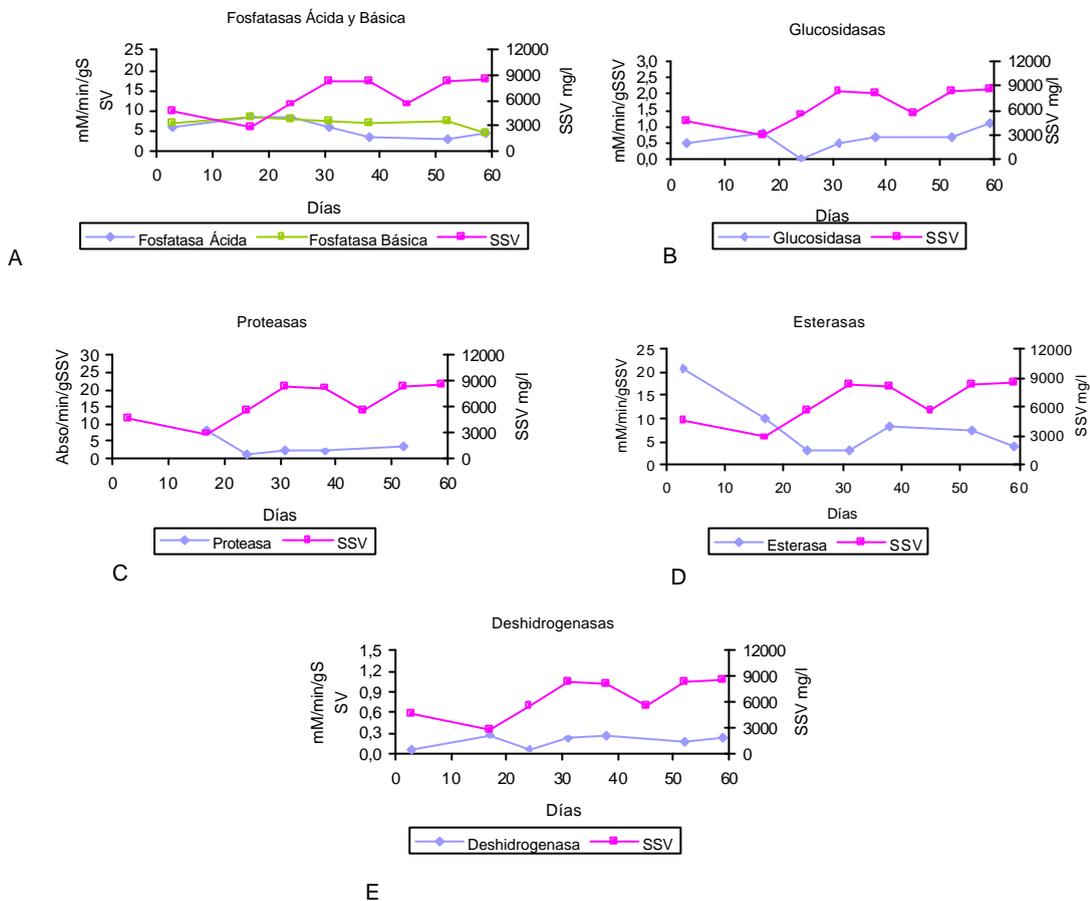


Figura 4.28. Actividades enzimáticas y SSV en el biorreactor en el 5º experimento. A. Fosfatasa ácida (MDS=0,39), fosfatasa básica (MDS=0,35). B. Glucosidasa (MDS=0,07). C. Proteasa (MDS=0,28). D. Esterasa (MDS=3,47). E. Deshidrogenasa (MDS=0,09).



**Figura 4.29. Actividades enzimáticas y SSV en el biorreactor en el 6º experimento. A. Fosfatasa ácida (MDS=0,90), fosfatasa básica (MDS=0,99). B. Glucosidasa (MDS=0,13). C. Proteasa (MDS=0,51). D. Esterasa (MDS=5,31). E. Deshidrogenasa (MDS=0,10).**

Después de estudiar cada actividad enzimática por separado en los 4 experimentos, se pudo observar que cada una de ellas presentaba unas condiciones de actividad óptimas diferentes. En la Tabla 4.2 se muestran los valores máximos y las condiciones ambientales existentes en el momento de mayor rendimiento para cada actividad.

**Tabla 4.2. Factores ambientales óptimos para las actividades enzimáticas dentro del biorreactor en los experimentos 3º, 4º, 5º y 6º.**

Actividad enzimática	mM/min/gSSV	SSV (mg/l)	Tª (°C)	pH	O <sub>2</sub> (mg/l)	Exp	TRH
Fosfatasa ácida	17,78	2.733	18	7,9	4,1	4º	14,4
Fosfatasa básica	10,01	5.767	18	6,9	1,9	4º	14,4
a-glucosidasa	1,08	8.533	7	7,2	1,6	6º	7,5
Proteasa	20,44	1.440	18	7,6	7,5	3º	7,5
Esterasa	23,22	2.733	18	7,9	4,1	4º	14,4
Deshidrogenasa	1,04	11.200	20	7,2	2	3º	7,5

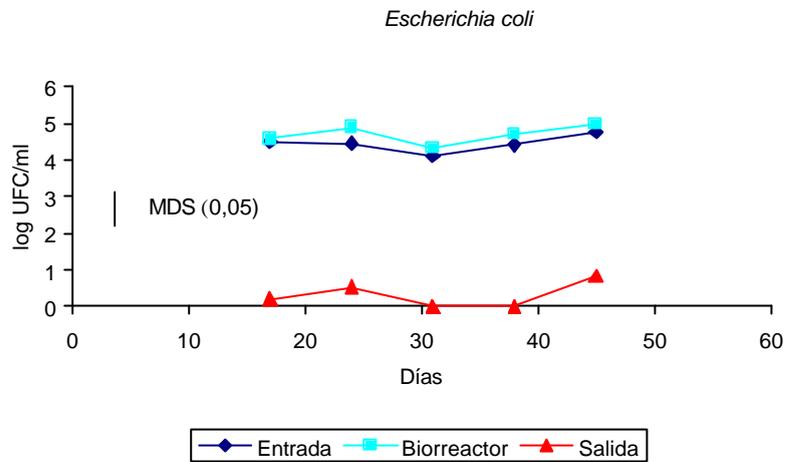
#### 4.4.3. Estudio de indicadores de contaminación fecal

##### 4.4.3.1. *Escherichia coli*

Los resultados de los recuentos realizados del indicador de contaminación fecal *E. coli* durante los experimentos 3º, 4º, 5º y 6º se muestran en las figuras 4.30, 4.31, 4.32 y 4.33.

En el 3º experimento se observó que los números de *E. coli* detectables tanto a la entrada como en el biorreactor eran muy similares. Los porcentajes de colonias correspondientes a *E. coli* que crecen tanto a 37 como a 44,5°C en medio TBA, en la entrada y en el biorreactor, fue del 98% para ambos puntos de muestreo. En la salida se detectó *E. coli* entre los días 17 y 24 y en el día 45 del experimento. Además de la presencia de *E. coli*, también aparecía la microbiota acompañante esos mismos días. En el resto de los días del experimento había una ausencia absoluta tanto de *E. coli* como de la microbiota acompañante.

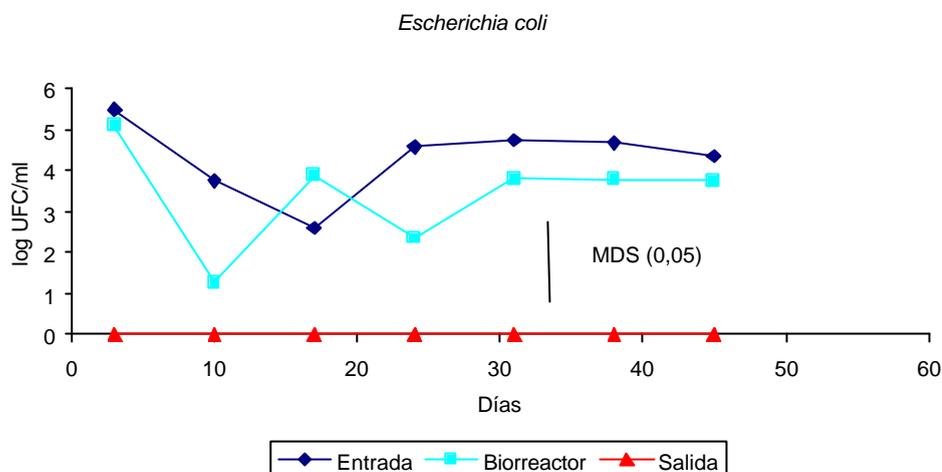
La presencia de estos microorganismos a la salida se pudo deber a la creación de una biopelícula en el lado interno (cara limpia) de la membrana, debido a que el contralavado se realizaba con el agua que se encontraba en el tanque de agua tratada el cual no estaba en condiciones de esterilidad.



**Figura 4.30. Número de *Escherichia coli* detectados en la entrada, en el biorreactor y en la salida durante el 3º experimento.**

El promedio de los porcentajes de colonias pertenecientes a *E. coli* en el ensayo fueron en la entrada y en el biorreactor de 91 y 81% respectivamente. En el día 10 se produjo una fuerte bajada del número de *E. coli*. Que fue más pronunciada en el biorreactor que en el influente.

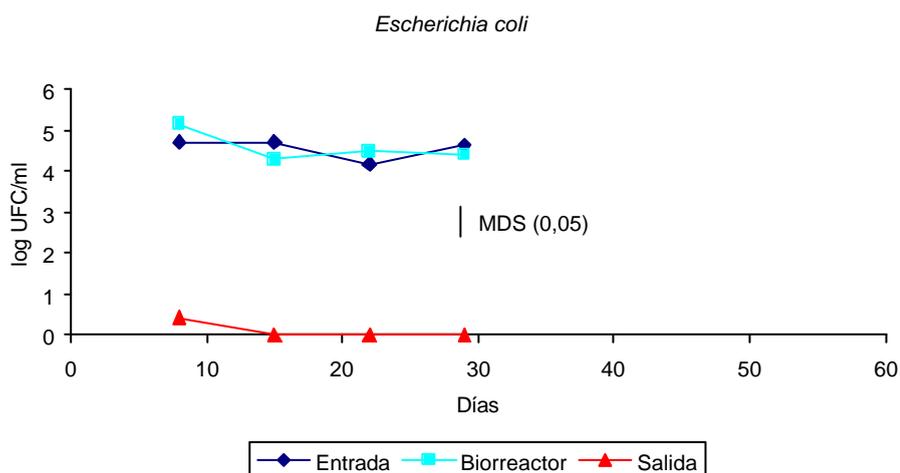
Durante el experimento 4º no se detectó *E. coli* a la salida de la planta, pero si fue detectado en las 2 últimas semanas la microbiota acompañante en un promedio de 6 UFC/ml.



**Figura 4.31.** Número de *Escherichia coli* detectados en la entrada, en el biorreactor y en la salida durante el 4º experimento.

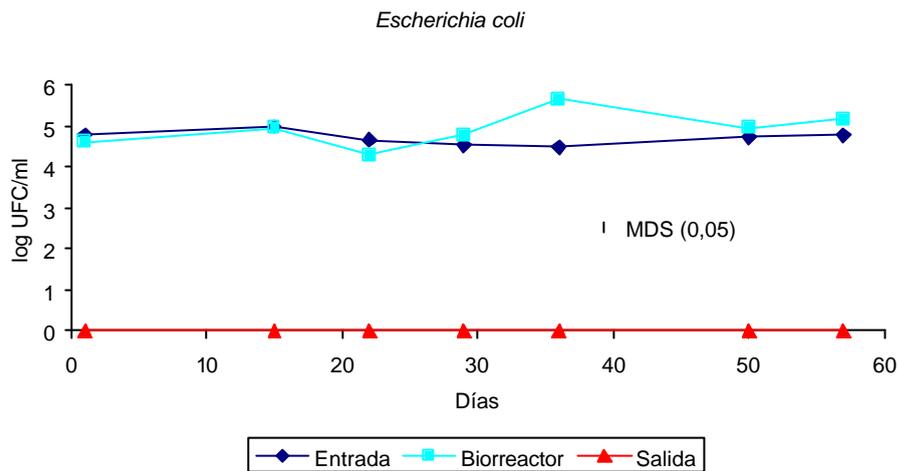
Durante el 5º experimento el porcentaje de *E. coli* en la entrada fue de 99% de todas las colonias detectadas por el método de filtración descrito anteriormente, y en el biorreactor fue de 91%.

En la salida se detectó la microbiota acompañante en un valor promedio de 2,5 UFC/ml. *E. coli* sólo se detectó en la salida un día en la primera fase del experimento.



**Figura 4.32.** Número de *Escherichia coli* detectados en la entrada, en el biorreactor y en la salida durante el 5º experimento.

En el 6º experimento *E. coli* estaba presente tanto en la entrada como en el biorreactor en unos órdenes de magnitud semejantes a los experimentos anteriores. En la salida fue detectado en todos los días analizados la microbiota acompañante en un promedio de 2 UFC/ml y hubo una ausencia completa de *E. coli*.



**Figura 4.33.** Número de *Escherichia coli* detectados en la entrada, en el biorreactor y en la salida durante el 6º experimento.

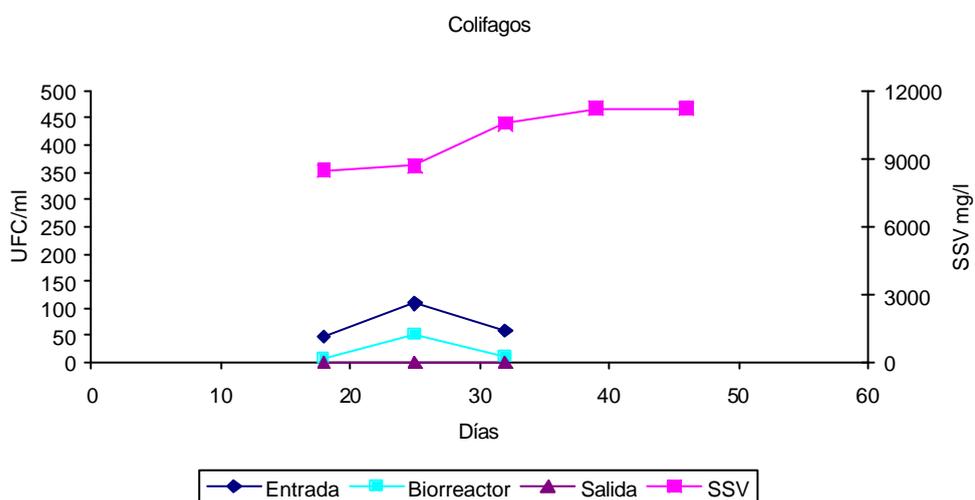
#### 4.4.3.2. Colifagos

Con objeto de estudiar la capacidad de eliminación de indicadores virales de los sistemas de BMS, se determinó semanalmente en los experimentos 3º, 4º, 5º y 6º el número de colifagos presentes en el agua de entrada, del biorreactor y de la salida. Los datos se muestran en las figuras 4.34, 4.35, 4.36 y 4.37.

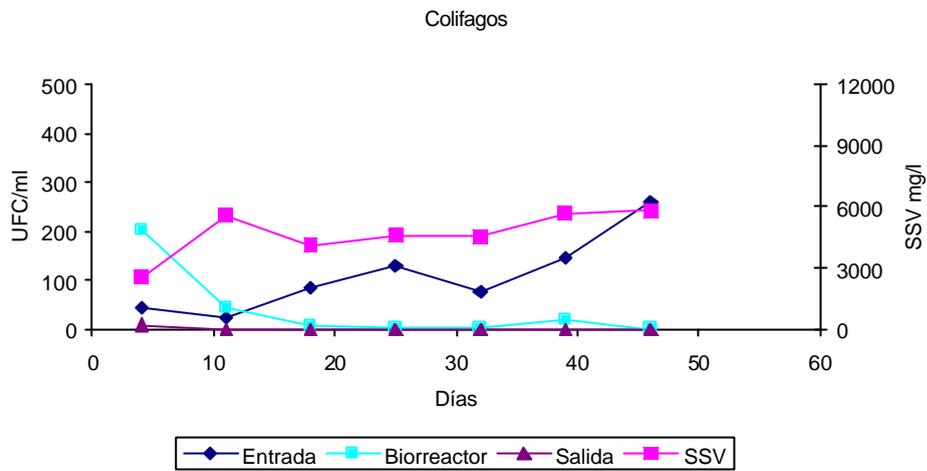
En general en los 4 experimentos hay una ausencia de colifagos a la salida de la planta piloto por lo que se puede afirmar que este tipo de sistemas son capaces de eliminar estos microorganismos. Se detectó una presencia de colifagos solamente el día 4 del 4º experimento y en los días 9 y 23 del 6º experimento, que pudo ser debido a un error analítico.

En todos los experimentos se puede observar que en el agua de entrada existe una variación muy fuerte en el número de colifagos que oscila entre 20 UFC/ml hasta 350 UFC/ml, dependiendo de la contaminación fecal del agua.

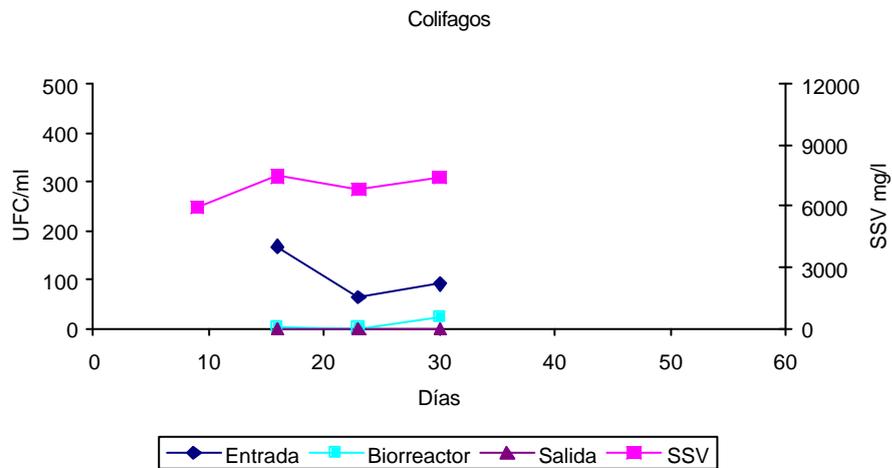
En los experimentos 4º y 6º se producen también variaciones puntuales muy fuertes de colifagos, como en el día 4 del 4º experimento y en el día 30 del 6º experimento. En los experimentos 3º y 5º esto no se produce y el número de colifagos se mantienen en órdenes estables oscilando entre 1 y 51 UFC/ml.



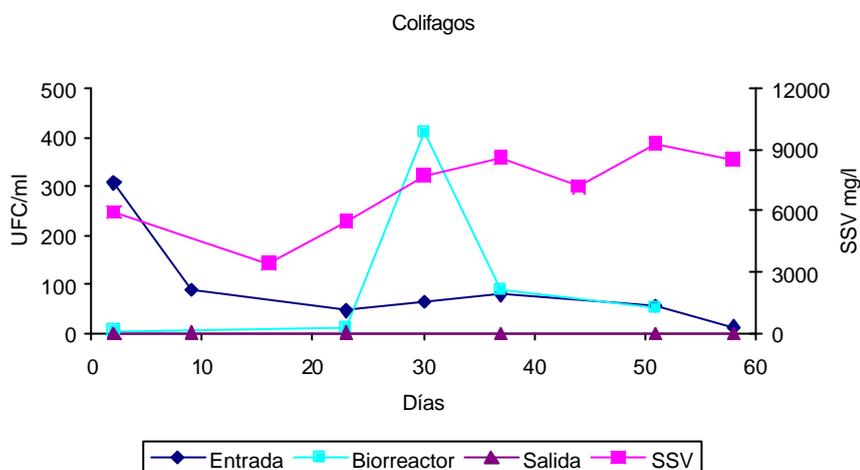
**Figura 4.34. Número de colifagos detectados en la entrada, en el biorreactor y en la salida y SSV del biorreactor durante el 3º experimento (MDS=74,27).**



**Figura 4.35. Número de colifagos detectados en la entrada, en el biorreactor y en la salida y SSV del biorreactor durante el 4º experimento (MDS=168,60).**



**Figura 4.36. Número de colifagos detectados en la entrada, en el biorreactor y en la salida y SSV del biorreactor durante el 5º experimento (MDS=110,85).**



**Figura 4.37. Número de colifagos detectados en la entrada, en el biorreactor y en la salida y SSV del biorreactor durante el 6º experimento (MDS=216,09).**

#### 4.5. Estudios de biodiversidad del biorreactor.

##### 4.5.1. Extracción de ADN, PCR y TGGE

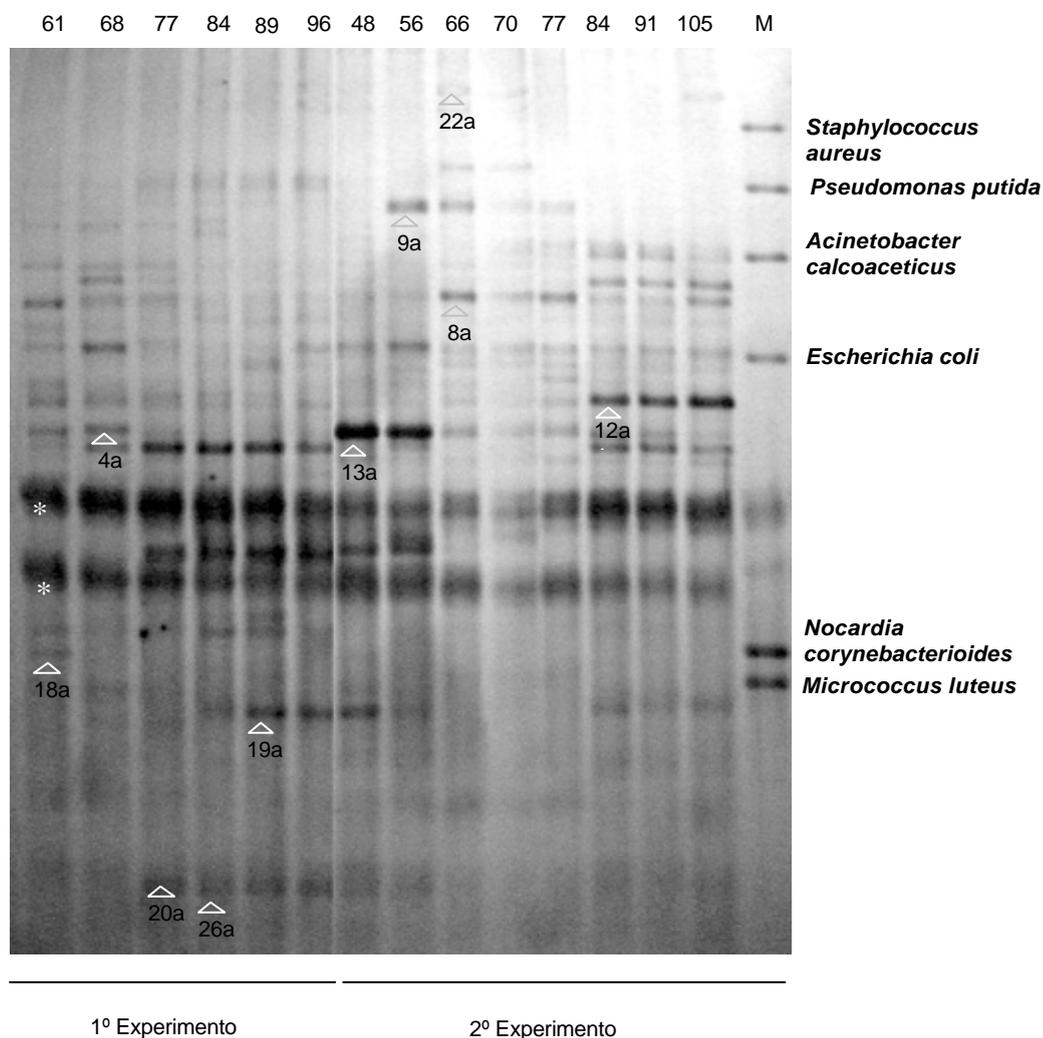
##### 4.5.1.1. Estudio de la población bacteriana del biorreactor utilizando fragmentos amplificados del gen codificante del ARN ribosómico 16S

Para realizar los estudios de biodiversidad se utilizó la técnica PCR-TGGE. Se tomaron periódicamente muestras del biorreactor durante los 6 experimentos, se extrajo el ADN y se amplificó el gen codificante del ARNr 16S mediante una estrategia de PCR anidada. Los fragmentos resultantes de la 2º PCR tuvieron un tamaño aproximado de 200 pb. Estos fragmentos de ADN correspondían con el tamaño esperado para la región hipervariable V3 los cuales se sometieron a una TGGE con el objeto de obtener los perfiles de la comunidad bacteriana del biorreactor en todos los experimentos.

La técnica utilizada para el análisis de las comunidades microbianas (TGGE), sólo permite detectar las poblaciones que muestren una abundancia relativa superior al 1%;

(Muyzer y Smalla, 1998) por ello tan sólo aparecen las bandas correspondientes a poblaciones mayoritarias.

En las figuras 4.38, 4.39 y 4.40 se muestran el perfil de la biodiversidad de la comunidad procariota del biorreactor durante todos los experimentos. En todas las figuras, el carril nombrado como M, corresponde a una mezcla de ADN amplificado a partir de varias especies bacterianas conocidas.



**Figura 4.38. Análisis de la biodiversidad microbiana del fango activo del biorreactor del sistema BMS mediante la técnica de TGGE durante los experimentos 1º y 2º. (Las bandas marcadas con asteriscos representan bandas artefactos)**

Del gel de TGGE del experimento 1º y 2º se intentó la extracción, reamplificación y secuenciación de un total de 21 bandas, de las cuales solo 10 se pudieron analizar comparándolas con las secuencias de ADNr 16S depositadas en la base de datos EMBL (tabla 4.3), ya que el resto o bien no se pudieron reamplificar o bien de ellas se obtuvieron secuencias con un alto número de indeterminaciones. Este bajo porcentaje de éxito fue debido en parte a la limitación física que existe para separar un número tan elevado de bandas en la superficie de los geles, lo que conduce a problemas de solapamiento.

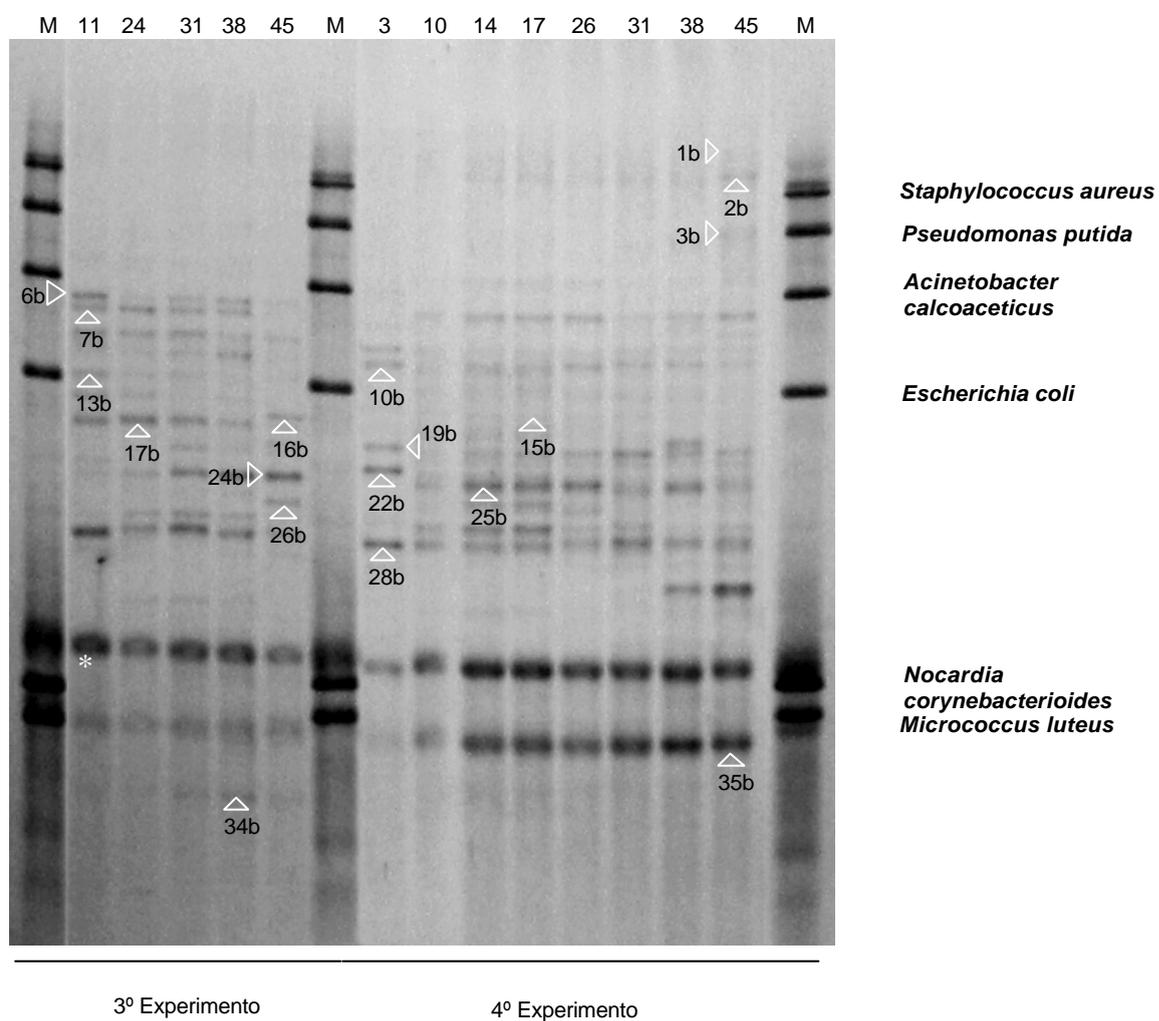
Del gel de TGGE del experimento 3º y 4º se intentó la extracción, reamplificación y secuenciación de un total de 37 bandas, de las cuales 19 se pudieron analizar comparándolas con las secuencias de ADNr 16S depositadas en la base de datos EMBL (tabla 4.4).

Del gel de TGGE del experimento 5º y 6º se intentó la extracción, reamplificación y secuenciación de un total de 17 bandas, de las cuales tan sólo 5 se pudieron analizar comparándolas con las secuencias de ADNr 16S depositadas en el banco de datos EMBL (tabla 4.5).

Tal y como se desprende del estudio de las fotografías de los geles de TGGE de la figura 4.38, 4.39 y 4.40 la composición de la comunidad microbiana cambia al variar las condiciones de trabajo de la planta y variar parámetros como los SS, que pueden afectar a la disponibilidad de oxígeno disuelto, y también al sufrir cambios las condiciones ambientales como la temperatura. Esto se ve reflejado en las bandas que están presentes sólo en algunas muestras y no en otras, o varían de intensidad.

**Tabla 4.3. Comparación de la secuencia de las bandas de TGGE (región V3 del ADNr 16S, aproximadamente 200 bp) de las poblaciones integrantes del fango activo del biorreactor durante el 1º y 2º experimento, con las secuencias depositadas en la base de datos EMBL.**

Banda	Afiliación taxonómica más probable (clase/familia)	Solapamiento	Microorganismo más similar	Nº de acceso	% de identidad
4ª	a-proteobacteria/ Caulobacteraceae	121	<i>Caulobacter</i> sp. S142	AY972383	100
			<i>Brevundimonas</i> sp. H2/98-FUNDUS	AJ313427	99,2
8ª	a-proteobacteria/ Sphingomonadaceae	123	<i>Blastomonas</i> sp. 42NP6	AB242676	99,2
			<i>Sphingomonas</i> sp. GBb6	AJ812013	99,2
9a	a-proteobacteria	123	<i>Sinorickettsia chlamys</i>	AY174894	90,2
			<i>Roseobacter</i> sp. RED59	AY136130	88,6
12a	β-proteobacteria	149	<i>Rhodoferax</i> sp. Rud07	AY788978	96,6
			<i>Rhodoferax fermentans</i> DSM 13 235	AJ289107	
13a	?-proteobacteria /Thiotrichaceae	112	<i>Thiothrix eikelboomii</i>	L79965	100
			<i>Thiothrix</i> sp. KRN-B2	AB166732	97,3
18a	Actinobacteria	127	<i>Microthrix parvicella</i>	X93044	96,9
		124	<i>Collinsella</i> sp. CB52	AB064936	88,7
19a	Bacteria/ Nitrospiraceae	125	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>	DQ059545	100
			<i>Nitrospira</i> cf. <i>moscoviensis</i> SBR2016	AF155154	99,2
20a	Gemmatimonadaceae	142	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i>	AB072735	83,8
	Actinobacteria	141	<i>Saccharopolyspora</i> sp. IM-8155	AF131491	82,3
22a	Bacteria	123	Bacterium TSA-5.4	AF240150	96,7
	a-proteobacteria /Methylobacteriaceae		<i>Roseomonas</i> sp. 1 LOT M4	AY624051	95,1
26a	Gemmatimonadaceae	159	Bacterium Ellin 5290	AY234641	89,3
			<i>Gemmatimonas aurantiaca</i>	AB072735	86,2



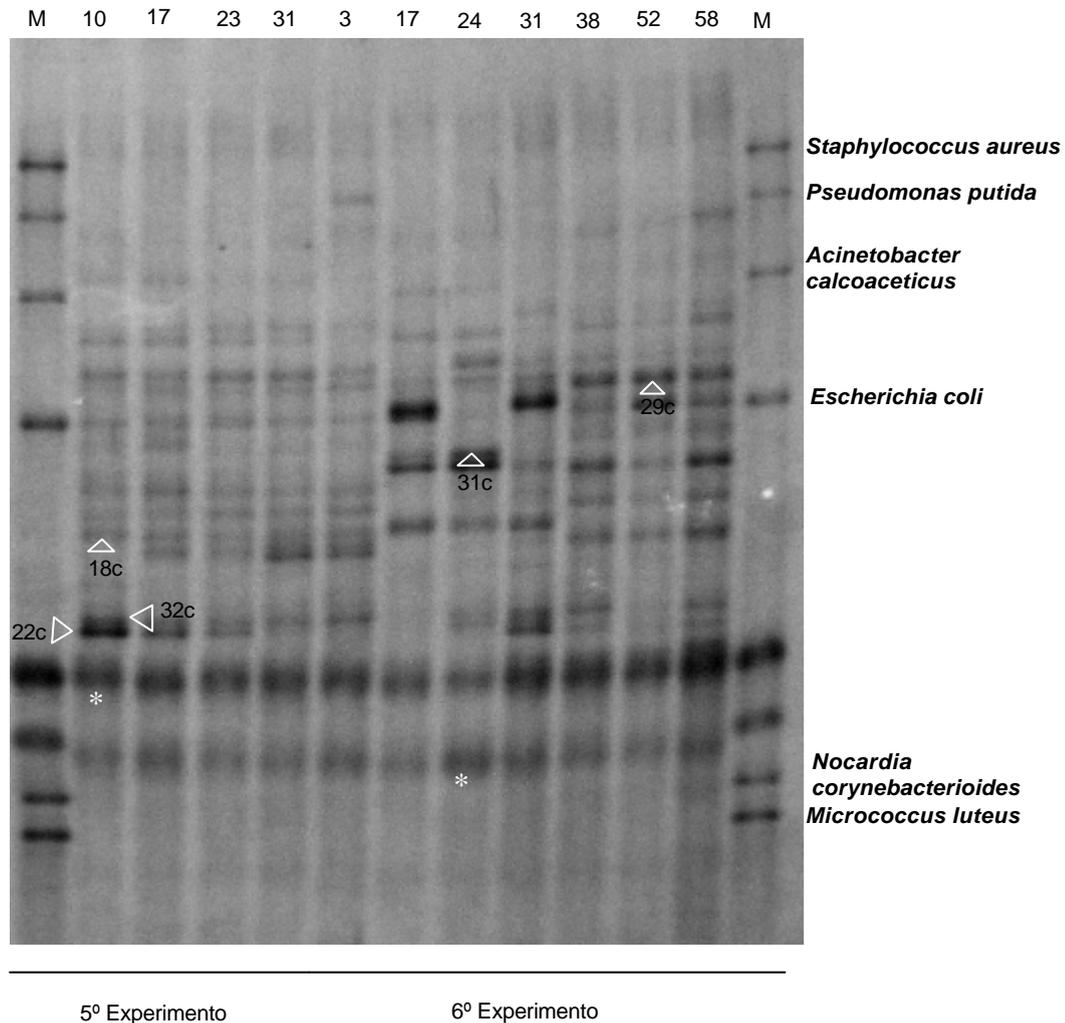
**Figura 4.39.** Análisis de la biodiversidad microbiana del fango activo del biorreactor del sistema BMS mediante la técnica de TGGE durante los experimentos 3º y 4º. (La banda marcada con asterisco representa banda artefacto)

**Tabla 4.4. Comparación de la secuencia de las bandas de TGGE (región V3 del ADNr 16S, aproximadamente 200 bp) de las poblaciones integrantes del fango activo del biorreactor durante el 3º y 4º experimento, con las secuencias depositadas en la base de datos EMBL.**

Banda	Afiliación taxonómica más probable (clase/familia)	Solapamiento	Microorganismo más similar	Nº de acceso	% de identidad
1b	?-proteobacteria/ Desulfovibrionaceae	145	<i>Desulfovibrio</i> sp. Zt31	AF109470	84,1
		142	<i>Lawsonia intracellularis</i>	U30147	81,7
2b	?-proteobacteria/ Desulfovibrionaceae	152	<i>Desulfovibrio</i> sp. zt31	AF109470	80,3
		147	<i>Pseudomonas marginalis</i> MF49	AY321968	79,6
3b	Bacteria	107	<i>Bacterium</i> TSA-5.4	AF240150	96,3
	a-proteobacteria/ Methylobacteriaceae		<i>Roseomonas</i> sp. 1 LOT M4	AY624051	94,4
6b	β-proteobacteria /Comamonadaceae	148	<i>Acidovorax facilis</i>	AJ420324	100
			<i>Hydrogenophaga</i> sp. R02-6	AY618575	100
7b	β-proteobacteria/ Neisseriaceae	148	<i>Aquaspirillum</i> sp. TG27	AF384190	100
	β-proteobacteria/ Comamonadaceae		<i>Variovorax paradoxus</i> TG27	AF508103	99,3
10b	a-proteobacteria/ Erythrobacteraceae	119	<i>Erythrobacter</i> sp. G265	AY371411	96,6
	a-proteobacteria/ Sphingomonadaceae		<i>Blastomonas</i> sp. 42NP6	AB242676	95,8
13b	?-proteobacterias/ Pseudomonadaceae	133	<i>Pseudomonas</i> sp. 114ND24	AB181698	99,2
	β-proteobacteria/ Comamonadaceae		<i>Acidovorax delafieldii</i> B27	AJ518818	99,2
15b	β-proteobacteria/	144	<i>Aquabacterium</i> sp. GPTSA100-18	DQ683360	100
			<i>Ideonella</i> sp. 0-0013	AB211233	97,2
16b	a-proteobacteria	121	<i>Trojanella thessalonices</i>	AF069496	95
	a-proteobacteria /Methylobacteriaceae		<i>Methylobacterium</i> sp. PB138	AB220085	95
17b	β-proteobacteria/ Comamonadaceae	148	<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i>	AF078768	99,3
			<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	AF078770	98,6
19b	β-proteobacteria/ Comamonadaceae	150	<i>Comamonas kerstersii</i> LMG 3475T	AJ430347	97,3
			<i>Comamonas terrigena</i>	AJ430342	97,3

**Tabla 4.4. Comparación de la secuencia de las bandas de TGGE (región V3 del ADNr 16S, aproximadamente 200 bp) de las poblaciones integrantes del fango activo del biorreactor durante el 3º y 4º experimento, con las secuencias depositadas en la base de datos EMBL. (Continuación)**

Banda	Afiliación taxonómica más probable (clase/familia)	Solapamiento	Microorganismo más similar	Nº de acceso	% de identidad
22b	?-proteobacterias/ Xanthomonadaceae	141	<i>Stenotrophomonas koreensis</i>	AB166885	100
			<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> HPC383	DQ129716	99,3
24b	?-proteobacterias/ Xanthomonadaceae	148	<i>Xanthomonas</i> sp. ML-122	AF139997	92,6
			<i>Silanimonas</i> sp. HO3-R19	DQ411038	91,9
25b	a-proteobacteria	118	a-proteobacteria A0839	AF236002	100
			<i>Caedibacter caryophilus</i>	AY753195	90,7
26b	$\beta$ -proteobacteria/ Rhodocyclaceae	149	<i>Thauera terpenica</i>	AJ005817	93,3
	$\beta$ -proteobacteria/ Comamonadaceae		<i>Brachymonas</i> sp. D1	DQ104212	91,9
28b	?-proteobacterias /Xanthomonadaceae	114	<i>Thermomonas haemolytica</i> S5	AF508108	98,2
			<i>Luteimonas</i> sp. S2	AF384191	96,5
34b	Gemmatimonadetes /Gemmatimonadaceae	128	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i>	AB072735	99,2
		130	Gemmatimonadetes bacterium Ellin7146	AY673312	90,0
35b	Actinobacteria/Pseudonocardiaceae	128	<i>Kibdelosporangium</i> sp. 428G04	AB123420	91,4
			<i>Pseudonocardia</i> sp. GWS-BW-H127	AY332096	90,6



**Figura 4.40. Análisis de la biodiversidad microbiana del fango activo del biorreactor del sistema BMS mediante la técnica de TGGE durante los experimentos 5º y 6º. (Las bandas marcadas con asteriscos representan bandas artefactos)**

**Tabla 4.5. Comparación de la secuencia de las bandas de TGGE (región V3 del ADNr 16S, aproximadamente 200 bp) de las poblaciones integrantes del fango activo del biorreactor durante el 5º y 6º experimento, con las secuencias depositadas en la base de datos EMBL.**

Banda	Afiliación taxonómica más probable (claseº/familia)	Solapamiento	Microorganismo más similar	Nº de acceso	% de identidad
18c	a-proteobacteria /Caulobacteraceae	107	<i>Brevundimonas</i> sp. JJF-2-2	DQ207842	100
			<i>Caulobacter</i> sp. IMCC1706	DQ664200	100
22c	?-proteobacterias /Xanthomonadaceae;	150	<i>Thermomonas</i> <i>haemolytica</i> S5	AF508108	96
			<i>Luteimonas</i> sp. S2	AF384191	94,7
29c	?-proteobacterias /Xanthomonadaceae	126	<i>Lysobacter antibioticus</i> 3R3-1	AJ581967	93,7
		127	<i>Xanthomonas</i> sp. 06.11	AY827869	94,5
31c	a-proteobacteria/ Sphingomonadaceae	119	<i>Sphingomonas</i> <i>asaccharolytica</i> OS-23.a	AM237347	99,2
			<i>Sphingomonas</i> <i>rosa</i> 24 OR18	AM086246	99,2
32c	?-proteobacterias /Xanthomonadaceae	148	<i>Thermomonas</i> <i>haemolytica</i> S5	AF508108	97,3
			<i>Luteimonas</i> sp. S2	AF384191	95,9

En la figura 4.41 se representa el árbol filogenético de todas las secuencias obtenidas, elaborado a partir de un alineamiento múltiple mediante el método *Neighbour-Joining*, incluyendo como referencia secuencias de la misma región V3 del gen codificante del ARNr 16S de los microorganismos más similares depositados en la base de datos. Como se puede ver en el árbol filogenético, los grupos más numerosos en el fango activo del BMS son las a-proteobacterias y las β-proteobacterias. Dentro de las a-proteobacterias la familia más representada es la *Caulobacteraceae* y de las β-proteobacterias la familia *Comamonadaceae*. El siguiente grupo más abundante en el fango activo es el grupo de las ?-proteobacterias en el cual la familia más representada es la *Xanthomonadaceae*.

En un menor número se detectan representantes del grupo de las Actinobacterias y de las  $\alpha$ -proteobacterias (familia *Desulfovibrionaceae*). Cabe destacar la presencia de otras 2 familias en el árbol filogenético, *Gemmatimonadaceae* y *Nitrospiraceae*.

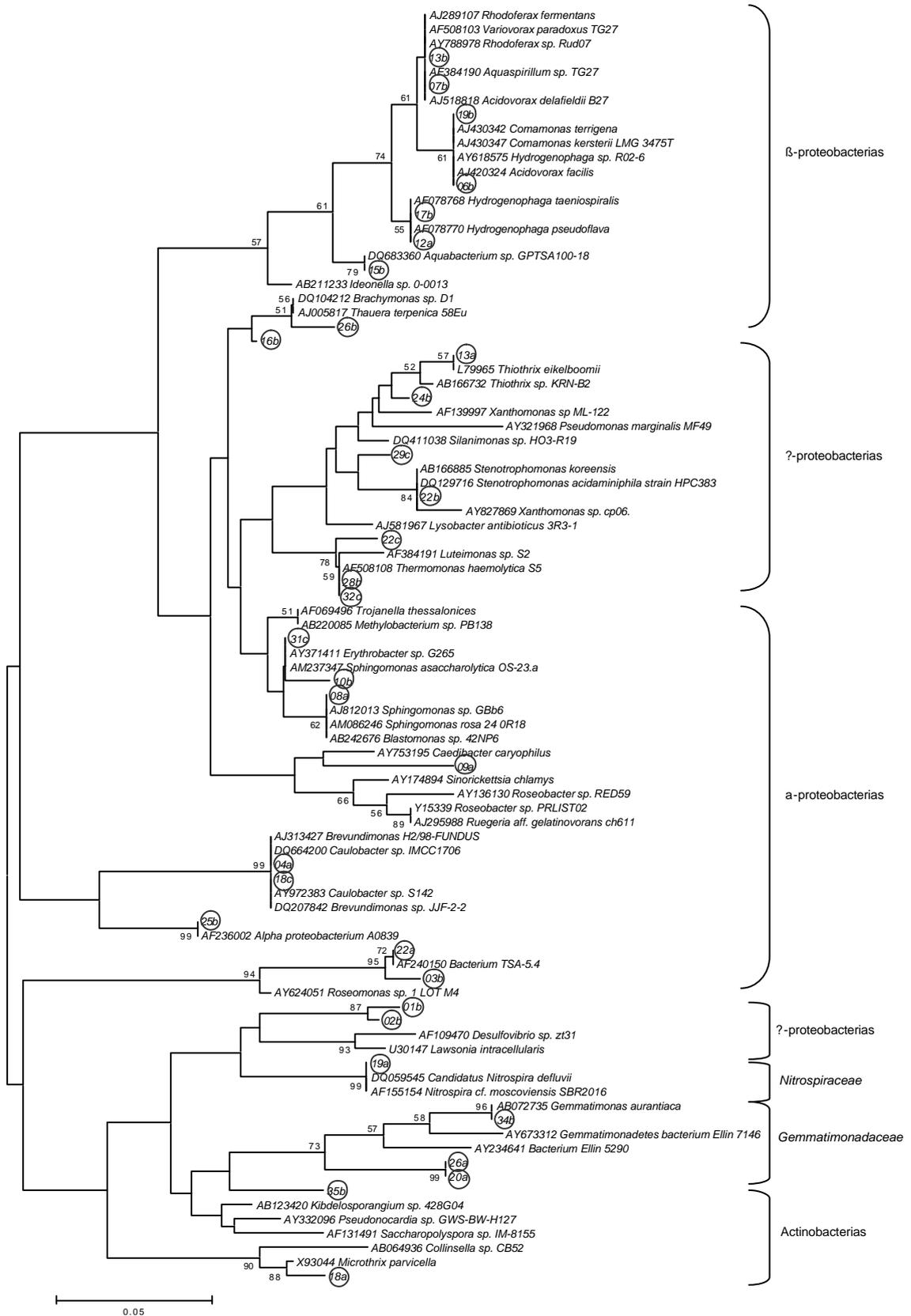
Los perfiles de bandas obtenidos mediante TGGE se analizaron con el programa Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Bélgica) y se construyó un dendograma que relacionó los distintos perfiles de bandas en función de su similitud. El dendograma muestra (figura 4.42) el perfil de la comunidad microbiana del fango activo del BMS durante los 6 experimentos. Se puede observar que el perfil obtenido el día 3 del 4º experimento se separa del resto de experimentos claramente (similitud del 48%).

En el resto del análisis se puede ver 2 clusters con una similitud entre ellos del 51%, en el primer cluster se agrupan los experimentos 1º y 2º, donde se aprecia que existe una diferencia significativa entre ellos, mostrando una similitud de sólo 57%. Dentro del 2º experimento la comunidad bacteriana sufrió cambios secuenciales al aumentar la concentración de SS, y se observó una diferencia significativa entre los primeros y los últimos días del experimento, que se separan en 2 clusters con una similitud del 68%.

En el segundo cluster aparecen agrupados los experimentos 3º, 4º, 5º y 6º que a su vez se dividen en otros 2 clusters. En uno de ellos se agrupan el 3º y el 4º experimento, separados en 2 subclusters (64% de similitud).

En el experimento 3º ocurrió lo mismo que en el 2º, se produjo una diferencia significativa entre los primeros días y los últimos días del experimento coincidiendo con la variación en la concentración de SS de 10.600-11.900 a 12.400-14.400 mg/l.

En el 4º experimento fue el único en que se hizo un muestreo cuando la planta llevaba muy pocos días en funcionamiento. Este día la concentración de los SS era de 3.500 mg/l y en los días sucesivos los SS subieron rápidamente hasta 9.500 mg/l (día 9).



**Figura 4.41. Árbol filogenético *Neighbour-Joining* basado en la secuencia de la región V3 del ADNr 16S, aproximadamente 200 bp, mostrando las posiciones de las secuencias de 33 bandas de TGGE obtenidas en este estudio y otras descritas en bibliografía. La barra indica un 5% de divergencia estimada. Los números junto a las ramas indican el valor de *bootstrap* cuando éste fue superior al 50%.**

En el siguiente cluster aparecen agrupados los experimentos 5º y 6º, con un 78% de similitud. Como se indicó en el apartado 3.5 de material y métodos el cambio del 5º al 6º experimento se limitó a una modificación del caudal, por tanto los SS al inicio del 6º experimento se mantuvieron en niveles similares a los del final del 5º experimento (ver figura 4.13.)

Los resultados demuestran que la variabilidad de la diversidad bacteriana responde a una secuencia temporal. Así aparecen varias bandas, que representan a los componentes mayoritarios de la comunidad microbiana del biorreactor en función de las condiciones de trabajo.

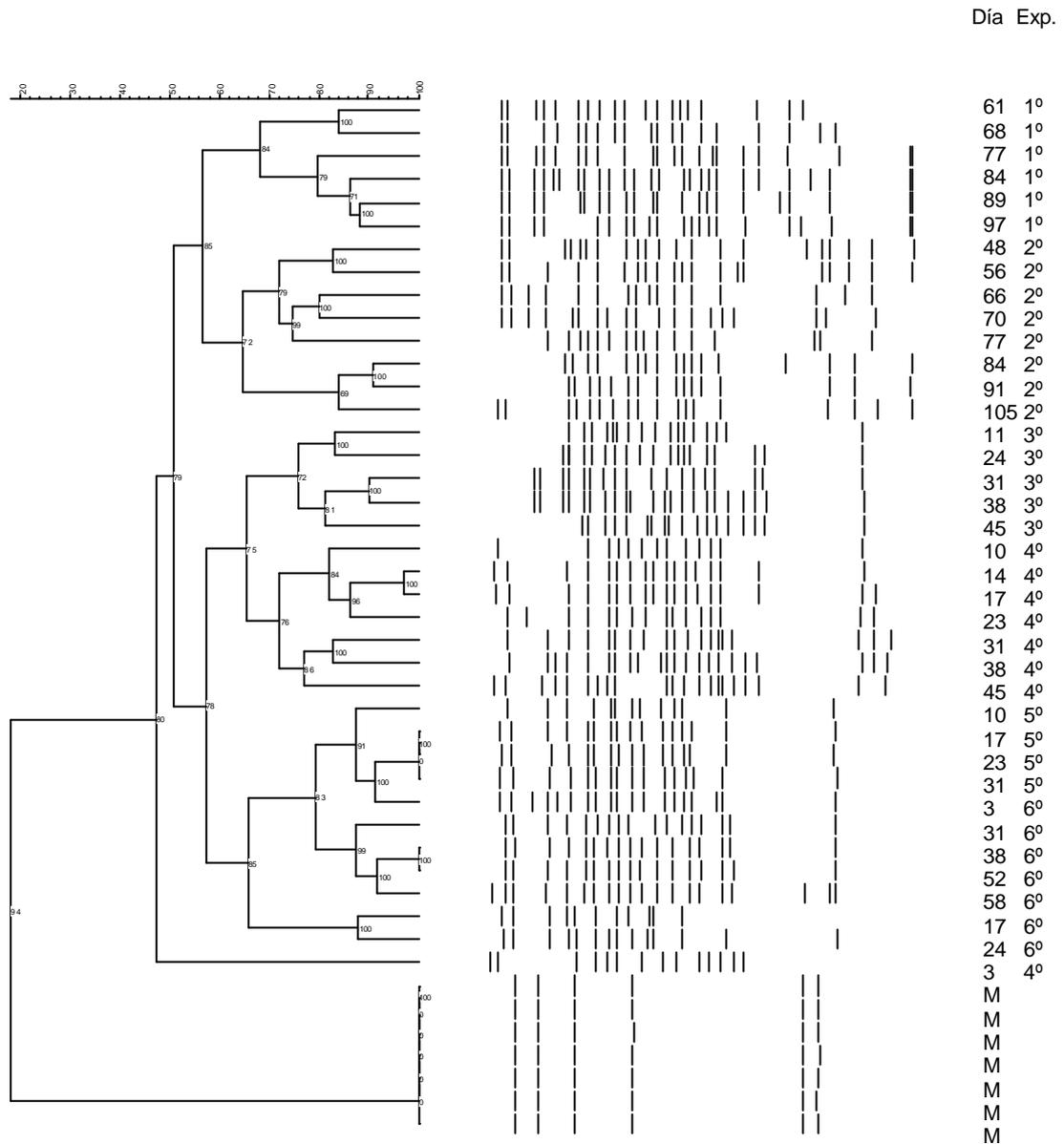


Figura 4.42. Dendrograma obtenido del análisis de los perfiles de bandas del TGGE de la comunidad bacteriana presente en el fango activo del BMS, utilizando el programa Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Bélgica) aplicando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y el coeficiente de Dice. La barra superior muestra la similitud entre los perfiles de bandas y los números entre las ramas representan el coeficiente copenético.

#### **4.5.1.2. Estudio de la población de las bacterias oxidadoras de amonio del biorreactor utilizando fragmentos amplificados del gen estructural de la subunidad $\alpha$ de la enzima amonio-monooxigenasa (*amoA*)**

Para el estudio específico de las comunidades de bacterias nitrificantes, se escogió como marcador el gen *amoA* que codifica la subunidad  $\alpha$  de la enzima amonio-monooxigenasa, propia de las bacterias nitrificantes fase I. Los cebadores utilizados permiten la amplificación de un fragmento de aproximadamente 475 pb de *amoA* en todas las bacterias nitrificantes de fase I pertenecientes a la clase  $\beta$ -proteobacteria.

Los perfiles de bandas obtenidos en este caso fueron mucho más simples que al utilizar el gen ADNr 16S como marcador (Figuras 4.43 y 4.44), al tratarse de un grupo de bacterias mucho más restringido.

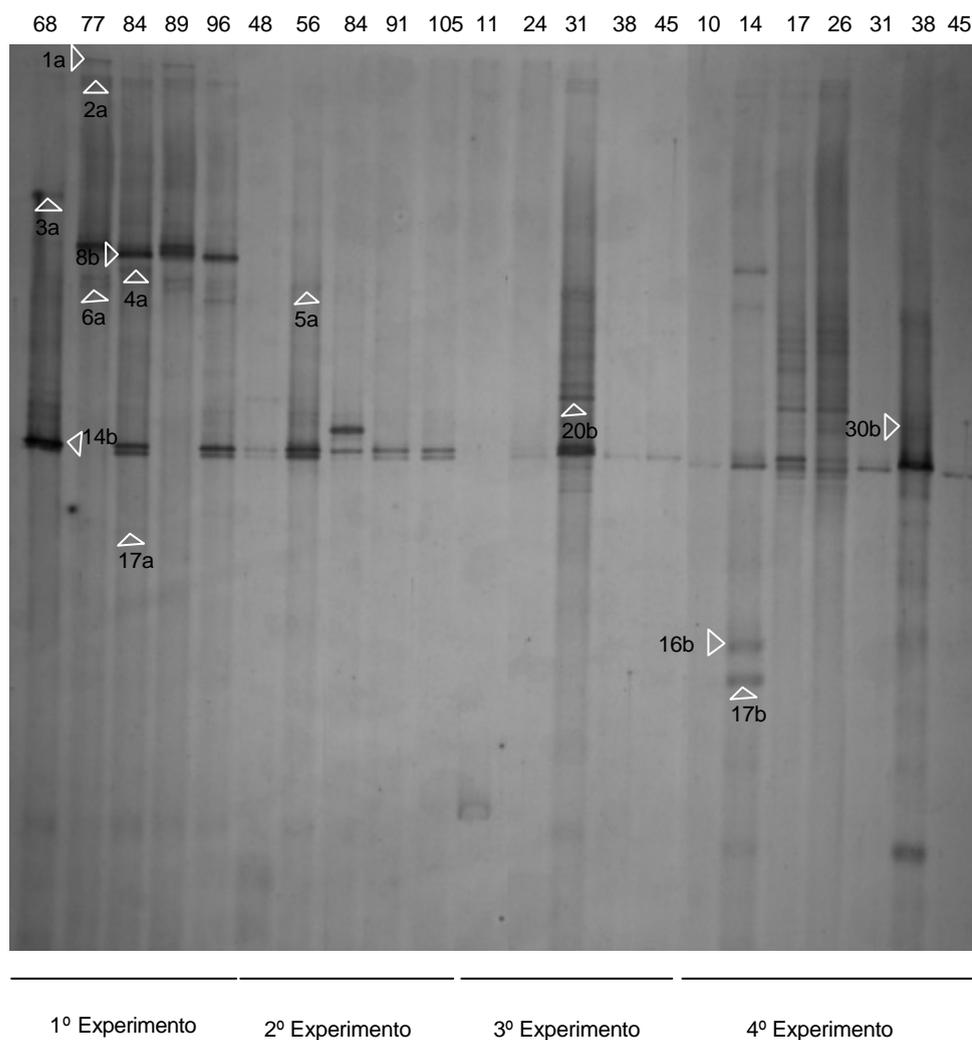
Se intentó la reamplificación de un total de 35 bandas de TGGE, extraídas de varios geles, de las cuales 12 se pudieron analizar comparándolas con las secuencias de ADN depositadas en la base de datos EMBL, y pertenecientes a todas las especies conocidas y validadas (tabla 4.6).

Finalmente, las secuencias parciales de la proteína AmoA obtenidas a lo largo de los experimentos del estudio fueron comparadas con la totalidad de las secuencias depositadas en la base de datos EMBL con el programa BLAST X. Los resultados de esta búsqueda se resumen en la tabla 4.7.

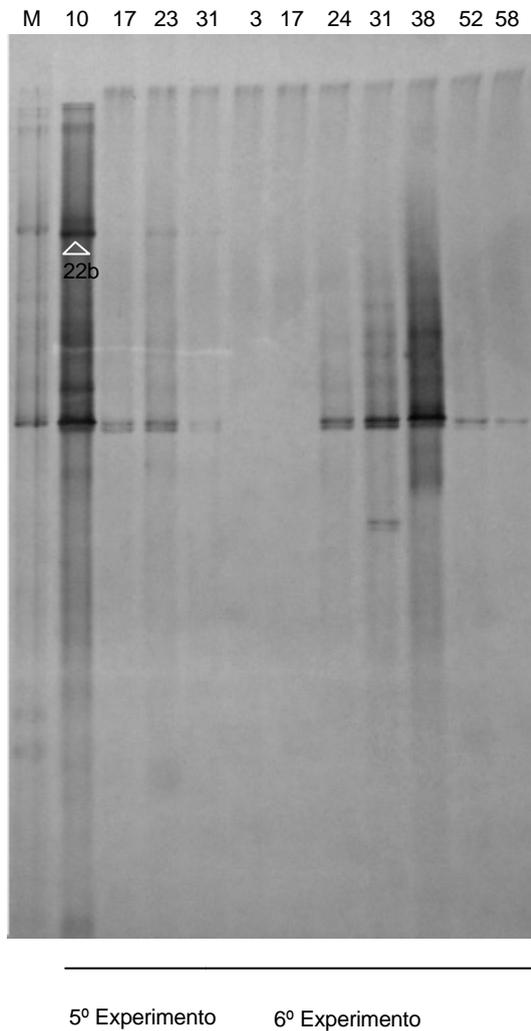
El análisis tanto de la secuencia de ADN como de la proteína mostró que la totalidad de las bandas secuenciadas estaban afiliadas al cluster de *Nitrosomonas europea/Nitrosomonas eutropha* (cluster 7).

Se observó mayor divergencia de las secuencias a nivel de ADN, si bien varias secuencias resultaron ser idénticas a pesar de estar en posiciones separadas en el gel de TGGE. Al estudiar la matriz de distancias de la secuencia de ADN se comprobó que 7 de ellas eran idénticas, las que correspondían a las bandas 1a, 3a, 5a, 14b, 17a,

20 b y 30b. En la matriz de distancias de las secuencias de proteínas no se observó divergencia alguna entre ellas. Las matrices de distancias no se muestran pero estos resultados se ven reflejados en los árboles filogenéticos (fig. 4.45 y 4.46)



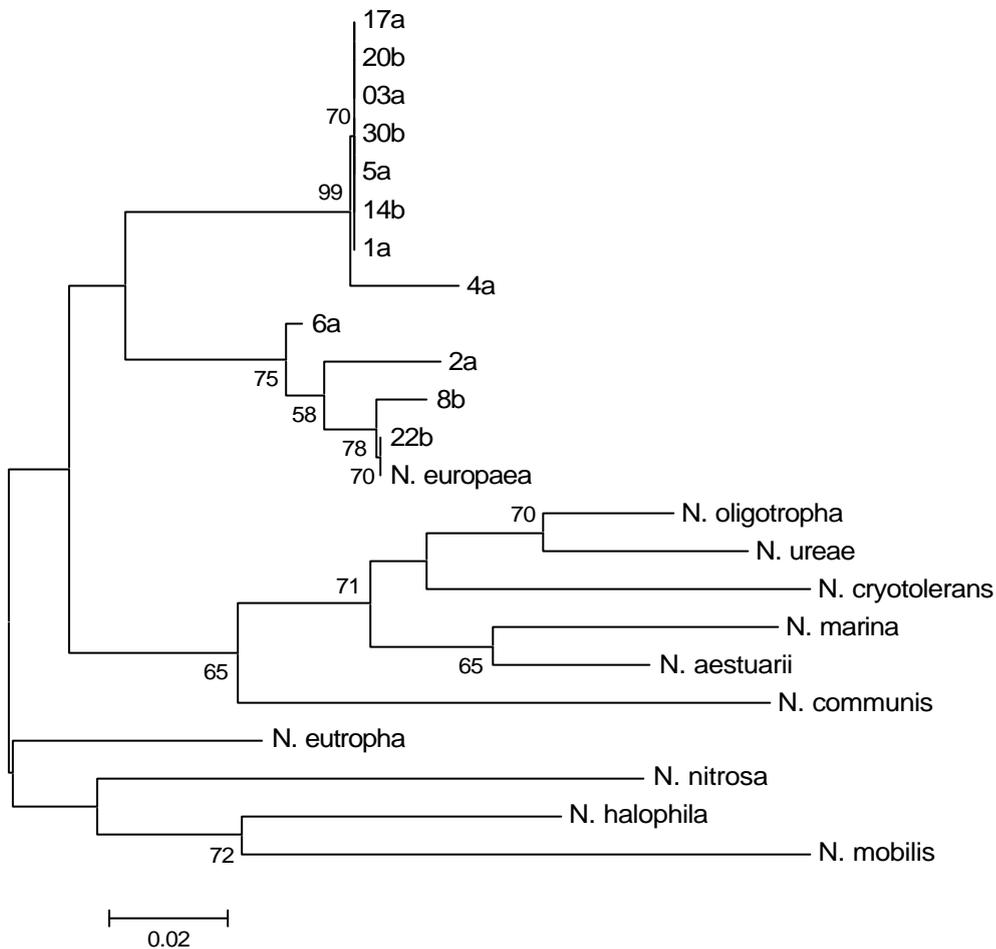
**Figura 4.43. Análisis de la biodiversidad de las bacterias nitrificantes del fango activo del biorreactor del sistema BMS mediante la técnica de TGGE (basada en el gen *amoA*), durante los experimentos 1º, 2º, 3º y 4º.**



**Figura 4.44. Análisis de la biodiversidad de las bacterias nitrificantes del fango activo del biorreactor del sistema BMS mediante la técnica de TGGE (basada en el gen *amoA*), durante los experimentos 5º y 6º. (El carril llamado M contiene la muestra del día 14 del experimento 4º, que sirvió como marcador)**

**Tabla 4.6. Comparación de la secuencia de las bandas de TGGE (de un fragmento de aproximadamente 475 pb del gen *amoA*) de las  $\beta$ -proteobacteria nitrificantes de fase I integrantes del fango activo del biorreactor, con las secuencias depositadas en la base de datos EMBL.**

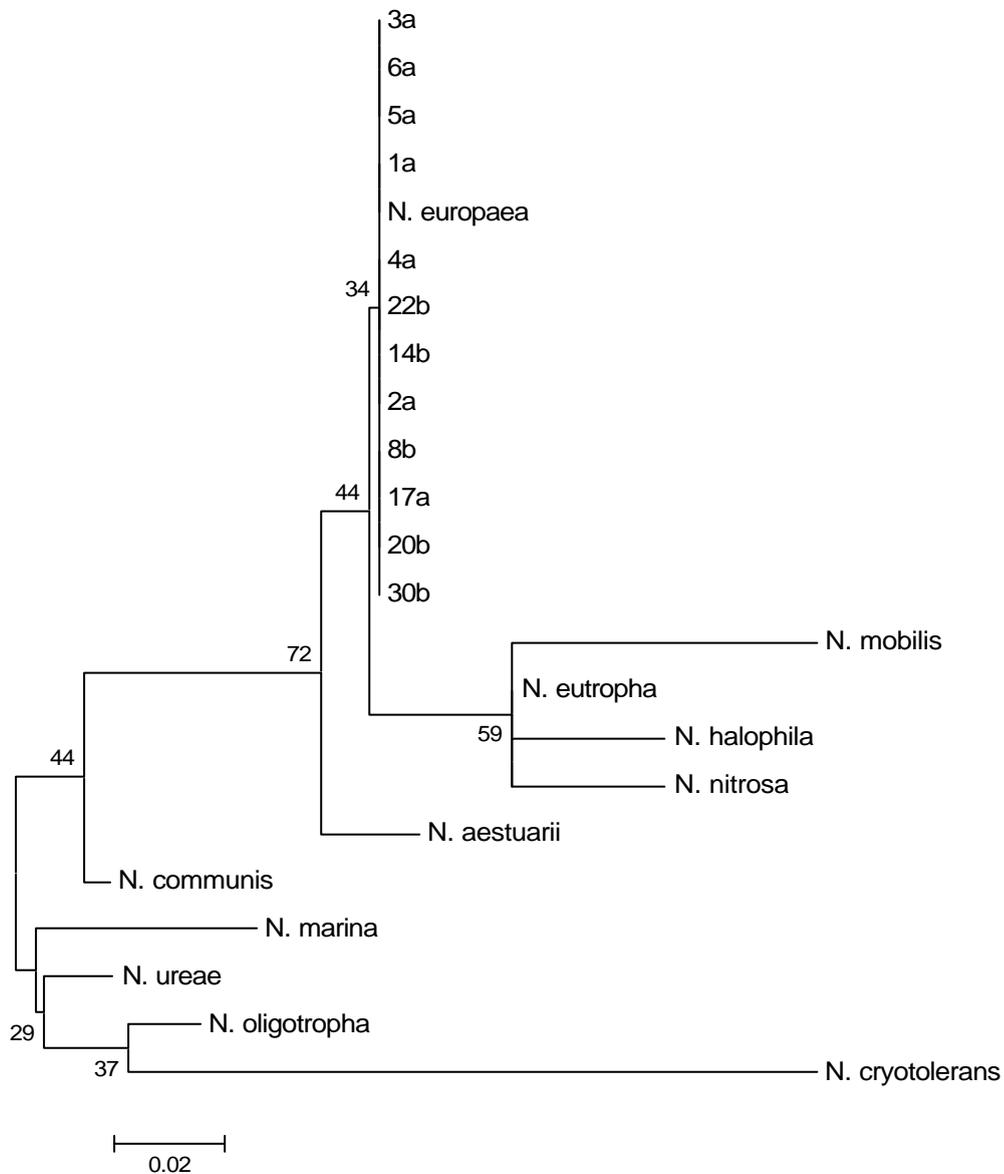
Banda	Microorganismo con gen <i>amoA</i> más similar	Solapamiento	Nº de acceso	%identidad
1a	<i>Nitrosomonas europaea</i>	421	L08050	88,36
	<i>Nitrosomonas</i> sp. OZK11		DQ228469	87,89
2a	<i>Nitrosomonas</i> sp. ENF-11	444	AB079055	98,87
	<i>Nitrosomonas europaea</i>		L08050	94,82
3a	<i>Nitrosomonas europaea</i>	438	L08050	87,90
	<i>Nitrosomonas eutropha</i>		U72670	86,30
4a	<i>Nitrosomonas europaea</i>	412	L08050	88,35
	<i>Nitrosomonas eutropha</i>		U72670	86,89
5a	<i>Nitrosomonas europaea</i>	437	L08050	87,87
	<i>Nitrosomonas eutropha</i>		U72670	86,50
6a	<i>Nitrosomonas europaea</i>	428	L08050	96,27
	<i>Nitrosomonas eutropha</i>	427	U72670	89,70
8b	<i>Nitrosomonas europaea</i>	140	AB070981	99,29
	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm103		AF272411	98,57
14b	<i>Nitrosomonas europaea</i>	331	AB070981	88,52
	<i>Nitrosomonas eutropha</i>		U72670	87,31
16b	<i>Nitrosomonas europaea</i>	87	AB070981	100
	<i>Nitrosomonas</i> sp. ML1		AY958703	100
17a	<i>Nitrosomonas europaea</i>	433	L08050	88,22
	<i>Nitrosomonas eutropha</i>	434	U72670	86,64
17b	<i>Nitrosomonas</i> sp. OZK11	88	DQ228469	88,64
	<i>Nitrosomonas europaea</i> C-91	86	Z97861	87,21
20b	<i>Nitrosomonas europaea</i>	418	L08050	87,80
	<i>Nitrosomonas</i> sp. OZK11		DQ228469	87,08
22b	<i>Nitrosomonas</i> sp. ENF-11	436	AB079055	98,17
	<i>Nitrosomonas europaea</i>		L08050	95,41
30b	<i>Nitrosomonas europaea</i>	398	L08050	86,93
	<i>Nitrosomonas</i> sp. OZK11		DQ228469	86,93



**Figura 4.45.** Árbol filogenético *Neighbour-Joining* basado en la secuencia parcial de *amoA*, mostrando las posiciones de las secuencias de 12 bandas de TGGE obtenidas en este estudio y otras depositadas en la base de datos EMBL. La barra indica un 2% de divergencia estimada. Los números junto a las ramas indican el valor de *bootstrap* cuando éste fue superior al 50%.

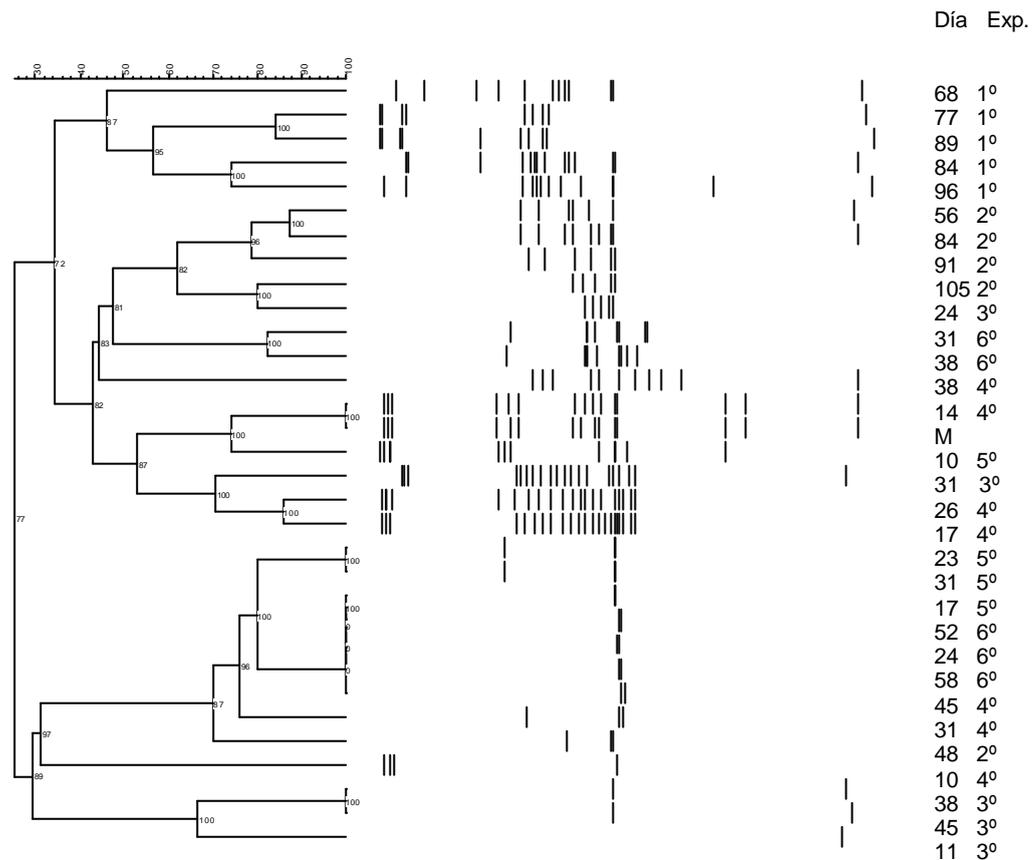
**Tabla 4.7. Comparación de las secuencias parciales de la proteína AmoA de las  $\beta$ -proteobacterias nitrificantes de fase I integrantes del fango activo del biorreactor, con las secuencias depositadas en la base de datos EMBL.**

Banda	Microorganismo con proteína AmoA más similar	Solapamiento (aa)	Nº de acceso	%identidad	% de similitud
1a	Bacteria no cultivada	138	Q9F0019PROT	100	100
	<i>Nitrosomonas europaea</i>		AMOA_NITEU	97,83	99,28
2a	Bacteria no cultivada	147	Q6UJ82_9BACT	99,32	99,32
	<i>Nitrosomonas</i> sp. ENI-11		Q8VL65_NITS1	98,64	99,32
	<i>Nitrosomonas europaea</i>		AMOA_NITEU	97,96	99,32
3a	Bacteria no cultivada	145	Q9F001_9PROT	98,62	98,62
	<i>Nitrosomonas eutropha</i> C71		Q0ADP7_NITEC	95,17	98,62
4a	Bacteria no cultivada	137	Q9F001_9PROT	100	100
	<i>Nitrosomonas europaea</i>		AMOA_NITEU	97,81	99,27
5a	Bacteria no cultivada	145	Q9F001_9PROT	100	100
	<i>Nitrosomonas eutropha</i> C71		Q0ADP7_NITEC	96,55	100
6a	Bacteria no cultivada	142	Q6UJ82_9BACT	99,30	99,30
	<i>Nitrosomonas</i> sp. ENI-11		Q8VL65_NITS1	98,59	99,30
	<i>Nitrosomonas europaea</i>		AMOA_NITEU	97,89	99,30
8b	<i>Nitrosomonas europaea</i>	46	AMOA_NITEU	97,83	97,83
	Bacteria no cultivada		A0FHS3_9PROT	97,83	97,83
14b	Bacteria no cultivada	109	Q1WJJ4_9BACT	96,33	96,33
	<i>Nitrosomonas europaea</i>		AMOA_NITEU	94,50	95,41
16b	Bacteria no cultivada	29	A0FHS3_9PROT	100	100
	<i>Nitrosomonas europaea</i>		Q8G9H2_NITEU	100	100
17a	Bacteria no cultivada	143	Q6A1G4_9PROT	100	100
	<i>Nitrosomonas europaea</i>		AMOA_NITEU	97,90	97,90
	<i>Nitrosomonas</i> sp. ENI-11		Q8VL65_NITS1	97,20	99,30
20b	Bacteria no cultivada	139	Q9F001_9PROT	99,28	99,28
	<i>Nitrosomonas europaea</i>		AMOA_NITEU	97,12	98,56
	<i>Nitrosomonas eutropha</i> C71		Q0ADP7_NITEC	96,40	99,28
22b	Bacteria no cultivada	145	Q6UJ82_9BACT	99,31	100
	<i>Nitrosomonas</i> sp. ENI-11		Q8VL65_NITS1	98,62	100
	<i>Nitrosomonas europaea</i>		AMOA_NITEU	97,93	100
30b	Bacteria no cultivada	131	Q1WJJ4_9BACT	99,24	100
	<i>Nitrosomonas eutropha</i> C71		Q0ADP7_NITEC	96,18	99,24



**Figura 4.46.** Árbol filogenético *Neighbour-Joining* basado en las secuencias parciales de la proteína AmoA, mostrando las posiciones de las secuencias de 12 bandas de TGGE obtenidas en este estudio y otras depositadas en la base de datos EMBL. La barra indica un 2% de divergencia estimada. Los números junto a las ramas indican el valor de *bootstrap* cuando éste fue superior al 50%.

Los perfiles de bandas obtenidos mediante TGGE se analizaron con el programa Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Bélgica) y se construyó un dendograma que relacionó los distintos perfiles de bandas en función de su similitud.



**Figura 4.47.** Dendograma obtenido del análisis de los perfiles de bandas del TGGE de las bacterias oxidadoras de amonio presente en el fango activo del BMS, utilizando el programa Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Bélgica) aplicando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y el coeficiente de Dice. La barra superior muestra la similitud entre los perfiles de bandas y los números entre las ramas representan el coeficiente cofenético. (El día llamado M contiene la muestra del día 14 del experimento 4º, que sirvió como marcador)

El dendrograma (fig. 4.47) muestra los perfiles de bandas obtenidos al estudiar la comunidad de las bacterias oxidadoras de amonio del fango activo del biorreactor. Como se puede observar no existe una secuencia temporal en la evolución de la diversidad biológica de las muestras de los distintos experimentos, como ocurría en el dendrograma obtenido para la comunidad microbiana total.

En el dendrograma, las muestras se agrupan en 2 grandes clusters con una similitud muy baja, por debajo del 30%. En el primer cluster los perfiles muestran una mayor cantidad de bandas, lo que a priori supondría una mayor diversidad. Sin embargo, al secuenciar se comprobó que bandas procedentes de distintas alturas del gel tenían idéntica secuencia. Este hecho puede ser debido a la generación de heteroduplex durante la reacción de PCR, lo cual puede conducir a una sobreestimación de la biodiversidad al interpretar los perfiles de TGGE.

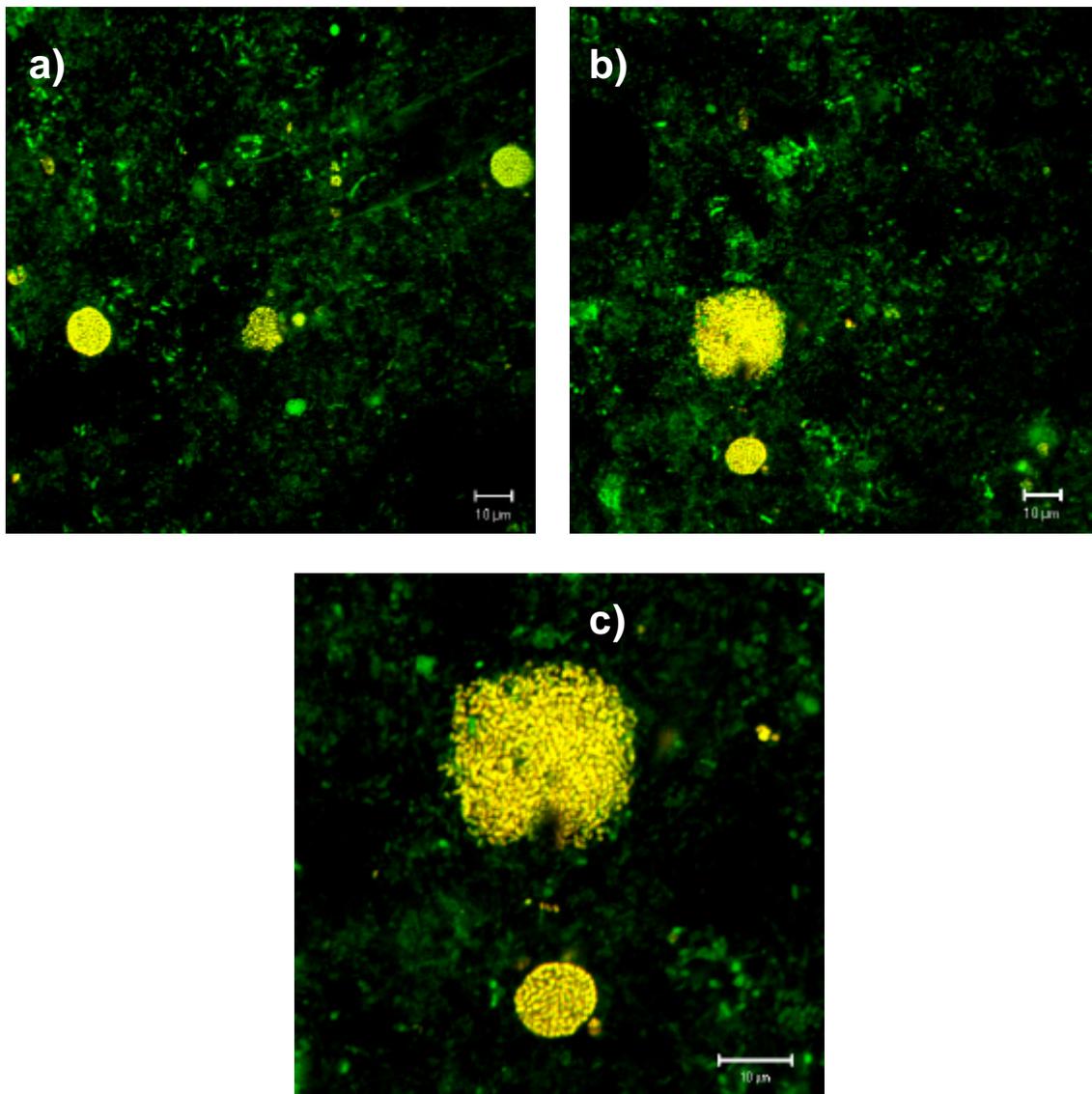
### **4.5.2. Caracterización de las bacterias nitrificantes mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH).**

En la última fase del estudio, se realizaron experimentos de hibridación *in situ* con fluorescencia, al objeto de estudiar con mayor detalle las comunidades de microorganismos encargados del proceso de nitrificación en el BMS. Con este objeto, se emplearon las siguientes combinaciones (Tabla 4.8) de las sondas marcadas con fluorescencia ya descritas previamente en la Tabla 3.10. Se analizaron muestras correspondientes al último día de funcionamiento del BMS durante el experimento 6 (día 60).

**Tabla 4.8 Combinaciones de sondas para FISH empleadas en este estudio.**

	Fluorocromo marcador y organismos diana:	
<b>Combinación:</b>	<b>CY3 (rojo)</b>	<b>FLUOS (verde)</b>
1	AOB mix (Betaproteobacterias oxidadoras de amonio, <i>Nitrosomonas</i> spp.)	EUB mix (todas las eubacterias)
2	Nso1225 ( <i>Nitrosomonas</i> spp., amplia)	Cluster6a192+C ( <i>Nitrosomonas</i> del cluster 6a)
3	Ncmob ( <i>Nitrosomonas mobilis</i> )	Nso1225 ( <i>Nitrosomonas</i> spp., amplia)
4	Ncmob ( <i>Nitrosomonas mobilis</i> )	NEU+CTE ( <i>Nitrosomonas</i> spp. halotolerantes/halófilos)
5	Nso1225 ( <i>Nitrosomonas</i> spp., amplia)	NEU+CTE ( <i>Nitrosomonas</i> spp. halotolerantes/halófilos)
6	Nsv444 ( <i>Nitrospira</i> spp.)	Nso1225 ( <i>Nitrosomonas</i> spp., amplia)
7	EUB mix (todas las eubacterias)	Ntspa662+C ( <i>Nitrospira</i> spp.)
8	Ntspa1431 ( <i>Nitrospira</i> sp. sublinaje I)	Ntspa1151 ( <i>Nitrospira</i> sp. sublinaje II)
9	Nit3+C ( <i>Nitrobacter</i> spp.)	Ntspa662+C ( <i>Nitrospira</i> spp.)
10	Nit3+C ( <i>Nitrobacter</i> spp.)	Nso1225 ( <i>Nitrosomonas</i> spp., amplia)
11	AMX820 (anammox)	EUB mix (todas las eubacterias)
12	AMX820 (anammox)	Nso1225 ( <i>Nitrosomonas</i> spp., amplia)

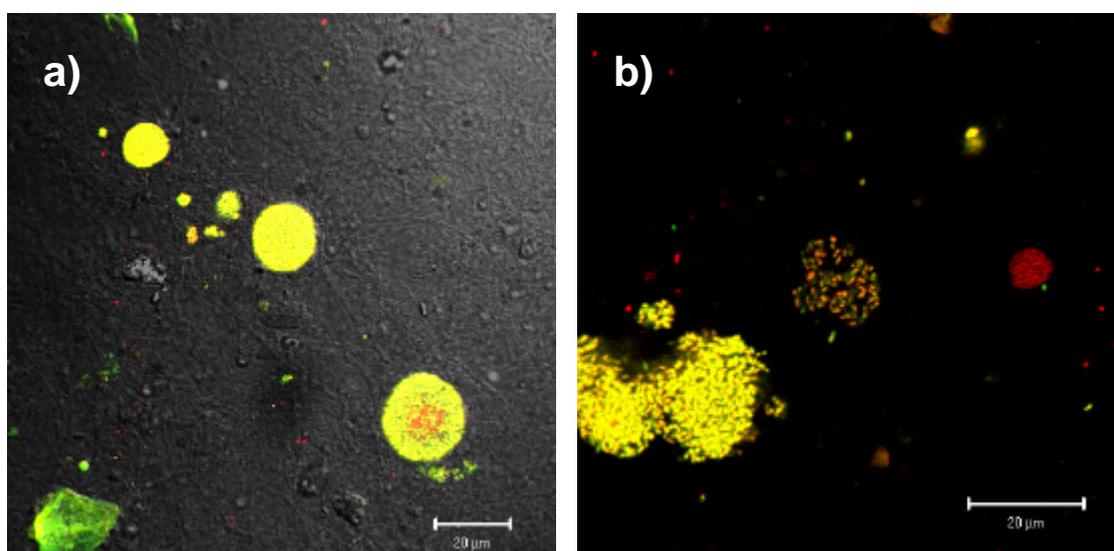
Para estudiar la composición de la comunidad oxidadora de amonio, se comenzó por emplear la combinación de sondas 1 (Tabla 4.8), que permitió visualizar microcolonias de  $\beta$ -proteobacterias oxidadoras de amonio (*Nitrosomonas* spp.), apreciándose claramente la existencia de colonias con diferentes morfologías (Fig. 4.48).



**Fig. 4.48.** Micrografías de CLSM de muestras de fango activo del BMS, tomadas durante el último día del experimento 6. a) y b) Microcolonias de  $\beta$ -proteobacterias oxidadoras de amonio (*Nitrosomonas* spp.), que hibridan con la sonda Nso1225 marcada con Cy3 (visibles en color amarillo). El resto de eubacterias hibridan sólo con la mezcla de sondas EUB mix (visibles en color verde). c) Detalle de b) que permite apreciar mejor la existencia de al menos dos morfologías distintas de microcolonias oxidadoras de amonio.

Para profundizar más en la composición de la comunidad oxidadora de amonio, se emplearon además las combinaciones de sondas 2, 3, 4, 5 y 6 (Tabla 4.8). Los

resultados de estos experimentos permitieron comprobar que la población oxidadora de amonio dominante en las muestras examinadas está filogenéticamente relacionada con las  $\beta$ -proteobacterias del cluster 6a (*Nitrosomonas oligotropha*/*N. ureae*), y sólo una proporción baja de las microcolonias oxidadoras de amonio visualizadas mediante CLSM no hibridó con la sonda Cluster6a192+C (Fig. 4.49). No se detectó la presencia de *Nitrosomonas mobilis*, ni de *Nitrosomonas* halotolerantes/halófilos, ni de *Nitrospira* spp.



**Fig. 4.49.** Micrografías de CLSM de muestras de fango activo del BMS, tomadas durante el último día del experimento 6. a) Microcolonias de bacterias oxidadoras de amonio, que hibridan con las sondas Nso1225 (*Nitrosomonas* spp., marcada con Cy3) y Cluster6a192+C (marcada con FLUOS), visibles en color amarillo. En esta micrografía, el resto de microorganismos en la muestra de fango se visualiza en el fondo en gris (SEM), apreciándose la abundancia de bacterias filamentosas. b) Imagen que muestra dos tipos de microcolonias de Betaproteobacterias oxidadoras de amonio (*Nitrosomonas* spp.) de diferente morfología. La combinación de sondas empleada es la misma que en a), que permite diferenciar las colonias relacionadas con el Cluster 6a de *Nitrosomonas* spp. (hibridan con ambas sondas y son visibles en color amarillo) y las que sólo hibridan con la sonda Nso1225 (*Nitrosomonas* spp., visibles en color rojo).

Para estudiar la composición de la comunidad oxidadora de nitrito, se empleó en primer lugar la combinación de sondas 7 (Tabla 4.8). En este caso, no se pudo detectar la presencia de *Nitrospira* spp. en las muestras examinadas mediante el empleo de la sonda Ntspa662+C. Para corroborar este resultado, se emplearon las combinaciones de sondas 8, 9 y 10. En ningún caso se detectó la presencia de *Nitrospira* sp. en las muestras analizadas. Con la combinación de sondas 9, fue posible visualizar un bajo número de células de *Nitrobacter* sp. en algunas de las muestras examinadas.

Por último, se descartó la presencia de poblaciones activas de bacterias anammox en el fango activo del BMS, mediante el empleo de las combinaciones de sondas 11 y 12.

## 5. DISCUSIÓN

### **Rendimiento de la eliminación de materia orgánica en el BMS.**

Los BMS han supuesto una importante innovación para el tratamiento de las aguas residuales urbanas y presentan numerosas ventajas frente a los fangos activos convencionales en términos de calidad del efluente, eficiencia de la biodegradación, y reducción de la producción de lodos (Melin *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2007). En el curso de los experimentos desarrollados en este estudio, las medidas de los parámetros físico-químicos DQO y DBO<sub>5</sub> demuestran que la planta piloto de BMS empleada es capaz de generar un efluente con unas características óptimas, según la normativa 91/277/CEE, operando bajo todas las variaciones de condiciones de trabajo que se impusieron, como el caudal, el TRH, TRC y diferentes concentraciones de MLSS.

Los mejores rendimientos de eliminación de DBO<sub>5</sub> se consiguieron durante los experimentos 4<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup>, cuando el TRH fue mayor (entre 14,4 y 15 h), alcanzando rendimientos de eliminación del 98%. En cambio, la tasa de eliminación máxima para la DQO se produjo cuando se trabajó con un TRH de 7,5 h, alcanzando valores de eliminación del 90,5%.

En general, estos valores de eliminación de la DQO y DBO<sub>5</sub> son similares a los resultados obtenidos por otros autores, descritos en la literatura. Liu *et al.*, (2005) trabajaron con un BMS a un TRH de 3,6 h, y alcanzaron rendimientos de eliminación de 96,78 y 82%, para la DBO<sub>5</sub> y DQO, respectivamente. Ren *et al.*, (2005) utilizaron para sus estudios un BMS trabajando a diferentes TRH (1, 2 y 3 h), y observaron que los mayores rendimientos de eliminación de DQO se obtuvieron con el TRH de 3 h. Los trabajos realizados por LaPara *et al.* (2001 a) en BMS que operaban con cuatro TRH diferentes (7,9, 13,1, 24,6 y 37,0 h) concluyen que la eliminación de la DQO es mayor a medida que se incrementa el TRH. Estos datos, junto con los obtenidos en nuestros estudios, muestran que el TRH es el factor que más influye en la eliminación de DQO y DBO<sub>5</sub>.

Con respecto a la influencia de los MLSS y la temperatura respecto a la eliminación de DQO y DBO<sub>5</sub>, en este estudio no se observaron mejoras al variar estos parámetros. Resultados similares obtuvieron Rosengerger *et al.*, (2000) trabajando con un BMS a escala de laboratorio a diferentes TRH (12-24 h), observaron que la tasa de eliminación de DQO siempre fue alta (86% de eliminación de DQO) independientemente de los cambios en la concentración de MLSS y de la composición de microorganismos y sólo se vio afectada al aumentar la tasa de carga de DQO por encima de 7 kg DQO/m<sup>3</sup>\*día.

### **Microorganismos heterótrofos totales (MHT)**

En los reactores biológicos convencionales para el tratamiento del agua residual, basados en la tecnología de fangos activos, ante un incremento de la concentración de SSV cabe esperar un aumento claro y proporcional de la concentración de MHT. Sin embargo, en el transcurso de este estudio esta circunstancia no se produce en el biorreactor de BMS, observándose una estabilidad en el número de microorganismos a pesar del aumento de SSV. Esto puede ser debido a que los microorganismos del fango activo de un BMS están expuestos a unas condiciones ambientales completamente diferentes a los de los fangos activos convencionales, en los cuales la concentración de biomasa depende principalmente del funcionamiento del decantador secundario. Este efecto ya lo apuntaron Witzig *et al.*, (2002), aseverando que al trabajar con condiciones de altas concentraciones de SSV y una completa retención de biomasa, implicaba modificaciones en la biología del biorreactor, como una disminución de la tasa de crecimiento por la disponibilidad de sustratos, al tener prioridad utilizar la energía para satisfacer los requerimientos de la comunidad. Sólo aquella energía en exceso sería utilizada para el crecimiento microbiano.

En cuanto a otros factores que pueden afectar al crecimiento microbiano en el biorreactor, el pH en nuestros experimentos osciló siempre entre 6,8–8,5 (fig. 4.4 y 4.19) y por tanto no se perfila como un factor que determine variaciones importantes del número de microorganismos.

En los experimentos 1º, 3º y 4º, la tendencia de la temperatura fue a subir, ya que comprendió los períodos de primavera-verano (fig. 4.5 y 4.20), en cambio, en los experimentos 2º, 5º y 6º la tendencia fue todo lo contrario, porque el periodo de investigación fue el comprendido en otoño-invierno. La temperatura tampoco pareció afectar significativamente al número de MHT, porque las variaciones producidas oscilaron entre valores similares en todos los experimentos, independientemente de la época del año en la que fueron realizados. En el experimento en el que se producen más variaciones en el número de MHT es el 1º.

En general, los números de MHT obtenidos en este estudio son análogos a los valores normales referidos para un sistema de fangos activos, aunque se aprecia un número ligeramente menor en el sistema de BMS. Así, en fangos activos, los resultados obtenidos por Güde (1982) mostraban un orden de magnitud medio de  $10^8$  UFC/ml. Por su parte, Kämpfer (1988) encontró una densidad de microorganismos heterotróficos comprendida entre  $10^7$  y  $10^8$  UFC/ml en plantas depuradoras de media carga. Witzig *et al.*, (2002), realizando estudios de la diversidad de las poblaciones microbianas utilizando la técnica de FISH, descubrieron que el contenido de células detectables era menor en un BMS que en un fango activo convencional. En estos sistemas, las condiciones de limitación de nutrientes, provocadas por la completa retención de biomasa, conducen a un estado en el cual las células no pueden dividirse, pero sí pueden participar en los procesos de degradación para satisfacer sus requerimientos de energía (Lobos *et al.*, 2005). Los datos obtenidos en el presente estudio igualmente indican que trabajar con altos niveles de SSV implica una baja tasa de crecimiento microbiano, lo que se ve reflejado en el mantenimiento de un número estable de MHT en el biorreactor, a pesar de los incrementos en la concentración de SSV.

### **Actividades enzimáticas**

El proceso de la hidrólisis enzimática en los tratamientos biológicos de la depuración de las aguas residuales urbanas es vital para completar la mineralización de los componentes orgánicos, de los cuales la mayoría son proteínas, carbohidratos y lípidos (Nielsen *et al.*, 1992). Para realizar la mineralización, los microorganismos

liberan al medio diferentes enzimas exocelulares. Las variaciones temporales de la actividad hidrolítica pueden responder a un mecanismo de regulación bacteriana ante los cambios en las condiciones ambientales, como la cantidad de sustrato, el aceptor de electrones, el pH o la temperatura (Bozcar *et al.*, 1992; Nybroe *et al.*, 1992).

En el curso de este estudio, durante el 1º experimento se siguió la evolución de 5 enzimas diferentes: fosfatasa básica, fosfatasa ácida,  $\alpha$ -glucosidasa, esterasa y proteasa. En los experimentos 2º, 3º, 4º, 5º y 6º se incluyó además la actividad deshidrogenasa, enzima intracelular cuya actividad se correlaciona con la captación de  $O_2$  y la capacidad de eliminación de los sustratos orgánicos mediante oxidación (Nybroe *et al.*, 1992).

LaPara *et al.*, (2001 b) estudiaron la actividad metabólica de un BMS con completa retención de biomasa, mediante la hidrólisis de polisacáridos (glucosidasa), proteínas y lípidos. Comprobaron que los valores de las actividades glucosidasa y esterasa fueron relativamente estables, pero con tendencia a disminuir con el tiempo, lo que suponía disminuir con el aumento de los SSV. Estas actividades permanecían estables o tendían a disminuir a medida que la limitación de nutrientes era mayor. Esta misma tendencia ha sido la observada en general en nuestros experimentos.

En este estudio, al comparar todas las experimentaciones realizadas, se observan valores medios más altos de la mayoría de las actividades enzimáticas durante los experimentos 1º, 3º y 4º. Esta predisposición puede estar relacionada con la temperatura y el pH, que son dos factores ambientales que tienen una importante influencia en la actividad enzimática y en el grado de solubilidad del fango en el biorreactor (Banister y Pretorius, 1998). Whiteley *et al.*, (2002) demostraron la existencia de una correlación positiva entre la temperatura y la actividad proteolítica, siendo esta máxima a temperaturas entre 20-22°C. En nuestro estudio, se observó cómo en los experimentos 1º, 3º y 4º el rendimiento en la degradación de la materia orgánica fue mayor, coincidiendo con los valores más altos de temperatura, que oscilaron entre 15-25°C. Sin embargo, en los experimentos 2º, 5º y 6º, los valores medios de las actividades fueron bajando paulatinamente, coincidiendo con la disminución del valor de las temperaturas, llegando a ser éstas de sólo 2,5°C en el

biorreactor en los días de temperatura más baja. En cuanto a la posible influencia del pH, como se ha comentado anteriormente, los valores obtenidos para este parámetro indican que osciló entre valores similares en la totalidad de los experimentos realizados, por lo que este factor no parece estar relacionado con los diferentes valores medios de las actividades enzimáticas registrados en cada experimento.

Las variaciones temporales en el grado de hidrólisis se puede explicar por cambios en las poblaciones bacterianas dominantes (Conrad *et al.*, 2000) así como en la cantidad de biomasa activa. En este sentido, la capacidad de los BMS para catabolizar sustratos es proporcional al nivel de biomasa (LaPara *et al.*, 2001(b)). La biomasa activa está íntimamente relacionada con la cantidad de SSV, por lo que al aumentar los SSV se esperaría un aumento de las actividades enzimáticas. Tal y como apuntamos en la sección anterior (5.1.1), el recuento de microorganismos heterótrofos no aumentó proporcionalmente al incremento de la concentración de SSV, debido a las relaciones de competencia que se crean en estos ecosistemas tan ricos en materia orgánica. Tampoco las actividades enzimáticas aumentaron proporcionalmente con respecto a la concentración de SSV, ya que en todos los experimentos se produjo una disminución en todas las actividades enzimáticas (excepto en la actividad deshidrogenasa) al alcanzar una concentración determinada de SSV, que fue variable en cada experimento. Una posible explicación a este fenómeno es la concurrencia de mecanismos de inhibición por producto o la inhibición por retroalimentación (Madigan *et al.*, 1997). Así, en el caso de la actividad fosfatasa, estudios realizados por Wright y Reddy (2001) en ambientes acuáticos demostraron que esta actividad era reprimida en presencia de altas concentraciones de fósforo inorgánico disuelto.

Otro factor importante para las actividades enzimáticas es la presencia de oxígeno disuelto en el agua. La transferencia de oxígeno decrece cuando hay una alta concentración de SSV, porque aumenta la viscosidad del fango activo y cambia sus propiedades reológicas (Rosenberg *et al.*, 2002), y esto puede ser una causa de la disminución de las actividades cuando se alcanzan determinadas concentraciones de SSV. La limitación de la disponibilidad de oxígeno puede provocar fuertes cambios en la supervivencia y en la actividad de algunos grupos de microorganismos, como por

ejemplo las bacterias nitrificantes, en concreto la oxidación del nitrito es particularmente sensible a la disponibilidad de oxígeno (Wyffels *et al.*, 2003).

Estudios realizados por Shang *et al.*, (2005), demostraron que la naturaleza de la biomasa, como la cantidad y la composición del EPS, cambiaban con las diferentes concentraciones de SSV. Las exoenzimas se encuentran localizadas en el EPS (Conrad *et al.*, 2000; Frølund *et al.*, 1995; Gessesse *et al.*, 2000; Guellil, *et al.*, 2001), por lo que la actividad enzimática puede verse afectada al aumentar la concentración de SSV, como se ha comprobado que ocurre en todos los experimentos realizados en este estudio.

### **Estudio de indicadores de contaminación fecal**

Los BMS son capaces de eliminar una amplia gama de microorganismos gracias al pequeño tamaño de poro de las membranas. Diferentes estudios han demostrado la eficiencia de estos sistemas para eliminar indicadores de contaminación fecal, como coliformes (Gander *et al.*, 2000) y enterococos fecales (Ueda y Horan, 2000).

### ***Escherichia coli***

La aplicación de los BMS presenta ventajas frente a las técnicas tradicionales de desinfección, tales como evitar la formación de subproductos derivados de los desinfectantes empleados (cloración). El proceso de filtración por membrana elimina completamente las bacterias coliformes y los sólidos suspendidos, generando un efluente de gran calidad respecto a los procesos convencionales (Arrojo *et al.*, 2005).

En todos los experimentos realizados en este estudio, el número de *E. coli* detectado en el influente varió en el tiempo, dependiendo de la carga contaminante del mismo, estos valores oscilaron entre 2,5-5,5 log UFC/ml.

En todos los experimentos se aumentó paulatinamente la concentración de SSV, lo que implicaría una mayor concentración de microorganismos en el biorreactor, pero

éste no se vio reflejado en un aumento en la población de *E. coli*, al igual que ocurrió en el caso de los MHT (ver apartado 5.1.1.).

A la salida del biorreactor se observó una ausencia total de *E. coli*, con lo que se podría afirmar que el sistema es capaz de eliminar el 100% de este tipo de indicador de contaminación fecal. Con esta condición se cumple un requisito indispensable para la reutilización de las aguas residuales. Sólo en ocasiones puntuales aparecieron *E. coli* en la salida, concretamente esto ocurrió durante el 3º experimento y en el 5º, como se puede ver en las figuras 4.30 y 4.32. Además de *E. coli*, se detectó a la salida una microbiota acompañante que tan sólo desaparecía al realizar la limpieza química de la membrana con hipoclorito sódico, necesaria para el mantenimiento periódico de la misma. La presencia de *E. coli* y de esta microbiota acompañante puede ser debida a la creación de una biopelícula en la cara interior de la membrana, generada por la proliferación de bacterias procedentes del tanque de agua tratada, ya que durante el curso del estudio éste no se mantuvo en condiciones de esterilidad, y el agua tratada se empleaba para el contralavado periódico de la membrana.

Gómez *et al.*, (2006 a, 2006 b), trabajando con membranas de ultrafiltración, también detectaron la presencia puntual de *E. coli* en el agua de salida, utilizando igualmente el método UNE-EN ISO 9308-1 para su detección. Al objeto de corroborar que estos microorganismos eran efectivamente *E. coli*, realizaron identificaciones taxonómicas usando el sistema API 20E (Bio Merieux, Marcy d'Etoile, France) y obtuvieron resultados sorprendentes, ya que ninguno de los aislamientos de *E. coli* detectados por el método UNE-EN ISO 9308-1 en el efluente correspondía realmente a *E. coli*, sino que se identificaban como *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* y otras bacterias no identificables mediante el sistema API 20E. Esto pone de manifiesto que el método utilizado para la detección de *E. coli*, aunque sea el recomendado por la normativa española, puede no ser lo suficientemente eficaz en determinados casos.

Los resultados obtenidos coinciden igualmente con los del trabajo realizado por Arrojo *et al.* (2005) en el que utilizaban una planta BMS marca Zenon con un módulo de membrana *hollow-fiber* con un tamaño de poro de 0,2 µm. Estudiaron la presencia de coliformes fecales y *E. coli* en el efluente y observaron una ausencia completa, aunque

se detectaron bacterias coliformes en el agua tratada a niveles de  $10^3$  CFU/100ml, debido posiblemente a la contaminación de los conductos del agua tratada.

Estudios realizados por Wen *et al.*, (2004) utilizando membranas del mismo tipo (*hollow fiber*), pero con una tamaño de poro mayor ( $0,4 \mu\text{m}$ ) conseguían una eficiencia de eliminación de *E. coli* del 98%. Gander *et al.*, (2000) trabajaron con membranas del tipo *plate and frame*, con dos tamaños de poro diferentes ( $5$  y  $0,4 \mu\text{m}$ ) para comprobar la capacidad de reducción de bacterias coliformes totales, obteniendo resultados de calidad del agua aptos para su reutilización tan sólo con la membrana de  $0,4 \mu\text{m}$  de tamaño de poro.

### **Colifagos**

Numerosos autores otorgan poca fiabilidad a la determinación de bacterias indicadoras de contaminación fecal como indicadoras de la contaminación viral (Mignotte *et al.*, 1999; Ueda y Horan, 2000; Skraber *et al.*, 2002; Brion, 2002; Hontoria *et al.*, 2003). Estos autores hacen alusión a la escasa correlación existente entre la presencia de virus patógenos y los indicadores bacterianos. La alta resistencia de los virus a los tratamientos de desinfección y a los factores ambientales, y la baja dosis infectiva que requieren, son alguna de las causas. Por esta razón se analizó la capacidad del sistema de BMS para la eliminación de virus del agua residual urbana, empleándose como indicador de contaminación viral los colifagos, que han sido propuestos en los últimos años como buenos indicadores de contaminación viral (Beaudeau *et al.*, 1997; Gómez y Hontoria, 2003; Skraber *et al.*, 2002; Brion, 2002). Otra razón para utilizar los bacteriófagos es que son muy parecidos en su estructura, morfología, tamaño y comportamiento a los virus entéricos (Maier *et al.*, 2000).

Para conocer el rendimiento de eliminación de virus por parte del sistema, se realizaron recuentos semanales de bacteriófagos en tres puntos de muestreo: la entrada, el biorreactor y la salida. A la salida del BMS, hay una ausencia completa de colifagos en todos los experimentos, exceptuando el día 4 del 4º experimento y los días 9 y 23 del 6º experimento. Esta presencia puntual de colifagos en la salida pudo ser debida a un error analítico, ya que tan sólo se detectan colifagos de manera

aislada en 3 días durante todos los experimentos realizados. La presencia de los colifagos en el efluente también puede producirse en los primeros días de funcionamiento del sistema o tras la limpieza química de la membrana, ya que al trabajar con un sistema BMS durante un tiempo prolongado se permite el desarrollo de una biopelícula sobre la membrana, que incrementa el rendimiento de eliminación de bacterias y virus (Chiemcheisri *et al.*, 1992; Shang *et al.*, 2005). En posteriores investigaciones, se propuso que la biopelícula atrapaba y acumulaba las partículas de tamaño vírico (Flood y Ashbolt, 2000; Sutherland *et al.*, 2004).

El desarrollo de la biopelícula sobre la membrana es pues el factor que más contribuye a la eliminación de colifagos. El efecto físico de la biopelícula es la reducción del tamaño del poro de la membrana (Ueda y Horan, 2000), y el efecto químico se produciría durante la aireación del fango activo, momento en el que los bacteriófagos colisionarían con la biopelícula y serían adsorbidos por ella (Lv *et al.*, 2005).

Estudios realizados por Ridgway y Flemming (1996) demostraron que en los primeros día de funcionamiento del BMS se forma una primera biopelícula y posteriormente se formaba una biopelícula secundaria (Ueda y Horan, 2000). Las características de la biopelícula formada dependen de factores como la concentración de SSV y del TRC (Shang *et al.*, 2005)

La ausencia de colifagos a la salida indica que la membrana de ultrafiltración es capaz de retener este tipo de indicadores de contaminación fecal y presumiblemente a la mayoría de los virus, ya que su tamaño oscila entre unos 25 nm y 300 nm (Ingraham y Ingraham, 1998) y el tamaño de poro de la membrana es de 40 nm.

Además de la eliminación de los bacteriófagos debido a la filtración a través de una membrana con tamaño de poro de 40 nm, también puede haber una eliminación por parte del propio fango activo, por floculación, por absorción de las partículas virales por las sustancias poliméricas extracelulares, por la inactivación por parte de enzimas extracelulares, y también por una depredación de virus por parte de otros microorganismos como bacterias y protozoos (Ueda y Horan, 2000; Lv *et al.*, 2005; Shang *et al.*, 2005). Esto podría explicar el bajo número de colifagos presentes en el biorreactor, en comparación con el número que aparece en el influente.

En el biorreactor se observó un aumento considerable de colifagos en el fango del BMS durante el experimento 2º (días 70-90) y el experimento 6º (días 20-30), que coincidió con el incremento progresivo de la concentración de SSV (Fig. 4.12 y 4.37). Esta tendencia sin embargo no fue observada en el resto de los experimentos. Una explicación posible para estos resultados es que la cantidad y la composición del EPS de la biomasa, así como las tasas de las actividades enzimáticas, cambian con las diferentes concentraciones de SSV, implicando así variaciones en la eliminación de colifagos por parte del propio fango activo (Shang *et al.*, 2005).

#### **Estudio de la población bacteriana del biorreactor utilizando TGGE basada en fragmentos amplificados del gen codificante del ARN ribosómico 16S.**

En los últimos años, la aplicación de las técnicas independientes de cultivo al estudio de la microbiología de los sistemas de tratamiento de aguas ha supuesto un gran avance en el conocimiento acerca de la ecología microbiana de los mismos. La existencia de nuevos géneros bacterianos con interés biotecnológico se ha puesto de manifiesto gracias a estas técnicas, al mismo tiempo que se ha podido demostrar que determinados grupos bacterianos, cuyo cultivo en condiciones de laboratorio es difícil o hasta la fecha imposible, juegan importantes papeles en procesos como el tratamiento de las aguas residuales para la eliminación de nitrógeno (Jetten *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 2002). La comparación de datos obtenidos mediante el empleo simultáneo de técnicas dependientes e independientes de cultivo indican que, en los fangos activos de los sistemas de tratamiento del agua residual, el número de bacterias cultivables constituye solamente un 5-15% del número total de bacterias (Amann *et al.*, 1998, Bramucci *et al.*, 2003). Debido a ello, en este estudio se consideró esencial el empleo de un método independiente de cultivo para profundizar en el conocimiento de la composición del fango activo del BMS, y se escogió para ello la metodología TGGE, basada en la amplificación y secuenciación parcial del gen codificante del ARNr 16S.

La técnica TGGE genera perfiles de bandas que representan las poblaciones dominantes dentro de una comunidad bacteriana compleja. Esta técnica, junto con su

análoga DGGE, ha sido ampliamente usada en los últimos años para estudiar la variedad de diferentes ecosistemas bacterianos, incluyendo fangos activos de plantas depuradoras, sistemas de depuración basados en filtros sumergidos y sistemas BMS (Gómez-Villalba *et al.*, 2006; LaPara *et al.*, 2001 a, 2006; Miura *et al.*, 2007; Morgan *et al.*, 2002; Stamper *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2002). Existen por tanto estudios previos sobre las comunidades bacterianas en los BMS, sin embargo, la información sobre la estructura, biodiversidad y estabilidad de las mismas en sistemas que tratan el agua residual urbana es aún muy escasa. Esto se debe en parte a que muchos de estos estudios previos se han realizado partiendo de agua residual sintética, y en experimentos efectuados con tiempos de operación relativamente cortos.

Para el estudio de la comunidad microbiana mediante TGGE, generalmente se asume que cada banda corresponde a una única población (especie) y que su densidad se corresponde con la abundancia relativa de la misma. No obstante se ha de tener en consideración que esta afirmación puede no ser del todo correcta, porque la técnica de TGGE se basa en la reacción de amplificación PCR de las poblaciones desconocidas (Becker *et al.*, 2000; Farrelly *et al.*, 1995; Polz *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1996), y dicha reacción puede introducir determinados artefactos (Wang *et al.*, 1997). En la reacción de PCR existe además una amplificación preferente de las moléculas de ADN más abundantes en la muestra inicial, produciéndose un sesgo en la composición de la muestra amplificada al final. No obstante, la abundancia y la densidad de las bandas puede dar una medida de la diversidad de la comunidad bacteriana original, aunque no exactamente del clásico significado dado para el índice de diversidad de Shannon (Stamper *et al.*, 2003).

Aunque la técnica TGGE no es cuantitativa, diversos estudios han constatado que esta metodología sólo es capaz de detectar organismos que constituyan como mínimo un 1% de la comunidad total (Muyzer y Smalla, 1998). Este umbral limita la detección de ADN amplificado a partir de células muertas o poblaciones poco numerosas, por lo cual se ha de considerar que las bandas presentes en los perfiles de TGGE son representantes de poblaciones mayoritarias en las muestras de las que proceden, cuyos genes para el ARNr 16S se encuentran en las concentraciones más altas (Lawrence *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos al analizar conjuntamente los perfiles de biodiversidad bacteriana, procedentes de la totalidad de los experimentos realizados en el curso de este estudio, muestran que el comportamiento de la comunidad procariota responsable de la depuración del agua residual fue similar al descrito para los consorcios de bacterias que crecen en condiciones de limitación de nutrientes en BMS alimentados con aguas residuales sintéticas (LaPara *et al.*, 2001 a); Morgan *et al.*, 2002) y aguas grises (Stamper *et al.*, 2003).

Al analizar los perfiles de bandas correspondientes a las muestras tomadas semanalmente del BMS (fig. 4.38, 4.39, 4.40, y fig. 4.42) se aprecian cambios en la composición de la comunidad microbiana al variar las condiciones de trabajo de la planta durante el tiempo de operación de la misma. Los perfiles de las muestras de cada uno de los seis experimentos realizados se agrupan en clusters claramente diferenciados, a excepción de los experimentos 5º y 6º que forman un único cluster (fig. 4.42). Dentro de cada experimento realizado, la comunidad bacteriana experimenta variaciones secuenciales, que se reflejan en la evolución de los perfiles de composición de la comunidad a lo largo del tiempo, de manera que las muestras tomadas al comienzo y al final de cada experimento tienden generalmente a separarse en subclusters diferentes. En las figs. 4.38-4.40 se puede apreciar la existencia de tipos de bandas que aparecen sólo en algunas muestras, ya que posteriormente desaparecen, o varían de intensidad. Aunque el TGGE no es una técnica cuantitativa debido a que está influenciada por la reacción de PCR, como ya hemos comentado anteriormente, el hecho de variar la intensidad de una misma banda en las diferentes muestras está relacionado con un cambio en su abundancia relativa en la composición de la comunidad bacteriana (Stamper *et al.*, 2003; Brüggemann *et al.*, 2000).

La variable que más parece afectar a la composición de la comunidad microbiana en la planta piloto empleada en este trabajo es la concentración de los SSV. Así, en el 2º experimento se puede observar claramente un cambio drástico en los perfiles de bandas (fig. 4.38) que se obtienen desde el día 84 hasta el final del experimento. Este cambio coincidió con una fuerte subida de la concentración de los SSV en el fango, que pasaron de valores comprendidos entre 4.500-7.300 mg/l en los días 66-77 de funcionamiento, a valores de 10.500-13.800 mg/l en los días 84-105 (fig. 4.1). En el

dendograma obtenido del análisis de los perfiles de bandas (fig. 4.42) también se puede observar como los días 84-105 del experimento se agrupan en un cluster independiente, presentando una similitud de tan sólo el 64% con el resto de los muestreos realizados durante el experimento 2º. De estos resultados se puede concluir que el cambio de la concentración de SSV en el biorreactor afecta significativamente a la composición de la comunidad microbiana.

Stamper *et al.*, (2003) observaron igualmente cambios secuenciales de la composición de la comunidad del fango de un BMS destinado al tratamiento de aguas grises, si bien concluyeron que la variable que más parecía afectar a la composición microbiana eran variaciones puntuales al alza de la DBO<sub>5</sub> del influente. Un hecho interesante del estudio realizado por Stamper *et al.*, (2003) es que los cambios de la composición de la comunidad que determinan la separación de los perfiles de las poblaciones en clusters significativamente diferentes coincidían con incrementos de la concentración de los SSV por encima de los 10.000 mg/l. En nuestros experimentos, no hemos encontrado relación entre los cambios observados en la composición de la comunidad bacteriana y picos ocasionales en los valores de la DQO o DBO<sub>5</sub>. No obstante, hay que tener en consideración que las aguas residuales domésticas y las aguas grises guardan importantes diferencias cualitativas y cuantitativas en su composición (Stamper *et al.*, 2003). La composición de las aguas grises, procedentes únicamente del uso de cocinas, duchas y lavandería, es mucho más simple que la del agua residual urbana, lo cual puede influenciar muy decisivamente la composición de la comunidad bacteriana del fango y los cambios experimentados por la misma (LaPara *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2007).

Durante el 4º experimento, también se aprecia cómo las muestras tomadas durante las 3 últimas semanas de experimentación se separan en un cluster significativamente diferente del resto del experimento (72% de similitud). Aparentemente, este cambio en la población no estuvo aparejado a ningún cambio de la concentración de los SSV (fig. 4.14), pero si se puede observar que el pH en el periodo de los días 31-45 se mantuvo en valores considerablemente más bajos que los días anteriores (fig. 4.19). Al mismo tiempo, la temperatura fue ligeramente superior (fig. 4.20) y la concentración de oxígeno fue menor que durante los primeros días del experimento (fig. 4.21). Estos

resultados indican que la composición de la comunidad microbiana también se vio afectada al variar las condiciones de trabajo de la planta que pueden afectar a la disponibilidad de oxígeno disuelto, y experimenta cambios en función de condiciones ambientales como la temperatura y el pH. La influencia de estos factores en la biodiversidad de los fangos de BMS ha sido igualmente constatada por otros autores (Miura *et al.*, 2007).

Para estudiar el efecto del cambio de caudal en la comunidad bacteriana del biorreactor, se pasó del 5º al 6º experimento sin cambiar la concentración de los SSV y variando sólo el caudal, que se incrementó de 0,25 a 0,5 l/min. Como se puede ver en el dendograma (fig. 4.42) el muestreo correspondiente al día 3 del 6º experimento se agrupa junto con el resto de muestras tomadas a lo largo del 5º experimento, con una similitud del 88%. Entre los días 4-11 del 6º experimento, se produjo una pérdida accidental de biomasa debida a una avería, de manera que los SSV descendieron bruscamente por debajo de los 3000 mg/l (fig. 4.14). En el dendograma de la fig. 4.42, se aprecia que los carriles correspondientes a los muestreos inmediatamente posteriores a la pérdida de SSV (días 17 y 24) se agrupan en un cluster separado de manera significativa del resto de los muestreos de los experimentos 5º y 6º (66% de similitud). Este mismo efecto se vio en los estudios realizados por Stamper *et al.*, (2003) en los que durante 29 días el BMS sufrió pérdidas de SSV, y los carriles de TGGE correspondientes a los días posteriores a la pérdida también se agrupan en un cluster separado. En el transcurso posterior del experimento 6º, cuando los SSV volvieron a valores similares a los anteriores a la pérdida accidental de biomasa, las muestras tomadas a partir del día 30 de operación vuelven a agruparse en el cluster correspondiente al experimento 5º. Este resultado sugiere que el cambio de caudal no afecta en gran medida a la composición de la comunidad microbiana, siendo por tanto el factor que más parece afectar los cambios la concentración de los SSV.

La recuperación de la diversidad biológica del sistema en la fase final del experimento 6º se puede explicar por la persistencia de algunas especies, que son capaces de adaptarse a las fluctuaciones de las condiciones ambientales durante los experimentos. Estas especies de permanencia estable podrían ser las mejores candidatas para incorporarlas a un biorreactor en su fase inicial (Stamper *et al.*, 2003).

Los resultados indican además que la flexibilidad de la comunidad bacteriana para adaptarse a los cambios ambientales es de considerable importancia para el funcionamiento estable del BMS.

Los estudios basados en TGGE permiten además la identificación de los miembros dominantes de las comunidades bacterianas, mediante la reamplificación y secuenciación de las bandas separadas en el gel, y la posterior comparación de las secuencias con las depositadas en las bases de datos (Muyzer y Smalla, 1998). De este modo, en el curso del presente estudio se logró secuenciar un total de 33 bandas a partir de los geles de TGGE realizados. La afiliación taxonómica más probable de las secuencias y la relación evolutiva entre ellas se muestran en las tablas 4.3, 4.4 y 4.5 y en el árbol filogenético correspondiente (fig 4.41).

Estudios realizados con diversas tecnologías independientes de cultivo (DGGE, FISH, T-RFLP, bibliotecas de clones, y otros), tanto basados en ADN como en ARN, han confirmado la presencia de complejas comunidades microbianas que son probablemente la razón fundamental del funcionamiento de los sistemas de tratamiento de aguas residuales, y coinciden en demostrar que los miembros dominantes de dichas comunidades microbianas en los biorreactores aeróbicos de las plantas depuradoras de aguas residuales son las Proteobacterias, siendo evidente la mayor abundancia de organismos afiliados a la clase  $\beta$ -proteobacterias (Amman *et al.*, 1996; Bond *et al.*, 1995; Bramucci *et al.*, 2003; Eschenhagen *et al.*, 2003; Luxmy *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2006; Manz *et al.*, 1994; Muyzer *et al.*, 1993; Olsen *et al.*, 1986; Rosemberg *et al.*, 2000; Snaidr *et al.*, 1997; Witzig *et al.*, 2002). Estos datos contradicen los de estudios anteriores basados en técnicas dependientes de cultivo, que sugerían la dominancia de las  $\alpha$ -proteobacterias en este tipo de ecosistemas (Bramucci *et al.*, 2003).

Las investigaciones sobre la comunidad bacteriana de BMS realizadas por Rosenberg *et al.*, (2000) utilizando la técnica FISH (sonda EUB 338) y tinción con DAPI, demostraron que las clases dominantes del fango activo del BMS pertenecían a las clases  $\alpha$ -proteobacterias (2-6%),  $\beta$ -proteobacterias (14-18%) y  $\gamma$ -proteobacterias (1-2%). Utilizando esta técnica pudieron comprobar que tan sólo el 40-50% de las células

teñidas con DAPI emitían fluorescencia en comparación con el 80% de células detectables en fangos activos de depuradoras convencionales. Este hecho corresponde al bajo contenido ribosomal de las bacterias, debido a las condiciones ambientales impuestas por el BMS, como la limitación de nutrientes que provoca una baja tasa de crecimiento celular (Witzig *et al.*, 2002). Otros estudios basados en FISH y realizados con muestras de fangos procedentes de distintos tipos de biorreactores corroboran resultados similares, incidiendo en la alta abundancia relativa de las  $\beta$ -proteobacterias, situándola en valores del 14-20% o superiores (Eschenhagen *et al.*, 2003; Luxmy *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2007).

Otros investigadores han utilizado técnicas de quimiotaxonomía también independientes de cultivo, como el estudio de los perfiles de las ubiquinonas respiratorias (UQ-8), para el estudio de la comunidad microbiana del fango activo de un BMS, y han obtenido resultados semejantes, concluyendo igualmente que la clase dominante en estas comunidades son las  $\beta$ -proteobacterias (Ahmed *et al.*, 2007).

Todos los resultados obtenidos en el presente estudio están en concordancia con muchas de las investigaciones precedentes realizadas sobre la composición de la comunidad microbiana de los procesos de tratamiento de aguas residuales. La mayoría de las bandas de TGGE cuya amplificación y secuenciación fue posible (fig. 4.41) se identificaron como pertenecientes a la clase Proteobacteria (82% de las secuencias). Los grupos más numerosos en el fango activo del BMS fueron las  $\alpha$ -proteobacterias (9 secuencias) y las  $\beta$ -proteobacterias (9 secuencias). Dentro de las  $\alpha$ -proteobacterias, la familia más representada fue la *Caulobacteraceae*, y de las  $\beta$ -proteobacterias la familia *Comamonadaceae*. El siguiente grupo más abundante en el fango activo fue el grupo de las  $\gamma$ -proteobacterias (7 secuencias), casi todas ellas afiliadas a la familia *Xanthomonadaceae*.

Estudios filogenéticos recientes, realizados sobre un amplio número de muestras de diferentes procedencias geográficas, demuestran que existen clusters bacterianos filogenéticamente coherentes típicos de las aguas dulces (incluyendo las aguas residuales), y confirman la abundancia global de las  $\beta$ -proteobacterias en dichos hábitats, con una importante presencia numérica de integrantes de la familia

*Comamonadaceae*, que constituyen el denominado cluster cosmopolita de aguas dulces  $\beta$ 1 (Glöckner *et al.*, 2000; Brümmer *et al.*, 2003). Las bacterias de esta familia son metabólicamente muy versátiles, muchas cepas degradan compuestos orgánicos complejos (Willem y De Vos, 2002), y las bacterias de los géneros *Acidovorax* y *Variovorax* son capaces de crecer quimiolitotróficamente (Kerstens *et al.*, 2003).

LaPara *et al.*, (2001 a) analizaron la comunidad bacteriana de un BMS termófilico (>45°C) utilizando agua residual sintética (con un TRH de 7,9 h), mediante la determinación de la secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S, y encontraron que la mayoría de las bacterias identificadas era bacterias Gram-positivas de bajo contenido G+C y bacterias pertenecientes a las clases  $\beta$ -proteobacterias y  $\gamma$ -proteobacterias, siendo la familia más abundante dentro de la clase  $\gamma$ -proteobacterias la *Xanthomonadaceae*. Posteriores investigaciones de este mismo autor corroboran los resultados obtenidos, siendo de nuevo las clases dominantes las  $\beta$ -proteobacterias y  $\gamma$ -proteobacterias (LaPara *et al.*, 2006).

Comparando los resultados de LaPara *et al.*, (2001 a) con nuestros resultados de los experimentos 3º y 6º, durante los que se operó con un TRH similar, se puede observar que aunque se trabajó a diferentes temperaturas también aparecen representadas bacterias de la familia *Xanthomonadaceae* (bandas 22b, 28b y 29c). La banda 22b aparece en el día 3 del 4º experimento y la 28b está representada durante todo el experimento 4º. Los microorganismos más similares a la banda 28b son *Thermomonas haemolytica* con un 98,2% de identidad y *Luteimonas* sp. con un 96,5%. La banda 29c está representada durante todo el 6º experimento y los microorganismos más similares son *Lysobacter* sp. y *Xanthomonas* sp. con unos porcentajes de identidad de 93,7 y 94,5% respectivamente.

En el estudio realizado de la población bacteriana del biorreactor utilizando fragmentos amplificados del gen codificante del ARNr 16S, también se detectó la presencia de una banda cuya secuencia corresponde a la de una población afiliada al género *Nitrospira* (banda 19a), que pertenece al grupo de las bacterias nitrificantes de fase II (fig. 4.41), Los microorganismos más similares a esta banda fueron *Candidatus Nitrospira defluvii* y *Nitrospira cf. moscovensis* SBR2016 con un porcentaje de identidad del 100 y 99,2%

respectivamente. La especie *Nitrospira moscovensis* fue aislada de tuberías de hierro oxidadas, y es miembro de un Phylum independiente (Ehrich *et al.*, 1995). El género *Nitrospira* podría ser el más importante en la oxidación del nitrito en los fangos activos, ya que habitualmente se describe presente en mayor abundancia que *Nitrobacter* en estos ecosistemas (Ehrich *et al.*, 1995; Mobarry *et al.*, 1996; Schramm *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1996; Witzig *et al.*, 2002).

Aunque las bandas obtenidas por PCR-TGGE y secuenciación, que tienen un tamaño aproximado de 200 pb, pueden ser insuficientes para la identificación filogenética a menos que presenten un porcentaje de identidad superior al 90% (Hugenholtz *et al.*, 1998) en nuestros estudios todas las secuencias superaban el 90% de identidad, excepto las de 5 bandas (1b, 2b, 9a, 20a, 26a). Esto indica que estas secuencias corresponden a bacterias pertenecientes a grupo de bacterias aún no conocidos, y su presencia como miembros mayoritarios de la comunidad sugiere la posible importancia de estos grupos en el funcionamiento de los sistemas BMS.

### **Estudio de la población de las bacterias oxidadoras de amonio del biorreactor utilizando fragmentos amplificados del gen estructural de la subunidad $\alpha$ de la enzima amonio-monooxigenasa (*amoA*)**

El estudio de las bacterias nitrificantes en ecosistemas naturales y en sistemas de depuración de aguas residuales se ha beneficiado enormemente con la introducción de las técnicas de biología molecular en el campo de la ecología microbiana, dado que este grupo de bacterias presenta algunas particularidades, como es el hecho de que muchos de sus integrantes son especialmente difíciles de cultivar bajo condiciones de laboratorio, y existen varios géneros o especies que aún son no cultivables. Por otro lado, la proximidad evolutiva del grupo de las bacterias nitrificantes de fase I facilita el diseño de cebadores específicos de grupo para la amplificación de genes de interés como marcadores. De este modo, diversos autores han diseñado con éxito cebadores para la amplificación específica de fragmentos del gen *amoA*, el cual es empleado cada vez con más frecuencia como marcador filogenético para las bacterias oxidadoras de amonio de la clase  $\beta$ -proteobacteria en los estudios de los años

recientes (Gómez-Villalba *et al.*, 2006; Horz *et al.*, 2000; Layton *et al.*, 2005; Nicolaisen y Ramsig, 2002; Oved *et al.*, 2001; Purkhold *et al.*, 2000; Sakano *et al.*, 2002), y por esta razón se escogió también como marcador para nuestros estudios. Varios autores han diseñado para ello distintas parejas de cebadores, de los cuales los diseñados por Nicolaisen y Ramsig (2002) fueron considerados los más apropiados, por carecer de degeneraciones y haber sido exhaustivamente probados con éxito en la amplificación de *amoA* a partir de muestras de diferentes procedencias, características que hacen a estos cebadores de elección cuando se emplean en la metodología DGGE/TGGE (Muyzer y Smalla, 1998; Muyzer, 1999).

Purkhold *et al.*, (2000) destacaron el valor taxonómico de la filogenia basada en *amoA/AmoA*, puesto que la filogenia inferida de la comparación de las secuencias de *amoA/AmoA* es equivalente a la obtenida a partir de las secuencias del gen codificante del ARNr 16S. Para el estudio de secuencias de *amoA* procedentes de muestras ambientales, estos autores establecieron un límite del 20% de divergencia de la secuencia de ADN como indicativo de especies no descritas con anterioridad (15% para la secuencia de aminoácidos).

Siguiendo estos criterios, los resultados del análisis de las secuencias de las distintas bandas de TGGE obtenidas en este estudio muestran cómo todas las bacterias nitrificantes de fase I detectadas y secuenciadas con éxito en el sistema BMS se afilian al género *Nitrosomonas*, y en concreto pertenecen al cluster 7, representado por las especies *N. europaea* y *N. eutropha*, no habiéndose identificado ninguna banda con la secuencia afiliada al género *Nitrospira*. En general, se observó una diversidad muy baja de las bacterias nitrificantes de fase I que pudieron ser secuenciadas en el fango activo del biorreactor (fig. 4.44 y 4.45). Todas las secuencias de *amoA* obtenidas en el estudio presentaron una divergencia con las depositadas en las bases de datos que fue inferior al 20%, lo cual indica que las bacterias detectadas mediante esta técnica son filogenéticamente cercanas a especies validadas de bacterias oxidadoras de amonio (tabla 4.6 y 4.7). Al comparar los árboles filogenéticos generados a partir de la secuencia de *amoA* y *AmoA* (fig. 4.44 y 4.45) se observó una mayor divergencia de las

secuencias a nivel de ADN. En cambio, en el árbol filogenético realizado con las secuencias ya traducidas de la proteína AmoA, todas se agrupan en un solo subcluster, junto con *N. europaea*.

Estos resultados son acordes con los de las investigaciones más recientes sobre la biodiversidad de las bacterias nitrificantes de fase I en los fangos activos, que demuestran que son los microorganismos del género *Nitrosomonas* los que llevan el peso de la oxidación de amonio en los sistemas de depuración del agua residual urbana, siendo los microorganismos afiliados a las especies *N. europaea*, *N. marina* y *N. eutropha* los más abundantes (Mobarry *et al.*, 1996; Otawa *et al.*, 2006; Schramm *et al.*, 1996; Siripong y Rittmann, 2007; Stephen *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1995; Wittebolle *et al.*, 2005). En contraste, *Nitrosospira* spp. son encontradas como las oxidadoras de amonio dominantes en muy pocos casos (Purkhold *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2002). La abundancia relativa de *Nitrosomonas* y *Nitrosospira* se ha relacionado con diferencias fisiológicas asociadas con su tolerancia o sensibilidad a las concentraciones altas de amonio (Prosser y Embley, 2002; Prosser, 2007).

En cuanto a estudios realizados sobre la biodiversidad de las bacterias nitrificantes en sistemas BMS, investigaciones anteriores pusieron de manifiesto la presencia de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* (Luxmy *et al.*, 2000). Al cuantificar *Nitrosomonas* encontraron que estas bacterias se localizaban en los flóculos de menor tamaño, y representaban el 6% del total de la población de eubacterias detectadas mediante FISH, si bien esta cifra puede estar sobreestimada ya que la sonda universal empleada en el estudio (EUB338) no es lo suficientemente específica para detectar a la totalidad de las eubacterias (Daims *et al.*, 1999). Por su parte, Zhang (1997) encontró que la mayor tasa de nitrificación se producía cuando menor era el tamaño del flóculo. Una de las ventajas de los sistemas de BMS es que se caracteriza por generar flóculos más pequeños, lo cual puede contribuir a favorecer el crecimiento y actividad de las bacterias nitrificantes. Witzig *et al.*, (2002) demostraron la presencia del género *Nitrospira* en una proporción menor al 1% en el total de la comunidad de las bacterias nitrificantes, y no detectaron presencia alguna de los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* y *Nitrobacter*, los cuales son típicos integrantes de los

sistemas de depuración convencionales (Wagner *et al.*, 1995). A la vista de estos datos, postularon la posible presencia de oxidadoras de amonio desconocidas no detectadas con las sondas empleadas.

*Nitrosomonas europaea* se considera la oxidadora de amonio modelo en el tratamiento del agua residual, aunque análisis recientes en fangos activos y biopelículas nitrificantes muestran que otras oxidadoras de amonio también pueden cumplir papeles importantes. Así, en plantas industriales y a escala de laboratorio de nitrificación-desnitrificación, la oxidadora de amonio predominante fue *N. mobilis* (Juretschko *et al.*, 1998; Daims *et al.*, 2001). Es frecuente que las plantas basadas en la tecnología de fangos activos están dominadas por una sola especie o incluso por una sola cepa de oxidadoras de amonio (Juretschko *et al.*, 1998; Ottawa *et al.*, 2006). Se considera que la distribución de las bacterias oxidadoras de amonio está muy controlada por factores ambientales, que actúan con un efecto de selección, determinando la dominancia de dichas especies o cepas concretas (Ottawa *et al.*, 2006). Sin embargo, en estudios conducidos mediante TGGE, realizados en una planta piloto de tratamiento de agua residual urbana basada en el empleo de biopelículas desarrolladas en filtros sumergidos, se observó la presencia de una amplia diversidad de especies del género *Nitrosomonas* (Gómez-Villalba *et al.*, 2006).

### **Estudio de las bacterias nitrificantes mediante FISH.**

El presente estudio se ha realizado en paralelo con otro trabajo acerca de la eficiencia del sistema BMS en la eliminación del nitrógeno del agua residual doméstica. En el curso de dicho estudio paralelo, se comprobó cómo en algunos de los experimentos realizados se producía un importante incremento de la concentración de nitrito en el agua tratada en el BMS (Poyatos, 2007), posible indicación de que se estaba produciendo algún tipo de fallo en el sistema de tratamiento biológico. La nitrificación microbiana es el proceso clave en la eliminación del amonio de las aguas residuales, por esta razón se decidió estudiar en mayor profundidad las bacterias oxidadoras de amonio y oxidadoras de nitrito en el fango activo del BMS en un momento en el cual se estaba produciendo la acumulación de nitrito en el agua del

efluente. De esta forma, se analizaron mediante FISH unas muestras del fango activo, correspondiente al último día de operación del BMS en el experimento 6º. En el día del muestreo, las concentraciones de  $\text{NO}_2^-$  en el agua del influente y a la salida fueron de 0,0 y 16,24 mg/l, respectivamente.

El estudio realizado con la técnica FISH demostró que en la muestra analizada había una presencia abundante de bacterias oxidadoras de amonio (Fig. 4.46), pero no se detectaron bacterias del género *Nitrospira*, y sólo se visualizaron de manera aislada algunas células que hibridaron con la sonda específica del género *Nitrobacter*. Estos resultados indican que en el momento del muestreo las bacterias oxidadoras de nitrito no se encontraban fisiológicamente activas en el fango del BMS, explicando la acumulación de nitrito registrada durante dicha etapa de funcionamiento del biorreactor. Para corroborar estos resultados, se comprobó también mediante FISH la ausencia de microorganismos anammox.

En los días finales del experimento 6º, conducido en el invierno de 2005, la concentración de SSV era elevada (11.500 mg/l, fig. 4.13) y la concentración de  $\text{O}_2$  disuelto era inferior a 2 mg/l (fig. 4.21). Un importante factor que limita el crecimiento de las bacterias nitrificantes es la baja concentración de  $\text{O}_2$ , siendo las bacterias oxidadoras de nitrito las más sensibles a la deficiencia de oxígeno (Wyffels *et al.*, 2003). Como ya se comentó anteriormente, la eficiencia de la transferencia de oxígeno se reduce al incrementarse la concentración de SSV ya que aumenta la viscosidad del fango (Rosenberger *et al.*, 2002). Por otro lado, durante los últimos días del experimento 6º se registraron en el biorreactor temperaturas muy bajas (5-10 °C, fig. 4.20). Las temperaturas por debajo de 8°C afectan negativamente a las bacterias nitrificantes, en especial a las oxidadoras de amonio (Egli *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2005). Todas estas circunstancias desfavorables para el proceso de nitrificación pudieron conducir al incremento de la concentración de formas tóxicas de N en el fango (amonio y nitrito), que generalmente son muy mal toleradas por *Nitrospira* (Abeling y Seyfried, 1992; Ehrich *et al.*, 1995).

Se ha postulado que la predominancia de *Nitrospira* sobre *Nitrobacter* en los tratamientos del agua residual es el resultado de las distintas estrategias de

supervivencia de estos microorganismos. *Nitrospira* es de crecimiento más lento y está mejor adaptada a concentraciones bajas de nitrito, que son las condiciones más frecuentes en las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas, donde *Nitrospira* puede competir mejor desplazando a *Nitrobacter*. En aquellas plantas donde se produzcan elevaciones temporales o espaciales de la concentración de nitrito, ambos oxidadores de nitrito podrían coexistir. Cuando se acumulan concentraciones muy elevadas de nitrito (hasta 80 mg/l del efluente del reactor), *Nitrobacter* desplaza a *Nitrospira*, y esta dominancia se ha mostrado irreversible (Wagner *et al.*, 2002).

En lo que respecta a las bacterias oxidadoras de amonio, la técnica FISH reveló la ausencia de *Nitrosospira* y la presencia dominante en la muestra analizada de bacterias afiliadas al cluster 6a (Fig. 4.47), en el que se encuentran agrupadas 2 especies descritas, *Nitrosomonas oligotropha* y *N. ureae*, además de 5 aislamientos no clasificados y 36 clones ambientales (Prosser, 2007). Este fue un resultado ciertamente inesperado, puesto que los estudios realizados mediante la técnica TGGE sólo habían puesto de manifiesto la presencia en el fango activo del BMS de secuencias de *amoA* evolutivamente cercanas a las especies del cluster 7 (*N. europaea*/*N. eutropha*). Debe tenerse en cuenta que la técnica TGGE se basó en la amplificación de fragmentos del gen *amoA*, mientras que la técnica FISH se basó en la hibridación con sondas específicas que tienen como diana el ARNr 16S. Otra posible causa de la divergencia de los resultados al usar técnicas diferentes es que mediante FISH tan sólo se detectan aquellas bacterias que se encuentren fisiológicamente activas y que tengan un alto contenido en ARNr (DeLong *et al.*, 1989), en cambio en el caso de la técnica de PCR-TGGE esta condición no es necesaria para la detección, por lo que pueden visualizarse bandas correspondientes a poblaciones muy abundantes pero que no estén fisiológicamente activas en un momento dado. Esta posibilidad la corrobora un estudio previo (Wittebolle *et al.*, 2005), en el cual se analizó la comunidad oxidadora de amonio de una planta de tratamiento de agua residual industrial, comparando los perfiles de DGGE obtenidos a partir de ADN y ARN. Se encontraron importantes diferencias en la composición de la comunidad de nitrificantes de fase I, lo que sugiere que las especies más abundantes no necesariamente son las más activas.

En cualquier caso, el empleo de la técnica FISH en este trabajo tenía la sola finalidad de obtener datos puntuales sobre las posibles causas de fallo del proceso biológico de la eliminación de N del agua residual. Para extraer una conclusión sólida acerca de las divergencias encontradas entre los resultados de TGGE y FISH será necesario realizar en futuros estudios el seguimiento de la comunidad de las bacterias nitrificantes mediante ambas técnicas en paralelo durante el curso completo de la experimentación.

## 6. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio y considerando los antecedentes bibliográficos en relación con el tema, se han establecido las siguientes conclusiones que podríamos enumerar en los siguientes términos:

1. El número de microorganismos totales presentes en el biorreactor no varía al cambiar condiciones de trabajo como el caudal, la concentración de SSV y las variaciones en el volumen de purga, caracterizándose este tipo de sistemas por tener una baja tasa de crecimiento microbiana debido a la condición de limitación de nutrientes impuestas por la condiciones de trabajo de los BMS.
2. Las actividades enzimáticas microbianas en el biorreactor se ven afectadas por cambios en la concentración de SSV y por la temperatura, presentando mejores rendimientos a bajas concentraciones de SSV comprendidas entre 2.700-5.500 mg/l, excepto para la actividad deshidrogenasa, que tiene un rendimiento óptimo para concentraciones de SSV entre 10.200 y 11.200 mg/l. La temperatura es otro factor ambiental que condiciona el rendimiento de las actividades enzimáticas, siendo su valor óptimo entre 17-23°C, excepto para la actividad glucosidasa que presenta mayores rendimientos entre 7-13°C.
3. La comunidad bacteriana del biorreactor está dominada por bacterias pertenecientes a las clases  $\beta$ -proteobacterias,  $\alpha$ -proteobacterias y  $\gamma$ -proteobacterias.
4. Las modificaciones de las condiciones experimentales de un BMS (SSV, concentración de O<sub>2</sub> disuelto, temperatura, caudal) inducen cambios en la biodiversidad bacteriana, haciendo que las distintas poblaciones se adapten progresivamente a las condiciones impuestas por la retención de biomasa en el biorreactor (aumento de la concentración de SSV).
5. Los estudios basados en la técnica TGGE demuestran que la comunidad de las bacterias oxidadoras de amonio en el biorreactor presenta una baja diversidad, estando representada por poblaciones filogenéticamente próximas a *Nitrosomonas europaea*/N. *eutropha*. La combinación de estos estudios con análisis mediante FISH sugiere la posible importancia de otras

poblaciones de bacterias oxidadoras de amonio, relacionadas con el cluster 6a.

6. La comunidad de las bacterias oxidadoras de amonio también se ve afectada por los cambios en las condiciones de trabajo del BMS y por las variaciones ambientales de pH, T<sup>a</sup> y concentración de O<sub>2</sub> disuelto. Las bacterias oxidadoras de nitrato sufren mayores variaciones ante los cambios de T<sup>a</sup>, oxígeno y sustancias tóxicas como el nitrato.
7. El sistema es capaz de eliminar eficazmente indicadores de contaminación fecal, como *E. coli* y bacteriófagos, cumpliendo la legislación vigente en la EU.

## 6. CONCLUSIONS

According to the results of the study, and taking into account the findings described in previously published papers, we conclude:

1. The number of THPM in the bioreactor does not experience any changes under different conditions of operation (water inflow rates, concentration of VSS, and different SRTs). The system is characterised for a low rate of microbial growth, due to the limitation of nutrients imposed in the SMB.
2. Microbial enzymatic activities in the SMB are affected by changes in the concentration of VSS and different temperatures of operation. The best yields of the enzymatic activities were registered at low VSS concentrations (2,700-5,500 mg/l), with the only exception of the dehydrogenase, that was optimal at a VSS concentration of 10,200-11,200 mg/l. The temperature of operation also influences the yields of the enzymatic activities, with an optimal value of 17-23°C for all of them, except for glucosidase, which was optimal at 7-13°C.
3. The bacterial community in the sludge of the SMB is dominated by  $\beta$ -proteobacteria,  $\alpha$ -proteobacteria and  $\gamma$ -proteobacteria.
4. Changes of the operation conditions and physical parameters in the SMB (VSS concentration, dissolved O<sub>2</sub>, temperature, and water inflow rates) induce a gradual shifting of the dominant members of the bacterial community. The bacterial populations adapted progressively to the conditions inflicted by the biomass retention in the bioreactor (increase of the concentration of VSS).
5. TGGE based studies demonstrated that the ammonia oxidizing community in the SMB show a low biological diversity. The major populations identified in the sludge were affiliated to the *Nitrosomonas europaea*/*N. eutropha* cluster. The combination of TGGE studies with data generated by FISH suggest the possible importance of other ammonia oxidizing bacteria in the SMB (nitrosomonads of cluster 6a).
6. The ammonia oxidizing community is also influenced by changes in the physical parameters in the SMB (pH, T<sup>a</sup>, and dissolved O<sub>2</sub> concentration). Nitrite oxidizers are more sensitive to changes in T<sup>a</sup>, dissolved O<sub>2</sub> concentration and accumulation of toxic by-products (nitrite).

7. The SMB system efficiently removes fecal-contamination indicators (*E. coli*) and bacteriophages, fulfilling the requirements of the European legislation currently in force.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abeling, U. and Seyfried C.F. 1992. Anaerobic-aerobic treatment of high-strength ammonium wastewater nitrogen removal via nitrite. *Water Science and Technology* 26:1007-1015.
- Adamczyk J., Hesselsoe M., Iversen N., Horn M., Lehner A., Nielsen P. H., Schloter M., Roslev P. and Wagner M. 2003. The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure and function. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:6875-6887.
- Adams, M.H. 1959. *Bacteriophages*. Interscience Publishers, Inc, New York. 443-451.
- Adema, C., Benson, J. 1999. Membrane biological non-oily wastewater treatment systems for ships. Virginia.
- Adham, S., P. Gagliardo, L. Boulos, J. Oppenheimer and R. Trussell. 2001. Feasibility of the membrane bioreactor process for water reclamation. *Water Science and Technology*. 43:203-209.
- Agencia Catalana del Agua (ACA). 2003. Proyecto de obra ejecutada para la instalación del tratamiento terciario (microfiltración) en la EDAR de La Bisbal del Ampurdán.
- Ahmed, Z., Cho, J., Lim, B-R., Song, K-G. and Ahn, K-H. 2007. Effects of sludge retention time on membrane fouling and microbial community structure in a membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science*. 287:211-218.
- Alm, E.W., Oerther, D.B., Larsen, N., Stahl, D.A., y Raskin, L. 1996. The Oligonucleotide Probe Database. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 3557-3559.
- Amann R.I., Binder B.J., Olson R. J., Chisholm S.W., Devereux R. and Stahl D.A. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 56:1919-1925.
- Amann, R., Fuchs, B.M. and Behrens, S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*. 12:231-236.

- Amann, R., Lemmer, H., Wagner, M. 1998. Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. FEMS Microbiology, Ecology 25:205-215
- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological reviews. 59:143-169.
- Amann, R.I., Snaidr, J., Wagner, M., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. 1996. In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. Journal of Bacteriology. 178:3496-3500.
- APHA, 2001. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20<sup>th</sup> edn. Edited by L.S. Clesceri, A.E. Greenberg & A.S. Eaton. Washington DC. American Public Health Association.
- Aptel, P. and Buckley, C. 1998. Tipos de operaciones de membranas. Tratamiento del agua por procesos de membrana. Principios, procesos y aplicaciones. American Water Works Association Research Foundation. Madrid. McGrawHill.
- Arrojo, B., Mosquera-Corra, A., Garrido, J.M., Méndez, R., Ficara, E. and Malpei, F. 2005. A membrane coupled to a sequencing batch reactor for water reuse and removal of coliform bacteria. Desalination 179:109-116.
- Atlas, R.M. and Bartha, R. 2001. Microbial ecology, fundamentals and applications. Ed. Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., an imprint of Addison Wesley Longman, Inc. Menlo Park California.
- Awong, J., Bitton, G. and Koopman, B. 1985. ATP, oxygen uptake rate and INT-dehydrogenase activity of actinomycete foams. Water Research. 7: 917-921
- Baek, H. and Pagilla. 2003. Comparison of aerobic and anaerobic membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. Conference proceedings WEFTEC, Los Ángeles.
- Banister, S.S. and Pretorius, W.A. 1998. Optimisation of sludge acidogenesis fermentation for biological nutrient removal. Water S A. 24:35-41.
- Beaudeau, P., Bertin, L., Leboulanger, T., Foulex, J.N. 1997. Traçage aux bactériophages dans le karst normand. Technologie et Science Méthodes 1:41-53.
- Becker, S., Coger, P., Oehlmann, R. and Ernst, A. 2000. PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative *Taq* nuclease assays in analyses of microbial communities. Applied and Environmental Microbiology. 66:4945-4953.

- Begon, M., Harper, J.L. and Townsend, C.R. 1999. *Ecología, Individuos, poblaciones y comunidades*. ISBN 84-282-1152-3. 3<sup>o</sup> Edición. Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
- *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2005. 3<sup>d</sup> Edition, Vol. 1 Garrity, G. Boone, D.R. Castenholz, R.W. (Eds). Springer-Verlag, NY, USA.
- Berube, D. and Soucy, M. 2004. Monitoring aluminium before and after filtration. *Journal of Supply: Research and Technology*. 53:271-285.
- Bond, P.L., Hugenholtz, P., Keller, J. and Blackall. 1995. Bacterial community structure of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludge from sequencing batch reactors. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 1910-1916.
- Borrego J. J. and Figueras M. J. 1997. Microbial quality of natural waters. *Microbiologia SEM*. 13:413-426.
- Bothe, H., Günter, J., Schloter, M., Ward, B.B. and Witzel, K.P. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews* 24:673-690
- Bozcar, B., Forney, L.J., Begley, W.M., Larson, R.J. and Federle, T.W. 2001. Characterization and distribution of esterase activity in activated sludge. *Water Research*. 35:4208-4216.
- Bramucci, M., Kane, H., Chen, M., Nagarajan, V. 2003. Bacterial diversity in an industrial wastewater biorreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62:594-600
- Brion, G. Meschke, J. and Sobsey M. 2002. F-specific RNA coliphages: occurrence, types, and survival in natural waters. *Water Research* 36:2419-2425.
- Broda, E. 1977. Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie*. 17:491-493.
- 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 mixture: an internal standard and an appraisal of template enumeration accuracy. *Journal of Microbiology and Methods* 49:111-123.
- Brümmer, I.H.M., Felske, A., Wagner-Dobler, I. 2003. Diversity and seasonal variability of  $\beta$ -Proteobacteria in biofilms of polluted rivers: analysis by temperature-

- gradient gel electrophoresis and cloning. *Applied and Environmental Microbiology* 69:4463-4473.
- Buckley, C. y Jacangelo, J. 1998. Microfiltración. Tratamiento del agua por procesos de membrana. Principios, procesos y aplicaciones. American Water Works Association Research Foundation. Madrid. McGrawHill.
  - Cadoret, A., Conrad, A. and Block, J.C. 2002. Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludged. *Enzyme and Microbial Technology*. 31:179-186.
  - Calvo C., Gómez Nieto M. A. and González López J. 1998. Fecal coliform-related bacterial and coliphages populations in five lakes of southeastern Spain. *Microbial Research* 32:283-288.
  - Chiemchaisri, C., Wong, Y.K., Urase, T. and Yamamoto, K. 1992. Organic stabilization and nitrogen removal in membrane separation bioreactor for domestic wastewater treatment. *Water Science and Technology*. 25:231-240.
  - Cicek, N. 2003. A review of membrane bioreactor and their potential application in the treatment of agricultural wastewater. *Canadian Biosystem and Engineering*. 45: 637-649
  - 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*. 71:43-50.
  - Cicek, N., Macomber, J., Davel, J., Suidan, M.T., Audic, J. and Ginestet, P. 2001. Effect of solids retention time on the performance and biological characteristics of a membrane bioreactor. *Water Science and Technology*. 43:43-50.
  - Conrad, A. Cadoret, A. and Block, J.C. 2000. Extracellular enzymatic activities in activated sludge flocs. In *Proceedings of the International Specialist Conference: Extracellular Polymeric Substances: The Construction Material of Biofilms*, Mülheim (D).
  - Cortés-Lorenzo, C., Molina-Muñoz, M, Villalba-Gómez, B., Vílchez, R., Ramos, A., Rodelas, B., Hontoria, E., González-López, J. 2006. Analysis of community composition of biofilms in a submerged filter system for the removal of ammonia and phenol from industrial wastewater. *Biochemical Society Transactions*. 34:161-168

- 
- Crawford, G., Thomson, D., Lozier, J., Daigger, G. and Fleischer, E. 2000. Membrane bioreactor a designer perspective. Conference proceeding WEFTEC 2000, Anaheim, CA.
  - Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.H., and Wagner, M. 1999. The domain specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*. 22:434-444
  - Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.-H., and Wagner, M. 2001. *In situ* characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied Environmental and Microbiology*. 67:5273-5284.
  - Dean, W.E. 1974. Determination of carbonate and organic matter in calcareous sediments and sedimentary rocks by loss on ignition: comparison with other methods. *Journal of Sedimentary Petrology*. 44:242-248.
  - DeLong, E.F., Wickman, G.S. and Pace, N.R. 1989. Phylogenetic satins: ribosomal RNA based probes for the identification of single cells. *Science* 243:1360-1363.
  - Directiva 91/271/CEE del Consejo de 21 de Mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales.
  - Dold, P.L., Fleit, E., Han, J. and Copp, J.B. 1995. Assay for determination of alpha-amylase activity in activated sludge mixed bacterial communities. *Environmental Technology*. 16:181-188.
  - Ehrich, S., Behrens, D., Lebedeva, E., Ludwin, W., Bock, E. 1995. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium. *Nitrospira moscovensis* sp. Nov. and its phylogenetic relationships. *Archives of Microbiology* 164:16-23.
  - EPA (United States Environmental Protection Agency). 2002. Onsite wastewater treatment system manual. EPA/625/R-00/008.
  - Eschenhagen, M., Schuppler, M., Röske, I. 2007. Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents. *Water Research* 37:3224-3232
  - Fane, A. and Chang, S. 2002. Membrane bioreactors: Design and operational options. *Filtration and Separation*.
  - Fang, Q., Brockmann, S., Botzenhart, K. and Wiedenmann, A. 2003. Improved detection of *Salmonella* spp. In foods by fluorescent *in situ* hybridization with 23S

- rRNA probes: a comparison with conventional culture methods. *Journal of Food Protection* 66:723-731.
- Farrelly, V., Rainey, F.A. and Stackebrandt. 1995. Effect of genome size and *rrn* copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology* 61:2798-2801.
  - Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
  - Flood, J.A., and Ashbolt, N.J. 2000. Virus-sized particles can be entrapped and concentrated one hundred fold within wetland biofilms. *Advances In Environmental Research* 3:403-411.
  - Focht, D. D. and Verstraete, W. 1977. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *Advances in Microbial Ecology* 1:135-214.
  - Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K. and Nielsen, P.H. 1995. Enzymatic activity in the activated sludge floc matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43:708-716.
  - Gálvez J. 2001. Eliminación de la material orgánica y del nitrógeno en el agua residual urbana mediante lechos inundados. Tesis doctoral, Universidad de Granada, Departamento de Microbiología, Instituto del agua.
  - Gander, M., Jefferson, B. and Judd, S. 2000. Aerobic MBRs for domestic wastewater treatment: a review with cost considerations. *Separation and Purification Technology*, 18:119-130.
  - Gao, M., Yang, M., Li, H., Yang, Q. and Zhang, Y. 2004. Comparison between a submerged membrane bioreactor and a conventional activated sludge system on treating ammonia-bearing inorganic wastewater. *Journal of Biotechnology* 108:265-269.
  - García, J., Fernández, S., Miranda, F.J. and López, F. 1997. Determination of the protease activity in activated sludge by gelatin hydrolysis. *Journal Of Environmental Science and Health. A* 32:2537-2551.
  - Gessesse, A., Dueholm, T., Petersen, S.B. and Nielsen, P.H. 2003. Lipase and protease extraction from activated sludge. *Water Research*. 37:3652-3657.
  - Gessesse, A., Petersen, S.B., Dueholm, T.E. and Nielsen, P.H. 2000. Lipase production in activated sludge may be dominated by few organisms. En: *Proceedings of the International Specialist Conference: Extracellular polymeric substances: The construction material of biofilms, Mülheim (D)*.

- 
- Ghyyoot, W. and Verstraete, W. 2000. Reduced sludge production in two-stage membrane assisted bioreactor. *Water Research*. 34:205-215.
  - Glöckner, F.O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A., Amann, R. 2000. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66:5053-5065.
  - Goel, R., Takashi, M., Hiroyasu, S. and Tomonori, M. 1998. Enzyme activities under anaerobic conditions in activated sludge sequencing batch reactor. *Water Research*. 32:2081-2088.
  - Gómez, M., de la Rúa, A., Garralón, G., Plaza, Hontoria, E., and Gómez, M.A. 2006. (a) Urban wastewater disinfection by filtration technologies. *Desalination* 190:16-28.
  - Gómez, M., Plaza, F., Garralón, G., Pérez, J. and Gómez, M.A. 2006. (b) A comparative study of tertiary wastewater treatment by physico-chemical-UV process and macrofiltration-ultrafiltration Technologies. *Desalination*. 202:369-376.
  - Gómez, M.A. y Hontoria, E. 2003. Técnicas analíticas en el control de la ingeniería ambiental. I.S.B.N.: 84-931385-2-5
  - Gómez-Villalba, B, Calvo, C., Vilchez, R., Gónzale-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 Technology* 72:393-400.
  - González Quesada. 2001. Curso Experto Universitario en Análisis y Tratamientos del Agua. Universidad de Sevilla, Junta de Andalucía y EMASESA.
  - Goyal, S., Gerba, C. and Bitton, G. 1987. Phage Ecology.
  - Güde. 1982. Interactions between floc-forming and non floc-forming bacterial populations from activated sludge. *Current Microbiology*. 7:347-350.
  - Guellil, A., Boualam, M, Quiquampoix, H., Ginestet, P., Audic, J.M. and Block, J.C. 2001. Hydrolysis of wastewater colloidal organic matter by extracellular enzymes extracted from activated sludge flocs. *Water Science and Technology*. 43:33-40.
  - Guellil, A., Thomas, F., Block, J.C., Berllison, J.L. and Ginestet, P. 2001. Transfer of organic matter between wastewater and activated sludge flocs. *Water Research* 35:143-150.

- Harada, H., Momoni, K., Yamazaki, S. and Takizawa, S. 1994. Application of anaerobic-UF membrane reactor for treatment of a wastewater containing high strength particulate organics. *Water Science Technology* 30:307-319.
- Hardt, F.W., Clesceri, L.S., Nemerov, N.L. and Washington, D.R. 1970. Solid separation by ultrafiltration for concentrated activated sludge. *Journal Water Pollution Control Federation* 42:2135 – 2148.
- Harms, H., Koops, H.P., Wehrmann, H. 1976. An ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosovibrio tenuis* nov. gen. nov. sp. *Archives of Microbiology*. 108:105-11.
- Head I.M, Hiorns W.D, Embley T.M, McCarthy A.J and Saunders J.R. 1995. The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Journal of General Microbiology* 139:1147-1153. VALIDATION LIST N° 54. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:619-620.
- Henze, M., and Mladenovski, C. 1991. Hydrolysis of particulate substrate by activated sludge under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Water Research* 25: 61-64.
- HERA Amasa. 2004. Biorreactores de membrana sumergidas. Cataluña.
- Hernández Muñoz, A. 1998. Depuración de aguas residuales. 4ª edición. ISBN – 8438001386. Colegio de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos. Madrid.
- Hernández Muñoz, A. 2001. Depuración y desinfección de aguas residuales. 5ª edición. Edit. Thomson Learning Paraninfo. Madrid.
- Hontoria, E., González, F.J., Gómez, M. A. y Moreno, B. 2003. Reutilización de las Aguas Residuales Urbanas. Edit. Placido Cuadros. ISBN: 84-931385-4-1.
- Hooper A. 1990. Biochemistry of the nitrifying lithoautotrophic bacteria. En H. G. Schlegel y B. Bowien (eds). *Autotrophic bacteria*. Springer-Verlag, Berlin.
- Horz. H., Rotthauwe. J, Lukow, T. and Liesack, W. 2000. Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of amo A PCR products. *Journal of Microbiological Methods* 39:197-204.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M. and Pace, N. R. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* 180:4765-4774.

- 
- Ingraham, J.L. and Ingraham, C.A., 1998. Introduction to Microbiology. Editorial Reverté, S.A.
  - Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. Trends Biochemical Science. 23:403-405.
  - Jetten, M.S.M., Sliemers, O., Kuypers, M., Dalsgaard, T., Van Nistrik, L., Cirpus, I., Van de Pas-Schoonen, K.T., Lavik, G., Thamdrup, B., Le Palier, D., Op den camp, H.J.M., Hulth, S., Nielsen, L.P., Adma, W., Third, K., Engström, P., Kuenen, J.G., Jorjensen, B.B., Canfield, D.E., Sinninghe Damsté, J.S., Revsbech, N.P., Fuerst, J., Weissenbach, J., Wagner, M., Schmid, I., Schmid, M. and Strous, M. 2003. Anaerobic Ammonium Oxidation by Marine and Freshwater Planctomycete-like Bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 63:107-114.
  - Jones R.D. 1988. A new marine ammonium-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas cryotolerans* sp.nov. Canadian Journal of Microbiology 34:1122-1128.
  - Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A., and Wagner, M. 2002. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. Systematic Applied Microbiology 25:84-99.
  - Kämpfer, P. 1988. Automatisierte charakterisierung mikrobieller lebensgemeinschaften. Hygiene, Berlin. 1:1-249.
  - Kenard, R.P. and Valentine, R.S. 1974. Rapid determination of the presence of enteric bacteria in water. Applied Microbiology 27:484-487.
  - Kersters, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P. and Stackebrandt, E. 2003. Introduction to the Proteobacteria. En: Dworkin, M. et al. (eds.) The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community, 3<sup>rd</sup> Edition, release 3.12. 28/03/2003. Springer-Verlag, New York <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>
  - Kilian M. 1998. Necessary changes of bacterial names? ASM News 64:670.
  - Kluver, J.G and Donker, H.J. 1926. Die Einheit in der Biochemie. Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe 13:134-190.
  - Knowles R. 1982. Denitrification. Microbiology Review. 46:43-70.
  - Konopka, A. 2000. Microbial physiological state at low growth rate in natural and engineered ecosystems. Current Opinion in Microbiology 3:244-247.

- Konopka, A., Zakharova, T., Oliver, L., Camp, D. and Turco, R.F. 1996. Biodegradation of organic wastes containing surfactants in a biomass recycle reactor. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:3292-3297.
- Koops, H.P., Bottcher, B., Moller, U.C, Pommering-Roser, A. and Stehr, G. 1991. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov., *Nitrosomonas halophila* sp. nov. *Journal of General Microbiology* 137:1689-1699.
- Kott Y. 1981. Viruses and bacteriophages. *Science of the Total Environment* 18:13-23.
- Kowalchuk, G.A. and Stephen, J.R. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Review Of Microbiology*. 55:485-529
- Kruskal, J. B. 1983. An overview of sequence comparison. In D. Sankoff and J. B. Kruskal, (ed.), *Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison*, pp. 1-44 Addison Wesley.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. and Nei, M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- LaPara, T.M., Klatt, C.G., Chen, R. 2006. Adaptations in bacterial catabolic enzyme activity and community structure in membrane-coupled bioreactors fed simple synthetic wastewater. *Journal of Biotechnology* 121:368-380.
- LaPara, T.M., Konopka, A., Nakatsu, C.H and Allegan, J.E. 2001. (a) Thermophilic Aerobic treatment of a synthetic wastewater in a membrana-couped bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26:203-209.
- LaPara, T.M., Zakharova, T., Nakatsu, C.H. and Konopka, A. 2001. (b) Functional and structural adaptations of bacterial communities growing on particulate substrates under stringent nutrient limitation. *Microbial Ecology* 44:317-326.
- Larrea L. 2002. Eliminación de nitrógeno y fósforo. XX Curso sobre tratamiento de aguas residuales y explotación de estaciones depuradoras. CEDEX, Madrid.
- Lawrence, J. R., Chenier M. R., Roy, R., Beaumier, D., Fortin, N., Swerhorne, G. D. W., Neu, T. R. and Greer. C. W. 2004. Microscale and molecular assessment of

- impacts of nickel, nutrients and oxygen level on structure and function of river biofilm communities. *Applied and Environmental Microbiology* 70:4326-4339.
- Layton, A.C., Dionisi, H., Kuo, H.W., Robinson K. G., Garret, V.M., Meyers, A., Sayler, G.S. 2005. Emergence of competitive dominant ammonia oxidizing bacterial populations in a full-scale industrial wastewater treatment plant. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1105-1108
  - Liwarska-Bizukojc, E. and Ledakowicz, S. 2003. Estimation of viable biomass in aerobic biodegradation processes of organic fraction of municipal solid waste (MSW). *Journal of Biotechnology*. 101:165-172.
  - Lobos, J., Wisniewski, C., Heran, M. and Gramsik, A. 2005. Effects of starvation conditions on biomass behaviour for minimization of sludge production in membrane bioreactor. *Water Science and Technology*. 51:35-44.
  - Loeb, S. and Sourirajan, S., 1961. "Sea Water Demineralization by Means of a Semipermeable Membrane," p. 22, Department of Engineering, University of California, Los Angeles, Rept. 60-60.
  - Loy, A., Horn, M., and Wagner, M. 2003. ProbeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Research* 31:514-516.
  - Luxmy, B.S., Nakajima, F. and Yamamoto, K. 2000. Analysis of bacterial community in membrane-separation bioreactors by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) techniques. *Water Science and Technology*. 41:259-268.
  - Lv, W., Zheng, X, Yang, M, Zhang, Y., Liu, Y. and Liu, J. 2006. Virus removal performance and mechanism of a submerged membrane bioreactor. *Process Biochemistry*. 41:299–304.
  - Ma, B-C, Lee, Y-N, Park, J-S, Lee, C-H, Lee, S-H, Chang, I-S. And Ahn, T-S. 2006. Correlation between dissolved oxygen concentration, microbial community and membrane permeability in a membrane bioreactor. *Process Biochemistry*. 41:1165-1172.
  - Madaeni, S.S. 1999. The application of membrane technology for water disinfection. *Water Research* 33:301-308.
  - Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 1997. Brock, *Biología de los Microorganismos*. Editorial Prentice Hall Iberia. Madrid. 8ª Edición.

- Maier, R.M., Pepper, I.L. and Gerba, C.P. 2000. Environmental Microbiology. Academic Press, San Diego, C.A.
- Maixner, F., Noguera, D.R., Anneser, B., Stoecker, K., Wegl, G., Wagner, M. and Daims, H. 2006. Nitrite concentration influences the population structure of *Nitrospira*-like bacteria. Environmental Microbiology. 8:1487-1495.
- Manem, J. y Sanderson, R. 1998. Biorreactores de membrana. Tratamiento del agua por procesos de membrana. Principios, procesos y aplicaciones. American Water Works Association Research Foundation. Madrid. McGraw Hill.
- Manz, W., Wagner, M., Amann, R. and Schleifer K-H. 1994. In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. Water Research 28:1715-1723.
- McLoughlin, A.J. and Crombie-Quilty, M.B. 1983. The kinetics of protein removal by activated sludge. Water Research. 17:161-166.
- Merlo, R., Adham, S., Gagliardo, P., Trussell, P. and Trusell, R. 2000. Application of membrane bioreactor (MBR) technology for water reclamation. Conference proceedings, WEFTEC 2000, Anaheim, CA.
- Metcalf y Eddy. 2000. Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización. 3ª edición. Mc Graw Hill, New York.
- Mignotte B., Maul A., and Schwartzbrod L. 1999. Comparative study of techniques used to recover viruses from residual urban sludge. Journal of Virological Methods 78:71-80.
- Miura, Y., Hiraiwa, M.N., Ito, T., Itonaga, T., Watanabe, Y., Okabe, S. 2007. Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: relationship between community stability and reactor performance. Water Research 41:627-637.
- Mobarry, B.K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B.E., and Stahl, D.A. 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 62:2156-2162.
- 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. 48:333-341.

- Mulder, A., van de Graaf, A.A., Robertson, L.A. and Kuenen J.G. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology and Ecology*. 16:177-189.
- 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* 73:127-141
- Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. 2:317-322.
- 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* 59:695-700.
- 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*. 50:189-203.
- Nielsen, J. and Villadsen, J. 1992. Modelling of microbial kinetics. *Chemical Engineering Science*. 47:4225-4270.
- Norma Española UNE-EN ISO 9308-01. 2001. Calidad del Agua. Detección y recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes.
- Nybroe, O., Jørgensen, P.E. and Henze, M. 1992. Enzyme activities in waste water and activated sludge. *Water Research*. 26:579-584.
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R., and Stahl, D.A. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology*. 40:337-365.
- Ossenbruggen, P. J, Spanjers, H and Klapwijk, A. 1996. Assessment of a two-step nitrification model for activated sludge. *Water Research* 30:939-953.
- Otawa, K., Asano, R., Ohba, Y., Sasaki, T., Kawamura, E., Koyama, F., Nakamura, S., Nakai, Y. 2006. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria community in intermittent aeration sequencing batch reactors used for animal wastewater treatment. *Environmental Microbiology* 8:1985-1996.
- Oved, T., Shaviv, A., Goldrath, T., Mandelbaum, R. and Minz, D. 2001. Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*.67:3426-3433

- Payne W.J. 1981. Denitrification. Wiley-Interscience, New York.
- Pernthaler, A., Preston, C.M., Pernthaler, J., DeLong, E.F. and Amann, R. 2002. Comparison of fluorescently labelled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. *Applied and Environmental Microbiology*. (68) 661-667.
- Pollice, A., Giuseppe, L. and Blonda, M. 2004. Biomass growth and activity in a membrane bioreactor with complete sludge retention. *Water Research*, 38, 1799-1808.
- Polz, M.F. and Cavanaugh, C.M. 1998. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3724-3730.
- Pommerening-Roeser, A., Rath, G. and Koops, H.-P. 1996. Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*. 19:344-351.
- Poyatos, J.M. 2007. Biorreactores de Membrana aplicados al tratamiento de aguas residuales urbanas y su influencia en la calidad del agua tratada. Tesis doctoral, Universidad de Granada. Departamento de Ingeniería Civil. Escuela de Caminos, Canales y Puertos.
- Prescott, L., Harley, J., and Klein, D. 1999. *Microbiología* 4ª edición. Ed. MacGraw-Hill interamericana. Madrid.
- Prosser, J.I. 2007. The ecology of nitrifying bacteria. En : *Biology of the Nitrogen Cycle*, Bothe, H, Ferguson, S.J. and Newton, W.E. (Eds.), pp. 223-243. Elsevier, The Netherlands.
- Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M., Koops, H. and Wagner, M. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and AmoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:5386-5382.
- Pynaert, K., Smets, B.F., Beheydt, D. and Verstraete, W. 2004. Start-up of Autotrophic Nitrogen Removal Reactors via Sequential Biocatalyst Addition. *Environmental Science and Technology*. 38:1228-1235.
- Real Decreto 1138/1990, de 14 de septiembre, por el que se aprueba la reglamentación Técnico-Sanitaria para el abastecimiento y control de Calidad de las Aguas Potables de Consumo Público.

- 
- Richards, S.R., Hastwell, C., and Davis, M., 1984. The comparative examination of 14 activated-sludge plants using enzymatic techniques. *Water Pollution Control*. 83: 300-313.
  - Ridgway, H.F. and Flemming, H.C. 1996. Membrane biofouling. *Treatment Membrane Processes*. McGraw-Hill, Boston.
  - Rittman, B.E. and Whiteman, R. 1994. Bioaugmentation: a coming of age. *Biotechnology*. 1:12-16.
  - Rittmann, B. E. and McCarty, P.L. 2001. *Biotecnología del Medio Ambiente. Principios y Aplicaciones*. 1ª Edición. McGraw-Hill.
  - Rosenberg, S., Witzig, R., Manz, W., Szewzyk, U., Kraume, M. 2000. Operation of different membrane bioreactors: experimental results and physiological state of the micro-organisms. *Water Science and Technology*. 41:269-277.
  - Rosenberger, S., Krüger, R., Manz, W., Szewzyk, U. and Kraume, M. 2002. Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal waste water. *Water Research*. 36:413-420.
  - Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
  - Sakano, Y., Pickering, K., Strom, P. and Kerkhof, L. 2002. Spatial distribution of total, ammonia-oxidizing, and denitrifying bacteria in biological wastewater treatment reactors for bioregenerative life support. *Applied and Environmental Microbiology* 68:2285-2293.
  - Sanders, W.T.M., Geering, M., Zeeman, G. and Lettinga, G. 2000. Anaerobic hydrolysis kinetic of particulates substrates. *Water Science and Technology*. 41:17-24.
  - Savelkoul, P. H. M., Aarts, H. J. M., De Haas J, Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J. L. W., Schouls L., and Lenstra J. 1999. Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:3083-3091.
  - Schmid, M., Schmitz-Esser, S., Jetten, M., and Wagner, M. 2001. 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. *Environmental Microbiology*. 3:450-459.

- 
- Schmidt, M., Walsh, K., Webb, R., Rijpstra, W. I.C., van de Paas-Schoonen, K., Verbruggen, M.J., Hill, T., Moffett, B., Fuerst, J., Schouten, S., Damsté, J.S.S., Harris, J., Shaw, P., Jetten, M., and Strous, M. 2003. Candidatus *Scalindua brodae* sp. nov., Candidatus *Scalindua wagneri* sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 26:529-538.
  - Schramm, A., De Beer, D., Wagner, M. and Amann, R. 1998. Identification and activities *in situ* of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant population in a nitrifying fluidized bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3480-3485.
  - Schramm, A., Larsen, L.H., Revsbech, N.P., Ramsing, N.B., Amann, R. and Schleifer, K.H. 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:4641-4647.
  - Seeley, N.B, and Primrose, S.B. 1980. The effect of temperature on the ecology of aquatic bacteriophages. *Journal of General Virology*. 46:87-95.
  - Servais, P. et Billen, G. 1990, Le contrôle de la qualité bactériologique des eaux de baignades, *Tribune de l'eau*. 543:23-28.
  - Shang, C., Wong, H.M. and Chen, G. 2005. Bacteriophage MS-2 removal by submerged membrane bioreactor. *Water Research* 39:4211-4219.
  - Siripong, S., y Rittmann, B.E. 2007. Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants. *Water Research* 41:1120-1120.
  - Skerman, V.B.D., McGowan, V. and Sneath, P.H.A. 1980. Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology* 30:225-420
  - Skraber, S., Gantzer, C. and Maul, L. 2002. Fates of bacteriophages and bacterial indicators in the Moselle river (France). *Water Research* 36:3629-3637.
  - Smith, C.V., Gregorio, D.O. and Talcott, R.M. 1969. The use of ultrafiltration membranes for activated sludge separation. *Proceedings of the 24<sup>th</sup> Industrial Waste Conference*, Purdue University, Ann Arbor Science, USA. 1300-10.
  - Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W. and Schleifer, K-H. 1997. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:2884-2896.
  - Sorokin D.Y, Muyzer G, Brinkhoff T, Kuenen J.G and Jetten M.S. 1999. Isolation and characterization of a novel facultatively alkaliphilic *Nitrobacter* species, *N. alkalicus*

- sp. nov. *Archives of Microbiology* 170:345-352. VALIDATION LIST N° 71. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:1325-1326.
- Sorokin, D., Tourova, T., Schmid, M.C., Wagner, M., Koops, H.P., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S. 2002. Isolation and properties of obligately chemolithoautotrophic and extremely alkali-tolerant ammonia-oxidizing bacteria from Mongolian soda lakes. *Archives of Microbiology*. 176:170-177. VALIDATION LIST N° 83. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:1945.
  - 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*. 69:852-860.
  - Stephen, J.R., McCaig, A.E., Smith, Z., Prosser, J.I. and Embley, T.M. 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to  $\beta$ -subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4147-4154.
  - Stephenson, T., Jefferson, B., Judd, S. and Brindle, K. 2000. Membrane bioreactor for wastewater treatment, IWA publishing, London, UK.
  - Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G., and Jetten MSM. 1998 The Sequencing Batch Reactor as a Powerful Tool for the Study of Slowly Growing Anaerobic Ammonium-Oxidizing Microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50: 589-596.
  - Sutherland, I.W., Hughes, K.A., Skilman, L.C. and Tait, K. 2004. The interaction of phages and biofilms. *FEMS Microbiology Letters*. 231:1-6.
  - Suzuki, M.T. and Govannoni, S.J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:625-630.
  - Tackett, K., Lowe, K., Siegrist, R., and Van Cuyk, S. 2003. Vadose zone treatment during effluent reclamation as affected by infiltrative surface architecture and hydraulic loading rate. USA. Golden. Environmental Science & Engineering Division, Colorado School of Mines.
  - Tazi-Pain, A., Schrotter, J. C., Bord, G., Payreaudeau, M. and Buisson, H. 2002. Recent improvement of the BIOSEP process for industrial and municipal wastewater treatment. *Desalination*. 146:439-443.

- 
- Till, S. and Malli, H. 2001. Membrane bioreactors: wastewater treatment applications to achieve high quality effluent. Annual Water Industry Engineers and Operators' Conference. Bendigo.
  - Ueda, T. and Horan, N.J. 2000. Fate of indigenous bacteriophage in a membrane bioreactor. *Water Research*. 34:2151-2159.
  - USEPA. U.S. Agency of International Development 1992. Manual of Guidelines for Water Reuse, EPA/625/R-92/004.
  - Van Cleemput, O. and Baert, L. 1984. Nitrite: a key compound in N loss processes under acid conditions. *Plant and Soil*. 76:233-241.
  - Van de Graff, A.A., Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M. and Kuenen, J.G. 1997. Metabolic Pathway of Anaerobic Ammonium Oxidation on the Basis of N<sup>15</sup> Studies in a Fluidized Bed Reactor. *Microbiology*. 143:2415-2421.
  - Van de Graff, A.A., Mulder, A., Bruijn, P., Jetten, M.S.M., Robertson, L.A. and Kuenen, J.G. 1995. Anaerobic Oxidation of Ammonium Is a Biologically Mediated Process. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:1246-1251.
  - Vaneechoutte, M., Cartwright, C.P., Williams, E.C., Jäger, B., Tichy, H.-V., De Baere, T., De Rouck, A. and Verschraegen, G. 1996. Evaluation of 16S rRNA Gene Restriction Analysis for the Identification of Cultured Organisms of Clinically Important *Clostridium* Species. *Anaerobe* 2:249-256.
  - Vinuesa, P., Rademaker, J.L.W., de Bruijn, F.J. and Werner, D. 1998. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 64:2096-2104.
  - Visvanathan, C., Ben Aim, R. and Parameshwaran, K. 2000. Membrane separation bioreactors for wastewater treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 30:1-48.
  - Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H. and Schleifer K-H. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for Proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structures. *Applied and Environmental Microbiology* 59:1520-1525.

- Wagner, M., Horn, M. and Daims, H. 2003. Fluorescence *in situ* hybridization for the identification of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*. 6:302-309.
- Wagner, M., Loy, A., Nogerira, R., Purkhold, U., Lee, N. and Daims, H. 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:665-680.
- Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H-P and Schleifer K-H. 1995. In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. 19:251-264.
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H.P., Flood, J., and Amann R. 1996. *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Science and Technology*. 34:237-244.
- Wang, G. and Wang C-Y. 1997. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:4645-4650.
- Ward, B.B. and O'Mullan, G.D.O. 2002. Worldwide distribution of *Nitrosococcus oceanii*, a marine ammonia-oxidizing  $\gamma$ -proteobacterium, detected by PCR and sequencing of 16SrRNA and *amoA* genes. *Applied Environmental and Microbiology*. 68:4153-4157.
- Watanabe K., Teramoto M., Futamata H. and Harayama S. 1998. Molecular detection, isolation, and physiological characterisation of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated-sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:4396-4402.
- Watson, S.W., Bock, E., Valois, F.W., Waterbury, J.B. and Schlosser, U. 1986. *Nitrospira marina* gen. nov., sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. *Archives of Microbiology* 144:1-7.
- Watson, S.W., Graham, L.B., Remsen, C.C. and Valois, F.W. 1971. A lobular, ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosolobus multiformis* nov. gen. nov. sp. *Archives fur Mikrobiologie* 76:183-203
- 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* 37:4453-4467.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. 1991. 16s ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *The Journal of Bacteriology*. 173:697-703.

- 
- Wen, X., Ding, H., Huang, X and Liu, R. 2004. Treatment of hospital wastewater using a submerged membrane bioreactor. *Process Biochemistry* 39:1427-1431.
  - Whiteley, C.G., Heron, P., Pletschke, B., Rose, P.D., Tshivhunge, S., Van Jaarsveld, F.P. and Whittington-Jones, K. 2002. The enzymology of sludge solubilisation utilising sulphate reducing systems. Properties of proteases and phosphatases. *Enzyme and Microbial Technology*. 31:419-424.
  - Willems, A., De Vos, P. 2002. *Comamonas*. En: Dworkin, M. et al. (eds.) *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3<sup>rd</sup> Edition, release 3.10. 27/09/2002. Springer-Verlag, New York <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>
  - Winogradsky, S. 1890. Recherches sur les organismes de la nitrification. *Annales Institute Pasteur*. 4:213-231.
  - Winogradsky, S. et Winogradsky, H. 1933. Etudes sur la microbiologie du sol. VII. Nouvelles recherches sur les organismes de la nitrification. *Annales de l'Institute Pasteur (Paris)* 50:350-432.
  - Wittebolle, L., Boon, N., Vanparys, B., Heylen, K., deVos, P., Verstraete, W. 2005. Failure of the ammonia oxidation process in two pharmaceutical wastewater treatment plants is linked to shifts in the bacterial communities. *Journal of Applied Microbiology* 99:997-1006
  - Witzig, R., Manz, W., Rosenberg, S., Krüger, U., Kraume, M. and Szewzyk, U. 2002. Microbiological aspects of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater. *Water Research*. 36:394-402.
  - Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 5:221-271.
  - World Health Organization 1989. Health Guidelines for the use of Wastewater in Agriculture and Aquaculture. Report of a WHO Scientific Group, Geneva, Switzerland.
  - Wright, A.I., and Reddy, K.R. 2001. Phosphorus loading effects on extracellular enzyme activity in Everglades wetlands soils. *Soil Science Society American Journal*. 65:588-659.
  - [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)
  - [www.microbials-ecology.net/probebase](http://www.microbials-ecology.net/probebase)
  - [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
  - [www.sterlitech.com](http://www.sterlitech.com)

- [www.usfilter.com](http://www.usfilter.com)
- [www.zenonenv.com](http://www.zenonenv.com)
- Wyffels, S., Van Hulle, S.W.H., Boeckx, P., Wolcke EIP, Van Cleemput, O., Vanrolleghem, P.A. and Verstraete, W. 2003. Modelling and simulation of oxygen-limited partial nitrification in a membrane-assisted bioreactor (MBR). *Biotechnology and Bioengineering*. 86:531-542.
- Xianghua, W., Hangjiu, D. and Ruopeng, L. 2004. Treatment of hospital wastewater using a submerged membrane bioreactor. *Process Biochemistry* 39:1427-1431.
- Yamamoto, K., Hiasa, M., Mahmood, T. and Matsuo, T. 1989. Direct solid-liquid separation hollow fiber membrane in an activated sludge aeration tank. *Water Science Technology*. 21:43-54.
- Zhang, B. 1997. A study on microbial activities and the role of predators in membrane separation activated sludge process. PhD. Thesis, Department of urban engineering of Tokyo.

**ENGLISH SUMMARY.****1. Introduction**

Urban wastewater is usually treated by processes based in the conventional activated sludge technology for the removal of organic matter. However, the technical and social developments have aroused the need for new technologies, more efficient with regard to nutrient removal, and which allow to obtain effluents of recovered water with better quality.

In the last decades, a fast development of the tertiary treatments of wastewater has upraised. Macrofiltration systems (often followed by disinfection by ozonization or UV radiation), microfiltration, ultrafiltration, and reverse osmosis, are the most commonly used methods (Hontoria *et al.*, 2003), which provide an effluent of high quality, that meets the parameters required for its direct reutilization. Submerged membrane bioreactors (SMBs) are based on the combination of the activated sludge process and the utilization of ultrafiltration or microfiltration membranes for the separation of the particulated material, avoiding the requirement of the secondary clarifier. Nowadays, there are over 1,000 SMBs currently in operation around the world, with approximately 66% in Japan and the remainder largely in Europe and North America. About 55% of the installations use membranes submerged inside the bioreactor, while the rest have external membrane modules (Cicek, 2003).

SMBs have several interesting advantages over the conventional activated sludge technology, as they are compact systems with small necessities of space, and improve yields in wastewater treatment, mainly regarding the removal of nitrogen compounds and pathogenic microorganisms (Ueda and Horan 2000; Stamper *et al.*, 2003). One of the main benefits brought about by the SMB processes 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, favouring 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).

Microbial communities developed in SMB-based treatment systems are analogous to those present in conventional activated sludges. However, the microorganisms are exposed to completely different conditions, mainly due to the biomass recycling in SMB, 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 *et al.*, 1996; Konopka 2000; Morgan *et al.*, 2002). Measuring biomass concentration and enzymatic activities is essential to achieve the biological characterization of a complex microbial microcosm, like the case of an activated sludge (Whiteley *et al.*, 2002; Liwarska-Bizukojc and Ledakowicz 2003). During the formation of the activated sludge, microorganisms use their extracellular and intracellular enzymes to hydrolyze and degrade the organic matter (Cadoret *et al.*, 2002; Gessesse *et al.*, 2003). These enzymatic activities give an estimation of the active biomass, the elimination of organic matter, N and P, and are also used as indicators of the fate of specific populations. Some of the most important enzymatic activities during the biological treatment of wastewater are phosphatase, glucosidase, protease, and esterase (Goel *et al.*, 1998; Boczar *et al.*, 2001; Cadoret *et al.*, 2002; Gessesse *et al.*, 2003). Due to the organic matter fraction of wastewater, mainly composed of carbohydrates and proteins, glucosidases and proteases play an essential role in its hydrolysis. Variations of the enzymatic activities are thus an excellent indicator of the physiology of the mixed species sludge community and provide a way to evaluate the impact of the variation of conditions of operation, such as the concentration of VSS.

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. In this context, denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis (DGGE/TGGE) yield extensive information about the diversity of microorganisms in their habitats (Muyzer 1999), also allowing for the taxonomic identification of community members (Cortés-Lorenzo *et al.*, 2006). 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 wastewater treatment plants (WWTPs), providing interesting new data in this area (Wagner *et al.*, 2002; Cortés-Lorenzo *et al.*, 2006).

In this work, we aimed to study the changes in the enzymatic activities and structure of the microbial community in a pilot-scale SMB, set up for the treatment of real domestic wastewater, as influenced by variations in the concentration of VSS and different water inflow rates. For this purpose, we monitored through time the evolution of the enzymatic activities in the sludge and the number of total heterotrophic cultivable microorganisms, and compared the community composition profiles based on TGGE separation of partial 16S rRNA (V3 hypervariable region) and *amoA* genes, amplified by PCR from total DNA extracted weekly from the sludge. Predominant TGGE bands were further reamplified and identified by sequence comparison to get a further insight of the main changes experienced by the sludge community. In order to better understand the composition of the sludge in the SMB, we had the opportunity to analyze the microbial diversity using the FISH technique in samples of the last experiment. Finally, the efficiency of the SMB for the removal of pathogenic bacteria and viruses was also evaluated. The influence of the concentration of VSS was evaluated in six experiments, which were carried out in different seasons of the year.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Description of the pilot-scale SMB experimental plant.

The experimental plant (ZeeWeed-10; Fig. 3.2 and 3.3) was purchased from ZENON S.A. The main elements of the system were the cylindrical bioreactor (0.8 m height and 0.6 m diameter, 225 l operating volume), the control panel, pumps, and rotameter. An ultrafiltration membrane of 0.04  $\mu\text{m}$  pore size was submerged inside the aerated bioreactor, and the extraction of the effluent water took place by mechanical suction. Control dispositives to monitor the membrane pressure and temperature of the activated sludge were available. To avoid clogging of the membrane, the activated sludge was kept in agitation below the membrane by means of an aeration system, which was independent of the process air. A second tank (25 l) was needed to keep the treated water, which is also used for the backflushing of the membrane when required. Influent water was pumped in, keeping the flow rate required by the suction pump. The running of the plant consisted of 10-min cycles: a cycle includes 9 min 45 s of filtration and a 15-s backflush cycle. A system for the purge of excess sludge is also provided.

### 2.2. Plant working conditions.

The system worked with real domestic wastewater, provided by Estación depuradora Oeste Puente de Los Vados (Granada), run by EMASAGRA, S.A. (Spain). Average composition of wastewater was determined by standard methods (APHA 2001) and was as follows: chemical oxygen demand (COD), 450 mg/l; biological oxygen demand at 5 days (BOD5), 300 mg/l;  $\text{NO}_3^-$ , 5 mg/l;  $\text{NH}_4^+$ , 75 mg/l; total suspended solids (TSS), 100 mg/l. The reactor was started up with no previous inoculation; thus, the microorganisms in the sludge came from the influent wastewater. The experimental work in the plant was divided in six periods. The features and variables of each experiment are detailed in table 3.1. During the second experiment, 2<sup>nd</sup> November

2004, we changed the water inflow rate from 0.34 to 0.5 l/min. In order to avoid fouling on the membrane surface. On November 18<sup>th</sup> 2004, we incorporate another membrane module with the same characteristics than the first, to increase the available membrane surface and allow the operation of the SMB at higher VSS concentrations.

All the experiments were started after washing the membrane with sodium hypochlorite, and with a very low TSS concentration, except in the case of the change from experiment 5<sup>th</sup> to experiment 6<sup>th</sup>, which were only separated by a change in the water inflow rate from 0.25 to 0.50 l/min, thus starting experiment 6<sup>th</sup> with a TSS concentration of 8,000 mg/l. The different operation conditions are summarized in the following Table:

<b>Exp.</b>	<b>Inflow rate (l/min)</b>	<b>Complete biomass retention</b>	<b>Maximal TSS (mg/l)</b>	<b>Days</b>	<b>Start Date</b>
<b>1st</b>	0.34	Yes	7,000	104	14/04/04
<b>2nd</b>	0.5	No (VSS adjusted by purge)	16,000	113	01/09/04
<b>3rd</b>	0.5	No (VSS adjusted by purge)	15,000	67	28/03/05
<b>4th</b>	0.26	No (VSS adjusted by purge)	10,000	49	13/06/05
<b>5th</b>	0.25	No (VSS adjusted by purge)	12,000	35	19/09/05
<b>6th</b>	0.5	No (VSS adjusted by purge)	12,000	60	24/10/05

COD and BOD<sub>5</sub> of the influent and effluent water through the experiments, the evolution of temperature, pH and dissolved O<sub>2</sub> of the sludge were monitored daily. The concentrations of TSS and VSS in bioreactor were measured daily by a gravimetric method (APHA 2001). In all experiments, a weekly sampling of the activated sludge

was done to measure the total heterotrophic platable microbiota and microbial enzymatic activities. Profiling of the community in the activated sludge of the SMB by TGGE was conducted in all experiments also on a weekly basis, using these same samples for DNA extraction. In the last day of experiment 6<sup>h</sup>, the sludge was also sampled and fixed for analysis by the FISH technique. Activated sludge samples were collected from the biological reactor in sterile plastic containers (1 l), transported to the laboratory in isothermic boxes, and analyzed within 24 h of sampling.

### 2.3. Total heterotrophic platable microbiota

The number of total heterotrophic platable microorganisms (THPM) was measured by standard serial dilution and plating on tryptic soy agar (TSA; Difco). Plates were incubated at both 22°C (48 h) and 37°C (24 h) before colonies were counted.

### 2.4. Evolution of microbial enzymatic activities in the bioreactor

The analysis of the enzymatic activities was done directly on sludge samples. Phosphatase determination was done by the method of Goel *et al.*, (1998), using *p*-nitrophenyl phosphate (0.1%), which is converted by the enzyme 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). Glucosidases were measured by the colorimetric method of Goel *et al.*, (1998), with Tris–HCl buffer and 1% *p*-nitrophenil  $\alpha$ -Dglucopyranoside as substrate for the reaction. For both phosphatases and glucosidases, standard curves were made with known concentrations of *p*-nitrophenol (Sigma). Protease activity was calculated by the colorimetric method of Cadoret *et al.*, (2002). Total esterase activity was measured by the methods of Boczar *et al.*, (2001). Substrates used in the assays were *p*-nitrophenyl esters of acetate, butyrate, caproate, caprilate, laurate, and palmitate. Dehydrogenase activity was estimated by the method of Liwarska-Bizukojc and Ledakowicz (2003),

based on the conversion of (*p*-iodophenyl)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) to formazan.

#### 2.5 PCR amplification of partial 16S rRNA gene, TGGE, and DNA sequencing TGGE.

DNA was extracted from the activated sludge samples using the Ultra Clean Soil DNA Isolation kit (MoBio, USA). A nested approach was used for PCR amplification, as this strategy has been previously reported to avoid non-specific priming, improve amplification of species present in low numbers, and yield richer band patterns in DGGE (Nicolaisen and Ramsing 2002; Ward and O'Mullan 2002). One microliter (2–5 ng) of DNA extracted from sludge was used as template for PCR using universal primers fD1 and rD1 to amplify the 16S rRNA gene in almost its full length (Weisburg *et al.*, 1991). Subsequently, 1 µl of the first PCR product was used as a template for a nested PCR using universal primers GC-P1 and C-P2, targeting the V3 hypervariable region (Muyzer *et al.*, 1993). Conditions for each of the PCR reactions were kept as previously described (Vinuesa *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1998). HPLC-purified oligonucleotides were purchased from Sigma, and AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems) was used for all PCRs. Final PCR products were cleaned and/or concentrated (when required) using Microcon YM cartridges. Two to five microliters (60– 100 ng DNA) were loaded in each well for TGGE, using a TGGE Maxi system (Whatman-Biometra). Denaturing gels (6% polyacrylamide gel electrophoresis with 20% deionized formamide, 2% glycerol and 8 M urea) were made and run with 2× Tris–acetate–EDTA buffer. Temperature gradient was optimized previously for efficient separation of bands at 43 to 63°C (Cortés-Lorenzo *et al.*, 2006). The gels were run at 125 V for 18 h. Bands were visualized by silver staining using the Gel Code Silver Staining kit (Pierce). A six-species marker was included, made by amplification of V3 region from DNA of the following culture collection strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas putida* ATCC 8750, *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 15308, *Escherichia coli* DH5a, *Nocardia corynebacterioides* ATCC 21253, *Micrococcus luteus* ATCC 9341. 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 directly used for reamplification with the appropriate primers. PCR products were purified by gel running and extraction with the Quiaex-II kit (Quiagen). DNA recovered was directly used for automated sequencing in an ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer.

#### 2.6. PCR amplification of partial *amoA* gene, TGGE, and DNA sequencing TGGE

In order to study the ammonia-oxidizing community in the bioreactor, fragments of 491 bp of the structural gene for ammonia monooxygenase (*amoA*) were amplified from sludge community DNA by PCR. Primers for *amoA* amplification were those published previously (*amoA*-1F and *amoA*2R) by Nicolaisen and Ramsing (2002). A semi-nested approach was used for PCR amplification (Gomez-Villaba *et al.*, 2006). Conditions for each of the PCR reactions and TGGE, were kept as previously described (Gomez-Villaba *et al.*, 2006). 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 directly used for reamplification with the appropriate primers. PCR products were purified by gel running and extraction with the Quiaex-II kit (Quiagen). DNA recovered was directly used for automated sequencing in an ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer.

#### 2.7. Cluster analysis of TGGE fingerprints

Band patterns generated by TGGE were compared and clustered using the Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Bélgica). Bands were automatically detected and matched, and further corrections were applied manually. Dendograms relating band pattern similarities were automatically calculated with the Dice coefficient and UPGMA algorithms (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*). Cluster analysis was used to investigate the relationships between TGGE profiles by calculation of the cophenetic coefficient.

### 2.8. Biocomputing.

DNA sequences were analyzed using the biocomputing tools provided online by the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk>). The BLASTn and BLASTx programs (Altschul *et al.*, 1997) were used for sequencing similarity analysis. The ClustalX v. 1.8 software (Jeanmougin *et al.*, 1998) was used for the aligning of the DNA and protein sequences. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 2.1 (Kumar *et al.*, 2001). Gaps were excluded from the analysis. Bootstrap values below 50% are not shown in the trees.

### 2.9. FISH.

The probes sequences used, the target sites, the target organisms, and the optimal formamide concentrations in the hybridization buffer are reported in tables 3.10 and 3.11. Probes were used as Cy3 and 5,6-carboxyfluoresccin-*N*-hydroxysuccinimide (FLUO)-labeled derivates. Sequential hybridization was applied for probes requiring 35% stringency.

Microscopy examinations were inspected by a confocal scanning laser microcopy Zeiss LSM-510 META, equipped with He and Ar/Ne laser. Excitation wavelengths were set at 488 nm for FLUO and 543 for Cy3. Images were captured and rendered using the software LSM Image Browser vs. 4.0.

### 2.10. Bacteriological and viral analyses

For bacteriological and viral analyses, water samples were collected in sterile plastic bottles (100 ml) and analyzed immediately after collection.

The presence of *E. coli* was studied using the membrane filtration procedure UNE - EN ISO 9308-1. Samples were filtered through Millipore sterile membranes filters (0.45 µm) placed on Petri dishes containing a double layer of tryptic-bile-agar and tryptic-soy-

agar (Oxoid®), respectively. Petri dishes were incubated at  $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  for 4 h and then at  $44\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  for 18 h.

Coliphages were examined using a modification of the double agar layer method described by Adams (1959), with *E. coli* (ATTC 13076) as host bacteria. Previous to analyses, 10 ml of sample or dilution was placed in a tube containing 5 ml of chloroform. The tube was shaken vigorously and then left to settle for 20 min. After heating at  $45^{\circ}\text{C}$ , the chloroform was removed.

### 2.11. Statistics

Data were analyzed by either one-way or multifactor analysis of variance (ANOVA), using the software package STATGRAPHICS 5.0 (STSC, Rockville, MD, USA) to identify significant differences between measurements. A significance level of 95% ( $P<0.05$ ) was selected.

## **3. Results and Discussion.**

### 3.1. Analysis of physical and chemical parameters, and efficiency of the SMB for the removal of organic matter.

Figures 4.1, 4.13 and 4.14 show the concentrations of TSS and VSS during all experiments. TSS and VSS concentrations were increased with time in all experiments, except during the 6<sup>th</sup> experiment, when an accidental loss of biomass happened in day 10<sup>th</sup>, due to a pump failure.

The average values of temperature, pH and dissolved oxygen in all experiments are shown in figures 4.5, 4.20, 4.4, 4.19 and 4.21. pH values behaved in a similar way in all experiments, oscillating between 6-8 in all the experiments. However, temperature

suffered significant fluctuations amongst experiments, since the 6 experiments were conducted in different seasons of the year.

COD and BOD<sub>5</sub> values monitored during all experiments, in both influent and effluent water, are shown in figures 4.2, 4.3, 4.15, 4.16, 4.17 and 4.18. These data reflect that the influent water has a medium degree of pollution (Hernández Muñoz, 1998), and the quality of the effluent after its treatment in the SMB was optimal to comply with the requirements of the European Law (Directive 91/271/CEE). Only during the early days of operation in some experiments, when the pilot plant had not yet achieved the steady-state, these values did not comply with the recommendations.

### 3.2. Total heterotrophic platable microorganisms.

THPM were counted during the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> experiments for 6 consecutive weeks, selecting a period of time during which the concentration of VSS was 2,600–6,200 mg/l in experiment 1<sup>st</sup> (days 60 to 95) and 6,500–8,200 mg/l in experiment 2<sup>nd</sup> (days 48 to 83). The temperatures during experiment 1<sup>st</sup> were 19–24°C, while they remained between 5 and 17°C during experiment 2<sup>nd</sup> (see Fig. 4.5). The numbers of THPM at both 22°C and 37°C were slightly lower during experiment 1<sup>st</sup>, but statistically significant differences were only observed for counts of plates incubated at 22°C (Fig. 4.6 and 4.7). In experiment 1<sup>st</sup>, plate counts at 22°C showed a tendency to decrease through time, while there was a remarkable increment in the number of platable microorganisms in experiment 2<sup>nd</sup> after day 65, correlating with the increase of VSS concentration.

The numbers of THPM in experiments 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> were weekly measured during the complete duration of the experiment. Data are shown in figures 4.22, 4.23, 4.24 and 4.25. Statistically significant differences were observed for counts of plates incubated at 22°C and 37°C in all experiments. Lower values were found in experiment 4<sup>th</sup> on 25 and 40 days (fig. 4.23). In this period of time, the temperature was the highest

in the four experiments (23-27°C). The highest counts of THPM were registered during the 6<sup>th</sup> experiment between days 10-30 of operation (fig. 4.25). In this period of time, the tendency of VSS concentration was to increase very fast (see fig. 4.14) and the temperature fluctuated between 10-20°C. Numbers of THPM incubated at 22°C in experiments 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> were higher than those of THPM incubated at 37°C.

In activated sludge from conventional WWTPs, an increase of VSS concentration is commonly correlated to an increase of the number of microorganisms. However, THPM counts conducted in this study showed that such correlation only took place during experiment 2<sup>nd</sup>, and for the cultivable microbiota incubated at 22°C. Witzig *et al.*, (2002) reported that high biomass retention rates modify the biology of the reactor, lowering growth rates due to the limitation of available substrates. The number of THPM found in the activated sludge in the SMB are slightly lower, compared to the values reported by other authors in activated sludge from a conventional, non-biomass recycling system (Güde 1982; Kämpfer 1988). Microbial populations from SMB are also reported to contain less bacterial cells detectable by FISH than conventional activated sludge samples (Witzig *et al.*, 2002).

Other factors, like pH and temperature, could affect the growth rate of THPM. In all the experiments carried out in the study, the average pH values recorded (figs. 4.4. and 4.19), should not drastically affect the viability of mesophilic bacteria commonly present in urban wastewater. The temperature ranges were very different amongst the experiments, but again these differences seemed not correlated with the THPM growth rates.

### 3.3. Enzymatic activities

For the first two experiments, the evolution through time of the enzymatic activities alkaline phosphatase, acid phosphatase, glucosidase, protease, esterase, and dehydrogenase (experiment 2<sup>nd</sup> only), is shown in figs. 4.8 and 4.9. During experiment

1<sup>st</sup>, enzymatic activities were measured when the concentration of VSS ranged from 1,500 to 6,000 mg/l (days 22 to 99 of plant operation), while during experiment 2 the activities were measured in the VSS range of 6,000–14,000 mg/l (days 41 to 104 of plant operation). Noticeably, the overall values of enzymatic activities measured during experiment 1<sup>st</sup> were significantly higher than those recorded during experiment 2<sup>nd</sup>, except for the glucosidase activity. The average temperature was considerably lower during experiment 2<sup>nd</sup> (fig. 4.5), which was carried out during the autumn–winter season, thus influencing enzymatic activity. In experiment 1<sup>st</sup>, alkaline phosphatase activity was slightly higher than acid phosphatase. The increase of the phosphatase activities correlated with the increase of the VSS concentration, but only during 20-50 days of the experiment (fig. 4.8. A). Glucosidase, protease, and esterase activities also increased with the rise of the VSS concentration, but as shown on fig. 4.8. B-D, the three activities experienced a tendency to decay after a certain VSS concentration was reached (4,000 mg/l for glucosidase and esterase, and 3,000 mg/l for protease). During experiment 2<sup>nd</sup>, a strong descent of glucosidase, protease and esterase activities was observed beginning from day 70, when average temperature was around 10°C and VSS concentration was set at 7,000–11,400 mg/l.

Phosphatase activities were more regular through time, but also experienced a decrease beginning from day 80. Alkaline phosphatases gave higher values than acid phosphatases, as demonstrated during experiment 1<sup>st</sup>. The maximum values of each activity, as influenced by temperature and VSS concentration, are summarized in table 4.1. The highest activities of all enzymes were recorded with a VSS concentration ranging from 2,000 to 6,000 mg/l and at temperatures from 13 to 23°C.

In experiments 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup>, we extended the studies on the enzymatic activities to the full time of operation of the SMB. These data are shown in figures 4.26, 4.27, 4.28 and 4.29. The highest enzymatic activities were recorded during experiment 4<sup>th</sup>, when the average temperature was higher than for the other experiments.

The average values registered of acid phosphatase, protease and esterase were higher in the 4<sup>th</sup> experiment, dehydrogenase activity in the 3<sup>rd</sup> experiment, and glucosidase and alkaline phosphatase in the 6<sup>th</sup> experiment. This same tendency of the enzymatic activities to raise with the temperature was observed in experiments 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup>. The only activity which was not favoured by the raising of temperature was glucosidase. This activity showed the highest values in the 2<sup>nd</sup> and 6<sup>th</sup> experiments, conducted in winter.

Values of acid phosphatase and alkaline phosphatase were very similar in experiment 3<sup>rd</sup>. Acid and alkaline phosphatase, glucosidase and dehydrogenase raise correlated with VSS concentration during 10-35 days, but then the activities started to decay. The same tendency was observed for protease and esterase, although the decay took place at different VSS concentrations.

In experiment 4<sup>th</sup> all the enzymatic activities decayed after day 10 of operation, and this decline started at a specific VSS concentration (5,467 mg/l), except for dehydrogenase activity, which suffered fluctuations throughout the experiment.

During the 5<sup>th</sup> experiment, VSS concentration was maintained between 7,200-7,400 mg/l and the enzymatic activities didn't exhibit strong changes. The 6<sup>th</sup> experiment started with a change in the inflow rate from 0.25 to 0.50 l/min, but TSS and VSS concentration were maintained from those of the 5<sup>th</sup> experiment. In day 10 of operation, an accidental loss of biomass took place in the reactor, with a drop of the VSS concentration to 780 mg/l (fig. 4.13). All the enzymatic activities tended to increase with the descent of VSS concentration, except the dehydrogenase activity. As VSS concentration was recovered, all the enzymatic activities declined again, showing a similar behaviour than in the rest of the experiments. The maximum average values registered for each activity, as influenced by temperature and VSS concentration, are summarized in table 4.2.

Enzymatic activities are essential for the hydrolysis and mineralization of the proteins, carbohydrates, and lipids, which are part of the organic matter removed from the wastewater (LaPara *et al.*, 2001 (b)). When the activities measured in all experiments are compared, significantly lower values are measured during experiment conducted during the autumn and winter seasons, like experiments 2<sup>nd</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup>. Physical factors, such as temperature and pH of the sludge, have a strong influence on the enzymatic activities and the solubility of sludge in the bioreactor (Banister and Pretorius, 1998). Whiteley *et al.*, (2002) reported a positive correlation between temperature and proteolytic activity, which achieved maximum values at temperatures ranging 20–22°C. In experiment 2<sup>nd</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup>, carried out during autumn and winter, the temperature of the sludge was 5–15°C, while maximum enzymatic activities were recorded at temperatures of 13–27°C (Tables 4.1 and 4.2).

Temporal variations of the hydrolysis rates are explained by two major factors: the changes of the active biomass and the shifting of the dominant populations in the bioreactor (Cadoret *et al.*, 2002). The ability of SMB to catabolize substrates is proportional to the level of active biomass (LaPara *et al.*, 2001(a)). VSS gives an estimation of the active biomass; thus, an increment of the activity is expected when VSS concentrations rise. However, in our experiments we found a tendency of all enzymatic activities tested to decline as VSS concentration increased through time. One explanation is the existence of a feedback inhibition of the activities, due to the accumulation of end products in the biomass recycling system. For instance, it is well-documented that phosphatase activity is repressed in aquatic environments by high concentrations of dissolved inorganic P (Wright and Reddy, 2001).

The efficiency of oxygen transfer decreases at high VSS concentrations, leading to an increase in viscosity and a change of the rheology of the sludge (Rosenberger *et al.*, 2002). Limited oxygen availability can have a strong impact on the survival and biological activity of particular groups of microorganisms, especially the nitrifying bacteria. Nitrite oxidation is particularly sensitive to oxygen availability (Wyffels *et al.*,

2003). Besides, the inhibition of the enzymatic activities at high VSS concentration was more evident in experiment 2<sup>nd</sup>, which was carried out in winter. Low temperatures (<8°C) also have a negative effect on the nitrifying bacteria, mainly the ammonia oxidizers (Martin *et al.*, 2005; Egli *et al.*, 2003). A failure of the nitrification process in the SMB reactor can lead to the accumulation of toxic nitrogen species such as ammonia and nitrite, which may affect community composition of the sludge and change the overall performance of the enzymatic activities. This type of failure was recorded at the end of the 6<sup>th</sup> experiment, and FISH analysis confirmed that nitrite oxidizers were physiologically inactive, leading to the accumulation of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

#### 3.4. Community fingerprinting of total bacterial communities and ammonia-oxidizing $\beta$ -proteobacteria by TGGE.

The diversity of bacteria in the activated sludge from the SMB was also studied by a culture-independent approach based on TGGE, which generates profiles of the dominant populations in complex communities in the environment. This technique has been extensively applied in recent years to the study of a variety of different bacterial ecosystems, including sludge and biofilms from WWTPs (Wagner *et al.*, 2002; Cortés-Lorenzo *et al.*, 2006).

Figure 4.38, 4.39 and 4.40 show the TGGE community profiles of bacteria in the SMB system during the 6 experiments, and figure 4.42 shows the dendrogram generated by the UPGMA cluster analysis of these TGGE banding patterns. Clustering of the TGGE profiles demonstrated that the community composition was significantly different in each experiment, except for fingerprints generated from samples taken during experiments 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup>, which clustered together showing a higher similarity. The only initial difference in the operation conditions between these two experiments was the change of the inflow rate from 0.25 to 0.50 l/min at the beginning of experiment 6<sup>th</sup>. The community fingerprint of day 3 during the 4<sup>th</sup> experiment clearly clustered away from the rest, showing only a 48% similarity. This day was the only one in all experiments

that we collected samples at the beginning of the experiment, when there was a very low VSS concentration in the sludge of the SMB (3,500 mg/l).

Within the same experiment, the bacterial community experienced sequential shifts as the biomass accumulated, as shown by the evolution of the population profiles through time as VSS concentration increased, with samplings from early and late operation stages of the SMB tending to group apart. Tables 4.3, 4.4 and 4.5 show the closest phylogenetic affiliations of 34 of the TGGE bands that experienced shifting through SMB operation, which were successfully reamplified from the gels and further sequenced.

We found that the behaviour of the community responsible for the treatment of real domestic wastewater was analogous to what has been described for bacterial consortia growing under stringent nutrient limitation on synthetic wastes (LaPara *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2002) and gray water (Stamper *et al.*, 2003). TGGE fingerprints generally clustered following the time course, displaying the effect of the accumulation of VSS in the bioreactor on the species composition of the sludge (Fig. 4.42, 4.47), which induced a gradual shifting of the dominant members of the community. Several bands were detected in the TGGE profiles, which were specific of certain stages of a particular experiment. Also, the TGGE fingerprints showed a connection between the concentration of VSS and the community changes, especially during experiment 2<sup>d</sup>. The clustering change between days 66–77 and 84–105 (Fig. 4.38, 4.29) is clearly linked to a sharp increase of VSS concentration (Fig 4.1, 4.14). These alterations of community composition overlapped with the drop of the enzymatic activities recorded in all experiments (except for experiment 5<sup>th</sup>) during the last days of operation, pointing to the operational importance of certain populations affected by the community shifting.

Stamper *et al.*, (2003) analyzed the biological diversity of the content of an SBM bioreactor treating gray water and proposed that major changes of the community structure were correlated to occasional peak increases of BOD<sub>5</sub> values and of the

content of oils and grease in the inflow. Interestingly, the data of Stamper *et al.*, (2003) showed also the separated clustering of DGGE profiles from samples taken within a period of operation when the VSS concentration was over 10,000 mg/ml. In contrast, we could not find in our experiments a clear correlation between COD or BOD<sub>5</sub> changes of the influent domestic wastewater (Fig. 4.2, 4.3, 4.15, 4.16, 4.17 and 4.18) and the variations experienced by the bacterial community. It must be taken into consideration that domestic wastewater and gray water have different qualitative and quantitative compositions (Stamper *et al.*, 2003).

33 TGGE bands were successfully reamplified from the gels and further sequenced. A phylogenetic tree was generated to visualize the phylogenetic relationships between the nucleotide sequences of the 16S rRNA gene retrieved from the SMB sludge and the sequences from previously known bacterial lineages (Fig. 4.41). This approach identified the sequences as being mostly related to the  $\alpha$ -proteobacteria (mainly to the *Caulobacteraceae* and *Sphingomonadaceae*),  $\beta$ -proteobacteria (mainly to the *Comamonadaceae*), and  $\gamma$ -proteobacteria (mainly to the *Xanthomonadaceae*).

Studies based on different cultivation-independent techniques (DGGE, FISH, T-RFLP, clone libraries, and others), both based on DNA and RNA approaches, confirmed the existence of very complex microbial communities responsible for the performance of biological wastewater treatments, and agree that the Proteobacteria are the dominant members of the bacterial communities in the bioreactors of aerobic treatment systems, with an obvious prevalence of  $\beta$ -proteobacteria members (Amman *et al.*, 1996; Bond *et al.*, 1995; Bramucci *et al.*, 2003; Eschenhagen *et al.*, 2003; Luxmy *et al.*, 2000; Manz *et al.*, 1994; Muyzer *et al.*, 1993; Olsen *et al.*, 1986; Rosemberg *et al.*, 2000; Snaidr *et al.*, 1997; Witzig *et al.*, 2002). These data are in disagreement with earlier studies based in the cultivation approach, which suggested the dominance of the  $\gamma$ -proteobacteria in these habitats (Bramucci *et al.*, 2003).

Although TGGE is not a quantitative method due to the bias introduced by the PCR reaction, some bands clearly changed their intensity through the experiments, which can be interpreted as a consequence of a change in their relative abundance in the community composition (Brüggemann *et al.*, 2000; Stamper *et al.*, 2003). Identification of bands by reamplification and sequencing demonstrated the significant occurrence in the samples of nitrite oxidizers of the *Nitrospira* genus (at least 1% of total population, according to the estimated average TGGE detection threshold). *Nitrospira* populations prevail over *Nitrobacter* in SMBs previously investigated by the FISH technique (Witzig *et al.*, 2002). Remarkably, some of the dominant bands displayed very low sequence identity with validated bacterial taxons, suggesting the possible importance of unknown bacterial groups in SMB operation.

In order to study the diversity of the community of ammonia-oxidizing bacteria, we used a PCR amplified fragment of the *amoA* gene to produce TGGE profiles (figs. 4.43 and 4.44), and generated a cluster analysis of the TGGE fingerprints, which is shown in fig. 4.47. Fingerprints based on the amplification of *amoA* were more simply than the fingerprints generated by the amplification of the 16S rRNA gene, as the community of ammonia-oxidizing bacteria is constrained to a limited number of genera and species affiliated to the  $\beta$ -proteobacteria.  $\alpha$ -proteobacteria ammonia oxidizers (*Nitrosococcus oceanii*) are restricted to marine habitats (Prosser, 2007) and were not analysed in this study.

The *amoA*-based TGGE fingerprints of all of the experiments clustered away in 2 clusters showing less than 30% similarity. In the first cluster, the profiles are more complex than in the second. Experiments 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> clustered at a 45% of similarity, while the rest of experiments did not cluster in separated groups. The evolution of *amoA* profiles did not show a temporal sequence, like it was recorded for the profiles obtained based in the 16S rRNA gene sequence.

Studies of the nitrifying communities in natural habitats and in wastewater have increased significantly during the last decades thanks to the introduction of the culture-independent approaches. Purkhold *et al.*, (2000) investigated in detail the phylogeny of ammonia oxidizers based both in the sequence of the 16S rRNA gene and the sequence of the ammonia monooxygenase gene (*amoA*) and the AmoA protein. To use the *amoA* sequence as a marker to infer the phylogeny of ammonia oxidizers from environmental samples, these authors established a limit of divergence of 20% for the DNA sequence of unknown bacteria (15% divergence for the amino acid sequence).

Tables 4.6, 4.7 show the closest phylogenetic affiliations of 14 of the TGGE bands which were successfully reamplified from the gels and further sequenced. All the partial sequences were affiliated to *Nitrosomonas*-like *amoA*, and no *Nitrospira*-related sequences were found. All the *amoA* sequences retrieved from the SMB showed a divergence well below 20% with the sequences deposited in the EMBL database. These results indicate that the detected bacteria were phylogenetically close to previously described ammonia oxidizers and validated bacterial species (table 4.6 and 4.7). The phylogenetic analysis showed that very similar ammonia-oxidizing populations inhabited the sludge of the SMB system, being all the sequenced bands related to the *Nitrosomonas europaea*/*Nitrosomonas eutropha* Cluster 7 (fig. 4.45 and 4.46). When aligned and compared, more divergence within the DNA sequences was found, compared to the protein sequences of AmoA. The DNA similarity matrix shows that only 7 of the 14 sequenced bands were identical (1a, 3a, 14b, 17a, 20b and 30b), but at the protein level all the bands showed identical amino acid sequences.

The predominance of ammonia oxidizers of the genus *Nitrosomonas* over *Nitrospira* has been commonly reported in previous studies of the ammonia oxidizer communities on WWTPs plants based on the activated sludge technology (Purkhold *et al.*, 2000). Our results are also in concordance with other studies which demonstrated the prevalence of *N. europaea*, *N. marina* and *N. eutropha* as members of the ammonia

oxidizing community in wastewater (Mobarry *et al.*, 1996; Ottawa *et al.*, 2006; Schramm *et al.*, 1996; Siripong and Rittmann, 2007; Stephen *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1995; Wittebolle *et al.*, 2005).

### 3.5. FISH analysis of nitrifying bacteria.

In the last period of this study, we further investigated the community composition of nitrifying bacteria of the SMB using the FISH technique. Several combinations of FISH probes were used to analyse the composition of the ammonia oxidizing and the nitrite oxidizing communities, in samples taken from the SMB in the last day of experiment 6<sup>th</sup> (table 4.8). At the time of sampling, the SMB was failing in nitrite elimination (Poyatos, 2007), and FISH studies were focused to get a further insight of the populations involved in nitrification, in order to understand the possible causes of such failure.

$\beta$ -proteobacteria ammonia oxidizers were visualised in the SMB sludge with probe combination 1, targeting eubacteria (EUB mix, FLUOS labelling) and  $\beta$ -proteobacteria ammonia oxidizers (Nos1225, Cy3 labelling) (see table 4.8). Different microcolony morphologies were observed (figure 4.48). The use of other probe combinations (combinations 2, 3, 4, 5 and 6) identified the dominating ammonia oxidizing microcolonies as related to the *Nitrosomonas oligotropha/N. ureae* cluster (ammonia-oxidizers cluster 6a). Neither halotolerant/halophilic nitrosomonads nor *Nitrospira* spp. were detected in the sludge.

In order to study the composition of nitrite oxidizers, we used the probe combinations 7, 8, 9 and 10 (table 4.8). Nitrite oxidizers were mostly absent except for a very low number of colonies of *Nitrobacter* sp. detected in some hybridizations. Anammox organisms couldn't be detected either, when probe combinations 11 and 12 were used.

FISH studies conducted in the last day of experiment 6<sup>th</sup> confirmed that nitrite was accumulated in the SMB due to the low physiological activity of nitrite oxidizing communities in the sludge at the time of sampling. At the time of sampling for FISH analysis, VSS concentration was high (12,000 mg/l, fig. 4.13) and O<sub>2</sub> concentration was below 2 mg/l (fig. 4.21). Low oxygen concentrations are a serious limitation for the development and physiology of nitrite oxidizers (Wyffels *et al.*, 2003). Oxygen transfer is reduced at high VSS concentrations, as a result of the increased viscosity of the sludge (Rosenberger *et al.*, 2002). Also, experiment 6<sup>th</sup> was fully conducted in winter and the MB operated at temperatures of 5-10 °C (fig. 4.20). These low temperatures negatively affect the performance of ammonia oxidizing and nitrite oxidizing bacteria (Egli *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2005). The low performance of nitrification induces the accumulation of ammonia and/or nitrite, which are toxic products poorly tolerated by *Nitrospira* (Abeling y Seyfried, 1992; Ehrich *et al.*, 1995).

FISH also demonstrated an abundant occurrence in the sludge of microcolonies of ammonia oxidizers phylogenetically related to Cluster 6a nitrosomonads. This was a rather unexpected result, provided that the TGGE analysis showed only the prevalence of the Cluster 7 nitrosomonads in the SMB. TGGE and FISH were based on different genes (*amoA* and 16S rRNA gene, respectively). Furthermore, TGGE will detect populations present in high numbers, even if these are actually not the most active at a physiological level (Wittebolle *et al.*, 2005). These discrepancies point to the need of using a combination of molecular techniques for the better understanding of the biological nitrification process.

### 3.6. *Escherichia coli* and bacteriophages

*E. coli* counts were carried out in influent water, in the bioreactor, and the effluent water, scheduled on a weekly basis. The data showed a high capacity of the SMB to remove *E. coli*.

During experiment 1<sup>st</sup>, *E. coli* counts were only carried out in the SMB sludge, in order to evaluate the order of magnitude of these bacteria in the bioreactor (fig. 4.10). Data show that *E. coli* numbers in the sludge remained stable throughout the whole experiment, between  $10^4$  and  $10^5$  CFU/ml.

In the rest of the experiments, analysis were extended to influent and effluent water, to study the retention of these organisms in the sludge biomass, and to assess the efficiency of the system in the elimination of these bacteria. Data all of experiments are showed in figures 4.11, 4.30, 4.31, 4.32 and 4.33.

The method used to analyse *E. coli* (UNE-EN ISO 9308-1) detects *E. coli* and other bacteria that can grow at both 37 and 44,5°C and resist bile salts (coliforms). Only indol- producing colonies were counted as positives of *E. coli*.

*E. coli* counts were very similar in the influent and in the bioreactor in all experiments, ranging from 2,5-5,5 log UCF/ml. *E. coli* numbers in the sludge did not increase with the raise of VSS concentration, as it was also demostntrated for THPM. As expected, the SMB system was able to completely retain *E. coli*, resulting in a 100% absence in the effluent water in all experiments. Exceptionally, *E. coli* colonies were identified in the effluent water (day 3 of 3<sup>rd</sup> experiment, and day 1 in the 5<sup>th</sup> experiment). Also, in most samplings of effluent water, indol-negative colonies were detected, at average values ranging from 1,5 to 40 CFU/ml. The presence of bacteria in effluent water was abolished after the chemical cleaning of the membrane. This fact was explained due to the growth of biofilm in the clean, inner side of membrane. The membrane was periodically cleaned by backflushing from the tank where treated water was kept, which was not maintained under sterile conditions in the experiments. Previous studies by Gómez *et al*, (2006a, 2006b), conducted in a similar SMB equipped with an ultrafiltration membrane, and using the same method for the detection of *E. coli* (UNE-EN ISO 9308-1), reached similar conclusions.

Previous studies demonstrated the efficiency of the SMB systems to remove pathogenic bacteria (Gander *et al.*, 2000; Ueda and Horan, 2000; Arrojo *et al.*, 2005). Microfiltration membranes (0.4  $\mu\text{m}$  pore size) have a removal efficiency of only 98% (Wen *et al.*, 2004). Gander *et al.*, (2000) used a SBM with a different membrane configuration (plate and frame) and evaluated the efficiency of membranes with different pore sizes (5 and 0.4  $\mu\text{m}$ ), concluding that the efficient removal of *E. coli* could only be achieved with the membrane of 0.4  $\mu\text{m}$  pore size.

The efficiency of retention of viral particles achieved by the SMB was analysed by coliphage counts. Coliphages has been proposed as good indicators of viral contamination (Beaudeau *et al.*, 1997; Gómez y Hontoria, 2003; Skrabber *et al.*, 2002; Brion, 2002), due to its structure, morphology and size being very similar to those of enteric viruses (Maier *et al.*, 2000). The results recorded in this study are shown in figures 4.12, 4.34, 4.35, 4.36 and 4.37. The effluent water was free of coliphages, pointing out that the ultramembrane is able to retain these kind of viruses and seemingly the majority of viruses in the same range of particle size. Exceptionally, coliphages were detected in 3 samples (day 4 of 4<sup>th</sup> experiment and days 9 and 23 of 6<sup>th</sup> experiment). This fact may be caused by an analytical mistake.

Several authors have confirmed that the creation of biofilms on the membranes of MBR act as a barrier that is able to catch and accumulate viruses (Flood y Ashbolt, 2000; Sutherland *et al.*, 2004, Lv *et al.*, 2005). This biofilm is a very important factor for the removal of coliphages. The physical effect of the biofilm is the reduction of the pore size of membrane (Ueda and Horan, 2000). Research by Ridgway and Flemming (1996) demonstrated that when a SMB is started, a first biofilm is created during the first days of operation and afterwards a second biofilm is formed (Ueda and Horan, 2000). The characteristics of the biofilm are determined by the VSS concentration and the sludge retention time (SRT) (Shan *et al.*, 2005).

The absence of coliphages indicate that membrane ultrafiltration is able to retain these type of indicators of viral contamination, as viral particle size is usually ranging from 25-

300 nm (Ingraham and Ingraham, 1998) and pore size of the membrane tested in this study is 40 nm.

The activated sludge of the SMBs can remove viruses by flocculation, by adsorption on EPS and by bacteria and protozoa predation (Ueda and Horan, 2000; Lv, *et al.*, 2005; Shang *et al.*, 2005). These theories may explain the low number of coliphages recorded in the SMB, compared to the influent water. During experiments 2<sup>nd</sup> (days 70-90) and 6<sup>th</sup> (days 20-30), coliphage counts were higher, and this fact was correlated with an increase of the VSS concentration (fig. 4.12 and 4.37), but this tendency was not observed in the rest of the experiments. The amount and composition of EPS, and the changes experienced in the enzymatic activities with the different VSS concentration can also influence the rate of elimination of coliphages by the activated sludge (Shang *et al.*, 2005).

In conclusion, the SMB operate in this study was efficient for the elimination of organic matter from urban wastewater in all the experiments conducted, during different seasons of the year, and under different operating conditions. Cultivation-based analysis demonstrated that the numbers of THPM and *E. coli* counted in the bioreactor were not influenced by the variation of the VSS concentrations, while coliphage numbers were often reduced in the sludge, compared to the influent water. SMB was able to eliminate with efficiency of 100% microbial indicators of fecal and viral contamination. Cultivation-independent studies based on TGGE demonstrated that the total bacterial community in the SMB is dominated by classes  $\beta$ -proteobacteria,  $\alpha$ -proteobacteria and  $\gamma$ -proteobacteria. The evolution of the enzymatic activities and community fingerprints generated by TGGE demonstrated that the bacteria adapted progressively to the conditions inflicted by the biomass retention in the bioreactor, mainly due to the variation of the VSS concentration. High concentrations of VSS induced a decay of the enzymatic activities, although the threshold concentration of VSS that generates such effect varied from one experiment to another. It must be taken into consideration that the 6 experiments were carried out under different

average temperatures of operation and inflow rates. Our results suggest the need for a careful monitoring of the concentrations of VSS reached in the SMB, in order to choose and maintain those most appropriated for the proper operation of the biomass recycling system. In the bioreactor tested in this study, VSS concentrations over 8,000 mg/l generated very low enzymatic hydrolysis rates, potentially affecting the features of the biological treatment. The optimal temperatures for the tested enzymatic activities were those between 17-23°C, except for glucosidase activity, which reached higher yields at 7-13°C. TGGE-sequencing analysis pointed out that the ammonia oxidizing community in the SMB was dominated by *Nitrosomonas europaea*/*N. eutropha* related strains, and demonstrated the occurrence of *Nitrospira*-related nitrite oxidizers. FISH analysis of samples taking at the end of experiment 6<sup>th</sup> revealed bacteria related to the nitrosomonads Cluster 6a, and suggested that the nitrifying community was very sensitive to changes of plant conditions and environmental factors (ie. pH, temperature, oxygen concentration and toxic shock).

## References

All references are indicated in pages 171-189.

- FIGURE AND TABLE LEGENDS
- Figure 3.2. Diagram of the SMB pilot-scale plant used in the study. P. 52.
- Figure 3.3. Pilot-scale plant ZeeWeed®10. P. 53.
- Figure 4.1. Time evolution of the concentration of TSS and VSS (mg/l) in sludge during 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> experiments. P 92.
- Figure. 4.2. Time evolution of COD and BOD<sub>5</sub> in the influent and effluent during 1<sup>st</sup> experiment. P. 93
- Figure. 4.3. Time evolution of COD and BOD<sub>5</sub> in the influent and effluent during 2<sup>nd</sup> experiment. P.93.
- Figure 4.5. Time evolution of temperature (°C) in sludge during 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> experiments. P 94.
- Figure 4.6. Total heterotrophic plateable microorganisms at 22 and 37°C, and VSS, in 1<sup>st</sup> experiment. LSD Least significant difference (P<0,05). P. 96.
- Figure 4.7. Total heterotrophic plateable microorganisms at 22 and 37°C, and VSS, in 2<sup>nd</sup> experiment. LSD (P<0,05). P. 96.
- Figure 4.8. Enzymatic activities and VSS in sludge during 1<sup>st</sup> experiment. A. Acid phosphatase (LSD=0,23), alkaline phosphatase (LSD=0,39). B. Glucosidase (LSD=0,10). C. Protease (LSD=0,88). D. Esterase (LSD=2,3). P. 98.
- Figure 4.9. Enzymatic activities and VSS in sludge during 2<sup>nd</sup> experiment. A. Acid phosphatase (LSD=0,77), Alkaline phosphatase (LSD=0,49). B. Glucosidase (LSD=0,08). C. Protease (LSD=0,77). D. Esterase (LSD=2,2). E. Dehydrogenase (LSD=0,16). P. 99.
- Figure 4.10. *Escherichia coli* counts in the bioreactor during 1<sup>st</sup> experiment. P. 101.
- Figure 4.11. *Escherichia coli* counts in the influent, bioreactor and effluent, during 2<sup>nd</sup> experiment. P. 101.
- Figure 4.12. Coliphage counts and VSS in the influent, bioreactor and effluent, during 2<sup>nd</sup> experiment. (LSD=62,38). P. 103.
- Figure 4.13. Time evolution of the concentration of TSS (mg/l) in sludge in the 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> experiments. P. 104.

- Figure 4.14. Time evolution of the concentration of VSS (mg/l) in sludge in the 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> experiments. P. 105.
- Figure 4.15. Time evolution of COD and BOD<sub>5</sub> in the influent and effluent during 3<sup>rd</sup> experiment. P. 106.
- Figure 4.16. Time evolution of COD and BOD<sub>5</sub> in the influent and effluent during 4<sup>th</sup> experiment. P. 107.
- Figure 4.17. Time evolution of COD and BOD<sub>5</sub> in the influent and effluent during 5<sup>rd</sup> experiment. P. 107.
- Figure 4.18. Time evolution of COD and BOD<sub>5</sub> in the influent and effluent during 6<sup>rd</sup> experiment. P. 108.
- Figure 4.20. Time evolution of temperature (°C) in the sludge in the 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> experiments. P. 110.
- Figure 4.22. Total heterotrophic platable microorganisms at 22 and 37°C, and VSS, in the 3<sup>rd</sup> experiment. LSD (P<0,05). P. 111.
- Figure 4.23. Total heterotrophic platable microorganisms at 22 and 37°C, and VSS, in the 4<sup>th</sup> experiment. LSD (P<0,05). P. 112.
- Figure 4.24. Total heterotrophic platable microorganisms at 22 and 37°C, and VSS, in the 5<sup>th</sup> experiment. LSD (P<0,05). P. 112
- Figure 4.25. Total heterotrophic platable microorganisms at 22 and 37°C, and VSS, in the 6<sup>th</sup> experiment. LSD (P<0,05). P. 113.
- Figure 4.26. Enzymatic activities and VSS in the sludge during the 3<sup>rd</sup> experiment. A. Acid phosphatase (LSD=0,30), Alkaline phosphatase (LSD=0,69). B. Glucosidase (LSD=0,10). C. Protease (LSD=0,59). D. Esterase (LSD=1,33). E. Dehydrogenase (LSD=0,14). P. 115.
- Figure 4.27. Enzymatic activities and VSS in the sludge during the 4<sup>th</sup> experiment. A. Acid phosphatase (LSD=0,56), Alkaline phosphatase (LSD=0,46). B. Glucosidase (LSD=0,09). C. Protease (LSD=6,12). D. Esterase (LSD=9,27). E. Dehydrogenase (LSD=0,05). P. 116.
- Figure 4.28. Enzymatic activities and VSS in the sludge during the 5<sup>th</sup> experiment. A. Acid phosphatase (LSD=0,39), Alkaline phosphatase (LSD=0,35). B. Glucosidase (LSD=0,07). C. Protease (LSD=0,28). D. Esterase (LSD=3,47). E. Dehydrogenase (LSD=0,09). P. 117.

- Figure 4.29. Enzymatic activities and VSS in the sludge during the 6<sup>th</sup> experiment. A. Acid phosphatase (LSD=0,90), Alkaline phosphatase (LSD=0,99). B. Glucosidase (LSD=0,13). C. Protease (LSD=0,51). D. Esterase (LSD=5,31). E. Dehydrogenase (LSD=0,10). P. 118.
- Figure 4.30. *Escherichia coli* counts in the influent, bioreactor and effluent, during the 3<sup>rd</sup> experiment. P. 120.
- Figure 4.31. *Escherichia coli* counts in the influent, bioreactor and effluent, during the 4<sup>th</sup> experiment. P. 121.
- Figure 4.32. *Escherichia coli* counts in the influent, bioreactor and effluent, during the 5<sup>th</sup> experiment. P. 121.
- Figure 4.33. *Escherichia coli* counts in the influent, bioreactor and effluent, during the 6<sup>th</sup> experiment. P. 122.
- Figure 4.34. Coliphage counts and VSS in the influent, bioreactor and effluent, during the 3<sup>rd</sup> experiment (LSD=74,27). P. 123.
- Figure 4.35. Coliphage counts and VSS in the influent, bioreactor and effluent, during the 4<sup>th</sup> experiment (LSD=168,60). P. 124.
- Figure 4.36. Coliphage counts and VSS in the influent, bioreactor and effluent, during the 5<sup>th</sup> experiment (LSD=110,85). P. 124.
- Figure 4.37. Coliphage counts and VSS in the influent, bioreactor and effluent, during the 6<sup>th</sup> experiment (LSD=216,09). P. 125.
- Figure 4.38. TGGE fingerprinting of the bacterial community of sludge samples taken from the SMB during the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> experiments. Profiles are based on the amplification and separation of the V3 hypervariable region of the 16S rRNA gene. Bands which were successfully amplified and sequenced are marked. (Bands marked with an asterisk are artifacts generated by the PCR reaction).P. 126.
- Figure 4.39. TGGE fingerprinting of the bacterial community of sludge samples taken from the SMB during the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> experiments. Profiles are based on the amplification and separation of the V3 hypervariable region of the 16S rRNA gene. Bands which were successfully amplified and sequenced are marked. (Bands marked with asterisk are artifacts generated by the PCR reaction). P. 129.

- Figure 4.40. TGGE fingerprinting of the bacterial community of sludge samples taken from the SMB during the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> experiments. Profiles are based on the amplification and separation of the V3 hypervariable region of the 16S rRNA gene. Bands which were successfully amplified and sequenced are marked. (Bands marked with asterisk are artifacts generated by the PCR reaction). P. 132.
- Figure 4.41. Unrooted Neighbour-Joining phylogenetic tree, showing the relationships between the sequences of the V3 hypervariable region of the 16S rRNA gene (ca. 200 bp), showing the positions of the 33 bands reamplified from the TGGE gels and the most similar sequences retrieved from the EMBL database. The scale bar indicates a 5% divergence. Bootstrap values over 50% are shown in nodes. P. 135.
- Figure 4.42. Dendrogram generated by UPGMA clustering (Dice correlation coefficient) of 16S-rRNA based TGGE patterns from activated sludge samples taken from the SMB, using Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Belgium). The scale bar indicates the percentage of similarity. Numbers in nodes represent the cophenetic correlation values. P 137.
- Figure 4.43. TGGE fingerprinting of the ammonia oxidizing  $\beta$ -proteobacteria community of sludge samples taken from the SMB during the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> experiments. Profiles are based on amplification and separation of the *amoA* gene. Bands which were successfully amplified and sequenced are marked. P. 139.
- Figure 4.44. TGGE fingerprinting of the ammonia oxidizing  $\beta$ -proteobacteria community of sludge samples taken from the SMB during the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> experiments. Profiles are based on amplification and separation of the *amoA* gene. Bands which were successfully amplified and sequenced are marked. (Lane M is the same sample as in the 14<sup>th</sup> day of 4<sup>th</sup> experiment; which was used as a standard lane for cluster analysis). P. 140.
- Figure 4.45. Unrooted Neighbour-Joining phylogenetic tree, showing the relationships between the sequences of the *amoA* fragment (ca. 450 bp), showing the positions of the 12 bands reamplified from the TGGE gels and the most similar sequences retrieved from the EMBL database. The scale bar

indicates a 2% divergence. Bootstrap values over 50% are shown in nodes. P. 142.

- Figure 4.46. Unrooted Neighbour-Joining phylogenetic tree, showing the relationships between the sequences of the AmoA protein fragment (ca. 150 aa), showing the positions of the 12 bands reamplified from the TGGE gels and the most similar sequences retrieved from the EMBL database. The scale bar indicates a 2% divergence. Bootstrap values over 50% are shown in nodes. P. 144.
- Figure 4.47. Dendrogram generated by UPGMA clustering (Dice correlation coefficient) of *amoA*-based TGGE patterns from activated sludge samples taken from the SMB, using Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Belgium). The scale bar indicates the percentage of similarity. Numbers in nodes represent the cophenetic correlation values. P 145.
- Figure 4.48. CLSM photomicrographs of activated sludge samples from SMB, taken during the last day of 6<sup>th</sup> experiment, after in situ hybridisation with different combinations of labelled probes. a) and b) Samples hybridized to EUB mix probe (FLUOS labelled) and Nso1225 probe (Cy3-labelled). Microcolonies of ammonia oxidizing  $\beta$ -proteobacteria (*Nitrosomonas* sp.), hybridized to both probes and are visible in yellow. The rest of eubacteria hybridised only to the FUOS-labelled EUB mix probe (visible in green). c) Detail of b) showing the existence of microcolonies of ammonia oxidizers of two different morphologies. P. 148.
- Figure. 4.49. CLSM photomicrographs of activated sludge samples from SMB, taken during the last day of 6<sup>th</sup> experiment. a) Microcolonies of ammonia oxidizing bacteria hybridised to both the Cy3-labeled probe Nso1225 (*Nitrosomonas* sp.) and to the FLUOS-labelled probe 6a 192+C (visibles in yellow). The rest of the microorganisms in the sludge sample are visualized in grey (SEM). It is noticeable the abundance of filamentous bacteria. b) Image showing two kinds of microcolonies of ammonia oxidizing  $\beta$ -proteobacteria (*Nitrosomonas* spp.) with different morphologies. The combination of probes used is the same than in a). The image shows colonies which only hybridised to the Cy3-labeled probe Nso1225 (*Nitrosomonas* sp., in red), and colonies

related to the nitrosomonads Cluster 6a (hibridizing to both probes, in yellow). P. 149.

- Table 3.1. Different features and variables of the 6 experiments conducted in the study. P. 57.
- Table 3.10. Probes used to study the community of nitrifying bacteria by FISH. Common names for probes and the standardized terminology proposed by Alm *et al.*, (1996) are included. P. 84.
- Table 3.11. Composition of hybridization buffer (1 ml). P. 86.
- Table 4.1. Optimal parameters for the maximum yields of enzymatic activities in the SMB sludge during the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> experiments. P. 100.
- Table 4.2. Optimal parameters for the maximum yields of the enzymatic activities in the SMB sludge during the 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> experiments. P. 119.
- Table 4.3. Sequence length and closest phylogenetic affiliation of TGGE bands (V3 hypervariable region of 16S rRNA gene) analyzed during the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> experiments. Reference numbers of nucleotide sequences were retrieved from the EMBL database. P. 128.
- Table 4.4. Sequence length and closest phylogenetic affiliation of TGGE bands (V3 hypervariable region of 16S rRNA gene) analyzed during the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> experiments. Reference numbers of nucleotide sequences were retrieved from the EMBL database. P. 130-131.
- Table 4.5. Sequence length and closest phylogenetic affiliation of TGGE bands (V3 hypervariable region of 16S rRNA gene) analyzed during the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> experiments. Reference numbers of nucleotide sequences were retrieved from the EMBL database. P. 133.
- Table 4.6. Sequence length and closest phylogenetic affiliation of TGGE bands (*amoA* gene fragment) analyzed during all experiments. Reference numbers of nucleotide sequences were retrieved from the EMBL database. P. 141.
- Table 4.7. Sequence length and closest phylogenetic affiliation of the translation of the sequence of the TGGE bands (*AmoA* protein fragment) analyzed during all experiments. Reference numbers of amino acid sequences were retrieved from the EMBL database. P. 143.