

UNIVERSIDAD DE GRANADA



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA.
FACULTAD DE FARMACIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA FUNDAMENTAL
Y DE SISTEMAS

Diversidad de microorganismos filamentosos en un biorreactor de membrana sumergida (MBR) para el tratamiento del agua residual urbana: Relación entre la estructura de las comunidades microbianas y las variables del sistema.

Paula Maza Márquez

Tesis Doctoral 2015

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Paula Maza Márquez

ISBN: 978-84-9125-266-5

URI: <http://hdl.handle.net/10481/40692>

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA.
FACULTAD DE FARMACIA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA FUNDAMENTAL
Y DE SISTEMAS**

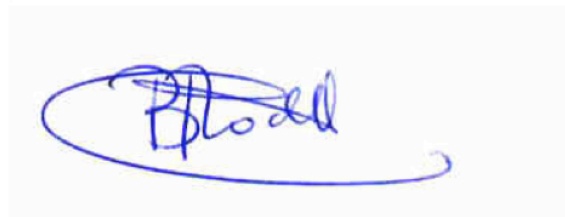
Diversidad de microorganismos filamentosos en un biorreactor de membrana sumergida (MBR) para el tratamiento del agua residual urbana: Relación entre la estructura de las comunidades microbianas y las variables del sistema.

Memoria para la obtención del grado de Doctor con mención internacional, 2015



Fdo. Paula Maza Márquez

Directora:



**Fdo. Dña. María Belén Rodelas
González**

Catedrática en Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

El doctorando, *Paula Maza Márquez* y la directora de la tesis *María Belén Rodelas González*, garantizan, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde mi conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 8 de Junio de 2015

Directora de la Tesis



**Fdo. María Belén Rodelas
González**

Doctorando



Fdo. Paula Maza Márquez

Este trabajo ha sido desarrollado en el marco del Proyecto CTM2010-17609/TECNO, financiado por el Plan Nacional de I+D+i (Programa Nacional de Proyectos de Investigación Fundamental) del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Agradecimientos

Index-Índice

Introduction-Introducción	17
1.1. Problemática actual de las aguas residuales. Necesidad de tecnologías avanzadas de tratamiento.	19
1.2. Tecnologías avanzadas de tratamiento de las aguas residuales: biorreactores de membrana sumergida (MBRs).	20
1.3. Formación de espumas (<i>foaming</i>) en los tratamientos de agua residual: problemática y causas.	23
1.4. Función de los microorganismos filamentosos: importancia de la biofloculación.	25
1.5. Diversidad de bacterias filamentosas en los sistemas de tratamiento de aguas residuales.	27
1.6. Mecanismos de formación de las espumas biológicas.	29
1.6.1. Burbujas de aire.	30
1.6.2. Partículas hidrofóbicas.	30
1.6.3. Tensioactivos.	31
1.7. Factores que afectan al crecimiento de los microorganismos formadores de espumas.	31
1.7.1. Requisitos nutricionales.	31
1.7.2. Oxígeno.	32
1.7.3. Temperatura.	32
1.7.4. pH.	33
1.7.5. SRT.	33
1.8. Estrategias K-r de los microorganismos filamentosos.	33
1.9. Métodos de control de la formación de espumas.	34
1.10. Diversidad y funciones de los hongos en los tratamientos del agua residual.	35
1.11. Técnicas de estudio de las comunidades microbianas filamentosas.	36
1.11.1. Métodos tradicionales: Microscopía.	36
1.11.2. Necesidad de seguir investigando con nuevas tecnologías. Técnicas moleculares.	38
1.12. Descripción del sistema MBR empleado en el estudio.	43
Objectives-Objetivos	49
Results-Resultados	53
Chapter 1 Linking operation parameters and environmental variables	55
Capítulo 1 to population dynamics of Mycolata in a membrane bioreactor.	
1. Introduction.	56
2. Materials and Methods.	58
2.1. Description of the full-scale MBR experimental plant and operating conditions.	58
2.2. Analysis of plant performance.	60
2.3. Activated sludge sampling for Mycolata-biodiversity.	60

2.4. DNA and RNA extraction.	60
2.5. PCR and RT-PCR amplification of partial Mycolata 16S-rRNA genes.	61
2.6. TGGE.	62
2.7. Analysis of TGGE fingerprints.	63
2.8. Reamplification and sequencing of isolated TGGE bands.	64
2.9. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses.	64
2.10. Statistics.	64
3. Results and Discussion.	66
3.1. Environmental variables in the MBR system.	66
3.2. Cluster analysis of gDNA- and cDNA-based TGGE fingerprints	67
3.3. Analysis of the diversity, structure and functional organization of the Mycolata community.	70
3.4. Phylogenetic analysis of total and active Mycolata populations.	73
3.5. Linking Mycolata community structure and population dynamics with operational parameters and environmental variables (BIO-ENV analysis).	77
3.5.1. <i>Linking operational parameters and environmental variables to changes of the descriptive indices of diversity R_r, H' and F_o.</i>	80
3.5.2. <i>Linking operational parameters and environmental variables to changes of the Mycolata community structure.</i>	80
4. Conclusions.	86
Chapter 2 The ratio of metabolically active versus total Mycolata	91
Capítulo 2 poblaciones triggers foaming in a membrane bioreactor.	
1. Introduction.	92
2. Materials and Methods.	94
2.1. Description of the full-scale MBR experimental plant, operating conditions, and summary of plant performance.	94
2.2. Activated sludge sampling for qPCR assays.	95
2.3. Nucleic acids extraction and purification.	96
2.4. Reverse transcription of RNA to cDNA.	96
2.5. qPCR assays.	96
2.6. Statistics.	98
3. Results and Discussion.	100
3.1. Absolute and relative quantifications of total and metabolically active Bacteria and Mycolata.	100
3.2. Linking the abundance of total and active Mycolata populations to changes of the environmental variables and operation factors in the MBR.	107
4. Conclusions.	113

Chapter 3	Estudio de la diversidad y dinámica de poblaciones de hongos en un biorreactor de membrana sumergida (MBR) mediante <i>fingerprinting</i> y pirosecuenciación 454: Influencia de las variables de operación y ambientales.	115
Capítulo 3	hongos en un biorreactor de membrana sumergida (MBR) mediante <i>fingerprinting</i> y pirosecuenciación 454: Influencia de las variables de operación y ambientales.	
1.	Introducción.	116
2.	Materiales y Métodos.	120
2.1.	Descripción de la planta experimental y condiciones de operación.	120
2.2.	Muestreo de fangos activos para el estudio de la diversidad de hongos mediante TGGE y pirosecuenciación.	121
2.3.	Extracción y purificación de los ácidos nucleicos.	121
2.4.	Amplificación de la región ITS2 y el gen 18S rRNA para el análisis <i>fingerprinting</i> mediante electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE).	121
2.5.	TGGE.	125
2.6.	Análisis de los patrones de bandas obtenidos por TGGE.	125
2.7.	Reamplificación y secuenciación del DNA de las bandas separadas mediante de TGGE.	126
2.8.	Análisis filogenético de las secuencias de DNA separadas mediante TGGE.	127
2.9.	Estudio de la diversidad fúngica mediante pirosecuenciación 454.	127
2.10.	Análisis bioinformático de los datos de pirosecuenciación.	128
2.11.	Análisis estadístico de los datos biológicos obtenidos.	131
3.	Resultados y Discusión.	133
3.1.	Análisis de clústeres de los perfiles de TGGE de la comunidad fúngica del MBR, generados a partir de amplicones de la región ITS2 y el gen 18S rRNA.	133
3.2.	Análisis de la diversidad, estructura y organización funcional de la comunidad de hongos mediante análisis teórico de los perfiles de TGGE.	138
3.3.	Análisis filogenético de las secuencias de DNA de la región ITS2 y el gen 18S rRNA obtenidas a partir de las bandas separadas mediante TGGE.	141
3.4.	Relación entre la estructura de la comunidad de hongos analizada mediante TGGE y las variables del sistema.	151
3.4.1.	<i>Relación de los índices de diversidad R_r, F_o y H' con las variables ambientales y parámetros operacionales.</i>	153
3.4.2.	<i>Relación de la abundancia relativa de las poblaciones totales y activas de hongos con las variables ambientales y operacionales del sistema (análisis BIO-ENV).</i>	155
3.5.	Estudio de la diversidad de las comunidades de hongos en el MBR con pirosecuenciación 454.	158
3.5.1	<i>Análisis de los parámetros e índices descriptivos de la diversidad de las comunidades de hongos en el MBR estudiadas mediante pirosecuenciación-454.</i>	159

3.5.2. <i>Diversidad de las poblaciones de hongos detectada en el MBR mediante pirosecuenciación 454.</i>	166
3.5.3. <i>Relación entre la dinámica de las poblaciones fúngicas detectadas mediante pirosecuenciación 454 y las variables del sistema MBR (análisis BIO-ENV).</i>	171
4. Conclusiones.	183
Chapter 4 Quantification of fungal populations in a full-scale membrane bioreactor and links to operational conditions and environmental variables.	185
Capítulo 4 membrana bioreactor and links to operational conditions and environmental variables.	
1. Introduction.	186
2. Materials and Methods.	188
2.1. Description of the full-scale MBR experimental plant, operating conditions, and summary of plant performance.	188
2.2. Activated sludge sampling for qPCR assays.	189
2.3. Nucleic acids extraction and purification.	189
2.4. qPCR assays.	189
2.5. Statistics.	192
3. Results and Discussion.	193
3.1. Absolute and relative quantifications of the abundance of fungi in the MBR.	193
3.2. Linking the abundance of fungi to the changes of environmental variables and operation factors in the MBR system.	198
4. Conclusions.	204
General Discussion-Discusión general	207
Conclusions-Conclusiones	217
Summary- Resumen	223
Index of Figures and Tables-Índice de Figuras y Tablas	271
Glossary-Glosario	277
References-Bibliografía	279

Introduction- Introducción

1.1. Problemática actual de las aguas residuales. Necesidad de tecnologías avanzadas de tratamiento.

Las técnicas de tratamiento biológico de las aguas residuales son muy antiguas y su uso se ha generalizado desde hace aproximadamente un siglo (Cooper, 2001). Los microorganismos son los responsables de las transformaciones de la materia orgánica, siendo la clave para el éxito de la depuración. De todos los procesos biológicos que se han desarrollado para el tratamiento de las aguas residuales, el sistema convencional de lodos o fangos activos (CAS) ha sido el más extendido, siendo patentado por Arden y Locket a principios del siglo XX (Arden y Locket, 1914).

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

A pesar de ser ampliamente utilizada a escala mundial, la tecnología CAS presenta una serie de restricciones: precisa de un sistema de decantación, que limita en ocasiones la eficacia del tratamiento (Bitton, 2010), a la vez que requiere grandes espacios para la implantación de la tecnología. Es preciso tener en cuenta también la gran generación de biomasa que acontece en los procesos CAS, pues ésta obliga a un purgado y tratamiento adicional de los fangos generados, lo que puede suponer hasta un 50% del total del coste del proceso (Defrance y Jaffrin, 1999). La eficiencia de eliminación de la materia orgánica en el CAS depende tanto de las condiciones de

operación del sistema como de la sedimentación de los sólidos, la cual depende a su vez de la concentración de biomasa en el reactor (Orantes *et al.*, 2006). El sistema CAS no es capaz de eliminar los nutrientes de N y P en los términos que exige la legislación para el vertido de las aguas tratadas en zonas sensibles (Directiva 271/91 de la UE y RD 509/1996) y el agua tratada no reúne la calidad necesaria para su reutilización directa, por lo que requiere de un tratamiento terciario adicional (Wang y Menon, 2009).

En las últimas décadas, ha ido surgiendo una gran inquietud por la reutilización de las aguas residuales tratadas, recurso hídrico muy necesario en zonas áridas o semiáridas del planeta (Bolzonella *et al.*, 2010). La tendencia hacia la reutilización de efluentes residuales tratados lleva obligatoriamente a establecer una serie de normas con la finalidad de proteger la salud pública y evitar daños al medio (WHO, 1989; USEPA, 1992), ello se traduce en la elaboración de normativas que establecen las condiciones básicas para la reutilización, precisando la calidad exigible a las aguas depuradas según los usos previstos. La legislación correspondiente en España (RD 1620/2007) no sólo exige una reducción en la concentración de materia orgánica y nutrientes, sino también la eliminación de microorganismos patógenos. Las restricciones establecidas por la legislación, unidas al rápido crecimiento industrial, la creciente urbanización y los cambios en las prácticas agrícolas, han conducido a la búsqueda de nuevas tecnologías de tratamiento de aguas residuales más eficientes que el sistema CAS.

1.2. Tecnologías avanzadas de tratamiento de las aguas residuales: biorreactores de membrana sumergida (MBRs).

Una de las tecnologías avanzadas de tratamiento de las aguas residuales más empleadas en la actualidad son los biorreactores de membrana sumergida (MBRs). Estos sistemas se desarrollaron a finales de la década de 1960 (Judd, 2011) y son una variación de la

tecnología CAS, donde la separación de sólidos se lleva a cabo sustituyendo la decantación por un proceso de filtración con membranas de microfiltración o ultrafiltración (Rosenberger *et al.*, 2002). Actualmente, los MBRs están bien establecidos, compitiendo activa y directamente con los CAS como tecnología de elección dado que ofrecen varias ventajas sobre los procesos convencionales (Judd, 2011, Le-Clech, 2010):

- Es un proceso compacto que permite reducir hasta un 75% el espacio requerido para la instalación, ya que prescinde de la decantación secundaria, y permite aplicar tiempos más cortos de retención hidráulica (HRT), con la consiguiente reducción de volumen del biorreactor (Xing *et al.*, 2000).
- Como consecuencia de la retención de biomasa en el biorreactor, es posible trabajar con tiempos de retención de sólidos (SRT) largos manteniendo una baja carga másica, lo que permite elevar la edad del fango y minimizar su producción como residuo sólido (Shimizu *et al.*, 1996; Witzig *et al.*, 2002).
- La retención de la biomasa proporciona mayor tolerancia a las variaciones de la composición del agua de entrada (Stamper *et al.*, 2003; Xing *et al.*, 2000).
- Los SRT largos y la tolerancia a los choques externos favorecen el desarrollo de las comunidades de microorganismos con tasas de crecimiento lento, tales como los oxidadores de amonio y nitrito (Bouhabila *et al.*, 1998, Witzig *et al.*, 2002).
- Se genera un efluente de alta calidad sanitaria, al lograrse la remoción total de los sólidos suspendidos y un índice elevado de eliminación de microorganismos y de contaminantes abióticos, lo que permite su reutilización directa (Gobel *et al.*, 2007; Ueda and Horan, 2000).

La tecnología MBR está destinada a mejorar las instalaciones de depuración de aguas residuales, evitando daños causados al medio por el vertido de este tipo de contaminantes, a la vez que permite obtener un efluente que cumpla los requisitos de calidades mínimas exigidos para su reutilización directa, según lo reflejado en el RD 1620/2007. Se trata pues de una tecnología destinada a la reducción de la contaminación, a la vez que permite obtener desde el agua residual un nuevo recurso hídrico con un amplio espectro de aplicación, mediante la inmovilización y transformación de los contaminantes antropogénicos. De este modo se contribuye a preservar la calidad de las aguas y del medio en general.

En los últimos años, la reducción de los costes, tanto de inversión como de operación, han incrementado las posibilidades de aplicación de los MBRs tanto al tratamiento de aguas residuales urbanas como a nivel de las industrias, las cuales generan a menudo efluentes altamente concentrados, y donde la disponibilidad de espacio es muy limitada. Así pues, el potencial de la aplicación de membranas en la etapa de separación de los reactores biológicos de tratamiento de agua residual es cada vez mayor (Orantes *et al.*, 2006).

En la actualidad, algunas de las principales líneas de investigación relacionadas con la aplicación óptima de los MBRs en el tratamiento de aguas residuales se han dirigido hacia la influencia de la concentración de sólidos del fango sobre las actividades biológicas en el biorreactor y la transferencia de oxígeno, la posibilidad de reducir la generación de lodos y eliminar la necesidad de su tratamiento posterior, el control de los procesos de formación de espumas (*foaming*), y el control del ensuciamiento biológico por formación de biopelículas sobre las membranas (*biofouling*) (Chen y LaPara, 2006; Guo y Zhang, 2012; He *et al.*, 2006; Kim y Jang,

2006; LaPara *et al.*, 2001; LaPara *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2009; Molina-Muñoz *et al.*, 2007, 2009, 2010; Rosenberger *et al.*, 2002; Sombatsompop y Visvanathan, 2006). También son numerosos los estudios realizados en la última década centrados en el estudio de la estructura de las comunidades microbianas y los factores que influyen sobre la misma en los MBRs, puesto que la retención de biomasa por medio de las membranas modifica significativamente la biología del sistema de tratamiento en comparación con los CAS (Calderón *et al.*, 2012; Gómez-Silván *et al.*, 2014a, 2014b; Miura *et al.*, 2007; Molina-Muñoz *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2012). Aunque en los fangos activos conviven poblaciones de bacterias, arqueas, virus, hongos, protozoos ciliados y algunos metazoos (Bitton, 2010), la mayoría de los estudios sobre la diversidad biológica en los MBRs se ha centrado en exclusiva en las comunidades bacterianas.

1.3. Formación de espumas (*foaming*) en los tratamientos de agua residual: problemática y causas.

La formación de espumas de origen biológico que interferían con la operación normal en instalaciones de tratamiento de aguas residuales fue descrita por primera vez en 1969 (Anonymous, 1969). En este estudio se describe el llamado “misterio de Milwaukee”, por ser esta la localidad donde se observaron por primera vez estas espumas. Actualmente, la formación de espumas en las plantas se considera un problema muy extendido, siendo descrito en numerosos países como Alemania y Suiza (Lemmer y Kroppenstedt, 1984), Arabia Saudita (Goddard y Forster, 1987), Australia (Seviour *et al.*, 1990, 1994; Blackall *et al.*, 1991), Austria (Franz y Matsche, 1994), Dinamarca (Wanner, 1994), Estados Unidos (Richard, 1989), Francia (Pujol *et al.*, 1991), Italia (Rossetti *et al.*, 1994), Japón (Hiraoka y Tsumura, 1984; Mori *et al.*, 1992), Países Bajos

(Eikelboom *et al.*, 1997), Reino Unido (Goddard y Forster, 1986), República Checa (Wanner *et al.*, 1998), Sudáfrica (Blackbeard *et al.*, 1986) y Suecia (Holmstrom *et al.*, 1996).

Aunque los problemas de generación de espumas biológicas fueron inicialmente asociados a los sistemas CAS, este fenómeno ha sido también observado en sistemas de tratamiento avanzado, como es el caso de los MBR (Di Bella *et al.*, 2011; Di Bella y Torregrossa, 2013; Nakajima y Mishima, 2005). En los MBRs, los inconvenientes causados por este fenómeno están relacionados principalmente con la estabilidad del sistema, siendo documentados los siguientes problemas operativos en depuración (Di Bella y Torregrossa, 2013; Insel *et al.*, 2014; Machnicka *et al.*, 2009):

- Pérdida del control del SRT, lo que significa que se pierden gran cantidad de sólidos desde la biomasa activa. Las espumas pueden retener más del 40% de los sólidos en suspensión, reduciendo el volumen útil del reactor.
- Mal funcionamiento de los electrodos que miden el oxígeno disuelto del sistema, produciendo fallos técnicos de los equipos.
- Disminución del oxígeno transferido a la superficie de los tanques aireados mecánicamente.
- Situaciones de riesgo sanitario y ambiental por el transporte y la posible la dispersión de patógenos desde la espuma.
- Generación de malos olores, necesitando un servicio de limpieza adicional.

Desde los años 70, se han desarrollado numerosos estudios centrados en la identificación de las causas de la formación de espumas en los tratamientos del agua residual y su posible prevención. Desde el principio, se relacionó el fenómeno con la

proliferación de microorganismos filamentosos. En los primeros trabajos, el examen microscópico de las espumas indicó que el principal tipo de microorganismos presentes en las mismas eran actinomicetos identificados como miembros del género *Nocardia*, concretamente *N. amarae* y *N. rhodochrous* (Lechevalier y Lechevalier, 1974), y por ello a estas espumas se las empezó a conocer como “*Nocardia* foams” o “espumas de *Nocardia*” (Jenkins *et al.*, 1993). Sin embargo, en la actualidad este término no resulta correcto, debido a que en los últimos años se ha producido un importante avance en este campo, que ha permitido determinar la implicación de otros muchos géneros y especies bacterianas en este problema operacional (ver sección 1.5). Adicionalmente, muchas de las especies de *Nocardia* descritas inicialmente en relación con la formación de espumas han sido posteriormente reclasificadas taxonómicamente. Por ejemplo, las primeras bacterias filamentosas identificadas como causantes de formación de espumas, *Nocardia amarae* y *N. rhodochrous*, han sido reclasificadas respectivamente como *Gordonia amarae* (Goodfellow *et al.*, 1994) y *Rhodococcus rhodochrous* (de los Reyes, 2010b).

1.4. Función de los microorganismos filamentosos: importancia de la biofloculación.

En los sistemas de tratamiento del agua residual, las células microbianas tienden a formar agregados junto con otras partículas orgánicas e inorgánicas, en los que el componente mayoritario son las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) producidas por los propios microorganismos (Wilen *et al.*, 2008). Estos agregados celulares, denominados flóculos, son de características muy variables y su tamaño oscila ampliamente, entre 10 y 300 μm (Biggs y Lant, 2002). La biofloculación es un proceso de crucial importancia en la separación sólido-líquido que se precisa a lo largo del

proceso convencional de tratamiento de aguas residuales. En los sistemas anaeróbicos y en algunos sistemas aireados operados bajo determinadas condiciones, los flóculos pueden evolucionar hacia otro tipo de agregados más compactos, semejantes a biopelículas en suspensión, denominados gránulos (Angenent *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2007). En los agregados celulares se establecen microgradientes ubicuos de los sustratos, tanto de las moléculas empleadas como fuente de nutrientes y energía, como de los compuestos que actúan como aceptores de electrones (Martins *et al.*, 2004).

Los flóculos del fango activo tiene estructuras muy heterogéneas y morfología muy variable, aunque se han propuesto varios modelos estructurales, que en general describen el flóculo como una nube de macromoléculas orgánicas y células fundamentalmente bacterianas, que se unen mediante interacciones débiles a un esqueleto más rígido, constituido por los microorganismos filamentosos (Wilén *et al.*, 2008). El crecimiento unidireccional proporciona a los microorganismos filamentosos ventajas competitivas a la hora de captar los sustratos, puesto que los filamentos atraviesan completamente la estructura del flóculo y se proyectan hacia el exterior (Martins *et al.*, 2004). Los microorganismos filamentosos actúan por lo tanto como soporte para el desarrollo de las estructuras floculares. La estabilidad y características de los flóculos dependen, entre otros factores, de la abundancia relativa de estas formas filamentosas (Wilén *et al.*, 2008).

A pesar del importante papel de los microorganismos filamentosos en la estructuración de los flóculos, como ya se ha comentado en el apartado 1.3, el excesivo desarrollo de estos microorganismos es responsable de la generación de espumas biológicas o *foaming*, y la flotación de fangos o *bulking*, dos problemas clásicos de los sistemas de fangos activos (Jenkins *et al.*, 1993; Seka *et al.*, 2001). Los flóculos con alto

contenido en filamentos son de mayor tamaño y tienen menor tendencia a sedimentar (Kim y Jang, 2006; Meng *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2003). Estos problemas se acentúan en los sistemas con alternancia de fases aireadas y anóxicas, diseñados para mejorar la eficiencia de la eliminación de compuestos de nitrógeno (Ekama y Wentzel, 1999).

Por el contrario, cuando no existen microorganismos filamentosos o están presentes en bajo número se forman los llamados flóculos en alfiler (*pin flocs*) que son de pequeño tamaño y de consistencia débil por lo que son disgregados por el sistema de aireación. Este tipo de flóculos no sedimentan bien, por lo que se producirá un sobrenadante turbio con sólidos en suspensión. Adicionalmente, en los sistemas de tipo MBR los flóculos en alfiler causan severos problemas de *biofouling* (Meng *et al.*, 2006).

1.5. Diversidad de bacterias filamentosas en los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

El estudio de la diversidad de los microorganismos filamentosos en los tratamientos de aguas residuales se ha basado tradicionalmente en procedimientos microscópicos. Mediante esta metodología, se han catalogado hasta la actualidad más de 30 morfotipos filamentosos (Eikelboom, 2000; Eikelboom, 2006), si bien no es posible identificar los filamentos de modo fiable solamente por sus características morfológicas. Por ello, el desarrollo y aplicación de los métodos independientes de cultivo ha permitido un importante avance en este campo, posibilitando una mejor comprensión de la identidad y fisiología de estos microorganismos (Nielsen *et al.*, 2009).

Los trabajos realizados en las últimas dos décadas concluyen que las bacterias filamentosas presentes en los sistemas de tratamiento de agua residual son evolutivamente diversas, habiéndose identificado hasta la fecha miembros afiliados a

siete Phyla diferentes: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Plantomycetes*, *Proteobacteria* (subclases *Alfa-* *Beta-* y *Gamma-*), y candidatos al nuevo Phylum TM7 (Nielsen *et al.*, 2009). Las especies de bacterias filamentosas que causan principalmente los problemas de formación de espumas biológicas en los sistemas de tratamiento de aguas residuales pertenecen a la clase *Actinobacteria*, y en concreto al orden *Corynebacteriales* según la propuesta de clasificación más reciente del Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática (Goodfellow y Jones, 2012). Se trata de bacterias cuya pared celular se caracteriza por un alto contenido en ácidos micólicos, por lo que reciben la denominación de "Mycolata" (Chun *et al.*, 1996). Entre las Mycolata se incluyen las especies de los géneros *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Millisia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Segniliparus*, *Skermania*, *Smaragdicoccus*, *Tomitella*, *Tsukamurella* y *Williamsia* (Goodfellow y Jones, 2012).

Hoy en día, el término "*Nocardia* foams" se emplea de manera restringida, para hacer referencia a los problemas de formación de espumas producidos por Mycolata, pero no para discutir la identidad de los microorganismos que ocasionan dichas espumas. *Gordonia amarae* es la especie de bacterias filamentosas cuya presencia es más común en fangos activos de EEUU y la mayoría de espumas biológicas parecen estar producidas por esta especie (Jenkins *et al.*, 1993), aunque recientes estudios realizados en plantas de tratamiento de otros países sugieren que la situación es más compleja (de los Reyes, 2010b).

Además de las Mycolata, también es frecuente encontrar asociadas a las formación de espumas y flotación de fangos otras actinobacterias (*Candidatus* "Microthrix"), Gammaproteobacterias oxidadoras de compuestos de azufre evolutivamente relacionadas con el género *Thiothrix*, y algunos organismos

recientemente descritos afiliados a las Alfaproteobacterias (Nielsen *et al.*, 2009). Muchos de estos microorganismos no están bien caracterizados ni clasificados, pues no han sido aislados en cultivo puro (Nielsen *et al.*, 2009).

1.6. Mecanismos de formación de las espumas biológicas.

Numerosas teorías han sido propuestas para intentar explicar el fenómeno de la formación de las espumas biológicas, que implica el enriquecimiento selectivo de los microorganismos filamentosos en el fango activo resultando de la combinación de elementos relacionados con la flotación y mecanismos para estabilizar la espuma producida (Jenkins *et al.*, 2004; Soddell y Seviour, 1990; Soddell y Seviour, 1997). Los agregados de microorganismos filamentosos se unen con las burbujas de aire y las partículas del flóculo, formando espumas estables y viscosas en la superficie de los tanques (Madoni *et al.*, 2000). Este proceso conduce a la separación de la masa de fango hacia la superficie, dando lugar a un ecosistema que tiende a evolucionar de forma diferente al resto, con características fisicoquímicas distintas.

Soddell y Seviour (1990) y Jenkins *et al.* (1993) describieron los fundamentos de este mecanismo de flotación. Los filamentos se adhieren a la superficie de las partículas sólidas en suspensión, volviéndolas hidrofóbicas. Estas partículas deben ser pequeñas (menores de 300 μm) para que puedan ser levantadas por flotabilidad mediante las burbujas (Soddell y Seviour, 1990). En sistemas de fangos activos, la hidrofobicidad de los filamentos causa la flotación de los flóculos, y los surfactantes, cuya presencia es común en las aguas residuales, contribuyen a la formación de una espuma estable. Por lo tanto, para la formación de una espuma biológica estable, se necesita la combinación de tres componentes: burbujas de aire, partículas hidrofóbicas (bacterias filamentosas) y surfactantes.

1.6.1. Burbujas de aire.

La estructura de la espuma consiste en una densa matriz de organismos filamentosos intercalados con burbujas de aire, estando a su vez rodeados por una capa compuesta de material celular y extracelular. El sistema de aireación es el principal responsable de la formación de burbujas. Además, el tamaño de las burbujas de aire mantiene una relación con la formación de espuma. Las burbujas pequeñas provocan más espuma que las gruesas, ya que el incremento del tamaño de la burbuja disminuye la capacidad de los organismos de enriquecerse en la interfase líquido-gas (de los Reyes, 2010b). En el fango activo también se encuentran otros gases (CO_2 , N_2 y H_2S), resultado del metabolismo de los microorganismos. Pero su contribución en la formación de burbujas es mínima comparada con el sistema de aireación (de los Reyes, 2010b).

1.6.2. Partículas hidrofóbicas.

Cuando se compara la hidrofobicidad del fango activo en sistemas de tratamiento con y sin problemas de formación de espumas, se observa claramente una correlación entre una mayor hidrofobicidad y la generación de las espumas (de los Reyes, 2010b). Los microorganismos filamentosos productores de espumas se caracterizan por el alto contenido lipídico de su pared celular, especialmente de los ácidos grasos específicos llamados ácidos micólicos, que proporcionan hidrofobicidad a la pared celular bacteriana. Estos ácidos micólicos se unen covalentemente a los azúcares de la pared celular, creando una superficie celular cerosa (Stratton *et al.*, 1997). El incremento de la longitud de cadena de los ácidos micólicos causa paralelamente un aumento de la hidrofobicidad, aunque este efecto es reducido por la influencia opuesta de otros componentes de la superficie celular (por ejemplo lipoglucopéptidos, lipopolisacáridos, exopolisacáridos con débil hidrofobicidad, lipopeptidos). Además, el nivel de

hidrofobicidad varía según la especie, edad del cultivo, temperatura de crecimiento y fuente de carbono (Sokolovská *et al.*, 2003).

1.6.3. Tensioactivos.

En las Mycolata, los mismos ácidos micólicos que le confieren hidrofobicidad a la superficie celular son también biosurfactantes (tensioactivos). Estas sustancias presentan una estructura polar-apolar que proporciona a las células la tendencia a concentrarse en la superficie de la interfase líquido-gas formando una capa estable y reduciendo la tensión superficial. Estas propiedades se deben al carácter dual de sus moléculas (grupo hidrófobo e hidrófilo). El grupo hidrófobo es el que causa una distorsión de la estructura del líquido debido a su insolubilidad, incrementando la energía libre del sistema. El grupo hidrófilo ejerce un efecto solubilizante contrarrestando la tendencia del otro, impidiendo que el tensioactivo sea completamente expulsado del solvente. Numerosos estudios realizados en muestras de fango activo han encontrado una relación entre la tensión superficial y la formación de espuma. Los sistemas con problemas de formación de espumas tienen menor tensión superficial debido a la mayor presencia de tensioactivos (de los Reyes, 2010b).

1.7. Factores que afectan al crecimiento de los microorganismos formadores de espumas.

1.7.1. Requisitos nutricionales.

El grupo de Mycolata puede utilizar una amplia variedad de sustratos como fuentes de C y energía, incluyendo compuestos fácilmente degradables como azúcares y ácidos grasos de cadena corta, compuestos de lenta degradación como polisacáridos de elevado peso molecular y compuestos aromáticos incluyendo los pesticidas. Especies de los géneros *Dietzia*, *Gordonia*, *Millisia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, y *Tsukamurella*

metabolizan una amplia variedad de hidrocarburos, lípidos complejos, esteroides, fenoles, ácidos carboxílicos aromáticos, compuestos aromáticos clorados, dinitiles, colorantes de trifenilmetano y otros xenobióticos. Estos datos ponen de manifiesto la gran versatilidad metabólica de Mycolata, siendo una potente ventaja frente otras bacterias en fangos activos (de los Reyes, 2010b).

Estudios realizados *in situ* muestran que *Candidatus* "Microthrix parvicella" no utiliza fuentes de carbono simples, pero sí compuestos más complejos como ácidos grasos de cadena larga (de los Reyes, 2010b). Al ser mayor la competencia por sustancias fácilmente biodegradables, *Candidatus* "M. parvicella" puede haber adquirido una ventaja competitiva usando compuestos más complejos (Rossetti *et al.*, 2005).

1.7.2. Oxígeno.

Tradicionalmente se ha pensado que las Mycolata eran bacterias aerobias obligadas. Sin embargo, recientes estudios han mostrado que la captación de sustratos la realizan bajo condiciones aerobias y anaerobias (de los Reyes, 2010b). La competencia por sustancias fácilmente biodegradables es más intensa en fangos activos, por lo tanto estos microorganismos han adquirido una posible ventaja competitiva adaptándose a diferentes condiciones de oxígeno (Rossetti *et al.*, 2005).

1.7.3. Temperatura.

El papel de la temperatura sobre el crecimiento de los microorganismos filamentosos en la plantas de tratamiento de aguas residuales ha sido ampliamente investigado. *Gordonia amarae* ha sido relacionada con episodios de espuma desarrollados durante los meses más cálidos (final de primavera y verano). Numerosos estudios han determinado que el crecimiento óptimo de *G. amarae* se encuentra en el rango de 23 a

37 °C (Asvapathanagul *et al.*, 2012; de los Reyes y Raskin, 2002). Por el contrario, los episodios de espuma desarrollados a temperaturas más bajas han sido relacionadas con Mycolata diferentes a *Gordonia* (de los Reyes, 2010b). Las especies de Mycolata descritas que pueden crecer a temperaturas inferiores de 5 °C están evolutivamente relacionadas con el género *Rhodococcus* (Soddell y Seviour, 1995).

1.7.4. pH.

El pH del fango activo influye en el crecimiento de las Mycolata, siendo el pH óptimo entre 6 y 8. No obstante, la tolerancia a este parámetro varía ampliamente entre las distintas especies de estos organismos. Bacterias de los géneros *Gordonia*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella* han sido descritas por crecer a pH 10 y las especies *G. terrae* y *R. erythropolis* pueden crecer a pH 4 (de los Reyes, 2010b).

1.7.5. SRT.

Debido a los largos tiempos de duplicación de las células de Mycolata, el incremento del SRT ha sido descrito como un parámetro que puede favorecer su crecimiento. El proceso de formación de espumas en fangos activos ha sido observado frecuentemente cuando el SRT > 9 días (de los Reyes, 2010b). Sin embargo, varios estudios no han encontrado una relación clara entre este parámetro y la formación de espumas (Asvapathanagul *et al.*, 2012).

1.8. Estrategias K-r de los microorganismos filamentosos.

Los organismos filamentosos formadores de espuma son de lento crecimiento en comparación con otras muchas bacterias en los sistemas de fango activo. En estos ambientes donde la competencia es altísima, no se entiende completamente cómo es habitual encontrar elevadas masas de filamentos en la espuma.

Lemmer (1986) propuso una teoría basada en la cinética enzimática para explicar el crecimiento de estos microorganismos. Según esta hipótesis, estos microorganismos crecen lentamente utilizando principalmente sustratos complejos de lenta degradación. De esta forma ocuparían un nicho ecológico no disponible para otras muchas poblaciones, estableciéndose una comunidad sólida sin interferir con la operación normal de la planta de tratamiento (Soddell y Seviour, 1990). Estos microorganismos tienen la capacidad de crecer competitivamente a bajas concentraciones de sustrato gracias a su alta eficiencia de absorción del mismo, consolidándose como estrategias tipo K. Sin embargo, cuando en el medio están disponibles altas concentraciones de sustratos fácilmente biodegradables, estas poblaciones podrían cambiar a estrategias tipo r. Ello implicaría el desarrollo de altas tasas de crecimiento debido a las altas concentraciones de sustrato disponible. En otras palabras, Lemmer postula que las Mycolata tienen la capacidad de cambiar entre las estrategias tipo K y r. Sin embargo, la validez de esta teoría ha sido cuestionada con posterioridad, debido principalmente a la incorrecta identificación de géneros y especies de Mycolata (de los Reyes, 2010b).

1.9. Métodos de control de la formación de espumas.

Debido a la gran diversidad de microorganismos filamentosos y no filamentosos encontrados en las espumas, actualmente no existe un método de control general para este problema. En este contexto, la complejidad del problema ha generado un escepticismo considerable hacia los métodos de control (de los Reyes, 2010b).

Entre los métodos de control más empleados se encuentra la **manipulación del SRT**. Como ya se indicó en el apartado 1.7.5., los SRT elevados favorecen el crecimiento de estos microorganismos, por lo que una reducción del SRT podría reducir su proliferación. Sin embargo, esta medida no resulta totalmente eficaz debido a la gran

diversidad de especies de Mycolata existentes, con la consiguiente elevada variabilidad de la tasa de crecimiento de estos microorganismos (de los Reyes, 2010b).

Otra estrategia de control ampliamente utilizada es el **uso de productos químicos** (cloro, coagulantes, enzimas comerciales). En general, la pulverización con estos productos puede ser útil contra espumas ligeras, pero es ineficaz contra espumas estables y viscosas. Además el uso de estos productos causa el deterioro de la calidad del efluente y la dispersión de los flóculos, sin eliminar los microorganismos productores de espuma (de los Reyes, 2010b).

Es posible eliminar también las espumas biológicas por métodos físicos, entre los que se encuentra la **eliminación mecánica** de la capa superficial del fango activo donde se concentra la espuma. Para este tipo de control es necesaria la utilización de bombas y tuberías especialmente diseñadas para la eliminación de la espuma, ya que deben tener en cuenta la mayor viscosidad de ésta en comparación con el fango activo. Además, debido a que los filamentos no viables también pueden causar la formación de espumas, se debe evitar cualquier tipo de recirculación en el sistema. Por lo tanto, este método no es eficaz al no eliminar completamente las células filamentosas (de los Reyes, 2010b).

1.10. Diversidad y funciones de los hongos en los tratamientos del agua residual.

La presencia de hongos en el tratamiento del agua residual se ha considerado tradicionalmente de poca relevancia, debido a que no son numéricamente abundantes excepto en el caso de tratamientos de agua residual industrial, en los que características del agua como el pH ácido, la escasez de compuestos de N, o la presencia de determinadas sustancias tóxicas favorecen su desarrollo respecto al de la bacterias (Evans y Seviour, 2011; Zheng *et al.*, 2011).

La diversidad de los hongos y los papeles que éstos desempeñan en los tratamientos de agua residual están todavía poco explorados. No obstante, varios estudios realizados fundamentalmente en plantas basadas en el proceso CAS demuestran que estos microorganismos eucariotas cumplen funciones importantes en la conversión de la biomasa y en el proceso de depuración en general (Evans y Seviour, 2011; Weber *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011). Además, hasta hace relativamente poco tiempo el conocimiento de la diversidad y funciones de los hongos en tratamientos de agua residual se ha basado fundamentalmente en estudios dependientes de cultivo (Evans y Seviour, 2011). Los estudios actualmente disponibles demuestran que los hongos están presentes en estos sistemas y que su diversidad es amplia (Evans y Seviour, 2011; Evans *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011). También está documentado que la proliferación excesiva de los hongos en las plantas de tratamiento puede generar problemas operacionales (Baker y Dudley, 1998; Richard, 2003; Weber *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2011). Todos estos aspectos se tratan con más detalle en la Introducción del Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral.

1.11. Técnicas de estudio de las comunidades microbianas filamentosas.

1.11.1. Métodos tradicionales: Microscopía.

Como se comentó en el apartado 1.5, los primeros estudios de las comunidades microbianas causantes de la generación de espumas en sistemas de fangos activos se basaron en el examen microscópico. En la década de 1970, Farquhar y Boyle (1971) desarrollaron una clave de identificación basada en pruebas morfológicas y fisiológicas. A mediados de la década de 1970, Eikelboom (1975, 1977) desarrolló un método más útil y práctico para la identificación de los filamentos. Esta clave de identificación utilizó características morfológicas y sencillas reacciones de tinción, clasificando

inicialmente los organismos filamentosos de fangos activos en 26 morfotipos. Debido a que este método no se basa en la filogenia o taxonomía, un gran número de filamentos se identificaban simplemente mediante un número tipo y carecían de nombres taxonómicamente válidos. A pesar de ello, las claves de clasificación e identificación de Eikelboom fueron ampliamente generalizadas, estableciéndose correlaciones entre las morfotipos de filamentos dominantes y las condiciones de operación de las plantas, lo que condujo a la propuesta de una serie de "soluciones" operacionales para los problemas de flotación de fangos y formación de espumas (Richard, 2003). Desafortunadamente, estas claves de identificación tienen numerosas limitaciones. Para un mismo microorganismo, la morfología y características de tinción pueden variar dependiendo de las condiciones ambientales (Foot *et al.*, 1992; Wagner *et al.*, 1994a). En algunos casos, la clave de identificación de Eikelboom no distingue entre los diferentes géneros y especies de actinomicetos, causando graves limitaciones ya que son los filamentos más numerosos en las espumas. Así, a todos los microorganismos filamentosos Gram positivos ramificados se les denominó *Nocardia amarae-like organisms* (NALO), (Soddell *et al.*, 1992), posteriormente GALO tras la reclasificación de *N. amarae* como *Gordonia amarae*. Sin duda, el uso de este término por muchos operarios de las plantas ha contribuido a simplificar la concepción de la diversidad de actinomicetos generadores de la espuma, además de haber ocultado la complejidad de las causas y soluciones de este fenómeno (Sodell *et al.*, 1997). Estas limitaciones se ejemplifican por la similar morfología y reacciones de tinción de *G. amarae* y *Rhodococcus* spp. (Soddell y Seviour, 1990). En otros casos, hay diferencias morfológicas que no siempre son observadas (Awong *et al.*, 1985; Jenkins, 1992), por ejemplo, los filamentos ramificados en forma de hojas de pino, *pine-tree-like organisms*

(PTLOs) correspondientes a *Nocardia pinensis*, ahora reclasificada como *Skermania pinensis* (Blackall *et al.*, 1989; Chun *et al.*, 1997).

1.11.2. Necesidad de seguir investigando con nuevas tecnologías. Técnicas moleculares.

Como se ha comentado en el apartado anterior, los tradicionales métodos de estudio de las bacterias filamentosas basados en microscopía presentan una serie de limitaciones y no resultan útiles para la correcta identificación de estos microorganismos. El desarrollo de las técnicas moleculares a partir de los años 90 del siglo XX ha sido esencial para mejorar su identificación y caracterización (Nielsen *et al.*, 2009). Numerosos estudios realizados en las últimas décadas se han basado en técnicas de hibridación *in situ* mediante fluorescencia (FISH). En la actualidad existe un amplio rango de sondas de FISH que han sido diseñadas con el objetivo de identificar los microorganismos más importantes en las espumas de los fangos activos, proporcionando una información sustancial sobre la ecología y diversidad de los filamentos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Nielsen *et al.*, 2009). No obstante, esta técnica presenta una serie de limitaciones. Por ejemplo, en las Mycolata, debido al alto contenido en ácidos micólicos se dificulta enormemente la permeabilización de la célula, además de que las sondas hasta ahora disponibles tienen una baja especificidad para la identificación a nivel de género y especie (de los Reyes y Raskin, 2002; Nielsen *et al.*, 2009).

En los últimos años, el desarrollo de técnicas de biología molecular basadas en la amplificación mediante PCR de los genes codificantes del rRNA ha supuesto una exitosa alternativa para la caracterización de estas comunidades. Algunos ejemplos de estos métodos se describen a continuación.

Los métodos de *fingerprinting* como la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizantes (DGGE) o de temperatura (TGGE) permiten el estudio de la estructura y dinámica de las comunidades de microorganismos filamentosos. Esta técnica permite la separación de fragmentos de DNA bicatenarios de igual tamaño dependiendo de la composición en bases de los mismos, lo que equivale a decir que separa fragmentos de DNA de igual tamaño pero de distinta secuencia. Los fragmentos de DNA se someten a la electroforesis bajo un gradiente creciente de desnaturalizantes químicos (DGGE) o de temperatura (TGGE), de modo que se desnaturalizan parcialmente en dominios discretos, creando moléculas de movilidad electroforética reducida (Muyzer *et al.*, 1999). Este comportamiento es variable, en función del contenido en G+C de las secuencias y por la existencia de regiones ricas en GC posicionadas en determinadas secciones a lo largo de las mismas. La electroforesis bajo gradiente lineal de temperatura se realiza en geles de poliacrilamida, y las moléculas con distinta secuencia se detienen progresivamente a diferentes alturas en el gel (Muyzer y Smalla, 1998; Muyzer, 1999). El método es tan sensible que permite separar secuencias que difieran en un único par de bases.

La técnica TGGE permite investigar la estructura de comunidades microbianas complejas, sin necesidad de aislar y estudiar individualmente sus componentes. Generalmente se basa en la amplificación por PCR y posterior separación de fragmentos del gen codificante del rRNA de la subunidad pequeña ribosomal de los integrantes de la comunidad objeto de estudio. Es una técnica de elección para la caracterización de comunidades microbianas en ecosistemas reales, en las que un porcentaje muy elevado de los microorganismos presentes pueden ser no cultivables. La técnica presenta gran versatilidad y admite numerosas variantes en su aplicación. Es posible el estudio de

grupos concretos de microorganismos mediante el diseño de cebadores específicos para amplificar el gen codificante del rRNA 16S/18S de un determinado grupo filogenético microbiano. La técnica TGGE se puede aplicar tanto a la separación de fragmentos específicos de DNA, obtenidos mediante PCR a partir del DNA total de una muestra (PCR-TGGE), como a fragmentos de cDNA obtenidos mediante retrotranscripción seguida de PCR, a partir del RNA total de una muestra (RT-PCR-TGGE). Mediante PCR-TGGE, se obtiene información sobre la presencia de poblaciones en una comunidad, mientras que la RT-PCR-TGGE permite un análisis más sensible de la fracción activa de una comunidad bacteriana, permitiendo detectar eventos transitorios pero ecológicamente relevantes, previsibles en entornos como los tratamientos del agua residual, donde existe una intensa dinámica de las poblaciones (Milner *et al.*, 2008).

La secuenciación de nueva generación (NGS) se ha instalado en los últimos años como una herramienta de gran poder para el estudio de las comunidades microbianas complejas en los ecosistemas naturales. La mayor ventaja de este tipo de técnicas es la capacidad de obtener una cantidad enorme de secuencias de DNA a partir de una sola muestra ambiental y sin necesidad de una inversión económica importante. Estas nuevas tecnologías permiten una lectura rápida y eficiente de miles de secuencias de DNA, siendo el coste inferior al de la tradicional secuenciación de Sanger. Existen actualmente diversas plataformas de secuenciación masiva, cuyo rendimiento, características y coste son muy variables (Metzker, 2010; Nguyen *et al.*, 2014). Entre las plataformas actualmente disponibles, las más empleadas son la pirosecuenciación 454 y la plataforma Illumina.

Pirosecuenciación o Secuenciación 454: Es una técnica de secuenciación masiva en paralelo de DNA, desarrollada a finales de la década de 1990 (Clarke, 2005; Ronaghi *et*

al., 1996,1998; Ronaghi y Elahi, 2002). Esta técnica se basa en la secuenciación por síntesis, que mide por quimioluminiscencia el pirofosfato inorgánico (PPi) liberado tras la adición de cada nucleótido a la cadena complementaria por la DNA polimerasa, lo que permite una rápida determinación de las secuencias en tiempo real. Para la síntesis de las cadenas complementarias de DNA se utilizan como molde moléculas de DNA de cadena simple, previamente amplificadas de manera individualizada pero simultánea mediante PCR en emulsión (emPCR). Para ello, en primer lugar los fragmentos de DNA a secuenciar se ligan en ambos extremos con adaptadores específicos, denominados genéricamente A y B. El adaptador A permite la inmovilización de cada uno de los fragmentos de DNA sobre una perla o esfera de sefarosa recubierta de oligonucleótidos con su secuencia complementaria. Seguidamente, las perlas con los fragmentos de DNA se emulsionan con los reactivos de amplificación en una micela de agua y aceite, al objeto de amplificar clonalmente los fragmentos de DNA, que finalmente se secuencian con ayuda de cebadores complementarios al adaptador B.

Illumina: Esta técnica, formalmente conocida como Solexa, fue introducida en el mercado en 2007. Al igual que la pirosecuenciación 454, se basa en la secuenciación por síntesis. Se emplean nucleótidos marcados con diferentes fluorocromos terminadores, que se eliminan mediante un reactivo químico en cada ciclo para permitir que la síntesis de la cadena complementaria de DNA continúe. En Illumina, también se utiliza como molde un DNA de cadena simple, sin embargo, para la amplificación clonal de los fragmentos a secuenciar se utiliza la denominada amplificación en puente. Para ello, los fragmentos son ligados por los extremos a dos adaptadores A y B y son dispuestos sobre una "celda de flujo" que contiene en su superficie una mezcla de adaptadores, uno de los cuales es idéntico al adaptador A, y el otro es de secuencia

complementaria al adaptador B, permitiendo así la unión de los fragmentos de DNA a la celda de flujo por un extremo. Una vez hibridados los fragmentos con sus adaptadores complementarios, los cuales actuaran como cebadores, se lleva a cabo la amplificación mediante PCR de tipo puente para obtener la biblioteca de fragmentos clonados.

Aunque la técnica TGGE y la secuenciación masiva en paralelo permiten un estudio detallado de las poblaciones dominantes en una comunidad microbiana compleja, no son técnicas cuantitativas, por lo cual para el estudio en profundidad de la estructura y dinámica de comunidades complejas es deseable compaginarlas con otras técnicas que permitan la cuantificación de la abundancia de grupos microbianos de interés.

La **qPCR o PCR en tiempo real** permite cuantificar la abundancia de poblaciones totales y activas presentes en los tratamientos del agua residual, ofreciendo la posibilidad de monitorizar la dinámica de estas poblaciones con el fin de detectar y prevenir cambios no deseables para el tratamiento biológico (Schäfer, 2003). Constituye una técnica molecular ampliamente utilizada en los estudios de ecología microbiana (Smith y Osborn, 2009). Esta técnica emplea sondas fluorescentes (Ej. TaqMan) o fluorocromos con afinidad por el DNA bicatenario (Ej. SYBR green I), los cuales emiten una señal de fluorescencia en tiempo real que es proporcional al número de copias obtenido en cada ciclo de amplificación de PCR (Smith y Osborn, 2009; Zhang y Fang, 2006). Presenta una gran especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y permite un rápido análisis de cuantificación absoluta de la abundancia de los microorganismos diana (Valones *et al.*, 2009).

1.12. Descripción del sistema MBR empleado en el estudio.

En este proyecto, se propone la continuación de los estudios iniciados anteriormente sobre un MBR a escala real (Gómez-Silván *et al.*, 2013, 2014a, 2014b). El MBR tiene una capacidad total de 40 m³ y es capaz de tratar el agua residual urbana generada por una población de 200-250 habitantes equivalentes, siendo alimentado con agua residual cruda y trabajando bajo condiciones reales de operación. Estas condiciones de trabajo permiten que los resultados obtenidos en el sistema experimental sean válidos, aplicables y extrapolables a plantas de mayor escala, ya que todas las piezas, materiales, sistemas de control, modo de operación y hasta la influencia de las variaciones de factores no controlables como pueden ser la temperatura o características del influente son idénticos. Se trata de un sistema previamente puesto a punto y optimizado para la obtención de un efluente de calidad óptima (Gómez-Silván, 2012).

La planta experimental MBR se ubica en la EDAR Sur (Churriana, Granada), gestionada por la empresa EMASAGRA. El sistema ha sido diseñado, controlado y monitorizado por investigadores del grupo de investigación “Tecnologías para la Gestión y el Tratamiento del Agua” (TEP-239), del Departamento de Ingeniería Civil de la Escuela de Ingeniería de Caminos, Canales y Puertos de la Universidad de Granada. En la Fig. 1 se muestra un esquema simplificado de la planta, así como fotografías de los distintos elementos componentes de la planta en la Fig. 2, y los problemas derivados de la formación de espumas observados en la misma en la Fig. 3.

El sistema se aplica tanto para eliminar materia orgánica como nitrógeno del agua residual, siendo necesario para ello el empleo de dos reactores biológicos. En el primer biorreactor, se trabaja en condiciones aeróbicas con el fin de completar la oxidación biológica de nitrógeno a nitrato, mientras que en el segundo biorreactor se mantienen

condiciones anóxicas para la reducción desasimilatoria del nitrato generado en el biorreactor aeróbico. El formato de operación empleado es el denominado modo de pre-desnitrificación, debido a que ofrece mejores resultados en la eliminación de nitrógeno y reduce los costes de operación (Orhon *et al.*, 2009).

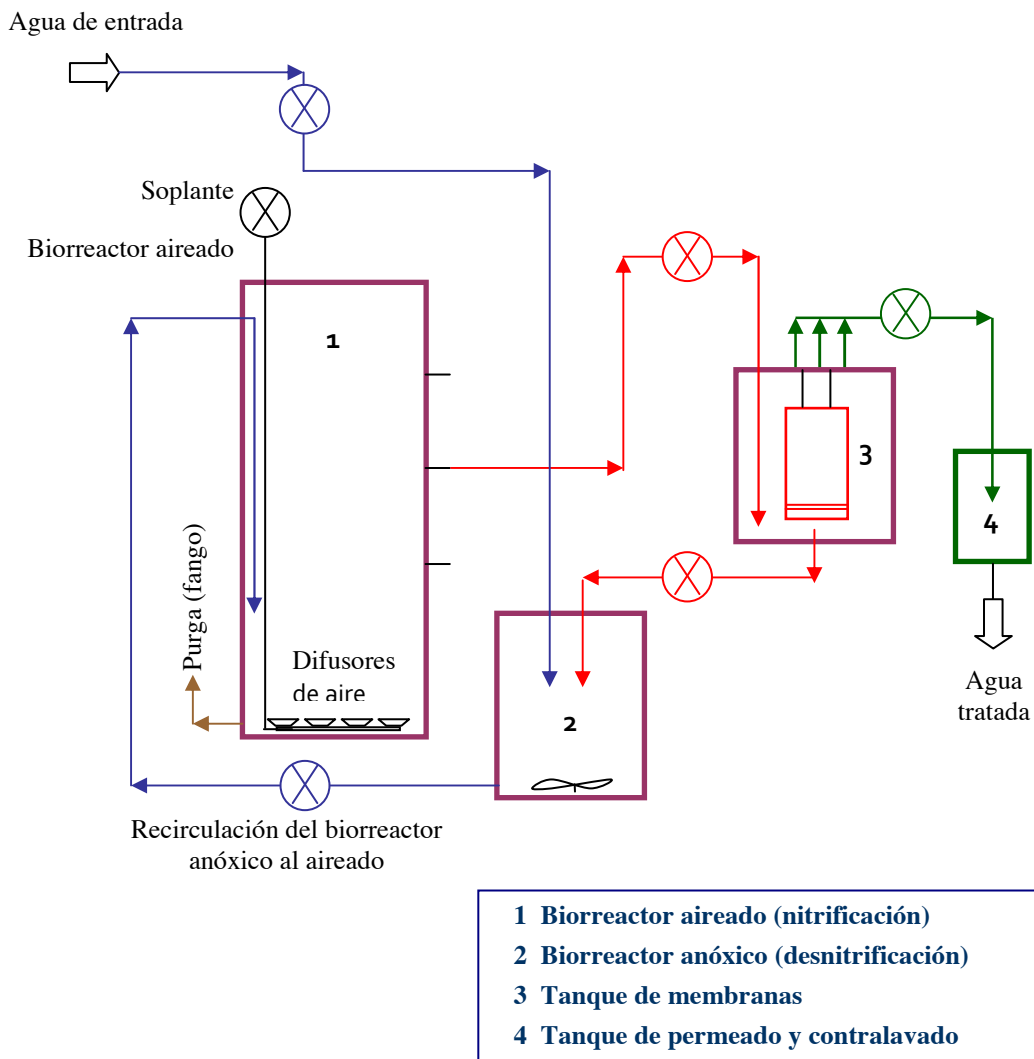


Fig. 1. Esquema simplificado del MBR (planta de tratamiento a escala piloto) que se ha empleado en la investigación. Por razones de simplicidad, se ha omitido el depósito intermedio entre el tanque aireado y el tanque de membranas (ver texto).

Los biorreactores son de forma cilíndrica y están diseñados de manera que se pueden seleccionar hasta 3 volúmenes máximos de trabajo, lo que proporciona la flexibilidad necesaria para la evaluación de distintas condiciones de operación. El biorreactor aeróbico, de mayor capacidad (6 m alto x 2,5 m de diámetro), puede ser operado a tres alturas de lecho distintas (2,50, 3,75 y 5,00 m) alcanzando un volumen máximo de trabajo de 30 m³. El aire de proceso se aporta al biorreactor aeróbico a través de difusores de burbuja fina, empleando un equipo de aireación independiente. El sistema está programado para mantener constante la concentración de O₂ disuelto en el fango del biorreactor aireado en el rango 0,5-4,0 mg/l. El biorreactor anóxico tiene un volumen máximo de 10 m³, y cuenta con un sistema de agitación del fango, para mantener en suspensión la materia particulada contenida. Igualmente, ambos biorreactores disponen de sistemas de purga para la evacuación de fangos. El volumen total de trabajo se ajusta a partir de las 3 alturas de la lámina de agua en el biorreactor aireado, de manera que el volumen de trabajo anóxico de la planta suponga aproximadamente un 25% del volumen total. El volumen máximo con el que puede operar el sistema es aproximadamente de 40 m³.

La membrana de ultrafiltración (ZeeWeed® 500D 3M, fabricada por Zenon®) se ha dispuesto en un tanque independiente de los reactores biológicos, cuyo volumen es de 2 m³. Las membranas de ultrafiltración son de fibra hueca, y presentan una conformación tipo *cassette*, con superficie neutra hidrofílica. Son membranas de fibra polimérica hueca con 1 mm de diámetro interno de fibra y tamaño de poro nominal de 40 nm.

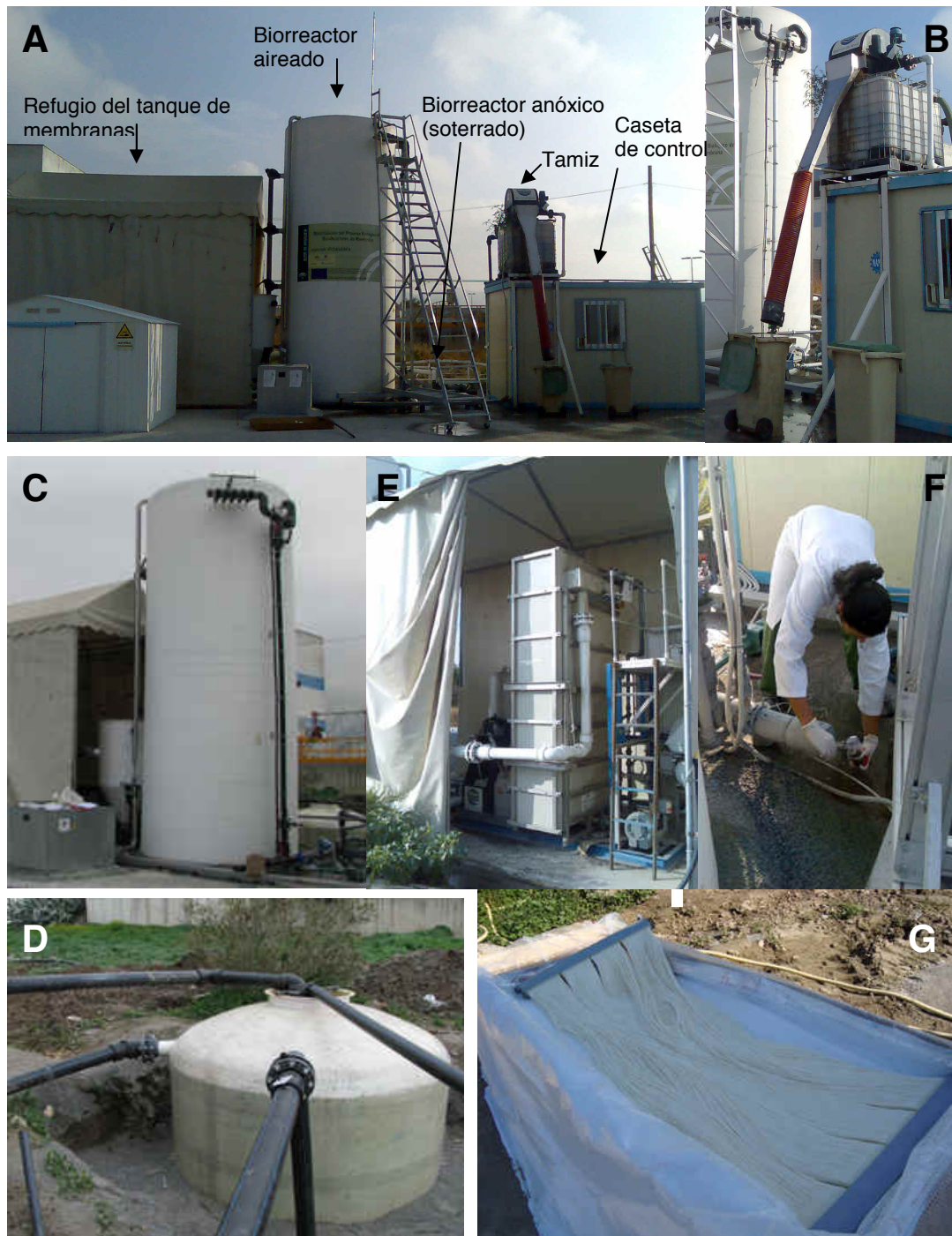


Fig. 2. Imágenes del MBR experimental.

- A. Panorámica de la instalación.
- B. Detalle del tamiz previo al paso del agua residual al tanque anóxico
- C. Tanque aireado.
- D. Tanque anóxico (durante la fase de montaje).
- E. Tanque de membranas.
- F. Punto de muestreo del tanque aireado.
- G. Aspecto de los módulos de membrana antes del montaje.

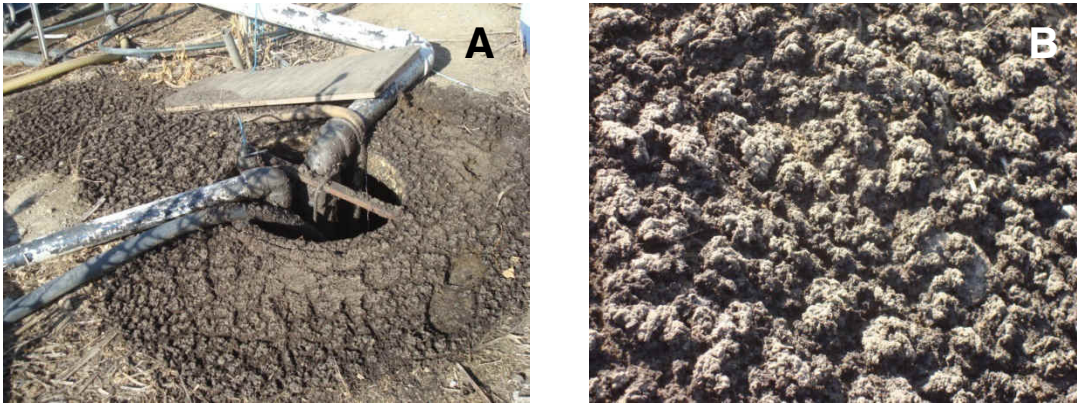


Fig. 3. Espumas producidas por exceso de crecimiento de microorganismos filamentosos en el MBR estudiado. (A) Problemas operacionales de rebose del biorreactor anóxico por la formación de espuma. (B) Detalle de las espumas generadas.

La planta se alimenta con agua residual obtenida de la salida del desarenador (pretratamiento) de la EDAR Sur, que previamente a su entrada a los biorreactores atraviesa un tamiz de 1 mm, siguiendo las especificaciones del fabricante de los módulos de membrana. La alimentación del agua residual influente se realiza mediante bombeo sobre el biorreactor anóxico, siendo el caudal aportado análogo al de la bomba de succión utilizada en la membrana (ambos caudales son variables). El agua contenida en el biorreactor anóxico es bombeada después al biorreactor aireado y desde ahí al tanque de membranas a través de un depósito intermedio dotado de dos boyas de nivel máximo y mínimo, a fin de prevenir un eventual funcionamiento accidental en vacío de la bomba. El tanque de membranas dispone de una recirculación interna hacia el biorreactor anóxico que se une en la entrada al agua influente. Esta recirculación tiene la finalidad de garantizar el proceso de eliminación de nitrógeno y su caudal se ha mantenido constante en el valor de (7×) el caudal de entrada, siguiendo las recomendaciones del fabricante de las membranas, siendo este caudal de recirculación adecuado para alcanzar valores de la eliminación de nitrógeno acordes con la legislación vigente. Es necesario un último tanque para la retención de una parte del agua tratada, la

cual se empleará en el contralavado de la membrana, siendo el rebose de este depósito el efluente tratado. También se dispone de una toma de agua limpia para reducir la concentración del influente en caso de ser necesario.

La planta es operada bajo un sistema computerizado de monitorización y control tipo SCADA (*Supervisory Control & Data Acquisition*), mantenido y suministrado por la empresa ICR ® (Ingeniería y Control Remoto). El sistema SCADA permite el control de todos los parámetros de operación y del funcionamiento de los distintos elementos de la planta, así como el registro automatizado constante de las variaciones de temperatura, pH y concentración de O₂ a lo largo de los diferentes puntos del sistema.

Objectives-Objetivos

Como se ha expuesto en el Capítulo de Introducción, en los MBRs la formación de espumas biológicas afecta a la eficacia del proceso depurador y al rendimiento de la filtración de membrana, a la vez que dificulta actividades como la purga de fangos y la recirculación (Di Bella *et al.*, 2013; Jenkins *et al.*, 2004). Es por ello esencial una identificación exacta de los microorganismos filamentosos implicados, para la prevención de desórdenes operacionales en los sistemas de tratamiento basados en esta tecnología. Aunque la diversidad de bacterias filamentosas es bien conocida en sistemas de tratamiento basados en el CAS (Nielsen *et al.*, 2009), son menos abundantes los estudios relativos a estos organismos en plantas basadas en la tecnología MBR. En cuanto a la estructura de las comunidades de hongos en sistemas de tratamiento de aguas residuales urbanas, son pocos los datos actualmente disponibles, a pesar de que en los últimos años se ha descrito la prevalencia de estos grupos de microorganismos en dichos sistemas (Evans y Seviour, 2011). Adicionalmente, se dispone de relativamente poca información acerca de la influencia de las variaciones en los parámetros de operación (HRT, SRT), y de variables del entorno de difícil control (temperatura, pH, composición del agua residual) sobre la estructura y dinámica de las comunidades de microorganismos filamentosos en los MBRs (Meng *et al.*, 2009). En plantas basadas en los CAS, factores como la escasez de O₂ disuelto, pH ácido, disponibilidad de nutrientes o abundancia de compuestos grasos se han relacionado con problemas de *foaming* causados por la proliferación de morfotipos concretos de bacterias filamentosas y hongos (Richard, 2003; Zheng *et al.*, 2011).

En este contexto, y como objetivo global de esta investigación, se planteó el estudio en profundidad de las comunidades microbianas filamentosas en los sistemas MBR, mediante un enfoque que permitiera interpretar la relación entre su estructura y

su función, así como establecer su correlación con los parámetros de operación del sistema y las variables del entorno de difícil control en explotaciones a escala real. Con ello se trata de contribuir a la predicción del comportamiento de las comunidades de organismos filamentosos en las plantas de tratamiento basadas en la tecnología MBR, así como al diagnóstico y corrección bajo condiciones reales de operación de los problemas de formación de espumas.

Para ello, se ha realizado un seguimiento del biorreactor de membrana anteriormente descrito (Capítulo de Introducción, apartado 1.10) a lo largo de cuatro periodos experimentales (Verano 2009, Otoño 2009, Verano 2010 e Invierno 2012) conducidos bajo diferentes condiciones de operación, y se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de la estructura de la comunidad de Mycolata, monitorización de la dinámica de sus poblaciones totales y activas y su relación con las variables del sistema MBR, mediante *fingerprinting* con TGGE.
2. Cuantificación de la abundancia absoluta de las poblaciones totales y activas de Mycolata y su relación con las variables del sistema, mediante qPCR.
3. Estudio de la estructura de la comunidad fúngica, monitorización de la dinámica de sus poblaciones totales y activas y su relación con las variables del sistema, mediante *fingerprinting* con TGGE y pirosecuenciación 454.
4. Cuantificación de la abundancia absoluta de las poblaciones totales de hongos y su relación con las variables del sistema, mediante qPCR.

Results-Resultados

Chapter 1-Capítulo 1

Linking operation parameters and environmental variables to population dynamics of Mycolata in a membrane bioreactor.

Maza-Márquez, P.¹, Gómez-Silván, C.¹, Gómez, M.A.², González-López, J.¹, Martínez-Toledo, M.V.¹, Rodelas, B.¹

¹Department of Microbiology and Institute of Water Research, University of Granada, Granada, Spain.

²Department of Civil Engineering and Institute of Water Research, University of Granada, Granada, Spain.

Published in Bioresource Technology vol. 180, pp. 318-329 (2015)

Abstract: The community structure and population dynamics of Mycolata were monitored in a full-scale membrane bioreactor during four experimental phases under changing operating and environmental conditions, by means of temperature-gradient gel electrophoresis of partial 16S-rRNA genes amplified from community DNA and RNA templates (total and active populations). Non-metric multidimensional scaling and BIO-ENV analyses demonstrated that population dynamics were mostly explained (30-32%) by changes in the input of nutrients in the influent water and the accumulation of biomass in the bioreactors, while the influence of hydraulic and solid retention times, temperature and F/M ratio was minor. Significant correlations were observed between particular Mycolata phylotypes and one or more variables, contributing information for the prediction of their abundance and activity under changing conditions. Fingerprinting

and multivariate analyses demonstrated that two foaming episodes, recorded at temperatures < 20 °C, were connected to the increase of the relative abundance of Mycolata unrelated to *Gordonia amarae*.

Keywords: membrane bioreactor (MBR); gDNA-based fingerprinting; cDNA-based fingerprinting; Mycolata; foaming; non-metric multidimensional scaling (MDS)

1. Introduction.

The excess proliferation of filamentous bacteria causes biological foaming and bulking in wastewater treatment plants (WWTPs) generating a variety of operational problems (Seviour, 2010). In membrane bioreactors (MBRs), the adverse effects of foaming which affect process stability and consequently treatment performance include the poor control of solid retention time (SRT) due to trapping of significant quantities of the active biomass in the foam, reduction of the usable reactor volume, malfunctioning of electrodes measuring dissolved oxygen, generation of bad odors, and health and environmental risks derived from the overflow of foams from the basins onto surrounding areas (di Bella and Torregrosa, 2013; Insel *et al.*, 2014; Machnicka *et al.*, 2009).

Mycolic acid-containing *Actinobacteria*, also referred to as Mycolata (Chun *et al.*, 1996), have been isolated from foams in many WWTPs throughout the world and are regarded as the main cause of foam stabilization. This activity may be related to their cell surface hydrophobicity and the extracellular excretion of biosurfactants (Capodici *et al.* 2015; de los Reyes, 2010b). Mycolata encompasses bacterial species characterized by branched morphology, currently classified in 13 genera (*Corynebacterium*, *Dietzia*,

Gordonia, *Millisia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Segniliparus*, *Skermania*, *Smaragdicoccus*, *Tomitella*, *Tsukamurella* and *Williamsia*) which fall within the Order *Corynebacteriales* of Class *Actinobacteria* (Goodfellow and Jones, 2012). Species from the genus *Gordonia* have been most frequently associated to severe foaming episodes in WWTPs; nevertheless, there is increasing evidence of a substantially wider phylogenetic diversity of the Mycolata occurring in WWTPs (reviewed by de los Reyes, 2010b).

The design of engineering strategies for foaming problems requires the understanding of the diversity and ecology of the causal organisms. Many of the filamentous bacteria are difficult to isolate and cultivate and have been traditionally monitored by microscopy; however, molecular tools are essential for their reliable identification (Nielsen *et al.*, 2009). Most of the studies conducted in the last decades were based on fluorescence in situ hybridization (FISH), providing significant information regarding the identity and ecophysiology of filamentous bacteria in WWTPs (Nielsen *et al.*, 2009), albeit this approach is not devoid of limitations. In the case of Mycolata, FISH is notably restricted by the low ribosomal content of poorly active cells, the difficult permeabilization of the hydrophobic Mycolata envelope, and the lack of specific enough FISH probes (de los Reyes *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2009). To overcome these drawbacks, molecular biology techniques based on PCR-amplification of rRNA genes are an interesting alternative. Temperature-gradient gel electrophoresis (TGGE) is a fingerprinting tool which provides characterization of the structure of microbial communities and allows relating population dynamics with changes in external factors (Muyzer *et al.*, 1993). Furthermore, TGGE also allows

RNA-based analysis, offering the advantage of identifying those populations which are actively growing (Gómez-Silvan *et al.*, 2014b).

The goal of the present work was to examine the structure of the Mycolata communities in the activated sludge of a real-scale membrane bioreactor (MBR) treating urban wastewater. The dynamics of both total and active Mycolata populations were analyzed by TGGE fingerprinting of partial 16S-rRNA genes amplified from community DNA and RNA templates, respectively. In order to link population dynamics of Mycolata to the MBR operation, multivariate analyses of the biological data (non-metric multidimensional scaling, MDS, and BIO-ENV) were performed to evaluate the influence of fluctuations of temperature, characteristics of the influent wastewater and operation parameters (hydraulic and solid retention times).

2. Materials and Methods.

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

The MBR investigated in the study is schematically depicted in Fig. S1. It was installed close to the municipal WWTP “Estacion Depuradora Sur”, located near the city of Granada (Southern Spain) and managed by the company EMASAGRA S.A. The MBR consisted of two bioreactors (BR): aerated BR (19.4 m³), and anoxic BR (6.8 m³). The filtration tank (2 m³) was equipped with three ultrafiltration hollow-fiber membrane modules (0.034 μ m nominal pore size) made of polyvinylidene fluoride (PVDF) (GE Water & Process Technologies, Fairfield, USA). A fourth tank (0.2 m³) collected part of the treated water, as requirement for the periodic backwashing of the membrane modules.

The MBR was fed urban wastewater taken from the pretreatment of the nearby Estación Depuradora Sur-WWTP, which was additionally filtered through a 1-mm brush screen in order to ensure the correct operation of the membranes, according to the manufacturer's recommendations. The plant was operated in pre-denitrification mode, as previously described (Gómez-Silván *et al.*, 2014b). The following parameters were measured automatically and registered continuously in a database: temperature, pH, and dissolved oxygen (DO) concentration inside the BRs; level of the tanks, transmembrane pressure and flow rates. The datasets were collected and analyzed with the aid of the Active Factory v.9.2 software (Wonderware, Spain). The daily medium internal temperature measured in the sludge of the MBR system (IT) was calculated by the software from data measured every second.

The biodiversity of Mycolata in the activated sludge of the MBR was monitored during four different phases of operation: summer 2009, autumn 2009, summer 2010 and winter 2012 (Sm09, Au09, Sm10, and Wn12, respectively) with different sets of hydraulic retention time (HRT) and SRT (Table S1) and markedly different average characteristics of the influent wastewater and temperature of the activated sludge (Fig. 1). In all cases, the activated sludge was sampled when the MBR had reached the steady-state operating conditions (at least threefold the SRT since the start-up date, Ruiz *et al.*, 2011). The MBR experienced intense foaming in the anoxic BR from 26/11/2009 to 22/12/2009 (end of phase Au09) and from 7/02/2012 to 18/02/2012 (phase Wn12). The occurrence of filamentous bacteria in the experimental MBR had been evaluated by conventional microscopy in a previous study, which concluded that seasonal foaming episodes were caused by the proliferation of nocardioforms (Parada-Albarracín *et al.*, 2012).

2.2. Analysis of plant performance.

Concentrations of suspended solids (total, iTSS; volatile, iVSS), total chemical oxygen demand (COD), and total biological oxygen demand at five days (BOD₅) were analyzed daily in influent and effluent (permeate) water. The influent and effluent water samples were automatically collected through the day using a time controller and a peristaltic pump, and were kept refrigerated at 4 °C until taken for analysis (Ruiz *et al.*, 2011). Concentrations of total and volatile suspended solids (TSS and VSS, respectively) were also measured daily in the sludge of both BRs. All the analyses were done in accordance with the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005). The effluent water satisfied the EU regulation legal requirements for effluent discharge to the environment (Directive 91/271/EEC, European Council, 1991) (Table S1).

2.3. Activated sludge sampling for Mycolata-biodiversity.

Samples (200 ml) of activated sludge from both BRs (aerobic and anoxic) were collected in sterile plastic containers once a week. The sampling frequency was selected to allow the detection of significant changes in community structure (Gomez-Silvan *et al.*, 2014b). The samples were transported from the experimental plant to the laboratory and preserved until nucleic-acid extraction, following previously described protocols (Gomez-Silvan *et al.*, 2014b).

2.4. DNA and RNA extraction.

Total genomic DNA (gDNA) and RNA were extracted from activated sludge samples by using the FastDNA-2 mL SPIN Kit for Soil and the FastRNA Blue Kit (MP-Bio, Santa Ana, CA, USA), respectively. The kits were used in combination with the FastPrep24 apparatus (MP-BIO, Santa Ana, CA, USA) following the manufacturer's

instructions. The RNA samples were further digested by the rigorous procedure of TURBO DNA-*free* kit (Ambion[®], Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) and then purified using the RNA Cleanup protocol from RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hamburg, Germany).

2.5. PCR and RT-PCR amplification of partial *Mycolata* 16S-rRNA genes.

Two-step approaches were used for PCR amplification, as previously described for TGGE or DGGE fingerprinting (Gómez-Silván *et al.*, 2014b). Negative controls were included in all sets of PCR and RT-PCR reactions. All PCRs were done with the aid of an Eppendorf Master Cycler thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The products amplified in all PCRs were checked for purity and correct size by electrophoresis on 1% agarose gels containing ethidium bromide and visualized under UV light.

Samples of gDNA (2-5 ng) were used as a template for PCR using the specific *Mycolata* primer F249 (5'-GATGGGCCCGCGGCCTATCA-3') (de Azeredo *et al.*, 2006) and the universal primer R1378 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') (Heuer *et al.*, 1997). Reaction mixtures (50 μ l final volume) contained 10 \times TrueStart Hot Start *Taq* buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 2.5 mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 1% deionized formamide (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 200 μ M of dNTPs (MBL, Córdoba, Spain), 20 pM of each primer (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1 U of TrueStart Hot Start *Taq* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), and 100 μ g bovine serum albumin (New England Biolabs, UK). The PCRs began with a denaturation step at 94°C for 7 min, followed by 25 cycles of denaturation at 94°C for 1

min, annealing at 71°C for 1 min, and extension at 72°C for 2 min, and a final extension step at 72°C for 10 min.

To generate 16S rRNA gene cDNA amplicons from RNA, a one-step RT-PCR was performed using the SuperScript[®] III One-Step RT-PCR System, with Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), also using primers F249 and R1378. An initial RT-PCR step at 55°C for 30 min was followed by DNA polymerase activation, and then the amplification of cDNA took place following the manufacturer's indications and using the same temperatures described above for gDNA samples.

All the amplicons (about 1158 bp size) generated from either gDNA or cDNA were 1:100 diluted and then used as templates for the second PCR using the universal primers P1-GC and P2 (Muyzer *et al.*, 1993), which amplify the V3 hypervariable region of the 16S rRNA gene (positions 341 to 534 in the *Escherichia coli* sequence). The reaction mixtures were kept as described above. PCR was performed using the following conditions: initial denaturation at 94°C for 7 min; 10 touchdown cycles (94°C for 1 min, annealing from 65°C to 55°C for 1 min decreasing 1°C per cycle, and extension at 72°C for 1 min); 10 additional cycles (94°C for 1 min, annealing at 55°C for 2 min, and extension at 72°C for 2 min); and a final elongation step at 72°C for 10 min.

2.6. TGGE.

TGGE was done using a TGGE Maxi system (Whatman-Biometra, GmbH, Germany). Denaturing gels (6% polyacrylamide (37.5:1 acrylamide:bisacrylamide), 20% deionized formamide, 2% glycerol and 8 M urea) were run with 2 x TAE buffer at 125 V for 18 h. The optimal temperature gradient for efficient separation of bands was 43-63 °C. Gel

bands were visualized by silver staining using the Gel Code Silver Staining kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific Rockford, IL, USA), following the manufacturer's indications. Different PCR reactions were tested and different TGGE gels were run to check the reproducibility of the results. To allow the further normalization of the different TGGE gels and the comparison of samples' fingerprints, one sample (named A3/2) was chosen as internal marker (M) and loaded in triplicate in each TGGE gel. The percentage of similarity between the repeated fingerprints of the internal markers provided the limit to consider significant differences between samples (Gómez-Silván *et al.*, 2014b).

2.7. Analysis of TGGE fingerprints.

The band patterns generated by TGGE were normalized using the Gel Compar II v.5.101 software (Applied Maths, Belgium). For cluster analysis, the TGGE profiles were compared using the Dice coefficient, based on the assignation of band-classes and the score of band's presence/absence (herein incidence). A 1% band position tolerance (relative to the total length of the gel) was applied (Gómez-Silván *et al.*, 2014b). Dendrograms relating band pattern similarities were automatically calculated with the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). The significance of the UPGMA clustering was estimated by calculating the cophenetic correlation coefficients. The relative intensity of each band in the whole densitometric curve of the corresponding TGGE lane was calculated using Gel Compar II (Gómez-Silván *et al.*, 2014b). Based on the relative abundance of the band-classes in normalized TGGE gels, the following descriptive indices of the biological diversity were calculated: Range-weighted richness index (Rr), Functional organization (Fo), Shannon-Wiener diversity index (H'), and Dynamics (Dy) (Gómez-Silván *et al.*, 2014b; Marzorati *et al.*, 2008).

2.8. Reamplification and sequencing of isolated TGGE bands.

TGGE bands were excised from the gel, re-amplified and sequenced, to gain insight into the identities of total and active populations predominantly present within the Mycolata community. Portions of individual bands on silver-stained TGGE gels were picked up with sterile pipette tips, placed in 10 μ l of filtered and autoclaved distilled water, and freeze-thawed. 3-5 μ l of these suspensions were directly used for reamplification with the appropriate primers in a final volume of 50 μ l. PCR products were purified by agarose gel electrophoresis and extraction with the Qiaex-II kit (Qiagen, Hamburg, Germany). The purified amplicons were sequenced in an ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

2.9. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses.

The DNA sequences of all the amplicons were analyzed using the biocomputing tools provided online by the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The BLASTn program (Altschul *et al.*, 1997) was used for sequence similarity analysis. The ClustalX v. 2.0.3 software (Jeanmougin *et al.*, 1998) was used for the alignment of the sequences. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA v. 4 (Tamura *et al.*, 2007). A *p*-distance based evolutionary tree was inferred using the Neighbor-Joining algorithm. The bootstrap test was conducted to infer the reliability of branch order, with a round of 1000 reassemblings. Bootstrap values below 50% are not shown in the tree.

2.10. Statistics.

IBM SPSS Statistics v. 19 (SPSS INC., USA) was used for a preliminary analysis of data distributions and the subsequent statistical tests in search for differences among the groups of samples. As most of the data sets did not fit the normal distribution, a non-

parametric analysis for related samples (Wilcoxon signed-rank test) was conducted for each biological assay and variable. A 95% significance level ($p < 0.05$) was selected.

The Primer software (PRIMER-E v. 6.0, Plymouth, UK) was used for analyses based in the sets of biological data derived from the fingerprints. Sample-resemblance matrices were generated from the relative abundance data using the Bray Curtis coefficient of similarity. Based in these similarity matrices, cluster analyses, non-parametric multidimensional scaling (MDS) and ANOSIM analyses were performed. The ANOSIM analyses render the significant differences between the groups of samples (aerated and anoxic BRs; gDNA and cDNA-based profiles; or experimental periods Sm09, Au09, Sm10 and Wn12).

The distribution patterns of the MBR samples according to the similarity between their TGGE profiles were studied by ordinations using non-parametric multidimensional scaling (MDS), aided by the Primer software (PRIMER-E, vs. 6.0, Plymouth, USA) as described previously (Gómez-Silván *et al.*, 2014b). The stress level of the MDS plots indicates how well the set of biological data fit into two dimensional spaces, with values close to 0.2 giving a valid representation of their distribution (Clarke and Warwick, 2001). Spearman rank correlations (ρ_s) were calculated between the ordinations of the biological data and the measured operational parameters and environmental variables. Those correlations were represented in the plots as vectors, which illustrate a variable's directional influence and its role in explaining the biological data ordination. Prior to the multivariate analyses, the variables' data sets were transformed to $\log(x+1)$ (except pH) and normalized. The correlations between the variables were analyzed using Draftsman's Plot, and data subsets with mutual correlation averaging more than 0.90 were replaced by a single representative. Nine variables were finally included: BOD₅,

COD and concentration of total suspended solids in the influent wastewater (iTSS); IT, pH, concentration of volatile suspended solids in the activated sludge of the BRs (VSS), HRT, SRT, and food to microorganisms (F/M) ratio (kg BOD₅ /kg VSS day in the aerated BR).

In order to link the distribution patterns of the biological data to the set of variables, BIO-ENV analysis was carried out (Clarke and Warwick, 2001). BIO-ENV calculates the Spearman rank correlations between the similarity matrix of biological data (created using the Bray Curtis coefficient) in which the ordination method (MDS) is based and the similarity matrices (created using Euclidean Distance) derived from all the possible sequential combinations of the measured variables. The highest valued obtained (BEST value) indicates which combination of variables best explains the biological ordination. The statistical significance of the BEST values was tested by a global permutation test (499 permutations).

Vectors were also used in the MDS plots to represent the Spearman rank correlations (ρ_s) of the calculated values of the diversity indices (Rr, H' and Fo), as well as the relative abundances of the prevalent band-class detected by TGGE and identified by 16S DNA sequencing, in order to illustrate their directional increase through the biological ordination.

3. Results and Discussion.

3.1. Environmental variables in the MBR system.

Fig. 1 shows the Box-and-Whiskers plots of the variables monitored in the MBR system during the four experimental phases (Sm09, Au09, Sm10, and Wn12). According to the Wilcoxon signed-rank test, there were significant differences ($p < 0.05$) among the four

phases for all the variables. As predictable, IT experienced sharp fluctuations, since the experimental phases were developed in different seasonal periods. The average IT was significantly higher during the two phases taking place in summer (Sm09 and Sm10), while the lowest average value was recorded in Wn12. Sm10 was characterized by a significantly lower pH and the highest levels of contamination in the influent water (COD, BOD₅, and suspended solids), while the F/M ratio was significantly lower in the Au09 phase. Regarding the evolution of the concentration of biomass in the BRs, significant differences were also found between the experimental phases (Fig. 1), but the average values of suspended solids in the aerated and the anoxic BRs were similar within each phase. Suspended solids measured in the activated sludge were particularly high during phase Sm10.

3.2. Cluster analysis of gDNA- and cDNA-based TGGE fingerprints.

The global analysis of the TGGE profiles of the Mycolata community in a total of 162 gDNA and cDNA samples retrieved from the MBR is displayed in Fig. 2. The Dice coefficient-based comparison evidenced that the overall similarity between the samples was below 50%. The ANOSIM analysis showed significant differences between gDNA- and cDNA-based profiles ($R= 0.113$) and between profiles of samples retrieved in the four different experimental phases ($R= 0.291$). The separate grouping of the profiles of samples retrieved during the Sm10 phase was particularly clear, since 95% of them grouped into a single subcluster (at 71% similarity). Also, cDNA- and gDNA-derived fingerprints clustered closer in the Sm10 period compared to the other three experimental phases, which displayed greater differences of the community structure when total or active populations were targeted. The gDNA-based TGGE profiles of most Wn12 samples tended to branch apart (<70% similarity) from those retrieved in

the other three experimental phases. The profiles of samples retrieved during the periods when the MBR experienced intense foaming grouped in individual subclusters (Fig. 2).

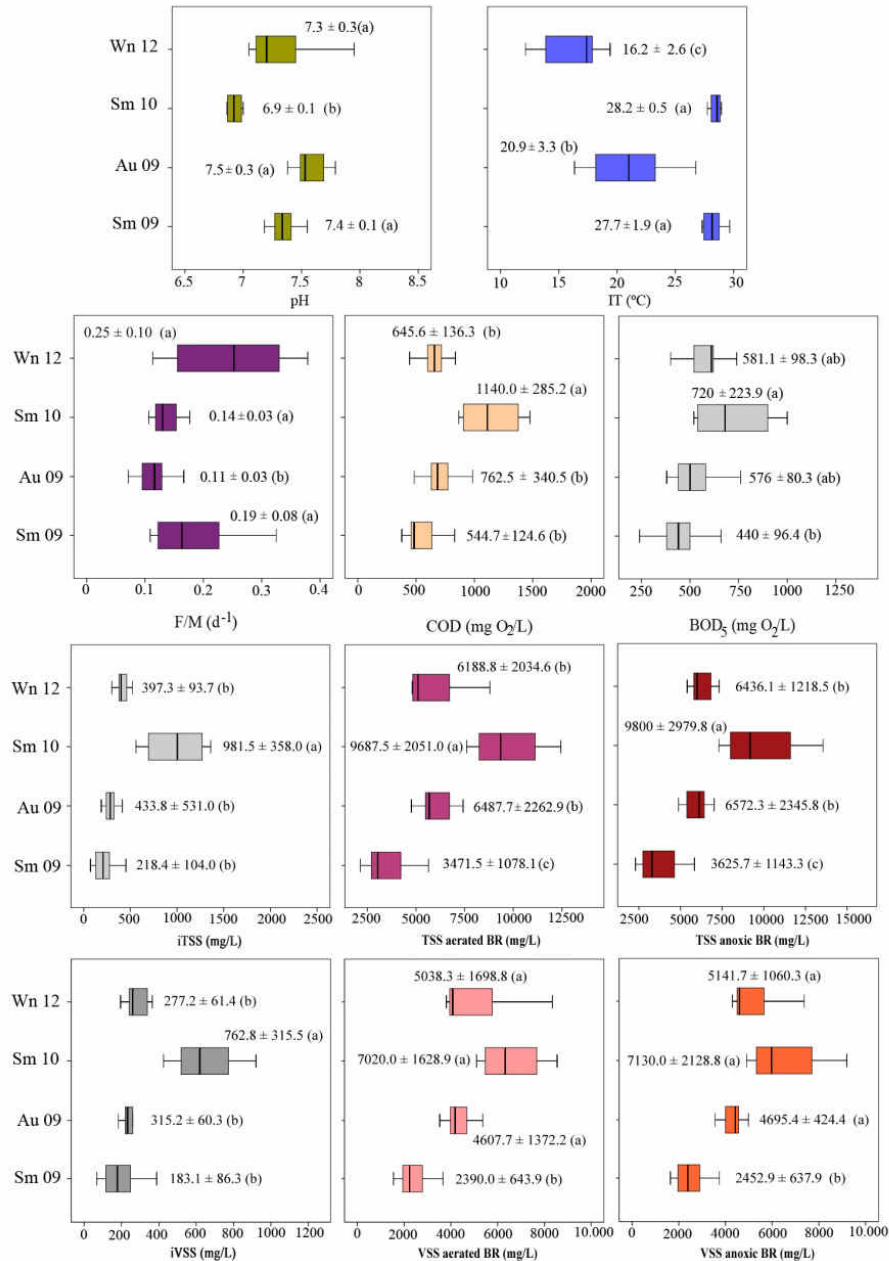


Fig. 1. Box-and-Whisker plots for the environmental variables throughout the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. Variables shown are: pH and medium internal temperature in the MBR system (IT), food to microorganisms ratio (F/M), concentrations of COD and BOD₅ in the influent wastewater, concentrations of suspended solids in the influent wastewater (total, iTSS; volatile, iVSS), and concentration of suspended solids in the activated sludge of the aerobic and anoxic bioreactors (total, TSS; volatile, VSS) In plots, upper and lower bounds of the box denote the 75th and 25th percentiles, and upper and lower bounds of bars are the 90th and 10th percentiles. Average values ± standard deviations are shown below the boxes. Data followed by the same lower-case letter do not significantly differ, according to the Wilcoxon signed-rank test (0.05).

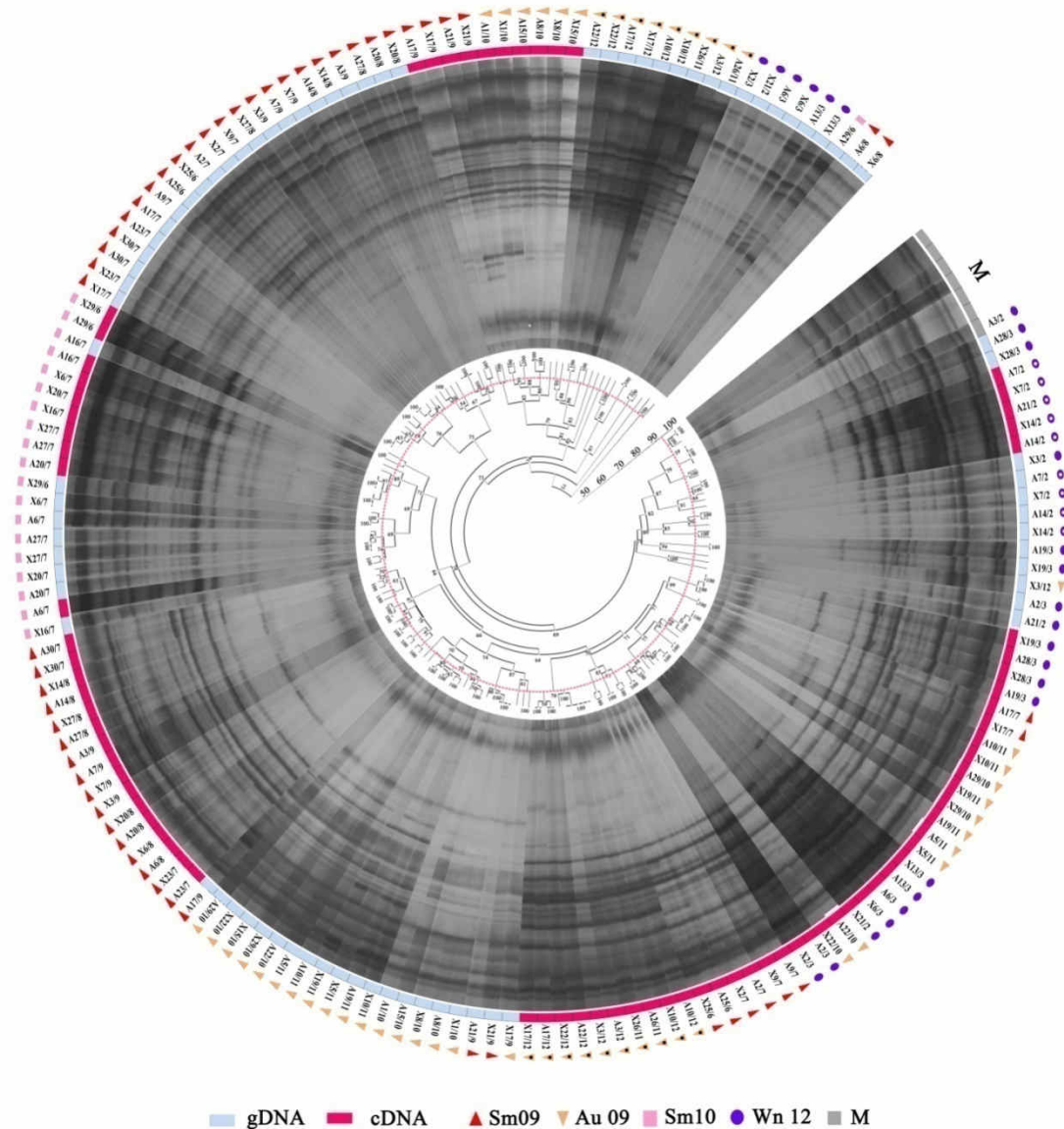


Fig. 2. gDNA- and cDNA-based TGGE fingerprinting analyses of the Mycolata communities in the full-scale membrane bioreactor (MBR) throughout the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. The clustering is based in the Dice coefficient of similarity. The dotted line marks the clustering similarity level of internal markers, indicating the limit to consider significant differences between samples. The scale bar indicates the percentage of similarity between sample profiles, and the numbers in nodes represent the cophenetic correlation coefficient values. A, samples from the aerated biorreactor; X, samples from the anoxic biorreactor. The samples of experimental phases Au09 and Wn12 marked with an inner dot were retrieved while intense foaming occurred in the MBR.

The significant differences between the structure of the total and active Mycolata communities were consistent with the previous knowledge on the ecophysiology of these organisms, since many studies reported that a high percent of the Mycolata cells

occurring in WWTPs are often metabolically inactive (de los Reyes 2010b; Nielsen *et al.*, 2009). Changes between the experimental phases were also expected, as the Mycolata community was subjected to very different operational and environmental conditions in each of them. In particular, SRT, temperature, loading of contaminants and F/M ratio have been previously reported to influence the occurrence and proliferation of Mycolata in WWTPs (Asvapathanagul *et al.*, 2012; de los Reyes, 2010b; de los Reyes and Raskin, 2002; Madoni *et al.*, 2000; Parada-Albarracín *et al.*, 2012; Tsang *et al.*, 2008). These influences will be analyzed with the aid of BIO-ENV analysis and discussed in detail in section 3.5.

The ANOSIM analysis also revealed that there were no significant differences of the community profiles between BRs ($R = -0.012$), demonstrating a similar structure of the total and active Mycolata communities in spite of the different aeration conditions. Indeed, the gDNA- or cDNA-based profiles of samples retrieved from the aerated and anoxic BRs on the same date often clustered close together (Fig. 2). It has generally been believed that Mycolata are obligate aerobic organisms; however, recent investigations appear to contradict this notion, as substrate uptake has been observed under both anoxic and anaerobic conditions (de los Reyes, 2010b).

3.3. Analysis of the diversity, structure and functional organization of the Mycolata community.

The analysis of the population diversity and dynamics of Mycolata in the MBR is shown in Fig. 3. The values of the Rr index, which describes the diversity richness of a given community (Marzorati *et al.*, 2008), significantly varied between the four phases analyzed (Fig. 3.A). The Au09 period was characterized by the highest diversity of total populations of Mycolata, while the diversity of the active populations was higher in

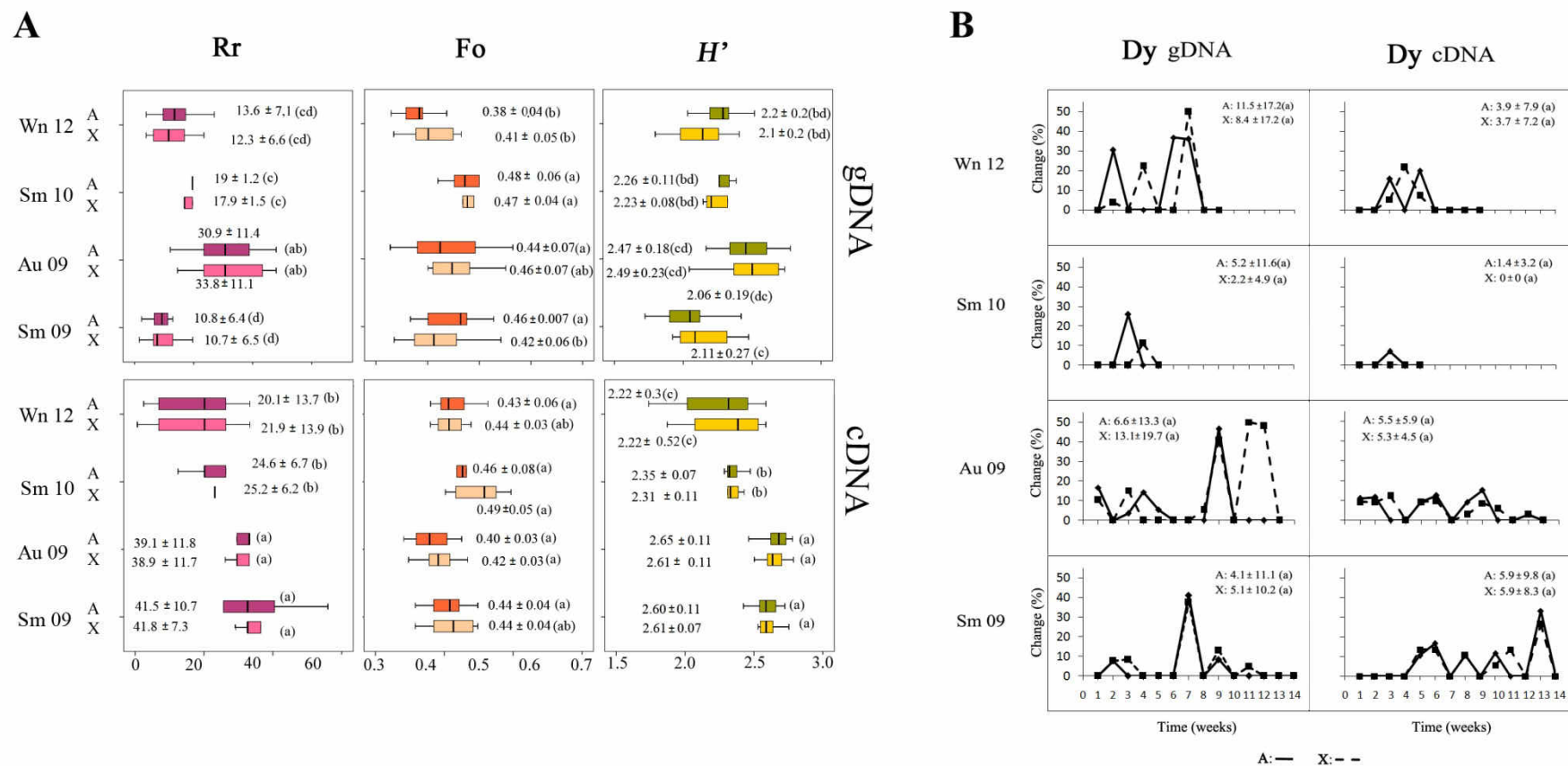
both Sm09 and Au09 phases. Rr was always significantly higher in the cDNA-based fingerprints, with the exception of the Au09 phase. Sm09 was characterized for the sharpest difference of diversity richness comparing between total and active Mycolata populations.

The Fo index defines the relationship between structure and function of the microbial communities, estimating their degree of specialization (Marzorati *et al.*, 2008). The average value of Fo of the microbial communities in the MBR was 0.43 (Fig.3.A), meaning that the 20% most dominant Mycolata populations in the fingerprints contributed 43% of the cumulative total relative abundance of populations, while the remaining 80% of detected populations were present in decreasingly lower relative abundance. Remarkably, the values of Fo were in the same ranges in the fingerprints based on gDNA and cDNA, indicating that the communities of either total or active population had similar levels of evenness, regardless of their diversity richness.

The H' index takes into account both the community species richness and its functional organization. The average value of H' was 2.3, reflecting also a medium richness and functional organization of Mycolata in the MBR (Fig. 3.A).

Regarding population dynamics, the average Dy index significantly varied, tending to be lower in the cDNA based fingerprints in phases Sm10 and Wn12 (Fig. 3.B). Moving-window analyses demonstrated that the diversity of Mycolata communities in the MBR did not remain stable throughout most of the experimental phases. Lower dynamics of Bacteria populations were previously observed in the same MBR during phases Sm09 and Au09 (Gómez-Silván *et al.*, 2014b), evidencing that the structure of the Mycolata communities was particularly prone to change compared to

Fig. 3. Indices of diversity describing the Mycolata community in the gDNA- and cDNA-based TGGE fingerprints of the full-scale membrane bioreactor (MBR) throughout the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. Average values \pm standard deviations of all indices are shown. Data followed by the same lower-case letter do not significantly differ, according to the Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$). **A:** Box-and-Whisker plots of the range-weighted richness index (Rr), functional organization index (Fo), and Shannon-Wiener diversity index (H'). Upper and lower bounds of the boxes denote the 75th and 25th percentiles, upper and lower bounds of bars are the 90th and 10th percentiles. **B:** Moving-window analyses (dynamics index, Dy) based on the weekly rate of change of Mycolata fingerprints. A: samples from the aerated bioreactor, X: samples from the anoxic bioreactor.



the average bacterial trends. Interestingly, the dynamics of total Mycolata populations during phase Au09 experienced substantial changes in the anoxic BR throughout the five final weeks of operation (Fig. 3.B), overlapping the period when foaming was experienced.

Overall, the ranges of Rr, Fo, H' , and Dy indices throughout the whole experimental period describe a Mycolata community displaying medium-to-high population richness, medium functional organization, and low-to-medium dynamics (Marzorati *et al.*, 2008). These indices define a good capacity of Mycolata to maintain their functionality in the MBR and getting adapted to changing environmental conditions (Marzorati *et al.*, 2008).

3.4. Phylogenetic analysis of total and active Mycolata populations.

Image analysis with Gel Compar II detected a total of 39 unique band classes in the TGGE fingerprints of Mycolata among the 162 samples analyzed. Bands representative of 27 out of the 39 band-classes detected (69%) were successfully reamplified and sequenced, and the phylogenetic tree showing the relationships among them is displayed in Fig. 4. The sequences of 22 bands were evolutionarily close to those of 4 different genera of Mycolata (*Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and *Segniliparus*), while 5 sequences were related to other *Actinobacteria*.

Several sequences clustered in the neighborhood of species *Gordonia amarae*, *G. polyisoprenivorans*, *G. defluvii*, *R. erythropolis* and *R. coprophilus*, often found in WWTPs (de los Reyes, 2010b) and whose proliferation has been connected with foaming episodes (de los Reyes, 2010b; Guo and Zhang, 2012). Both fast- and slow-growing *Mycobacterium* spp. phlotypes were identified (Fig. 4). Members of this genus are also commonly present in wastewater influents and activated sludge in

WWTPs (Fang *et al.*, 2013; Guo and Zhang, 2012). *Segniliparus* spp. is a fairly recently described genus of mycolic-acid containing *Actinobacteria*, currently comprising two species (*S. rugosus* and *S. rotundus*) which are emerging respiratory opportunistic pathogens in humans (Kim *et al.*, 2013). The environmental sources of *Segniliparus* spp. are undetermined (Butler *et al.*, 2005). To the best of the author's knowledge, there are no previous reports on the incidence of phylotypes related to *Segniliparus* spp. in WWTPs.

The heat-map in Fig. 5 shows the longitudinal evolution throughout all the experimental phases of the relative abundance of the 39 band classes, in both the gDNA- and cDNA-based fingerprints. Among the populations identified as Mycolata by sequencing, 9 TGGE band-classes (P2, P3, P14, P24, P25, P27, P30, P38, P39) displayed a high incidence (occurrence in > 65% of the total samples), and remarkable changes of their relative intensities were observed throughout the whole experimental period. These 9 band-classes included phylotypes related to the genera *Gordonia* (P38, P39), *Mycobacterium* (P2, P3, P27, P30), *Rhodococcus* (P14) and *Segniliparus* (P25), plus one Mycolata population not identified to the genus level (P24). These results indicate that phylotypes displaying a high relative abundance were balanced between the four different genera of Mycolata occurring in the MBR, suggesting that they all may play significant roles in the WWTP community.

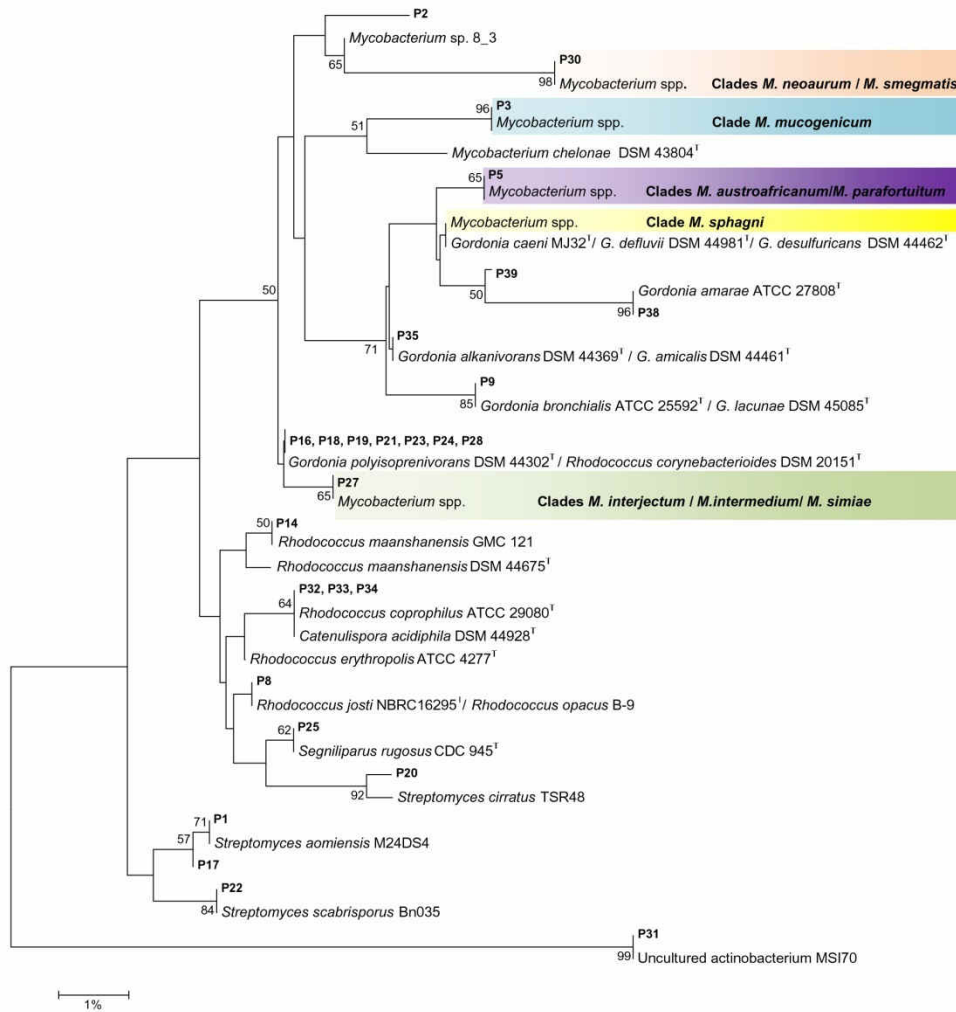
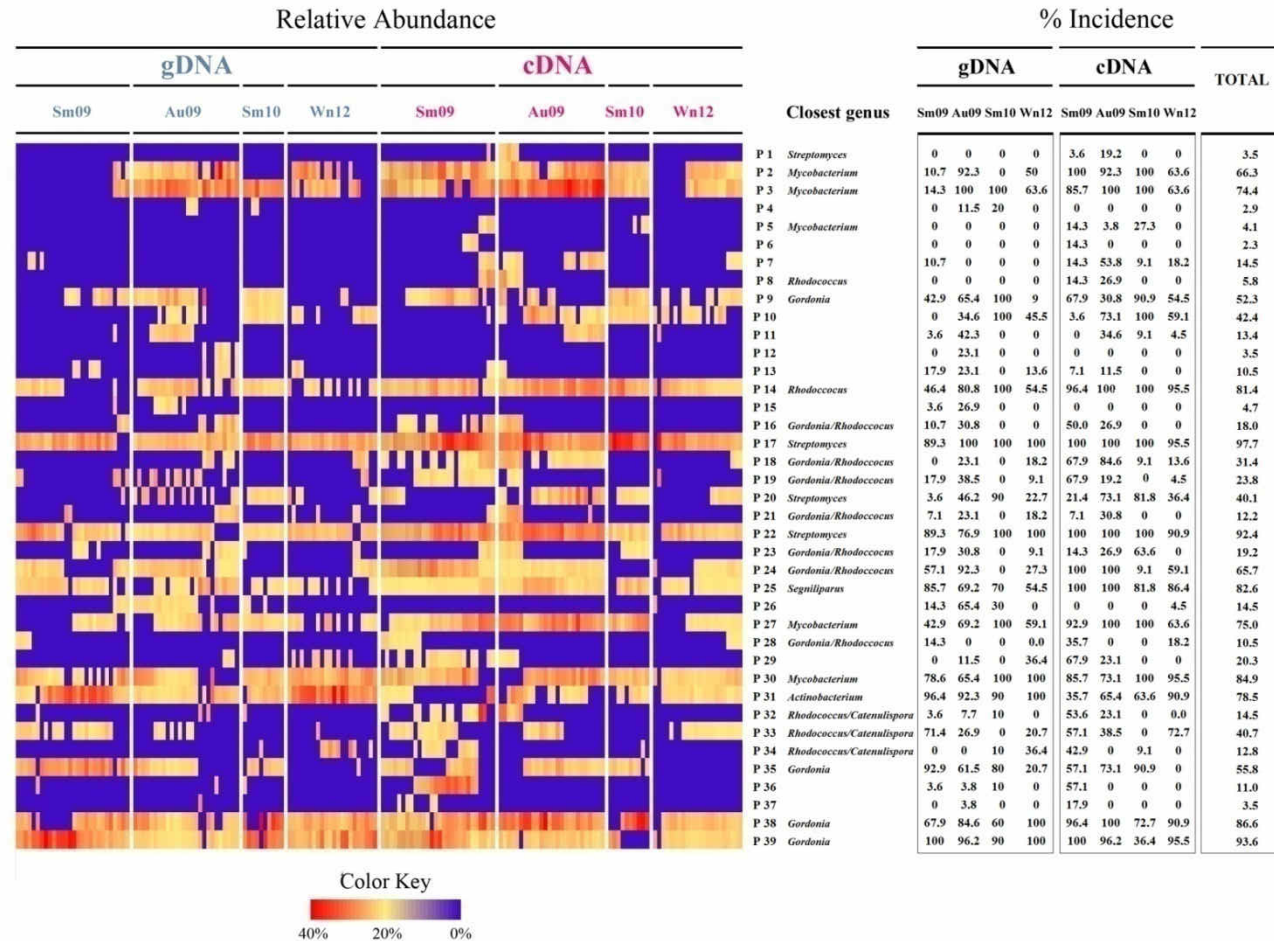


Fig. 4. Neighbor-Joining phylogenetic tree showing the affiliations of 27 TGGE band-classes, based on ca. 140 nt length sequences of the V3 region of the 16S rRNA gene. The scale bar indicates a 1% divergence. Only bootstrap values above 50% are shown in nodes. The accession numbers of the sequences retrieved from the EMBL database to generate the tree are the following: *Catenulispora acidiphila* DSM 44928^T (NR 074457.1); *Gordonia alkanivorans* DSM 44369^T (Y18054.1); *G. amarae* ATCC 27808^T (X80635.1); *G. amicalis* DSM 44461^T (AF101418); *G. bronchialis* ATCC 25592^T (CP001802.1); *G. caeni* MJ32^T (JF806526.1); *G. defluvi* DSM44981^T (AY650265.1); *G. desulfuricans* DSM 44462^T (AF101416.1); *G. lacunae* DSM 45085^T (EF151959.1); *G. polyisoprenivorans* DSM 44302^T (Y18310.1); *Mycobacterium* sp. 8_3 (HF 954488.1); *Mycobacterium chelonae* DSM 43804^T (AY457072.1); *Mycobacterium* spp. clades *M. austroafricanum* / *M. parafortuitum*: *M. austroafricanum* DSM 44191^T (X93182.1), *M. gilvum* ATCC 43909^T (X81996.1), *M. parafortuitum* DSM 43528^T (X93183.1); *Mycobacterium* spp. clades *M. interjectum*/*M. intermedium*/*M. simiae*: *M. interjectum* DSM 44064^T (HM037998.1), *M. intermedium* DSM 44049^T (X67847.1), *M. simiae* ATCC 25275^T (X52931.1); *Mycobacterium* spp. clade *M. mucogenicum*: *M. mucogenicum* ATCC 4965^T (AY457074), *M. phocaicum* JCM 15301^T (AY859682.1); *Mycobacterium* spp. clades *M. neoaurum*/*M. smegmatis*: *M. neoaurum* DSM 44074^T (AF480593.1); *M. smegmatis* ATCC 19420^T (AJ131761.1); *Mycobacterium* spp. clade *M. sphagni*: *M. chubuense* DSM 44219^T (AF480597.1), *M. poriferae* ATCC 35087^T (AF480589); *Rhodococcus coprophilus* ATCC 29080^T (X80626.1); *R. corynebacterioides* DSM 20151^T (AF430066.1); *R. erythropolis* ATCC 4277^T (X79289.1); *R. josti* NBRC16295^T (AB046357.1); *R. maanshanensis* GMC121 (AB741451.1); *R. maanshanensis* DSM44675^T (AF416566.1); *R. opacus* B-9 (AB192963.1); *Segniliparus rugosus* CDC945^T (AY608920.1); *Streptomyces cirratus* TSR48 (JF825436.1); *S. amiensis* M24DS4 (JQ899252.1); *S. scabrisporus* Bn035 (KC440853.1); Uncultured actinobacterium MSI70 (EU 199234.1). A superscript T designates type strains.

Fig. 5. Heatmap showing the longitudinal evolution of the relative abundances and % of incidence of the band-classes detected in the gDNA and cDNA-based TGGE fingerprints of activated sludge samples collected in the MBR throughout the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases.



3.5. Linking Mycolata community structure and population dynamics with operational parameters and environmental variables (BIO-ENV analysis).

Fig. 6 shows the non-metric multidimensional scaling (MDS) plots generated for the biological data derived from each molecular template (gDNA and cDNA). The vectors in the plots represent the directional increase through the biological ordinations of the Spearman rank correlations (ρ_s) calculated for: the MBR operation parameters and environmental variables (middle column); the diversity indices R_r , F_o and H' (left column); or the relative abundance of the nine Mycolata band-classes with > 65% incidence in the MBR samples (right column). The Pearson product-moment correlations (r) between the groups of vectors shown in the plots in Fig. 6 are summarized in Table S2.

BIO-ENV analysis was used to evaluate the significance of the influence of the operational parameters and environmental variables on the community structure and population dynamics of Mycolata. Similar levels of explanation were achieved for gDNA- and cDNA-based fingerprints (BIO-ENV = 0.301 and 0.320, respectively). The variables which best explained the distribution of the biological data are marked with an asterisk (*) in the ordinations (Fig. 6, middle column). The dynamics of the total Mycolata populations in the MBR throughout the experimental period were 30% explained by changes of BOD_5 and VSS, while in the case of active populations the factors contributing the better explanation (32%) were iTSS and VSS. Thus, the variables mostly influencing both biological ordinations were related to the input of nutrients in the influent water and the accumulation of biomass in the BRs. It is also reflected in the plots (Fig. 6, middle column) that COD, BOD_5 , iTSS and VSS showed

influences on the shaping of the Mycolata communities opposite to those observed for IT and HRT. The same divergent trends were found between pH and F/M ratio.

Remarkably, changes of the operating parameters HRT and SRT did not contribute a major explanation to the modifications of the structure of the Mycolata communities. In particular, the length of the vector representing SRT in the MDS plot of gDNA-based fingerprints was <0.200 (Fig. 6, middle column), indicating its low input as influencing factor (Gómez-Silván *et al.*, 2014b). Due to the long cell-doubling times of Mycolata, increasing SRTs are widely reported to favor their growth, and it is generally accepted that foaming in WWTPs occurs mostly when $SRT > 9$ days (de los Reyes, 2010b). The SRTs used in the present study (12 to 35 days) exceed this threshold value by a large margin, and the results of the MDS and BIO-ENV analyses imply that increases of this parameter once the 9 days limit was surpassed had no relevant influence. MBRs are often operated under long SRT to favor the removal of N and P and minimize sludge generation (Gómez-Silván *et al.*, 2014b; Le-Clech, 2010). Parada-Albarracín *et al.* (2012) systematically registered high densities of filamentous morphotypes in ultra- and microfiltration MBRs lacking performance issues when operated at SRTs ranging 20-35 days. Additionally, other studies failed to link consistently the increase of SRT to foaming episodes in full-scale WWTPs (Asvapathanagul *et al.*, 2012; Dhaliwal, 1979; Oerther *et al.*, 2001).

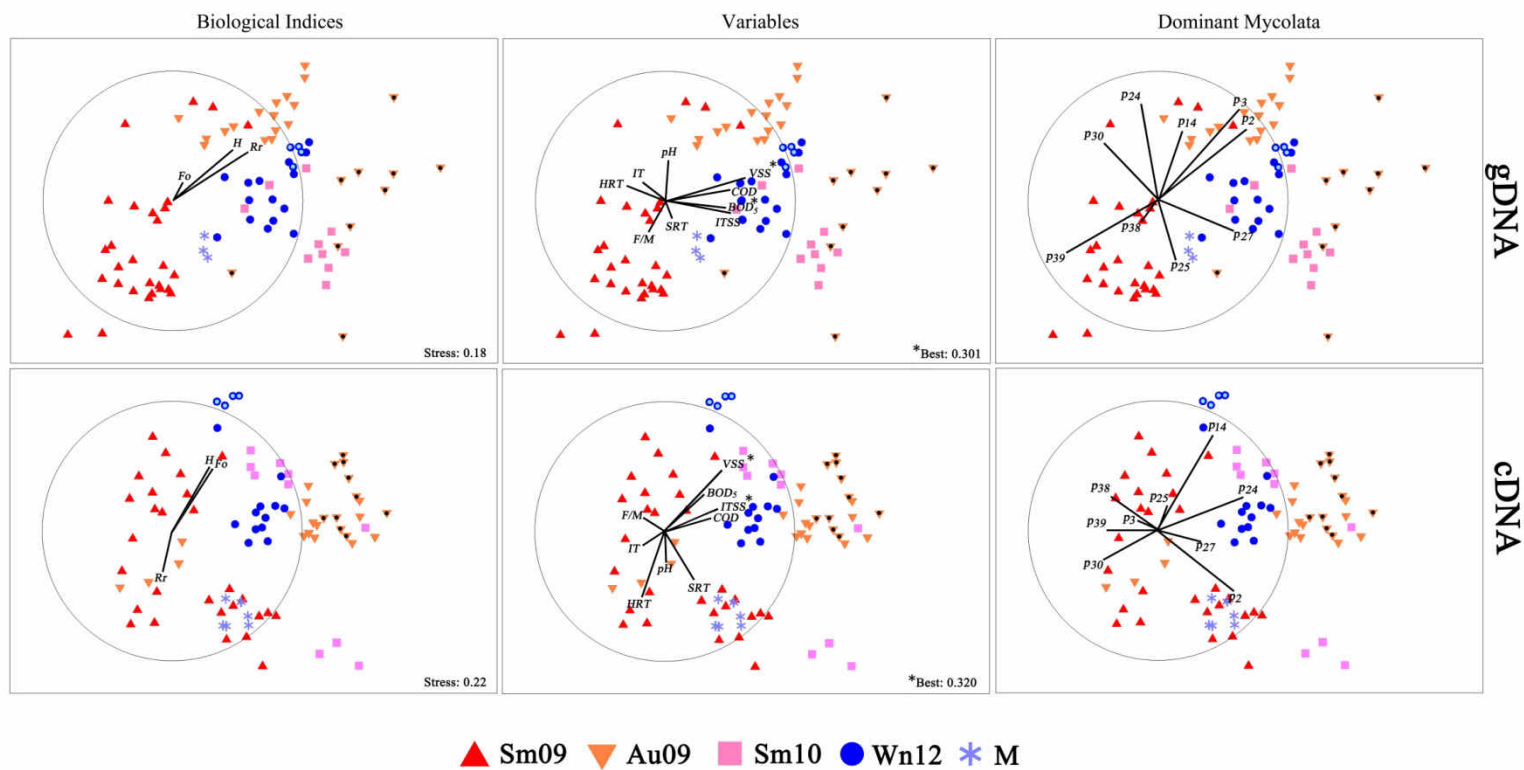


Fig. 6. Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots illustrating the distributions of the sludge samples of the full-scale membrane bioreactor (MBR) throughout the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases according to the relative similarity of their gDNA or cDNA-based fingerprints, based in the relative abundance of all the band-classes detected by TGGE. In the middle column, the vectors represent the direction along the samples of each operational parameter or environmental variable, showing the role each of them played in explaining the distribution of the samples TGGE-fingerprints and its directional influence. The BEST value represent the level of biological data explanation given by the variables which best explained its distribution and are marked with an asterisk (*). In the left column, the vectors represent the trends along the samples of the diversity indices range-weighted richness (Rr), functional organization (Fo) and Shannon's diversity index (H'). In the right column, the vectors represent the trends along the samples of the nine prevalent Mycolata phylotypes detected (incidence > 65% samples). The samples of experimental phases Au09 and Wn12 marked with an inner dot were retrieved while intense foaming occurred in the MBR.

3.5.1. Linking operational parameters and environmental variables to changes of the descriptive indices of diversity R_r , H' and F_o .

The BIO-ENV analyses (Fig. 6, Table S2) indicate that the population richness of total Mycolata (R_r index) benefited from increasing COD, BOD₅, iTSS, and VSS ($r= 0.72$ to 0.96) and lower F/M ratios ($r= -0.88$). In contrast, the R_r index of the actively growing Mycolata correlated negatively to all these variables ($r= -0.35$ to -0.86). The H' and F_o indices correlated positively with COD, BOD₅, iTSS, and VSS ($r= 0.30$ to 1) in both gDNA- and cDNA-based fingerprints. In summary, the availability of substrates in the influent water and the level of biomass retention in the MBR had opposite influences on the population richness of total and active Mycolata, but not on community evenness. Increasing pH, temperature (IT), and retention times (HRT, SRT) contributed to expand the R_r index of the active Mycolata ($r =0.72$ to 0.99), while at the same time these variables lowered their specialization degree (F_o index, $r= -0.45$ to -0.97). The increase of diversity contributes to the availability of populations displaying functional redundancy, in accordance with a lower specialization of the actively growing bacteria (Gómez-Silván *et al.*, 2014b).

3.5.2. Linking operational parameters and environmental variables to changes of the Mycolata community structure.

The vectors in Fig. 6 (right column) display the directional increase of ρ_s calculated for the relative abundance of the nine band-classes (P2, P3, P14, P24, P25, P27, P30, P38 and P39) representing Mycolata populations of high incidence in the TGGE fingerprints. Strong correlations were observed with the vectors standing for the variables best explaining the biological ordinations (BOD₅, iTSS and VSS) (Fig. 6, middle column, Table S2). The band-classes formed two major groups in each

ordination, according to the direction of the influence of these variables on their trends of relative abundance. In the gDNA-based fingerprints, P2, P3 and P27 showed high positive correlations with BOD₅, iTSS and VSS ($r= 0.52$ to 0.97), while the correlations were negative for P30, P38 and P39 ($r= -0.45$ to -0.97) (Fig. 6, Table S2). In the cDNA-based fingerprints, the correlations were positive with band-classes P14, P24, P25 and P27 ($r= 0.48$ to 1.00), and negative for P30 and P39 ($r= -0.68$ to -1.00).

P2, P3, P27 and P30 represented populations phylogenetically close to *Mycobacterium* spp. (Fig. 4). P2, P3 and P27 often showed similar trends throughout the gDNA-based ordination (positive correlations $r > 0.5$ to COD, BOD₅, iTSS and VSS, Table S2), while the response of P30 to the same variables was the opposite (Table S2). In particular, divergent trends were observed for P27 and P30 in the fingerprints of total and active populations (Fig.6, right column; Table S2). These results indicate an alternation of the dominating *Mycobacterium*-related phylotypes in the MBR in response to changes in the environmental conditions.

P38 and 39 represented populations phylogenetically close to *Gordonia amarae* (Fig. 4). The trends of relative abundance of P38 and P39 in the samples' ordination tended to be opposed to most of the *Mycobacterium*- and *Rhodococcus*-related band-classes, in particular in the gDNA-based fingerprints. Negative correlations were observed between BOD₅ and the relative abundance of P38 and P39 phylotypes (Fig. 6, Table S2), in agreement with previous studies who pointed to drops in BOD₅ concentration as the factor triggering excess proliferation of *G. amarae*-like cells in WWTPs (Asvapathanagul *et al.*, 2012).

In Fig. 6, the positions of the samples retrieved while the MBR experienced intense foaming in the Au09 and Wn12 phases are marked with an inner dot in the MDS

plots. These groups of samples tended to cluster separately in the ordinations, and their distribution was strongly correlated to the increase in the three best-explaining factors (BOD₅, iTSS and VSS). The plots in the right column of Fig 6. show which Mycolata phylotypes increased their relative abundance when intense foaming occurred (vectors pointing to the position of these samples in the ordination). Interesting differences between the two foaming episodes were observed, regarding the relative abundance of the active Mycolata populations. In the Au09 phase, band-classes P24 and P27 showed increasing relative abundances during the foaming episode, while in the Wn12 phase the vector representing band-class P14 pointed in the direction of the samples retrieved when foaming occurred. The vectors corresponding to band-classes P38 and P39 pointed in the opposite direction in both ordinations, evidencing that *Gordonia amarae*-related populations were not particularly abundant or actively growing while foaming was experienced in the MBR.

The BIO-ENV analysis revealed that environmental variables such as F/M ratio, pH, and IT were not contributing a major explanation to the biological ordinations; thus, they are represented by vectors of short lengths (Fig. 6). However, some of the prevalent band-classes in the fingerprints showed high correlations to these parameters (Fig. 6, Table S2), rendering information about the links between the behavior of specific Mycolata phylotypes and the variables influencing the MBR.

The F/M ratio has long been discussed as a factor involved in foaming in WWTPs (Dhaliwal *et al.*, 1979); however, the reports in the literature regarding the relevance of this variable are contradictory. In a 3-year survey conducted in 167 Italian full-scale WWTPs, foaming episodes were reported only in those operated at F/M ratios in the 0.1-0.2 range (Madoni *et al.*, 2000). Asvapathanagul *et al.* (2012) attributed the

proliferation of *Gordonia* spp. to drops in the F/M ratio < 0.2 , while Tsang *et al.* (2008) concluded that filamentous nocardioforms were competitively favored when F/M ratios were maintained below 0.5. Other studies discarded F/M as a significant parameter influencing Mycolata-related foaming (Dhaliwal, 1979, Frigon *et al.*, 2006). The results presented here indicate that the availability of biodegradable organics (BOD_5) and the concentration of VSS in the activated sludge were the parameters explaining the dynamics of the Mycolata populations, rather than the F/M ratio. This conclusion is consistent with the only previous study (Frigon *et al.*, 2006) applying multivariate analysis to link foaming incidence with plant process parameters, which reported that the influence of F/M was negligible.

The ability of Mycolata to switch between r- and K- growing strategies following F/M ratio fluctuations under stable long SRT has been postulated to explain the proliferation of Mycolata under both high and low substrate availabilities (de los Reyes, 2010b). Nevertheless, the validity of this theory has been questioned, mostly due to the lack of identification of particular Mycolata genera and species in the earlier literature (de los Reyes, 2010b). The later is supported by the results of the present study, since the relative abundance of populations evolutionarily close to *Gordonia amarae* (P38, P39) increased with higher F/M ratios in both gDNA- and cDNA-based fingerprints (Fig. 6, Table S2), while other Mycolata (i.e., band classes P2 and P24) were consistently favored by low F/M ratios. The *Mycobacterium*-related phylotypes P3 and P30 showed dissimilar responses to the F/M ratio when cDNA was targeted instead of gDNA, indicating that this variable favored their active growth but not their overall abundance in the Mycolata community.

Although no extreme pH values were recorded in the MBR throughout the experimental period (Fig. 2), the increase of this variable was highly correlated with the relative abundance of some of the *Mycobacterium*-related phylotypes in both ordinations (band-classes P2 and P30), while the opposite trends were observed for band-classes P25 and P38, representing phylotypes related to *Segniliparus rugosus* and *Gordonia amarae*, respectively. Dissimilar responses to pH were expected, since the tolerance to this parameter widely varies among genera and species of Mycolata (de los Reyes, 2010b).

The role of temperature on the occurrence of foaming and Mycolata proliferation in WWTPs has been evaluated in several previous works. Mycolata-related foaming is often reported during the late spring and summer months (Asvapathanagul *et al.*, 2012; de los Reyes and Raskin, 2002), consistently with the knowledge on *Gordonia amarae* temperature requirements, since the optimal growth of this species occurs between 23-37°C while growth has seldom been observed below 18°C (de los Reyes, 2010b). Foaming described at lower temperatures has been connected to Mycolata other than *Gordonia* (de los Reyes 2010b; de los Reyes and Raskin, 2002). In particular, *Rhodococcus* spp. are able to grow at temperatures as low as 5°C (Soddell and Seviour, 1995). The results described in this paper are in agreement with this previous knowledge, since the relative abundance of *Gordonia amarae*-related populations (P38 and P39) did not show negative correlations with IT, while in the case of other Mycolata (P14, P24, P25, P27) there were strong correlations to decreasing temperature, particularly in the cDNA based fingerprints, which reflected the dynamics of the actively growing populations (Table S2). The foaming incidents registered during the Au09 and Wn12 phases took place in late November (average IT < 20°C) and February

(average IT < 15°C), respectively. The results of the present study are also in agreement with previous works which concluded that temperature alone could not explain Mycolata-related foaming in WWTPs (Asvapathanagul *et al.*, 2012; Parada-Albarracín *et al.*, 2012).

Mycolata play important roles in WWTPs not only for their relevance in bulking and foaming episodes, but also due to their function in floc formation and stabilization and their biodegrading capacities, since this group comprises nutritionally versatile bacteria, able to secrete extracellular hydrolases and assimilate a wide variety of substrates (de los Reyes, 2010b; Nielsen *et al.*, 2009; Seviour, 2010). Linking the incidence and population dynamics of Mycolata to operating parameters and environmental variables is required to fully understand their relevance in WWTPs; however, few studies addressing this issue are currently available (Asvapathanagul *et al.*, 2012; de los Reyes and Raskin, 2002; Parada-Albarracín *et al.*, 2012), and seldom have taken advantage of multivariate analysis for this purpose (Frigon *et al.*, 2006). The cumulative influence of multiple parameters over the abundance of competing *Gordonia* spp. populations in WWTPs was discussed previously by Asvapathanagul *et al.* (2012), who highlighted the fact that these combined influence was overlooked in studies relying on single-variable analysis, justifying the contradictory results often reported in the earlier literature. The work described in this paper evidenced clear relationships between the population dynamics of Mycolata and a set of variables in a full-scale MBR. *Gordonia amarae*-related phylotypes were mostly favored by low BOD₅, iTSS and VSS concentrations, being also positively influenced by increasing temperatures. On the contrary, *Mycobacterium/Rhodococcus*-related Mycolata occurred and actively proliferated with higher influent contaminant load and VSS concentration, and

additionally were favored by low temperatures. These findings are of practical relevance for the prediction and control of foaming episodes in WWTPs.

4. Conclusions.

Foaming in WWTPs is often reported as a seasonal phenomenon; however, temperature cannot be regarded as the single triggering factor. Community structure and population dynamics of Mycolata were strongly influenced by the contaminant load of the influent and VSS concentration in the MBR. Given the broad phylogenetical and physiological diversity of Mycolata, the proliferation of particular genera or species was bound to different environmental conditions, making the design of global antifoaming strategies difficult. Specific diagnosis of the more abundant Mycolata in each particular WWTP looks the most promising tool to adjust the operating conditions for the successful prevention of foaming.

Fig. S1. Diagram of the full-scale membrane-bioreactor (MBR) used in the study.

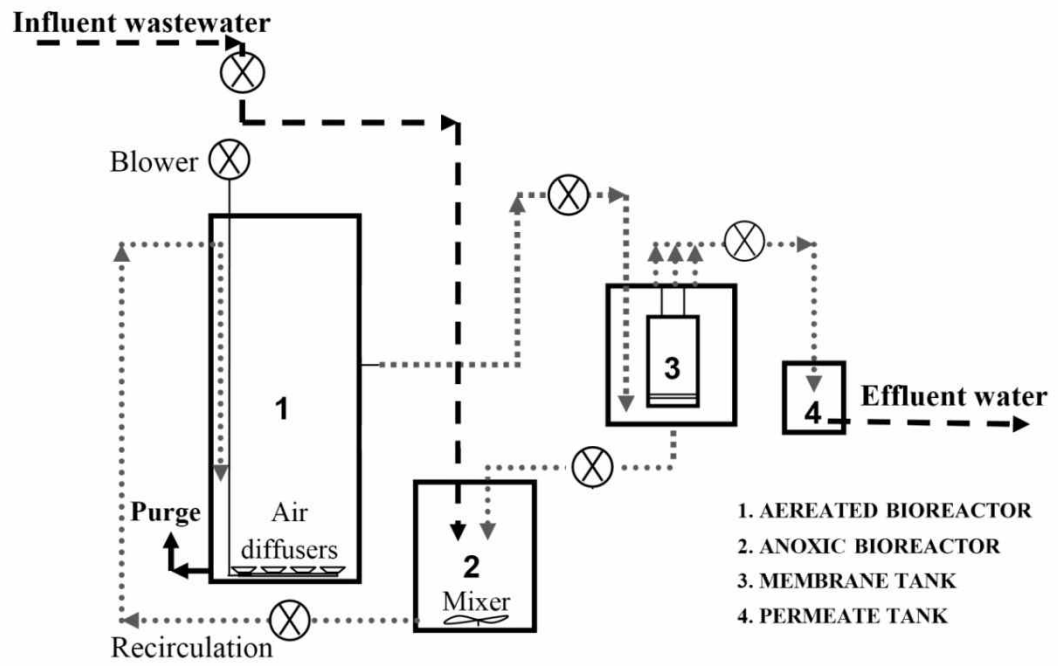


Table S1. Operation parameters and efficiency of organic matter removal in the MBR throughout the four experimental phases analyzed in the study.

Operation parameters				
Phase	Sampling period		HRT (h)	SRT (d)
Sm09	25 June-20 September 2009		38	20
Au09	21 September-22 December 2009		38	20
Sm10	29 June-27 July 2010		33	35
Wn12	3 February - 28 March 2012		30	12
Average effluent composition			Removal rates (%)	
Phase	BOD₅ (mgO₂/l)	COD(mg/l)	BOD₅	COD
Sm09	3.5±3.7	25.9±25.2	99.2±0.7	95.4±4.0
Au09	2.4±0.9	23.7±8.2	99.5±0.2	96.2±1.6
Sm10	2.3 ± 1.0	20.0 ± 11.0	99.3 ± 0.8	94.6 ± 2.3
Wn12	2.8 ± 1.3	25.0 ± 9.0	99.7 ± 0.8	98.0 ± 1.9

Table S2. Pearson product-moment correlation coefficients (r) between the vectors in Fig.6 representing the operating and environmental variables and the relative abundance of TGGE band-classes P2, P3, P14, P24, P25, P27, P30, P38 and P39, or the diversity indices (Range weighed richness, Rr; Functional organization, Fo; Shannon-Wiener, H'), in A) the gDNA-based fingerprints, and B), the cDNA-based fingerprints.

A. gDNA-based fingerprints

	Relative abundance of band-classes									Diversity indices			
	P2	P3	P14	P24	P25	P27	P30	P38	P39	Rr	Fo	H'	
COD	0.87	0.78	0.47	0.00	0.12	0.87	-0.55	-0.71	-0.94	COD	0.91	0.61	0.86
BOD₅	0.70	0.58	0.23	-0.26	0.37	0.97	-0.75	-0.51	-0.82	BOD₅	0.78	0.38	0.69
iTSS	0.64	0.52	0.15	-0.34	0.45	0.99	-0.80	-0.43	-0.76	iTSS	0.72	0.31	0.63
VSS	0.92	0.85	0.58	0.12	0.00	0.80	-0.45	-0.79	-0.97	VSS	0.96	0.70	0.91
F/M	-0.93	-0.98	-0.99	-0.79	0.71	-0.15	-0.31	0.99	0.85	F/M	-0.88	-1.00	-0.94
pH	0.69	0.79	0.97	0.97	-0.94	-0.28	0.68	-0.84	-0.55	pH	0.60	0.91	0.70
IT	-0.20	-0.04	0.34	0.75	-0.82	-0.95	0.99	-0.05	0.36	IT	-0.30	0.19	-0.18
SRT	-0.31	-0.46	-0.76	-0.98	1.00	0.66	-0.93	0.54	0.14	SRT	-0.21	-0.65	-0.33
HRT	-0.48	-0.34	0.05	0.51	-0.61	-1.00	0.90	0.25	0.63	HRT	-0.57	-0.12	-0.47

B. cDNA-based fingerprints

	Relative abundance of band-classes									Diversity indices			
	P2	P3	P14	P24	P25	P27	P30	P38	P39	Rr	Fo	H'	
COD	0.56	-0.74	0.73	1.00	0.64	0.86	-0.98	-0.60	-0.96	COD	-0.49	0.76	0.75
BOD₅	0.10	-0.33	0.96	0.92	0.93	0.52	-0.96	-0.16	-0.71	BOD₅	-0.84	0.98	0.97
iTSS	0.48	-0.67	0.79	1.00	0.71	0.81	-1.00	-0.53	-0.92	iTSS	-0.57	0.82	0.81
VSS	0.07	-0.30	0.97	0.90	0.94	0.49	-0.95	-0.13	-0.68	VSS	-0.86	0.98	0.98
F/M	-0.99	0.99	0.06	-0.58	0.18	-0.94	0.48	1.00	0.84	F/M	-0.35	0.01	0.02
pH	0.68	-0.49	-0.84	-0.31	-0.90	0.30	0.41	-0.64	-0.07	pH	0.96	-0.81	-0.82
IT	-0.30	0.51	-0.89	-0.98	-0.83	-0.68	1.00	0.35	0.83	IT	0.72	-0.91	-0.91
SRT	0.94	-0.83	-0.50	0.15	-0.60	0.70	-0.05	-0.92	-0.51	SRT	0.73	-0.45	-0.46
HRT	0.34	-0.11	-0.98	-0.65	-1.00	-0.09	0.73	-0.29	0.33	HRT	0.99	-0.97	-0.98

Chapter 2-Capítulo 2

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

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

Keywords: membrane bioreactor (MBR); qPCR; RT-qPCR; Mycolata; foaming; non-metric multidimensional scaling (MDS)

1. Introduction.

Since 1969, biological foaming has been reported worldwide in wastewater treatment plants (WWTPs) (de los Reyes, 2010a). This operational problem negatively influences plant performance and it is attributed to the excessive proliferation of filamentous microorganisms (Seviour, 2010). Mycolic-acid containing actinobacteria (herein Mycolata) are often involved in the generation of biological foaming, mostly due to their cell surface hydrophobicity and their ability to excrete extracellular polymers which act as biosurfactants (de los Reyes, 2010a; Petrovsky *et al.*, 2011). Although several operation strategies have been devised to control this phenomenon in WWTPs, they are often ineffective and in practice the incidence of biological foaming is hard to predict (Asvapathanagul *et al.*, 2012; Blackall *et al.*, 1991; Kragelund *et al.*, 2009).

To better cope with foaming with a more comprehensive understanding of its microbial background, many studies in the last decade have investigated the proliferation of Mycolata in WWTPs by different techniques, including conventional microscopy, quantitative FISH, or quantitative RNA membrane hybridization (de los Reyes and Raskin, 2002; Oerther *et al.*, 2001; Parada-Albarracín *et al.*, 2012). Quantitative PCR (qPCR) approaches have been recently introduced (Asvapathanagul *et al.*, 2012; Marrengane *et al.*, 2011), although focused only to the detection of *Gordonia*, since species from this genus (in particular *G. amarae*) are often connected to foaming issues in WWTPs (de los Reyes, 2010b). However, a wide phylogenetic diversity of Mycolata occurs in WWTPs (Davenport *et al.*, 2000), and foaming induced by genera other than *Gordonia* has been reported, particularly at temperatures below 20°C (de los Reyes, 2010b; Maza-Márquez *et al.*, 2015).

Studies robustly linking the changes of the operational and environmental conditions to the occurrence of foaming, the shifts in Mycolata abundance or their population dynamics contribute useful information for the prediction and control of foaming episodes in WWTPs; however, this approaches have seldom been attempted in the available literature (Asvapathanagul *et al.*, 2012; Frigon *et al.*, 2006; Maza-Márquez *et al.*, 2015). In consequence, there is still a lack of knowledge about the role of Mycolata and the factors which trigger the generation of foam by these microorganisms.

In membrane bioreactors (MBRs), the adverse effects of biological foaming affect the stability of the process at several levels (Maza-Márquez *et al.*, 2015). Nevertheless, very few studies are available focused on the identification and quantification of filamentous Mycolata in this type of WWTPs. In the present study, the abundance of total and metabolically active populations of Mycolata was evaluated in a full-scale MBR experiencing seasonal foaming, by means of qPCR and RT-qPCR targeting the 16S-rRNA gene sequence. The study spanned four different phases of operation in the MBR (Summer 2009, Autumn 2009, Summer 2010 and Winter 2012). Multivariate analyses of the biological data (non-metric multidimensional scaling, MDS, and BIO-ENV) were performed to evaluate the influence of operation parameters (hydraulic and solid retention times) and environmental conditions (fluctuations of temperature, pH, contaminant load of the influent wastewater and biomass accumulation) on the abundances of Mycolata populations in the MBR, in search of tools useful for the prediction and control of foaming in this kind of WWTPs.

2. Materials and Methods.

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

The MBR investigated in the study was described in detail previously (Gómez-Silván *et al.*, 2013) and a description can be found in Introduction (sub-paragraph 1.12). The MBR was installed at the facilities of EDAR Sur-WWTP (EMASAGRA, Granada Spain) and fed urban wastewater taken from its pretreatment, after being filtered through a 1-mm brush screen. The MBR was operated in pre-denitrification mode, as previously described (Gómez-Silván *et al.*, 2013).

The following parameters were measured automatically and registered continuously in a database: temperature, pH, and dissolved oxygen (DO) concentration inside the BRs; level of the tanks, transmembrane pressure and flow rates. The datasets were collected and analyzed with the aid of the Active Factory v.9.2 software (Wonderware, Spain). The daily medium internal temperature measured in the sludge of the MBR system (IT) was calculated by the software from data measured every second.

The abundances of total and active populations of Bacteria and Mycolata in the activated sludge of the MBR were monitored by qPCR/RT-qPCR during four different phases of operation: Summer 2009, Autumn 2009, Summer 2010 and Winter 2012 (Sm09, Au09, Sm10, and Wn12, respectively). In each phase, different sets of hydraulic retention time (HRT) and solid retention time (SRT) were used, and markedly different average characteristics of the influent wastewater and temperature of the activated sludge were recorded (summarized in Chapter 1: Fig. 1. and Table S1; Maza-Márquez *et al.*, 2015). Two episodes of foaming mainly affecting the anoxic BR were observed, from 26/11/2009 to 22/12/2009 (end of phase Au09) and from 7/02/2012 to 18/02/2012

(phase Wn12). Previous studies concluded that seasonal foaming in the MBR was related to Mycolata (Parada-Albarracín *et al.*, 2012; Maza-Márquez *et al.*, 2015).

Concentrations of suspended solids (total, iTSS; volatile, iVSS), total chemical oxygen demand (COD), and total biological oxygen demand at five days (BOD₅) were analyzed daily in influent and effluent (permeate) water. The influent and effluent water samples were automatically collected through the day using a time controller and a peristaltic pump, and were kept refrigerated at 4 °C until taken for analysis (Ruiz *et al.*, 2011). Concentrations of total and volatile suspended solids (TSS and VSS, respectively) were also measured daily in the sludge of both BRs. All the analyses were done in accordance with the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005). The effluent water satisfied the EU regulation legal requirements for effluent discharge to the environment (Directive 91/271/EEC, European Council, 1991) (Chapter 1, Table S1).

2.2. Activated sludge sampling for qPCR assays.

Activated sludge samples were retrieved from the MBR in each experimental phase when steady-state conditions were reached (at least threefold the SRT since the start-up date, Maza-Márquez *et al.*, 2015). Two samplings per experimental period were scheduled, with the exception of the Sm10 phase, when the BRs were sampled only once. Samples (200 ml) of activated sludge from both BRs (aerobic and anoxic) were collected in sterile plastic containers, transported from the experimental plant to the laboratory, and preserved until nucleic-acid extraction, following previously described protocols (Gómez-Silván *et al.*, 2014a).

2.3. Nucleic acids extraction and purification.

The extraction and purification of total DNA and RNA from the activated sludge samples were performed using the methods previously described in Chapter 1 (Maza-Márquez *et al.*, 2015).

2.4. Reverse transcription of RNA to cDNA.

Reverse transcription reactions were performed with Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's directions, and using 150-200 ng RNA in a final volume of 20 μ l. The specific primers (Table 1) were supplied by Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), and the dNTPs by Promega (Madison, USA). The quality and concentration of nucleic acids was measured using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific Waltham, MA USA).

2.5. qPCR assays.

The number of copies of 16S rDNA and 16S rRNA were quantified in each sample, using either extracted DNA or cDNA as templates for qPCR and previously described primer sets (Table 1). All quantitative amplifications were performed in triplicate.

qPCR was optimized using TrueStart Hot Start DNA polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA USA) and SYBR Green I (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in a total volume of 25 μ l, using a StepOnePlusTM Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Cycling conditions are summarized in Table 2. The qPCR reaction mixtures contained 0.125 μ l of Taq DNA polymerase (50 U/ μ l), 0.5 μ l of each primer (10 μ M), 2.5 μ l of 10 \times Taq Buffer (with KCl), 1.5 μ l MgCl₂ (25 mM), 0.5 μ l of dNTPs (10 mM), 0.0625 μ l of bovine serum albumin (BSA, 20 mg/ml), and 0.125 μ l SYBR green diluted in DMSO (20 \times).

Table 1. Primers used for the quantification of total and active populations of Bacteria and Mycolata in the MBR samples.

Group	Gene marker	Primers		References
		Name	Sequence (5'-3')	
Bacteria	V3-16S rRNA	P1 (341F)	CCTACGGGAGGCAGCAG	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)
		P2 (534R)	ATTACCGCGGCTGCTGG	
Mycolata	16S rRNA	F249	GATGGGCCCGCGGCCTATCA	(de Azeredo <i>et al.</i> , 2005)
		R689	TACACCAGGAATTCCAGTCT	

Table 2. qPCR cycling conditions used for the quantification of the abundance of total and active populations of Bacteria and Mycolata in the MBR samples.

	Total Bacteria	Mycolata	
Initial denaturalization	95°C 3 minutes	95°C 3 minutes	
Denaturalization	94°C 30 seconds	94°C 1 minute	
Amplification (x40 cycle)	Primers annealing	58°C 40 seconds	56°C 40 sec
	Elongation	72°C 40 seconds	72°C 40 seconds
Melting curve	60°C-95°C + 2°C/min Fluorescence measured each 15 seconds		
Hold	25°C		

qPCR calibration curves were constructed with the aid of plasmid standards harboring inserts of the targeted genes. Amplicons of 16S rDNA were generated from the culture collection strains *Pseudomonas putida* NCB 957 (quantification of Bacteria) and *Mycobacterium phlei* DSM 43239 (quantification of Mycolata). The PCR products were cloned with the aid of the TOPO[®] TA cloning[®] system (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's protocols. The calibration curves for the absolute quantification in the DNA samples

were generated using serial tenfold dilutions (10^{-1} - 10^{-8}) of linearized plasmid standards. For the absolute quantification in RNA samples, non-linearized plasmid standards were used as a template for *in vitro* transcription of the target genes into RNA, using T7-RNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), following the indications of the manufacturer. DNA traces were digested as already described, and RNA was retrotranscribed to cDNA, which was then tenfold diluted (10^{-1} - 10^{-8}) for the construction of the calibration curves. Template copy numbers per ng of the standards were estimated using the online software "Calculator for determining the number of copies of a template", as described by Jackson *et al.* (2013).

All the calibration curves had a correlation coefficient $r^2 > 0.99$ in all the assays. The efficiency of PCR amplification was between 90 and 100%. The ranges of the Ct values of the standard curves were always wider than the range of Ct values of the activated sludge samples and the number of copies detected in the samples was always included in the range of the detection limits imposed by the standard curves. All the qPCR amplifications resulted in a single band of the expected size for each set of primers, verified by electrophoresis in agarose and by melting curve analysis. The numbers of copies of the targeted genes were expressed per L of activated sludge in the MBR samples.

2.6. Statistics.

IBM SPSS Statistics v. 19 (SPSS INC., USA) was used for a preliminary analysis of data distributions and the subsequent statistical tests in search for differences among the groups of samples. As most of the data sets did not fit the normal distribution, a non-parametric analysis for related samples (Wilcoxon signed-rank test) was conducted for each biological assay and variable. A 95% significance level ($p < 0.05$) was selected.

The Primer software (PRIMER-E v. 6.0, Plymouth, UK) was used for analyses based in the sets of biological data derived from the quantifications by qPCR/RT-qPCR. Sample-resemblance matrices of the biological data (logarithms of the number of copies per L of rDNA or rRNA, and rRNA/rDNA ratios) were generated using the Bray Curtis coefficient of similarity. Based in these similarity matrices, non-parametric multidimensional scaling (MDS) was performed. The MDS plots display the distribution of the samples according to the similarity between their biological data. The stress level of the MDS plots indicates how well the variables' data fit into two dimensional spaces. Values of stress 0.05 indicate that they give an accurate representation of the data distribution (Clarke and Warwick, 2001).

Spearman rank correlations (ρ_s) were calculated between the ordinations of the biological data and the measured operational parameters and environmental variables. Those correlations were represented in the plots as vectors, which illustrate a variable's directional influence and its role in explaining the biological data ordination. Prior to the multivariate analyses, the data sets were transformed to $\log(x+1)$ and normalized. The correlations between the variables were analyzed using Draftsman's Plot, and data subsets with mutual correlation averaging more than 0.90 were replaced by a single representative. Nine variables were finally included: BOD₅, COD and concentration of total suspended solids in the influent wastewater (iTSS); IT, pH, concentration of volatile suspended solids in the activated sludge of the BRs (VSS), HRT, SRT, and food to microorganisms (F/M) ratio (kg BOD₅ per kg VSS in the aerated BR per day).

In order to link the distribution patterns of the biological data to the set of variables, BIO-ENV analysis was carried out (Clarke and Warwick, 2001). BIO-ENV calculates the Spearman rank correlations (ρ_s) between the similarity matrix of

biological data (created using the Bray Curtis coefficient) in which the ordination method (MDS) is based and the similarity matrices (created using Euclidean Distance) derived from all the possible sequential combinations of the measured variables. The highest value obtained (BEST value) indicates which combination of variables best explains the biological ordination. The statistical significance of the BEST values was tested by a global permutation test (499 permutations).

3. Results and Discussion.

3.1. Absolute and relative quantifications of total and metabolically active Bacteria and Mycolata.

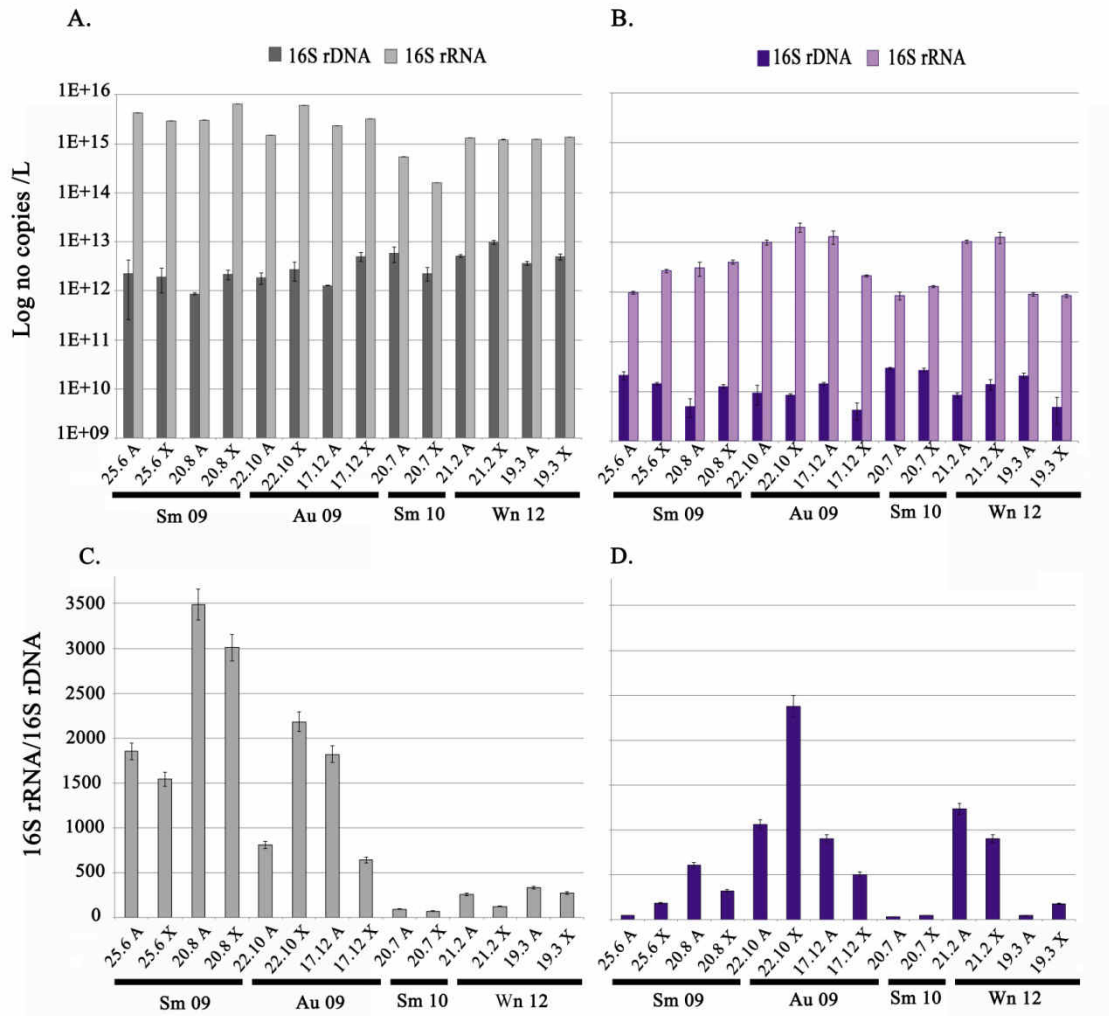
One of the advantages of simultaneously quantifying 16S rDNA and rRNA is that a complete overview of both the abundances and activity of the targeted populations in a given system is gained in the same set of experiments. Fig. 1A and 1B show the average numbers of copies of 16S rDNA and rRNA of both Bacteria and Mycolata, quantified throughout the four experimental periods in both MBR bioreactors (aerated and anoxic). The Ribosomal RNA Database, (<http://rrndb.umms.med.umich.edu>) estimates that the average number of 16 rDNA copies per cell of Bacteria is 4.02, while in the case of Mycolata an average of 2.66 copies per cell is calculated on the basis of the data of known genomes of the genera *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Segniliparus* and *Tsukamurella*.

According to the Wilcoxon signed-rank test, the abundance of total Bacteria populations remained fairly stable over time (average numbers of 16S rDNA copies/L activated sludge in the 10^{12} order), regardless of the changes of the operating and environmental conditions (Fig. 1E). There were also no significant differences between

the BRs (Table S2-A). The average numbers of total Bacteria fell in the range described in previous works performed in MBRs treating urban wastewater (Zhang *et al.*, 2010; Gómez-Silván *et al.*, 2014). Nevertheless, the cDNA-based quantifications showed more variation (Fig. 1A). Significant differences were revealed between the experimental phases (Fig. 1E), and also between the BRs in the Au09 and Sm10 periods (Table S2-A). The average abundance of 16S rRNA copies of Bacteria was significantly lower (one logarithmic unit) in the samples retrieved during the Sm10 period.

Although the number of copies of 16S rRNA was always significantly higher than the number of copies of 16S rDNA measured in the same sample, the rRNA/rDNA ratios were highly variable (Fig. 1C), and the average ratios were significantly different in each of the four experimental periods (Fig. 1F). The largest proportions of actively growing Bacteria were recorded in the Sm09 and Au09 phases, with 16S rRNA/rDNA ratios over 1000 (Fig. 1F).

(Next page) Fig. 1. (A) Numbers of copies of 16S rDNA and rRNA of Bacteria (in logarithmic scale), per L of activated sludge, quantified by qPCR in the full-scale membrane bioreactor (MBR) during the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. (B) Numbers of copies of 16S rDNA and rRNA of Mycolata (in logarithmic scale), per L of activated sludge, quantified by qPCR in the full-scale membrane bioreactor (MBR) during the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. (C) 16S rRNA/rDNA ratios of Bacteria. (D) 16S rRNA/rDNA ratios of Mycolata. (E) Average and standard deviation of the numbers of copies of 16S rDNA and 16S rRNA of Bacteria and Mycolata quantified in the MBR, expressed per L of activated sludge. Data with the same lower-case letter do not significantly differ according to the Wilcoxon signed -rank test ($p < 0.05$). (F) Average and standard deviation of the 16S rRNA/ rDNA ratios of Bacteria and Mycolata quantified in the MBR, expressed per L of activated sludge. Data with the same lower-case letter do not significantly differ according to the Wilcoxon signed -rank test ($p < 0.05$).



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

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

The abundance of total Mycolata populations (Fig.1B) remained also stable throughout the study (average numbers of 16S rDNA copies/L activated sludge in the 10^{10} order), with little significant differences between the experimental phases, according to the Wilcoxon signed-rank test (Fig.1E). No significant differences were detected between BRs (Table S2-B). In contrast, when the metabolically active Mycolata populations were targeted, significant variations were observed among the four experimental phases (Fig. 1E), and also between the BRs in the Au09 period (Table S2-B). Remarkably, the average numbers of copies of 16S rRNA of Mycolata were up to one order of magnitude higher in the samples of the Au09 and Wn12 periods (Fig. 1B and Fig. 1E), during which the MBR experienced foaming issues. This fact was more clearly reflected when the 16S rRNA/rDNA ratios of Mycolata were calculated (Fig.1D). Throughout the two consecutive experimental phases Sm09 and Au09 (operated with the same SRT and HRT), the ratio increased progressively, peaking in the anoxic BR (sample 22.10.09.X) five weeks before a severe foaming episode took place. On average, the 16S rRNA/rDNA ratio of Mycolata was 4-fold increased from the Sm09 to the Au09 phase (Fig.1F). The ratio was also particularly high in samples retrieved from the MBR three days after the recession of a shorter foaming episode observed during the Wn12 period (samples 21.2.12.A and 21.2.12.X), with values similar to those recorded after one month of foaming incidence in phase Au09 (samples 17.12.09A and 17.12.09.X). The increase of the 16S rRNA/rDNA ratio of Mycolata was clearly related to the occurrence of foaming, in contrast with the results observed when the full Bacteria group was targeted, which yielded the highest ratios in the Sm09 phase when no foaming was experienced (Fig. 1C, D, and F).

Fig. 2 shows the relative abundance of 16S rDNA and rRNA copies of Mycolata versus Bacteria. Mycolata always represented a relatively small proportion of the Bacteria populations in the samples (0.2-1.2% of rDNA copies). The Wn12 period was characterized for the lowest average relative abundance of Mycolata among the total populations (0.24% of rDNA copies), while a particularly low fraction of Mycolata among the active Bacteria (0.07% of rRNA copies) was registered during the Sm09 period (Fig. 2B). On average, Mycolata displayed higher relative abundances among the total populations of Bacteria (0.60% of rDNA copies) than among the actively growing populations (0.35% of rRNA copies). These results are in accordance with earlier studies which reported that a high proportion of the Mycolata cells found in activated sludge of WWTPs display low metabolic rates (de los Reyes 2010a; Nielsen *et al.*, 2009). However, the average tendency was inverted in the samples which showed the highest 16S rRNA/rDNA ratios of Mycolata, detected in the Au09 and Wn12 experimental phases in relation with foaming occurrence.

Davenport *et al.* (2000), by means of quantitative FISH, identified a threshold of 2×10^9 Mycolata cells per L of activated sludge for the occurrence of foam, later supported by a survey of 14 full-scale WWTPs (Davenport *et al.*, 2008). Nevertheless, in the present study, the absolute abundances of Mycolata were calculated using a qPCR approach, and largely exceeded this threshold value in all the experimental phases (Fig. 1E). Indeed, the highest relative abundance of Mycolata within the Bacteria community was recorded during the Sm10 phase (Fig. 2B), operated under the longest SRT (35 days) and in the absence of foaming episodes. Davenport *et al.* (2008) found densities of Mycolata beyond the threshold in three WWTPs lacking foaming issues, and attributed these exceptions to the predominance of Mycolata with low cell wall hydrophobicity

(*Corynebacterium* and *Dietzia*). However, this is not the case in the present study, since previous work (Maza-Márquez *et al.*, 2015) revealed that the prevalent Mycolata populations in the MBR during the four experimental phases were mainly related to *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Gordonia* and *Segniliparus*. It must also be taken into consideration that quantitative FISH measures may subestimate the total cell numbers of Mycolata since the method only detects cells with high numbers of ribosomes (Petrovsky *et al.*, 2011), hence they may differ from measures based on qPCR targeting DNA.

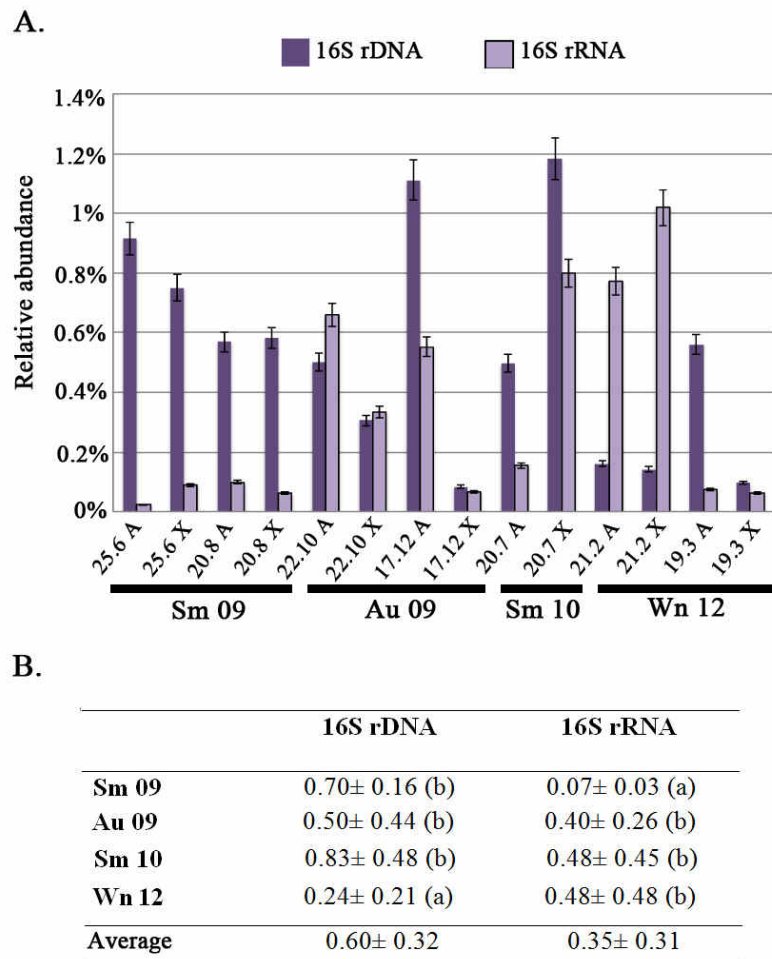


Fig. 2. A. Relative abundance of Mycolata, expressed as percentage of total Bacteria, based on 16S rDNA and 16S rRNA measurements in samples of the full-scale membrane bioreactor (MBR) throughout the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. B. Average and standard deviation of the relative abundance of 16S rDNA and rRNA of Mycolata versus Bacteria. Data with the same lower-case letter do not significantly differ according to the Wilcoxon signed -rank test ($p < 0.05$).

The universal validity of the threshold value proposed by Davenport *et al.* (2008) was already questioned by Petrovsky *et al.* (2011), who compared the foaming ability of 65 pure cultures of filamentous species of Mycolata under controlled laboratory conditions. These authors demonstrated that not all the Mycolata pure cultures exhibited foaming capacity, and that the cell density threshold values of the strains able to generate foam varied up to three orders of magnitude. Additionally, there are conditions which can strongly influence the foaming threshold values, such as the type of carbon substrates available and the concentration of biosurfactants (Frigon *et al.*, 2006; Petrovsky *et al.*, 2011), which are likely to differ among WWTPs. MBRs are particularly characterized by biomass retention and are often operated under long SRTs, features which strongly influence the biology of the system (Gómez-Silván *et al.*, 2013). In a previous study based on conventional microscopy, high densities of Mycolata were continuously detected in the absence of foam formation in a long-term survey of ultra- and micro-filtration MBRs (Parada-Albarracín *et al.*, 2012).

Since foaming is a physical phenomenon caused by the entrapment of gas within a film of liquid, previous studies (Carr *et al.*, 2005; de los Reyes *et al.*, 1998; Oerther *et al.*, 2001; Petrovsky *et al.*, 2011) suggested that even filamentous Actinomycetes which are metabolically inactive contribute to foam formation and stabilization. However, the results of the present study demonstrate that the occurrence of foaming in the MBR was triggered by a high ratio of active versus total populations of Mycolata, rather than being induced only by a threshold number of total Mycolata. This conclusion is also in concordance with previous observations by Asvapathanagul *et al.* (2012), who hypothesized that *Gordonia*-related foaming was triggered by a rapid increase of their cell numbers, detected 40 days before foam was effectively observed. A similar pattern

was clearly displayed in phase Au09 of the present study, when the numbers of metabolically active Mycolata were measured 5 weeks before foaming (Fig 1B). Both the work by Asvapathanagul *et al.* (2012) and the results of the present study showed that once foaming occurred following the overgrowth event, the foam persisted even though the numbers of Mycolata decreased.

3.2. Linking the abundance of total and active Mycolata populations to changes of the environmental variables and operation factors in the MBR.

The MDS plots generated for the absolute abundance of 16S rDNA and rRNA copies of Mycolata in the samples are shown in Fig 3 A and B, respectively, where the distance between any two sample points reflects their relative similarity. Bubbles of increasing size were superimposed over the plots, representing the values of absolute abundance of total or active Mycolata in each sample. The vectors in the plots illustrate the direction of the linear relationships between the variables (operational and environmental parameters) and the samples' ordination, while vector lengths indicate the strength of the correlations. According to the BEST values, SRT and pH were the variables mostly explaining (29.4%) the abundance of total Mycolata populations (16S rDNA) throughout the samples, while BOD₅ and pH contributed the best explanation (50.4%) in the case of the metabolically active Mycolata (16S rRNA).

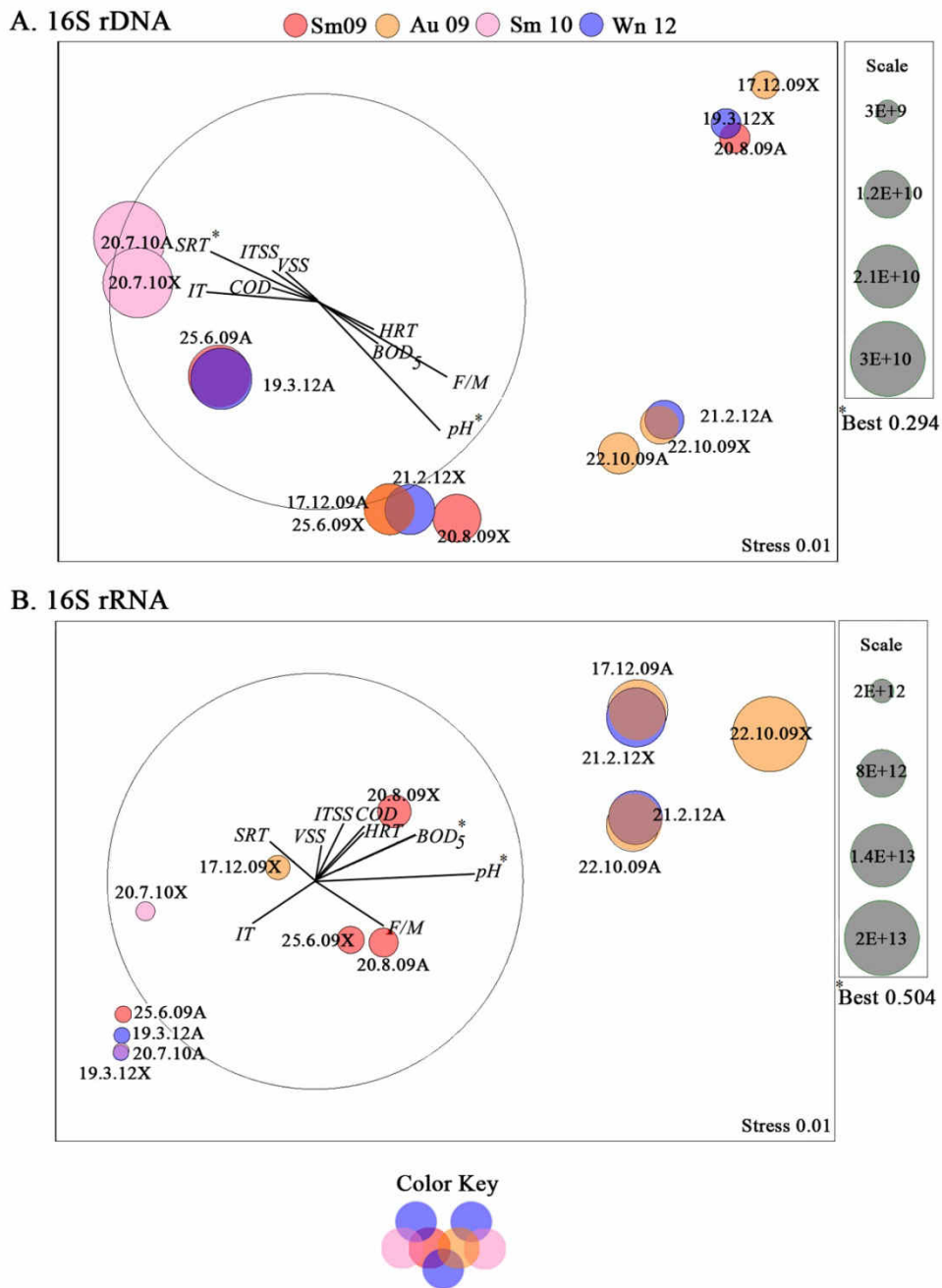


Fig. 3. Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots illustrating the distributions of the activated sludge samples retrieved from the full-scale membrane bioreactor (MBR) throughout the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases, according to the relative similarity of 16S rDNA (A) or 16S rRNA-based (B) quantifications of Mycolata. Bubbles of increasing size were superimposed over the plots, representing the values of absolute abundance of total or active Mycolata in each sample. The vectors represent the direction along the samples of each operational parameter or environmental variable, showing the role each of them played in explaining the distribution of the quantifications and its directional influence. The variables which best explained the distribution of the biological data according to the BIO-ENV analyses are marked with an asterisk (*).

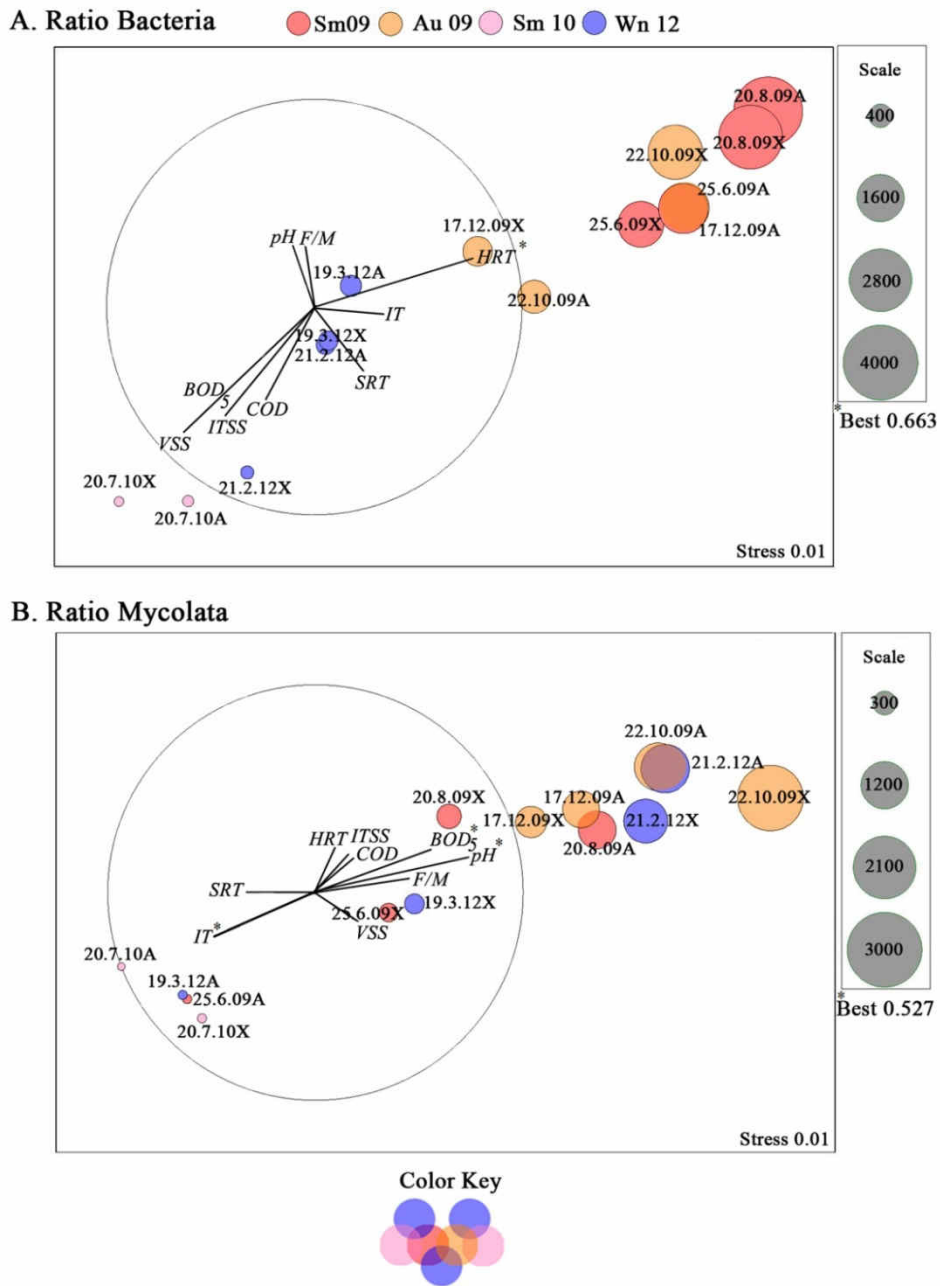


Fig. 4. Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots illustrating the distributions of the activated sludge samples retrieved from the full-scale membrane bioreactor (MBR) throughout the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases according to the relative similarity of their 16S rRNA/rDNA ratios of Bacteria (A.) and Mycolata (B.). Bubbles of increasing size were superimposed over the plots, representing the values of the ratios in each sample. The vectors represent the direction along the samples of each operational parameter or environmental variable, showing the role each of them played in explaining the distribution of the 16S rRNA/rDNA ratios and its directional influence. The variables which best explained the distribution of the biological data according to the BIO-ENV analyses are marked with an asterisk (*).

Interestingly, the variables included in the analysis were distributed in two main groups in both MDS plots, and showed opposed influences on the ordinations of the samples, depending on whether the total Mycolata or the metabolically active populations were targeted by qPCR. This distribution of the influence of the external factors was particularly clear for the quantification of the abundance of total Mycolata (Fig. 3A). Variables IT and SRT were positively correlated to the position of samples displaying the highest abundances, while negative correlations were observed for HRT, pH, BOD₅ and F/M ratio. Together with the best explaining factors (SRT and pH), IT and F/M showed strong directional influences through the ordination (vector lengths > 0.5).

The ordination of samples according to the 16S rRNA-based quantification of Mycolata is shown in Fig. 3B. The samples displaying the highest abundance of active Mycolata tended to group separately to the right side of the ordination plot. The group was comprised of samples of the Au09 and Wn12 periods, when foaming was observed. The highest abundances of actively growing Mycolata were correlated positively with the best explaining factors (BOD₅ and pH) and HRT, and negatively with IT and SRT.

MDS plots relating the variables to the ordination of the samples according to the 16S rRNA/rDNA of both Bacteria and Mycolata are shown in Fig. 4. It is worth noting that the samples' ordination and the factors which best explained the distribution of the ratios throughout the samples differed when Bacteria or Mycolata were targeted. The ratio of active versus total populations of Bacteria was best explained by HRT (66.3%, Fig. 4A), while in the case of Mycolata, BOD₅, pH and IT contributed the best explanation (52.7%, Fig. 4B). The highest ratios of active versus total Mycolata, observed in the samples of the two experimental phases when foaming was experienced,

were favored by higher pH, higher concentrations of substrates in the influent water (BOD₅, COD, iTSS), higher F/M ratio, lower IT, and shorter SRT (Fig. 4B). Remarkably, a previous study revealed that BOD₅, COD, iTSS, and IT had the same directional influences on the shaping of the Mycolata communities leading to foaming in the MBR (Maza-Márquez *et al.*, 2015).

High temperatures (IT) favored the abundance of total Mycolata populations in the MBR (Fig. 3A), but at the same time influenced negatively their metabolic rates (Fig. 3B and Fig. 4B). The two episodes of foaming observed during the Au09 and Wn12 phases took place at IT < 20°C, and a previous study (Maza-Márquez *et al.*, 2015) showed that this variable acted in conjunction with other parameters increasing the relative abundance of active populations related to *Rhodococcus* and *Mycobacterium*. In contrast, *Gordonia amarae*-related phylotypes dominated in the MBR during the Sm09 phase (Maza-Márquez *et al.*, 2015) favored by warmer temperatures, in agreement with previous studies (de los Reyes, 2010b). However, even if *G. amarae*-related Mycolata were numerically dominant at higher IT in the MBR, the results presented here demonstrated that they remained at low metabolic levels due to the influence of other factors (Fig. 4B), and foaming was not triggered.

The F/M ratio was negatively correlated to the abundance of total Mycolata (Fig. 3A) and positively to their 16S rRNA/rDNA ratio (Fig. 4B). This factor has been thoroughly analyzed in relation with foaming in previous studies, with contradictory conclusions. While several authors found a link between the occurrence of foaming and F/M ratios below 0.5-0.2 (Asvathanagul *et al.*, 2012; Madoni *et al.*, 2000; Tsang *et al.*, 2008), studies based on multivariate analysis did not report a significant correlation (Frigon *et al.*, 2006). The results presented here corroborate that higher abundance of

total Mycolata occurred at lower F/M ratios (Fig. 3A); however, the proportion of active versus total Mycolata, which was found linked to foaming occurrence, was enlarged as the F/M ratios increased (Fig. 4B). Asvapathanagul *et al.* (2012) postulated a similar influence of F/M ratio and BOD₅ concentration on *Gordonia*'s rapid growth preceding foaming.

Several previous works have evaluated and discussed the influence of SRT on foaming incidence in WWTPs. The general consensus is that foaming is favored by long SRTs (de los Reyes, 2010a; Jenkins *et al.*, 2004); however, many studies failed to link consistently this operation parameter to foaming occurrence (Blackall *et al.*, 1991; Dhaliwal, 1979; Oether *et al.*, 2001; Parada-Albarracín *et al.*, 2012). Using qPCR, Asvapathanagul *et al.* (2012) concluded that short-term increases of SRT promoted the abundance of *G. amarae*. The results presented here throw a new light on the former observations, since operation at longer SRTs was found to correlate with a higher abundance of total Mycolata in the MBR (Fig. 3A), but at the same time it reduced their metabolically active fraction (Fig. 3B, Fig. 4B). During the Sm10 phase, the MBR was operated with the longest SRT (35 days). This period was characterized also for the highest temperatures (average IT= 28.4°C) and the lowest average values of pH (6.9) and F/M ratio (0.11). The combination of these operational and environmental conditions led to the highest absolute abundance of total populations of Mycolata but minimized their metabolic activity, and under such conditions foaming did not take place.

4. Conclusions.

The ratio of metabolically active versus total Mycolata was a key parameter triggering foaming in the MBR and is a candidate predictive tool, although the proposal of an universal threshold ratio useful for the evaluation of the potential risk of foaming will require gathering data from a larger number of MBRs. The use of multivariate analysis revealed robust links between operational and environmental variables and the ratio of active Mycolata in the MBR. While the fluctuations of the contaminant load of the influent, pH and temperature are hardly controllable in full-scale WWTPs, F/M ratio and SRT are operational factors often regulated in search of foaming control. The results of the present study corroborate their relevance for the management of foaming in MBRs.

Table S2. Average and standard deviation of the numbers of copies of 16S rDNA and rRNA of bacteria (A.) and Mycolata (B.) per L of activated sludge quantified in the aerated and anoxic bioreactors of the MBR during the Sm 09, Au 09, Sm 10 and Wn 12 experimental phases. For each experimental phase and target molecule (16S rDNA or 16S rRNA), data on different bioreactors marked with the same lower-case letter do not significantly differ, according to the Wilcoxon signed -rank test ($p < 0.05$).

A. Bacteria

Phase	16S rDNA		16S rRNA	
	Aerated	Anoxic	Aerated	Anoxic
Sm 09	$1.6 \times 10^{12} \pm 9.9 \times 10^{11}$ (a)	$2.0 \times 10^{12} \pm 1.7 \times 10^{11}$ (a)	$3.6 \times 10^{15} \pm 8.2 \times 10^{14}$ (a)	$4.7 \times 10^{15} \pm 2.5 \times 10^{15}$ (a)
Au 09	$1.6 \times 10^{12} \pm 3.9 \times 10^{11}$ (a)	$3.8 \times 10^{12} \pm 1.6 \times 10^{12}$ (a)	$1.9 \times 10^{15} \pm 5.9 \times 10^{14}$ (a)	$4.6 \times 10^{15} \pm 1.9 \times 10^{15}$ (b)
Sm 10	$5.7 \times 10^{12} \pm 2.0 \times 10^{12}$ (a)	$2.0 \times 10^{12} \pm 6.9 \times 10^{11}$ (a)	$5.4 \times 10^{14} \pm 5.5 \times 10^{10}$ (a)	$1.6 \times 10^{14} \pm 1.9 \times 10^{11}$ (b)
Wn 12	$4.4 \times 10^{12} \pm 1.0 \times 10^{12}$ (a)	$7.3 \times 10^{12} \pm 3.3 \times 10^{12}$ (a)	$1.3 \times 10^{15} \pm 7.2 \times 10^{13}$ (a)	$1.3 \times 10^{15} \pm 9.1 \times 10^{13}$ (a)

B. Mycolata

Phase	16S rDNA		16S rRNA	
	Aerated	Anoxic	Aerated	Anoxic
Sm 09	$1.3 \times 10^{10} \pm 1.1 \times 10^{10}$ (a)	$1.3 \times 10^{10} \pm 1.2 \times 10^9$ (a)	$1.9 \times 10^{12} \pm 1.2 \times 10^{12}$ (a)	$3.3 \times 10^{12} \pm 7.9 \times 10^{11}$ (a)
Au 09	$1.2 \times 10^{10} \pm 3.5 \times 10^9$ (a)	$6.3 \times 10^9 \pm 2.9 \times 10^9$ (a)	$1.1 \times 10^{13} \pm 3.1 \times 10^{12}$ (a)	$1.1 \times 10^{13} \pm 1.0 \times 10^{13}$ (b)
Sm 10	$2.9 \times 10^{10} \pm 1.5 \times 10^9$ (a)	$2.7 \times 10^{10} \pm 2.1 \times 10^9$ (a)	$8.4 \times 10^{11} \pm 1.5 \times 10^{11}$ (a)	$1.3 \times 10^{12} \pm 5.3 \times 10^{10}$ (a)
Wn 12	$1.4 \times 10^{10} \pm 8.7 \times 10^9$ (a)	$9.2 \times 10^9 \pm 6.3 \times 10^9$ (a)	$5.5 \times 10^{12} \pm 5.1 \times 10^{12}$ (a)	$6.6 \times 10^{12} \pm 6.6 \times 10^{12}$ (a)

Chapter 3-Capítulo 3

Estudio de la diversidad y dinámica de poblaciones de hongos en un biorreactor de membrana sumergida (MBR) mediante *fingerprinting* y pirosecuenciación 454: Influencia de las variables de operación y ambientales.

Resumen.

La diversidad y dinámica de las poblaciones de hongos fue monitorizada en un biorreactor de membrana sumergida (MBR) a escala real durante 4 periodos experimentales con diferentes condiciones ambientales y operacionales. El estudio se realizó mediante *fingerprinting* TGGE, empleando como marcadores moleculares el gen codificante del 18S rRNA y la región intergénica ITS2. Conjuntamente con el estudio de TGGE, se evaluó la diversidad de hongos mediante pirosecuenciación 454, empleando como marcador el gen codificante del 18S rRNA. Ambas aproximaciones muestran que los hongos se encuentran presentes en estos sistemas, viéndose afectados por las condiciones ambientales y operacionales. El análisis de los índices descriptivos de la diversidad describe una comunidad formada por un bajo número de especies, capaz de mantener su funcionalidad en el sistema y con un perfil flexible de adaptación a las cambiantes condiciones ambientales y operacionales. El análisis BIO-ENV reveló que el pH fue la variable que aportó mayor nivel de explicación de la estructura de la comunidad fúngica tanto analizada mediante *fingerprinting* como por pirosecuenciación 454, aunque también se observaron correlaciones fuertes con otras variables ambientales y operacionales. Los Phyla dominantes fueron *Ascomycota* y

Chytridicomycota, que mostraron una clara tendencia antagónica, ya que sus abundancias relativas se correlacionaron con signo opuesto con todas las variables del sistema incluidas en el análisis multivariante. Entre los miembros de la comunidad fúngica encontramos filotipos relacionados con géneros que desarrollan importantes funciones en biorremediación por sus actividades enzimáticas y capacidades metabólicas, así como géneros de morfología filamentosa, que podrían estar implicados en la formación de agregados celulares o generar problemas de operación. Se detectaron cambios significativos en la composición de la comunidad de hongos cuando el MBR experimentó episodios de formación de espumas.

Palabras clave: biorreactor de membrana (MBR); hongos; *fingerprinting*; 454-pirosecuenciación; *foaming*; escalado multidimensional no métrico (MDS).

1. Introducción.

Los hongos son microorganismos extraordinariamente versátiles desde el punto de vista metabólico, capaces de degradar lípidos, carbohidratos complejos, compuestos fenólicos y otras moléculas persistentes, mediante la producción de enzimas extracelulares (Sankaran *et al.*, 2010). Aunque el empleo de hongos es una opción bien establecida para el tratamiento especializado de aguas residuales industriales y agrícolas con alta carga de contaminantes (Anastasi *et al.*, 2012; Jarboui *et al.*, 2012, 2013), como se comentó en el apartado 1.10 del Capítulo de Introducción, el potencial de estos organismos en los sistemas de tratamiento del agua residual urbana ha sido tradicionalmente poco estudiado o subestimado y la evaluación de su importancia ecológica ha recibido poca atención (Basak *et al.*, 2014; Lopandic *et al.*, 2013;

Watanabe *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011, 2013). Además, se desconoce si estos microorganismos pueden sobrevivir en los sistemas de fangos activos durante un tiempo prolongado (Liébana *et al.*, 2014).

Sin embargo, hay estudios recientes que han destacado la importancia de los hongos en el proceso de depuración de las aguas residuales, en particular por su contribución a la degradación de la materia orgánica (Evans y Seviour, 2012; Yang *et al.*, 2013). Algunos hongos tienen potencial para la eliminación de compuestos nitrogenados, debido a su capacidad desnitrificante (Weber *et al.*, 2007). Los hongos filamentosos, al igual que las bacterias, cumplen papeles estructurales en el proceso de formación y estabilidad de los agregados floculares o granulares, actuando igual que un esqueleto en la formación de los mismos, proporcionando un sustrato para el crecimiento de las bacterias (Weber *et al.*, 2007). Como se indicó en el apartado 1.4 del Capítulo de Introducción, la arquitectura de los agregados celulares es compleja, siendo su correcta formación esencial para la calidad del lodo (Aonofriesei y Petrosanu, 2007). Los hongos filamentosos están implicados en diversos problemas de operación de las plantas de tratamiento, como la obstrucción de filtros y tuberías, flotación de fangos, formación de espumas y el taponamiento biológico de membranas de filtración (*biofouling*) (Baker y Dudley, 1998; Richard, 2003; Weber *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2011).

La mayoría de los trabajos disponibles hasta la fecha dedicados al estudio de los hongos en los tratamientos de agua residual se han basado en técnicas de enriquecimiento, aislamiento y cultivo (Awad y Kraume, 2011; Bux *et al.*, 1994; Fakhru'l-Razi *et al.*, 2002, Kacprzak *et al.*, 2005; Liébana *et al.*, 2015). Sin embargo, estos métodos no son la mejor opción para abordar el estudio de la ecología de los

microorganismos presentes en estos sistemas, pues limitan su correcta caracterización. Estas limitaciones han sido corregidas con el desarrollo de métodos independientes de cultivo, siendo éstos herramientas excelentes para evaluar la diversidad y abundancia de las poblaciones de hongos en su hábitat natural, sin necesidad de aislarlos y cultivarlos (Hoshino, 2012). Los pocos estudios realizados con técnicas moleculares en plantas a escala real se han basado en la construcción de bibliotecas de clones y métodos de *fingerprinting*, e indican que los hongos están presentes con gran frecuencia en estos sistemas, siendo su diversidad amplia (Evans y Seviour, 2012; Evans *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011, Zheng *et al.*, 2011). Las características del agua residual y las condiciones de operación parecen fundamentales para configurar la estructura de la comunidad de hongos (Evans y Seviour, 2012; Yang *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011).

El conocimiento de la ecología, fisiología y actividades bioquímicas de la microbiota es fundamental para el óptimo control operacional de los sistemas de tratamiento del agua residual (Cabrol y Malhautier 2011; Nielsen *et al.*, 2012). No obstante, los papeles que desempeñan los hongos están todavía poco explorados. Con el desarrollo reciente de las técnicas de secuenciación de nueva generación (*next generation sequencing*, NGS), se ha abierto un nuevo campo de estudio en profundidad de las comunidades de estos microorganismos. Las técnicas NGS juegan actualmente un papel importante en todos los estudios de ecología microbiana (Mardis, 2008), facilitando la detección de poblaciones no cultivables en comunidades complejas (Blaalid *et al.*, 2012; Jumpponen y Jones, 2009). La plataforma de pirosecuenciación 454 es una metodología NGS que produce en cada carrera millones de lecturas de secuencias de ADN a partir de una muestra ambiental, incrementando las posibilidades de detectar poblaciones poco abundantes en la comunidad microbiana (Shokralla *et al.*,

2012). La pirosecuenciación es una técnica rápida, con un coste aproximadamente 20-30 veces inferior al de la tradicional secuenciación de Sanger, y además no requiere clonación (Lim *et al.*, 2010). Esta tecnología permite realizar los análisis metagenómicos superando en varios órdenes de magnitud a la tradicional secuenciación con Sanger y además posibilita la detección de nuevos filotipos y filotipos raros (Tedersoo *et al.*, 2010).

Los sistemas de biorreactores de membrana (MBR) combinan el proceso de fangos activos con la separación sólido-líquido mediante un sistema de membranas de micro- o ultra filtración, constituyendo una tecnología avanzada para el tratamiento del agua residual. Esta tecnología genera un agua de elevada calidad y libre de patógenos, además de proporcionar numerosas ventajas operacionales con respecto al sistema de fangos activos convencional, como se detalló en el apartado 1.2 del Capítulo de Introducción. En los MBR, la diversidad y funciones de los hongos son prácticamente desconocidas. El crecimiento de los hongos puede verse favorecido en estos sistemas comparado con los fangos activos convencionales, debido a que operan bajo largos tiempos de retención de sólidos (Gómez Silván *et al.*, 2014a).

En este estudio, investigamos la diversidad de hongos en un sistema a escala real para el tratamiento de agua residual urbana basado en la tecnología MBR. Para ello, se ha evaluado la estructura de las comunidades fúngicas mediante *fingerprinting* empleando electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), completando el estudio de la diversidad de las poblaciones mediante pirosecuenciación 454. Además, se ha estudiado la relación existente entre los cambios experimentados en las diferentes variables ambientales y operacionales que influyen sobre el MBR y la dinámica de las

poblaciones de hongos identificados en el sistema, empleando métodos de análisis multivariante.

2. Materiales y Métodos.

2.1. Descripción de la planta experimental y condiciones de operación.

El MBR utilizado en el estudio se encuentra descrito en detalle en el apartado 1.12 del Capítulo de Introducción. La planta se ubica en la EDAR Sur (Churriana, Granada), siendo gestionada por la empresa EMASAGRA. El sistema se alimenta con agua residual obtenida de la salida del desarenador (pretratamiento), donde previamente a la entrada a los biorreactores (BRs) atraviesa un tamiz de 1 mm, siguiendo las especificaciones del fabricante de los módulos de membrana. El sistema trabaja para eliminar materia orgánica y nitrógeno del agua residual mediante nitrificación-desnitrificación, siendo necesario para estos objetivos el empleo de dos BRs, uno aireado y otro anóxico.

La diversidad de hongos en el fango activo del MBR fue monitorizada a lo largo de cuatro fases experimentales: Verano 2009, Otoño 2009, Verano 2010 e Invierno 2012 (Sm09, Au09, Sm10, Wn12, respectivamente). En cada una de las fases de estudio el MBR operó con diferentes condiciones de tiempo de Retención Hidráulico (HRT) y tiempo de Retención Celular (SRT), además se registraron diferentes características del influente de agua residual (iTSS, iVSS, COD, BOD₅), ratio F/M, pH y temperatura del fango activo (IT) y acumulación de biomasa en los BRs (VSS, TSS) (Capítulo 1, Maza-Márquez *et al.*, 2015). A lo largo del estudio, se observaron dos episodios de formación de espumas, afectando principalmente al BR anóxico. El primer episodio tuvo lugar desde 26/11/2009 al 22/12/2009 (final del periodo Au09) y el segundo episodio se desarrolló desde el 7/02/2012 al 18/02/2012 (periodo Wn12).

2.2. Muestreo de fangos activos para el estudio de la diversidad de hongos mediante TGGE y pirosecuenciación.

Los muestreos en el MBR se realizaron en cada fase experimental una vez alcanzada la estabilidad del sistema (tres veces el SRT desde la puesta en marcha, Maza-Márquez *et al.*, 2015). De cada BR (aireado y anóxico) se recogieron quincenalmente muestras de fango activo (200 ml) en recipientes de plástico estériles, siendo transportados desde la planta experimental hasta el laboratorio, y siendo conservados según protocolos anteriormente descritos (Gómez-Silván *et al.*, 2014a) hasta la extracción de los ácidos nucleicos.

2.3. Extracción y purificación de los ácidos nucleicos.

La extracción y purificación del DNA genómico (gDNA) y del RNA se realizó siguiendo protocolos anteriormente descritos en el Capítulo 1 (Maza-Márquez *et al.*, 2015).

2.4. Amplificación de la región ITS2 y el gen 18S rRNA para el análisis *fingerprinting* mediante electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE).

El conocimiento actual de la diversidad filogenética de los hongos es aún limitado y se basa en gran parte en las especies que se han obtenido en cultivo puro (Jones *et al.*, 2011). En particular, existen aún muchas incógnitas en la resolución de los linajes basales de los hongos y los organismos denominados *fungus-like*, que representan un grupo muy subestimado en su diversidad y abundancia reales (Shelest y Voigt, 2014). El diseño de cebadores universales para estudios moleculares de las comunidades de hongos en muestras ambientales plantea por tanto más dificultades que el de las bacterias. Aunque existe un gran número de parejas de cebadores propuestos como universales para la amplificación de secuencias fúngicas, muchas de esas parejas no se

han validado frente a otros organismos y es muy frecuente que amplifiquen un cierto porcentaje de secuencias de otros microorganismos eucariotas, en particular los cebadores dirigidos a la amplificación de los genes codificantes de los rRNAs (Mitchell y Zuccaro, 2006). Las secuencias de las regiones ITS presentan mayor variabilidad que las de los genes codificantes de los rRNAs y permiten el diseño de cebadores más específicos, aunque presentan otros inconvenientes, como el polimorfismo de su longitud, que dificultan el análisis filogenético (Mitchell y Zuccaro, 2006). Por esta razón, en este estudio se optó por emplear simultáneamente dos marcadores moleculares diferentes, al objeto de disponer de una mayor información.

Para la caracterización de la estructura de la comunidad de hongos en el MBR, se realizó un estudio de *fingerprinting* mediante electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), empleando como marcadores moleculares el gen codificante del 18S rRNA y la región intergénica ITS2, la cual incluye parte del gen 5.8 rRNA. Debido a la plasticidad que presenta la técnica TGGE, se pudieron estudiar tanto las poblaciones totales de hongos como las poblaciones más activas. Los perfiles de TGGE de las poblaciones totales de hongos se generaron mediante la amplificación parcial del gen del 18S rRNA y de la región ITS2 a partir de gDNA procedente del fango activo del MBR, y los perfiles de las poblaciones más activas de hongos se derivaron de la retrotranscripción del RNA ambiental a cDNA, que se empleó posteriormente para la amplificación por PCR de la secuencia del 18S rRNA (RT-PCR).

El análisis *fingerprinting* de TGGE se realizó a partir de amplicones generados mediante PCR en dos pasos, estrategia que se aplica frecuentemente al emplear esta técnica (Gómez-Silván *et al.*, 2014b). En todas las reacciones de PCR y RT-PCR se incluyeron controles negativos carentes de la molécula molde. Además, tras cada

amplificación, se comprobó el tamaño y pureza de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.

Para el primer paso de la amplificación de la región ITS2 a partir de gDNA, se utilizaron los cebadores ITS-3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), descritos por White *et al.* (1990) (Fig. 1). Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 μ l, conteniendo 5 μ l de 10 \times True Start Hot Start *Taq* Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 1,5 μ l de MgCl₂ (25 mM) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 1 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO), 0,5 μ l de dNTPs (10 mM) (MBL, Córdoba, España), 0,1 μ l de cada primer (100 μ M) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0,2 μ l de True Start Hot Start *Taq* DNA polimerasa (5 U/ μ l) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), y 1 μ l de seroalbúmina bovina (BSA) (20 mg/ml) (New England Biolabs, UK). El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 7 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos más anillamiento a 52°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min, y una extensión final a 72°C durante 10 min.

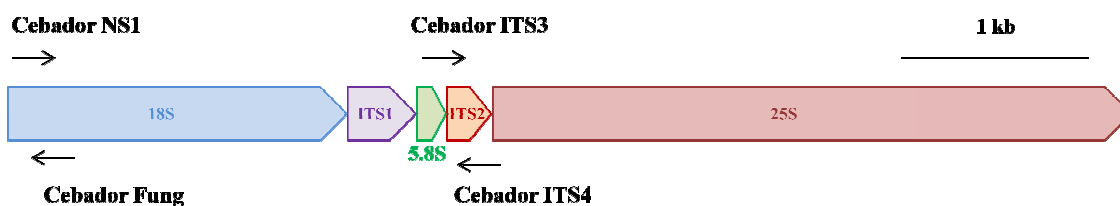


Fig. 1. Localización de los cebadores empleados para la amplificación de la secuencia parcial del gen 18S rRNA y la región ITS2 de hongos. El mapa se ha generado empleando como base la secuencia del locus RDN37-1 del cromosoma XII de *Saccharomyces cerevisiae* cepa S288C, disponible en la página web *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org>).

Para el primer paso de amplificación parcial del gen codificante del 18S rRNA a partir de gDNA, se utilizó el set de cebadores NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') y Fung (5'-ATTCCCCGTTACCCGTTG-3'), descritos por Evans y Seviour (2012) (Fig. 1). Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 μ l, conteniendo 5 μ l de 10 \times True Start Hot Start *Taq* Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 5 μ l de MgCl₂ (25 mM) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 2,5 μ l DMSO, 1 μ l de dNTPs (10 mM) (MBL, Córdoba, España), 0,2 μ l de cada primer (100 μ M) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0,3 μ l de True Start Hot Start *Taq* DNA polimerasa (5 U/ μ l) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), y 1 μ l de BSA (20 mg/ml) (New England Biolabs, UK). El programa de amplificación consistió en una primera desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos más anillamiento a 50°C durante 30 segundos y extensión a 72° C durante 45 segundos, y una extensión final a 72°C durante 7 min.

Para realizar la retrotranscripción de RNA a cDNA y el primer paso de amplificación de la secuencia parcial del 18S rRNA, se empleó el sistema SuperScript III One-Step RT-PCR, con Platinum *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). La retrotranscripción tuvo lugar en un paso inicial incubando las mezclas de reacción a 55° C durante 30 min, y a continuación se desarrolló la amplificación de la secuencia correspondiente al 18S rRNA a partir de cDNA, siguiendo las instrucciones del fabricante y usando los cebadores NS1 y Fung bajo las mismas condiciones de reacción y ciclos de temperaturas descritos anteriormente.

Todos los amplicones (tamaño aproximado de 350 pb) generados tanto a partir de gDNA como cDNA fueron diluidos 1:60 y utilizados como molde para el segundo paso de amplificación por PCR, utilizando los mismos cebadores usados en el primer paso de cada amplificación. Los cebadores NS1 e ITS3 se flanquearon en 5' con colas de 40 nt de guanina y citosina, necesarias para la desnaturalización parcial de los fragmentos durante el TGGE, permitiendo la separación de los mismos (Muyzer *et al.*, 1993). Las reacciones de PCR y los programas de amplificación se realizaron en las condiciones anteriormente descritas.

2.5. TGGE.

La electroforesis en gel con gradiente de temperatura se realizó empleando el sistema TGGE MAXI (Watman-Biometra, Goettingen, Alemania). Para la separación de los distintos fragmentos, se emplearon geles desnaturalizantes de poliacrilamida (6% poliacrilamida; 37,5:1 poliacrilamida-bisacrilamida), 20% formamida desionizada, 2% de glicerol, y 8 M de urea. Para la electroforesis se utilizó tampón TAE (2 ×) corriendo a 125 V durante 18 h. El gradiente de temperatura óptimo para la correcta separación de las bandas fue 25-45°C para el gen del 18S rRNA y 30-50°C para la región ITS2. Tras la electroforesis, se tiñó el gel con plata empleando el kit Gel Code Silver Staining (Pierce, Thermo Fisher Scientific Rockford, IL, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.6. Análisis de los patrones de bandas obtenidos por TGGE.

Los patrones de bandas obtenidos por TGGE fueron normalizados con el programa Gel Compar II v. 5.101 (Applied Maths, Bélgica). Para el análisis de clústeres, los patrones de bandas se compararon utilizando el coeficiente de Dice, que es un índice de similitud dependiente de la asignación de clases de bandas. Este coeficiente establece la similitud

entre los perfiles teniendo en cuenta únicamente la presencia/ausencia de las clases de bandas en las muestras (incidencia). En la asignación de bandas a cada clase, se permitió una tolerancia del 1% de la longitud total del gel (Gómez-Silván *et al.*, 2014b). Los dendrogramas que relacionan la similitud de los distintos perfiles de bandas de las muestras se construyeron mediante el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*, o Método de agrupamiento pareado no ponderado con media aritmética). Para la evaluación de la validez del agrupamiento de las muestras en clústeres en los dendrogramas, se utilizó el método del coeficiente de correlación cofenética, que expresa la consistencia de un clúster calculando la correlación entre las similitudes del dendrograma y la matriz de distancia por pares (Sokal y Rohlf, 1962). La intensidad relativa de cada una de las bandas en toda la curva densitométrica correspondiente a los carriles de TGGE fue calculada con el programa Gel Compar II (Gómez-Silván *et al.*, 2014b). A partir de la abundancia relativa de las clases de bandas en la normalización de los geles de TGGE, se calcularon diferentes índices descriptivos de la diversidad biológica: rango ponderado de riqueza (Rr), organización funcional (Fo), e índice de diversidad de Shannon (H') (Gómez-Silván *et al.*, 2014b; Marzorati *et al.*, 2008).

2.7. Reamplificación y secuenciación del DNA de las bandas separadas mediante de TGGE.

El DNA de las bandas individuales visualizadas en los geles fue extraído, reamplificado y secuenciado. Las bandas se punzaron en su parte central con una punta de pipeta estéril y la porción obtenida fue resuspendida en 10 μ l de agua bidestilada grado PCR. 3-5 μ l de esta resuspensión se utilizaron directamente como molde para la reamplificación con los cebadores adecuados y siguiendo el protocolo ya descrito

anteriormente. Los productos de la amplificación se purificaron y se concentraron mediante el kit comercial "QIAquick PCR purification kit" (Quiagen, Hamburgo, Alemania). Los amplicones purificados fueron secuenciados mediante el equipo ABI-PRISM® 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (CSIC, Granada).

2.8. Análisis filogenético de las secuencias de DNA separadas mediante TGGE.

Los datos de secuencias de todos los amplicones fueron comparados con las secuencias indexadas en la base de datos GenBank del servidor web del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y los servidores de las bases de datos de secuencias de hongos AFTOL (<http://aftol.org>) y UNITE (<https://unite.ut.ee>). El programa BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) fue utilizado para el análisis de similitud de las secuencias.

2.9. Estudio de la diversidad fúngica mediante pirosecuenciación 454.

Un total de 14 muestras de gDNA correspondientes a los 4 periodos experimentales (Sm09, Au09, Sm10, Wn12) fueron seleccionadas para realizar el análisis de la comunidad de hongos mediante pirosecuenciación 454. Se secuenciaron amplicones parciales del gen del 18S rRNA empleando los cebadores NS1 y Fung. El análisis completo fue realizado a partir de las muestras de gDNA (430-480 ng/ μ l) en el centro Research and Testing Laboratory (<http://www.researchandtesting.com>, Lubbock, Texas, USA) con la plataforma 454 GS FLX+ (Roche, Branford, USA), siguiendo protocolos previamente estandarizados en dicho laboratorio.

2.10. Análisis bioinformático de los datos de pirosecuenciación.

El procesado, análisis informático, normalización, anotación y análisis estadísticos de los datos derivados de la pirosecuenciación 454 de bibliotecas de amplicones del gen del 18S rRNA fue llevado a cabo con la colaboración de los Dres. Frederiek Maarten Kerckhof y Ramiro Vílchez Vargas (Laboratory of Microbial Ecology, Universidad de Gante).

Para el análisis informático de los datos de las secuencias brutas, se empleó la plataforma informática Mothur 1.33.3, versión de marzo de 2014 (Schloss *et al.*, 2009, <http://www.mothur.org>). En primer lugar, se empleó el comando `sff.multiple` con el set de parámetros por defecto, exceptuando el ajuste de la máxima longitud permitida para homopolímeros $n=9$. En resumen, este comando usa la información de los archivos de datos brutos derivados de la plataforma 454 (archivos `.sff`) para extraer las secuencias en formato FASTA, sus coeficientes de calidad y los correspondientes diagramas de flujo. Después, se usó el comando `trim.flows` como primer filtro de calidad. Este comando permite eliminar las secuencias demasiado cortas o con excesivo número de errores. A continuación, se ejecutó el comando `shhh.flows` para eliminar ruido de fondo (*denoising*). Finalmente, se ejecutó el comando `trim.seqs` para eliminar la parte de las secuencias correspondiente a los cebadores, sin permitir ninguna discordancia (*mismatch*) de la secuencia. Los comandos `trim.flows`, `shhh.flows` y `trim.seqs` se emplearon usando el set de parámetros por defecto.

A continuación, se desarrolló el procedimiento operativo estándar (SOP por sus siglas en inglés) para datos derivados de la plataforma 454, como se describe en la página web de Mothur (http://www.mothur.org/wiki/454_SOP). Las secuencias únicas se alinearon con las de la base de datos de referencia para secuencias eucariotas SSU

Silva Reference, formateada para Mothur (SSURef v102, 15/02/2010, conteniendo 1238 secuencias, <http://www.arb-silva.de>). Se empleó el comando `screen.seqs` que ajustó las secuencias a un mismo espacio de alineamiento, escogiendo las posiciones inicial y final óptimas de manera que se retuvieran el 99% de las secuencias. En este paso, se eliminaron 1006 secuencias únicas (3257 lecturas), de un set inicial de 252422 lecturas. Después, se filtró el alineamiento para eliminar posiciones carentes de nucleótidos en el total de las secuencias (*gaps*), resultando en alineamientos con una longitud total de 614 nt. Las secuencias se agruparon en preclústeres con aquellas de mayor semejanza, con una diferencia máxima de 2 nt, y se clasificaron empleando el Clasificador Bayesiano Ingenuo (Naïve Bayesian classifier, Wang *et al.*, 2007) y Silva SSURef Eukarya Taxonomy. Se calcularon las distancias genéticas y se definieron los filotipos (PHYs) mediante análisis de clústeres por el algoritmo UPGMA, generando una tabla del número de lecturas por cada PHY al 97% de similitud (*cut-off* = 3%), y escogiendo secuencias representativas de cada PHY.

Para aquellos PHYs que no resultaron clasificados al 97% de similitud, se realizó una clasificación adicional empleando NCBI BLAST+ suite (Camacho *et al.*, 2009) a través de un servidor Linux remoto, comparando las secuencias con las depositadas en la NT Nucleotide Collection. Los diez resultados con mayor puntuación se seleccionaron para cada PHY y se mapeó su taxonomía con la interfaz online Galaxy (<http://usegalaxy.org>, Blakenberg *et al.*, 2010; Goecks *et al.*, 2010). Finalmente, las secuencias de los PHYs que restaban por clasificar se enfrentaron a la base de datos GenBank en el servidor BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) del National Centre for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Todas aquellas secuencias con nivel de similitud $\geq 90\%$ con secuencias de hongos a nivel de género/especie se

agregaron a la lista efectiva de PHYs, siguiendo los criterios de porcentaje mínimo de similitud de Lanzén *et al.* (2012) para asignarlos a taxones (97% para género, 95% para familia, 90% para orden, 85% para clase, 80% para phylum).

A partir de la tabla con la lista efectiva de PHYs, se aplicó un filtro adicional eliminando aquellos detectados en una sola muestra y con una sola lectura. Posteriormente, se excluyeron todas las PHYs cuya secuencia no fue asignada al Reino Fungi mediante ninguno de los métodos de clasificación aplicados, y se calculó el número resultante de lecturas totales por muestra. Para realizar la comparación de la diversidad de las distintas muestras analizadas, y al objeto de evitar sesgos debidos a diferencias en el tamaño del muestreo, se normalizaron los tamaños de muestra al de aquella con menor número de lecturas de secuencias fúngicas (muestra 22.10.09.A, 1656 lecturas), mediante remuestreo con el paquete phyloseq (MacMurdie y Holmes, 2013) para R v. 3.2.0 (<http://www.r-project.org>).

El programa informático PAST v. 3.06 (Hammer *et al.*, 2006) se empleó para la construcción de las curvas de rarefacción y el cálculos de los índices de diversidad Chao-1 (Chao, 1984), Shannon-Weaver (Shannon and Weaver, 1963), Simpson (Simpson, 1949) e índice de equidad de Pielou (*Pielou's evenness*, Pielou, 1966). Para todos los índices se calculó el intervalo de confianza al 95% mediante el método de muestreo con reemplazamiento (*bootstrap*). El índice de cobertura de Good (Good, 1953) se calculó para cada muestra con la fórmula:

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

Donde:

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

N= número total de secuencias leídas en una muestra

Para comparar la diversidad fúngica en las distintas muestras de fango del MBR a partir de los datos de secuencias obtenidos de las muestras de DNA, se construyeron mapas de abundancia relativa (*heatmaps*) empleando los paquetes *gplots* y *RColorBrewer* para R v. 3.2.0 (<http://www.r-project.org>). También se calcularon los coeficientes de similitud de Bray-Curtis entre las muestras a partir de los datos de abundancia relativa de las PHYs en las mismas, empleando el programa informático *PRIMER-E* v. 6.0, (Plymouth, UK). Este programa se utilizó también para construir los dendrogramas correspondientes mediante el algoritmo UPGMA, determinando la significancia de los clústeres con el método *SIMPROF* (*similarity profile analysis*) (Clarke *et al.*, 2008), estableciendo un 95% de intervalo de confianza ($p < 0,05$). Por último, a partir de la matriz de similitud entre muestras determinada con el coeficiente de Bray Curtis, se realizó un análisis *SIMPER* (*similarity percentages analysis* o análisis de porcentajes de similitud), que determina cuál es la contribución de cada PHY a la divergencia observada entre los distintos pares de muestras (Clarke y Warwick, 2001).

2.11. Análisis estadístico de los datos biológicos obtenidos.

El análisis estadístico se realizó con el paquete IBM SPSS Statistics v.19 (SPSS INC., USA), utilizando el test no paramétrico de prueba de rangos de Wilcoxon para muestras relacionadas. El nivel de significancia establecido fue 95% ($p < 0,05$).

El software Primer (*PRIMER-E*, v. 6.0, Plymouth, UK) fue utilizado para el análisis de los datos biológicos generados a partir de los perfiles de TGGE y de la pirosecuenciación 454. Para las ordenaciones biológicas, se crearon matrices de similitud entre muestras, basadas en el coeficiente de Bray Curtis. A partir de las matrices de similitud, se generaron ordenaciones biológicas en dos dimensiones

mediante escalado multidimensional no métrico (MDS). También se realizó un análisis ANOSIM, que midió las diferencias entre los distintos agrupamientos posibles de las muestras (procedentes del BRs aireado o anóxico; perfiles obtenidos a partir de gDNA o cDNA; o periodo experimental muestreado, Sm09, Au09, Sm10 o Wn12). El nivel de estrés en las gráficas indica cómo de bien representadas se encuentran las muestras biológicas en un espacio de dos dimensiones. Un estrés cercano a 0.2 indica una representación válida de la distribución de las muestras, y los valores $<0,10$ indican una representación precisa de dicha distribución (Clarke and Warwick, 2001). También se calcularon las correlaciones de rangos de Spearman (ρ_s) entre la ordenación de los datos biológicos y los factores ambientales y operacionales. Estas correlaciones aparecen representadas en los gráficos como vectores, que indican la dirección de la influencia de cada variable, y cuya longitud indica la fuerza de su contribución a la explicación de la ordenación de las muestras biológicas. Previo al análisis multivariante, las variables (ambientales y operacionales) se transformaron a $\log(x+1)$ (excepto el pH) y se normalizaron, para evitar interferencias debido a diferencias de unidades de medida en el posterior análisis. Las correlaciones entre las diferentes variables fueron analizadas con Draftsman's Plot. Cuando varias variables presentaron una correlación $> 0,90$ sólo una de ellas se seleccionó como representante del grupo, puesto que sus efectos no son estadísticamente distinguibles. Nueve variables fueron finalmente incluidas: BOD₅, COD, y concentración de sólidos totales en el influente (iTSS); IT, pH, concentración de sólidos en suspensión en los BRs de fango activo (VSS), HRT, SRT, y ratio F/M (alimento/microorganismo) (kg BOD₅/kg VSS día en el BR aireado).

El análisis BIO-ENV (análisis biota-entorno, Clarke y Warwick, 2001) permitió relacionar la distribución de los datos biológicos derivados del estudio de *fingerprinting*

o pirosecuenciación 454 con el set de variables del sistema (ambientales y operacionales). BIO-ENV calcula la correlación entre la matriz de similitud de datos biológicos (creada con el coeficiente de Bray Curtis) y las matrices de similitud derivadas de la combinación secuencial de las variables del sistema (creada a partir de la distancia Euclídea). El mayor coeficiente obtenido a partir de todas las combinaciones posibles de variables (análisis BEST) indica el conjunto de las mismas que mejor explica la ordenación biológica. El nivel de significancia estadística del análisis BEST fue determinado con un test de permutación global (499 permutaciones) (Clarke *et al.* 2008). En las ordenaciones MDS, se representaron también como vectores las correlaciones de rango de Spearman (ρ_s) para los índices de diversidad (Rr, H' y Fo), así como las de los datos biológicos de los estudios de *fingerprinting* (abundancia relativa de las clases de bandas identificadas en TGGE) y pirosecuenciación 454 (abundancia relativa de los distintos PHYs), con el fin de indicar la dirección de sus tendencias a lo largo de las ordenaciones biológicas.

3. Resultados y Discusión.

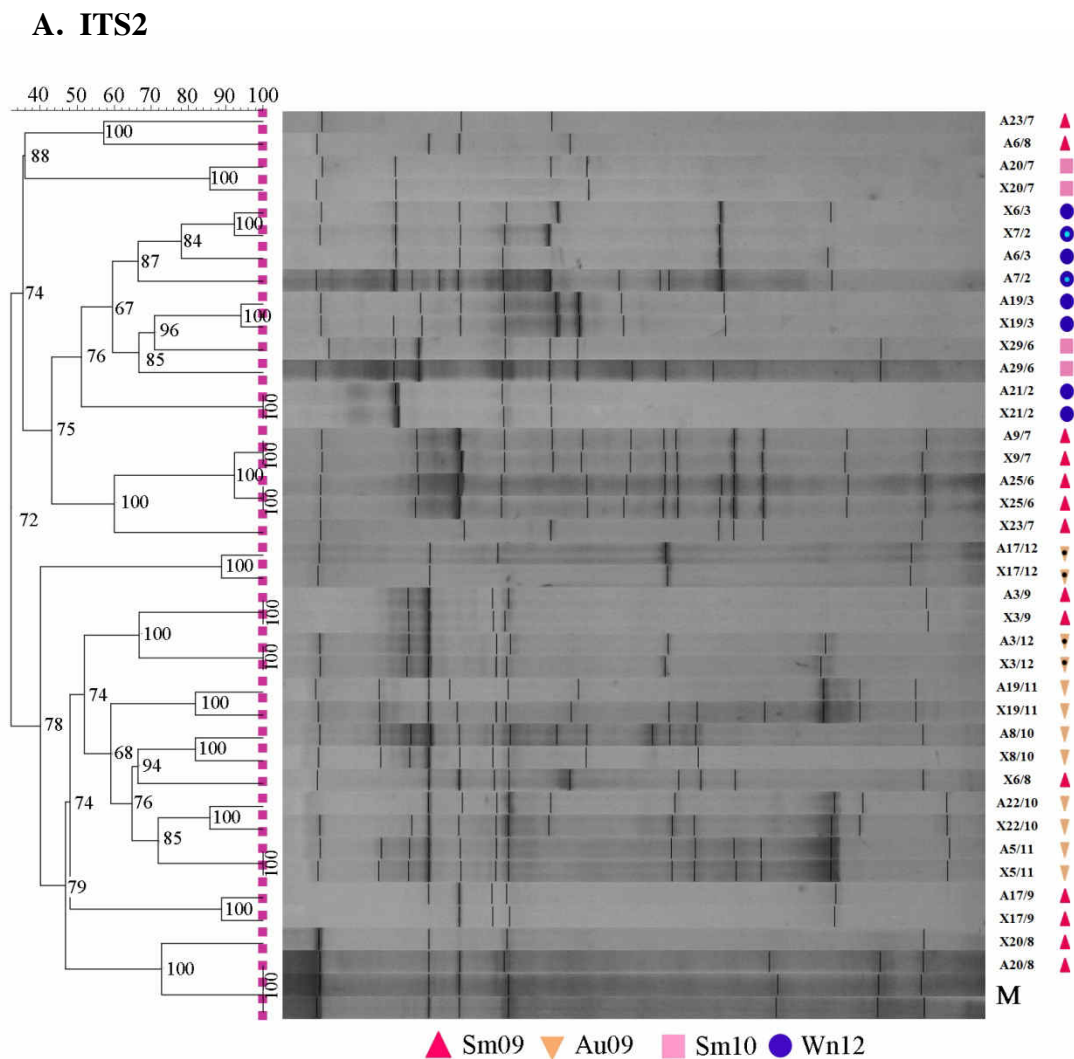
3.1. Análisis de clústeres de los perfiles de TGGE de la comunidad fúngica del MBR, generados a partir de amplicones de la región ITS2 y el gen 18S rRNA.

La Fig. 2 muestra los análisis de clústeres de los resultados del *fingerprinting* de la comunidad fúngica del MBR obtenidos con los dos marcadores moleculares empleados.

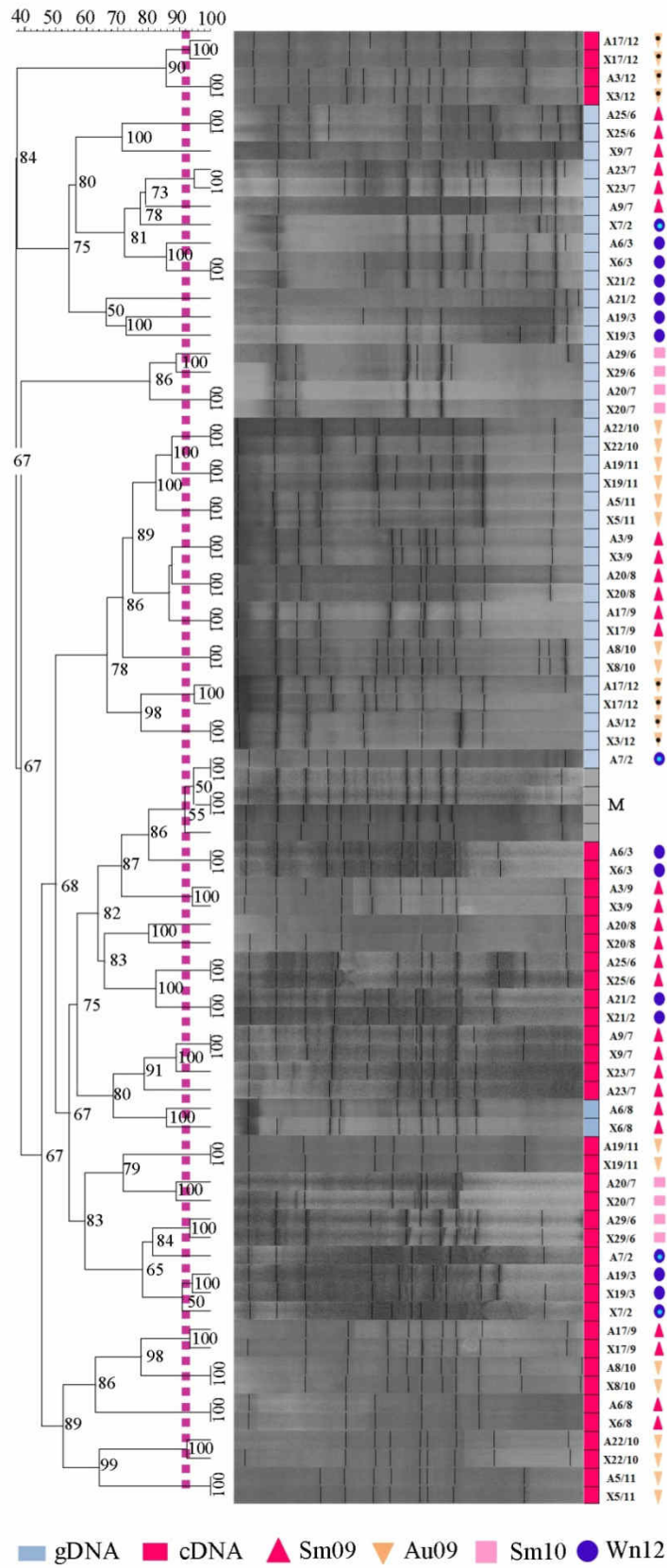
La Fig. 2A muestra el análisis de clústeres de un total de 38 muestras analizadas mediante TGGE basado en la región ITS2. En el análisis se detectaron un total de 29 clases de bandas. El coeficiente de Dice indicó que la similitud entre los perfiles de bandas fue inferior al 40%, mostrando una baja estabilidad de la estructura de la

comunidad. En contraste, en un estudio anterior realizado en el mismo sistema MBR a lo largo de los periodos de muestreo Sm09 y Au09, se concluyó que la comunidad de bacterias era muy estable (similitud >80%) (Gómez-Silván *et al.*, 2014b).

Fig. 2. *Fingerprinting* de la comunidad de hongos para los dos marcadores moleculares a lo largo de las 4 fases experimentales (Sm09, Au09, Sm10, Wn12) A. Perfil de TGGE basado en la región ITS2 amplificada a partir de gDNA. B. Perfil de TGGE basado en la amplificación parcial del gen codificante del 18S rRNA a partir de gDNA y cDNA. La comparación se ha realizado mediante el coeficiente de similitud de Dice. La línea punteada muestra el porcentaje de similitud máximo para considerar significativas las diferencias entre muestras, calculado a partir del porcentaje de divergencia de las muestras empleadas como marcadores internos. A: Biorreactor aireado; X: Biorreactor anóxico. M: Marcador interno. Las muestras tomadas cuando el MBR experimentó formación de espumas en los periodos Au09 y Wn12 se encuentran marcadas mediante un punto en el centro. Los números en los nodos corresponden al coeficiente de correlación cofenética.



B. 18S rRNA



El análisis ANOSIM indicó diferencias significativas entre los perfiles de la comunidad fúngica de las muestras pertenecientes a los 4 periodos de estudio ($R=0,437$), pero no entre BRs ($R= -0,054$). El grupo de perfiles de los marcadores internos presentó un 100% de similitud, siendo establecido como porcentaje límite para considerar diferencias significativas entre la estructura de las comunidades. La agrupación de muestras se encuentra diferenciada en dos grandes clústeres (32,1 % de similitud). En el primer clúster principal (35,4% de similitud), se encontraron las muestras de los periodos Wn12, Sm10 y muestras del periodo Sm09 (meses de junio y julio). El segundo clúster principal (40,1% de similitud) engloba las muestras de Au09 y muestras del periodo Sm09 (meses más cercanos a otoño). Dentro de este clúster, encontramos un subclúster diferenciado del resto de muestras, donde se agrupan las del día 17.12.09, cuando se estaba observando formación de espumas en la planta.

El análisis basado en el coeficiente de Dice de los perfiles de bandas de TGGE para el gen 18S rRNA se muestra en la Fig. 2B. Se analizaron un total de 76 muestras (38 de gDNA y 38 de cDNA). Se observó inicialmente que los perfiles de bandas obtenidos a partir del gen 18S rRNA fueron considerablemente más complejos y contenían un número mucho mayor de bandas que los basados en la región ITS2. Ante esta discrepancia entre los dos marcadores empleados, se realizó un análisis preliminar de las secuencias de DNA de las bandas aisladas de los geles, que demostró que las bandas separadas en las regiones distales superior e inferior del gel en su gran mayoría no correspondían a secuencias fúngicas. Por esta razón, el análisis de clústeres y todos los análisis subsiguientes se limitaron a la zona intermedia de los geles (gradiente de temperatura 32-39 °C), que es la que se visualiza en la Fig. 2B. Se escogió el set de cebadores NS1-Fung porque a pesar de amplificar un cierto porcentaje de secuencias no

fúngicas, se había evaluado previamente en otros estudios, ofreciendo mejores resultados que otros cebadores para la detección de la diversidad de hongos en suelos y plantas de aguas residuales mediante *fingerprinting* basado en el gen del 18S rRNA (Evans y Seviour, 2012; Hoshino y Morimoto, 2008, 2010). En el estudio de Hoshino y Morimoto (2010) también se detectó que las bandas superiores del perfil del DGGE no correspondían a secuencias de hongos.

En el análisis conjunto de los perfiles de TGGE derivados a partir de gDNA y cDNA, se detectaron un total de 21 clases de bandas. El análisis ANOSIM indicó que existían diferencias significativas entre los perfiles generados a partir de distintos ácidos nucleicos ($R=0,342$) pero no entre los biorreactores ($R= -0,014$). El análisis ANOSIM también mostró diferencias significativas entre los 4 periodos de estudio ($R= 0,406$; $0,294$; gDNA y cDNA respectivamente). Al igual que en los perfiles generados con la región ITS2, la similitud entre las muestras calculada con el coeficiente de Dice fue inferior al 40%. El grupo de perfiles de los marcadores internos presentó un 96% de similitud, siendo establecido como porcentaje límite para considerar diferencias significativas en la estructura de las comunidades.

Las muestras procedentes de gDNA y cDNA de cada periodo experimental mostraron tendencia a agruparse separadamente, organizándose en dos clústeres principales (37,2% de similitud). El primer clúster principal (37,6 % de similitud) a su vez se divide en dos subclústeres (85,6 y 54,3 % de similitud). El primer subclúster se encuentra formado por muestras de cDNA tomadas durante el episodio de formación de espumas registrado en el periodo Au09. El segundo subclúster engloba parte de las muestras de gDNA de los periodos Wn12 y Sm09. El segundo clúster principal (38,8 % de similitud) engloba el resto de muestras de gDNA y cDNA, divididas en cuatro

subclústeres. Las muestras de gDNA del periodo Sm10 se agruparon en un primer subclúster claramente separado del resto, con un 80,3 % de similitud entre ellas. Las muestras de gDNA del periodo Au09 y parte de las muestras del periodo Sm09 formaron un segundo subclúster, con un 66,6% de similitud. La mayoría de las muestras de cDNA se agruparon en un tercer subclúster, con un 54,3% de similitud, compuesto por todas las muestras de los periodos Wn12 y Sm10 y parte de las muestras de Au09 y Sm09. Finalmente, el resto de las muestras de Sm09 y Au09 se agruparon en el cuarto subclúster, con un 52,4 % de similitud. Es destacable mencionar las grandes diferencias que encontramos entre los BRs en la muestra de gDNA del día 7.2.12, tomada durante el segundo episodio de formación de espumas registrado en la planta. En todas las demás muestras, no existen diferencias significativas en la estructura de la comunidad fúngica entre los BRs.

3.2. Análisis de la diversidad, estructura y organización funcional de la comunidad de hongos mediante análisis teórico de los perfiles de TGGE.

La Fig. 3 muestra los índices descriptivos (R_r , F_o , y H') calculados para los perfiles de TGGE generados a partir de los dos marcadores moleculares empleados. El índice ponderado de riqueza R_r describe la diversidad de especies de una comunidad (Marzorati *et al.*, 2008). En el sistema MBR, los valores de R_r fueron menores de 10 para los perfiles generados con ambos marcadores moleculares (valor medio de 7,7 para ITS2 y 2,9 para 18S rRNA), definiendo un sistema con bajo número de especies. El análisis estadístico basado en el test de rangos de Wilcoxon mostró diferencias significativas entre las 4 fases analizadas, para ambos marcadores moleculares (Fig. 3). Sin embargo, no mostró grandes diferencias entre BRs, indicando que la riqueza de especies de hongos fue similar bajo condiciones aireadas y anóxicas. El periodo Au09

estuvo caracterizado por tener la mayor diversidad de las poblaciones de hongos totales tanto cuando se analizó la región ITS2 como el 18S rRNA amplificando a partir de gDNA (Rr medio= 12,3 y 4,6, respectivamente).

Comparando los datos obtenidos con el marcador 18S rRNA a partir de gDNA y cDNA, la diversidad de las poblaciones totales y activas fue bastante similar en los distintos periodos estudiados (Fig. 3B). Las mayores diferencias se encontraron en el periodo Sm10, caracterizado por una menor diversidad de poblaciones totales.

La organización funcional (Fo) media detectada en el MBR fue 0,44 (0,42 y 0,45, cuando se emplearon como marcadores el gen 18S rRNA o la región ITS2, respectivamente), lo que significa que en promedio el 44% de la abundancia total de poblaciones detectada en el sistema MBR correspondió a un 20% de especies dominantes, mientras que el 56% de la abundancia correspondió al 80% de especies minoritarias. El test de Wilcoxon indicó una gran estabilidad de la organización funcional de las poblaciones totales y activas cuando se empleó como marcador el gen del 18S rRNA, sin diferencias significativas entre BRs, excepto en el periodo Sm10 donde si hubo diferencias tanto para las poblaciones totales como activas. En resumen, la comunidad de hongos presentó valores de Fo representativos de una organización funcional media, lo que significa que tiene suficiente flexibilidad para amortiguar los cambios ambientales y de las condiciones operacionales (Marzorati *et al.*, 2008).

El índice de diversidad de Shannon (H') tiene en cuenta tanto la riqueza de especies como la organización funcional del sistema. Los valores medios de H' fueron 1,5 y 1,7 (ITS2 y gen del 18S rRNA, respectivamente), reflejando una baja riqueza de la diversidad de la comunidad de hongos en el sistema, en consonancia con los índices Rr y Fo.

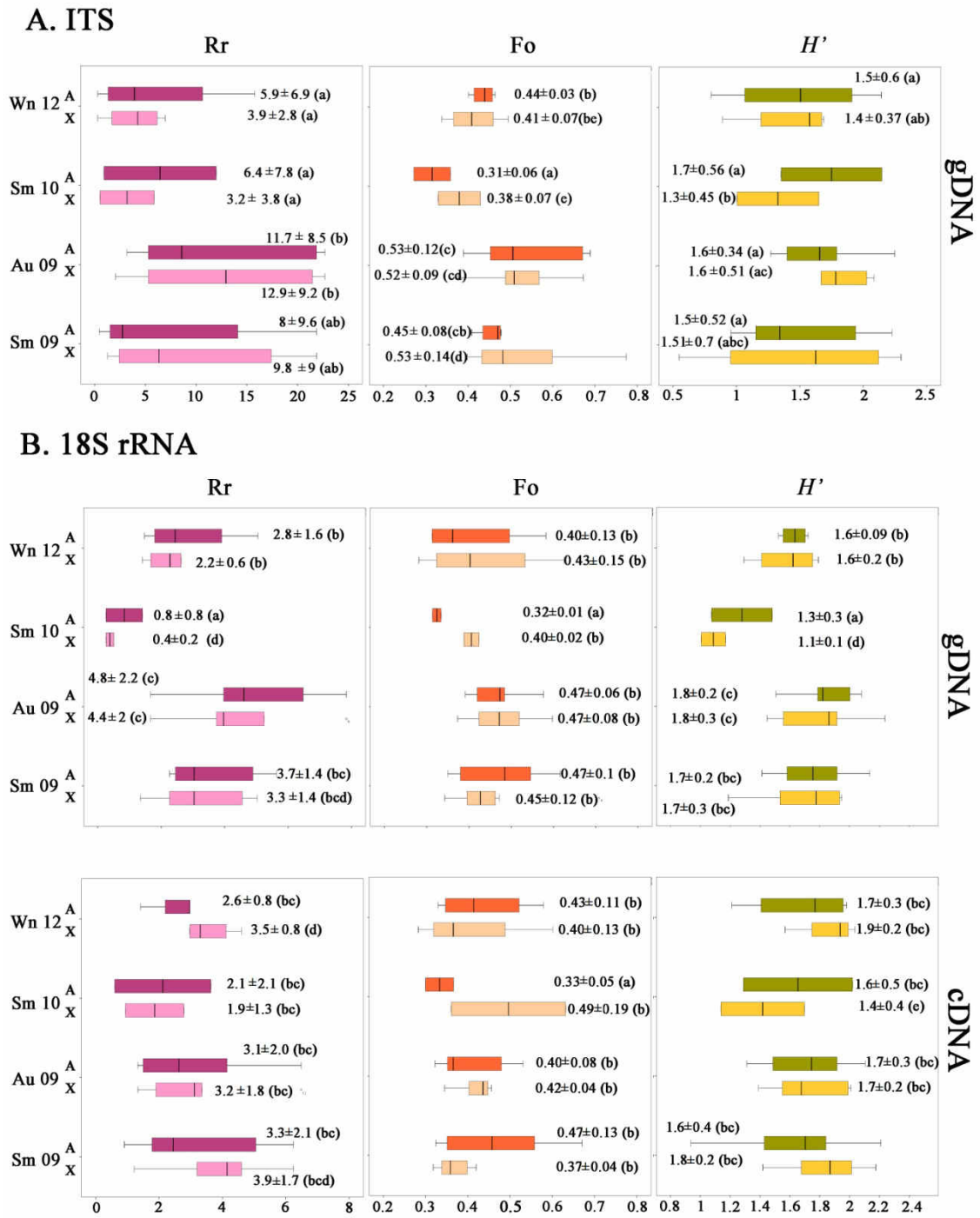


Fig 3. Índices descriptivos (Rr: rango ponderado de riqueza; Fo: organización funcional; H' : diversidad de Shannon) de la diversidad de la comunidad de hongos obtenidos a partir de los perfiles de TGGE del MBR de ambos biorreactores (A: aireado; X: anóxico) y a lo largo de las 4 fases experimentales (Sm09, Au09, Sm10, Wn12). El valor medio de cada índice \pm la desviación estándar es mostrado en cada caso. Los datos seguidos entre paréntesis con la misma letra no son estadísticamente diferentes, según el test de Wilcoxon ($p < 0,05$) (A) Índices descriptivos basados en los perfiles de TGGE de la región ITS2 amplificada a partir de gDNA. (B) Índices descriptivos basados en los perfiles de TGGE del gen parcial 18S rRNA amplificado a partir de gDNA y cDNA.

En resumen, el análisis de estos índices teóricos de diversidad permite un mejor conocimiento de la ecología de la comunidad de hongos, describiendo una comunidad con bajo número de especies, capaz de mantener su funcionalidad en el sistema y adaptarse a las cambiantes condiciones ambientales y operacionales (Marzorati *et al.*, 2008).

3.3. Análisis filogenético de las secuencias de DNA de la región ITS2 y el gen 18S rRNA obtenidas a partir de las bandas separadas mediante TGGE.

El análisis de los perfiles de TGGE basados en la región ITS2 detectó 29 clases de bandas, de las que se lograron reamplificar y secuenciar 14 bandas representativas de las mismas, constituyendo un 48,3 % de las poblaciones totales de hongos detectadas mediante *fingerprinting*. La Tabla 1 muestra la clasificación de los filotipos representados por estas 14 clases de banda, en función de su similitud con las secuencias depositadas en la base de datos UNITE.

De las 14 secuencias analizadas, sólo pudimos identificar dos de ellas (IP1 e IP18) como evolutivamente próximas (>97% de similitud) a especies de géneros validados de hongos (*Trichosporon* y *Thelobolus*, respectivamente). Para las restantes secuencias obtenidas, sólo se obtuvieron alineamientos con >80% de similitud con secuencias de hongos de afiliación taxonómica desconocida en las bases de datos empleadas para las búsquedas.

La Fig. 4 muestra la evolución longitudinal de la abundancia relativa de cada una de las clases de bandas detectadas a través de todas las fases experimentales, representada en forma de *heatmap*, así como el porcentaje de incidencia de cada clase de banda en el total de las muestras analizadas. Se detectaron dos clases de bandas (IP1 e IP9) con alta incidencia en todos los periodos estudiados (observadas en >70% del

total de las muestras). Además, se detectaron 6 clases de bandas con una elevada incidencia en algunos periodos (observadas en $\geq 70\%$ de las muestras de dicho periodo): IP3 en Sm10 y Wn12; IP 7 en Sm09 y Wn12; IP 10 en Sm10 y Wn12; IP12 en Sm10; IP15 en Au09; IP 18 en Wn12; e IP28 en Sm09.

Tabla 1. Clasificación de los filotipos representados por las 14 clases de banda detectadas en los perfiles de TGGE de la comunidad de hongos en el MBR, basados en la secuencia de la región ITS2.

Clase de banda	Afiliación taxonómica mas próxima	Longitud (nt)	Organismo más similar según la base de datos UNITE y n° de acceso (GenBank)	% identidad
IP1	Fungi, <i>Basidiomycota</i> , <i>Agaricomycotina</i> , <i>Tremellomycetes</i> , <i>Tremellales</i>	182	<i>Trichosporon montevidense</i> cepa CBS 6721; NR073245	97%
		182	<i>Trichosporon domesticum</i> cepa CBS 8280; NR073239	97%
IP3	Fungi	218	Hongo rizosférico no cultivado; KC191759	85%
IP4	Fungi	234	Hongo rizosférico no cultivado; KC191759	85%
IP7	Fungi	234	Hongo rizosférico no cultivado; KC191759	85%
IP9	Fungi	274	Hongo rizosférico no cultivado; KC191759	93%
IP10	Fungi	121	Hongo ambiental no cultivado; JX898594	84%
IP12	Fungi	150	Hongo ambiental no cultivado, suelo contaminado con metales pesados; FJ197961	87%
IP15	Fungi	161	Hongo rizosférico no cultivado; KC191759	87%
IP18	Fungi, <i>Ascomycota</i> , <i>Pezizomycotina</i> , <i>Leotiomycetes</i> , <i>Thelebolales</i> , <i>Thelebolaceae</i>	270	Hongo endofítico no cultivado; KC457144	99%
		271	<i>Thelebolus microsporus</i> cepa GW3- 19; KJ700299	99%
IP19	Fungi	122	Hongo ambiental no cultivado; JX898594	83%
IP20	Fungi	121	Hongo ambiental no cultivado; JX898594	83%
IP22	Fungi	118	Hongo no cultivado de sedimentos contaminados; JX974791	86%
IP23	Fungi	232	Hongo no cultivado de aguas fluviales; KC215944	88%
IP28	Fungi	223	Hongo no cultivado de aguas fluviales; KC215944	99%

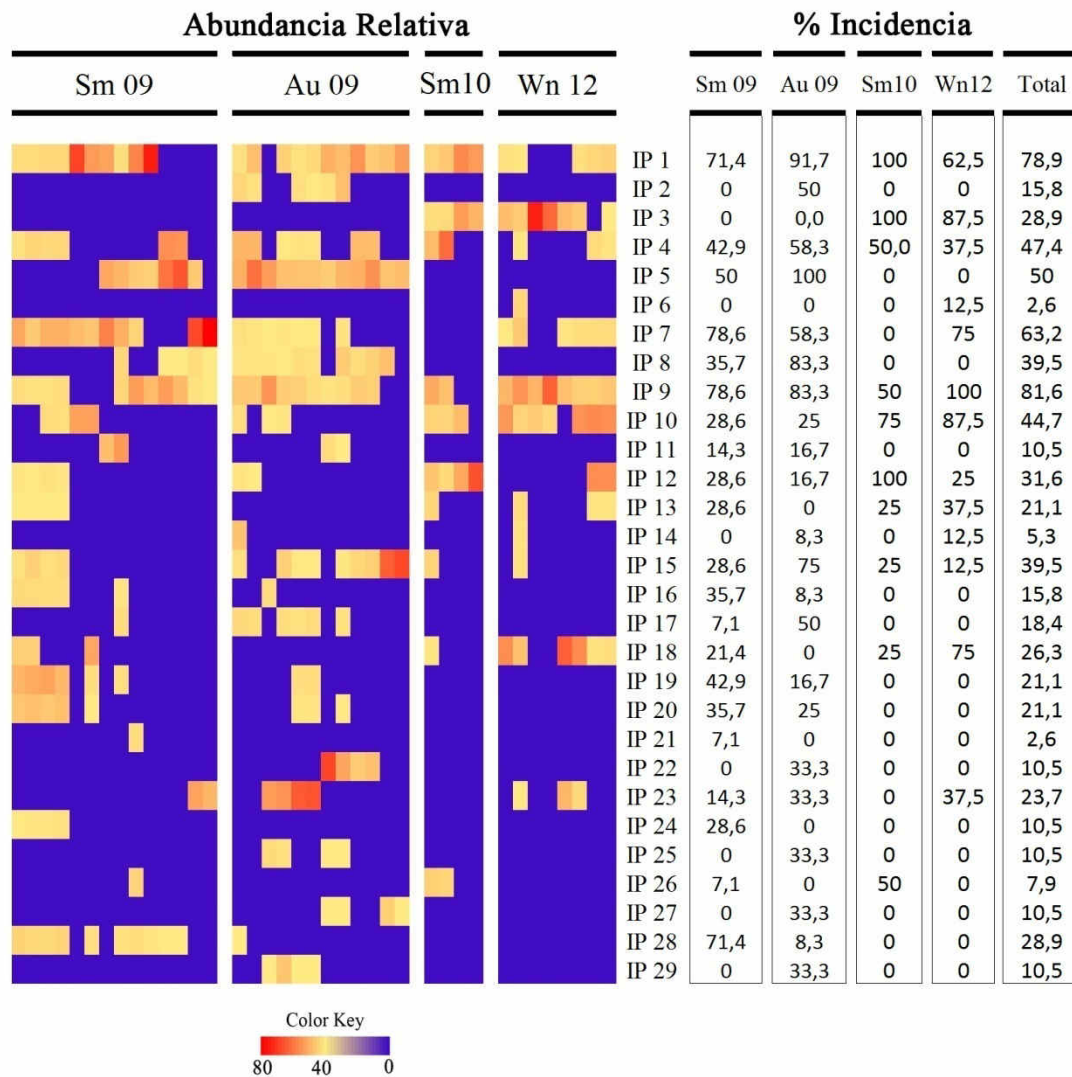


Fig. 4. Heatmap mostrando la evolución longitudinal de la abundancia relativa de cada clase de banda detectada en los perfiles de TGGE de la comunidad de hongos en el MBR, basados en la secuencia de la región ITS2, así como el porcentaje de incidencia en las muestras de cada periodo experimental analizado en el MBR.

En el análisis de los perfiles de TGGE basados en el gen 18S rRNA, se intentó la reamplificación de representantes de las 21 clases de bandas identificadas en los geles, aunque en algunos casos no fue posible obtener secuencias de suficiente calidad. Las secuencias representativas de 14 clases de bandas (67% de las clases totales) fueron identificadas como hongos (Tabla 2), relacionados evolutivamente con miembros de 4 Phyla/Subphyla diferentes: *Ascomycota* (36% de las secuencias),

Chytridiomycota/Blastocladiomycota (21,4%), *Cryptomycota* (14%) y *Mucoromycotina* Incertae sedis (7%).

Dentro de *Ascomycota*, se detectó 1 filotipo clasificado en el Orden *Hypocreales* y 4 filotipos clasificados dentro del orden *Saccharomycetales*. Se detectaron 3 filotipos clasificables como *Chytridiomycota/Blastocladiomycota*, mientras que en *Cryptomycota* encontramos 2 filotipos evolutivamente relacionados con el género *Paramicrosporidium*. Dentro del Subphylum *Mucoromycotina* se detectó 1 filotipo próximo al género *Endogone*. Los 3 filotipos restantes (21,4 % de las secuencias) presentaron porcentajes de identidad muy similares con secuencias de géneros pertenecientes a Phyla diferentes, por lo que no pudieron clasificarse a este nivel.

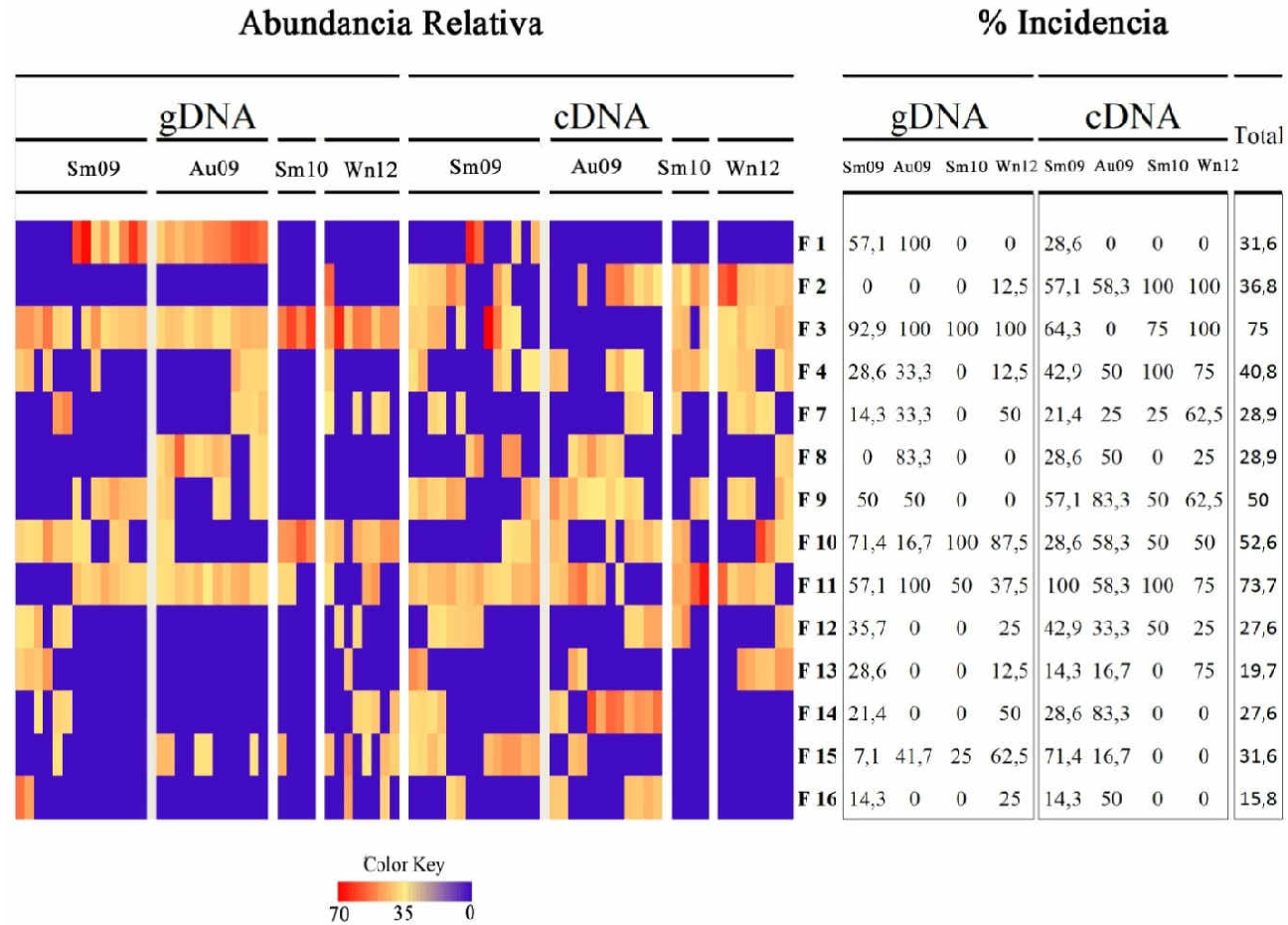
Tabla 2. Clasificación de los filotipos representados por las 14 clases de banda detectadas en los perfiles de TGGE de la comunidad de hongos en el MBR, basados en la secuencia parcial del gen 16S rRNA.

Clase de banda	Afiliación taxonómica mas próxima	Longitud (nt)	Organismo más similar según la base de datos GenBank y nº de acceso	% identidad
F1	Fungi, <i>Ascomycota</i> , <i>Saccharomycotina</i> , <i>Saccharomycetes</i> , <i>Saccharomycetales</i> , <i>Saccharomycetaceae</i>	277	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> cepa YJM996; CP006468.1	100%
F2	Fungi, <i>Ascomycota</i> , <i>Saccharomycotina</i> , <i>Saccharomycetes</i> , <i>Saccharomycetales</i> , <i>Saccharomycetaceae</i>	277	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> cepa YJM996; CP006468.1	100%
F3	Fungi, <i>Ascomycota</i> , <i>Pezizomycotina</i> , <i>Sordariomycetes</i> , <i>Hypocreales</i>	274	<i>Tolypocladium capitatum</i> cepa NBRC 106325; JN941739.1 <i>Tolypocladium parasiticum</i> cepa ARSEF 3436; EF468993.1	96,7% 97,0%
F4	Fungi	223	<i>Cyllamyces aberensis</i> cepa AFTOL-ID 846; DQ536481.1 <i>Endogone lactiflua</i> cepa AFTOL-ID 45; DQ536471.1	92,0% 91,9%
F7	Fungi, <i>Ascomycota</i> , <i>Saccharomycotina</i> , <i>Saccharomycetes</i> , <i>Saccharomycetales</i>	275	<i>Candida mycetangii</i> cepa ATCC 62900; FJ381691.1 <i>Candida maritima</i> cepa NRRL Y-17775; EF550470.1 <i>Cyberlindnera petersonii</i> cepa NRRL YB-3808; EF550449.1	99,6% 99,6% 99,6%

Tabla 2 (continuación)

Clase de banda	Afiliación taxonómica mas próxima	Longitud (nt)	Organismo más similar según la base de datos GenBank y n° de acceso	% identidad
F8	Fungi, <i>Chytridiomycota</i> , <i>Chytridiomycetes</i> , <i>Spizellomyetales</i>	205	<i>Gaertneriomyces tenuis</i> DAOM BR 366; FJ827650.1	96,0%
			<i>Spizellomyces dolichospermus</i> ATCC 48897; JN940943.1	95,6%
F9	Fungi, <i>Chytridiomycota</i> / <i>Blastocladiomycota</i>	272	<i>Pseudorhizidium endosporangiatum</i> cepa AFTOL-ID 1534; DQ536484.1	95,6%
			<i>Physoderma maydis</i> cepa AFTOL-ID 19; NG_017165.1	95,6%
F10	Fungi, <i>Cryptomycota</i>	269	<i>Paramicrosporidium vannellae</i> cepa KAUN; JQ796368.1	92,6%
			<i>Paramicrosporidium saccamoebae</i> cepa KSL3; JQ796369.1	91,9%
F11	Fungi, <i>Chytridiomycota</i> / <i>Blastocladiomycota</i>	272	<i>Pseudorhizidium endosporangiatum</i> cepa AFTOL-ID 1534; DQ536484.1	95,6%
			<i>Physoderma maydis</i> cepa AFTOL-ID 19; NG_017165.1	95,6%
F12	Fungi	269	<i>Paramicrosporidium vannellae</i> cepa KAUN; JQ796368.1	84,2%
			<i>Paramicrosporidium saccamoebae</i> cepa KSL3; JQ796369.1	83,7%
			<i>Colacogloea peniophorae</i> cepa AFTOL-ID 709; DQ234564.1	83,1%
F13	Fungi, <i>Mucoromycotina</i> Incertae sedis, <i>Endogonales</i>	279	<i>Endogone lactiflua</i> cepa AFTOL-ID 45; DQ536471.1	91,0%
F14	Fungi, <i>Ascomycota</i> , <i>Saccharomycotina</i> , <i>Saccharomycetes</i> , <i>Saccharomycetales</i> , <i>Dipodascaceae</i>	214	<i>Geotrichum clavatum</i> cepa IFO 10824; AB000655.1	98,6%
			<i>Dipodascus capitatus</i> cepa IFO 10820; AB000650.1	98,6%
			<i>Dipodascus spicifer</i> cepa IFO 10809; AB000649.1	98,6%
F15	Fungi	275	<i>Paramicrosporidium vannellae</i> cepa KAUN; JQ796368.1	84,7%
			<i>Paramicrosporidium saccamoebae</i> cepa KSL3; JQ796369.1	84,0%
			<i>Syzygospora effibulata</i> cepa AM7; JN043554.1	82,9%
F16	Fungi, <i>Cryptomycota</i>	273	<i>Paramicrosporidium vannellae</i> cepa KAUN; JQ796368.1	92,3%
			<i>Paramicrosporidium saccamoebae</i> cepa KSL3; JQ796369.1	91,6%

Fig. 5. Heatmap mostrando la evolución longitudinal de la abundancia relativa de las 14 clases de bandas representantes de poblaciones de hongos detectadas en los perfiles de TGGE de la comunidad del MBR, basados en la secuencia parcial del gen del 18S rRNA, así como el porcentaje de incidencia en las muestras de cada periodo experimental analizado en el MBR.



La Fig. 5 muestra el *heatmap* correspondiente a la abundancia relativa de las 14 clases de bandas analizadas, así como el porcentaje de incidencia de cada clase de bandas en el total de las muestras analizadas de gDNA y cDNA. Entre las secuencias identificadas, las correspondientes a las clases de bandas F3 y F11 tuvieron incidencia alta en todos los periodos experimentales (observables en >70% del total de muestras).

Algunas de las clases de bandas detectadas se caracterizaron por su alta incidencia ($\geq 70\%$) solamente en muestras del MBR correspondientes a una determinada fase experimental. Este es el caso de las clases F1 y F8 en el periodo Au09; y la clase F10 en los periodos Sm09, Sm10 y Wn12. Otras clases de bandas se detectaron con alta incidencia ($\geq 70\%$) solamente entre las poblaciones activas: F2 y F4 en el periodo Sm10 y Wn12; y F9 y F14 en el periodo Au09. En suma, los resultados obtenidos con ambos marcadores moleculares indican que en líneas generales son diferentes los filotipos prevalentes en la comunidad fúngica según la fase experimental, por tanto se producen cambios en función de los factores ambientales y operacionales que influyan en cada momento sobre el sistema.

Como se indicó en la Introducción de este Capítulo, actualmente existen pocos estudios publicados dedicados a la comunidad de hongos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales urbanas que se hayan realizado por métodos independientes de cultivo. La presencia de los hongos en este tipo de sistemas se ha considerado poco relevante, ya que numéricamente son poco dominantes, y se ha asociado con una entrada accidental desde el aire o el suelo, como consecuencia de la sedimentación o el arrastre producido por la lluvia (Cooke, 1970). Debido a ello, la mayoría de los hongos aislados y cultivados de muestras de fango activo han sido principalmente catalogados como formas esporuladas dentro del Phylum *Ascomycota* (Cooke, 1970; Kacprzak *et*

al., 2005; Tomlinson, 1975). Sin embargo, los estudios de *fingerprinting* llevados a cabo en los últimos años muestran que la comunidad de hongos en sistemas de depuración es mucho más diversa (Evans y Seviour, 2012; Yang *et al.*, 2011). Trabajos recientes indican que los sistemas de aguas residuales urbanas albergan mayor número de microorganismos que las plantas industriales (Yang *et al.*, 2013). Estos sistemas reciben tanto agua industrial como doméstica, aumentando la variedad de nutrientes disponibles y permitiendo el desarrollo de microorganismos con capacidades específicas para la degradación de numerosos compuestos, incluyendo compuestos recalcitrantes. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo confirman que los hongos se encuentran presentes y son activos en los sistemas MBR, posiblemente cumpliendo importantes funciones en estos sistemas de depuración.

Los resultados del estudio de *fingerprinting* indican que en líneas generales el agrupamiento de las muestras analizadas siguió tendencias similares con los dos marcadores moleculares empleados, que coinciden en describir una comunidad fúngica en el MBR poco estable y formada por un número bajo de especies. Estos resultados son acordes con los de los trabajos recientemente realizados por Evans y Seviour (2012) y Evans *et al.* (2014) empleando DGGE para el estudio la comunidad de hongos en tratamientos de agua residual, usando también los marcadores moleculares ITS2 y gen del 18S rDNA. La diversidad a nivel de Phylum/Subphylum hallada en nuestro sistema fue similar a la del estudio realizado por Evans y Seviour (2012), quienes encontraron representantes de *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Cryptomycota* y *Mucoromycotina* utilizando los mismos cebadores empleados en este estudio. No se han detectado filotipos clasificados dentro del Phylum *Basidiomycota* al secuenciar las bandas aisladas de los geles de TGGE basados en amplicones del gen 18S rRNA, pero cuando se

empleó la región ITS2 si se detectó un filotipo (IP1) con secuencia 97% similar a la del hongo filamentoso *Trichosporon*.

El Phylum *Cryptomycota* ha sido recientemente descubierto como una nueva rama evolutiva dentro del reino de los hongos, siendo su rasgo más peculiar el de carecer de quitina en su pared celular (Jones *et al.*, 2011). Dentro de este Phylum encontramos que la secuencia del 18S rRNA de dos de las clases de bandas identificadas (F10 y F16) estaba relacionada con especies del género *Paramicrosporidium*, descrito como parásito de protozoos (Corsaro *et al.*, 2014). Las secuencias de DNA obtenidas a partir de las clases de banda F12 y F15 también guardaron similitud con las de especies de *Paramicrosporidium*, si bien los bajos porcentajes de identidad (< 85%) sugieren que se trata de hongos aún no clasificados.

Como se ha comentado en el apartado 3.1. de este Capítulo, los pocos estudios basados en técnicas de *fingerprinting* para la caracterización de hongos en suelos y plantas de agua residual han encontrado la dificultad de la baja especificidad de los cebadores universales (Evans y Seviour, 2012; Hoshino y Morimoto, 2010; Yang *et al.*, 2011). Cuando el objetivo es identificar la mayoría de hongos en un sistema, se recomienda usar varias combinaciones de cebadores (Ihrmak *et al.*, 2012; Toju *et al.*, 2012). En nuestro estudio, el empleo de los cebadores NS1 y Fung garantizaba la correcta separación de bandas y su identificación mediante un método de *fingerprinting* (Evans y Seviour, 2012), ya que la selección de cebadores es un paso crítico en los análisis de TGGE, donde factores como la región diana del gen 18S rDNA, la longitud del fragmento y la secuencia de cada cebador afectan al resultado final. El marcador perfecto para estudiar la comunidad de hongos debe reunir una serie de condiciones: ser una diana compartida por todos los hongos, presentar una longitud apropiada para una

amplificación y secuenciación eficiente, poseer elevada variación interespecífica pero baja variación intraespecífica, y permitir el alineamiento de secuencias en todos los hongos (Lindahl *et al.*, 2013). Hasta la fecha, no se ha diseñado ninguna estrategia basada en marcadores que reúnan todos los requerimientos.

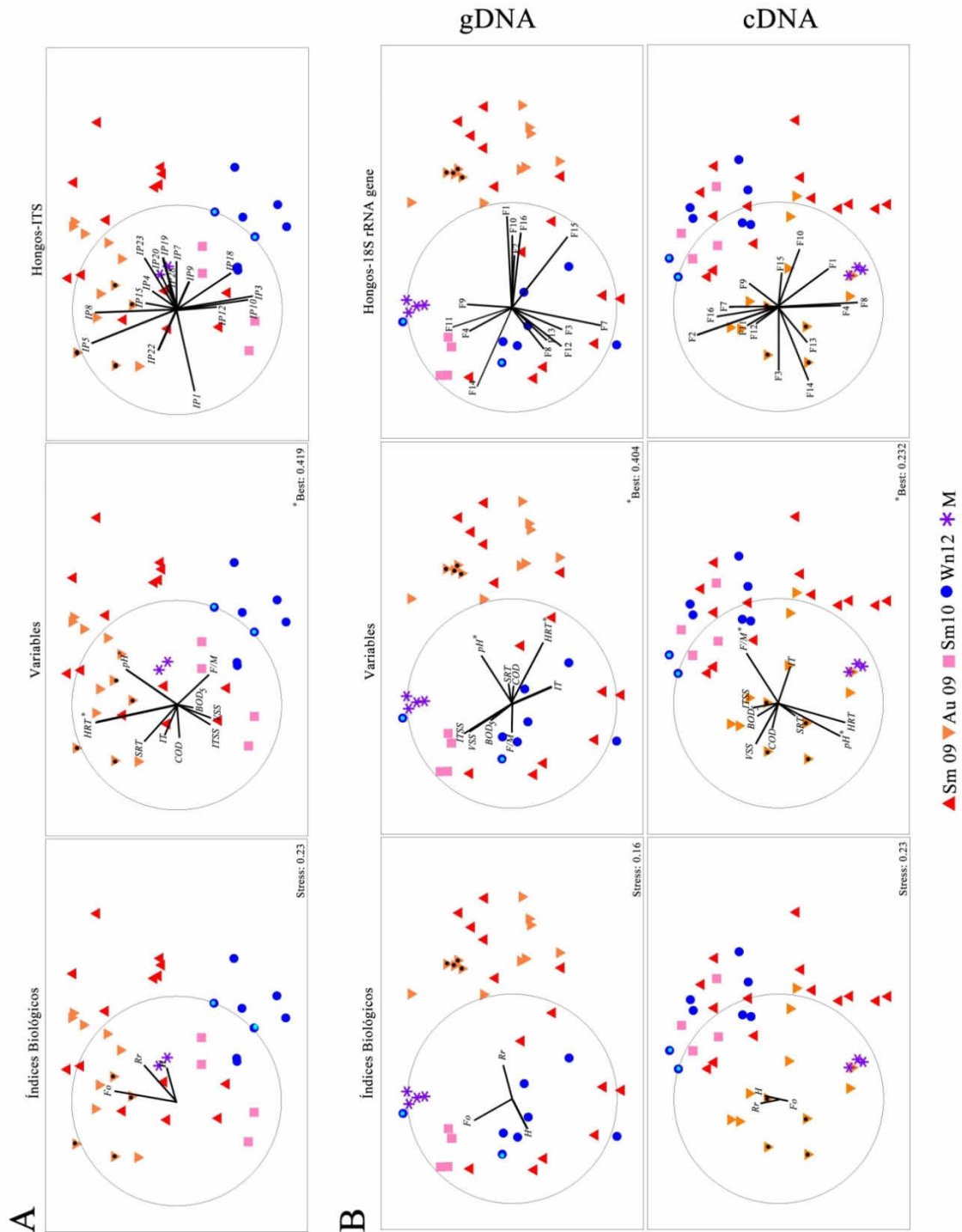
Dadas estas limitaciones y a fin de disponer de una mayor información sobre la estructura de las comunidades fúngicas en el MBR, en este trabajo se amplificó también la región ITS2 utilizando la combinación de cebadores ITS-3/ITS-4. La región ITS2 ha sido utilizada como marcador molecular en los estudios taxonómicos para la identificación de los hongos (Hibbett *et al.*, 2011). Sin embargo, para esta región no resolvimos satisfactoriamente la identificación taxonómica, debido a que la mayoría de las secuencias recuperadas mediante la técnica TGGE no guardaron una similitud lo suficientemente alta con secuencias de géneros o especies validadas depositadas en las bases de datos, posiblemente por formar parte de la diversidad de hongos aún inexplorada. De aproximadamente 300.000 secuencias públicas de la región ITS, sólo la mitad se encuentran anotadas a nivel de especie (Schoch *et al* 2012), y representan aproximadamente 20.000 especies diferentes (Latin binomials), correspondiendo al 0,2-4,5 % de los 0,5-10 millones de especies de hongos que se estiman existentes (Bass y Richards 2011; Blackwell 2011). Existen otros problemas adicionales para la correcta identificación de los hongos en base a la región ITS: más del 10% de las secuencias de esta región se encuentran incorrectamente anotadas a nivel de especie en las bases de datos, y además hay secuencias anotadas para especies no descritas formalmente (Nilsson *et al.*, 2006).

3.4. Relación entre la estructura de la comunidad de hongos analizada mediante TGGE y las variables del sistema.

La Fig. 6 muestra las ordenaciones mediante escalado multidimensional no métrico (MDS) de las muestras de fango activo del MBR en los cuatro periodos de estudio, según los datos biológicos de la comunidad fúngica (abundancia relativa de clases de bandas en los perfiles de TGGE para la región ITS2 y el gen 18S rRNA fúngicos). El coeficiente de correlación de Spearman (ρ_s) mide la interdependencia entre las variables representadas como vectores a través de la ordenación biológica de los datos, calculado para: las variables ambientales y los parámetros de operación en el MBR (columna central); índices de diversidad R_r , F_o y H' (columna izquierda); y abundancia relativa de las clases de bandas de las poblaciones de hongos (columna derecha). Las Tablas 3 y 4 muestran las correlaciones de Pearson (r) entre los distintos grupos de vectores.

El análisis BIO-ENV indicó el nivel de influencia de las variables ambientales y factores operacionales en la estructura y dinámica de la comunidad de hongos estudiada mediante TGGE. El análisis BEST reveló que las variables que mejor explican la dinámica de las poblaciones totales de hongos para ambos marcadores moleculares fueron el pH y HRT, contribuyendo con un 41,9 y 40,4% de explicación (ITS2 y gen del 18S rRNA, respectivamente), mientras que la distribución de las poblaciones activas (TGGE del 18S rRNA basado en cDNA) fue explicada principalmente (23,2%) por las variables pH y F/M. En las tres distribuciones, las variables pH y HRT se correlacionaron negativamente con BOD₅, iTSS, VSS y F/M.

Fig. 6. Escalado multidimensional no métrico (MDS) mostrando la distribución de las muestras de fango activo del MBR, según la abundancia relativa de las clases de bandas detectadas en los perfiles de TGGE para la región ITS2 y el gen 18S rRNA fúngicos en ambos biorreactores del MBR y a lo largo de las cuatro fases experimentales (Sm09, Au09, Sm10, Wn12). Los vectores representan la dirección y el incremento a través de las muestras de las variables del sistema (columna del centro), abundancia relativa de las clases de bandas detectadas (columna derecha) e índices de diversidad (columna izquierda). El valor BEST indica el nivel de explicación de los datos biológicos por las variables, estando marcadas estas variables más influyentes con un asterisco (*). (A) Región ITS2. (B) Gen 18S rRNA. Las muestras tomadas cuando el MBR experimentó formación de espumas se encuentran marcadas mediante un punto en el centro.



3.4.1 Relación de los índices de diversidad Rr, Fo y H' con las variables ambientales y parámetros operacionales.

El análisis BIO-ENV (Tabla 3) indicó que la riqueza (Rr) de las poblaciones totales de hongos evaluada con ambos marcadores moleculares fue favorecida por los dos factores que mejor explicaron el sistema, pH ($r > 0,85$) y HRT ($r = 0,50$). Sin embargo, los factores que presentaron correlación positiva más alta fueron diferentes dependiendo del marcador molecular, siendo el pH para la riqueza de poblaciones determinada en base a la región ITS2 ($r = 0,99$) y el SRT cuando se empleó el gen 18S rRNA ($r = 0,99$). La concentración de sustratos en el influente (COD, BOD₅, iTSS) y acumulación de biomasa en el MBR (VSS) mostraron correlaciones negativas altas con Rr ($r < -0,80$) solamente cuando el marcador molecular escogido fue la ITS2. En contraste, la riqueza Rr de las poblaciones activas se correlacionó negativamente con pH y HRT ($r < -0,60$) y positivamente con la concentración de los sólidos totales (iTSS) y la materia orgánica del agua influente (BOD₅) ($r > 0,95$), si bien la corta longitud del vector que representa Rr ($< 0,2$) muestra una relación poco robusta entre las variaciones de este índice y la ordenación de las muestras.

El índice de organización funcional (Fo) de las poblaciones totales de hongos evaluadas mediante *fingerprinting* de la región ITS2 se correlacionó positivamente con el pH y el HRT ($r > 0,80$). También se detectaron fuertes correlaciones negativas con el incremento de la concentración de materia biodegradable y sólidos en el influente y la concentración de biomasa en el sistema (iTSS, BOD₅ y VSS, $r < -0,90$); sin embargo, al emplear como marcador el gen del 18S rRNA se encontraron correlaciones positivas con estos factores ($r > 0,90$). La organización funcional de las poblaciones activas de hongos se correlacionó positivamente con el pH y el HRT ($r > 0,90$) y negativamente

con los sólidos totales del influente, iTSS ($r < -0,90$), aunque al igual que en el caso del índice Rr, Fo es representado en dicha ordenación por un vector de corta longitud ($< 0,2$).

Finalmente, el índice de Shannon (H') de las poblaciones totales estudiadas con ambos marcadores moleculares se vio favorecido por una menor concentración de COD ($r < -0,70$) en el influente. Además se detectaron correlaciones negativas con pH y SRT ($r < -0,90$) tanto para la diversidad de poblaciones totales como activas estudiadas con el 18S rRNA.

Tabla 3. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre los vectores de la Fig. 6 que representan los índices de diversidad (Rr: rango ponderado de riqueza; Fo: organización funcional; H' : diversidad de Shannon) y las variables ambientales y operacionales; para: A. perfiles de TGGE basados en la región ITS2 a partir de gDNA, B. perfiles de TGGE basados en el gen 18S rRNA a partir de cDNA, C. perfiles de TGGE basados en el gen 18S rRNA a partir de cDNA.

A. ITS2-basado en los perfiles de TGGE

	pH	IT	HRT	SRT	F/M	iTSS	VSS	COD	BOD ₅
Rr	0,99	-0,38	0,51	-0,09	0,00	-0,95	-0,83	-0,81	-0,86
Fo	0,85	0,28	0,94	0,56	-0,63	-0,93	-1,00	-0,26	-0,99
H'	0,82	-0,77	0,06	-0,54	0,46	-0,71	-0,48	-0,99	-0,53

B. gDNA- basado en los perfiles de TGGE

	pH	IT	HRT	SRT	F/M	iTSS	VSS	COD	BOD ₅
Rr	0,87	0,05	0,75	0,99	-0,96	-0,34	-0,33	0,89	-0,37
Fo	0,23	-0,97	-0,85	-0,43	0,53	1,00	1,00	-0,68	1,00
H'	-0,96	0,17	-0,58	-0,93	0,88	0,13	0,11	-0,78	0,16

C. cDNA- basado en los perfiles de TGGE

	pH	IT	HRT	SRT	F/M	iTSS	VSS	COD	BOD ₅
Rr	-0,70	-0,58	-0,83	-0,61	0,28	1,00	0,70	0,52	0,96
Fo	0,93	0,19	0,98	0,89	-0,65	-0,94	-0,34	-0,12	-0,76
H'	-0,96	-0,11	-1,00	-0,92	0,71	0,91	0,26	0,04	0,70

En resumen, se detectaron importantes discrepancias en cuanto a qué factores son más influyentes en la diversidad de la comunidad fúngica en función del marcador molecular escogido, lo cual subraya la dificultad de realizar este tipo de estudios y la posibilidad de extraer conclusiones erróneas en estudios basados en un solo marcador. De manera global, la riqueza Rr de las poblaciones totales resultó siempre influenciada positivamente por el incremento del pH y HRT, factores que a su vez se correlacionaron negativamente con la riqueza de las poblaciones activas (Tabla 3).

3.4.2 Relación de la abundancia relativa de las poblaciones totales y activas de hongos con las variables ambientales y operacionales del sistema (análisis BIO-ENV).

El análisis BIO-ENV (Tabla 4) permitió comprobar la influencia de las variables ambientales y operaciones (Fig. 6, columna central) sobre la abundancia relativa de las poblaciones presentes (gDNA) y activas (cDNA) de hongos (Fig. 6, columna derecha) en el fango activo del sistema MBR. Encontramos fuertes correlaciones entre las abundancias relativas de determinadas clases de bandas y las variables ambientales y parámetros operacionales. Además, muchas de estas clases de bandas corresponden a poblaciones de hongos relacionadas filogenéticamente entre sí.

Para el Phylum *Cryptomycota*, la abundancia relativa dentro de las poblaciones totales de hongos de las clases de bandas F10 y F16, cuyas secuencias están relacionadas filogenéticamente con *Paramicrosporidium*, fue positivamente influenciada por los factores operacionales HRT y SRT, el pH y la COD del influente ($r = 0,62 - 0,99$), y negativamente por la ratio F/M ($r < -0,90$) y VSS ($r < -0,55$).

Para el Phylum *Ascomycota*, encontramos que la abundancia relativa de las clases de bandas F1 y F2 se correlacionó positivamente con el pH, HRT, SRT y COD ($r >$

0,60) y negativamente con la ratio F/M ($r < -0,90$) en la ordenación de las muestras basada en los datos de gDNA.

Tabla 4. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre los vectores de la Fig. 6 que representan la abundancia relativa de las clases de bandas del TGGE y las variables ambientales y operacionales; para A. perfiles de TGGE basados en el gen 18S rRNA a partir de gDNA, B. perfiles de TGGE basados en el gen 18S rRNA a partir de cDNA.

A. gDNA- basado en los perfiles de TGGE

	pH	IT	HRT	SRT	F/M	iTSS	VSS	COD	BOD ₅
F1	0,76	0,23	0,85	1,00	-1,00	-0,51	-0,49	0,96	-0,53
F2	0,62	0,42	0,94	0,98	-0,99	-0,67	-0,65	1,00	-0,69
F3	-0,92	0,77	0,08	-0,47	0,36	-0,54	-0,56	-0,18	-0,52
F4	0,24	-0,97	-0,85	-0,42	0,53	1,00	1,00	-0,68	0,99
F7	-0,83	0,87	0,26	-0,30	0,18	-0,69	-0,70	0,00	-0,66
F8	-0,99	0,34	-0,43	-0,85	0,78	-0,05	-0,07	-0,65	-0,02
F9	0,74	-0,94	-0,41	0,15	-0,03	0,79	0,80	-0,15	0,77
F10	0,71	0,31	0,89	0,99	-1,00	-0,57	-0,56	0,98	-0,60
F11	0,45	-1,00	-0,70	-0,20	0,32	0,96	0,96	-0,49	0,95
F12	-0,99	0,55	-0,20	-0,70	0,61	-0,28	-0,30	-0,45	-0,25
F13	-1,00	0,50	-0,26	-0,74	0,66	-0,23	-0,24	-0,50	-0,19
F14	-0,38	-0,65	-1,00	-0,88	0,93	0,85	0,83	-0,98	0,86
F15	0,15	0,81	0,99	0,74	-0,81	-0,95	-0,94	0,91	-0,96
F16	0,63	0,41	0,94	0,98	-1,00	-0,66	-0,65	1,00	-0,69

B. cDNA-basado en los perfiles de TGGE

	pH	IT	HRT	SRT	F/M	iTSS	VSS	COD	BOD ₅
F1	0,41	0,82	0,59	0,31	0,07	-0,91	-0,90	-0,78	-1,00
F2	-0,67	-0,61	-0,80	-0,58	0,24	0,99	0,73	0,55	0,97
F3	0,47	-0,95	0,29	0,57	-0,83	0,22	0,89	0,97	0,56
F4	0,87	0,33	0,95	0,81	-0,53	-0,98	-0,48	-0,27	-0,85
F7	-0,87	-0,34	-0,95	-0,81	0,53	0,98	0,48	0,27	0,85
F8	0,84	0,38	0,93	0,78	-0,49	-0,99	-0,52	-0,31	-0,87
F9	-0,99	0,33	-0,94	-1,00	0,94	0,64	-0,18	-0,40	0,32
F10	-0,17	1,00	0,03	-0,28	0,62	-0,52	-0,99	-1,00	-0,79
F11	-0,53	-0,74	-0,69	-0,43	0,07	0,96	0,83	0,69	1,00
F12	-0,49	-0,77	-0,65	-0,39	0,02	0,94	0,86	0,72	1,00
F13	0,92	-0,55	0,82	0,96	-1,00	-0,43	0,42	0,61	-0,08
F14	0,79	-0,75	0,65	0,85	-0,98	-0,18	0,64	0,79	0,18
F15	-0,41	0,97	-0,23	-0,51	0,80	-0,29	-0,92	-0,98	-0,61
F16	-0,78	-0,47	-0,89	-0,71	0,39	1,00	0,60	0,41	0,92

En el caso de las clases de bandas cuyas secuencias se clasificaron en los Phyla *Chytridiomycota/Blastocladiomycota*, la abundancia relativa dentro de las poblaciones totales de hongos de la clase de bandas F8 fue positivamente influenciada por la ratio F/M ($r = 0,78$) y negativamente por el pH, SRT y la COD del influente ($r < -0,65$). En contraste, dentro de las poblaciones activas, la abundancia relativa de esta clase de bandas mostró correlaciones fuertes positivas con el pH, HRT y SRT ($r > 0,70$), y negativas con los iTSS y BOD₅ ($r < -0,85$). La abundancia relativa de las clases de bandas F9 y F11 se correlacionó positivamente con iTSS, VSS y BOD₅ ($r = 0,70 - 0,90$) y negativamente con IT ($r < -0,90$). Dentro de las poblaciones activas, la abundancia relativa de estas dos clases de bandas se vio positivamente influenciada por iTSS ($r > 0,60$) y negativamente por HRT ($r < -0,60$).

Las muestras de los periodos Au09 y Wn12 tomadas en las fechas en las que el MBR experimentó *foaming* se encuentran marcadas en ambas ordenaciones mediante un punto interno (Fig. 6). En la ordenación obtenida a partir de los datos de gDNA con el 18S rRNA como marcador, las muestras correspondientes al episodio de formación de espumas observado durante el periodo Au09 tendieron a formar un clúster más cerrado que para la ordenación basada en cDNA, siendo la abundancia relativa del filotipo representado por la clase de banda F1 (relacionada filogenéticamente con *Saccharomyces cerevisiae*) la que aumentó principalmente en la dirección de estas muestras. El incremento de la abundancia relativa de esta clase de banda a finales de Au09 coincidiendo con el mencionado episodio también se refleja en el *heatmap* (Fig 5). En el caso de las poblaciones activas de hongos, la abundancia relativa del filotipo correspondiente a la clase de banda F14 se incrementó en la dirección de dichas muestras en el mismo periodo (Figs. 5 y 6B). El filotipo F14 está relacionado

filogenéticamente con la familia *Dipodascaceae* (Tabla 2), que incluye hongos con morfología filamentosa (Suh *et al.*, 2006).

Dentro del periodo Wn12, es en la ordenación para cDNA donde queda más clara la segregación en la ordenación de las muestras obtenidas en las fechas en las que el MBR experimentó *foaming*. El *heatmap* y la ordenación muestran que la secuencia representativa de la clase de banda F2, también relacionada con *Saccharomyces cerevisiae*, incrementó su abundancia relativa en dichas muestras (Figs. 5 y 6B).

En suma, estos resultados corroboran que en la comunidad fúngica hay una alternancia de los filotipos dominantes, ya que se ven favorecidos unos u otros dependiendo de las diferentes condiciones del sistema, y la influencia de las variables no es siempre idéntica sobre las poblaciones totales y activas de hongos. El análisis realizado en este estudio en diferentes fases de operación del sistema MBR es acorde con resultados previos en plantas basadas en otras tecnologías, que indican que la composición de la comunidad de hongos parece verse influenciada por la naturaleza del agua residual, el tipo de configuración del sistema, las condiciones de operación y variables ambientales, de manera que prevalecen ciertas especies según sus capacidades metabólicas (Yang *et al.*, 2013).

3.5 Estudio de la diversidad de las comunidades de hongos en el MBR con pirosecuenciación 454.

Las técnicas de *fingerprinting* constituyen una metodología eficaz y poco costosa para la monitorización y seguimiento de las comunidades microbianas, especialmente para detectar cambios en el tiempo o interpretar las respuestas frente a diferentes factores ambientales (Bidartondo y Gardes 2005; Muyzer y Smalla 1998; Singh *et al.*, 2006). Sin embargo estos métodos tienen limitaciones en cuanto a la profundidad de muestreo que

pueden alcanzar y sólo detectan las poblaciones dominantes de la comunidad, concretamente aquellas que constituyen más del 1% de la misma (Muyzer y Smalla, 1998). Debido a ello, se decidió completar el estudio de la diversidad de las comunidades de hongos en el MBR mediante pirosecuenciación 454. Para ello se optó por emplear como marcador el gen del 18S rRNA y el set de cebadores NS1-Fung. A pesar de las limitaciones en la especificidad de estos cebadores descritas en el apartado 3.1 de este Capítulo, se decidió que el gen del 18S rRNA era un marcador más adecuado para este estudio, dado que el análisis de la diversidad de hongos mediante TGGE basado en la región ITS2 no proporcionó suficiente resolución taxonómica (apartado 3.3 de este Capítulo).

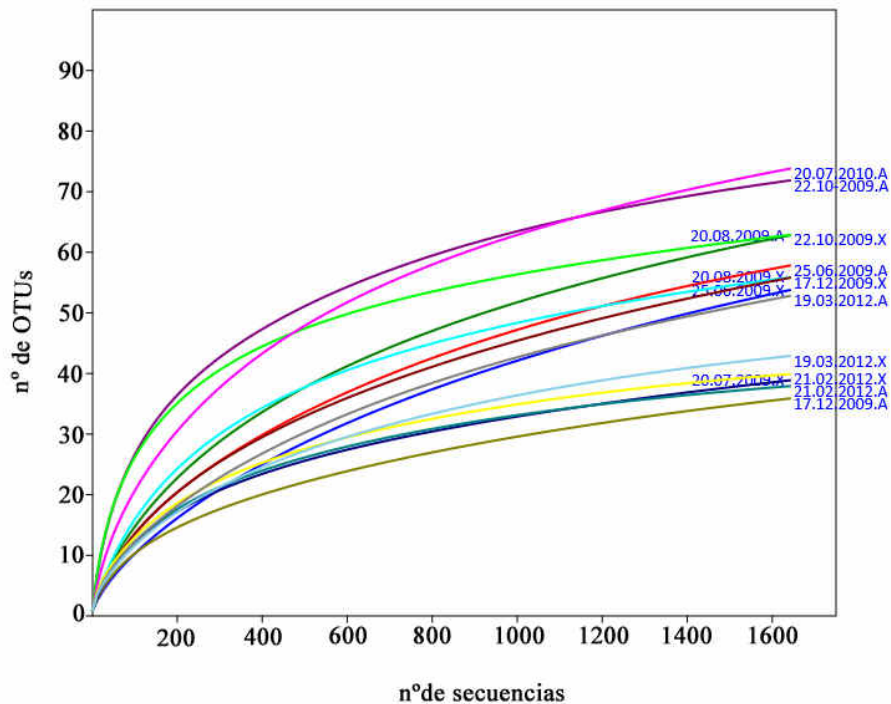
3.5.1 Análisis de los parámetros e índices descriptivos de la diversidad de las comunidades de hongos en el MBR estudiadas mediante pirosecuenciación 454.

Para el estudio de la diversidad de hongos en el MBR mediante pirosecuenciación 454, se seleccionaron un total de 14 muestras de los 4 periodos experimentales (25.6.2009A, 25.6.2009X, 20.8.2009A, 20.8.2009X, 22.10.2009A, 22.10.2009X, 17.12.2009A, 17.12.2009X, 20.7.2010A, 20.7.2010X, 21.2.2012A, 21.2.2012X, 19.3.2012A, 19.3.2012X). Tras aplicar todos los análisis bioinformáticos y la normalización como se describió en el apartado 2.8 de este Capítulo, el número normalizado de secuencias totales analizadas fue de 23184 (1656 secuencias/muestra) y se definieron 284 PHYs, (Fig 7). El número de PHYs por muestra se puede ver en la Tabla 5. En esta Tabla se muestran también el porcentaje de cobertura de Good y distintos índices de diversidad: Chao-1, Shannon-Weaver (H'), Simpson, e índice de equidad de Pielou.

Las curvas de rarefacción (Fig. 7) asintóticas y el porcentaje de Good (Tabla 5) muestran una cobertura suficiente de la diversidad de la comunidad mediante el estudio

realizado. Se observa que para todas las muestras, las curvas alcanzan su punto de inflexión, indicando que al aumentar el número de secuencias, el incremento en el número de nuevos PHYs detectados es menor.

Fig 7. Curvas de rarefacción de las muestras analizadas. Se ha utilizado el número de filotipos (PHYs) asignado tras aplicar todos los filtros y el número de secuencias normalizadas.



Los índices de diversidad Chao-1 y Shannon-Wiener (H') (valores medios 69 y 1,45, respectivamente) indican una baja riqueza de la diversidad de la comunidad de hongos en el sistema MBR. El índice de Simpson y el índice de equidad de Pielou muestran que la organización funcional de la comunidad fúngica fue media-alta (valores medios 0,48 y 0,35, respectivamente). En general, estos resultados están en concordancia con los de los índices de diversidad calculados a partir de los datos del estudio de *fingerprinting* mediante TGGE (Fig. 3).

Tabla 5. Número de lecturas y filotipos (PHYs) por muestra, número de PHYs con una sola lectura en cada muestra, porcentaje de cobertura de Good, índices de diversidad Chao-1, Shannon-Wiener (H'), Simpson e índice de equidad de Pielou, calculados a partir de los datos de pirosecuenciación 454 de la comunidad de hongos en el MBR. IC: intervalos de confianza al 95%.

Fase	Muestra	N° de lecturas (normalizado)	N° de PHYs Riqueza (S)	PHYs con 1 lectura	Good's coverage	Chao-1	IC 95%
Sm09	25.06.2009A	1656	58	21	98,73	74	61-90
Sm09	25.06.2009X	1656	54	25	98,49	81	57-91
Sm09	20.08.2009A	1656	63	23	98,61	86	67-95
Sm09	20.08.2009X	1656	56	15	99,09	68	57-80
Au09	22.10.2009A	1656	72	16	99,03	84	73-95
Au09	22.10.2009X	1656	63	14	99,15	81	65-86
Au09	17.12.2009A	1656	36	13	99,21	46	38-59
Au09	17.12.2009X	1656	56	22	98,67	79	60-89
Sm10	20.07.2010A	1656	74	22	98,67	93	78-104
Sm10	20.07.2010X	1656	39	13	99,21	55	40-62
Wn12	21.02.2012A	1656	38	9	99,46	43	39-56
Wn12	21.02.2012X	1656	40	9	99,46	44	40-60
Wn12	19.03.2012A	1656	53	22	98,67	86	55-82
Wn12	19.03.2012X	1656	43	12	99,28	50	44-64
	Valor medio	1656	53	17	98,98	69	-
Fase	Muestra	Shannon-Wiener H'	IC 95%	Simpson	IC 95%	Pielou	IC 95%
Sm09	25.06.2009A	1,15	1,09-1,26	0,36	0,34-0,40	0,28	0,27-0,31
Sm09	25.06.2009X	0,86	0,80-0,97	0,27	0,25-0,31	0,22	0,20-0,24
Sm09	20.08.2009A	1,26	1,20-1,38	0,39	0,37-0,43	0,30	0,29-0,33
Sm09	20.08.2009X	1,26	1,19-1,37	0,38	0,36-0,42	0,31	0,29-0,34
Au09	22.10.2009A	2,64	2,56-2,72	0,80	0,78-0,82	0,62	0,60-0,64
Au09	22.10.2009X	2,70	2,63-2,79	0,83	0,82-0,85	0,65	0,64-0,67
Au09	17.12.2009A	0,90	0,84-1,00	0,30	0,28-0,34	0,25	0,23-0,28
Au09	17.12.2009X	1,13	1,06-1,24	0,35	0,33-0,39	0,28	0,26-0,31
Sm10	20.07.2010A	1,97	1,90-2,09	0,62	0,60-0,65	0,46	0,44-0,48
Sm10	20.07.2010X	1,06	0,98-1,14	0,35	0,32-0,38	0,29	0,27-0,31
Wn12	21.02.2012A	1,32	1,25-1,41	0,51	0,48-0,54	0,36	0,34-0,39
Wn12	21.02.2012X	1,47	1,40-1,56	0,57	0,54-0,60	0,40	0,38-0,42
Wn12	19.03.2012A	1,29	1,25-1,41	0,47	0,46-0,51	0,33	0,32-0,36
Wn12	19.03.2012X	1,31	1,27-1,41	0,53	0,51-0,56	0,35	0,34-0,38
	Valor medio	1,45	-	0,48	-	0,36	-

Adicionalmente, con ambas metodologías se observa en la mayoría de las muestras una menor riqueza de filotipos en el BR anóxico (valores de R_r en el estudio de *fingerprinting* y valores de S en el estudio de pirosecuenciación 454). En el periodo Sm10, se aprecia una importante diferencia de la organización funcional de la comunidad entre los dos biorreactores (índice F_o en el estudio de TGGE e índices de Simpson y Pielou en el estudio de pirosecuenciación 454). Ambas metodologías permiten por tanto alcanzar conclusiones similares respecto a la diversidad y nivel de especialización de la comunidad fúngica del MBR.

La Fig. 8 muestra el dendrograma construido a partir de la matriz de similitud de Bray-Curtis, que tiene en cuenta la abundancia relativa de las PHYs de cada muestra. También encontramos varias semejanzas con respecto al análisis de clústeres del estudio realizado mediante TGGE. La estructura de la comunidad presenta una estabilidad baja, siendo la similitud global entre las muestras inferior al 30%. El análisis ANOSIM indicó diferencias significativas entre las muestras de los 4 periodos de estudio ($R=0,286$), pero no entre BR ($R= -0,093$). La falta de significancia de las diferencias entre la mayoría de las muestras tomadas el mismo día de los dos BRs del MBR también fue confirmada con el resultado del análisis SIMPROF (Fig. 8).

La mayoría de los PHYs detectados (98,9%) tuvieron una abundancia relativa inferior al 1% en todas las muestras analizadas. La contribución de los distintos PHYs a la diferenciación o similitud entre grupos de muestras se analizó con el módulo SIMPER de PRIMER-E. Según SIMPER, en el global de las muestras analizadas la comunidad fúngica del MBR estuvo dominada por 4 PHYs cuya abundancia relativa media fue superior al 2%, y que contribuyen el 92% a la similitud entre las muestras (Tabla 6).

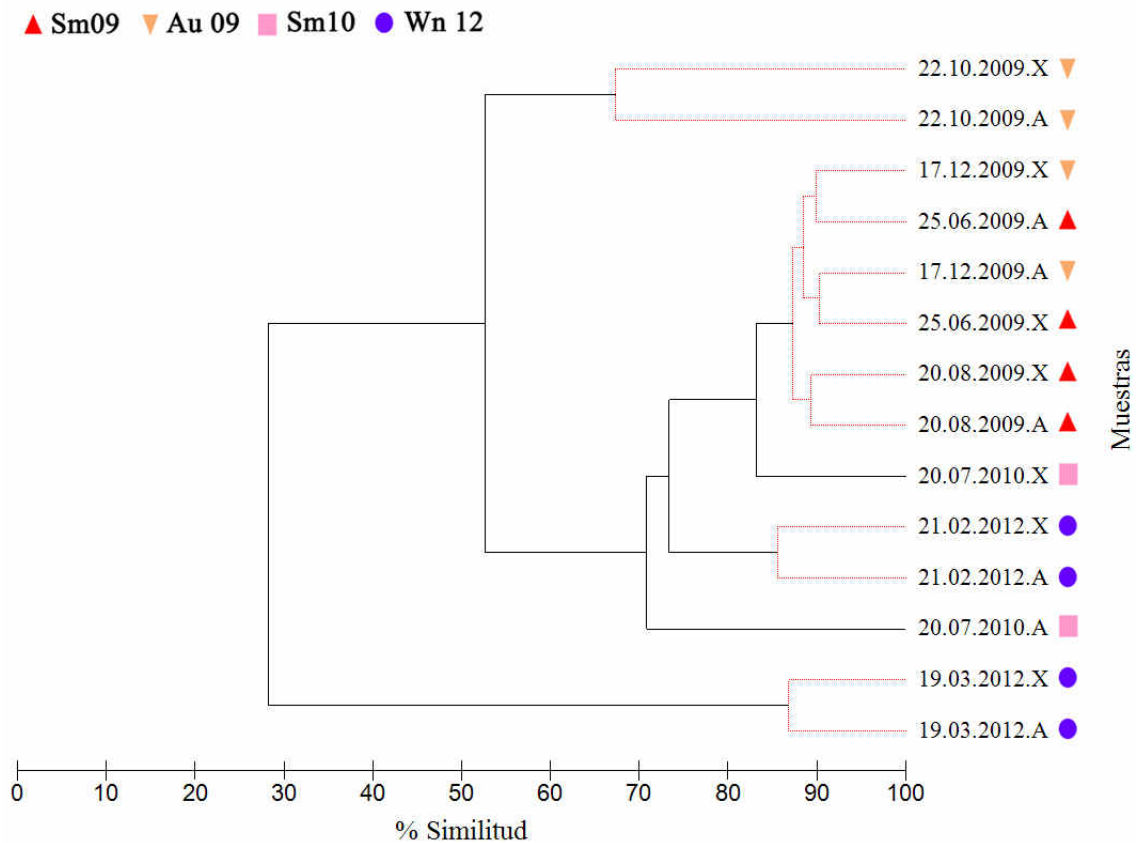


Fig 8. Dendrograma representando la similitud de la diversidad de la comunidad fúngica en las muestras tomadas de los biorreactores aireado (A) y anóxico (X) del MBR en distintas fechas, abarcando los cuatro periodos de estudio (Sm09, Au09, Sm10, Wn12). El análisis de clústeres se basa en la matriz de distancias de Bray-Curtis, generada a partir de los datos de abundancia relativa de las PHYs identificadas mediante pirosecuenciación 454 en las muestras. Las líneas de color rojo muestran las ramificaciones no significativas ($p > 0,05$) de acuerdo con el análisis SIMPROF.

Tabla 6. Filotipos que definen principalmente la similitud de la comunidad fúngica en las muestras de fango activo del MBR, según el análisis SIMPER.

Similitud media entre el total de las muestras: 59,9%				
Filotipos	Afiliación taxonómica	Abundancia relativa media	Similitud media entre muestras	Contribución
Phy00001	<i>Saccharomycetales</i>	62,2%	48,7%	81,3%
Phy00005	<i>Chytridiomycetes</i>	13,6%	2,8%	4,72%
Phy00020	<i>Tremellales</i>	3,2%	2,3%	3,78%
Phy00029	<i>Saccharomycetales</i>	2,2%	1,3%	2,2%

Tabla 7. Filotipos que definen principalmente la similitud de la comunidad fúngica en las muestras de fango activo del MBR en cada una de las 4 fases experimentales, según el análisis SIMPER.

Sm09 Similitud media entre las muestras: 88,1%				
Filotipo	Afiliación taxonómica	Abundancia relativa media	Similitud media	Contribución
PHY0001	<i>Saccharomycetales</i>	80,27%	78,28%	88,9%
PHY0005	<i>Chytridiomycetes</i>	3,73%	2,98%	3,38%
Total		84%	81,26%	92,28%

Au09 Similitud media entre las muestras: 61,0%				
Filotipo	Afiliación taxonómica	Abundancia relativa media	Similitud media	Contribución
PHY0001	<i>Saccharomycetales</i>	61,1%	46,7%	76,7%
PHY0005	<i>Chytridiomycetes</i>	5,3%	2,8%	4,7%
PHY0020	<i>Tremellales</i>	3,1%	2,1%	3,5%
PHY0029	<i>Saccharomycetales</i>	2,5%	1,6%	2,7%
Total		71,9%	53,3%	87,5%

Sm10 Similitud media entre las muestras: 69,9%				
Filotipo	Afiliación taxonómica	Abundancia relativa media	Similitud media	Contribución
PHY0001	<i>Saccharomycetales</i>	70,5%	60,6%	86,7%
PHY0005	<i>Chytridiomycetes</i>	4,8%	3,1%	4,5%
Total		75,2%	63,7%	91,2%

Wn12 Similitud media entre las muestras: 55,3%				
Filotipo	Afiliación taxonómica	Abundancia relativa media	Similitud media	Contribución
PHY0001	<i>Saccharomycetales</i>	41,1%	23,9%	43,2%
PHY0005	<i>Chytridiomycetes</i>	40,9%	23,2%	41,9%
PHY0020	<i>Tremellales</i>	2,8%	2,01%	3,64%
PHY0029	<i>Saccharomycetales</i>	3,4%	1,96%	3,55%
Total		88,13%	51,07%	92,31%

El análisis SIMPER se empleó también para estimar qué filotipos contribuyeron principalmente a las similitudes en la composición de la comunidad fúngica en las muestras pertenecientes a cada una de las 4 fases experimentales (Tabla 7). El filotipo dominante en todas la fases experimentales fue PHY0001 (80,3, 61,1, 70,5 y 41,1% de abundancia relativa en las fases Sm09, Au09, Sm10 y Wn12, respectivamente) y su

contribución a la similitud entre las muestras fue superior al 70% en las fases Sm09, Au9 y Sm10. PHY0005 tuvo una abundancia relativa <6% en todas las fases excepto en Wn12 (40,9%), cuando fue un filotipo codominante con PHY0001, contribuyendo ambos por encima del 40% a la similitud entre las muestras. PHY0020 y PHY0029 solo tuvieron una contribución significativa aunque baja (<5%) en las fases Au09 y Wn12.

Tabla 8. Filotipos que definen principalmente las divergencias de la comunidad fúngica en las muestras de fango activo del MBR entre las 4 fases experimentales, según el análisis SIMPER. Sólo se han incluido en la tabla los filotipos con una contribución $\geq 5\%$. Afiliación taxonómica de los PHYs: PHY0001, *Saccharomycetales*; PHY0005, *Chytridiomycetales*; PHY0020, *Tremellales*; PHY0027, *Unclassified Pezizomycotina*.

Fases	Divergencia media entre fases		Filotipos				Total
			PHY0001	PHY0005	PHY0020	PHY0027	
Sm09 × Au09	30,5%	Divergencia media	10,7%	2,5%	-	-	13,2%
		Contribución	35,2%	8,1%	-	-	43,3%
Sm09 × Sm10	22,0%	Divergencia media	5,6%	-	1,3%	2,0%	8,9%
		Contribución	25,2%	-	6,0%	9,0%	40,2%
Sm09 × Wn12	50,9%	Divergencia media	19,7%	20,9%	-	-	40,6%
		Contribución	38,7%	41,0%	-	-	79,8%
Au09 × Sm10	35,8%	Divergencia media	10,3%	2,6%	-	-	12,0%
		Contribución	28,8%	7,4%	-	-	36,2%
Au09 × Wn12	52,4%	Divergencia media	16,4%	18,4%	-	-	34,9%
		Contribución	31,4%	35,2%	-	-	66,6%
Sm10 × Wn12	54,7%	Divergencia media	16,1%	21,1%	-	-	37,1%
		Contribución	29,4%	38,5%	-	-	67,9%

SIMPER detectó que PHY0001 y PHY0005 también fueron los filotipos con más peso en la definición de las diferencias de la diversidad de la comunidad fúngica entre fase experimentales comparadas por pares (Tabla 8). PHY0001 contribuyó en todos los casos a estas diferencias (5,6-38,7%), y PHY0005 tuvo la contribución más alta para explicar las diferencias entre la fase Wn12 y el resto. Mediante el programa Clustal X, se compararon las secuencia de los filotipos mayoritarios PHY0001 y PHY0005 con las

secuencias representativas de las clases de bandas detectadas en los perfiles de TGGE basados en la secuencia parcial del gen del 16S rRNA. Se observó un 100% de identidad entre las secuencias de PHY0001 y las clases de bandas F1 y F2, un 100% de identidad entre PHY0005 y las clases de bandas F9 y F11, y un 98,5% de identidad entre PHY0005 y la clase de bandas F8 (solapamientos de aproximadamente 200 nt).

3.5.2 Diversidad de las poblaciones de hongos detectada en el MBR mediante pirosecuenciación 454.

La Fig. 9 muestra el mapa de la abundancia relativa acumulada de los PHYs de hongos a nivel de Phylum/Subphylum, a lo largo de las 4 fases experimentales. Se detectaron filotipos fúngicos clasificados en un total de 9 Phyla/Subphyla diferentes: *Ascomycota* (75,8%), *Chytridiomycota* (14,4%), *Basidiomycota* (7,4%), *Cryptomycota* (2%), *Mucoromycotina* Incertae sedis (0,7%), *Zoopagomycotina* Incertae sedis (0,6%), *Neocallimastigomycota* (0,2%), *Monoblepharidomycota* (0,1%) y *Glomeromycota* (0,02%). A grandes rasgos, estos resultados están en concordancia con el análisis de la comunidad de los perfiles de TGGE basados en el gen 18S rRNA (Fig. 5A), ya que con ambas metodologías, los Phyla dominantes de la comunidad son *Ascomycota* y *Chytridiomycota*. No obstante, hubo diferencias importantes en los porcentajes de abundancia relativa observados para cada uno de los Phyla. Además, debido a la mayor profundidad de muestreo de la técnica de pirosecuenciación 454, se detectaron hongos de 5 Phyla/Subphyla más que con la metodología *fingerprinting* TGGE.

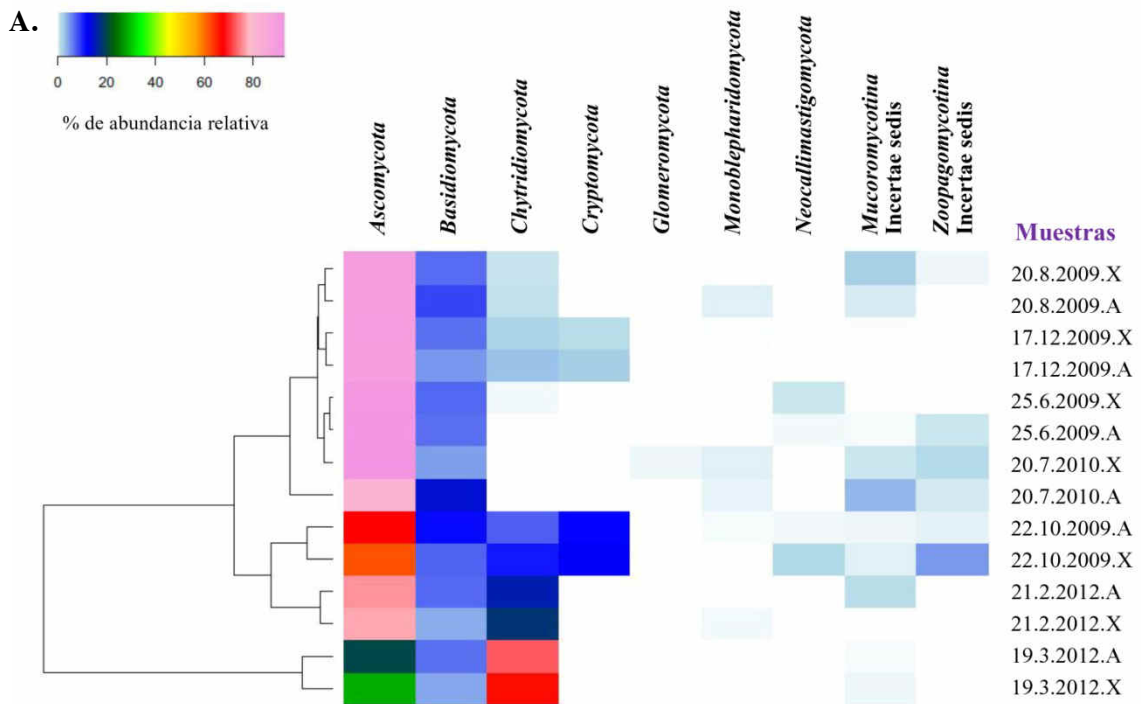
En la Fig. 9B se desglosan los cambios en la abundancia relativa de los diferentes taxones a lo largo de las fases experimentales en el MBR. El Phylum dominante en todas ellas fue *Ascomycota*: 90,7, 77,3, 87,1 y 50,6% (Sm09, Au09, Sm10, Wn12, respectivamente). En los periodos Sm09 y Au09, operados de forma continua en el

tiempo un total de seis meses y caracterizados por mantener los mismos factores operacionales HRT y SRT (38 horas y 20 días), la abundancia relativa de los filotipos clasificados en el Phylum *Basidiomycota* se mantuvo estable (media de 7,5 y 7,7% en Sm09 y Au09, respectivamente). Sólo se detectaron representantes del Phylum *Neocallimastigomycota* en las muestras de estos dos periodos y no se detectaron filotipos del Phylum *Glomeromycota*. El periodo Au09 estuvo caracterizado por presentar la mayor diversidad de hongos a nivel de Phylum/Subphylum, con representantes de 7 de los 8 taxones detectados a este nivel. Los miembros del Phylum *Cryptomycota* sólo fueron detectados en esta fase experimental. Los filotipos clasificados en los Phylum *Chytridiomycota*, *Cryptomycota* y *Basidiomycota* tuvieron abundancias relativas muy similares (5,9, 6,9 y 7,7%, respectivamente).

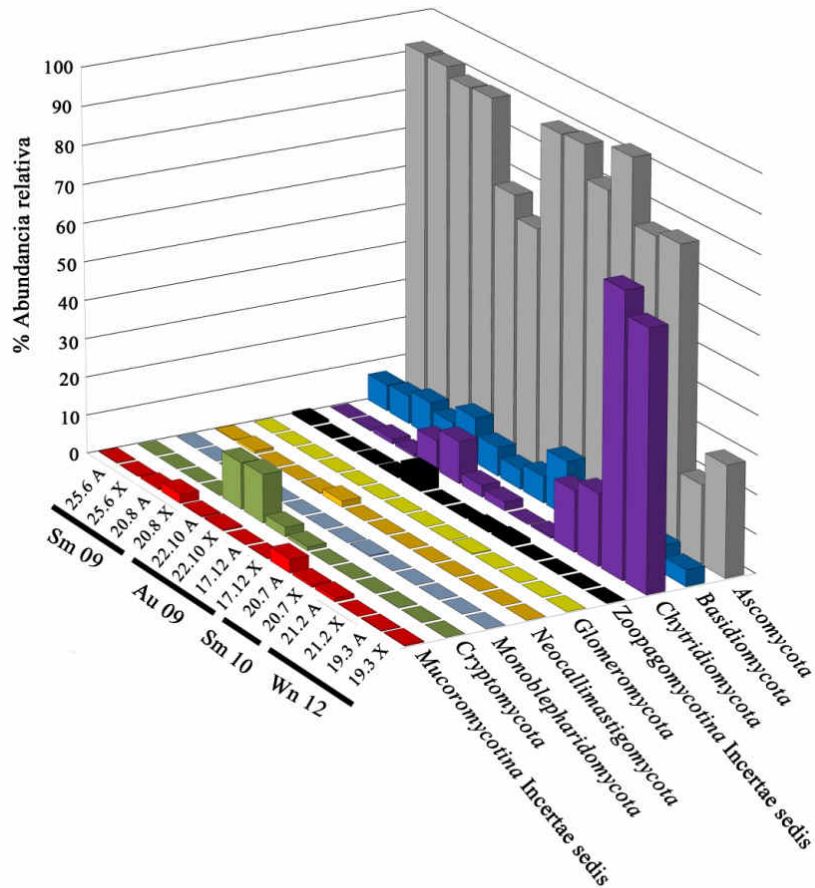
Durante el periodo experimental Sm10, caracterizado por elevados tiempos de retención de sólidos (35 días), elevada temperatura (valor medio de 28,2 °C) y alta concentración de materia orgánica en el influente, se observó un incremento de la abundancia relativa de los hongos clasificados en los Phyla *Basidiomycota* (9,4%), *Mucoromycotina* Incertae sedis (2,1%) y *Monoblepharidomycota* (0,36%). Además, los filotipos clasificados en el Phylum *Glomeromycota* sólo se detectaron en este periodo (0,12%).

Finalmente, el periodo Wn12 estuvo caracterizado por presentar la menor diversidad a nivel de Phylum. Los filotipos clasificados como *Ascomycota* y *Basidiomycota* disminuyeron su abundancia relativa (50,6 y 5,6%) en comparación con las otras fases experimentales, siendo los hongos del Phylum *Chytridiomycota* los que aumentaron drásticamente su abundancia relativa (hasta el 43,4%), lo que supone un incremento de 17 veces respecto a la media de los demás periodos analizados.

Fig. 9. Abundancia relativa acumulada de los filotipos detectados por pirosecuenciación 454 en el MBR clasificados a nivel de Phyla/Subphyla en las muestras de los cuatro periodos experimentales (Sm09, Au09, Sm10, Wn12), representada en forma de *heatmap* (A.) y gráfico de barras (B.).



B.



La Fig. 10 muestra la diversidad fúngica detectada en las muestras del MBR a los niveles taxonómicos Clase (Fig. 10A) y Orden (Fig. 10B). Dentro del Phylum *Ascomycota* encontramos filotipos relacionados con las siguientes Clases: *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Leotiomycetes*, *Pezizomycetes*, *Saccharomycetes* y *Sordariomycetes*, además de filotipos no clasificados a este nivel taxonómico (Unclassified *Ascomycota* y Unclassified *Pezizomycotina*). En el Phylum *Basidiomycota* se detectaron representantes de las Clases *Agaricomycetes*, *Exobasidiomycetes*, *Moniliellomycetes*, *Tremellomycetes* y *Ustilaginomycetes*, así como algunos filotipos no clasificados a este nivel taxonómico (Unclassified *Agaricomycotina*). Se detectaron también filotipos relacionados con *Chytridiomycetes*, *Glomeromycetes*, *Monoblepharidomycetes* y *Neocallimastigomycetes* (Clases únicas de sus respectivos Phyla) y una serie de filotipos no clasificables a este nivel taxonómico (*Endogonales Incertae sedis*, *Mucorales Incertae sedis*, *Zoopagales Incertae sedis* y Unclassified *Cryptomycota*).

La comunidad de hongos se caracterizó por albergar filotipos pertenecientes a 22 Ordenes diferentes (Fig. 10B). Dentro del Phylum *Ascomycota* encontramos representantes de 8 Ordenes: *Erysiphales*, *Eurotiales*, *Hypocreales*, *Onygenales*, *Pezizales*, *Pleosporales*, *Saccharomycetales* y *Venturiales*, y filotipos no clasificables a nivel de Orden (Unclassified *Dothideomycetes*, Unclassified *Eurotiomycetes*, Unclassified *Sordariomycetes*, Unclassified *Pezizomycotina*, Unclassified *Ascomycota*). En el Phylum *Basidiomycota* encontramos hongos de 6 Ordenes: *Boletales*, *Malasseziales*, *Moniliellales*, *Tremellales*, *Urocystidales* y *Ustilaginales*, además de filotipos no clasificables a este nivel (Unclassified *Agaricomycetes*, Unclassified

Exobasidiomycetes, Unclassified *Tremellomycetes* y Unclassified *Agaricomycotina*).

Para los Phyla restantes, se detectaron miembros de dos o menos Órdenes.

3.5.3. Relación entre la dinámica de las poblaciones fúngicas detectadas mediante pirosecuenciación 454 y las variables del sistema MBR (análisis BIO-ENV).

La Fig. 11 muestra las ordenaciones mediante escalado multidimensional no métrico (MDS) de las muestras de fango activo del MBR, según la abundancia relativa acumulada de las poblaciones fúngicas detectadas por secuenciación 454 para los niveles taxonómicos de Phylum/Subphylum y Clase en los cuatro periodos de estudio. El análisis BIO-ENV indicó el nivel de influencia de las variables ambientales y los factores operacionales sobre la composición de la comunidad. El análisis BEST reveló que la variable que mejor explicó estos cambios fue el pH, con un 74% para la diversidad a nivel Phylum/Subphylum (Fig. 11A) y un 71,5% a nivel Clase (Fig. 11B). Estos resultados se encuentran en concordancia con los encontrados en el estudio de TGGE, donde el pH fue una de las variables que aportó la mayor explicación a la dinámica de las poblaciones totales de hongos, para ambos marcadores moleculares utilizados (ITS2 y 18S rRNA).

A nivel de Phylum/Subphylum, se observaron fuertes correlaciones entre las abundancias relativas y las variables ambientales y operacionales. Además, varios Phyla estuvieron influenciados por las mismas variables (Fig. 11A y Tabla 9A). En este sentido, la abundancia relativa de los filotipos clasificados en los Phyla *Glomeromycota*, *Monoblepharidomycota*, y *Mucoromycotina* Incertae sedis mostraron fuertes correlaciones positivas con iTSS e IT ($r > 0,9$) y negativas con BOD₅ ($r < -0,9$). *Ascomycota* y *Zoopagomycotina* Incertae sedis se correlacionaron positivamente con la concentración de COD del influente, SRT e IT ($r > 0,8$), y negativamente con la ratio

F/M, pH y VSS ($r < -0,8$). La abundancia relativa de los filotipos del Phylum *Chytridiomycota* siguió tendencias completamente opuestas a las observadas para el Phylum *Ascomycota* para todas las variables estudiadas. Las correlaciones positivas más fuertes se observaron con la ratio F/M, pH y VSS ($r > 0,75$), y las negativas con COD, SRT e IT ($r < -0,7$). Finalmente, la abundancia relativa de los hongos de los Phyla *Basidiomycota* y *Neocallimastigomycota* se correlacionó positivamente con COD y HRT ($r > 0,7$) y negativamente con VSS ($r < -0,7$).

Estos resultados son en parte coincidentes con los obtenidos mediante TGGE basado en el gen del 18S rRNA, en lo referente a la abundancia relativa de las clases de bandas correspondientes a los dos Phyla dominantes en el MBR (*Ascomycota* y *Chytridiomycota*) (Fig. 6, Tabla 4). Dentro del Phylum *Ascomycota*, las abundancias relativas de las clases de bandas F1 y F2, con secuencia idéntica a la de PHY0001, mostraron las mismas tendencias respecto a todas las variables, con excepción del pH. En el Phylum *Chytridiomycota*, la abundancia relativa de la clase de bandas F8 se correlacionó positivamente con la ratio F/M y negativamente con COD y SRT, y las clases de bandas F9 y F11 mostraron fuertes correlaciones positivas con VSS y negativas con IT.

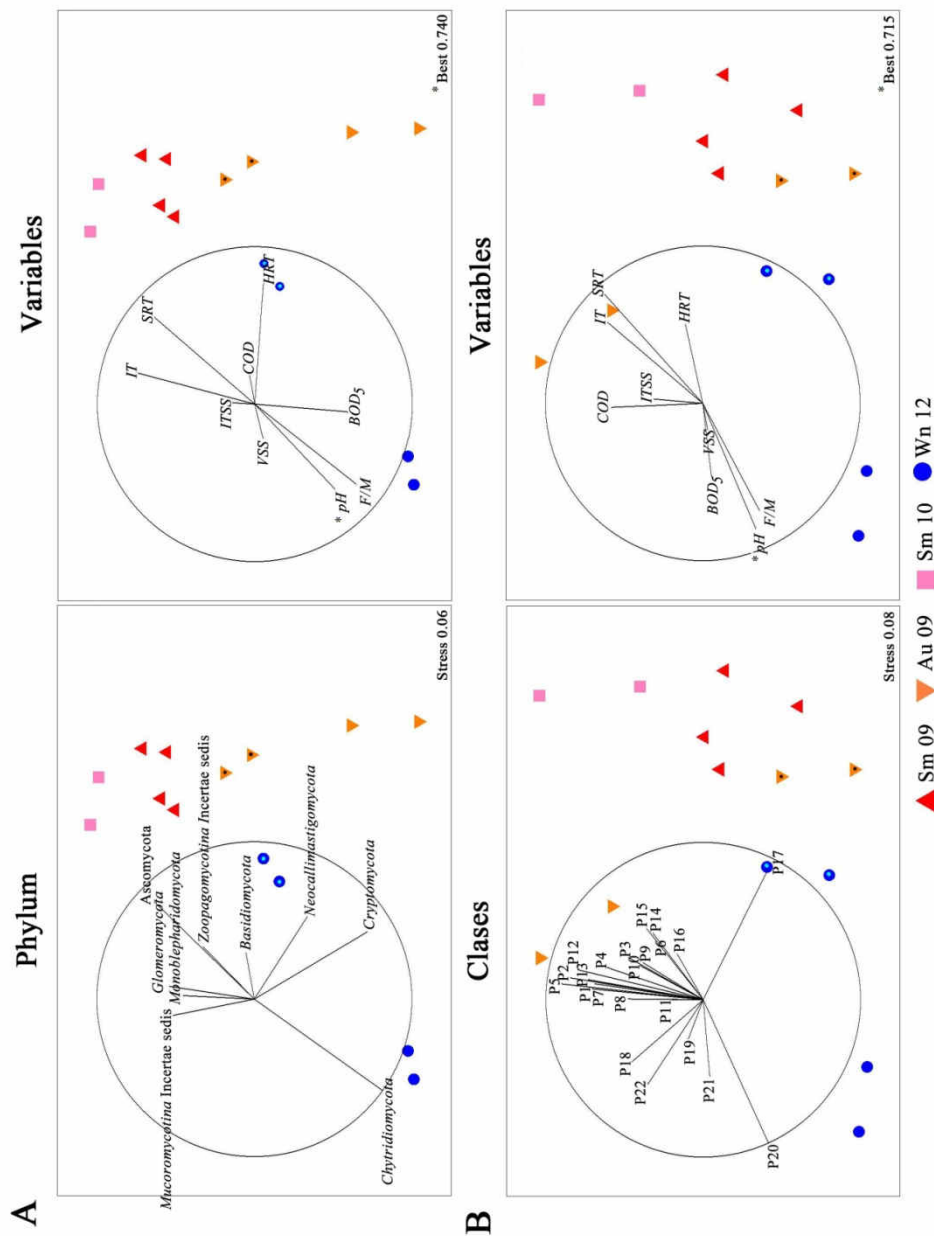


Fig. 11. Escalado multidimensional no métrico (MDS) mostrando la distribución de las muestras de fango activo en los dos biorreactores (aireado y anóxico) del MBR a lo largo de las cuatro fases experimentales (Sm09, Au09, Sm10, Wn12), basada en la abundancia relativa de los taxones fúngicos detectados mediante el estudio de pirosecuenciación 454. Los vectores representan la dirección y el incremento a través de las muestras de las variables del sistema (columna derecha) y la abundancia relativa de filotipos fúngicos clasificados a nivel de Phylum y Orden (columna izquierda). El valor BEST indica el nivel de explicación de los datos biológicos por las variables incluidas en el análisis, estando marcadas las variables que contribuyen a dicho valor con un asterisco (*) (A) Phylum (B) Clases. Afiliación taxonómica para las Clases: P1: *Dothideomycetes*; P2: *Eurotiomycetes*; P3: *Letiomycetes*; P4: *Pezizomycetes*; P5: unclassified *Pezizomycotina*; P6: unclassified *Ascomycota*; P7: *Exobasidiomycetes*; P8: *Tremellomycetes*; P9: *Glomeromycetes*; P10: *Monoblepharidomycetes*; P11: *Neocallimastigomycetes*; P12: *Mucorales* Incertae sedis; P13: *Zoopagales* Incertae sedis; P14: *Agaricomycetes*; P15: *Moniliellomycetes*; P16: *Ustilaginomycetes*; P17: *Saccharomycetes*; P18: *Sordariomycetes*; P19: unclassified *Cryptomycota*; P20: *Chytridiomycetes*; P21: unclassified *Agaricomycotina*; P22: *Endogonales* incertae sedis. Las muestras tomadas cuando el MBR experimentó formación de espumas se encuentran marcadas mediante un punto en el centro.

En la Fig. 11B y Tabla 9B se muestra el análisis BIO-ENV realizado agrupando los filotipos de hongos a nivel de Clase. Para las Clases del Phylum *Ascomycota*, la abundancia relativa de los filotipos de *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Letiomycetes* y *Pezizomycetes*, así como los filotipos agrupados como unclassified *Pezizomycotina* y unclassified *Ascomycota*, se correlacionaron positivamente con COD, iTSS, IT y SRT ($r > 0,7$). Se observaron las mismas tendencias para *Exobasidiomycetes* y *Tremellomycetes* (*Basidiomycota*), *Glomeromycetes*, *Monoblepharidomycetes*, *Neocallimastigomycetes*, *Mucorales* Incertae sedis y *Zoopagales* Incertae sedis ($r > 0,7$).

Dentro del Phylum *Basidiomycota*, la abundancia relativa de filotipos de las Clases *Agaricomycetes*, *Moniliellomycetes* y *Ustilaginomycetes* fue favorecida por los incrementos de IT, HRT y SRT ($r > 0,8$) y por los valores decrecientes de BOD₅, VSS, pH y F/M ($r < -0,8$). Las abundancias relativas de los filotipos de la Clase *Saccharomycetes* se correlacionaron positivamente con HRT ($r > 0,8$) y negativamente con pH y F/M ($r < -0,5$). Para las Clases *Sordariomycetes* y el grupo unclassified *Cryptomycota*, se detectaron correlaciones positivas con BOD₅ y VSS ($r > 0,5$). Para la Clase *Chytridiomycetes*, hubo correlaciones positivas con BOD₅, VSS, pH y F/M ($r > 0,9$) y negativas con IT, SRT y HRT ($r < -0,9$). Estos resultados corroboran de nuevo la alternancia de los filotipos de la comunidad fúngica en el sistema, influenciados por las variaciones de las condiciones ambientales y operacionales.

Las muestras que experimentaron formación de espumas en los periodos Au09 y Wn12 se encuentran marcadas en las ordenaciones mediante un punto interno (Fig. 11). Al igual que en el estudio de TGGE, encontramos que los filotipos de la clase *Saccharomycetes* aumentaron su abundancia relativa en la dirección de estas muestras (Fig. 6 y 11B).

Tabla 9. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre los vectores de la Fig. 11 que representan la abundancia relativa de los diferentes taxones de hongos detectados por secuenciación 454 en el MBR y las variables ambientales y operacionales. A. Nivel Phylum/Subphylum, B. Nivel Clase.

A. Nivel Phylum/Subphylum

	COD	BOD ₅	VSS	ITSS	PH	IT	SRT	HRT	F/M
<i>Ascomycota</i>	0,81	-0,77	-0,84	0,76	-0,99	0,87	1,00	0,65	-1,00
<i>Basidiomycota</i>	1,00	-0,26	-1,00	0,23	-0,75	0,42	0,78	0,97	-0,84
<i>Chytridiomycota</i>	-0,71	0,86	0,75	-0,85	1,00	-0,94	-1,00	-0,52	0,98
<i>Cryptomycota</i>	0,36	0,81	-0,30	-0,83	0,36	-0,70	-0,31	0,57	0,22
<i>Glomeromycota</i>	0,32	-1,00	-0,37	1,00	-0,87	0,99	0,85	0,08	-0,79
<i>Monoblepharidomycota</i>	0,22	-1,00	-0,28	1,00	-0,81	0,98	0,79	-0,02	-0,72
<i>Neocallimastigomycota</i>	0,74	0,47	-0,69	-0,49	-0,10	-0,31	0,14	0,88	-0,24
<i>Mucoromycotina</i>									
<i>Incertae sedis</i>	-0,03	-0,96	-0,04	0,97	-0,65	0,90	0,61	-0,27	-0,53
<i>Zoopagomycotina</i>									
<i>Incertae sedis</i>	0,82	-0,76	-0,86	0,74	-0,99	0,86	1,00	0,66	-1,00

B. Nivel Clase

		COD	BOD ₅	VSS	ITSS	pH	IT	SRT	HRT	F/M
<i>Ascomycota</i>	<i>Dothideomycetes</i>	0,99	-0,21	-0,28	1,00	-0,48	0,82	0,74	0,31	-0,55
	<i>Eurotiomycetes</i>	0,98	-0,28	-0,34	1,00	-0,53	0,86	0,78	0,37	-0,61
	<i>Leotiomycetes</i>	0,85	-0,59	-0,64	0,91	-0,79	0,98	0,95	0,67	-0,84
	<i>Pezizomycetes</i>	0,93	-0,43	-0,49	0,97	-0,66	0,93	0,87	0,51	-0,72
	<i>Saccharomycetes</i>	-0,48	-0,84	-0,80	-0,36	-0,65	0,24	0,37	0,78	-0,58
	<i>Sordariomycetes</i>	0,78	0,56	0,51	0,69	0,31	0,15	0,02	-0,48	0,23
	<i>Unclassified Pezizomycotina</i>	0,99	-0,23	-0,29	1,00	-0,49	0,83	0,75	0,32	-0,56
	<i>Unclassified Ascomycota</i>	0,96	-0,35	-0,41	0,99	-0,59	0,89	0,82	0,44	-0,66
<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycetes</i>	0,57	-0,86	-0,89	0,67	-0,97	0,98	1,00	0,91	-0,99
	<i>Exobasidiomycetes</i>	0,98	-0,26	-0,32	1,00	-0,52	0,85	0,77	0,35	-0,59
	<i>Moniliellomycetes</i>	0,59	-0,85	-0,88	0,69	-0,96	0,98	1,00	0,90	-0,98
	<i>Tremellomycetes</i>	1,00	-0,13	-0,19	1,00	-0,40	0,77	0,68	0,22	-0,48
	<i>Ustilaginomycetes</i>	0,46	-0,92	-0,95	0,57	-0,99	0,94	0,98	0,96	-1,00
	<i>Unclassified Agaricomycotina</i>	-0,04	1,00	1,00	-0,17	0,95	-0,71	-0,80	-0,99	0,92
	<i>Chytridiomycetes</i>	-0,38	0,95	0,97	-0,49	1,00	-0,91	-0,95	-0,98	1,00
	<i>Glomeromycetes</i>	0,83	-0,62	-0,67	0,89	-0,81	0,99	0,96	0,70	-0,86
	<i>Monoblepharidomycetes</i>	0,86	-0,58	-0,63	0,92	-0,78	0,98	0,94	0,65	-0,83
	<i>Neocallimastigomycetes</i>	1,00	-0,12	-0,18	1,00	-0,39	0,76	0,67	0,21	-0,47
<i>Endogonales Incertae sedis</i>	0,58	0,77	0,72	0,47	0,56	-0,12	-0,25	-0,70	0,48	
<i>Mucorales Incertae sedis</i>	0,98	-0,29	-0,35	1,00	-0,54	0,86	0,79	0,38	-0,61	
<i>Zoopagales Incertae sedis</i>	0,96	-0,35	-0,41	0,99	-0,59	0,89	0,82	0,44	-0,66	
<i>Unclassified Cryptomycota</i>	0,39	0,89	0,85	0,27	0,72	-0,34	-0,46	-0,84	0,66	

En la Fig. 12 se analizan los cambios de la abundancia relativa de los taxones fúngicos dominantes en el MBR a nivel de Phylum y Clase: *Chytridiomycota* y *Ascomycota* (Fig. 12A); *Chytridiomycetes* y *Saccharomycetes* (Fig. 12B). Se observa un marcado carácter antagónico entre ambos grupos, cuya abundancia relativa se vio influenciada de manera opuesta por las diferentes condiciones ambientales y operacionales del MBR (Tabla 9). En este sentido, los filotipos del Phylum *Chytridiomycota* y la clase *Chytridiomycetes* son muy abundantes en las muestras de finales de Wn12 (19.3.12.A, X), viéndose positivamente favorecidos por los valores altos de pH y F/M, y negativamente por SRT, HRT e IT. Este periodo se caracterizó por presentar los mayores niveles de F/M ($0,25 \text{ d}^{-1}$), la IT media más baja ($16,2 \pm 2,6 \text{ }^\circ\text{C}$) y el SRT más corto (12 días) de todas las fases experimentales. Además, en el día 19.3.12 se registró un valor de pH particularmente elevado (8,4). En contraste, no se detectaron filotipos de *Chytridiomycota* en las muestras del periodo Sm10, caracterizado por presentar los SRT más largos (35 días) y una ratio F/M muy inferior ($0,14 \pm 0,03 \text{ d}^{-1}$). Estos resultados indican que la operación en el MBR con SRT prolongados y ratios F/M bajas fue desfavorable para la proliferación de los hongos de este grupo.

En sentido opuesto, encontramos que la abundancia relativa de hongos del Phylum *Ascomycota* y la Clase *Saccharomycetes* (Fig. 12) fue positivamente influenciada por SRT, HRT e IT, y negativamente por F/M y pH. Los periodos Sm09, Au09 y Sm10, donde la abundancia relativa de filotipos clasificados en estos taxones fue alta, se caracterizaron por tener los SRT y HRT más largos (20 y 35 días, 33 y 38 horas, respectivamente), elevadas temperaturas (20-28 $^\circ\text{C}$) y los menores valores de F/M ($0,14 - 0,19 \text{ d}^{-1}$) y pH (6,9 - 7,5).

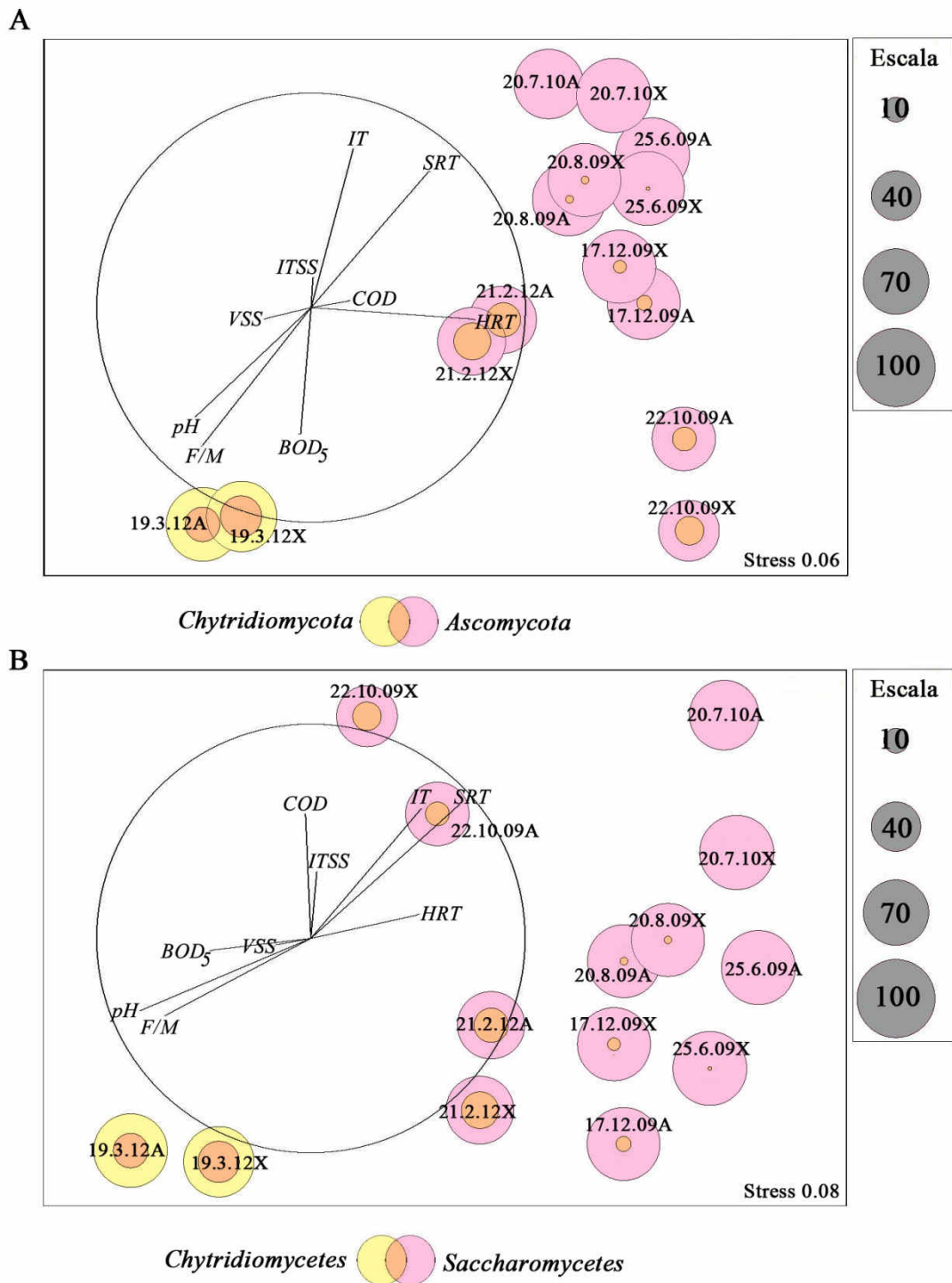


Fig 12. Escalado multidimensional no métrico (MDS) mostrando la abundancia relativa de los filotipos clasificados en los taxones fúngicos dominantes en el MBR en ambos biorreactores (aireado y anóxico) y a lo largo de las cuatro fases experimentales (Sm09, Au09, Sm10, Wn12). A. Nivel Phylum: *Chytridiomycota* y *Ascomycota*, B. Nivel Clase: *Chytridiomycetes* y *Saccharomycetes*. El tamaño de las burbujas es proporcional a la abundancia relativa de los filotipos clasificados en cada grupo en cada una de las muestras. Los vectores muestran la dirección y fuerza con la que cada variable explica la distribución de las muestras en la ordenación.

Las plataformas de secuenciación masiva han permitido realizar estudios de la diversidad de los microorganismos en ecosistemas naturales o en sistemas de ingeniería, con una profundidad mayor de la que permiten los métodos moleculares convencionales como la construcción de bibliotecas de clones, técnicas de *fingerprinting* o FISH, en particular a la hora de detectar organismos poco abundantes (Wang *et al.*, 2012). Con el estudio de pirosecuenciación 454 se ha logrado profundizar en la caracterización de las poblaciones de hongos en el MBR, usando una herramienta de mayor resolución que la secuenciación de bandas separadas por medio de la técnica de *fingerprinting* TGGE, detectándose 284 PHYs de hongos en el sistema. No obstante, ambas aproximaciones permiten concluir que la comunidad de hongos del MBR es de estructura poco estable y está formada por un número bajo de especies (Fig. 3 y Tabla 5), con un perfil flexible de adaptación y de respuesta a los cambios de las distintas variables estudiadas (Figs. 6, 11 y 12).

En nuestro estudio, detectamos ciertos cambios en la composición de la comunidad de hongos cuando el MBR experimentó episodios de formación de espumas (Fig. 6 y 11). En el análisis MDS basado en los datos de *fingerprinting* a partir de la secuencia del gen del 18S rRNA, las muestras tomadas en las fechas próximas a los episodios de generación de espumas tendieron a formar clústeres separados en la ordenación (Fig. 6), En los análisis MDS basados tanto en estos datos de *fingerprinting* como en los datos del estudio de pirosecuenciación 454, se observa que la abundancia relativa de filotipos de la Clase *Saccharomycetes* se incrementa en la dirección de dichas muestras en la ordenación (Fig. 6 y Fig. 11).

Hasta la fecha, los estudios dedicados a analizar el potencial biotecnológico de los hongos se han basado en su mayoría en técnicas dependientes de cultivo. Las especies

de hongos cultivables más comúnmente utilizadas en depuración de aguas son *Aspergillus niger*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium expansum*, *Phanerocheate chrysosporium* y *Trichoderma harzianum* (Alam *et al.*, 2001; Alam and Fakhru'l-Razi, 2003; Alam *et al.*, 2003b; Fakhru'l-Razi *et al.*, 2002b; Fakhru'l-Razi and Molla, 2007; Jamal *et al.*, 2005; Mannan *et al.*, 2005; Molla *et al.*, 2004; Subramanian *et al.*, 2006; Subramanian *et al.*, 2008). Las técnicas NGS permiten conocer la incidencia de los hongos en los sistemas de tratamiento de aguas y la posible importancia de grupos interesantes y desconocidos hasta ahora. En el análisis de los datos de pirosecuenciación 454, se ha podido determinar la identidad de 29 de los filotipos detectados en el MBR hasta el nivel de género, clasificándose en 15 géneros diferentes: *Barnettozyma*, *Blumeria*, *Candida*, *Geotrichum*, *Kazachstania*, *Malassezia*, *Ochroconis*, *Phoma*, *Pilobolus*, *Rhizidium*, *Sporopachydermia*, *Syncephalastrum*, *Trichosporon*, *Urocystis* y *Yarrowia*. Adicionalmente, el análisis manual de la secuencia del filotipo más abundante, PHY0001, indica que se encuentra filogenéticamente muy cercano al género *Saccharomyces*. En concordancia, las secuencias representativas de algunas de las clases de bandas del estudio de TGGE guardan porcentajes de identidad altos (>97%) con secuencias de los géneros *Candida* (F7), *Geotrichum* (F14) y *Saccharomyces* (F1, F2).

Especies de los géneros *Candida*, *Saccharomyces* y *Trichosporon* han sido encontradas en la microbiota de plantas de aguas residuales urbanas e industriales estudiadas mediante la técnica DGGE (Monteiro *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2001). Además, especies pertenecientes al género *Candida* han sido descritas por desarrollar *biofouling* en las membranas de los sistemas MBR (Liébana *et al.*, 2014), y especies de *Geotrichum* y *Trichosporon* han sido aisladas

durante episodios de *bulking* (Zheng *et al* 2001, 2011). Previos estudios han demostrado que cepas de *Candida*, *Geotrichum*, *Saccharomyces* y *Trichosporon* producen diferentes enzimas extracelulares: lipasas, proteasas, y las peroxidasas ligninolíticas Mnp y LiP (Chi *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2013). Las lipasas tienen numerosas aplicaciones industriales debido a que catalizan un amplio rango de reacciones, que incluyen hidrólisis, inter-esterificación, alcoholólisis, acidólisis, esterificación y aminólisis. Estos hongos también han sido estudiados por presentar actividad proteasa, teniendo importantes aplicaciones en el tratamientos de residuos, detergentes, procesado del cuero, recuperación de plata, medicina y productos químicos (Chi *et al.*, 2009). Especies de los géneros antes mencionados han sido detectadas en plantas de aguas residuales (Yang *et al.*, 2013) y también en masas de agua naturales contaminadas, donde son capaces de metabolizar compuestos aromáticos y transformar metales pesados, resultando de esta forma excelentes indicadores de la contaminación (Boguslawska-Was *et al.*, 2001).

Las enzimas ligninolíticas fúngicas son responsables de la degradación de varias sustancias recalcitrantes como hidrocarburos aromáticos policíclicos y productos derivados de los tintes, estas enzimas han sido ampliamente estudiadas (Kaushik y Malik, 2009). Estudios recientes han demostrado que especies de *Candida* y *Trichosporon* podrían producir al menos dos tipos diferentes de estas enzimas extracelulares, convirtiéndose en dos géneros con un gran potencial biotecnológico para la degradación de sustancias aromáticas en procesos de biorremediación (Kurtzman *et al.*, 2011). *Trichosporon montevideense*, aislada del agua residual (Yang *et al.*, 2013) presenta cuatro tipos diferentes de actividades enzimáticas, especialmente una alta actividad LiP, implicada en la degradación de sustancias aromáticas. En conclusión, los

trabajos existentes indican que la comunidad de hongos puede cumplir funciones de importancia para la depuración en los sistemas de tratamiento de aguas, además de presentar un gran potencial para el desarrollo de futuras aplicaciones biotecnológicas.

El filotipo PHY0005 (*Chytridiomycetes*) fue el segundo en abundancia relativa en las muestras del MBR, y junto a PHY0001 fue el principal determinante de las semejanzas y diferencias observadas en la estructura de la comunidad fúngica (Tablas 6-8). Los *Chytridiomycota* son un grupo de hongos con zoosporas flageladas (Hageskal *et al.*, 2009), que frecuentemente pasa desapercibido en los estudios debido a incorrectos métodos de muestreo, a pesar de que su papel como descomponedores de quitina, queratina, celulosa y hemicelulosa es de bastante importancia.

Entre los géneros identificados en el fango activo del MBR, hay varios hongos filamentosos (*Geotrichum*, *Phoma*, *Pilobolus*, *Trichosporon*, *Syncephalastrum*, *Urocystis*) que podrían cumplir papeles relevantes en la formación de agregados celulares o influir en problemas de operación, como se comentó en el apartado de Introducción de este Capítulo. Estos resultados ponen de manifiesto la variedad y posiblemente el gran potencial de otros hongos que queda todavía por explorar. En este sentido, en el estudio de pirosecuenciación 454 se eliminaron del análisis un gran número de secuencias cuya relación evolutiva con el Reino Fungi era dudosa, dado que los cebadores de PCR disponibles amplifican secuencias de otros organismos que no son hongos verdaderos; no obstante, estas secuencias no clasificadas podrían contener representantes de grupos hasta ahora desconocidos, sobre todo de los linajes basales de hongos cuya posición evolutiva aún conserva muchas incógnitas. Por ello, son necesarios más estudios con el fin de establecer una mejor comprensión de estos

microorganismos y establecer la relevancia de sus funciones en los sistemas de tratamiento de aguas.

4. Conclusiones.

Los resultados de este estudio amplían el conocimiento de la composición de la comunidad fúngica y la dinámica de sus poblaciones en sistemas de depuración de aguas residuales del tipo MBR, prácticamente inexplorada hasta la fecha. En este estudio basado en *fingerprinting* con TGGE, el empleo de dos marcadores moleculares (ITS2 y el gen 18S rRNA) contribuyó a una mejor monitorización de esta comunidad compleja, si bien se detectaron algunas discrepancias al comparar los resultados obtenidos con los dos marcadores moleculares, y la resolución de la identificación taxonómica fue baja para las secuencias de la región ITS2. La combinación de las técnicas de *fingerprinting* TGGE con pirosecuenciación 454 se ha aplicado con éxito al estudio de la diversidad de la comunidad fúngica en el MBR. Ambas metodologías mostraron que las poblaciones de hongos se encuentran presentes en estos sistemas, adaptándose a las cambiantes condiciones ambientales y operacionales de las cuatro fases experimentales estudiadas. El análisis BIO-ENV reveló en ambos casos que el pH es la variable con mayor contribución a la explicación de los cambios observados en la composición de esta comunidad. Además, mediante ambas técnicas se demostró que los Phyla dominantes en este sistema son *Ascomycota* y *Chytridiomycota*, mostrando un comportamiento excluyente entre ellos y viéndose afectados de forma opuesta por las mismas variables ambientales y operacionales.

Chapter 4-Capítulo 4

Quantification of fungal populations in a full-scale membrane bioreactor and links to operational conditions and environmental variables.

Abstract.

The absolute abundance of fungi was estimated by means of quantitative PCR (qPCR) in a full-scale membrane bioreactor (MBR) treating urban wastewater and experiencing seasonal foaming. Both the fungal 18S-rRNA gene and the internal transcribed spacer (ITS2) sequences were targeted, and a difference of *ca.* 2 orders of magnitude between the numbers of copies measured was observed, highlighting that the selection of the molecular markers and primers is a crucial step for the accuracy of the absolute quantification of fungi by qPCR. In spite of these differences, the results of the present study demonstrated that fungi were a numerically important fraction of the activated sludge microbial community, occurring in both the aerated and anoxic bioreactors of the MBR under changing operating and environmental conditions. Multivariate analysis showed positive correlations of the abundance of fungi with temperature and negatively correlations to BOD₅ of the influent and concentration of solids in the MBR. In contrast, the directional influence of solids retention time, pH and food/microbial ratio diverged depending on the molecular marker chosen. The absolute abundance of fungi was not increased when the MBR experienced foaming episodes.

Keywords: membrane bioreactor (MBR); qPCR; Fungi; foaming; non-metric multidimensional scaling (MDS).

1. Introduction.

In recent years, the application of molecular techniques has allowed to significantly increase our understanding of the diversity and functions of microorganisms in a range of environments (Vílchez-Vargas *et al.*, 2010). However, studies in the field of microbial ecology more often consider only bacteria (Kent and Triplett, 2002), while the relevance of the roles of other microbial communities in many natural and engineered environments remains limited (Hoshino, 2012).

Fungi are ubiquitous microorganisms and key players in a wide array of ecosystems processes, in particular the decomposition of organic matter (Hoshino and Morimoto, 2010). In biological wastewater treatment plants (WWTPs), fungi are part of the complex microbial community of the activated sludge, together with viruses, archaea, bacteria, protozoa, metazoa and algae (Bitton, 2010). The occurrence of fungi in WWTPs has been often regarded unimportant, since they are not numerically dominant except in industrial wastewaters, where features such as acid pH, shortage of N sources and the presence of substances toxic for bacteria favor their development (Evans and Seviour, 2012; Sladka, 1966; Zheng *et al.*, 2011). Therefore, the roles of fungi in municipal WWTPs are currently very little explored, although several recent studies have demonstrated that these organisms play important functions contributing to biomass degradation, denitrification and stabilization of cell aggregation (Evans and Seviour, 2012; Guest and Smith, 2002; More *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2007, 2009; Yang *et al.*, 2011). Filamentous fungi are also involved in the generation of operational problems such as clogging of pipes and filters, bulking, foaming and membrane

biofouling (Baker and Dudley, 1998; Richard, 2003; Weber *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2011).

Most of the available studies devoted to the identification and quantification of fungal populations in engineered systems have been performed based on cultivation-dependent approaches (Awad and Kraume, 2011; Bux *et al.*, 1994, Fakhru'l-Razi *et al.*, 2002, Kacprzak *et al.*, 2005, Liébana *et al.*, 2015). Molecular biology techniques are powerful tools to evaluate the diversity and abundance of environmental fungi in natural communities without the need for their isolation and culture (Hoshino, 2012). Real-time PCR (qPCR) is an accurate and cultivation-independent method which has recently become a valuable molecular tool for the direct quantification of indigenous organisms in environmental DNA extracts (Smith and Osborn, 2009). qPCR approaches have been widely used to quantify fungal species from soil (Cullen *et al.*, 2001; Cullen *et al.*, 2002; Filion *et al.*, 2003; Jaffar-Abbas *et al.*, 2014; Lees *et al.*, 2002; Prévost-Bouré *et al.*, 2011), and also applied to indoor environments, building materials, food and wines, and clinical samples (Hierro *et al.*, 2006; Pietarinen *et al.*, 2008; Pitkäranta *et al.*, 2008; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2007). However, to the best of the authors' knowledge, qPCR has never been used to evaluate the abundance of fungi in WWTPs.

The lack of knowledge on the incidence and abundance of fungi in WWTPs and the poor understanding of their possible importance in foaming prompted us to initiate this study. A full-scale membrane bioreactor (MBR) treating urban wastewater and experiencing seasonal foaming was selected for the evaluation of the abundance of fungi, by means of qPCR targeting the fungal 18S-rRNA gene and the internal transcribed spacer (ITS2) sequences. The study was conducted during four different phases of operation in the MBR (Summer 2009, Autumn 2009, Summer 2010 and

Winter 2012). In order to link the abundance of fungi to the MBR operation conditions, multivariate analyses of the biological data (non-metric multidimensional scaling, MDS, and BIO-ENV) were performed to evaluate the influence of fluctuations of temperature, characteristics of the influent wastewater and operation parameters (hydraulic and solid retention times).

2. Material and Methods.

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

The MBR investigated in the study was described in detail previously (Gómez-Silván *et al.*, 2013), and a summarized description can be found in subparagraph 1.12 of the Introduction and Chapter 1 (Maza-Márquez *et al.*, 2015). The MBR was installed at the facilities of EDAR Sur-WWTP (EMASAGRA, Granada Spain) and fed urban wastewater taken from its pretreatment, after being filtered through a 1-mm brush screen. The MBR was operated in pre-denitrification mode, as previously described (Gómez-Silván *et al.*, 2013). The following parameters were measured automatically and registered continuously in a database: temperature, pH, and dissolved oxygen (DO) concentration inside the BRs; level of the tanks, transmembrane pressure and flow rates. The datasets were collected and analyzed with the aid of the Active Factory v.9.2 software (Wonderware, Spain). The daily medium internal temperature measured in the sludge of the MBR system (IT) was calculated by the software from data measured every second.

The abundance of fungi in the activated sludge of the MBR was monitored during four different phases of operation: Summer 2009, Autumn 2009, Summer 2010 and

Winter 2012 (Sm09, Au09, Sm10, and Wn12, respectively). In each phase, different sets of hydraulic retention time (HRT) and solids retention time (SRT) were used, and markedly different average characteristics of the influent wastewater and temperature of the activated sludge were recorded (Chapter 1, Maza-Márquez *et al.*, 2015). Two episodes of foaming mainly affecting the anoxic BR were observed, from 26/11/2009 to 22/12/2009 (end of phase Au09) and from 7/02/2012 to 18/02/2012 (phase Wn12).

2.2. Activated sludge sampling for qPCR assays.

Activated sludge samples were retrieved from the MBR in each experimental phase when steady-state conditions were reached (at least threefold the SRT since the start-up date, Maza-Márquez *et al.*, 2015). Samples (200 ml) of activated sludge from both BRs (aerobic and anoxic) were collected in sterile plastic containers, transported from the experimental plant to the laboratory, and preserved until nucleic-acid extraction, following previously described protocols (Gómez-Silván *et al.*, 2014a).

2.3. Nucleic acids extraction and purification.

The extraction and purification of total DNA from the activated sludge samples were performed using the methods previously described in Chapter 1 (Maza-Márquez *et al.*, 2015). The quality and concentration of the extracted DNA was measured using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific Waltham, MA, USA).

2.4. qPCR assays.

The quantification of fungal populations in the MBR samples was achieved using qPCR. For a better assessment of fungal abundance in the samples, two molecular makers were targeted: the 18S rRNA gene (herein 18S rDNA) and the internal transcribed spacer ITS2 including the partial sequence of the 5.8S rRNA gene (herein ITS rDNA) (Fig.1).

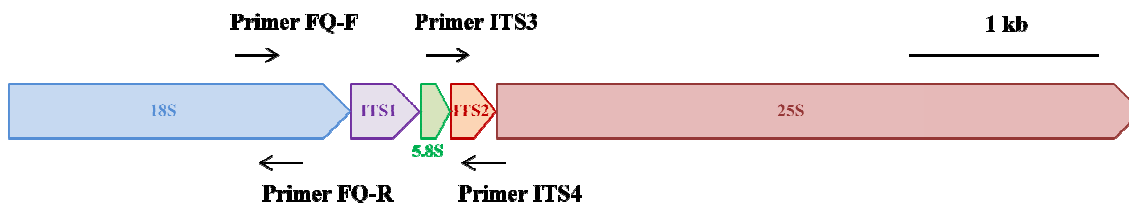


Fig. 1. Location of the primers used for the quantification of Fungi in the MBR samples by qPCR of the partial 18S rRNA gene and the ITS2 region. The map was constructed based on the sequence of locus RDN37-1 of the chromosome XII of *Saccharomyces cerevisiae* strain S288C, available at the *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org>)

Molecular marker	Primers		References
	Name	Sequence (5'-3')	
ITS2 + partial 5.8S rRNA gene	ITS-3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	(White <i>et al.</i> , 1990)
	ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
18S rRNA gene	FungiQuant-F	GGRAAACTCACCAGGTCCAG	(Liu <i>et al.</i> , 2012)
	FungiQuant-R	GSWCTATCCCCAKCACGA	

Table 1. Primers used for the quantification of the abundance of Fungi in the MBR samples.

Primer set		ITS3-4	FungiQuant F-R
Initial denaturalization		95°C	95°C
		1 minute	3 minutes
Amplification (x40 cycle)	Denaturalization	94°C	94°C
		30 seconds	30 seconds
	Primers annealing	54°C	62°C
		40 seconds	30 seconds
	Elongation	72°C	72°C
		40 seconds	45 seconds
Melting curve		60°C-95°C + 2°C/minute	
		Fluorescence measured each 15 seconds	
Hold		25°C	

Table 2. qPCR cycling conditions used for the quantification of the abundance of Fungi in the MBR samples

The primers pairs used for qPCR are listed in Table 1. qPCR was optimized using True Start Hot Start DNA polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA USA) and SYBR Green I (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in a total volume of 25 μ l, using a Step One Plus TM Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Cycling conditions are summarized in Table 2. The qPCR reaction mixtures contained 0.125 μ l of DNA polymerase (50 U/ μ l), 0.5 μ l of each primer (10 μ M), 2.5 μ l of 10 \times Taq Buffer (with KCl), 1.5 μ l MgCl₂ (25 mM), 0.5 μ l of dNTPs (10 mM), 0.0625 μ l of bovine serum albumin (BSA, 20 mg/ml), and 0.125 μ l SYBR green diluted in DMSO (20 \times). All quantitative amplifications were performed in triplicate. The number of copies of the targeted sequences per L of activated sludge was calculated.

qPCR calibration curves were constructed with the aid of plasmid standards harboring inserts of the targeted sequences. 18S rDNA and ITS rDNA amplicons were generated from the culture collection yeast *Candida albicans* strain ATCC 10231. The PCR products were cloned with the aid of the TOPO® TA cloning® system (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's protocols. The calibration curves for the absolute quantification in the samples were generated using these plasmid standards, as already described in Chapter 2. Template copy numbers were estimated using the online software "Calculator for determining the number of copies of a template" described by Jackson *et al.* (2013). All the calibration curves had a correlation coefficient $r^2 > 0.99$ in all the assays. The efficiency of PCR amplification was between 90 and 100%. The ranges of the Ct values of the standard curves were always wider than the range of Ct values of the activated sludge samples and the number of copies detected in the samples was always included in the range of the detection limits imposed by the standard curves. All the qPCR

amplifications resulted in a single band of the expected size for each set of primers, verified by electrophoresis in agarose and by melting curve analysis.

2.5. Statistics.

IBM SPSS Statistics v. 19 (SPSS INC., USA) was used for a preliminary analysis of data distributions and the subsequent statistical tests in search for differences among the groups of samples. As most of the data sets did not fit the normal distribution, a non-parametric analysis for related samples (Wilcoxon signed-rank test) was conducted for each biological assay and variable. A 95% significance level ($p < 0.05$) was selected.

The Primer software (PRIMER-E v. 6.0, Plymouth, UK) was used for analyses based in the sets of biological data derived from the quantifications by qPCR. Sample-resemblance matrices of the biological data (logarithms of the number of copies per L of the target molecules ITS rDNA and 18S rDNA) were generated using the Bray Curtis coefficient of similarity. Based in these similarity matrices, non-parametric multidimensional scaling (MDS) was performed. The MDS plots display the distribution of the samples according to the similarity between their biological data. The stress level of the MDS plots indicates how well the variables' data fit into two dimensional spaces. Values of stress <0.05 indicate that they give an accurate representation of the data distribution (Clarke and Warwick, 2001).

Spearman rank correlations (ρ_s) were calculated between the ordinations of the biological data and the measured operational parameters and environmental variables. Those correlations were represented in the plots as vectors, which illustrate a variable's directional influence and its role in explaining the biological data ordination. Prior to the multivariate analyses, the data sets were transformed to $\log(x+1)$ and normalized. The correlations between the variables were analyzed using Draftsman's Plot, and data

subsets with mutual correlation averaging more than 0.90 were replaced by a single representative. Nine variables were finally included: BOD₅, COD and concentration of total suspended solids in the influent wastewater (iTSS); IT, pH, concentration of volatile suspended solids in the activated sludge of the BRs (VSS), HRT, SRT, and food to microorganisms (F/M) ratio (kg BOD₅ per kg VSS in the aerated BR per day).

In order to link the distribution patterns of the biological data to the set of variables, BIO-ENV analysis was carried out (Clarke and Warwick, 2001). BIO-ENV calculates the Spearman rank correlations (ρ_s) between the similarity matrix of biological data (created using the Bray Curtis coefficient) in which the ordination method (MDS) is based and the similarity matrices (created using Euclidean Distance) derived from all the possible sequential combinations of the measured variables. The highest value obtained (BEST value) indicates which combination of variables best explains the biological ordination. The statistical significance of the BEST values was tested by a global permutation test (499 permutations).

3. Results and Discussion.

3.1. Absolute and relative quantifications of the abundance of fungi in the MBR.

Fig. 2A and B show the average numbers of copies of fugal ITS rDNA and 18S rDNA amplicons quantified for each experimental period (Sm09, Au09, Sm10 and Wn12) in both MBR bioreactors (aerated and anoxic). The average numbers of copies of ITS rDNA per L of activated sludge were in the 10^7 - 10^8 range (Fig. 2A and 2C), and were moderately although significantly lower in the Sm10 period compared to the other experimental phases, according to the Wilcoxon signed-rank test (Fig 2C). In the Sm09

and Wn12 phases, there were also small although significant differences of the abundance of ITS rDNA copies between the two BRs (Table S1).

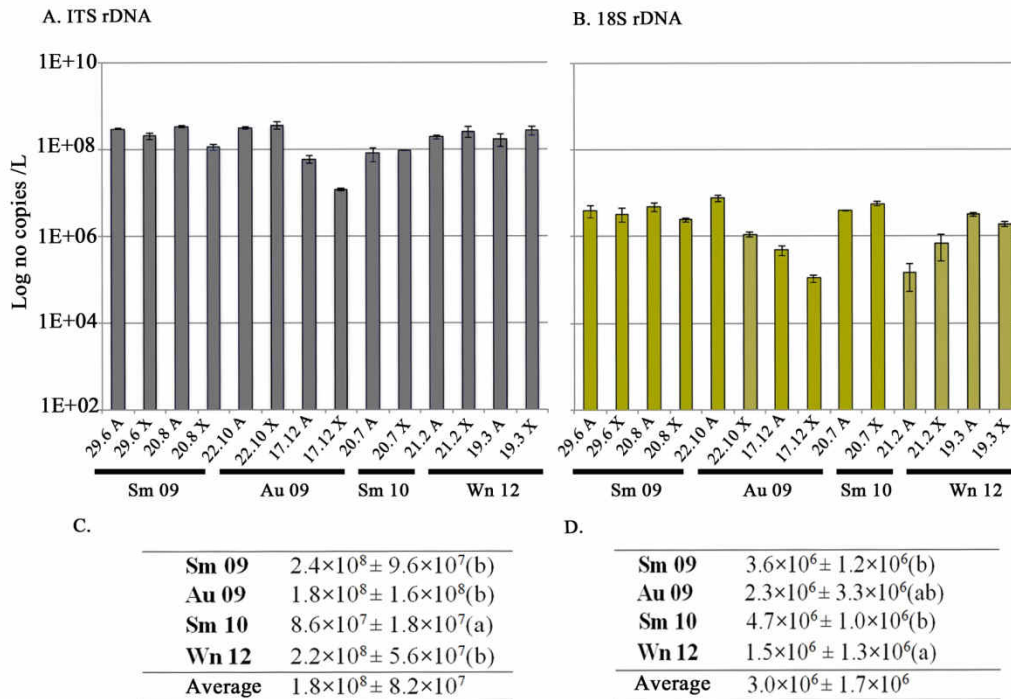


Fig.2. (A) Number of copies per L of activated sludge of ITS rDNA of fungi (in logarithmic scale), quantified by qPCR in the full-scale membrane bioreactor (MBR) during the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. (B) Number of copies per L of activated sludge of 18S rDNA of fungi (in logarithmic scale), quantified by qPCR in the full-scale membrane bioreactor (MBR) during the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases (C) Average and standard deviation of the number of copies of ITS rDNA per L of activated sludge in each experimental phase. Data with the same lower-case letter do not significantly differ according to the Wilcoxon signed -rank test ($p < 0.05$). (D) Average and standard deviation of the number of copies of 18S rDNA per L of activated sludge in each experimental phase. Data with the same lower-case letter do not significantly differ according to the Wilcoxon signed -rank test ($p < 0.05$).

When the 18S rDNA was used as molecular marker to estimate the abundance of fungi, the numbers of copies per L of activated sludge were in the 10^6 range in the four experimental phases (Fig 2B), and were significantly lower in the Wn12 period compared to the Sm09 and Sm10 phases, according to the Wilcoxon signed-rank test (Fig 2D). Moreover, there were significant differences of the abundance of 18S rDNA copies between the aerated and the anoxic bioreactors in all the experimental phases,

except Wn12 (Table S1), although these differences between BRs were only large in the Au09 phase (abundance nearly one order of magnitude higher in the aerated BR).

Interestingly, throughout the two consecutive experimental phases Sm09 and Au09 (operated with the same SRT and HRT), the number of copies of both ITS rDNA and 18S rDNA decreased gradually in the samples towards the end of the Au09 phase (differences up to one order of magnitude), particularly in the anoxic BR (Fig. 2A and B). At the end of phase Au09, severe foaming initiated in the anoxic BR was observed in the MBR. Lower abundances of 18S rDNA copies were also observed in the Wn12 period in the samples 21.2.12.A and 21.2.12.X, taken two days after the recession of the second foaming episode (Fig. 2B).

To the best of the authors' knowledge, the present study is the first comparing the performance of two different sets of universal primers targeting different molecular markers for the quantification of fungi by qPCR in environmental samples. Overall, the dynamics of the abundance of fungi evaluated throughout the experimental period followed similar patterns regardless of the marker chosen (Fig 2A and B), with the only exception of two samples (21.02.12A and 21.02.12X). However, the average absolute abundance of copies of ITS rDNA was 2 logarithmic units higher than that of the 18S rDNA. These differences are attributable to biases introduced by the intrinsic variability of the specificity and coverage of the primer sets targeting different regions of the rRNA operon, as previously reported in other studies (Bellemain *et al.*, 2010; Bokulik and Mills, 2013; Prévost-Bouré *et al.*, 2010). While the ITS1 and ITS2 regions have been recently proposed as the official barcoding marker sequences for fungi (Bellemain *et al.*, 2010), their high level of length polymorphism is a significant drawback for qPCR, since it may lead to preferential amplification of the shorter sequences (*ie. Ascomycota*

and non-Dikarya versus *Basidiomycota*, Bellemain *et al.*, 2010). In contrast, the 18S rRNA gene sequence has low length polymorphism, but the design of fungal-specific primers offering complete coverage of all fungal Phyla remains a challenge (Prévost-Bouré *et al.*, 2010). The FungiQuant primer set was selected for this study since it was specifically designed and optimized for qPCR by Liu *et al.* (2012), but according to these authors, the coverage of the primer set falls below 70% for some fungal taxa, including *Chytridiomycota* and *Mucoromycotina*, which have been described in the mycobiota of WWTPs by molecular methods by Evans and Seviour (2012). Additionally, the diversity of fungi in the MBR used in this study was previously characterized by TGGE fingerprinting and 454 pyrosequencing throughout the four experimental phases (Chapter 3), showing the predominance of phylotypes related to both *Ascomycota* and *Chytridiomycota*, which shifted in their relative abundance influenced by the operational and environmental parameters.

It is difficult to contrast the fungal community quantification data presented here with other published information, because to date, there are very few examples in the literature attempting the quantification of fungi in WWTPs, and all of them were based in cultivation-dependent approaches (Kacprzak *et al.*, 2005; Liébana *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2011). These previous studies often provide lower estimations of the abundance of fungi, compared to the data presented here. Yang *et al.* (2011) reported a range of 5.1- 9.1 10^4 CFU of fungi per L activated sludge in a conventional municipal plant, of which 4.1- 6.6 10^4 were classified as yeasts. In the only available study in a MBR, 1.3-3 10^6 yeasts CFU/L of activated sludge were detected (Liebana *et al.*, 2015), closer to the quantifications revealed in the present study by qPCR targeting 18S rDNA.

Fig. 3 displays the ratios between the qPCR quantifications of Bacteria (described in detail in Chapter 2) and Fungi in the MBR samples. The observed numbers of bacterial 16S rDNA copies/L activated sludge were in the 10^{12} order, regardless of the changes of the operating and environmental conditions (Chapter 2). The average abundance of copies of bacterial 16S rDNA was 4-5 or 5-7 orders of magnitude higher than that of fungi, depending on the experimental period in the MBR and the fungal molecular marker chosen (ITS rDNA or 18S rDNA, Fig. 3C and 3D, respectively). While the average number of 16S rDNA copies per cell of Bacteria is 4.02 (Ribosomal Database Project, <http://rrndb.umms.med.umich.edu>), the number of repeats of the rRNA genes in fungal genomes is highly variable between species and strains, ranging from tens to hundred of copies per haploid genome (40-240 copies, Griffin, 1996). A difference of *ca.* two orders of magnitude was also confirmed by comparison of the abundances measured by qPCR targeting simultaneously the 18S rDNA and the single-copy β -tubulin gene in six fungal species (Black *et al.*, 2013). In consequence, the bacterial/fungal cell ratios in the MBR could be estimated 1-1.8 orders of magnitude higher than the 16S rDNA/18S rDNA copy number ratios. In contrast with the data presented here, Yang *et al.* (2011) reported a much lower bacteria/fungi ratio ($5.0 \cdot 10^2$ - $8.5 \cdot 10^2$) using a cultivable approach (colony counts) in a municipal WWTP.

The quantification of fungi by qPCR indicated that foaming was unrelated to an increased proliferation of these organisms; on the contrary, both their absolute abundance and their relative abundance to bacteria were lower in samples retrieved when the MBR was experiencing foaming issues (Figs. 2 and 3). Previously, the MBR fungal community was characterized by TGGE fingerprinting and 454 pyrosequencing using the 18S rDNA as marker, and significant changes of the fungal community

structure were detected (Chapter 3, subparagraph 3.1), in the samples retrieved during foaming episodes. Hence, both the absolute numbers of fungal cells and the structure of the fungal community in the activated sludge were changed when foaming was experienced in the MBR.

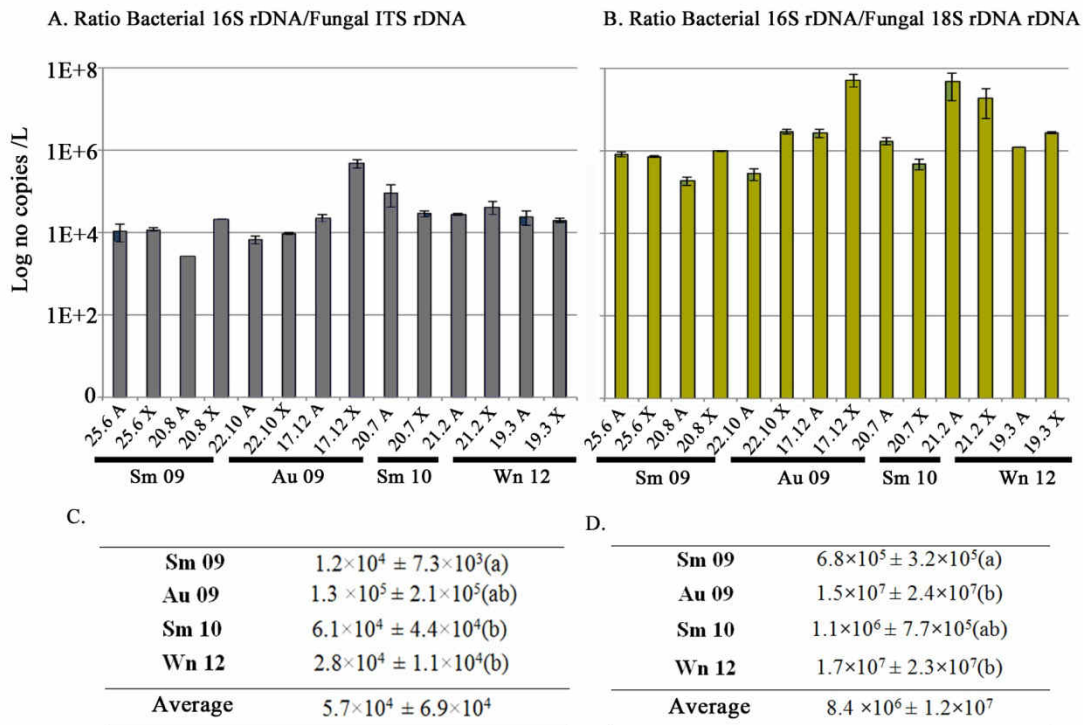


Fig. 3. Bacteria/Fungi relative abundance ratios in the full-scale membrane bioreactor (MBR) during the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. (A) 16S rDNA/ITS rDNA ratios (B) 16S rDNA/18S rDNA ratios (C) Averages and standard deviations of the 16S rDNA/ITS rDNA ratios in each experimental phase. Data with the same lower-case letter do not significantly differ according to the Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$). (D) Averages and standard deviations of the 16S rDNA/18S rDNA ratios in each experimental phase. Data with the same lower-case letter do not significantly differ according to the Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$).

3.3. Linking the abundance of fungi to the changes of environmental variables and operation factors in the MBR system.

The MDS plots generated for the biological data (absolute abundance of ITS rDNA and 18S rDNA) are shown in Fig 4. The distance between any two sample points in the plots reflects their relative similarity, and bubbles of increasing size superimposed over the samples represent the values of absolute abundance of copies of the fungal molecular

markers. BIO-ENV analysis was used to evaluate the significance of the influence of the operational parameters and environmental variables on the abundance of fungi in the samples. The vectors in the plots illustrate the direction of the linear relationships between the variables and the samples' ordination, while vector lengths indicate the strength of the correlations.

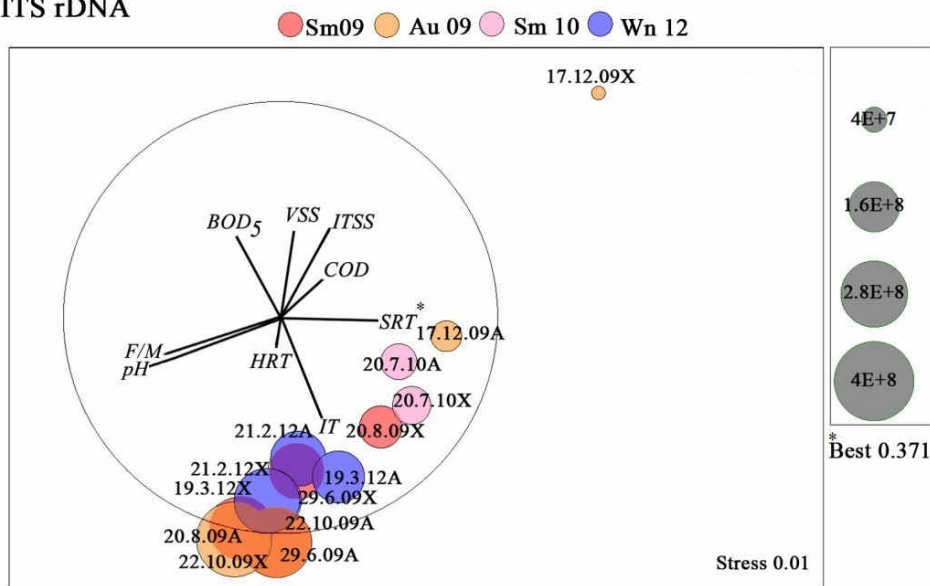
According to BEST values, the level of explanation achieved by the variables influencing the MBR was lower when the molecular marker chosen was ITS rDNA (BEST=0.37), compared to 18S rDNA (BEST= 0.48). In the two plots, the vectors representing the variables COD and HRT were of short length, indicating that the contribution of these variables to the changes in the abundance of fungi in the MBR samples was weak, regardless of the molecular marker chosen. Several variables displayed similar directional influences in both MDS plots (Fig. 4, Table S2), in spite of the differences in the absolute quantification with each molecular marker. The abundance of copies of both ITS rDNA and 18S rDNA was negatively correlated to VSS, iTSS and BOD₅, and positively correlated to IT, although the correlations were considerably weaker for BOD₅ and IT in the ITS rDNA ordination. However, the directional influence observed for SRT, F/M ratio and pH strongly diverged between the ordinations (Fig. 4, Table S2). Due to these differences, the variables giving the best explanation of the ordination of the samples (BEST value) varied depending on the choice of the molecular marker. SRT was the major factor explaining the distribution of the absolute abundance of fungi throughout the samples based on the quantification of copies of ITS rDNA (Fig. 4A), while in the case of 18S rDNA the best explaining factor was IT (Fig. 4B).

iTSS and BOD₅ of the influent water and VSS concentration in the bioreactors were negatively correlated to the abundance of copies of both fungal markers in the MBR samples (Fig. 4). In a previous study conducted in the same MBR, strong positive correlations were found between the abundance of actively growing bacteria and the concentrations of suspended solids and BOD₅ of the influent water (Gómez-Silván *et al.*, 2014a). Like bacteria, fungi are heterotrophic organisms, and both compete for the same substrates in wastewater. Due to their larger surface-to-volume ratio and shorter generation times, bacteria are able to obtain more nutrients and use them at a faster rate than fungi, reaching higher numbers in WWTPs under standard conditions (Wang, 2012). A lower input of readily biodegradable C compounds in the influent water may favor the growth of fungi, since they are often able to degrade recalcitrant complex polymers of both animal and plant origin, which bacteria cannot use as C sources (Kinsey *et al.*, 2003).

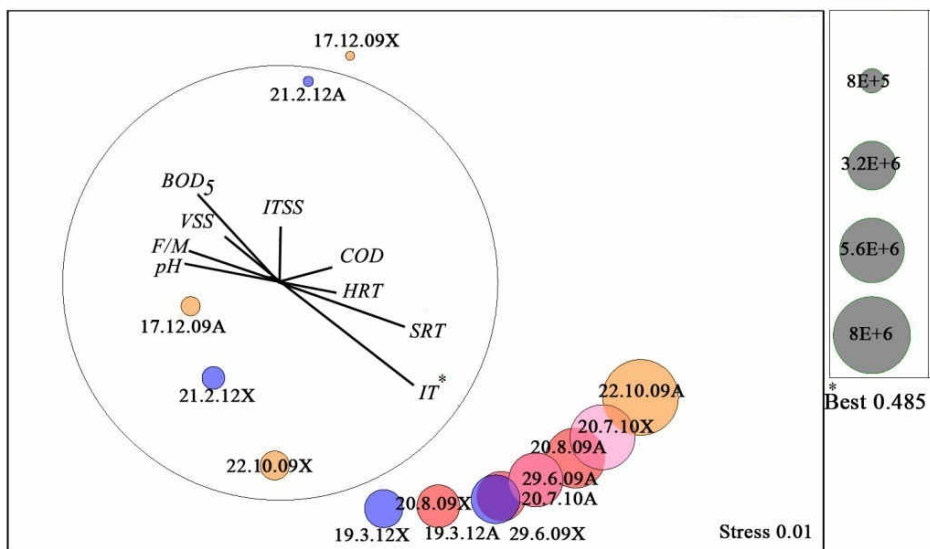
Regarding the accumulation of biomass inside the bioreactors (VSS), the MBR technology is based on the retention of solids by a membrane, allowing for the accumulation of biomass in the system and at the same time limiting the availability of carbon substrates, which leads to reduced microbial metabolic activities and growth rates of heterotrophs (Gómez-Silván *et al.*, 2014a). In this sense, similar patterns of response to VSS concentrations were previously found for the abundance of total bacteria and denitrifiers in the MBR analyzed here (Gómez-Silvan *et al.*, 2014a). In relation with the BOD₅ and VSS concentration, the influence of the F/M ratio on the abundance of fungi was unclear, since correlations of opposite sign were observed depending on the molecular marker chosen (Fig. 4).

Temperature is well known to influence the growth rates, enzyme activities and cell permeability in microorganisms, including fungi (Moore-Landecker, 1990). Most fungal species have an optimal growth at 25-30 °C but are able to grow under a wide range of temperatures (5-35 °C), which covers those most frequently found in WWTPs, even in tropical regions (Kinsey *et al.*, 2003). In the present study, the average temperature of the MBR was kept into the optimal growth range for fungi in the Sm09 and Sm10 phases, and fell below 25°C in the Au09 and Wn12 phases (Chapter 1, Fig.1). This pattern is consistent with a positive correlation between the absolute abundance of fungi and temperature, which was observed regardless of the molecular marker used for qPCR (Fig. 4). It is generally accepted that fungi have a competitive advantage over bacteria by growing faster at colder temperatures (Lessard and Le Bihan, 2003). However, studies focused on the response to temperature of microbial communities in soil provided contradictory conclusions. Pietikäinen *et al.* (2005) reported that both fungi and bacteria displayed their optimal growth rates at temperatures between 25–30°C and found that below this range the growth of fungi was less affected than that of bacteria, while Bárcenas-Moreno *et al.* (2009) did not find that suboptimal temperatures benefited fungi over bacteria. In the present study, neither lower absolute abundance of bacteria (Chapter 2, Fig. 1) nor lower values of bacteria/fungi ratios (Fig. 3) were observed in the samples retrieved in the Au09 and Wn12 periods, when the MBR operated at average temperatures <20°C.

A. ITS rDNA



B. 18S rDNA



Color Key



Fig.4. Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots illustrating the distributions of the sludge samples of the full-scale membrane bioreactor (MBR) throughout the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases according to the relative similarity of their ITS rDNA- and 18S rDNA-based quantifications. The size of the bubbles is proportional to the values of each quantification. Bubbles size scale is displayed in right column. The vectors represent the direction along the samples of each operational parameter or environmental variable, showing the role each of them played in explaining the distribution of the quantifications and its directional influence. The BEST values represent the level of explanation of the ordination of the biological data in each plot, given by the variables marked with an asterisk (*), according to BIO-ENV analysis.

In MBRs, the SRT is known to directly affect biomass growth and bioactivities of microorganisms, influencing also sludge structure and membrane biofouling (Han *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2001; Laera *et al.*, 2007; Van den Broeck *et al.*, 2012). Since fungi are eukaryotic organisms with significantly longer average generation times than bacteria, their development and abundance is theoretically favored by increasing the SRT. Previously (Chapter 3, subparagraph 3.5.3), it was found that the fungal community diversity in the MBR was enriched at longer SRTs, as the relative abundances of most of the fungal Phyla detected displayed a strong positive correlation ($r > 0.60$) with this operational parameter (with the exception of *Chytridiomycota*). However, when the absolute abundance of fungi was measured, a positive correlation with SRT was only observed when 18S rDNA was the target of qPCR (Fig 4B).

pH has been frequently related to changes in the occurrence and abundance of fungi in WWTPs. Indeed, when the diversity of fungi in the MBR throughout the four experimental phases was evaluated by TGGE fingerprinting and 454 pyrosequencing (Chapter 3, subparagraphs 3.4 and 3.5.3), pH was the major factor explaining the shifts of the fungal community structure. Most fungi develop in a wider pH range than bacteria and are favored over them in acidic environments (Lessard and Le Bihan, 2003). They increase their abundance in WWTPs at $\text{pH} \leq 5$ (Bitton, 2010), contributing themselves with their metabolic activities to reduce the pH of the activated sludge (Fakhru'l-Razi and Molla, 2007; Lacina *et al.*, 2003; Mannan *et al.*, 2005). In the present study, the average values of pH in the MBR remained close to neutrality throughout the whole experimental phase (6.9-7.5, Chapter 1, Fig. 1); thus, this factor was unlikely providing a competitive advantage for fungi over bacteria. A positive

correlation of the absolute abundance of fungi with lower pH values was found only when 18S rDNA was used as phylogenetic marker (Fig. 4B).

4. Conclusions.

Fungi are ubiquitous and ecologically important organisms and molecular biology techniques opened up exciting new possibilities for increasing our understanding of their ecology. While qPCR has been widely applied for the quantification of Bacteria in engineered systems, quantification of Fungi in WWTPs using this approach was unexplored to date. The results of the work presented here contribute to the knowledge of the abundance of Fungi in MBRs, providing also valuable information on the performance, advantages and drawbacks of using the qPCR technique for the quantification of this group of organisms in activated sludge. The comparison of the results generated by qPCR targeting either the ITS2 region or the 18S rRNA gene demonstrated important differences (*ca.* 2 orders of magnitude) of the numbers of copies of fungal rRNA operons detected, highlighting that the selection of the molecular marker and primers is a crucial step for the accuracy of the absolute quantification of fungi in complex communities. In spite of these differences, the results demonstrated that fungi were a numerically important fraction of the activated sludge microbial community, occurring in both the aerated and anoxic bioreactors of the MBR throughout the four experimental phases analyzed. Analogous results were provided by both molecular markers when the changes of the absolute abundance of fungi were compared among activated sludge samples retrieved under different sets of operating conditions in the MBR. MDS and BIO-ENV analyses demonstrated significant links between the absolute abundance of fungi and several variables (higher IT, lower iTSS

and BOD₅ of the influent and lower VSS in the bioreactors) regardless of the molecular marker chosen, while the influence of other environmental factors was unclear due to biases introduced by the two qPCR approaches used.

Table S1. Average and standard deviation of the numbers of copies of fungal ITS rDNA and 18S rDNA per L of activated sludge, quantified in the aerated and anoxic bioreactors of the MBR during the Sm 09, Au 09, Sm 10 and Wn 12 experimental phases. For each experimental phase and molecular marker, data on different bioreactors marked with the same lower-case letter do not significantly differ, according to the Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$).

Phase	ITS rDNA		18S rRNA	
	Aerated	Anoxic	Aerated	Anoxic
Sm 09	$3.2 \times 10^8 \pm 2.5 \times 10^7$ (a)	$1.6 \times 10^8 \pm 5.7 \times 10^7$ (b)	$4.3 \times 10^6 \pm 8.9 \times 10^5$ (a)	$2.8 \times 10^6 \pm 7.4 \times 10^5$ (b)
Au 09	$1.8 \times 10^8 \pm 1.4 \times 10^8$ (a)	$1.8 \times 10^8 \pm 2.0 \times 10^8$ (a)	$4.1 \times 10^6 \pm 3.6 \times 10^6$ (a)	$6.1 \times 10^5 \pm 5.1 \times 10^5$ (b)
Sm 10	$8.1 \times 10^7 \pm 2.9 \times 10^7$ (a)	$9.1 \times 10^7 \pm 1.7 \times 10^5$ (a)	$3.9 \times 10^6 \pm 5.5 \times 10^4$ (a)	$5.6 \times 10^6 \pm 6.0 \times 10^5$ (b)
Wn 12	$1.8 \times 10^8 \pm 3.6 \times 10^7$ (a)	$2.6 \times 10^8 \pm 5.3 \times 10^7$ (b)	$1.6 \times 10^6 \pm 1.5 \times 10^6$ (a)	$1.3 \times 10^6 \pm 6.7 \times 10^5$ (a)

Table S2. Pearson's product-moment correlation coefficients (r) between the absolute abundances of fungal ITS rDNA and 18S rDNA copies per L activated sludge quantified in the aerated and anoxic bioreactors of the MBR and the operational and environmental variables influencing the MBR.

Variables	No. copies per L activated sludge	
	ITS rDNA	18S rDNA
COD	-1.00	0.56
BOD ₅	-0.22	-0.96
VSS	-0.74	-1.00
iTSS	-0.94	-0.50
pH	0.97	-0.86
IT	0.13	0.99
SRT	-0.72	0.98
HRT	0.79	0.96
F/M ratio	0.94	-0.94

General discussion-Discusión general

La presente investigación se ha centrado en un sistema avanzado de depuración de aguas residuales urbanas del tipo MBR, que constituye una alternativa interesante y con múltiples ventajas respecto al sistema CAS convencional (Introducción, Figs. 1 y 2). El objetivo fundamental del trabajo ha sido mejorar la caracterización de dos grupos de microorganismos, actinobacterias con pared celular rica en ácidos micólicos (Mycolata) y hongos, cuya diversidad, abundancia y papeles en este tipo de sistemas aún están poco explorados. Ambos grupos diana se monitorizaron en el MBR durante cuatro periodos experimentales, con el fin de evaluar adecuadamente sus respuestas a los cambios de las variables ambientales y operacionales bajo condiciones reales de trabajo (Capítulo 1, Fig. 1). A lo largo del estudio, se observaron dos episodios de formación de espumas en el MBR, lo que ofreció además la oportunidad para establecer vínculos entre la incidencia de este fenómeno y las modificaciones experimentadas por las comunidades de microorganismos diana. El carácter episódico de la formación de espumas en los tratamientos del agua residual, unido a la ineffectividad de los métodos de control disponibles, muestra la necesidad de una mayor comprensión de los microorganismos causantes, al objeto de mejorar la prevención y resolución de este problema operacional.

Como conclusión general del estudio, las fluctuaciones de las variables operacionales y ambientales condicionaron la estructura de las comunidades tanto de Mycolata como de hongos (Capítulo 1, Fig. 2; Capítulo 3, Fig. 2), que en ambos casos mostraron un perfil dinámico, con flexibilidad para responder y adaptarse a los cambios del entorno (Capítulo 1, Fig. 3; Capítulo 3, Fig. 3). La cuantificación de las poblaciones totales de Mycolata y hongos mediante qPCR basada en el gen del RNA de la subunidad pequeña ribosomal reveló coincidencias en la influencia direccional de las variables SRT, IT (correlación positiva) y ratio F/M (correlación negativa) para ambos

grupos de microorganismos (Capítulo 2, Fig. 3B, Capítulo 4, Fig. 4). Los sistemas MBR a menudo operan con SRT largos y F/M bajas, lo que permite elevar la edad del fango y minimizar su producción como residuo sólido (Shimizu *et al.*, 1996; Witzig *et al.*, 2002). En este trabajo se ha corroborado que estas condiciones operacionales favorecen el desarrollo de estos grupos de microorganismos, caracterizados por tiempos de generación largos.

La implicación de las Mycolata en la formación de espumas biológicas en plantas de tratamiento de aguas residuales está bien establecida, aunque la gran mayoría de las investigaciones publicadas se han realizado en los CAS (de los Reyes, 2010b), siendo los sistemas MBR mucho menos conocidos en este aspecto. Con anterioridad, se había descrito la implicación de Mycolata en el *foaming* estacional observado en el MBR empleado en el estudio, aunque solamente en base a análisis morfológicos mediante microscopía óptica (Parada-Albarracín *et al.*, 2012). Con el enfoque adoptado en este trabajo, que aborda de forma simultánea la caracterización de la dinámica de las poblaciones totales y activas de Mycolata, se ha logrado identificar los filotipos concretos relacionados con los problemas de *foaming* en el sistema MBR estudiado. Se detectó una incidencia alta de nueve filotipos evolutivamente próximos a cuatro géneros distintos de actinobacterias, cuya abundancia relativa se modificó a lo largo de los distintos periodos experimentales en función de la carga de materia orgánica del influente y la concentración de sólidos acumulada en el fango activo (BOD₅, iTSS y VSS, Capítulo 1, Fig. 6). La prevalencia de las poblaciones activas de tres de los filotipos, relacionados con los géneros *Mycobacterium* y *Rhodococcus*, coincidió con los episodios de *foaming* (Capítulo 1, Figs. 5 y 6). Tanto el estudio de *fingerprinting* como la cuantificación con qPCR señalaron el papel determinante de algunas de las

variables incluidas en el análisis (COD, BOD₅, iTSS e IT), que mostraron una influencia direccional similar tanto sobre la dinámica de las poblaciones activas de *Mycolata* (Capítulo 1, Fig. 6) como sobre el incremento de la ratio poblaciones activas/poblaciones totales de *Mycolata* (Capítulo 2, Fig. 4B). Esta ratio fue desvelada como un factor clave para el desencadenamiento posterior de la generación de espumas, y por ello se propone como indicador predictivo. La abundancia absoluta de *Mycolata* en el MBR (Capítulo 2, Fig. 1) se mantuvo siempre por encima de los límites considerados umbral para el inicio del *foaming* (Davenport *et al.*, 2000, 2008), corroborando que un número elevado de estas bacterias filamentosas no es indicativo *per se* del riesgo de formación de espumas, si sus tasas de actividad metabólica se mantienen bajas. El incremento de la ratio poblaciones activas/poblaciones totales de *Mycolata* se correlacionó positivamente con el pH y la ratio F/M, y negativamente con la temperatura (IT) y el SRT (Capítulo 2, Fig. 4B). En instalaciones de tratamiento a escala real, es frecuente realizar ajustes de los parámetros de operación SRT y ratio F/M para el control de la formación de espumas (de los Reyes, 2010b); sin embargo, no se había establecido con anterioridad que su influencia fuera determinante sobre el incremento de la proporción de *Mycolata* metabólicamente activas.

Aunque no existe ningún estudio previo publicado que haya alcanzado conclusiones similares en el caso de bacterias filamentosas generadoras de espumas, Vervaeren *et al.* (2005) relacionaron una mayor ratio 16S rRNA/16S rDNA con el desencadenamiento de la flotación de fangos (*bulking*) por filamentos del morfotipo 021N en un biorreactor a escala de laboratorio. Estos autores determinaron además una correspondencia entre ratios 16S rRNA/16S rDNA elevadas y el incremento del número y la longitud de los filamentos, condiciones que conducen a la formación de flóculos de

gran tamaño y estructura abierta, que flotan en lugar de sedimentar (Kim y Jang, 2006; Liao *et al.*, 2004). En el caso de las Mycolata, la hidrofobicidad de la envuelta celular implica que los flóculos además de flotar retengan burbujas de aire, generando las espumas (apartado 1.6 de la Introducción). En varios estudios previos, se ha relacionado también una mayor longitud de los filamentos por unidad de volumen del biorreactor con el desencadenamiento y estabilización del *foaming* por *Gordonia amarae* (revisados por de los Reyes, 2010b).

La generación de las espumas biológicas por bacterias filamentosas es por tanto un fenómeno complejo e influenciado por múltiples variables, aunque en la bibliografía se tiende a relacionarlos especialmente con el efecto de la temperatura, dado que los episodios de *foaming* a menudo recurren con carácter estacional (de los Reyes, 2010b). En el MBR objeto de este estudio, la formación de espumas se observó en periodos estacionales fríos, en contraste con una gran mayoría de las investigaciones anteriores, en las que se describe como un fenómeno primaveral o estival y principalmente relacionado con la proliferación de *Gordonia amarae*, especie que es favorecida por las temperaturas altas (>23°C) (Asvapathanagul *et al.*, 2012; de los Reyes y Raskin, 2002). En el presente estudio, se demostró la incidencia en el MBR de filotipos relacionados con *G. amarae* y un incremento de su abundancia relativa entre las poblaciones de Mycolata tanto totales como activas en verano (fase Sm09, Capítulo 1, Figs. 4 y 6). No obstante, el conjunto de las variables que influyeron sobre el MBR no determinó una ratio elevada de poblaciones activas de Mycolata en dicho periodo (Capítulo 2, Fig. 1), en el que no se observó formación de espumas. En conclusión, las distintas tendencias mostradas por los filotipos detectados en respuesta a las variables implican la imposibilidad de generalizar en la predicción de los fenómenos de formación de

espumas sin corroborar antes la identidad de los microorganismos causantes en cada planta de tratamiento.

La diversidad y abundancia de los hongos han sido escasamente exploradas en los MBRs, tanto en lo referente a los hongos unicelulares como los de morfología filamentosa, que pueden estar igualmente implicados en los fenómenos de *foaming* (Richard, 2003). La caracterización de esta comunidad con pirosecuenciación 454 y la cuantificación mediante qPCR constituyen una novedad, ya que no hay publicaciones previas donde se empleen estas aproximaciones experimentales. Aunque el estudio se planificó combinando varios sets de cebadores descritos como universales para hongos y dirigidos a dos marcadores moleculares distintos (secuencias de la región ITS2 y 18S rRNA), se detectaron dificultades en su uso debido a la inespecificidad de los mismos, lo que dificulta la interpretación de los resultados y desaconseja el uso de un solo marcador en la evaluación de la diversidad y abundancia de los hongos mediante métodos moleculares, así como la necesidad de mejorar el diseño de los cebadores existentes para futuros estudios.

Los resultados de este trabajo demuestran que los hongos constituyeron una fracción numéricamente relevante de la microbiota total del fango activo del MBR (Capítulo 4, Fig. 2), corroborando algunas de las observaciones previas basadas en métodos dependientes de cultivo (Liebana *et al.*, 2015), si bien la abundancia relativa de estos microorganismos respecto a las bacterias (número de copias del operón del rRNA 4-7 órdenes de magnitud inferior, Capítulo 4, Fig. 3) es considerablemente más baja que la descrita previamente en bibliografía (Yang *et al.*, 2011). Mediante pirosecuenciación 454, se identificaron un total de 284 filotipos de hongos en el fango activo del MBR a lo largo de las cuatro fases experimentales, un número muy superior al descrito en estudios

anteriores basados en métodos dependientes de cultivo (revisados por More *et al.*, 2010). A pesar de ello, las semejanzas y diferencias entre las distintas muestras analizadas estuvieron fundamentalmente determinadas por los cambios de abundancia relativa de tan solo 4 filotipos (Capítulo 3, Tabla 6). El análisis de los datos obtenidos tanto mediante *fingerprinting* como pirosecuenciación 454 y el cálculo de los índices descriptivos de la diversidad (Capítulo 3, Fig. 3, Tabla 5) indicaron que la comunidad fúngica estuvo formada por un número bajo de especies, con un grado de organización funcional media-alta (índice de equidad de Pielou 0,22-0,65, Capítulo 3, Tabla 5). En contraste, en un estudio anterior realizado en el mismo sistema MBR durante los periodos experimentales Sm09 y Au09 se detectaron 700-800 filotipos del dominio Bacteria mediante secuenciación con la plataforma Illumina, y el índice de equidad de Pielou fue siempre $>0,75$, indicando que la comunidad bacteriana se caracterizó por una diversidad mayor y una organización funcional más baja que la de hongos (Gómez-Silván, 2012).

Por medio de las dos aproximaciones metodológicas empleadas, *fingerprinting* y pirosecuenciación 454 (Capítulo 3, Fig. 6 y 11), se ha podido concluir que la estructura de la comunidad fúngica estuvo determinada fundamentalmente por los cambios de pH en el sistema, si bien se observaron también vínculos robustos con la temperatura y los parámetros de operación HRT, SRT y ratio F/M. A diferencia de lo observado en el caso de Mycolata, las variables representativas de la concentración de sustratos en el influente (COD, BOD₅, iTSS) fueron poco determinantes a la hora de explicar la dinámica de las poblaciones de hongos (Capítulo 3, Figs. 6 y 11). No obstante, estas variables mostraron fuertes correlaciones negativas con la abundancia absoluta de hongos determinada mediante qPCR (Capítulo 4, Fig. 4), influyendo por tanto mucho

más sobre la representación numérica de este grupo de organismos en la comunidad microbiana del fango activo que sobre su diversidad.

La implicación de los hongos en los fenómenos de *foaming* se ha descrito principalmente en relación a sistemas de tratamiento de aguas residuales industriales, con características muy diferentes a las de un tratamiento de aguas residuales urbanas (Richard, 2003). En el presente estudio, se observaron algunas modificaciones significativas en la comunidad fúngica en relación con los episodios de formación de espumas, como la tendencia al incremento de la abundancia relativa de filotipos de la clase *Saccharomyces* (Capítulo 3, Figs. 6 y 11) y al descenso del número absoluto de copias del 18S rDNA fúngico (Capítulo 4, Fig. 2). Se requieren estudios adicionales para determinar si estos cambios guardan alguna relación con el inicio del fenómeno de *foaming*, o si por el contrario son consecuencia del mismo.

Conclusions-Conclusiones

Conclusions

1. The community structure and population dynamics of Mycolata in the MBR were strongly influenced by the contaminant load of the influent wastewater and the concentration of biomass of the activated sludge. Mycolata phylotypes related to four different genera of Actinobacteria were identified (*Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and *Segniliparus*), whose relative abundances were favored by different operational and environmental conditions, making the design of global antifoaming strategies difficult. Specific diagnosis of the more abundant Mycolata in each particular WWTP looks the most promising tool to adjust the operating conditions for the successful prevention of foaming.

2. The ratio of metabolically active versus total Mycolata was a key parameter triggering foaming in the MBR and is proposed as a candidate predictive tool. The ratio was robustly linked to operational and environmental variables, displaying positive correlations with the concentrations of substrates in the influent water, food/microbial (F/M) ratio and pH, and negative correlations with temperature and solids retention time (SRT). The results of the present study corroborate the relevance of the operation parameters F/M ratio and SRT for the management of foaming in MBRs.

3. The combined use of two molecular markers (ITS2 region and 18S rRNA gene) contributed to the better characterization of the structure of the fungal community in the MBR by means of TGGE fingerprinting, although some divergences were detected when the results generated by the two approaches were compared, and the taxonomic resolution of the ITS2 region was low. The combination of TGGE fingerprinting and 454 pyrosequencing demonstrated that the fungal community harbored a low number of

species and its structure shifted significantly throughout the four experimental phases of the study, in response to the changes of operational and environmental conditions. pH was the variable mostly contributing to explain the dynamics of the fungal populations. Both approaches used to investigate the fungal community diversity detected that the prevalent fungal phylotypes in the MBR were related to Phyla *Ascomycota* and *Chytridiomycota*, whose relative abundances were correlated in the opposite way to the same operational and environmental variables.

4. The absolute quantification of fungi in the MBR by a qPCR approach based in the use of two molecular markers (ITS2 region and 18S rRNA gene) showed important differences (*ca.* 2 orders of magnitude) of the numbers of copies of fungal rRNA operons detected, highlighting that the selection of the molecular marker and primers is a crucial step for the accuracy of the absolute quantification of fungi in complex communities. In spite of these differences, the results demonstrated that fungi were a numerically important fraction of the activated sludge microbial community. Regardless of the molecular marker chosen, significant links were detected between the absolute abundance of fungi and several variables (positive correlations with temperature, and negative correlations with the concentration of biodegradable organic matter and suspended solids in the influent wastewater and the concentration of biomass in the bioreactors), while the influence of other environmental factors was unclear, due to biases introduced by the two qPCR approaches used.

Conclusiones:

1. La estructura de la comunidad de Mycolata y la dinámica de sus poblaciones en el MBR estuvieron fuertemente influenciadas por la carga contaminante del agua influente y la concentración de biomasa del fango activo. Se identificaron filotipos clasificados en cuatro géneros bacterianos diferentes (*Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Segniliparus*), cuyas abundancias relativas estuvieron determinadas por diferentes condiciones operacionales y ambientales, lo que dificulta el diseño de una estrategia general para el control de la formación de espumas. Por tanto, el diagnóstico específico de las Mycolata más abundantes en cada sistema de tratamiento de aguas residuales se postula como la herramienta más prometedora para la prevención exitosa de este problema de operación.

2. La ratio poblaciones metabólicamente activas/poblaciones totales de Mycolata fue un parámetro clave desencadenante de la formación de espumas en el MBR, por lo que se propone como herramienta de predicción. Dicha ratio estuvo vinculada significativamente con los cambios de las variables operacionales y ambientales en el MBR, mostrando correlaciones positivas con la concentración de sustratos en el agua influente, la ratio F/M y el pH, y negativas con la temperatura y el SRT. Los resultados de este estudio corroboran la importancia de los parámetros de operación SRT y ratio F/M en el control de la formación de espumas en las plantas de tratamiento de aguas residuales.

3. El empleo de dos marcadores moleculares (región ITS2 y gen codificante del 18S rRNA) contribuyó a una mejor monitorización de la estructura de la comunidad fúngica en el MBR mediante *fingerprinting* con la técnica TGGE, si bien se detectaron algunas discrepancias al comparar los resultados obtenidos con ambas aproximaciones, y la

resolución de la identificación taxonómica fue baja para las secuencias de la región ITS2. La combinación de la técnica de *fingerprinting* TGGE con la pirosecuenciación 454 demostró que la comunidad de hongos del MBR está formada por un número bajo de especies y que su estructura se modificó significativamente a lo largo de las cuatro fases experimentales estudiadas, adaptándose a los cambios de las condiciones ambientales y operacionales. El pH fue la variable con mayor contribución a la explicación de la dinámica de las poblaciones fúngicas. Mediante ambas técnicas empleadas, se detectó que los hongos dominantes en el MBR pertenecen a los Phyla *Ascomycota* y *Chytridiomycota*, mostrando un comportamiento excluyente entre ellos y viéndose afectados de forma opuesta por las mismas variables ambientales y operacionales.

4. La aplicación de la técnica qPCR a la cuantificación absoluta de la abundancia de hongos en el MBR empleando dos marcadores moleculares (región ITS2 y gen codificante del 18S rRNA) mostró importantes diferencias (aproximadamente 2 órdenes de magnitud) de los números de copias del operón del rRNA de hongos detectados, destacando que la selección del marcador molecular y los cebadores es un paso crucial para la precisión de la cuantificación absoluta de los hongos en comunidades complejas. A pesar de estas diferencias, los hongos representaron una fracción numéricamente importante de la comunidad microbiana de los fangos activos. Independientemente del marcador molecular elegido, se detectaron vínculos significativos entre una mayor abundancia absoluta de hongos y varias de las variables que influyen sobre el sistema MBR (correlaciones positivas con la temperatura, y negativas con las concentraciones de sólidos suspendidos y materia orgánica en el agua influente y la concentración de biomasa del fango activo), mientras que la influencia de otros factores operacionales y ambientales no pudo esclarecerse debido a los sesgos introducidos por los dos enfoques utilizados con la técnica qPCR.

Summary-Resumen

English Summary

1. Introduction.

1.1. Advanced wastewater treatment technologies: submerged membrane bioreactors (MBRs).

Submerged membrane bioreactors (MBRs) are an advanced technology for biological wastewater treatment. These systems are a modification of the conventional activated sludge (CAS) technology, based in the replacement of decanters by ultra- or micro-filtration membrane modules to achieve solid/liquid separation (Rosenberger *et al.*, 2002). MBRs are an interesting alternative to conventional activated sludge (CAS) systems due to their many advantages, such as 75% lower space requirements, an operational flexibility which allows using long solids retention times (SRTs), and generation of smaller volumes of sludge (Shimizu *et al.*, 1996; Witzig *et al.*, 2002). These features allow for an improved removal of pollutants and the generation of high quality, pathogen-free effluent water fulfilling the legal requirements for direct reuse in Spain (RD 1620/2007). Despite its many advantages, the MBR technology is not devoid of some drawbacks, such as the biological clogging of the membranes (biofouling), low efficiency of O₂ transfer to the sludge, or the generation of biological foams (foaming) (Chen and LaPara, 2006; Guo and Zhang, 2012; He *et al.*, 2006; LaPara *et al.*, 2001; LaPara *et al.*, 2006; Kim y Jang, 2006; Meng *et al.*, 2009; Molina-Muñoz *et al.*, 2007, 2009, 2010; Rosenberger *et al.*, 2002; Sombatsompop and Visvanathan, 2006).

Foaming in wastewater treatment plants (WWTPs) is an operational problem reported worldwide. Foaming was initially associated to CAS systems, but it is also frequently observed in advanced treatments like MBRs. The main disadvantage brought

about by foaming is the lack of control over SRT, since foams may retain up to 40% of suspended solids, significantly reducing the useful bioreactor volume.

1.2. Diversity of filamentous bacteria in wastewater treatment systems.

Since the 1970's, many studies have been focused to identify the causes of biological foaming in WWTPs and the design of strategies for its control and prevention. Foaming was related from the beginning with the proliferation of filamentous microorganisms. Filamentous cells are the support required for the development of cell aggregates in the activated sludge, which is a crucial step for the correct separation of solids by decantation. The features and stability of the cell aggregates rely strongly on the relative abundance of filaments (Wilén *et al.*, 2008). In spite of this important role, if filamentous cells proliferate in excess they lead to foaming (Jenkins *et al.*, 1993; Seka *et al.*, 2001).

The diversity of filamentous microorganisms in WWTPs has been traditionally based on microscopy. To date, over 30 filamentous morphotypes have been characterized by this methodology (Eikelboom, 2000; Eikelboom, 2006), although their correct taxonomic identification was not possible just relying on morphological features. In recent years, the development of cultivation independent methods allowed for an important advancement in this field, providing a better understanding of the identity and physiology of these microorganisms (Nielsen *et al.*, 2009). Work conducted in the last two decades revealed an ample diversity of filamentous bacteria in WWTPs, spanning species classified in seven different bacterial Phyla (Nielsen *et al.*, 2009). Bacterial species more often related to foaming issues in WWTPs belong to class *Actinobacteria*, order *Corynebacteriales*. These bacteria are characterized for a high content of mycolic acids in the cell walls and are referred to as Mycolata (Chun *et al.*, 1996). Mycolic acids confer strong hydrophobicity to the cell envelope, a feature which has been related to

the ability of these filaments to cause foaming (De los Reyes *et al.*, 1998; Jenkins *et al.*, 1993). Mycolic acids also act as biosurfactants and aid for the stabilization of foams on the surface of the bioreactors.

1.3. Diversity and roles of fungi in wastewater treatment plants.

The occurrence of fungi in wastewater treatment plants (WWTPs) has been often regarded unimportant, since they are not numerically dominant, with the exception of industrial wastewaters where some features favor their development versus bacteria (Evans and Seviour, 2012; Zheng *et al.*, 2011). For this reason, the roles of fungi in WWTPs are still very little explored, although studies mainly performed in CAS systems demonstrated that they play important roles in biomass degradation (Evans y Seviour, 2011; Weber *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011). Fungal overgrowth was also described in relation to operating problems, including foaming (Baker y Dudley, 1998; Richard, 2003; Weber *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2011).

1.4. Molecular methods for the study of microbial communities.

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, in particular, PCR amplification of molecular markers such as the genes encoding the rRNA genes. 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. Some examples of such methods are the fingerprinting techniques (denaturing or temperature gradient gel eletrophoresis, DGGE/TGGE), next-generation sequencing technologies (NGS), and real-time quantitative PCR (qPCR).

2. Objectives.

This PhD Thesis Project is a follow-up to investigations early developed on a real-scale MBR based WWTPs (Gómez-Silván *et al.*, 2013, 2014a, 2014b). The global objective of the research performed was focused to study the structure and diversity of the communities of filamentous microorganisms in MBR systems, and to link their population dynamics to the changes of the operation parameters and other variables not controlled under real operating conditions which also influence the treatment process. The research intends to contribute data useful for the prediction of the behavior of filamentous organisms in MBR systems which may help for the diagnosis and control of foaming. For this purpose, a real scale MBR was monitored throughout four different experimental phases (Summer 2009, Autumn 2009, Summer 2010 and Winter 2012), under different sets of operating conditions (hydraulic and solids retention times, HRT and SRT). The specific objectives were the following:

1. Study of the community structure and population dynamics of total and active Mycolata in the MBR by TGGE fingerprinting. Links with operation parameters and variables influencing the MBR.
2. Quantification of the absolute abundance of total and active Mycolata populations by qPCR. Links with operation parameters and variables influencing the MBR.
3. Study of the community structure and population dynamics of total and active fungi in the MBR by TGGE fingerprinting, and characterization of fungal diversity by 454 pyrosequencing. Links with operation parameters and variables influencing the MBR.
4. Quantification of the absolute abundance of fungal populations by qPCR. Links with operation parameters and variables influencing the MBR.

3. Material and Methods.

3.1. Description of the experimental MBR plant and operation conditions.

The MBR system (40 m³ maximum volume) is designed to treat wastewater generated by 200-250 equivalent inhabitants. It was installed at the facilities of EDAR Sur-WWTP (EMASAGRA, Granada Spain) and fed urban wastewater taken from its pretreatment, after being filtered through a 1-mm brush screen. The MBR consisted of two bioreactors (BR), aerated BR and anoxic BR, to achieve the elimination of both organic matter and N compounds, and worked in pre-denitrification mode. The MBR is described in more detail in Chapter 1, subparagraph 2.1 and Fig. S1.

The biodiversity of Mycolata and fungi in the activated sludge of the MBR was monitored during four different phases of operation: Summer 2009, Autumn 2009, Summer 2010 and Winter 2012 (Sm09, Au09, Sm10, and Wn12, respectively) under different HRT and SRT (Chapter 2, Table S1) and markedly different average characteristics of the influent wastewater and temperature of the activated sludge (Chapter 1, Fig. 1). The MBR experienced intense foaming in the anoxic BR from 26/11/2009 to 22/12/2009 (end of phase Au09) and from 7/02/2012 to 18/02/2012 (phase Wn12).

3.2. Activated sludge sampling for the studies of Mycolata and fungi biodiversity.

The activated sludge was sampled when the MBR had reached the steady-state operating conditions (at least threefold the SRT since the start-up date, Maza-Márquez *et al.*, 2015). Samples (200 ml) of activated sludge from both BRs (aerobic and anoxic) were collected in sterile plastic containers and were transported from the experimental plant to the laboratory and preserved until nucleic-acid extraction, following previously described protocols (Gómez-Silván *et al.*, 2014b).

3.3. DNA and RNA extraction.

Total genomic DNA (gDNA) and RNA were extracted from activated sludge samples by using the FastDNA-2 mL SPIN Kit for Soil and the FastRNA Blue Kit (MP-Bio, Santa Ana, CA, USA), respectively. The kits were used in combination with the FastPrep24 apparatus (MP-BIO, Santa Ana, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The RNA samples were further digested by the rigorous procedure of TURBO DNA-free kit (Ambion[®], Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) and then purified using the RNA Cleanup protocol from RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hamburg, Germany). Purified DNA and RNA were preserved at -20°C.

3.4. TGGE.

TGGE fingerprinting was done based on two-step amplifications of target molecular markers, generated by PCR or RT-PCR. To characterize the Mycolata community, the 16S rRNA sequence was targeted using the group specific primer F249 (de Azeredo *et al.*, 2006) and the universal primer R1378 (Heuer *et al.*, 1997). The 18S rRNA gene and the intergenic transcribed spacer (ITS2) were used as molecular markers for fungi, using the primer sets NS1-Fung (Evans y Seviour, 2012) and ITS3-ITS4 (White *et al.*, 1990), respectively. Both total and active populations were targeted by different approaches based on PCR amplification of the target sequences from either DNA or retrotranscribed RNA (cDNA) extracted from the MBR samples.

TGGE was done using a TGGE Maxi system (Whatman-Biometra, GmbH, Germany) as previously described (Maza-Márquez *et al.*, 2015). The optimal temperature gradients for efficient separation of bands were 43-63 °C for 16S rRNA amplicons of Mycolata, 25-45°C for fungal 18S rRNA amplicons, and 30-50°C for fungal ITS2 region amplicons. Gel bands were visualized by silver staining using the Gel Code Silver Staining kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific Rockford, IL, USA),

following the manufacturer's indications. The band patterns generated by TGGE were normalized using the Gel Compar II v.5.101 software (Applied Maths, Belgium). For cluster analysis, the TGGE profiles were compared using the Dice coefficient, based on the assignation of band-classes and the score of band's presence/absence (herein incidence). Dendrograms relating band pattern similarities were automatically calculated with the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). Based on the relative abundance of the band-classes in normalized TGGE gels, the following descriptive indices of the biological diversity were calculated: Range-weighted richness index (Rr), Functional organization (Fo), Shannon-Wiener diversity index (H'), and Dynamics (Dy) (Gómez-Silván *et al.*, 2014b; Marzorati *et al.*, 2008).

2.8. Reamplification and sequencing of isolated TGGE bands and phylogenetic analysis of the DNA sequences.

Portions of individual bands on silver-stained TGGE gels were picked up with sterile pipette tips, placed in 10 μ l of filtered and autoclaved distilled water, and freeze-thawed. 3-5 μ l of these suspensions were directly used for reamplification with the appropriate primers in a final volume of 50 μ l. PCR products were purified by agarose gel electrophoresis and extraction with the Qiaex-II kit (Qiagen, Hamburg, Germany). The purified amplicons were sequenced in an ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

The DNA sequences of all the amplicons were analyzed using the biocomputing tools provided online by the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), as well as the specific fungal sequence databases AFTOL (<http://aftol.org>) and UNITE (<https://unite.ut.ee>). The BLASTn program (Altschul *et al.*, 1997) was used for sequence similarity analysis. The ClustalX v. 2.0.3 software (Jeanmougin *et al.*, 1998) was used for the alignment of the sequences.

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

3.6. qPCR (Real-time PCR).

The absolute quantification of Bacteria and Mycolata in the MBR samples by qPCR was achieved using the 16S rRNA sequence as molecular marker. For the absolute quantification of fungi, two molecular markers were simultaneously used: the sequence of the 18S rRNA and the ITS2 region. Primers and qPCR conditions are detailed in Chapter 2, Tables 1, 2, and Chapter 4, Tables 1, 2.

The number of copies of all the molecular markers was quantified in each sample, using either extracted DNA or cDNA as templates. qPCR was optimized using TrueStart Hot Start DNA polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA USA) and SYBR Green I (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in a total volume of 25 μ l, using a StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems). qPCR calibration curves were constructed with the aid of plasmid standards harboring inserts of the targeted genes. Amplicons of 16S rDNA were generated from the culture collection strains *Pseudomonas putida* NCB 957 (quantification of Bacteria) and *Mycobacterium phlei* DSM 43239 (quantification of Mycolata). Amplicons of fungal 18S rRNA and ITS2 regions were constructed using *Candida albicans* strain ATCC 10231. The PCR products were cloned with the aid of the TOPO® TA cloning® system (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's protocols. Template copy numbers per ng of the standards were estimated using the

online software "Calculator for determining the number of copies of a template", as described by Jackson *et al.* (2013).

3.7. Study of fungal diversity in the MBR by 454 pyrosequencing.

454 pyrosequencing was used to evaluate the fungal diversity in 14 MBR samples representative of the four experimental phases studied. Samples of gDNA (430-480 ng/ μ l) extracted from the activated sludge samples was processed at Research and Testing Laboratory (<http://www.researchandtesting.com>, Lubbock, Texas, USA) using the 454 GS FLX+ instrument (Roche, Branford, USA), following standard protocols set up in their laboratories.

3.7.1. Biocomputing of 454 pyrosequencing data.

Raw sequences were analyzed with the aid of Mothur 1.33.3 (Schloss *et al.*, 2009, <http://www.mothur.org>). Commands `sff.multiple`, `trim.flows`, `shhh.flows` and `trim.seqs` were used for the preliminary quality trimming and denoising before applying the Mothur standard operating procedure (SOP) for 454 derived data (http://www.mothur.org/wiki/454_SOP). The sequences were aligned with the eukaryotic SSU Silva Reference as formatted for Mothur (SSURef v102, 15/02/2010, 1238 sequences). All unique sequences were preclustered with their more abundant counterparts within a maximum difference of 2 nucleotides. Sequences were classified with the Naïve Bayesian Classifier (Wang method, Wang *et al.*, 2007) using the Silva SSURef eukarya taxonomy. Phylotypes (PHYs) were defined by clustering using the UPGMA algorithm. An overview table of PHYs based read count per sample was made at 97% sequence similarity, the PHYs were classified at each cutoff, and representative sequences were picked at 97% similarity.

For all PHYs that were unclassified at the 97% similarity level by using the Naïve Bayesian Classifier as implemented in Mothur, an additional classification was made by

using the NCBI Blast + suite (Camacho *et al.*, 2009) on a Linux system and remote blasting the 97% PHY binning representative sequences against the NT Nucleotide Collection. Finally, PHYs still unclassified were manually compared against the GenBank database using the BLASTn server (Altschul *et al.*, 1990) at the National Centre for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). All sequences scoring $\geq 90\%$ similarity with fungal sequences were added to the list of effective PHYs following the criteria of Lanzén *et al.* (2012) to be assigned to taxa. An additional filter was applied to remove PHYs represented by only one read in a single sample, and then the PHYs not classified as Fungi at the Phylum level were excluded from the analysis. For the comparison of the fungal diversity between samples, the number of filtered sequences was normalized to the smaller size in the sample set.

The PAST v. 3.06 software (Hammer *et al.*, 2006) was used for the construction of rarefaction curves and calculation of diversity indices Chao-1 (Chao, 1984), Shannon-Weaver (Shannon and Weaver, 1963), Simpson (Simpson, 1949) and Pielou's evenness (Pielou, 1966) with a 95% confidence interval calculated by a bootstrap method.

The PRIMER software was used to calculate the Bray Curtis similarity matrix between samples, construction of a dendrogram by the UPGMA algorithm, and SIMPER analysis to evaluate the contribution of each PHY to the observed divergence between sample pairs (Clarke y Warwick, 2001).

3.8. Statistics.

IBM SPSS Statistics v. 19 (SPSS INC., USA) was used for a preliminary analysis of data distributions and the subsequent statistical tests in search for differences among the groups of samples. As most of the data sets did not fit the normal distribution, a non-

parametric analysis for related samples (Wilcoxon signed-rank test) was conducted for each biological assay and variable. A 95% significance level ($p < 0.05$) was selected.

The Primer software (PRIMER-E v. 6.0, Plymouth, UK) was used for analyses based in the sets of biological data derived from the fingerprints, 454 pyrosequencing and qPCR. Sample-resemblance matrices were generated from the relative abundance data using the Bray Curtis coefficient of similarity. Based in these similarity matrices, cluster analyses, non-parametric multidimensional scaling (MDS) and ANOSIM analyses were performed. The ANOSIM analyses render the significant differences between the groups of samples (aerated and anoxic BRs; gDNA and cDNA-based profiles; or experimental periods Sm09, Au09, Sm10 and Wn12).

Spearman rank correlations (ρ_s) were calculated between the ordinations of the biological data and the measured operational parameters and environmental variables. Those correlations were represented in the plots as vectors, which illustrate a variable's directional influence and its role in explaining the biological data ordination. In order to link the distribution patterns of the biological data to the set of variables, BIO-ENV analysis was carried out (Clarke and Warwick, 2001). BIO-ENV calculates the Spearman rank correlations between the similarity matrix of biological data (created using the Bray Curtis coefficient) in which the ordination method (MDS) is based and the similarity matrices (created using Euclidean Distance) derived from all the possible sequential combinations of the measured variables. The highest valued obtained (BEST value) indicates which combination of variables best explains the biological ordination.

4. Results and Discussion.

4.1. Environmental variables in the MBR system.

Chapter 1, Fig. 1 shows the Box-and-Whiskers plots of the variables monitored in the MBR system during the four experimental phases (Sm09, Au09, Sm10, and Wn12).

According to the Wilcoxon signed-rank test, there were significant differences ($p < 0.05$) among the four phases for all the variables. As predictable, IT experienced sharp fluctuations, since the experimental phases were developed in different seasonal periods. The average IT was significantly higher during the two phases taking place in summer (Sm09 and Sm10), while the lowest average value was recorded in Wn12. Sm10 was characterized by a significantly lower pH and the highest levels of contamination in the influent water (COD, BOD₅, and suspended solids), while the F/M ratio was significantly lower in the Au09 phase. Regarding the evolution of the concentration of biomass in the BRs, significant differences were also found between the experimental phases (Chapter 1, Fig. 1), but the average values of suspended solids in the aerated and the anoxic BRs were similar within each phase. Suspended solids measured in the activated sludge were particularly high during phase Sm10.

4.2. Linking Mycolata population dynamics to operating and environmental variables in the MBR.

The global analysis of the TGGE profiles of the Mycolata community in a total of 162 gDNA and cDNA samples retrieved from the MBR is displayed in Chapter 1, Fig. 2. The Dice coefficient-based comparison evidenced that the overall similarity between the samples was below 50%. The ANOSIM analysis showed significant differences between gDNA- and cDNA-based profiles and between profiles of samples retrieved in the four different experimental phases. There were no significant differences between the BRs. Samples retrieved from the MBR while foaming was being experienced tended to cluster apart.

Overall, the ranges of Rr, Fo, H' , and Dy diversity indices throughout the whole experimental period describe a Mycolata community displaying medium-to-high population richness, medium functional organization, and low-to-medium dynamics

(Marzorati *et al.*, 2008). These indices define a good capacity of Mycolata to maintain their functionality in the MBR and getting adapted to changing environmental conditions (Marzorati *et al.*, 2008).

Image analysis with Gel Compar II detected a total of 39 unique band classes in the TGGE fingerprints of Mycolata among the 162 samples analyzed. Bands representative of 27 out of the 39 band-classes detected (69%) were successfully reamplified and sequenced, and the phylogenetic tree showing the relationships among them is displayed in Chapter 1, Fig. 4. The sequences of 22 bands were evolutionarily close to those of 4 different genera of Mycolata (*Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and *Segniliparus*). Several sequences clustered in the neighborhood of species *Gordonia amarae*, *G. polyisoprenivorans*, *G. defluvii*, *R. erythropolis* and *R. coprophilus*, often found in WWTPs and whose proliferation has been connected with foaming episodes (de los Reyes, 2010b; Guo and Zhang, 2012). Both fast- and slow-growing *Mycobacterium* spp. phlotypes were identified (Chapter 1, Fig. 4). The heatmap in Chapter 1, Fig. 5 shows the longitudinal evolution throughout all the experimental phases of the relative abundance of the 39 band classes, in both the gDNA- and cDNA-based fingerprints. Among the populations identified as Mycolata by sequencing, 9 TGGE band-classes displayed a high incidence (occurrence in > 65% of the total samples), and remarkable changes of their relative intensities were observed throughout the whole experimental period. These results indicate that phlotypes displaying a high relative abundance were balanced between the four different genera of Mycolata occurring in the MBR, suggesting that they all may play significant roles in the WWTP community.

BIO-ENV analysis was used to evaluate the significance of the influence of the operational parameters and environmental variables on the community structure and

population dynamics of Mycolata. The dynamics of the total Mycolata populations in the MBR throughout the experimental period were 30% explained by changes of BOD₅ and VSS, while in the case of active populations the factors contributing the better explanation (32%) were iTSS and VSS. Thus, the variables mostly influencing both biological ordinations were related to the input of nutrients in the influent water and the accumulation of biomass in the BRs.

Significant correlations were observed between particular Mycolata phylotypes and one or more variables, contributing valuable information for the prediction of their abundance and activity under changing conditions. *Gordonia amarae*-related phylotypes were mostly favored by low BOD₅, iTSS and VSS concentrations, being also positively influenced by increasing temperatures. On the contrary, *Mycobacterium/Rhodococcus*-related Mycolata occurred and actively proliferated with higher influent contaminant load and VSS concentration, and additionally were favored by low temperatures.

In Chapter 1, Fig. 6, the positions of the samples retrieved while the MBR experienced intense foaming in the Au09 and Wn12 phases are marked with an inner dot in the MDS plots. These groups of samples tended to cluster separately in the ordinations, and their distribution was strongly correlated to the increase in the three best-explaining factors (BOD₅, iTSS and VSS) and negatively to IT. Foaming episodes were related to an increased relative abundance of phylotypes related to *Mycobacterium* and *Rhodococcus* (Chapter 1, Figs.5 and 6). The role of temperature on the occurrence of foaming and Mycolata proliferation in WWTPs has been evaluated in several previous studies. In the present work, the foaming incidents registered during the Au09 and Wn12 phases took place in late November (average IT < 20°C) and February (average IT < 15°C), respectively. Mycolata-related foaming is often reported during the

late spring and summer months (Asvapathanagul *et al.*, 2012; de los Reyes and Raskin, 2002), consistently with the knowledge on *Gordonia amarae* temperature requirements, since the optimal growth of this species occurs between 23-37°C while growth has seldom been observed below 18°C (de los Reyes, 2010b). Foaming described at lower temperatures has been connected to Mycolata other than *Gordonia* (de los Reyes 2010b; de los Reyes and Raskin, 2002).

These findings are of practical relevance for the management of foaming episodes in WWTPs. Studies robustly linking the changes of the operational and environmental conditions to the occurrence of foaming, the shifts in Mycolata abundance or their population dynamics contribute useful information for the prediction and control of foaming episodes in WWTPs; however, this approaches have seldom been attempted in the available literature (Asvapathanagul *et al.*, 2012; de los Reyes and Rasking, 2002; Parada-Albarracín *et al.*, 2012).

4.3. The ratio of metabolically active versus total populations of Mycolata triggers foaming in MBRs.

In Chapter 2, the quantification of total and active Mycolata populations was achieved in the MBR samples by means of qPCR. qPCR revealed that the highest ratios of metabolically active versus total Mycolata populations were observed in samples of the two experimental phases when foaming was experienced in the MBR (Chapter 2, Fig.1). It the first time that the ratio of metabolically active versus total Mycolata is found to be a key parameter triggering foaming in MBRs; thus, we propose it as a candidate predictive tool. The increase in the numbers of metabolically active cells was detected 5 weeks before foaming was observed in the MBR (Chapter 2, Fig 1B). A similar result was previously reported by Asvapathanagul *et al.* (2012), who observed a rapid growth of *Gordonia amarae* 40 days in advance of a foaming episode.

Davenport *et al.* (2000), by means of quantitative FISH, identified a threshold of 2×10^9 Mycolata cells per L of activated sludge for the occurrence of foam, later supported by a survey of 14 full-scale WWTPs (Davenport *et al.*, 2008). Nevertheless, in the present study, the absolute abundances of Mycolata were calculated using a qPCR approach, and largely exceeded this threshold value in all the experimental phases (Chapter 2, Fig. 1E). Indeed, the highest relative abundance of Mycolata within the Bacteria community was recorded during the Sm10 phase (Fig. 2B), operated under the longest SRT (35 days) and in the absence of foaming episodes. The universal validity of the threshold value proposed by Davenport *et al.* (2008) was already questioned by Petrovsky *et al.* (2011). The results of the present study demonstrate that the occurrence of foaming in the MBR was triggered by a high ratio of active versus total populations of Mycolata, rather than being induced only by a threshold number of total Mycolata.

Chapter 2, Fig. 2 shows the relative abundance of 16S rDNA and rRNA copies of Mycolata versus Bacteria. Mycolata always represented a relatively small proportion of the Bacteria populations. On average, Mycolata displayed higher relative abundances among the total populations of Bacteria (0.60% of rDNA copies) than among the actively growing populations (0.35% of rRNA copies). These results are in accordance with earlier studies which reported that a high proportion of the Mycolata cells found in activated sludge of WWTPs display low metabolic rates (de los Reyes 2010a; Nielsen *et al.*, 2009). However, the average tendency was inverted in the samples which showed the highest 16S rRNA/rDNA ratios of Mycolata, detected in the Au09 and Wn12 experimental phases in relation with foaming occurrence.

According to MDS and BIO-ENV analyses, the highest ratios of active versus total Mycolata observed in the samples of the two experimental phases when foaming was experienced were favored by higher pH, higher concentrations of substrates in the

influent water (BOD₅, COD, iTSS), higher F/M ratio, lower IT, and shorter SRT (Chapter 2, Fig. 4B). Remarkably, BOD₅, COD, iTSS, and IT had the same directional influences on the shaping of the Mycolata communities leading to foaming in the MBR (Chapter 1, Maza-Márquez *et al.*, 2015). High temperatures (IT) favored the abundance of total Mycolata populations in the MBR (Chapter 2, Fig. 3A), but at the same time influenced negatively their metabolic rates (Chapter 2, Fig. 3B and Fig. 4B). Several previous works have evaluated and discussed the influence of SRT on foaming incidence in WWTPs. The general consensus is that foaming is favored by long SRTs (de los Reyes, 2010a; Jenkins *et al.*, 2004); however, many studies failed to link consistently this operation parameter to foaming occurrence (Blackall *et al.*, 1991; Dhaliwal, 1979; Oether *et al.*, 2001; Parada-Albarracín *et al.*, 2012). The results presented here throw a new light on the former observations, since operation at longer SRTs was found to correlate with a higher abundance of total Mycolata in the MBR, but at the same time it reduced their metabolically active fraction. In conclusion, the results of the present study corroborate the relevance of SRT and F/M ratio for the management of foaming in MBRs.

4.4. Diversity and dynamics of fungal populations in the MBR investigated by TGGE fingerprinting and 454 pyrosequencing: Influence of operation parameters and environmental variables.

By means of both TGGE fingerprinting and 454 pyrosequencing, cluster analysis revealed a low stability of the fungal communities in the MBR (Chapter 3, Figs. 2 and 8). ANOSIM analysis showed significant differences between the community profiles of samples retrieved in the four different experimental phases, but not between the BRs.

The descriptive indices of diversity allowed the characterization of the ecology of the fungal communities (Chapter 3, Fig. 3 and Table 5). By either TGGE or 454

pyrosequencing, the indices described a community with a low number of species but able to keep the functionality in the system and become adapted to changes of the environmental and operating conditions.

The comparison of the structure of fungal communities between samples represented in heatmaps (Chapter 3, Figs. 4, 5, 9 and 10) and BIO-ENV analyses (Chapter 3, Figs. 6 and 11) revealed an alternation of the dominant phylotypes in the fungal community in response to the changes of the variables included in the analysis. These results are in agreement with previous work on WWTPs based in technologies other than MBR, which conclude that the composition of the fungal community in the activated sludge is influenced by the wastewater composition and origin, system configuration, operational parameters and environmental conditions, which select the prevalence of fungal species according to their metabolic capacities (Yang *et al.*, 2013).

MDS and BIO-ENV analysis showed that pH was the variable mostly contributing to explain the structure of the fungal communities assessed by both TGGE fingerprinting and 454 pyrosequencing, although strong correlations were also observed for other operational and environmental variables (Chapter 3, Figs. 6 and 11).

Fungi have been often overlooked in the evaluation of microbial diversity in WWTPs, since they were classically considered not numerically dominant and their presence was associated to accidental entrance from air or soil sources due to sedimentation or rainfall (Cooke, 1970). However, fingerprinting-based studies published in recent years conclude that the diversity of fungal communities in WWTPs is wider than previously believed (Evans y Seviour, 2012; Yang *et al.*, 2011). The results of the present work demonstrated that fungi occur and their populations are active in MBR systems, potentially fulfilling important functions in wastewater depuration. *Ascomycota* and *Chytridicomycota* were the dominant fungal Phyla, whose

relative abundances were correlated in the opposite way to the same operational and environmental variables.

454 pyrosequencing allowed a better characterization of the fungal diversity compared to TGGE fingerprinting, detecting 284 PHYs classified in 9 Phyla/Subphyla. Among the fungal community members, several PHYs were related to the genera *Candida*, *Geotrichum*, *Saccharomyces* and *Trichosporon*, known for their versatile hydrolytic enzyme activities (Chi *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2013) and their ability to metabolize aromatic compounds and transform heavy metals, which makes them of great potential in biotechnology and bioremediation (Kurtzman *et al.*, 2011). Also, several PHYs were related to genera of filamentous fungi (*Geotrichum*, *Phoma*, *Pilobolus*, *Trichosporon*, *Syncephalastrum*, *Urocystis*) which may participate in cell aggregation or influence in operational problems such as foaming or biofouling. These results point to the need of investigate the still unknown diversity and roles of fungi and their potential in wastewater treatment.

In the present study, shifts of the fungal community structure were detected when the MBR was experiencing foaming issues (Chapter 3, Figs. 6 and 11). In the MDS ordinations based of 18S rDNA derived TGGE fingerprints, the samples retrieved while foaming was taking place tended to cluster separately (Chapter 3, Fig. 6). MDS ordination of biological data from both TGGE and 454 pyrosequencing showed that the relative abundance of phylotypes classified as *Saccharomycetes* increased in the direction of those samples (Chapter 3, Figs. 6 and 11).

4.5. Quantification of fungal populations in a full-scale MBR and links to operational conditions and environmental variables.

The absolute abundance of fungi in the MBR samples was measured using two molecular markers (18S rRNA gene and ITS2 region). Overall, the dynamics of the

abundance of fungi evaluated throughout the experimental period followed similar patterns regardless of the marker chosen. However, the average absolute abundance of copies of ITS rDNA was 2 logarithmic units higher than that of the 18S rDNA. The average numbers of copies of ITS rDNA per L of activated sludge were in the 10^7 - 10^8 range, while the numbers of copies per L of activated sludge were in the 10^6 range in the four experimental phases when the 18S rDNA was used as molecular marker to estimate the abundance of fungi (Chapter 4, Fig. 2). These differences are attributable to biases introduced by the intrinsic variability of the specificity and coverage of the primer sets targeting different regions of the rRNA operon, as previously reported in other studies (Bellemain *et al.*, 2010; Bokulik and Mills, 2013; Prévost-Bouré *et al.*, 2010). While the ITS1 and ITS2 regions have been recently proposed as the official barcoding marker sequences for fungi (Bellemain *et al.*, 2010), their high level of length polymorphism is a significant drawback for qPCR, since it may lead to preferential amplification of the shorter sequences (ie. *Ascomycota* and non-Dikarya versus *Basidiomycota*, Bellemain *et al.*, 2010). In contrast, the 18S rRNA gene sequence has low length polymorphism, but the coverage of the primer used set falls below 70% for some fungal taxa, including *Chytridiomycota* and *Mucoromycotina*, which have been described in the mycobiota of WWTPs by molecular methods by Evans and Seviour (2012). Besides, the study of fungal diversity described in Chapter 3 demonstrated that *Ascomycota* and *Chytridiomycota* phylotypes dominated the fungal community in the MBR.

The average abundance of copies of bacterial 16S rDNA was 4-5 or 5-7 orders of magnitude higher than that of fungi, depending on the experimental period in the MBR and the fungal molecular marker chosen (ITS rDNA or 18S rDNA, Chapter 4, Fig. 3). To date, there are very few examples in the literature attempting the quantification of fungi in WWTPs, and all of them were based in cultivation-dependent approaches

(Kacprzak *et al.*, 2005; Liébana *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2011). These previous studies often provide lower estimations of the abundance of fungi (10^4 CFU/L), compared to the data presented here.

The quantification of fungi by qPCR indicated that foaming was unrelated to an increased proliferation of these organisms; on the contrary, both their absolute abundance and their relative abundance to bacteria were lower in samples retrieved when the MBR was experiencing foaming issues (Chapter 4, Figs. 2 and 3). Previously, the MBR fungal community was characterized by TGGE fingerprinting and 454 pyrosequencing using the 18S rDNA as marker, and significant changes of the fungal community structure were detected (Chapter 3, subparagraph 3.1), in the samples retrieved during foaming episodes.

MDS and BIO-ENV analyses demonstrated significant links between the absolute abundance of fungi and several variables (higher IT, lower iTSS and BOD₅ of the influent and lower VSS in the bioreactors), regardless of the molecular marker chosen (Chapter 4, Table S2). In the present study, the average temperature of the MBR was kept into the optimal growth range for fungi in the Sm09 and Sm10 phases, consistently with a positive correlation between the absolute abundance of fungi and this parameter. Temperature is well known to influence the growth rates, enzyme activities and cell permeability in microorganisms, including fungi (Moore-Landecker, 1990).

BOD₅ of the influent water and VSS in the sludge were negatively correlated to fungal abundance (Chapter 4, Fig. 4). A lower input of readily biodegradable C compounds in the influent water may favor the growth of fungi, since they are often able to degrade recalcitrant complex polymers of both animal and plant origin, which bacteria cannot use as C sources (Kinsey *et al.*, 2003). Regarding the accumulation of

biomass inside the bioreactors (VSS), the MBR technology is based on the retention of solids by a membrane, allowing for the accumulation of biomass in the system and at the same time limiting the availability of carbon substrates, which leads to reduced microbial metabolic activities and growth rates of heterotrophs (Gómez-Silván *et al.*, 2014a).

According to BEST analysis, the level of explanation achieved by the variables influencing the MBR was lower when the molecular marker chosen was ITS rDNA (BEST=0.37), compared to 18S rDNA (BEST= 0.48). Several variables displayed similar directional influences in both MDS plots (Chapter 4, Fig. 4, Table S2), while the directional influence observed for SRT, F/M ratio and pH strongly diverged between the ordinations (Chapter 4, Fig. 4, Table S2). Due to these differences, the variables giving the best explanation of the ordination of the samples (BEST value) varied depending on the choice of the molecular marker. SRT was the major factor explaining the distribution of the absolute abundance of fungi throughout the samples based on the quantification of copies of ITS rDNA, while in the case of 18S rDNA the best explaining factor was IT (Chapter 4, Fig. 4).

Resumen en español

1. Introducción.

1.1. Tecnologías avanzadas de tratamiento de las aguas residuales: biorreactores de membrana sumergida (MBRs).

Los biorreactores de membrana sumergida (MBRs) constituyen una de las tecnologías más avanzadas en el tratamiento de las aguas residuales. Estos sistemas son una variación de la tecnología de fangos activos convencionales (CAS), donde la separación de sólidos se lleva a cabo sustituyendo la decantación por un proceso de filtración con membranas de microfiltración o ultrafiltración (Rosenberger *et al.*, 2002). Actualmente, los MBRs están bien establecidos, compitiendo activa y directamente con los CAS como tecnología de elección. Los MBR son sistemas compactos, permitiendo reducir hasta un 75% del espacio requerido para la instalación. Entre las principales ventajas se encuentra el poder trabajar empleando tiempos de retención celular (SRT) largos, lo que permite elevar la edad del fango y minimizar su producción como residuo sólido (Shimizu *et al.*, 1996; Witzig *et al.*, 2002). Estas condiciones de operación permiten obtener un efluente de alta calidad sanitaria, además de evitar daños causados al medio ambiente por el vertido de este tipo de contaminantes cumpliendo los requisitos de calidades mínimas exigidos para su reutilización directa, según lo reflejado en el RD 1620/2007. No obstante, el uso de este tipo de tecnología también genera algunos problemas, como son el ensuciamiento biológico de las membranas por la formación de biopelículas (*biofouling*), la falta de transferencia de oxígeno al fango, o problemas de formación de espumas (*foaming*) (Chen y LaPara, 2006; Guo y Zhang, 2012; He *et al.*, 2006; LaPara *et al.*, 2001; LaPara *et al.*, 2006; Kim y Jang, 2006; Meng *et al.*, 2009;

Molina-Muñoz *et al.*, 2007, 2009, 2010; Rosenberger *et al.*, 2002; Sombatsompop y Visvanathan, 2006).

Actualmente, la formación de espumas en las plantas se considera un problema muy extendido, siendo descrito en numerosos países. Estos problemas de generación de espumas biológicas fueron inicialmente asociados a los sistemas CAS. Sin embargo, este fenómeno ha sido también observado en sistemas de tratamiento avanzado, como es el caso de los MBR. Los principales inconvenientes están relacionados con la estabilidad del sistema al producirse la pérdida de control del tiempo de retención de sólidos (SRT). Las espumas pueden retener más del 40% de los sólidos, reduciendo el volumen útil del reactor.

1.2. Diversidad de bacterias filamentosas en los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Desde los años 70, se han desarrollado numerosos estudios centrados en la identificación de las causas de la formación de espumas en los tratamientos del agua residual y su posible prevención. Desde el principio, se relacionó este fenómeno con la proliferación de microorganismos filamentosos. Los microorganismos filamentosos actúan como soporte para el desarrollo de las estructuras floculares, siendo la correcta formación del flóculo de crucial importancia en la separación sólido-líquido para el tratamiento de las aguas residuales. La estabilidad y características de los flóculos dependen, entre otros factores, de la abundancia relativa de estas formas filamentosas (Wilen *et al.*, 2008). A pesar del importante papel de los microorganismos filamentosos en la estructuración de los flóculos, el excesivo desarrollo de estos microorganismos es responsable de la generación de espumas biológicas o *foaming*, uno de los problemas clásicos de los sistemas de fangos activos (Jenkins *et al.*, 1993; Seka *et al.*, 2001).

El estudio de la diversidad de los microorganismos filamentosos en los tratamientos de aguas residuales se ha basado tradicionalmente en procedimientos microscópicos. Mediante esta metodología, se han catalogado hasta la actualidad más de 30 morfotipos filamentosos (Eikelboom, 2000; Eikelboom, 2006), si bien no es posible identificar los filamentos de modo fiable solamente por sus características morfológicas. Por ello, el desarrollo y aplicación de los métodos independientes de cultivo ha permitido un importante avance en este campo, posibilitando una mejor comprensión de la identidad y fisiología de estos microorganismos (Nielsen *et al.*, 2009).

Los trabajos realizados en las últimas dos décadas concluyen que las bacterias filamentosas presentes en los sistemas de tratamiento de agua residual son evolutivamente diversas, habiéndose identificado hasta la fecha miembros afiliados a siete Phyla diferentes (Nielsen *et al.*, 2009). Las especies de bacterias filamentosas que causan principalmente los problemas de formación de espumas biológicas en los sistemas de tratamiento de aguas residuales pertenecen a la clase *Actinobacteria*, y en concreto al orden *Corynebacteriales*. Se trata de bacterias cuya pared celular se caracteriza por un alto contenido en ácidos micólicos, por lo que reciben la denominación de “Mycolata” (Chun *et al.*, 1996). Los ácidos micólicos confieren características hidrofóbicas a la superficie celular, que se han relacionado con la generación de las espumas (De los Reyes *et al.*, 1998; Jenkins *et al.*, 1993). Los mismos ácidos micólicos son también biosurfactantes, tendiendo a formar una capa de espuma estable en la superficie de los tanques.

1.3. Diversidad y funciones de los hongos en los tratamientos del agua residual.

La presencia de hongos en el tratamiento del agua residual se ha considerado tradicionalmente de poca relevancia, ya que numéricamente son poco dominantes, excepto en tratamientos del agua residual industrial, donde encuentran características

que les favorecen en la competición con las bacterias (Evans and Seviour, 2012; Zheng *et al.*, 2011). Debido a ello, la diversidad y los papeles que desempeñan en los tratamientos de agua residual están todavía poco explorados. No obstante, varios estudios realizados fundamentalmente en plantas basadas en el proceso CAS demuestran que estos microorganismos eucariotas cumplen funciones importantes en la conversión de la biomasa y en el proceso de depuración en general (Evans y Seviour, 2011; Weber *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011). También está documentado que la proliferación excesiva de los hongos en las plantas de tratamiento puede generar problemas operacionales, incluido el *foaming* (Baker y Dudley, 1998; Richard, 2003; Weber *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2011).

1.4. Técnicas moleculares para el estudio de las comunidades microbianas.

El desarrollo de técnicas de biología molecular basadas en la amplificación mediante PCR de los genes codificantes del rRNA ha supuesto una exitosa alternativa para la caracterización de las comunidades microbianas en ecosistemas complejos. Estos métodos nos proporcionan una importante información sobre la diversidad o abundancia de los microorganismos en sus hábitats naturales, permitiéndonos descubrir un amplio número de especies microbianas previamente desconocidas, debido a las dificultades de aislarlos y cultivarlos en laboratorio. Algunos ejemplos de estos métodos son *fingerprinting* (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante o de temperatura, DGGE/TGGE), secuenciación de nueva generación (NGS) o PCR en tiempo real (qPCR).

2. Objetivos.

Como objetivo global de esta investigación, se planteó el estudio en profundidad de las comunidades microbianas filamentosas en los sistemas MBR, mediante un enfoque que permitiera interpretar la relación entre su estructura y su función, así como establecer su

correlación con los parámetros de operación del sistema y las variables del entorno de difícil control en explotaciones a escala real. Con ello se trata de contribuir a la predicción del comportamiento de las comunidades de organismos filamentosos en las plantas de tratamiento basadas en la tecnología MBR, así como al diagnóstico y corrección bajo condiciones reales de operación de los problemas de formación de espumas. Para ello, se ha realizado un seguimiento en un biorreactor de membrana sumergida a escala real, a lo largo de cuatro periodos experimentales (Verano 2009, Otoño 2009, Verano 2010 e Invierno 2012) conducidos bajo diferentes condiciones de operación, y se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de la estructura de la comunidad de Mycolata, monitorización de la dinámica de sus poblaciones totales y activas y su relación con las variables del sistema MBR, mediante fingerprinting con TGGE.
2. Cuantificación de la abundancia absoluta de las poblaciones totales y activas de Mycolata y su relación con las variables del sistema, mediante qPCR.
3. Estudio de la estructura de la comunidad fúngica, monitorización de la dinámica de sus poblaciones totales y activas y su relación con las variables del sistema, mediante fingerprinting con TGGE y pirosecuenciación 454.
4. Cuantificación de la abundancia absoluta de las poblaciones totales de hongos y su relación con las variables del sistema, mediante qPCR.

3. Materiales y Métodos.

3.1. Descripción de la planta experimental y condiciones de operación.

El MBR utilizado en el estudio se encuentra descrito en detalle en el apartado 1.12 del Capítulo de Introducción. La planta se ubica en la EDAR Sur (Churriana, Granada), siendo gestionada por la empresa EMASAGRA. El sistema se alimenta con agua residual obtenida de la salida del desarenador (pretratamiento), donde previamente a la

entrada a los biorreactores (BRs) atraviesa un tamiz de 1 mm, siguiendo las especificaciones del fabricante de los módulos de membrana. El sistema trabaja para eliminar materia orgánica y nitrógeno del agua residual mediante nitrificación-desnitrificación, siendo necesario para estos objetivos el empleo de dos BRs, uno aireado y otro anóxico.

La diversidad de bacterias filamentosas y hongos en el fango activo del MBR fue monitorizada a lo largo de cuatro fases experimentales: Verano 2009, Otoño 2009, Verano 2010 e Invierno 2012 (Sm09, Au09, Sm10, Wn12, respectivamente). En cada una de las fases de estudio el MBR operó con diferentes condiciones de tiempo de Retención Hidráulico (HRT) y tiempo de Retención Celular (SRT), además se registraron diferentes características del influente de agua residual y de la temperatura del fango activo (Capítulo 1, Fig. 1 y Tabla S1). A lo largo del estudio, se observaron dos episodios de formación de espumas, afectando principalmente al BR anóxico. El primer episodio tuvo lugar desde 26/11/2009 al 22/12/2009 (final del periodo Au09) y el segundo episodio se desarrolló desde el 7/02/2012 al 18/02/2012 (periodo Wn12).

3.2. Muestreo de fangos activos para los estudios de la diversidad de Mycolata y hongos.

Los muestreos en el MBR se realizaron en cada fase experimental una vez alcanzada la estabilidad del sistema (tres veces el SRT desde la puesta en marcha, Maza-Márquez *et al.*, 2015). De cada BR (aireado y anóxico) se recogieron muestras de fango activo (200ml) en recipientes de plástico estériles, siendo transportados desde la planta experimental hasta el laboratorio, y siendo conservados según protocolos anteriormente descritos (Gómez-Silván *et al.*, 2014a) hasta la extracción de los ácidos nucleicos.

3.3. Extracción y purificación de los ácidos nucleicos.

La extracción del DNA genómico (gDNA) y del RNA se realizó con el kit para suelos FastDNA[®] SPIN y FastRNA[®] PRO BLUE, mediante el equipo FastPrep[®]24-Instrument (MPBiomedicals, Santa Ana, CA, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El DNA extraído fue conservado a -20°C. El RNA extraído fue digerido mediante TURBO DNA-free[™] kit (Ambicon[®], Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) para eliminar el DNA contaminante y purificado mediante RNeasy Mini kit (Qiagen, Hamburg, Germany), y eluido en formamida (Chomczynski, 1992) para su conservación a -20°C.

3.4. Análisis TGGE.

El análisis *fingerprinting* de TGGE se realizó a partir de amplicones generados mediante PCR en dos pasos. Para la caracterización de la estructura de la comunidad de Mycolata se utilizó el primer específico de Mycolata F249 (de Azeredo *et al.*, 2006) y el universal R1378 (Heuer *et al.*, 1997). Para la caracterización de la estructura de la comunidad de hongos, se emplearon como marcadores moleculares el gen codificante del 18S rRNA utilizando el set de cebadores NS1 y Fung (Evans y Seviour, 2012) y la región intergénica ITS2 (White *et al.*, 1990), la cual incluye parte del gen 5.8 rRNA. Debido a la plasticidad que presenta la técnica TGGE, se pudieron estudiar tanto las poblaciones totales como las poblaciones más activas derivadas de la retrotranscripción del RNA ambiental a cDNA (RT-PCR).

La electroforesis en gel con gradiente de temperatura se realizó empleando el sistema TGGE MAXI (Watman-Biometra, Goettingen, Alemania). Para la separación de los distintos fragmentos, se emplearon geles desnaturalizantes de poliacrilamida. El gradiente de temperatura óptimo para la correcta separación de las bandas de Mycolata

fue de 43-63°C. El gradiente óptimo para la comunidad de hongos fue 25-45°C para el gen del 18S rRNA y 30-50°C para la región ITS2.

Los patrones de bandas obtenidos por TGGE fueron normalizados con el programa Gel Compar II v. 5.101 (Applied Maths, Bélgica). Para el análisis de clústeres, los patrones de bandas se compararon utilizando el coeficiente de Dice, estableciendo la similitud de los perfiles teniendo en cuenta la presencia/ausencia de las clases de bandas en las muestras (incidencia). Los dendrogramas que relacionan la similitud de los distintos perfiles de bandas de las muestras se construyeron mediante el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*, o Método de agrupamiento pareado no ponderado con media aritmética). A partir de la abundancia relativa de las clases de bandas en la normalización de los geles de TGGE, se calcularon diferentes índices descriptivos de la diversidad biológica: rango ponderado de riqueza (Rr), organización funcional (Fo), e índice de diversidad de Shannon (H') (Gómez-Silván *et al.*, 2014b; Marzorati *et al.*, 2008).

3.5. Reamplificación y secuenciación del DNA de las bandas separadas mediante de TGGE. Análisis filogenético.

El DNA de las bandas individuales visualizadas en los geles fue extraído con una punta de pipeta estéril y la porción obtenida fue resuspendida en 10 μ l de agua bidestilada grado PCR. Partiendo de estos fragmentos como molde, 3-5 μ l de esta resuspensión se utilizaron directamente para la reamplificación con los cebadores adecuados. Los productos de la amplificación se purificaron y se concentraron mediante el kit comercial "QIAquick PCR purification kit" (Quiagen, Hamburgo, Alemania). Los amplicones purificados fueron secuenciados mediante el equipo ABI-PRISM® 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Los datos de secuencias de todos los amplicones bacterianos y fúngicos fueron comparados con las secuencias indexadas en la base de datos GenBank del servidor web del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y los servidores de las bases de datos específicas de secuencias de hongos AFTOL (<http://aftol.org>) y UNITE (<https://unite.ut.ee>). El programa BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) fue utilizado para el análisis de similitud de las secuencias. Para los alineamientos de las secuencias, se empleó el programa Clustal X v.2.0.3 (Jeanmougin *et al.*, 1998). Las matrices de distancia entre las secuencias y la construcción de los árboles filogenéticos se realizó con el método Neighbour-Joining, mediante el software de libre distribución MEGA v.4 (Tamura *et al.*, 2007). Los valores de confianza se calcularon mediante el método de muestreo con reemplazamiento (método *Bootstrap*, Felsenstein, 1985), y los porcentajes superiores al 50% aparecen reflejados en los árboles filogenéticos correspondientes.

3.6. qPCR (PCR en tiempo Real).

La cuantificación de las poblaciones de Bacteria y Mycolata se realizó empleando como marcador molecular el gen codificante del 16S rRNA. Para la cuantificación de las poblaciones de hongos se utilizaron dos marcadores moleculares: el gen codificante del 18S rRNA y la región intergénica ITS2.

El número de copias de los genes 16S rRNA, 18S rRNA y de la región ITS2 fue cuantificado por qPCR usando TrueStart Hot Star DNA polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA USA) y SYBR Green I (Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA) en un volumen de 25 μ l, empleando el kit StepOnePlusTMReal-Time PCR (Applied Biosystems). Para la cuantificación absoluta de Bacterias, Mycolata y hongos, se construyeron curvas de calibración para cada uno de los genes diana. Para ello, se crearon amplicones mediante PCR con el fragmento diana para cada grupo a partir de

cepas de colección: *Pseudomonas putida* BCN 957 (cuantificación de Bacterias), *Mycobacterium phlei* DSM 43239 (cuantificación de Mycolata) y *Candida albicans* strain ATCC 10231 (cuantificación de hongos). Los productos de PCR se clonaron con la ayuda del sistema de Cloning® TOPO® TA (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Finalmente a los clones representantes de cada grupo se le calculó el nº de copias / μ l usando el programa online "Calculator for determining the number of copies of a template" (Jackson *et al.*, 2013).

3.7. Estudio de la diversidad fúngica en el MBR mediante pirosecuenciación 454.

El análisis mediante pirosecuenciación 454 fue realizado en una selección de 14 muestras de gDNA (430-480 ng/ μ l) extraído de los fangos activos de MBR, abarcando las cuatro fases experimentales. Las muestras se procesaron íntegramente en el centro Research and Testing Laboratory (<http://www.researchandtesting.com>, Lubbock, Texas, USA) con la plataforma 454 GS FLX+ (Roche, Branford, USA), siguiendo protocolos previamente estandarizados en dicho laboratorio.

3.7.1. Análisis bioinformático de los datos de pirosecuenciación.

Para el análisis informático de los datos de las secuencias brutas, se empleó la plataforma informática Mothur 1.33.3 (Schloss *et al.*, 2009, <http://www.mothur.org>). Se utilizaron una serie de comandos para el eliminar el ruido de las secuencias (sff.multiple, trim.flows, shhh.flows y trim.seqs) y a continuación, se desarrolló el procedimiento operativo estándar (SOP) para datos derivados de la plataforma 454. Las secuencias únicas se alinearon con las de la base de datos de referencia para secuencias eucariotas SSU Silva Reference, formateada para Mothur (SSURef v102, 15/02/2010, conteniendo 1238 secuencias). Las secuencias se agruparon en preclústeres con aquellas de mayor semejanza, con una diferencia máxima de 2 nt, y se clasificaron empleando el Clasificador Bayesiano Ingenuo (Naïve Bayesian classifier, Wang *et al.*, 2007) y Silva

SSURef Eukarya Taxonomy. Se calcularon las distancias genéticas y se definieron los filotipos (PHYs) mediante análisis de clústeres por el algoritmo UPGMA, generando una tabla del número de lecturas por cada PHY al 97% de similitud (*cut-off* = 3%), y escogiendo secuencias representativas de cada PHY.

Para aquellos PHY que no resultaron clasificados al 97% de similitud, se realizó una clasificación adicional empleando NCBI BLAST+ suite (Camacho *et al.*, 2009) a través de un servidor Linux remoto, comparando las secuencias con las depositadas en la NT Nucleotide Collection. Finalmente, las secuencias de los PHY que restaban por clasificar se enfrentaron a la base de datos GenBank en el servidor BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) del National Centre for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Todas aquellas secuencias con nivel de similitud $\geq 90\%$ con secuencias de hongos a nivel de género/especie se agregaron a la lista efectiva de PHYs, siguiendo los criterios de porcentaje mínimo de similitud de Lanzén *et al.* (2012) para asignarlos a taxones (97% para género, 95% para familia, 90% para orden). A partir de la tabla con la lista efectiva de PHYs, se aplicó un filtro adicional eliminando aquellos detectados en una sola muestra y con una sola lectura. Posteriormente, se excluyeron todas las PHYs cuya secuencia no fue asignada al Reino Fungi mediante ninguno de los métodos de clasificación aplicados, y se calculó el número resultante de lecturas totales por muestra. Para realizar una comparación adecuada de la diversidad de las distintas muestras analizadas, se normalizaron los tamaños de muestra al de aquella con menor número de lecturas de secuencias fúngicas.

El programa informático PAST v. 3.06 (Hammer *et al.*, 2006) se empleó para la construcción de las curvas de rarefacción y el cálculos de los índices de diversidad Chao-1 (Chao, 1984), Shannon-Weaver (Shannon and Weaver, 1963), Simpson (Simpson, 1949) e índice de equidad de Pielou (*Pielou's evenness*, Pielou, 1966). Para

todos los índices se calculó el intervalo de confianza al 95% mediante el método de muestreo con reemplazamiento (*bootstrap*).

Por último, se calcularon los coeficientes de similitud de Bray-Curtis entre las muestras a partir de los datos de abundancia relativa de las PHYs en las mismas, empleando el programa informático PRIMER-E v. 6.0, (Plymouth, UK). Este programa se utilizó también para construir los dendrogramas correspondientes mediante el algoritmo UPGMA. A partir de la matriz de similitud entre muestras determinada con el coeficiente de Bray Curtis, se realizó un análisis SIMPER (*similarity percentages analysis* o análisis de porcentajes de similitud), que determina cuál es la contribución de cada filotipo a la divergencia observada entre los distintos pares de muestras (Clarke y Warwick, 2001).

3.8. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el paquete IBM SPSS Statistics v.19 (SPSS INC., USA), utilizando el test no paramétrico de prueba de rangos de Wilcoxon para muestras relacionadas. El nivel de significancia establecido fue 95% ($p < 0,05$).

El software Primer (PRIMER-E, v. 6.0, Plymouth, UK) fue utilizado para el análisis de los datos biológicos generados a partir de los perfiles de TGGE, pirosecuenciación 454 y qPCR. Para la ordenación biológica, se crearon matrices de similitud entre muestras, basadas en el coeficiente Bray Curtis. También se realizó un análisis ANOSIM, que midió las diferencias entre los distintos agrupamientos posibles de las muestras. Se calcularon correlaciones de rangos de Spearman (ρ_s) entre la ordenación de los datos biológicos y los factores ambientales y operacionales. Estas correlaciones aparecen representadas en los gráficos como vectores. El análisis BIO-ENV (análisis biota-entorno, Clarke y Warwick, 2001) permitió relacionar la distribución de los datos biológicos derivados del estudio de *fingerprinting* o

pirosecuenciación 454 con el set de variables del sistema (ambientales y operacionales). BIO-ENV calcula la correlación entre la matriz de similitud de datos biológicos (creada con el coeficiente de Bray Curtis) y las matrices de similitud derivadas de la combinación secuencial de las variables del sistema (creada a partir de la distancia Euclídea). El mayor coeficiente obtenido a partir de todas las combinaciones posibles de variables (análisis BEST) indica el conjunto de las mismas que mejor explica la ordenación biológica.

4. Resultados y Discusión.

4.1. Estudio de las variables ambientales en el MBR.

La Fig. 1 del Capítulo 1 muestra el diagrama de cajas (Box y Whisker plots) de las variables monitorizadas en el sistema MBR a lo largo de las cuatro fases experimentales (Sm09, Au09, Sm10 y Wn12). Según el test de Wilcoxon, hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) a lo largo de todas las fases y para todas las variables. Como era esperable, la temperatura del sistema (IT) experimentó fuertes fluctuaciones, debido a que las fases experimentales se desarrollaron en diferentes periodos estacionales. La media de IT fue significativamente mayor durante las dos fases que tuvieron lugar en verano (Sm09 y Sm10), mientras que el valor medio más bajo se registró en Wn12. Sm10 estuvo caracterizado por un valor de pH significativamente más bajo y los niveles más altos de contaminación en el influente (COD, DBO₅ y sólidos en suspensión), mientras la ratio F/M fue significativamente menor en el periodo Au09. En cuanto a la evolución de la concentración de biomasa en el BRs, también se encontraron diferencias significativas entre las fases experimentales, mientras que los valores medios de los sólidos suspendidos en los BRs aireado y anóxico fueron similares dentro de cada fase. Los sólidos en suspensión medidos en el fango activo fueron particularmente altos en el periodo Sm10.

4.2. Relación entre la dinámica de las poblaciones de Mycolata y las variables ambientales y operacionales del MBR.

El análisis de clústeres (Capítulo 1, Fig. 2) de los perfiles de TGGE de la comunidad de Mycolata reveló una similitud inferior al 50% entre los perfiles de bandas. El análisis ANOSIM indicó diferencias significativas entre los perfiles generados a partir de distintos ácidos nucleicos y entre los 4 periodos de estudio. La comunidad de Mycolata no mostró diferencias entre BRs, mostrando similar estructura bajo las diferentes condiciones de aireación. Las muestras correspondientes a las fechas en las que el MBR experimentó formación de espumas en los periodos Au09 y Wn12 tendieron a agruparse en subclústeres individuales.

Los índices de diversidad R_r , D_y , H' y F_o (Capítulo 1, Fig. 3) describieron una comunidad con una riqueza media-alta, organización funcional media y una dinámica media-baja (Marzorati *et al.*, 2008). La dinámica en el periodo Au09 experimentó cambios en el BR anóxico durante las 5 últimas semanas, coincidiendo con el episodio de espuma. Estos índices definen una comunidad con capacidad de mantener su funcionalidad en el MBR y conseguir adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes (Marzorati *et al.*, 2008).

El análisis de los perfiles de TGGE detectó un total de 39 clases de bandas, de las que se lograron reamplificar y secuenciar 27 clases de bandas (69% del total). Todos los filotipos fueron relacionadas con 4 géneros diferentes de Mycolata (*Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Segniliparus*) (Capítulo 1, Fig. 4). Se encontraron filotipos relacionados con especies de *Mycobacterium* de rápido y lento crecimiento. Además, numerosos filotipos estuvieron filogenéticamente relacionados con especies de *G. amarae*, *G. polyisoprenivorans*, *G. defluvii*, *R. erythropolis* y *R. coprophilus* encontradas en los sistemas de tratamiento de agua residual y relacionados con

problemas de formación de espumas (de los Reyes, 2010; Guo y Zhang, 2012). El *heatmap* mostró la evolución longitudinal de la abundancia relativa a lo largo de las fases experimentales (Capítulo 1, Fig. 5), encontrando 9 filotipos con una alta incidencia (encontradas > 65% del total de las muestras), encontrando notables cambios de su abundancia relativa en los diferentes periodos. Estos filotipos estuvieron relacionados con los géneros *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Segniliparus*, indicando que la alta abundancia relativa se equilibra entre estos 4 géneros, estos resultados sugieren que pueden cumplir importantes funciones en la comunidad del MBR.

El análisis BIO-ENV (Capítulo 1, Fig. 6) reveló que la ordenación de las muestras en función de la distribución de las poblaciones totales de Mycolata fue explicada por un 30% por las variables BOD₅ y VSS, mientras que en el caso de las poblaciones activas los factores que aportaron mayor nivel de explicación fueron iTSS y VSS (32%). Las variables que tuvieron mayor influencia en ambas ordenaciones estuvieron relacionadas con la entrada de nutrientes en el influente y la acumulación de biomasa en los BRs.

Este trabajo pone de manifiesto una clara relación entre la dinámica de las poblaciones de Mycolata y las variables del MBR, convirtiéndose en una valiosa información para la predicción de la abundancia y actividad de los diferentes filotipos de Mycolata bajo condiciones cambiantes. Los filotipos relacionados con *Gordonia amarae* fueron favorecidos principalmente por bajas concentraciones de DBO₅, iTSS y VSS, y por el aumento de temperatura. Este resultado está en concordancia con el estudio de Asvapathanagul *et al.* (2012) que señala a la disminución de BOD₅ como factor desencadenante de la proliferación de *G. amarae* en WWTPs. Por el contrario, la

actividad de los filotipos relacionados con *Mycobacterium/Rhodococcus* fue favorecida por la carga contaminante del influente, la acumulación de biomasa y baja temperatura.

Las muestras tomadas en el MBR durante los episodios de formación de espumas tendieron a formar clústeres separados en la ordenación, estando positivamente correlacionadas con el incremento de los tres factores que mejor explicaron el sistema (BOD_5 , iTSS y VSS) y negativamente con IT. Estos episodios estuvieron relacionados con un incremento de la abundancia relativa de filotipos activos de *Rhodococcus* y *Mycobacterium* (Capítulo 1, Figs. 5 y 6). La influencia de la temperatura sobre los episodios de formación de espumas ha sido ampliamente estudiada en estudios anteriores. En nuestro trabajo, los dos episodios de formación de espumas fueron observados en Au09 y Wn12, cuando la IT < 20°C. La temperatura parece influir en la proliferación de determinadas especies de Mycolata, así, la proliferación de la especie *G. amarae* ha sido relacionada con temperaturas elevadas (23- 37°C) (de los Reyes y Raskin, 2002; Asvapathanagul *et al.*, 2012). A temperaturas más bajas las especies que se relacionan con los episodios de formación de espumas son diferentes a *Gordonia amarae* (de los Reyes, 2010; de los Reyes y Raskin, 2002).

Las conclusiones derivadas de esta investigación son de relevancia para la predicción y el control de la formación de espumas en WWTPs. La relación entre la dinámica de las poblaciones de Mycolata y las variables ambientales y operacionales es fundamental para entender la ecología e importancia de estos microorganismos en los sistemas de tratamiento de agua residual. Sin embargo, hasta la fecha existen pocos estudios publicados que aborden este tema (Asvapathanagul *et al.*, 2012; de los Reyes y Rasking, 2002; Parada-Albarracín *et al.*, 2012).

4.3. La ratio poblaciones metabólicamente activas/poblaciones totales de Mycolata desencadena la formación de espumas en el MBR.

En el Capítulo 2 se lleva a cabo la cuantificación absoluta de las poblaciones totales y activas de Mycolata en muestras del MBR a lo largo de las cuatro fases experimentales, mediante qPCR. La cuantificación absoluta de la abundancia de Mycolata reveló ratios elevadas de poblaciones metabólicamente activas con respecto a las poblaciones totales en las muestras tomadas durante los dos episodios de formación de espumas (Capítulo 2, Fig. 1). Es la primera vez que se describe que esta ratio es un parámetro clave para desencadenar la formación de espumas en MBRs. El incremento de células metabólicamente activas se detectó 5 semanas antes de que se observase la formación de espumas (Capítulo 2, Fig. 1B), convirtiéndose por tanto en una potente herramienta de predicción. Un resultado similar fue encontrado en el estudio de Asvapathanagul *et al.* (2012), quien sugirió que la formación de espumas estuvo relacionada con un rápido incremento de la abundancia de *Gordonia*, detectado con 40 días de antelación.

Davenport *et al.* (2000), empleando FISH cuantitativo, propusieron un valor umbral de 2×10^9 células/L de Mycolata a partir del cual se producían las espumas. Sin embargo, en el presente estudio, basado en qPCR, este valor umbral fue excedido en todas las fases experimentales, con independencia de los episodios de *foaming*. Además, los niveles más elevados de Mycolata totales se registraron en el periodo Sm10, donde no se observó formación de espumas. La validez de este valor umbral ya fue cuestionada por Petrovsky *et al.* (2011). Los resultados aquí descritos indican que la formación de espumas está provocada por una alta proporción de poblaciones activas versus poblaciones totales de Mycolata, y no por un valor umbral de éstas como se ha descrito en trabajos previos (Davenport *et al.*, 2008).

La comunidad de Mycolata representó una pequeña fracción del total de Bacterias en el MBR (0,2-1,2% de las copias de 16S rDNA, Capítulo 2, Fig. 2). Se detectó una mayor abundancia relativa entre las poblaciones totales (0,60% de copias de rDNA) que entre las poblaciones activas de Mycolata (0,35% de copias de rRNA). Estos resultados están en concordancia con previos estudios (de los Reyes 2010a; Nielsen *et al.*, 2009), donde se ha documentado que en los sistemas de fango activo existe una alta proporción de células de Mycolata con baja tasa metabólica. Sin embargo, en nuestro estudio esta tendencia se invirtió en los periodos Au09 y Wn12, coincidiendo con la formación de espumas.

Según los resultados del MDS y análisis BIO-ENV, las ratios elevadas de poblaciones metabólicamente activas/poblaciones totales de Mycolata que se observan en las muestras tomadas cuando se produjeron episodios de *foaming* se vieron favorecidas por pH mas altos, mayor concentración de sustratos en el agua influente (BOD₅, COD, iTSS), ratios F/M más altas, temperaturas más bajas y SRT más cortos (Capítulo 2, Fig. 4B). Es destacable el hecho de que muchos de estos parámetros (BOD₅, COD, iTSS, IT) tuvieron la misma influencia direccional sobre la estructuración de las comunidades de Mycolata que condujo a los episodios de foaming (Capítulo 1, Maza-Márquez *et al.*, 2015).

La influencia de la temperatura sobre los episodios de formación de espumas ha sido ampliamente estudiada por otros autores. En el presente estudio, se observa que las temperaturas (IT) altas favorecen la abundancia de poblaciones totales de Mycolata (incluyendo a *G. amarae*, Capítulo 1), pero al mismo tiempo influyen negativamente la ratio de poblaciones activas/poblaciones totales, y en esas condiciones no se observa formación de espuma (Capítulo 2, Fig. 3A). Por otro lado, numerosos estudios han evaluado y discutido la influencia de los SRTs prolongados en la formación de

espumas, sin embargo no se ha logrado aún establecer una relación consistente con este parámetro (Blackall *et al.*, 1991; Dhaliwal, 1979; Oether *et al.*, 2001; Parada-Albarracín *et al.*, 2012). Los resultados de nuestro estudio aportan un nuevo ángulo a las teorías propuestas, ya que los SRT prolongados se correlacionan con una mayor abundancia de poblaciones totales de Mycolata, al mismo tiempo que reducen la fracción metabólicamente activa de las mismas. Estos resultados corroboran los de estudios anteriores, que destacan la importancia de los parámetros de operación SRT y F/M en el control de la formación de espumas.

4.4. Estudio de la diversidad y dinámica de poblaciones de hongos en un biorreactor de membrana sumergida (MBR) mediante *fingerprinting* y pirosecuenciación 454: Influencia de las variables de operación y ambientales.

Tanto mediante el *fingerprinting* con TGGE como con la pirosecuenciación 454, el análisis de clústeres (Capítulo 3, Figs. 2 y 8) reveló una baja estabilidad de la estructura de la comunidad fúngica en el MBR. El análisis ANOSIM reveló diferencias significativas entre los perfiles de la comunidad de las muestras pertenecientes a los 4 periodos de estudio, pero no entre BRs.

El análisis de los índices descriptivos de la diversidad (Capítulo 3, Fig. 3 y Tabla 5) permite un mejor conocimiento de la ecología de la comunidad de hongos. Con ambas aproximaciones metodológicas, estos índices describen una comunidad formada con bajo número de especies, capaz de mantener su funcionalidad en el sistema y con un perfil flexible de adaptación a las condiciones ambientales y operacionales cambiantes.

La comparación entre la estructura de la comunidad fúngica en las distintas muestras analizadas representada en forma de *heatmap* (Capítulo 3, Figs. 4, 5, 9 y 10) y el análisis BIO-ENV (Capítulo 3, Figs. 6 y 11) revelaron una alternancia de los filotipos dominantes de la comunidad según las condiciones ambientales y operacionales. Estos

resultados son acordes con los de estudios previos en plantas basadas en otras tecnologías, que indican que la composición de la comunidad de hongos parece verse influenciada por la naturaleza del agua residual, el tipo de configuración del sistema, las condiciones de operación y las variables ambientales, de manera que prevalecen ciertas especies según sus capacidades metabólicas (Yang *et al.*, 2013).

El análisis BIO-ENV reveló que el pH fue la variable que aportó mayor nivel de explicación de la estructura de la comunidad fúngica, tanto analizada mediante *fingerprinting* como por pirosecuenciación 454, aunque también se observaron correlaciones fuertes con otras variables ambientales y operacionales (Capítulo 3, Figs. 6 y 11).

La presencia de hongos en este tipo de sistemas se ha considerado poco relevante, ya que numéricamente son poco dominantes, y se asociaba su presencia con una entrada accidental desde el aire o el suelo, como consecuencia de la sedimentación o el arrastre producido por la lluvia (Cooke, 1970). Sin embargo, los estudios de *fingerprinting* llevados a cabo en los últimos años muestran que la comunidad de hongos en sistemas de depuración es mucho más diversa (Evans y Seviour, 2012; Yang *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo confirman que los hongos se encuentran presentes y son activos en los sistemas MBR, posiblemente cumpliendo importantes funciones en estos sistemas de depuración. Los Phyla dominantes de la comunidad en ambas metodologías fueron *Ascomycota* y *Chytridicomycota*. El estudio de pirosecuenciación 454, al ser una herramienta de mayor resolución que la secuenciación de bandas separadas por medio de la técnica de *fingerprinting* TGGE, mejoró la caracterización de la comunidad de hongos. Esta técnica detectó un total de 284 PHYs pertenecientes a 9 Phyla/Subphyla, encontrando 4 Phyla más que el estudio de TGGE. Entre los miembros de la comunidad de hongos encontramos varias clases de bandas o

PHYs relacionadas filogenéticamente con *Candida*, *Geotrichum*, *Saccharomyces* y *Trichosporon* conocidas por producir diferentes enzimas extracelulares (Chi *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2013), siendo capaces de metabolizar compuestos aromáticos y transformar metales pesados, convirtiéndose en microorganismos con un gran potencial biotecnológico para la degradación de sustancias aromáticas en procesos de biorremediación (Kurtzman *et al.*, 2011). Entre los géneros identificados en el fango activo del MBR, hay varios hongos filamentosos (*Geotrichum*, *Phoma*, *Pilobolus*, *Trichosporon*, *Syncephalastrum*, *Urocystis*) que podrían cumplir papeles relevantes en la formación de agregados celulares o influir en problemas de operación. Estos resultados ponen de manifiesto la variedad y posiblemente el gran potencial de otros hongos que queda todavía por explorar.

En nuestro estudio, detectamos ciertos cambios en la composición de la comunidad de hongos cuando el MBR experimentó episodios de formación de espumas (Capítulo 3, Figs. 6 y 11). En el análisis MDS basado en los datos de *fingerprinting* a partir de la secuencia del gen del 18S rRNA, las muestras tomadas en las fechas próximas a los episodios de generación de espumas tendieron a formar clústeres separados en la ordenación (Fig. 6). En los análisis MDS basados tanto en estos datos de *fingerprinting* como en los datos del estudio de pirosecuenciación 454, se observa que la abundancia relativa de filotipos de la Clase *Saccharomycetes* se incrementa en la dirección de dichas muestras en la ordenación (Capítulo 3, Figs. 6 y 11).

4.5. Cuantificación absoluta de las poblaciones de hongos en el MBR y relación con las variables ambientales y operacionales.

La abundancia absoluta de las poblaciones de hongos fue determinada en el MBR mediante qPCR, usando dos marcadores moleculares: el gen 18S rDNA y la región intergénica ITS2. La dinámica de la abundancia de hongos a lo largo de las fases

experimentales siguió un patrón bastante similar con ambos marcadores. Sin embargo, el promedio de la abundancia absoluta de copias de la región ITS2 fue 2 unidades logarítmicas mayor que para el gen 18S rDNA. La media del número de copias para la región intergénica ITS2 se mantuvo en el rango de 10^7 - 10^8 copias rDNA/L en los cuatro periodos experimentales, mientras que el número de copias para el gen 18S rDNA estuvo en el rango de 10^6 copias rDNA/L en todas las fases (Capítulo 4, Fig. 2A, B). Estas diferencias son debidas al sesgo introducido por la variabilidad intrínseca de la especificidad y la cobertura de los conjuntos de cebadores dirigidos a diferentes regiones del operón rRNA (Bellemain *et al.*, 2010; Bokulik y Mills, 2013; Prévost-Bouré *et al.*, 2010). Las secuencias de las regiones ITS presentan mayor variabilidad que las de los genes codificantes de los rRNAs y permiten el diseño de cebadores más específicos, aunque presentan otros inconvenientes, como el polimorfismo de su longitud. Esto provoca la amplificación preferencial de las secuencias más cortas, viéndose favorecidos grupos de *Ascomycota* contra *Basidiomycota* (Bellemain *et al.*, 2010). Al contrario, la secuencia del gen 18S rDNA tiene bajo polimorfismo pero la cobertura de los cebadores empleados es inferior al 70% para algunos taxones de hongos (Liu *et al.*, 2012). Entre estos taxones se incluyen *Chytridiomycota* y *Mucoromycotina*, descritos por estar presentes en la microbiota del WWTPs (Evans y Seviour, 2012). Además, el estudio de diversidad de hongos realizado mediante *fingerprinting* y pirosecuenciación 454 (Capítulo 3), reveló la presencia de filotipos relacionados con *Ascomycota* y *Chytridiomycota*.

Se determinó que las poblaciones de hongos constituyeron una fracción numéricamente importante de la microbiota total del fango activo del MBR (Capítulo 4, Fig. 3), siendo la abundancia de las mismas de 4 a 7 órdenes de magnitud inferior que la abundancia de las Bacterias. La caracterización de esta comunidad por medio de

técnicas moleculares constituye una novedad, ya que actualmente en la literatura no existe información disponible sobre la cuantificación por qPCR de poblaciones de hongos. Los pocos estudios existentes de la abundancia de hongos se han basado en métodos dependientes de cultivo (Kacprzak *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2011; Liébana *et al.*, 2015). Estos estudios han proporcionado estimaciones inferiores a las encontradas en este estudio (del orden de 10^4 CFU/L fango activo).

Los episodios de formación de espumas coincidieron con una disminución de la abundancia tanto absoluta como relativa de las poblaciones de hongos (Capítulo 4, Fig. 2 y 3). En el estudio de diversidad realizado con anterioridad, se encontraron cambios significativos de la estructura de la comunidad de hongos también en relación con los episodios de formación de espumas (Capítulo 3, apartado 3.1).

El MDS y el análisis BIO-ENV revelaron fuertes relaciones entre la abundancia de los hongos en el sistema y varias variables (IT, iTTS, BOD₅ y VSS) para los dos marcadores moleculares empleados (Capítulo 4, Tabla S2). La abundancia fue positivamente correlacionada con la IT, mientras que esta correlación fue negativa para las variables iTTS, BOD₅ y VSS. En este estudio, la temperatura media del MBR en los periodos Sm09 y Sm10 estuvo en el rango de crecimiento óptimo para los hongos, coincidiendo con la mayor abundancia. La temperatura influye en la tasa de crecimiento, actividades enzimáticas y la permeabilidad celular de los microorganismos, incluyendo hongos (Moore-Landecker, 1990).

La disponibilidad de sustratos en el influente (BOD₅) y la acumulación de biomasa en los biorreactores (VSS) se correlacionaron negativamente con la abundancia de hongos (Capítulo 4, Fig. 4). Una menor entrada de compuestos C fácilmente biodegradables en el influente puede favorecer el crecimiento de los hongos, ya que a menudo son capaces de degradar polímeros complejos recalcitrantes. Estos

microorganismos se verán favorecidos competitivamente debido a que las bacterias no pueden utilizar estas fuentes de C (Kinsey *et al.*, 2003). En cuanto a la acumulación de la biomasa en los biorreactores (VSS), la tecnología MBR se basa en la retención de sólidos, permitiendo la acumulación de biomasa en el sistema y al mismo tiempo limitando la disponibilidad de sustratos de carbono, lo que conduce a una reducción de las actividades metabólicas microbianas y las tasas de crecimiento de heterótrofos (Gómez-Silván *et al.*, 2014).

El análisis BEST reveló que el nivel de explicación para la región ITS2 fue menor que para el gen 18S rDNA. También se encontró una divergencia de la influencia direccional de varias variables (SRT, F/M y pH) dependiendo del marcador molecular (Capítulo 4, Tabla S2). Debido a estas diferencias, las variables que mejor explicaron el sistema fueron diferentes dependiendo del marcador. Para el gen 18S rDNA fue la IT, mientras que para la región ITS fue el SRT (Capítulo 4, Fig. 4).

Index of Figures and Tables- Índice de Figuras y Tablas

Introduction-Introducción

- Figura 1. Esquema simplificado del BRM (planta de tratamiento a escala piloto) que se empleará en la investigación. 44
- Figura 2. Imágenes del MBR experimental. 46
- Figura 3. Espumas producidas por exceso de crecimiento de microorganismos filamentosos en el MBR estudiado. (A) Problemas operacionales de rebose del biorreactor anóxico por la formación de espuma. (B) Detalle de las espumas generadas. 47

Chapter 1-Capítulo 1

- Figure 1. Box-and-Whisker plots for the environmental variables throughout the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. Average values \pm standard deviations are shown below the boxes. Data followed by the same lower-case letter do not significantly differ, according to the Wilcoxon signed-rank test (0.05). 68
- Figure 2. gDNA- and cDNA-based TGGE fingerprinting analyses of the Mycolata communities in the full-scale membrane bioreactor (MBR) throughout the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. The clustering is based in the Dice coefficient of similarity. A, samples from the aerated bioreactor; X, samples from the anoxic bioreactor. 69
- Figure 3. Indices of diversity describing the Mycolata community in the gDNA- and cDNA-based TGGE fingerprints of the full-scale membrane bioreactor (MBR) throughout the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. Average values \pm standard deviations of all indices are shown. 72
- Figure 4. Neighbor-Joining phylogenetic tree showing the affiliations of 27 TGGE band-classes, based on ca. 140 nt length sequences of the V3 region of the 16S rRNA gene. 75
- Figure 5. Heatmap showing the longitudinal evolution of the relative abundances and % of incidence of the band-classes detected in the gDNA and cDNA-based TGGE fingerprints of activated sludge samples collected in the MBR throughout the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases. 76
- Figure 6. Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots illustrating the distributions of the sludge samples of the full-scale membrane bioreactor (MBR) throughout the Sm09, Au09, Sm10 and Wn12 experimental phases according to the relative similarity of their gDNA or cDNA-based fingerprints, based in the relative abundance of all the band-classes detected by TGGE. 79

Figure S1	Diagram of the full-scale membrane-bioreactor (MBR) used in the study.	87
Table S1	Operation parameters and efficiency of organic matter removal in the MBR throughout the four experimental phases analyzed in the study.	88
Table S2	Pearson product-moment correlation coefficients (r) between the vectors in Fig.6 representing the operating and environmental variables and the relative abundance of TGGE band-classes or the diversity indices.	89

Chapter 2-Capítulo 2

Figure 1.	(A) Numbers of copies of 16S rDNA and rRNA of Bacteria, per L of activated sludge, quantified by qPCR in the full-scale membrane bioreactor (MBR).(B) Numbers of copies of 16S rDNA and rRNA of Mycolata, per L of activated sludge, quantified by qPCR in the full-scale membrane bioreactor (MBR). (C) 16S rRNA/rDNA ratios of Bacteria. (D) 16S rRNA/rDNA ratios of Mycolata. (E) Average and standard deviation of the numbers of copies of 16S rDNA and 16S rRNA of Bacteria and Mycolata quantified in the MBR, expressed per L of activated sludge.	102
Figure 2.	(A) Relative abundance of Mycolata, expressed as percentage of total Bacteria, based on 16S rDNA and 16S rRNA measurements in samples of the full-scale membrane bioreactor (MBR). (B) Average and standard deviation of the relative abundance of 16S rDNA and rRNA of Mycolata versus Bacteria.	105
Figure 3.	Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots illustrating the distributions of the activated sludge samples retrieved from the full-scale membrane bioreactor (MBR) according to the relative similarity of their 16S rDNA (A) or 16S rRNA-based (B) quantifications. Bubbles of increasing size were superimposed over the plots, representing the values of absolute abundance of total or active Mycolata in each sample. The variables which best explained the distribution of the biological data according to the BIO-ENV analyses are marked with an asterisk (*).	108
Figure 4.	Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots illustrating the distributions of the activated sludge samples retrieved from the full-scale membrane bioreactor (MBR) according to the relative similarity of their 16S rRNA/rDNA ratios of Bacteria (A) and Mycolata (B). Bubbles of increasing size were superimposed over the plots, representing the values of the ratios in each sample. The variables which best explained the distribution of the biological data according to the BIO-ENV analyses are marked with an asterisk (*).	109

Table 1	Primers used for the quantification of total and active populations of Bacteria and Mycolata in the MBR samples.	97
Table 2	qPCR cycling conditions used for the quantification of the abundance of total and active populations of Bacteria and Mycolata in the MBR samples.	97
Table S2	Average and standard deviation of the numbers of copies of 16S rDNA and rRNA of bacteria (A) and Mycolata (B) per L of activated sludge quantified in the aerated and anoxic bioreactors of the MBR.	114

Chapter 3-Capítulo 3

Figura 1.	Localización de los cebadores empleados para la amplificación de la secuencia parcial del gen 18S rRNA y la región ITS2 de hongos. El mapa se ha generado empleando como base la secuencia del locus RDN37-1 del cromosoma XII de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cepa S288C.	123
Figura 2.	<i>Fingerprinting</i> de la comunidad de hongos para los dos marcadores moleculares a lo largo de las 4 fases experimentales (Sm09, Au09, Sm10, Wn12) (A) Perfil de TGGE basado en la región ITS2 amplificada a partir de gDNA. (B) Perfil de TGGE basado en la amplificación parcial del gen codificante del 18S rRNA a partir de gDNA y cDNA. La comparación se ha realizado mediante el coeficiente de similitud de Dice.	134
Figura 3.	Índices descriptivos (Rr: rango ponderado de riqueza; Fo: organización funcional; <i>H'</i> : diversidad de Shannon) de la diversidad de la comunidad de hongos obtenidos a partir de los perfiles de TGGE del MBR de ambos biorreactores (A: aireado; X: anóxico) y a lo largo de las 4 fases experimentales. (A) Índices descriptivos basados en los perfiles de TGGE de la región ITS2 amplificada a partir de gDNA. (B) Índices descriptivos basados en los perfiles de TGGE del gen parcial 18S rRNA amplificado a partir de gDNA y cDNA.	140
Figura 4.	<i>Heatmap</i> mostrando la evolución longitudinal de la abundancia relativa de cada clase de banda detectada en los perfiles de TGGE de la comunidad de hongos en el MBR, basados en la secuencia de la región ITS2, así como el porcentaje de incidencia en las muestras de cada periodo experimental analizado en el MBR.	143
Figura 5.	<i>Heatmap</i> mostrando la evolución longitudinal de la abundancia relativa de las 14 clases de bandas representantes de poblaciones de hongos detectadas en los perfiles de TGGE de la comunidad del MBR, basados en la secuencia parcial del gen del 18S rRNA, así como el porcentaje de incidencia en las muestras de cada periodo experimental analizado en el MBR	146

Figura 6.	Escalado multidimensional no métrico (MDS) mostrando la distribución de las muestras de fango activo del MBR, según la abundancia relativa de las clases de bandas detectadas en los perfiles de TGGE para la región ITS2 y el gen 18S rRNA fúngicos en ambos biorreactores del MBR y a lo largo de las cuatro fases experimentales (Sm09, Au09, Sm10, Wn12).	152
Figura 7.	Curvas de rarefacción de las muestras analizadas. Se ha utilizado el número de filotipos (PHYs) asignado tras aplicar todos los filtros y el número de secuencias normalizadas.	160
Figura 8.	Dendrograma representando la similitud de la diversidad de la comunidad fúngica en las muestras tomadas de los biorreactores aireado (A) y anóxico (X) del MBR en distintas fechas, abarcando los cuatro periodos de estudio (Sm09, Au09, Sm10, Wn12). El análisis de clústeres se basa en la matriz de distancias de Bray-Curtis, generada a partir de los datos de abundancia relativa de las PHYs identificadas mediante pirosecuenciación 454 en las muestras.	163
Figura 9.	Abundancia relativa acumulada de los filotipos detectados por pirosecuenciación 454 en el MBR clasificados a nivel de Phyla/Subphyla en las muestras de los cuatro periodos experimentales (Sm09, Au09, Sm10, Wn12), representada en forma de <i>heatmap</i> (A) y gráfico de barras (B).	168
Figura 10	Abundancia relativa acumulada de los filotipos detectados por pirosecuenciación 454 en el MBR clasificados a nivel de Clase (A) y Orden (B) en las muestras de los cuatro periodos experimentales (Sm09, Au09, Sm10, Wn12), representada en forma de <i>heatmap</i> .	169
Figura 11	Escalado multidimensional no métrico (MDS) mostrando la distribución de las muestras de fango activo en los dos biorreactores (aireado y anóxico) del MBR a lo largo de las cuatro fases experimentales (Sm09, Au09, Sm10, Wn12), basada en la abundancia relativa de los taxones fúngicos detectados mediante el estudio de pirosecuenciación 454.	173
Figura 12	Escalado multidimensional no métrico (MDS) mostrando la abundancia relativa de los filotipos clasificados en los taxones fúngicos dominantes en el MBR en ambos biorreactores (aireado y anóxico) y a lo largo de las cuatro fases experimentales.	178
Tabla 1.	Clasificación de los filotipos representados por las 14 clases de banda detectadas en los perfiles de TGGE de la comunidad de hongos en el MBR, basados en la secuencia de la región ITS2.	142
Tabla 2.	Clasificación de los filotipos representados por las 14 clases de banda detectadas en los perfiles de TGGE de la comunidad de hongos en el MBR, basados en la secuencia parcial del gen 16S rRNA.	144

Tabla 3.	Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre los vectores de la Fig. 6 que representan los índices de diversidad y las variables ambientales y operacionales.	154
Tabla 4.	Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre los vectores de la Fig. 6 que representan la abundancia relativa de las clases de bandas del TGGE y las variables ambientales y operacionales.	156
Tabla 5.	Número de lecturas y filotipos (PHYs) por muestra, número de PHYs con una sola lectura en cada muestra, porcentaje de cobertura de Good, índices de diversidad Chao-1, Shannon-Wiener (H'), Simpson e índice de equidad de Pielou, calculados a partir de los datos de pirosecuenciación 454 de la comunidad de hongos en el MBR. IC: intervalos de confianza al 95%.	161
Tabla 6.	Filotipos que definen principalmente la similitud de la comunidad fúngica en las muestras de fango activo del MBR, según el análisis SIMPER.	163
Tabla 7.	Filotipos que definen principalmente la similitud de la comunidad fúngica en las muestras de fango activo del MBR en cada una de las 4 fases experimentales, según el análisis SIMPER.	164
Tabla 8.	Filotipos que definen principalmente las divergencias de la comunidad fúngica en las muestras de fango activo del MBR entre las 4 fases experimentales, según el análisis SIMPER. Sólo se han incluido en la tabla los filotipos con una contribución $\geq 5\%$.	165
Tabla 9.	Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre los vectores de la Fig. 9 que representan la abundancia relativa de los diferentes taxones de hongos detectados por secuenciación 454 en el MBR y las variables ambientales y operacionales.	175

Chapter 4-Capítulo 4

Figure 1.	Location of the primers used for the quantification of Fungi in the MBR samples by qPCR of the partial 18S rRNA gene and the ITS2 region. The map was constructed based on the sequence of locus RDN37-1 of the chromosome XII of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain S288C.	190
Figure 2.	(A) Number of copies per L of activated sludge of ITS rDNA of fungi, quantified by qPCR in the full-scale membrane bioreactor (MBR). (B) Number of copies per L of activated sludge of 18S rDNA of fungi, quantified by qPCR in the full-scale membrane bioreactor (MBR). (C) Average and standard deviation of the number of copies of ITS rDNA per L of activated sludge in each experimental phase. (D) Average and standard deviation of the number of copies of 18S rDNA per L of activated sludge in each experimental phase. Data with the same lower-case letter do not significantly differ according to the Wilcoxon signed -rank test ($p < 0.05$).	194

Figure 3.	Bacteria/Fungi relative abundance ratios in the full-scale membrane bioreactor (MBR) (A) 16S rDNA/ITS rDNA ratios (B) 18S rDNA ratios (C) Averages and standard deviations of the 16S rDNA/ITS rDNA ratios in each experimental phase. (D) Averages and standard deviations of the 16S rDNA/18S rDNA ratios in each experimental phase.	198
Figure 4.	Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots illustrating the distributions of the sludge samples of the full-scale membrane bioreactor (MBR) according to the relative similarity of their ITS rDNA- and 18S rDNA-based quantifications. The size of the bubbles is proportional to the values of each quantification. Bubbles size scale is displayed in right column.	202
Table 1	Primers used for the quantification of the abundance of Fungi in the MBR samples.	190
Table 2	qPCR cycling conditions used for the quantification of the abundance of Fungi in the MBR samples.	190
Table S1	Average and standard deviation of the numbers of copies of fungal ITS rDNA and 18S rDNA per L of activated sludge, quantified in the aerated and anoxic bioreactors of the MBR.	205
Table S2	Pearson's product-moment correlation coefficients (r) between the absolute abundances of fungal ITS rDNA and 18S rDNA copies per L activated sludge quantified in the aerated and anoxic bioreactors of the MBR, and the operational and environmental variables influencing the MBR.	205

Glossary-Glosario

A	Aerated bioreactor	Biorreactor aireado
APHA	American Public Health Association	Asociación Americana de Salud Pública
Au09	Autumn 2009	Otoño 2009
BOD ₅	Biological oxygen demand in 5 days (in the influent)	Demanda biológica de oxígeno en 5 días (en el influente)
BR	Bioreactor	Biorreactor
CAS	Conventional active sludge	Sistema convencional de fangos activos
cDNA	Complementary desoxiribonucleic acid	Ácido desoxirribonucleico complementario
COD	Chemical oxygen demand (in the influent)	Demanda química de oxígeno (en el influente)
Ct	Threshold cycle	Ciclo umbral
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimetil sulfóxido
DNA	Desoxiribonucleic acid	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotides triphosphate	Desoxiribonucleótidos trifosforilados
Dy	Dynamic index	Índice de dinámica
EDAR	Wastewater treatment station	Estación depuradora de aguas residuales
EPS	Extracellular polymeric substances	Sustancias poliméricas extracelulares
PHYs	Phylotypes	Filotipos
F/M	Food/ microbial ratio	Relación nutrientes/biomasa
Fo	Functional organization	Organización funcional
gDNA	Genomic DNA	DNA genómico
H'	Shannon index	Índice de Shannon
HRT	Hydraulic Retention time	Tiempo de retención hidráulica
IT	Internal temperature in the MBR	Temperatura interna en el MBR
ITS	Internal transcribed spacer	Espaciador intergénico transcrito
iTSS	Total suspended solid in the influent	Sólidos en suspensión totales en el influente
iVSS	Volatile suspended solid in the influent	Sólidos en suspensión volátiles en el influente
MBR	Membrane bioreactor	Biorreactor de membrana
MDS	Non-metric multidimensional scaling	Escalado multidimensional no métrico
PCR	Polymerase chain reaction	Reacción en cadena de la polimerasa
PPi	Inorganic Pyrophosphate	Pirofosfato inorgánico
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction	Reacción cadena cuantitativa de la polimerasa

r	Pearson's correlation coefficient between vectors	Coefficiente de correlación de Pearson entre vectores
RNA	Ribonucleic Acid	Ácido ribonucleico
Rr	Range-weighted richness	Rango ponderado de riqueza
rDNA	Gene encoding rRNA	Gen codificante de rRNA
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid	Ácido ribonucleico ribosomal
RT	Reverse transcription	Retrotranscripción
Sm09	Summer 2009	Verano 2009
Sm10	Summer 2010	Verano 2010
SRT	Solids retention time	Tiempo de retención de sólidos
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis	Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante
TGGE	Temperature gradient gel electrophoresis	Electroforesis en gel con gradiente de temperatura
TSS	Total suspended solids in the activated sludge	Sólidos suspendidos totales en el fango activo
VSS	Volatile suspended solids in the activated sludge	Sólidos suspendidos volátiles en el fango activo
X	Anoxic bioreactor	Biorreactor anóxico
Wn12	Winter 2012	Invierno 2012
WWTP(s)	Wastewater treatment plant(s)	Planta(s) de tratamiento de aguas residuales
ρ_s	Spearman's correlation coefficient	Coefficiente de correlación de Spearman

References-Bibliografía

- Aksu, Z., 2005. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: A review. *Process Biochem.* 40, 997–1026.
- Alam, M.Z., Fakhru'l-Razi, A., Molla, A.H., Roychoudhury, P.K., 2001. Treatment of wastewater sludge by liquid state bioconversion process. *J. Environ. Sci. Health A* 36, 1237–1243.
- Alam, M.Z., Fakhru'l-Razi, A., 2003. Enhanced settleability and dewaterability of fungal treated domestic wastewater sludge by liquid state bioconversion process. *Water Res.* 37, 1118–1124.
- Alam, M.Z., Fakhru'l-Razi, A., Molla, A.H., 2003b. Optimization of liquid state bioconversion process for microbial treatment of domestic wastewater sludge. *J. Environ. Eng. Sci.* 2, 299–306.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Anastasi, A., Spina, F., Romagnolo, A., Tigini, V., Prigione, V., Varese, G.C., 2012. Integrated fungal biomass and activated sludge treatment for textile wastewaters bioremediation. *Bioresour. Technol.* 123, 106–111.
- Anonofriesei, F., Petrosanu, M., 2007. Activated sludge bulking episodes and dominant filamentous bacteria at waste water treatment plant Constanta sud (Romania). *Proc. Rom. Acad. Series B*, 2, 83–87.
- Angenent, L., Sung, S., Raskin, L., 2004. Formation of granules and *Methanosaeta* fibres in an anaerobic migrating blanket reactor (AMBR). *Environ. Microbiol.* 6, 315–322.
- Anonymous., 1969. Milwaukee mystery: unusual operating problem develops. *Water Sew. Works* 116, 213.
- APHA, 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed. American Public Health Association, Washington DC, USA.
- Arden, E., Locket, W. T., 1914. Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters. *J. Soc. Chem. Ind.* 33, 523–539.

- Arévalo, J., Moreno, B., Pérez, J., Gómez, M.A., 2009. Applicability of the sludge biotic index (SBI) for MBR activated sludge control. *J. Hazard. Mater.* 167, 784–789.
- Asvapathanagul, P., Huang, Z., Gedalanga, P.B., Baylor, A., Olson, B.H., 2012. Interaction of operational and physicochemical factors leading to *Gordonia amarae*-like foaming in an incompletely -nitrifying activated sludge plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8165-8175.
- Awad, M.F., Kraume, M., 2011. Fungal diversity in activated sludge from membrane bioreactors in Berlin. *Can. J. Microbiol.* 57,693–698.
- Awong, J., Bitton, G., Koopman, B., 1985. ATP, oxygen uptake rate and INT-dehydrogenase activity of actinomycete foams. *Water Res.* 19, 917–921.
- Baker, J.S., Dudley, L.Y., 1998. Biofouling in membrane systems- a review. *Desalination* 118, 81-90.
- Bass, D., Richards, T.A., 2011. Three reasons to re-evaluate fungal diversity “on Earth and in the ocean”. *Fungal Biol. Rev.* 25, 159–164.
- Basak, B., Bhunia, B., Dutta, S., Chakraborty, S., Dey, A., 2014. Kinetics of phenol biodegradation at high concentration by a metabolically versatile isolated yeast *Candida tropicalis* PHB5. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 1444–1454.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., Kauserud, H., 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol.* 10:189.
- Bidartondo, M.I., Gardes, M., 2005. Fungal diversity in molecular terms: profiling, identification and quantification in the environment. In: Dighton J, White, JF, Oudemans, P (eds). *The fungal community: Its Organisation and Role in the Ecosystem*, vol 23. Taylor and Francis, Boca Raton, pp 215-240.
- Biggs, C.A., Lant, P.A., 2002. Modelling activated sludge flocculation using population balances. *Powder Technol.* 124, 201– 211.
- Bitton, G., 2010. *Wastewater Microbiology*. Wiley-Liss, New York., EEUU.
- Blaalid, R., Carlsen, T., Kumar, S., 2012. Changes in the root associated fungal communities along a primary succession gradient analysed by 454 pyrosequencing. *Mol. Ecol.* 21,1897–1908.
- Black, J., Dean, T., Byfield, G., Foarde, K., Menetrez, M., 2013. Determining fungi rRNA copy number by PCR. *J. Biomol. Techniques* 24, 32-38.

- Blackall, L.L., Parlett, J.H., Hayward, A.C., Minnikin, D.E., Greenfield, P.F., Harbers, A.E., 1989. *Nocardia pinensis* sp. nov., an Actinomycete found in activated sludge foams in Australia. *J. Gen. Microbiol.* 135, 1547–1558.
- Blackall, L., Harbers, A., Greenfield, P.F., Hayward, A.C., 1991. Foaming in activated sludge plants: a survey in Queensland, Australia and an evaluation of some control strategies. *Water Res.* 25, 313–317.
- Blackbeard, J.R., Ekama, G.A., Marais, G., 1986. A survey of filamentous bulking and foaming in activated sludge plants in South-Africa. *Water Pollut. Control* 85, 90–100.
- Blackwell, M., 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am. J. Bot.* 98, 936–948.
- Blankenberg, D., Von Kuster, G., Coraor, N., Ananda, G., Lazarus, R., Mangan, M., Nekrutenko, A., Taylor, J., 2010. "Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists". *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 19, Unit 19.10.1-21.
- Boenigk, J., Arndt, H., 2002. Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 465–480.
- Boguslawska-Was, E., Dabrowski, W., 2001. The seasonal variability of yeast and yeast-like organisms in water and bottom sediment of the Szczecin Lagoon. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203, 401–458.
- Bokulik, N.A., Mills, D.A., 2013. Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2519–2526.
- Bolzonella, D., Fatone, F., di Fabio, S., Cecchi, F., 2010. Application of membrane bioreactor technology for wastewater treatment and reuse in the Mediterranean region: Focusing on removal efficiency of non-conventional pollutants. *J. Environ. Manage.* 91, 2424–2431.
- Bouhabila, E. H., Aïm, R.B., Buisson, H., 1998. Microfiltration of activated sludge using submerged membrane with air bubbling (application of wastewater treatment). *Desalination* 118, 315–322.
- Butler, W.R., Floyd, M.M., Brown, J.M., Toney, S.R., Daneshvar, M.I., Cooksey, R.C., Carr, J., Steigerwalt, A.G., Charles, N., 2005. Novel mycolic acid-containing bacteria in the family *Segniliparaceae* fam. nov., including the genus *Segniliparus* gen. nov., with descriptions of *Segniliparus rotundus* sp. nov. and *Segniliparus rugosus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 55, 1615–1624

- Bux, F., Kasan, H.C.A., 1994. Microbiological survey of ten activated sludge plants. *Water S.A.* 20, 61–72.
- Cabana, H., Jiwan, J.L., Rozenberg, R., Elisashvili, V., Penninckx, M., Agathos, S.N., Jones, J.P., 2007. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. *Chemosphere* 67, 770–778.
- Cabrol, L., Malhautier, L., 2011. Integrating microbial ecology in bioprocess understanding: the case of gas biofiltration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 837–849.
- Calderón, K., González-Martínez, A., Montero-Puente, C., Reboleiro-Rivas, P., Poyatos, J.M., Juárez-Jiménez, B., Martínez-Toledo, M.V., Rodelas, B., 2012a. Bacterial community structure and enzyme activities in a membrane bioreactor (MBR) using pure oxygen as an aeration source. *Bioresour. Technol.* 103, 87–94.
- Capodici, M., di Bella, G., Nicosia, S., Torregrossa, M. 2015. Effect of chemical and biological surfactants on activated sludge of MBR system: Microscopic analysis and foam test. *Bioresour. Technol.* 177, 80–86.
- Carr, E., Eales, K.L., Soddell, J., Seviour, R.J., 2005. Improved permeabilization protocols for fluorescence in situ hybridization (FISH) of mycolic-acid-containing bacteria found in foams. *J. Microbiol. Meth.* 61, 47-54.
- Carr, M., Leadbeater, B.S.C., Hassan, R., Nelson, M., Baldauf, S.L., 2008. Molecular phylogeny of choanoflagellates, the sister group to Metazoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 16641-16646.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 421.
- Chao, A., 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Statist.* 11, 265-270.
- Chen, R., LaPara, T., 2006. Aerobic biological treatment of low-strength synthetic wastewater in membrane-coupled bioreactors: the structure and function of bacterial enrichment cultures as the net growth rate approaches zero. *Microbial Ecol.* 51, 99-108.

- Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Li, J., Wang, X., 2009. Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnol. Adv.* 27, 236–255.
- Chun, J., Blackall, L., Knag, S.O., Hah, Y.C., Goodfellow, M., 1997. A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall *et al.* as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 127–131.
- Chun, J., Kang, S.O., Hah, Y., Goodfellow, M., 1996. Phylogeny of mycolic acid-containing actinomycetes. *J. Ind. Microbiol.* 17, 205-213.
- Cicek, N., 2003. A review of membrane bioreactors and their potential application in the treatment of agricultural wastewater. *Can. Biosyst. Eng.* 45, 637-649.
- Clarke, K. and Warwick, R., 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. Plymouth Marine Laboratory, Plymouth, UK.
- Clarke, S.C., 2005. Pyrosequencing, nucleotide sequencing technology with bacterial genotyping applications. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5, 947-953.
- Clarke, K.R., Somerfield, P.J., Gorley, R.N., 2008. Testing of null hypotheses in exploratory community analyses: similarity profiles and biota-environment linkage. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 366, 56-69.
- Cooke, W.B., 1970. Fungi associated with the activated sludge process of sewage treatment at the Lebanon, Ohio, sewage-treatment plant. *Ohio J. Sci.* 70, 129-146.
- Corsaro, D., Walochnik, J., Venditti, D., Steinmann, J., Müller, K. H., Michel, R., 2014. *Microsporidia*-like parasites of amoebae belong to the early fungal lineage *Rozellomycota*. *Parasitol. Res.* 113,1909-191.
- Cooper, P.F., 2001. Historical aspects of wastewater treatment. En: *Decentralised Sanitation and Reuse: Concepts, Systems and Implementation*, Lens, P., Zeeman, G., Lettinga, G. (eds.), pp. 11-36. IWA Publishing, London, Reino Unido.
- Cullen, D.W., Lees, A.K., Toth, I.K., Duncan, J.M., 2001. Conventional PCR and real time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 387-398.
- Cullen, D.W., Lees, A.K., Toth, I.K., Duncan, J.M., 2002. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. *Plant. Pathol.* 51, 281-292.

- D'Annibale, A., Ricci, M., Quarantino, D., Federici, F., and Fenice, M., 2004. *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Res. Microbiol.* 155, 596–603.
- Davenport, R.J., Pickering, R.L., Goodhead, A.K., Curtis, T.P., 2008. An universal threshold concept for hydrophobic Mycolata in activated sludge foaming. *Water Res.* 42, 3446-3454.
- Davenport, R.J., Curtis, T.P., Goodfellow, M., Stainsby, F.M., Bingley, M., 2000. Quantitative use of fluorescent in situ hybridization to examine relationships between mycolic acid-containing actinomycetales and foaming in activated sludge plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1158-1166.
- Defrance, L., Jaffrin, M.Y., 1999. Comparison between filtration at fixed transmembrane pressure and fixed permeate flux: application to a membrane bioreactor used for wastewater treatment. *J. Membr. Sci.* 152, 203-210.
- de Azeredo, L.A.I., Cunha, C.D., Rosado, A.S., Macrae, A., Freire, D.M.G., Mendonça-Hangler, L.C.S., Sant'Anna, J., 2006. New group-specific 16S rDNA primers for monitoring foaming Mycolata during saline waste-water treatment. *Biotechnol. Lett.* 28, 447-453.
- de los Reyes, M.F., De Los Reyes III, F.L., Hernández, M., Raskin, L., 1998. Quantification of *Gordonia amarae* strains in foaming activated sludge and anaerobic digester systems with oligonucleotide hybridization probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2503-2512.
- de los Reyes III, F. L., Raskin, L., 2002. Role of filamentous microorganisms in activated sludge foaming: relationship of mycolata levels to foaming initiation and stability. *Water Res.* 36, 445-459.
- de los Reyes, F.L., Rothauszky, D., Raskin, L., 2002. Microbial community structures in foaming and non-foaming full-scale wastewater treatment plants. *Water Environ. Res.* 74, 437-449.
- de los Reyes, F.L. III., 2010a. Foam in Wastewater Treatment Facilities. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Timmis, K.N. (Ed.). Springer, Germany, pp. 2401-2411.
- de los Reyes, F.L., 2010b. Foaming. In: *Microbial Ecology of Activated Sludge*. Seviour, R., Nielsen, P.H. (eds.), pp. 215-258. IWA Publishing, London, Reino Unido.
- Dhaliwal, B.S., 1979. *Nocardia amarae* and activated sludge foaming. *J. Water Pollut. Control Fed.* 51, 344-350.
- Di Bella, G., Torregrossa, M., Viviani, G., 2011. The role of EPS concentration in MBR foaming: analysis of a submerged pilot plant. *Bioresour. Technol.* 102, 1628–1635.

- Di Bella, G., Torregrossa, M., 2013. Foaming in membrane bioreactors: identification of the causes. *J. Environ. Manage.* 128, 453–461.
- Eikelboom, D.H., 1975. Filamentous organisms observed in activated sludge. *Water Res.* 9, 365–388.
- Eikelboom, D.H., 1977. Identification of filamentous organisms in bulking activated sludge. *Prog. Water Technol.* 8, 153–161.
- Eikelboom, D.H., Andreadakis, A., Andreasen, K., 1997. Survey of the filamentous population in nutrient removal plants in four European Countries. In *Second International Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes*, Berkeley, California, EEUU.
- Eikelboom, D.H., 2000. *Process control of activated sludge plants by microscopic investigation*. IWA Publishing, London, Reino Unido.
- Eikelboom, D.H., 2006. *Identification and control of filamentous microorganisms in industrial wastewater treatment plants*. IWA Publishing, London, Reino Unido.
- Ekama, G.A., Wentzel, M.C., 1999. Difficulties and developments in biological nutrient removal technology and modelling. *Water Sci. Technol.* 39, 1-11.
- Evans, T.N., Seviour, R.J., 2012. Estimating biodiversity of fungi in activated sludge communities using culture-independent methods. *Microb. Ecol.* 63, 773-786.
- Evans, T.N., Watson, G., Rees, GN., Seviour, R.J., 2014. Comparing activated sludge fungal community population diversity using denaturing gradient gel electrophoresis and terminal restriction fragment length polymorphism. *Antonie van Leeuwenhoek* 10, 559-569.
- Fakhru'l-Razi, A., Alam, M.Z., Idris, A., Abd-Aziz, S., Molla, A.H., 2002. Filamentous fungi in Indah Water Konsortium (IWK) sewage treatment plant for biological treatment of domestic wastewater sludge. *J. Environ. Sci. Health part A*, 37, 309–320.
- Fakhru'l-Razi, A., Molla, AH., 2007. Enhancement of bioseparation and dewaterability of domestic wastewater sludge by fungal treated dewatered sludge. *J. Hazard. Mater.* 147, 350-356.
- Fang, H., Cai, L., Yu, Y., Zhang, T., 2013. Metagenomic analysis reveals the prevalence of biodegradation genes for organic pollutants in activated sludge. *Bioresour. Technol.* 129, 209–218.
- Farquhar, G., Boyle, W., 1971. Occurrence of filamentous microorganisms in activated sludge. *J. Water Pollut. Control Fed.* 43, 779–798.

- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39, 783-791.
- Filion, M., Arnaud, M.S., Jabaji-Hare, S., 2003. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* 53, 67-76.
- Fleury, S., 2007. Method for Treatment of Sewage Plant Sludge by a Fungal Process. United States Patent, US007270751B2.
- Foot, R.J., Kocianova, E., Forster, C.F., 1992. Variable morphology of *Microthrix parvicella* in activated sludge systems. *Water Res.* 26, 875–880.
- Franz, A., Matsche, N., 1994. Investigation of a bacteria-enzyme additive to prevent foaming in activated sludge plants. *Water Sci. Technol.* 29, 281–284.
- Frigon, D., Guthrie, R.M., Bachman, G.T., Royer, J., Bailey, B., Raskin, L., 2006. Long-term analysis of a full-scale activated sludge wastewater treatment system exhibiting seasonal biological foaming. *Water Res.* 40, 990-1008.
- Giardine, B., Riemer, C., Hardison, R.C., Burhans, R., Elnitski, L., Shah, P., Zhang, Y., Blankenberg, D., Albert, I., Taylor, J., Miller, W., Kent, W.J., Nekrutenko, A., 2005. Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res.* 15, 1451-1455.
- Giraud, F., Guiraud, P., Kadri, M., Blake, G., Steiman, R., 2001. Biodegradation of anthracene and fluoranthene by fungi isolated from an experimental constructed wetland for wastewater treatment. *Water Res.* 35, 4126–4136.
- Gobel, A., Mc Ardell, C.S., Joss, A., Siegrist, H., Giger, W., 2007. Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Sci. Total Environ.* 372, 361-371.
- Goddard, A.J., Forster, C.F., 1987. A further examination into the problem of stable foams in activated sludge plants. *Microbios* 50, 29–42.
- Goddard, A.J., Forster, C.F., 1986. Surface tension of activated sludges in relation to the formation of stable foams. *Microbios* 46, 29–43.
- Goecks, J., Nekrutenko, A., Taylor, J., 2010. The Galaxy Team. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* 11, R86.

- Gómez-Silván, C. 2012. Efecto de las variables de un sistema de biorreactores de membrana sumergida (MBR) sobre la actividad enzimática y la estructura de su comunidad microbiana. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
- Gómez-Silván, C., Arévalo, J., Pérez, J., González-López, J., Rodelas, B., 2013. Linking hydrolytic activities to variables influencing a submerged membrane bioreactor (MBR) treating urban wastewater under real operating conditions. *Water Res.* 47, 66-78.
- Gómez-Silván, C., Vélchez-Vargas, R., Arévalo, J., González-López, J., Pieper, D.H., Rodelas, B., 2014a. Quantitative response of nitrifying and denitrifying communities to environmental variables in a full-scale membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* 169, 126-133.
- Gómez-Silván, C., Arévalo, J., González-López, J., Rodelas, B., 2014b. Exploring the links between population dynamics of total and active bacteria and the variables influencing a full-scale membrane bioreactor (MBR). *Bioresour. Technol.* 162, 103-114.
- Good, I.J., 1953. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40, 237-264.
- Goodfellow, M., Chun, J., Stubbs, S., Tobill, A. S., 1994. Transfer of *Nocardia amarae* Lechevalier and Lechevalier 1974 to the genus *Gordona* as *Gordona amarae* comb. nov. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 401-405.
- Goodfellow, M., Jones, A.L., 2012. Order V: *Corynebacteriales* ord. nov.. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd Ed., Vol. 5A. Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Suzuki, K.I., Ludwig, W., Whitman, W.B. (eds.), pp. 235-243. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Griffin, D., 1996. Chemistry of the fungal cell. In: *Fungal Physiology*, 2nd ed. Wiley-Liss, NY, USA.
- Guest, R.K., Smith, D.W., 2002. A potential new role for fungi in a wastewater MBR biological nitrogen reduction system. *J. Environ. Eng. Sci.* 1, 433-437.
- Guo, F., Zhang, T., 2012. Profiling bulking and foaming bacteria in activated sludge by high throughput sequencing. *Water Res.* 46, 2772-2782
- Gutierrez-Correa, M., Tengerdy, R.P., 1997. Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnol. Lett.* 19, 665-667.

- Hageskal, G., Leema, N., Skaar, I., 2009. The study of fungi in drinking water. *Mycol. Res.* 113, 165–172.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4, 9pp.
- Han, S.-S., Bae, T.-H., Jang, G.-G., Tak, T.-M., 2005. Influence of sludge retention time on membrane fouling and bioactivities in membrane bioreactor system. *Process Biochem.* 40, 2393-2400.
- He, S.B., Xue, G., Wang, B.Z., 2006. Activated sludge ozonation to reduce sludge production in membrane bioreactor (MBR). *J. Hazard. Mater.* 135, 406-411.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E.M.H., 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3233-3241.
- Hibbett, D.S., Ohman, A., Glotzer, D., Nuhn, M., Kirk, P., Nilsson, R.H., 2011. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fung. Biol. Rev.* 25, 38–47.
- Hierro, N., Estévez-Zarzoso, B., González, Á., Mas, A., Guillamón, J. M., 2006. Real-time quantitative PCR (qPCR) and reverse-transcription-qPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7148-7155.
- Hiraoka, M., Tsumura, K., 1984. Suppression of actinomycete scum production-A case study at Senboku wastewater treatment plant, Japan. *Water Sci. Technol.* 16, 83–90.
- Holmstrom, H., Bosander, J., Dahlberg, A.G., Dillner-Westlund, A., Flyborg, L., Jokinen, K., 1996. Severe bulking and foaming at the Himmerfjorden WWTP. *Water Sci. Technol.* 33, 127–135.
- Hoshino, Y., Morimoto, S., 2010. Soil clone library analyses to evaluate specificity and selectivity of PCR primers targeting Fungal 18S rDNA for denaturing-gradient gel electrophoresis (DGGE). *Microbes Environ.* 25, 281-287.
- Hoshino, Y.T., 2012. Molecular analyses of soil fungal community-Methods and applications. In: *Soil health and land use management*, Hernandez-Soriano, M.C. (Ed), pp. 279-302. InTech Europe, Rijeka, Croatia.
- Huang, X., Gui, P., Qian, Y., 2001. Effect of sludge retention time on microbial behavior in a submerged membrane bioreactor. *Process Biochem.* 36, 1001-1006.

- Ihrmark, K., Bodeker, I.T.M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandstrom-Durling, M., Clemmensen, K.E., Lindahl, B.D., 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 321, 666–677.
- Insel, G., Erol, S., Övez, S., 2014. Effect of simultaneous nitrification and denitrification on nitrogen removal performance and filamentous microorganism diversity of a full-scale MBR plant. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 2163–2173.
- Jackson, G.A., Livingston, R. S., Riley, L. K., Livingston, B. A., Franklin, G. L., 2013. Development of a PCR assay for the detection of *Spironucleus muris*. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 52, 165–170.
- Jaffar-Abbas, S., Ahmad, B., Karlovsky, P., 2014. Real time PCR (qPCR) assay for *Rhizoctonia solani* anastomoses group AG2-2 IIIB. *Pak. J. Bot.* 46, 353–356.
- Jamal, P., Alam, M.Z., Salleh, M.R.M., Akib, M.M., 2005. Sewage treatment plant sludge: a source of potential microorganism for citric acid production. *Am. J. Applied Sci.* 2, 1236–1239.
- Jaouani, A., Guillén, F., Penninckx, M.J., Martínez, A.T., and Martínez, M.J., 2005. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 478–486.
- Jarboui, R., Baati, H., Fetoui, F., Gargouri, A., Gharsallah, N., Ammar, E., 2012. Yeast performance in wastewater treatment: case study of *Rhodotorula mucilaginosa*. *Environ Technol.* 33, 951–960.
- Jarboui, R., Magdich, S., Ayadi, R.J., Gargouri, A., Gharsallah, N., Ammar, E., 2013. *Aspergillus niger* P6 and *Rhodotorula mucilaginosa* CH4 used for olive mill wastewater (OMW) biological treatment in single pure and successive cultures. *Environ. Technol.* 34, 629–636.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* 23, 403–405.
- Jenkins, D., 1992. Towards a comprehensive model of activated-sludge bulking and foaming. *Water Sci. Technol.* 25, 215–230.
- Jenkins, D., Richard, M.G., Daigger, G.T., 1993. *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*, 2nd ed., Lewis Publishers Inc, Chelsea, Michigan, EEUU.
- Jenkins, D., Richard, M.G., Daigger, G.T., 2004. *Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation problems*. IWA Publishing, Londo, Reino Unido.

- Jones, M.D.M., Forn, I., Gadelha, C., Egan, M.J., Bass, D., Massana, R., Richards, T.A., 2011. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature*. 474, 200-203.
- Judd, S., 2011. *The MBR book. Principles and applications of membrane bioreactors for water and wastewater treatment*, 2nd Ed., Judd, S., Judd, C. (eds). Elsevier, Oxford, Reino Unido.
- Jumpponen, A., Jones, K.L., 2009. Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytol.* 184, 438–448.
- Jürgens, K., Matz, C., 2002. Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 413–434.
- Kacprzak, M., Neczaj, E., Okoniewska, E., 2005. The comparative mycological analysis of wastewater and sewage sludge from selected wastewater treatment plants. *Desalination* 185, 363–370.
- Kaushik, P., Malik, A., 2009. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. *Environ. Int.* 35, 127–141.
- Kent, A.D., Triplett, E.W., 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 211-236.
- Kinsey, G., Paterson, R., Kelley, J., 2003. Filamentous fungi in water systems. In: *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, Mara. D. Horan, N (Eds.), pp. 77-96. Academic Press, United Kingdom.
- Kim, J.S., Kim, W.S., Lee, K., Won, C.J., Kim, J.M., Eum, S.Y., Koh, W.J., Shin, S.J., 2013. Differential immune responses to *Segniliparus rotundus* and *Segniliparus rugosus* infection and analysis of their comparative virulence profiles. *PLOS One* 8 (3), e59646.
- Kim, I.S., Jang, N., 2006. The effect of calcium on the membrane biofouling in the membrane bioreactor (MBR). *Water Res.* 40, 2756-2764.
- Kragelund, C., Müller, E., Schade, M., Nguyen, H.T.T., Lemmer, H., Seviour, R., Nielsen, P.H., 2009. Identification of filamentous bacteria by FISH. In: *FISH handbook for biological wastewater treatment: identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH*, Nielsen, P.H., Daims, H., and Lemmer, H. (eds), pp.33-68. IWA Publishing, London, United Kingdom.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, fifth ed., vol. 1. Elsevier, London, UK, pp. 3–277.

- Lacina, C., Germain, G., Spiros, AN., 2003. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. *J. Biotechnol.* 2 , 620-630.
- Laera, G., Giordano, C., Pollice, A., Saturno, D., Mininni, G., 2007. Membrane bioreactor sludge rheology at different solid retention times. *Water Res.* 41, 4191-4203.
- Lanzén, A., Jørgensen, S.L., Huson ,D.H., Gorfer, M., Grindhaug, S.H., Jonassen, I., Øvreås. L., Urich T., 2012. CREST-classification resources for environmental sequence tags. *PLoS One* 7, e49334.
- LaPara, T.M., Konopka, A., Nakatsu, C.H., Alleman, J.E., 2001. Thermophilic aerobic treatment of a synthetic wastewater in a membrane coupled bioreactor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26, 203–209.
- 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. *J. Biotechnol.* 121, 368-380.
- Lechevalier, M. P., Lechevalier, H. A., 1974. *Nocardia amarae* sp. nov., an actinomycete common in foam activated sludge. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24, 278-288.
- Le-Clech, P., 2010. Membrane bioreactors and their uses in wastewater treatments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 1253-1260.
- Lee, S.S., Ha, J.K., Cheng, K.J., 2000. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to in vitro degradation of orchard grass cell walls and their interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3807–3813.
- Lees, A.K., Cullen, D.W., Sullivan, L., Nicolson, M.J., 2002. Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. *Plant Pathol.* 51, 293-302.
- Lemmer, H., Kroppenstedt, R.M., 1984. Chemotaxonomy and physiology of some actinomycetes isolated from scumming activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* 5, 124–135.
- Lessard, P., Le Bihan, Y., 2003. Fixed film processes. In: *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, Mara. D. Horan, N (Eds.), pp. 77-96. Academic Press, United Kingdom.
- Liao, J., Lou, I., de los Reyes., F. 2004. Relationship of species-specific filament levels to filamentous bulking in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2420-2428.

- Liébana, R., Arregui, L., Belda, I., Gamella, L., Santos, A., Marquina, D., Serrano, S., 2015. Membrane bioreactor wastewater treatment plants reveal diverse yeast and protist communities of potential significance in biofouling. *Biofouling*. 31, 71-82.
- Lim, Y.W., Kim, B.K., Kim, C., 2010. Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. *J. Microbiol.* 48, 284–289.
- Lindahl, B.D., Nilsson, R. H., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Carlsen, T., Kjøller R, Kõljalg, U., Pennanen, T., Rosendahl, S., Stenlid, J., Kauserud, H. 2013. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers--a user's guide. *New Phytol.* 199, 288-299.
- Liu, X., Yang, M., Zhang, Y., Yang, X., Gan, Y., 2007. Microbial community comparison of different biological processes for treating the same sewage. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 135-143.
- Liu, C.M., Kachur, S., Dwan, M.G., Abraham, A.G., Aziz, M., Hsueh, P.R., Huang, Y.T., Busch, J.D., Lamit, L.J., Gehring, C.A., Keim, P., Price, L.B., 2012. FungiQuant: A broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiol.* 12:255.
- Lopandic, K., Rentsendorj, U., Prillinger, H., Sterflinger, K., 2013. Molecular characterization of the closely related *Debaryomyces* species: proposition of *D. vindobonensis* sp. nov. from a municipal wastewater treatment plant. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 59, 49–58.
- Machnicka, A., Grubel, K., Suscha, J., 2009. The use of disintegrated foam to accelerate anaerobic digestion of activated sludge. *Arch. Environ. Prot.* 35, 11-19.
- Madoni, P., Davoli, D., Gibin, G., 2000. Survey of filamentous microorganisms from bulking and foaming activated-sludge plants in Italy. *Water Res.* 34, 1767-1772.
- Mannan, S., Fakhru'l-Razi, A., Alam, ZMd., 2005. Use of fungi to improve bioconversion of activated sludge. *Water Res.* 39, 2935-2943.
- Mardis, E.R., 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* 24, 133–141.
- Marrengane, Z., Santhosh Kumar, S.K., Pillay, L., Bux, F., 2011. Rapid quantification and analysis of genetic diversity among *Gordonia* populations in foaming activated sludge plants. *J. Basic Microbiol.* 51, 415-423.
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W., 2008. How to get more out of molecular fingerprints, practical tools for microbial ecology. *Environ. Microbiol.* 10, 1571–1581.

- Martins, A.M.P., Picioreanu, C., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., 2004. Three-dimensional dual-morphotype species modeling of activated sludge flocs. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5632-5641.
- Matsunaga, K., Kubota, K., Harada, H., 2014. Molecular diversity of Eukaryotes in municipal wastewater treatment processes as revealed by 18S rRNA gene analysis. *Microbes Environ.* 29, 401-407.
- Maza-Márquez, P., Gómez-Silván, C., Gómez, M.A., González-López, J., Martínez-Toledo, M.V., Rodelas, B., 2015. Linking operation parameters and environmental variables to population dynamics of Mycolata in a membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* 180, 318-329.
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8:e61217.
- Meng, F., Zhang, H., Yang, F., Li, Y., Xiao, J., Zhang, X., 2006. Effect of filamentous bacteria on membrane fouling in submerged membrane bioreactor. *J. Membr. Sci.* 272, 161-168.
- Meng, F., Chae, S.R., Drews, A., Kraume, M., Shin, H.S., Yang, F., 2009. Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): membrane fouling and membrane material. *Water Res.* 43, 1489-512.
- Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies- the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11, 31-46.
- Meyer, V., 2008. Genetic engineering of filamentous fungi-Progress, obstacles and future trends. *Biotechnol. Adv.* 26, 177-185.
- Milner, M.G., Curtis, T.P., Davenport, R.J., 2008. Presence and activity of ammonia-oxidizing bacteria detected amongst the overall bacterial diversity along a physico-chemical gradient of a nitrifying wastewater treatment plant. *Water Res.* 42, 2863-2872.
- Mitchell, J.I., Zuccaro, A., 2006. Sequences, the environment and fungi. *Mycologist* 20, 62-74.
- 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 Res.* 41, 627-637.
- Molina-Muñoz, M., Poyatos, J.M., Rodelas, B., Pozo, C., Manzanera, M., Hontoria, E., González-López, J., 2010. Microbial enzymatic activities in a pilot-scale MBR experimental plant under different working conditions. *Bioresour. Technol.* 101, 696-704.
- Molina-Muñoz, M., Poyatos, J.M., Sánchez-Peinado, M., Hontoria, E., González-López, J., Rodelas, B., 2009. Microbial community structure and dynamics in a pilot-scale submerged membrane bioreactor

- aerobically treating domestic wastewater under real operation conditions. *Sci. Total Environ.* 407, 3994-4003.
- Molina-Muñoz, M., Poyatos, J.M., Vilchez, R., Hontoria, E., Rodelas, B., González-López, J., 2007. Effect of the concentration of suspended solids on the enzymatic activities and biodiversity of a submerged membrane bioreactor for aerobic treatment of domestic wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 1441-1451.
- Molla, A.H., Fakhru'l-Razi, A., Abd-Aziz, S., Hanafi, M.M., 2001. In-vitro compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 849-856.
- Molla, A.H., Fakhru'l-Razi, A., Alam, M.Z., 2004. Evaluation of solid-state bioconversion of domestic wastewater sludge as a promising environmental friendly disposal technique. *Water Res.* 38, 4143-4152.
- Monteiro, A.S., Bonfim, M.R.Q., Domingues, V.S., Correa, A., Siqueira, E.P., Zani, C.L., Santos, V.L., 2010. Identification and characterization of emulsifier-producing yeasts isolated from effluent of a dairy industry. *Bioresour. Technol.* 101, 5186-5193.
- Moore-Landecker, E., 1990. *Fundamentals of the fungi* (3rd ed.) Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
- More, T.T., Yan, S., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2010. Potential use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment. *Bioresour. Technol.* 101, 7691-7700.
- Mori, T., Itokazu, K., Ishikura, Y., Mishina, F., Sakai, Y., Koga, M., 1992. Evaluations of control strategies for actinomycete scum in full-scale treatment plants. *Water Sci. Tech.* 25, 231-237.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
- Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of DGGE and temperature gradient gel electrophoresis TGGE in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 73: 127-141.
- Nakajima, J., Mishima, I., 2005. Measurement of foam quality of activated sludge in MBR process. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 33, 232-239.
- Nguyen, L., Burnett, L., 2014. Automation of Molecular-Based Analyses: A Primer on Massively Parallel Sequencing. *Clin. Biochem. Rev.* 35, 169-176.

- Nielsen, P.H., Kragelund, C., Seviour, R.J., Nielsen, J.L., 2009. Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 969-998.
- Nielsen, P.H., Saunders, A.M., Hansen, A.A., Larsen, P., Nielsen, J.L., 2012. Microbial communities involved in enhanced biological phosphorus removal from wastewater : a model system in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 452-459.
- Nilsson, R.H., Ryberg, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Larsson, K.H., Kõljalg, U., 2006. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS ONE*, 1, e59.
- Ntougias, S., S. Tanasidis, and P. Melidis., 2011. Microfaunal indicators, Ciliophora phylogeny and protozoan population shifts in an intermittently aerated and fed bioreactor. *J. Hazard. Mater.* 186:1862-1869.
- Oerther, D.B., de los Reyes III, F.L., de los Reyes, M.F., Raskin, L., 2001. Quantifying filamentous microorganisms in activated sludge before, during, and after an incident of foaming by oligonucleotide probe hybridizations and antibody staining. *Water Res.* 35, 3325-3336.
- Orantes, J.C., Wisniewski, C., Lobos, J., Héran, M., Grasmick, A., 2006. Bioreactores a membranas sumergidas, operados en condiciones de retención total de sólidos. 2º Foro Académico Nacional de Ingenierías y Arquitectura, 6-8 Diciembre, Morelia, Michoacán, México, pp. 147-154.
- Orhon, D., Babuna, F.G., Karahan, O., 2009. *Industrial wastewater treatment by activated sludge*. IWA Publishing, London, UK.
- Ozkose, E., Thomas, B.J, Davies, D.R., Griffith, G.W., Theodorou, M.K., 2001. *Cyllumyces aberensis* gen. nov. sp. nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. *Can. J. Bot.* 79,666-673.
- Papadimitriou, C.A., A. Papatheodoulou, V. Takavakoglou, A. Zdragas, P. Samaras, G.P. Sakellariopoulos, M. Lazaridou, and G. Zalidis., 2010. Investigation of protozoa as indicators of wastewater treatment efficiency in constructed wetlands. *Desalination* 250:378-382.
- Paps, J., Medina-Chacón, LA., Marshall, W., Suga, H., Ruiz-Trillo, I., 2012. Molecular phylogeny of unikonts: new insights into the position of Apusomonads and Ancyromonads and the internal relationships of opisthokonts. *Protist.* 164, 2-12.

- Parada-Albarracín, J., Marín, E., Pérez, J.I., Moreno, B., Gómez, M.A., 2012. Evolution of filamentous bacteria during urban wastewater treatment by MBR. *J. Environ. Sci. Heal. A* 47, 863-872.
- Petrovsky, S., Dyson, Z.A., Quill, E.S., McIlroy, S.J., Tillett, D., Seviour, R.J., 2011. An examination of the mechanisms for stable foam formation in activated sludge systems. *Water Res.* 45 (5), 2146-2154.
- Pielou, E.C., 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. *J. Theor. Biol.* 13, 131-144.
- Pietarinen, V.M., Rintala, H., Hyvärinen, A., Lignell, U., Kärkkäinen, P., Nevalainen, A., 2008. Quantitative PCR analysis of fungi and bacteria in building materials and comparison to culture-based analysis. *J. Environ. Monit.* 10, 655-663.
- Pietikäinen, J., Pettersson, M., Bååth, E., 2005. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52, 49-58.
- Pitkäranta, M., Meklin, T., Hyvärinen, A., Paulin, L., Auvinen, P., Nevalainen, A., Rintala, H., 2008. Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal DNA sequence analysis, quantitative PCR, and culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 233-244.
- Prévost-Bouré, NC., Christen, R., Dequiedt, S., Mougél, C., Lelièvre, M., Jolivet, C., Shahbazkia, H., Guillou, L., Arrouya, D., Ranjard, L., 2011. Validation and Application of a PCR Primer Set to Quantify Fungal Communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *Plos One* 6, e24166.
- Pujol, R., Duchene, P., Schetrite, S., Canler, J.P., 1991. Biological foams in activated-sludge plants – characterization and situation. *Water Res.* 25, 1399–1404.
- Richard, M., 2003. Activated sludge microbiology problems and their control. 20th Annual USEPA National Operator Trainers Conference, Buffalo, NY, EEUU.
- Richard, M., 1989. *Activated Sludge Microbiology*. Alexandria, Virginia: The Water Pollution Control Federation.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M., Nyren, P., 1996. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* 242, 84-89.
- Ronaghi, M., Uhlen, M., Nyren, P., 1998. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281, 363-365.
- Ronaghi, M., Elahi, E., 2002. Pyrosequencing for microbial typing. *J. Chromatogr. B.* 782, 67-72.

- Rosenberger, S., Krüger, U., Witzig, R., Manz, W., Szewzyk, U., Kraume, M., 2002. Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater. *Water Res.* 36, 413-420.
- Rossetti, S., Tomei, MC., Nielsen, PH., Tandoi, V., 2005. "Microthrix parvicella", a filamentous bacterium causing bulking and foaming in activated sludge systems: a review of current knowledge. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 49-64.
- Rossetti, S., Carucci, A., Rolle, E., 1994. Survey on the occurrence of filamentous organisms in municipal wastewater treatment plants related to their operating conditions. *Water Sci. Technol.* 29, 305–308.
- Ruiz, L.M., Arévalo, J., Parada, J., González, D., Moreno, B., Pérez, J. and Gómez, M.A., 2011. Respirometric assays of two different MBR (microfiltration and ultrafiltration) to obtain kinetic and stoichiometric parameters. *Water Sci. Technol.* 63, 2478-2485.
- Ryan, D.R., Leukes, W.D., and Burton, S.G., 2005. Fungal bioremediation of phenolic wastewaters in an airlift reactor. *Biotechnol. Prog.* 21, 1068–1074.
- Ryberg, M., Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Tøpøl, M., Jacobsson, S., Larsson, E., 2008. Mining metadata from unidentified ITS sequences in GenBank: a case study in *Inocybe* (Basidiomycota). *BMC Evol. Biol.* 8, 50.
- Sankaran, S., Khanal, S.K., Jasti, N., Jin, B., Pometto, A.L., Van Leewen, J.H., 2010. Use of Filamentous Fungi for Wastewater Treatment and Production of High Value Fungal Byproducts: A Review. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 40, 400–449.
- Schabereiter-Gurtner, C., Selitsch, B., Rotter, M.L., Hirschl, A.M., Willinger, B., 2007. Development of novel Real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3906-3914.
- Scheckenbach, F., Hausmann, K., Wylezich, C., Weitere, M., Arndt, H., 2010. Large-scale patterns in biodiversity of microbial eukaryotes from the abyssal sea floor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 115-120.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing Mothur: open-source, platform-independent, community-supported

- software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537-7541.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 6241– 6246.
- 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., Strous, M., 2003. *Candidatus Scalindua brodae* sp. nov., *Candidatus Scalindua wagneri* sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 529-538.
- Seka, A.M., Van de Wiele, T., Verstraete, W., 2001. Feasibility of a multi-component additive for efficient control of activated sludge filamentous bulking. *Water Res.* 35, 2995-3003.
- Seviour, R.J., 2010. Factors affecting the bulking and foaming filamentous bacteria in activated sludge. In: *Microbial Ecology of Activated Sludge*. Seviour, R., Nielsen, P.H. (eds.), pp. 139-167. IWA Publishing, London, UK.
- Seviour, E.M., Williams, C.J., Seviour, R.J., Soddell, J.A., Lindrea, K.C., 1990. A survey of filamentous bacterial-populations from foaming activated-sludge plants in eastern states of Australia. *Water Res.* 24, 493–498.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, IL, USA.
- Shelest, E., Voigt, K., 2014. Genomics to study basal lineage fungal biology: phylogenomics suggest a common origin. In: *The Mycota XIII: Fungal Genomics*, 2nd Ed., Nowrousian, M. (ed), pp.31-60. Sprigner-Verlag, Germany.
- Sherr, E.B., Sherr, B.F., 2002. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie van Leeuwenhoek.* 81, 293–308.
- Shimizu, Y., Okuno, Y., Uryu, K., Ohtsubo, S., Watanabe, A., 1996. Filtration characteristics of hollow fiber microfiltration membranes used in membrane bioreactor for domestic wastewater treatment. *Water Res.* 30, 2385-2392.
- Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F., Hajibabaei, M., 2012. Next-generation sequencing Technologies for environmental DNA research. *Mol. Ecol.* 21, 1794-1805.

- Singh, BK, Munro, S., Reid, E., Ord, B., Potts, JM., Paterson, E., Millard, P., 2006. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. *Eur. J. Soil Sci.* 57, 72-82.
- Simpson, E. H., 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163, 688.
- Sladka, A., 1966. The most common fungi in biological treatment plants. *Hydrobiologia* 31, 350-362.
- Smith, C.J., Osborn, A.M., 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67, 6-20.
- Sodell, J.A., Seviour, R.J., Blackall, L.L., Hugenholtz, P., 1997. New foam-forming nocardioforms in activated sludge. In *Second International Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes*, Berkeley, CA, IAWQ.
- Soddell J.A., Seviour, R.J., 1995. Relationship between temperature and growth of organisms causing *Nocardia* foams in activated sludge plants. *Water Res.* 29, 1555–1558.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 11, 33-40.
- Sokolovská, I., Rozenberg, R., Riez, C., Rouxhet, P. G., Agathos, S. N., Wattiau, P., 2003. Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7019-7027.
- Sombatsompop, K., Visvanathan, C., 2006. Evaluation of biofouling phenomenon in suspended and attached growth membrane bioreactor systems. *Desalination* 201, 138-149.
- Stamper, D.M., Walch, M., 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 852-860.
- Stock, A., Breiner, H.W., Pachiadaki, M., Edgcomb, V., Filker, S., La Cono, V., Yakimov, MM., Stoeck, T., 2012. Microbial eukaryote life in the new hypersaline deep-sea basin Thetis. *Extremophiles* 16, 21-34.
- Stratton, H., Seviour, R., Brooks, P., 1997. “Activated sludge foaming: what causes hydrophobicity and can it be manipulated to control foaming?” En: *Proceedings of the 2nd Int. Conf. on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes*. Berkeley, California, EEUU, p. 293-300.
- Subramanian, B.S., Yan, S., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2006. Isolation of extra cellular biopolymer producing microorganisms from wastewater sludge for sludge settling and dewatering. In:

- Proceedings of the 79th Annual Water Environment Federation Technical Exposition and Conference [CD-ROM]; Dallas, Texas Oct 21-25; Water Environment Federation, Alexandria, Virginia.
- Subramanian, B.S., Yan, S., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2008. A new, pellet-forming fungal strain: its isolation, molecular identification, and performance for simultaneous sludge-solids reduction, flocculation, and dewatering. *Water Environ. Res.* 80, 840–852.
- Suh, S.O., Blackwell, M., Kurtzman, C.P., Lachance, M.A., 2006. Phylogenetics of *Saccharomycetales*, the ascomycete yeasts. *Mycologia* 98, 1006-1017.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
- Tedersoo, L., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., 2010. 454 pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytol.* 188, 291–301.
- Toju, H., Tanabe, A.S., Yamamoto, S., Sato, H., 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in environmental samples. *PLoS One* 7:e40863.
- Tomlinson, T.G., Williams, I.L., 1975. Fungi in: Curds CR, Hawkes HA (eds) *Ecological aspects of used-water treatment*, vol I. Academic, London, pp 93-152.
- Tsang, Y.F., Sin, S.N., Chua, H., 2008. *Nocardia* foaming control in activated sludge process treating domestic wastewater. *Bioresour. Technol.* 99, 3381-3388.
- Ueda, T., Horan, N.J., 2000. Fate of indigenous bacteriophage in a membrane bioreactor. *Water Res.* 34, 2151-2159.
- Valones, M.A.A., Guimarães, R.L., Cavalcanti Brandão, L.A., de Souza, P.R.E., Carvalho, A.D.A.T., Crovela, S., 2009. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields, a review. *Brazilian J. Microbiol.* 40, 1-11.
- Van den Broeck, R., Van Dierdonck, J., Nijskens, P., Dotremont, C., Krzeminski, P., van der Graaf, J.H.J.M., van Lier, J.B., Van Impe, J.F.M., Smets, I.Y., 2012. The influence of solids retention time on activated sludge bioflocculation and membrane fouling in a membrane bioreactor (MBR). *J. Membr. Sci.* 401-402, 48-55.
- Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Valéro, J.R., 2007. Bench-scale fermentation of *Trichoderma viride*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1695–1703.

- Vervaeren, H., de Wilde, K., Matthys, J., Boon, N., Raskin, L., Verstraete, W., 2005. Quantification of an Eikelboom type 021N bulking event with fluorescence *in situ* hybridization and real-time PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 695-704.
- Vílchez-Vargas, R., Junca, H., Pieper, D.H., 2010. Metabolic networks, microbial ecology and 'omics' technologies: towards understanding *in situ* biodegradation processes. *Environ. Microbiol.* 12, 3089-3104.
- Wagner, M., Amann, R., Kampfer, P., Assmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P., Springer, N., Schleifer, K., 1994a. Identification and *in-situ* detection of Gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* 17, 405-417.
- Wan, C.Y., De Wever, H., Diels, L., Thoeye, C., Liang, J.B., Huang, L.N., 2011. Biodiversity and population dynamics of microorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water Res.* 45, 1129-1138.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261-5267.
- Wang, L.K., Menon, R., 2009. Membrane Bioreactors. In: *Advanced biological treatment processes*, Wang, K., Shamas, N. K., Hung, Y.E. (eds). *Handbook of Environmental Engineering* vol. 9. Humana Press, NY, EEUU.
- Wang, J., 2012. Fundamentals of biological processes for wastewater treatment, In: *Biological sludge minimization and biomaterials/bioenergy recovery technologies*, 1st Ed.. Paul, E, Liu, Y (eds.), pp. 1-80. John Wiley & Sons, NJ, USA.
- Wanner, J., 1994. *Activated sludge bulking and foaming control*. Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, EEUU.
- Wanner J, Ruzicková I, Jetmarová, P., Krhutková, O., Paraniaková, J., 1998. A national survey of activated sludge separation problems in the Czech Republic: filaments, floc characteristics and activated sludge metabolic properties. *Water Sci. Technol.* 37, 271-279.
- Watanabe, T., Ikeda, H., Masaki, K., Fujii, T., Iefuji, H., 2009. Cloning and characterization of a novel phytase from wastewater treatment yeast *Hansenula fabianii* J640 and expression in *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioeng.* 108, 225-230.

- Weber, S. D., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Fried, J., 2007. Microbial composition and structure of aerobic granular sewage biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6233-6240.
- Weber, S.D., Hofmann, A., Pilhofer, M., Wanner, G., Agerer, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Fried, J., 2009. The diversity of fungi in aerobic sewage granules assessed by 18S rRNA gene and ITS sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 246-254.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), pp. 315-322. Academic Press, NY, USA.
- WHO, World Health Organization., 1989. Health Guidelines for the use of Wastewater in Agriculture and Aquaculture. Report of a WHO scientific Group, Geneva, Suiza.
- Wilén, B.M., Onuki, M., Hermansson, M., Lumley, D., Mino, T., 2008. Microbial community structure in activated sludge floc analysed by fluorescence in situ hybridization and its relation to floc stability. *Water Res.* 42, 2300-2308.
- Witzig, R., Manz, W., Rosenberger, S., Krugerb, U., Kraumb, M., Szewzyk, U., 2002. Microbiological aspects of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater. *Water Res.* 36, 394-402.
- Xia, S., Jia, R., Feng, F., Xie, K., Li, H., Jing, D., Xu, X., 2012. Effect of solids retention time on antibiotics removal performance and microbial communities in an A/O-MBR process. *Bioresour. Technol.* 106, 36-43.
- Xing, C.H., Tardieu, E., Qian, Y., Wen, W.H., 2000. Ultrafiltration membrane bioreactor for urban wastewater reclamation. *J. Memb. Sci.* 177, 73-82.
- Yamamoto, N., Kimura, M., Matsuki, H., Yanagisawa, Y., 2010. Optimization of a real-time PCR assay to quantitative airborne fungi collected on a gelatin filter. *J. Biosci. Bioeng.* 109, 83-88.
- Yang, Q., Angly, F.E., Wang, Z., Zhang, H., 2011. Wastewater treatment systems harbour specific and diverse yeast communities. *Biochem. Eng. J.* 58-59, 168-176.
- Yang, Q., Zhang, H., Li, X., Wang, Z., Xu, Y., Ren, S., Chen, X., Xu, Y., Hao, H., Wang, H., 2013. Extracellular enzyme production and phylogenetic distribution of yeasts in wastewater treatment systems. *Bioresour. Technol.* 129, 264-273.

- Zhang, T., Fang, H.H.P., 2006. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 281-289.
- Zhang, B., Sun, B., Ji, M., Liu, H., Liu, X., 2010. Quantification and comparison of ammonia-oxidizing bacterial communities in MBRs treating various types of wastewater. *Bioresour. Technol.* 101, 3054-3059.
- Zhang, T., Shao, MF., Ye, L., 2012. 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J.* 6, 1137-1147.
- Zheng, S., Sun, J., Han, H., 2011. Effect of dissolved oxygen changes on activated sludge fungal bulking during lab-scale treatment of acidic industrial wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8928-8934.