



UNIVERSIDAD DE GRANADA



---

# **Desarrollo de una Nueva Tecnología de Eliminación de Nitrógeno basada en Procesos de Nitrificación Parcial-Anammox mediante Biofiltración en Lecho Fijo**

**Tesis Doctoral**

---

**María Jesús García Ruiz**

Programa de Doctorado de Ingeniería Civil

**2018**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: María Jesús García Ruiz  
ISBN: 978-84-9163-940-4  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/52513>



La doctoranda Dña. *María Jesús García Ruiz* y el director de la Tesis D. *Jesús González López*, garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección del director de Tesis y hasta donde nuestro 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, 15 de Mayo de 2018

Doctorando

Director de la Tesis

Fdo: Dña. **María Jesús García Ruiz**

Fdo: D. **Jesús González López**  
Catedrático de Universidad  
Departamento de Microbiología  
Universidad de Granada



La presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias al Proyecto de Investigación “DENITOX: Desarrollo de una nueva Tecnología Medioambiental de Desnitrificación basada en la Oxidación Anaerobia Autotrófica”, concedido por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI, Ministerio de Economía y Competitividad, España), y el European Economic Area, de la Comunidad Europea, en el marco del programa Science, Technology and Environmental and Climate Change (EEA Grants) (Ref.: IDI 20140117).



Los resultados obtenidos en esta **Tesis Doctoral** han sido los siguientes:

***Publicaciones en revistas internacionales indexadas en JCR:***

**García-Ruiz, M.J.**; Maza-Márquez, P.; González-Martínez, A.; Campos, E.; González-López, J.; Osorio, F., Performance and bacterial community structure in three autotrophic submerged biofilter bioreactors operated under different operational conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2018. [10.1002/jctb.5598](https://doi.org/10.1002/jctb.5598) (Publicado online).

**García-Ruiz, M.J.**; Maza-Márquez, P.; González-López, J.; Osorio, F., Nitrogen removal capacity and bacterial community dynamics of a Canon biofilter system at different organic matter concentrations. *Chemosphere*, 2018. 193, 591-601.

**García-Ruiz, M.J.**; Castellano-Hinojosa, A.; González-López, J.; Osorio, F., Effects of salinity on the nitrogen removal efficiency and bacterial community structure in fixed-bed biofilm CANON bioreactors. *Chemical Engineering Journal*, 2018. 347, 156-164.

***Patente:***

**García-Ruiz, M.J.**; Osorio, F.; González-López, J.; González-Martínez, A.; Campos, E.; Terrero, P.; Zarzo, D., Método y sistema de eliminación autotrófica de nitrógeno en aguas residuales mediante biofiltración en lecho fijo. *Valoriza Agua S.L.*, Septiembre, 2016. Ref.: 2562379.

***Congresos internacionales:***

**García-Ruiz, M.J.**; González-López, J.; Osorio, F., Effect of salinity on the treatment of effluents with high nitrogen load. IWARESA, IWA Regional Conference on Water Reuse and salinity, Murcia, España, 2018.

**García-Ruiz, M.J.**; Maza-Márquez, P.; González-Martínez, A.; Campos, E.; Gallardo, M.; González-López, J.; Osorio, F., Study of performance and bacterial community structure on autotrophic submerged biofilter bioreactors operated under different conditions. Bioremid 2017: International Meeting on New Strategies in Bioremediation Processes. Universidad de Granada, Granada, 2017.

Campos, E.; Terrero, P.; Osorio, F.; **García-Ruiz, M.J.**; González-López, J. Tecnología de lecho fijo sumergido de nitrificación parcial anammox en una única etapa. XI Congreso Internacional AEDYR. Valencia, España, 2016.

Además, durante este período posgradual, la doctoranda ha participado en los siguientes ***trabajos de investigación publicados en revistas internacionales indexadas en JCR (SELECCIÓN)***:

González Martínez A.; Rodríguez Sánchez A.; Tommaso L.; **García-Ruiz M.J.**; Osorio F.; González López J.; Van Loosdrecht, M. Comparison of bacterial communities of conventional and A-stage activated sludge systems. *Scientific Reports*. 6 - 18786, 2016. Índice de impacto: 4.259



González Martínez A.; Rodríguez Sánchez A.; **Garcia-Ruiz M.J.**; Muñoz Palazón B.; Carmen Cortés Lorenzo; Francisco Osorio Robles; Vahala, Riku. Performance and bacterial community dynamics of a CANON bioreactor acclimated from high to low operational temperatures. *Chemical Engineering Journal*. 287, pp. 557 - 567. 2016. Índice de impacto: 6.216

González Martínez A.; Rodríguez Sánchez A.; **Garcia-Ruiz M.J.**; Osorio F.; González López J., Impact of methionine on a partial-nitrification biofilter. *Environmental Science and Pollution Research*. 23 - 7, pp. 6651 - 6660. 2016. Índice de impacto: 2.741

González Martínez A.; Rodríguez Sánchez A.; **Garcia-Ruiz M.J.**; Osorio F.; González López J., Archaeal and bacterial community dynamics and bioprocess performance of a bench-scale two-stage anaerobic digester. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Índice de impacto: 3.420

González Martínez A.; Rodríguez Sánchez A.; Muñoz Palazón B.; **Garcia-Ruiz M.J.**; Osorio F.; Van-loosdreth, M.; González López J.; Microbial community analysis of a full-scale DEMON bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 38 - -, pp. 499 - 508. 2015. Índice de impacto: 1,901

González Martínez A.; Rodríguez Sánchez A.; **Garcia-Ruiz M.J.**; Osorio F.; Rivadeneira Ruiz, M.A.; González López J. Effect of methionine amino acid over the performance process and bacterial community structure of a partial bench-scale nitrification biofilter. *Amino Acids*. 47 - 8, pp. 1691 - 1691. 2015. Índice de impacto: 3,196

González-Martínez, A.; Morillo, J.A.; **Garcia-Ruiz M.J.**; González López J.; Osorio F., Martínez-Toledo, M.V.; Van Loosdreth, M. Archaeal populations in full-scale autotrophic nitrogen removal bioreactors operated with different technologies: CANON, DEMON and partial nitrification/anammox. *Chemical Engineering Journal*. 277, pp. 194 - 201. 2015. Índice de impacto: 6.216

González Martínez A.; Rodríguez Sánchez A.; Martínez Toledo M.V.; **Garcia-Ruiz M.J.**; Osorio F.; González López J., The effect of influent characteristics and operational conditions over the performance and microbial community structure of partial nitrification reactors. *Water*. 6 - 7, pp. 1905 - 1924. 2014. Índice de impacto: 1.428

González Martínez A.; Rodríguez Sánchez A.; Martínez Toledo M.V.; **Garcia-Ruiz M.J.**; Hontoria García E.; Osorio F.; González López J., Effect of ciprofloxacin antibiotic on the partial-nitrification process and bacterial community structure of a submerged biofilter. *Science of the Total Environment*. 476-477, pp. 276 - 287. 2014. Índice de impacto: 4.099

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento al director y al tutor de esta tesis doctoral, los catedráticos **D. Jesús González López y D. Francisco Osorio Robles**, por la dedicación que han brindado a este trabajo, por el seguimiento y el rigor que han aportado al mismo, por la supervisión y la orientación proporcionada durante este tiempo. Gracias por la confianza, motivación y apoyo que me han ofrecido continuamente.

Asimismo, dar las gracias por el interés, el apoyo y el aprendizaje recibidos en esta etapa, a mis compañeros del Departamento de Ingeniería Civil y en especial a mis compañeros del Área de Tecnologías del Medio Ambiente, así como a mis compañeros del Instituto del Agua.

Pero este trabajo de investigación también es fruto de la enseñanza, apoyo y reconocimiento de las personas que forman parte de mi vida, mi familia y amigos. En especial a mis abuelos, a mis hijos, por su comprensión aun sin tener edad para entenderlo, a mi marido y a mis padres.



## ÍNDICE GENERAL

<b>1. Resumen.....</b>	<b>21</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>25</b>
2.1. El nitrógeno y su problemática.....	26
2.2. Sistema convencional de nitrificación/desnitrificación. ....	29
2.3. Desnitrificación aeróbica .....	32
2.4. Sistemas autotróficos de eliminación de nitrógeno.....	33
2.5. Comparación de los diferentes sistemas .....	37
2.6. Efecto de las condiciones operacionales en la comunidad de bacterias anamnox.....	39
2.6.1. Influencia del ph.....	39
2.6.2. Influencia de la temperatura.....	40
2.6.3. Influencia de la concentración de nitritos .....	41
2.6.4. Influencia de la materia orgánica .....	42
2.6.5. Influencia de la salinidad .....	43
2.7. Perspectivas futuras. ....	44
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>46</b>
3.1. Objetivo principal .....	46
3.2. Objetivos secundarios .....	46
<b>4. Materiales y métodos .....</b>	<b>48</b>
4.1. Planta a escala de laboratorio.....	48
4.1.1. Esquema de la planta a escala de laboratorio .....	48
4.1.2. Material soporte .....	49
4.1.3. Bomba de agua .....	50
4.1.4. Bombas de aire.....	50
4.1.5. Cámara termostatazada.....	51

4.2. Composición del agua sintética .....	51
4.3. Instrumentos de medida y equipos de laboratorio.....	52
4.3.1. Medida de ph y oxígeno disuelto .....	52
4.3.2. Determinación de las concentraciones de amonio, nitrato y nitrito.....	52
4.4. Inóculo .....	53
4.5. Toma de muestras para análisis microbiológicos.....	53
4.6. microscopía electrónica de barrido .....	54
4.7. Purificación y extracción de ADN.....	54
4.8. Ensayos cuantitativos mediante qPCR.....	55
4.9. Análisis de la diversidad microbiana mediante secuenciación masiva con illumina .....	57
4.10. Análisis estadísticos .....	58
<b>5. Diseño y construcción de la planta piloto.....</b>	<b>60</b>
<b>6. Estudio comparativo de carriers (filtralite) .....</b>	<b>63</b>
<b>7. Resultados y discusión de los experimentos .....</b>	<b>68</b>
7.1. Experimento 1: Start-up de un sistema de biofiltros CANON bajo diferentes condiciones .....	68
7.2. Experimento 2: Sistema CANON configurado como filtros sumergidos bajo diferentes concentraciones de materia orgánica.....	92
7.3. Experimento 3: Sistema CANON de biofiltros bajo diferentes concentraciones de salinidad.....	111
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>137</b>
<b>9. Referencias.....</b>	<b>141</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>153</b>
Anexo I: Publicaciones.....	155
AnexoII: Patente .....	269

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1.</b> Ciclo del Nitrógeno.....	27
<b>Ilustración 2.</b> Configuración de procesos convencionales de eliminación de Nitrógeno.....	30
<b>Ilustración 3.</b> Esquema planta a escala de laboratorio .....	48
<b>Ilustración 4.</b> Bomba Watson Marlow 520 S.....	50
<b>Ilustración 5.</b> Disposición de bombas de aire .....	50
<b>Ilustración 6.</b> Cámara Termostatizada.....	51
<b>Ilustración 7.</b> Cromatógrafo ionico utilizado en la determinación de cationes e iones.....	53
<b>Ilustración 8.</b> Reactores en su disposición definitiva .....	62
<b>Ilustración 9.</b> Eficiencia de eliminación de amonio en cada reactor al final del periodo experimental.....	64
<b>Ilustración 10.</b> Concentración de nitrógeno total en los efluentes de cada reactor al final del periodo experimental.....	64
<b>Ilustración 11.</b> Diagrama de cajas para las concentraciones de amonio de los efluentes según los reactores.....	66
<b>Ilustración 12.</b> Concentración de Nitrógeno total en los efluentes tratados. ....	70
<b>Ilustración 13.</b> Imágenes SEM de la biopelícula formada en los soportes bajo diferentes condiciones. Las imágenes A1 y A2 corresponden al biorreactor microaeróbico con adición de nitrito (BR2); las imágenes B1 y B2 corresponden al al biorreactor microaeróbico sin adición de nitritos (BR3); las imágenes C1 y C2 al biorreactor anaeróbico con adición de nitritos (BR1).....	73
<b>Ilustración 14.</b> Número de copias de bacterias 16S rRNA y AOB amoA (en escala logarítmica) por litro de fango activo. Cuantificado mediante qPCR en inóculo y biorreactores. BR1: biorreactor anóxico y con adición de nitritos; BR2: biorreactor microaeróbico y con adición de nitritos; BR2: biorreactor microaeróbico y con adición de nitritos; BR3: biorreactor microaeróbico sin adición de nitritos. Línea discontinua representa el ratio AOB amoA/ 16S rRNA bacteriano. ....	74
<b>Ilustración 15.</b> Curvas de rarefacción generadas a nivel Otus (97% de similitud) para la secuenciación con Illumina filtrada y normalizada según las lecturas totales de bacterias obtenidas para inóculo y biorreactores. BR1: biorreactor	

anóxico y con adición de nitritos; BR2: biorreactor microaeróbico y con adición de nitritos; BR3: biorreactor microaeróbico sin adición de nitritos. ....	76
<b>Ilustración 16.</b> Análisis dendograma que ilustra la similitud de la comunidad bacteriana en el inóculo y biorreactores. Reactor anóxico operando con nitrito (BR1), biorreactor aireado operando con nitrito (BR2) y biorreactor aireado operando sin nitrito (BR3). El clustering fue generado por el algoritmo UPGMA, usando la matriz de la semejanza de la distancia de Bray-Curtis generada de la abundancia relativa de 54 OTUs bacterianas identificadas por Illumina-sequencing.....	77
<b>Ilustración 17.</b> Heatmap que muestra la abundancia relativa de OTUs bacterianas detectadas por secuenciación Illumina en inóculo y biorreactores operados bajo diferentes condiciones. BR1: biorreactor anóxico y con adición de nitritos; BR2: biorreactor microaeróbico y con adición de nitritos; BR3: biorreactor microaeróbico sin adición de nitritos. Clasificación a nivel de Phylum (A) y Orden (B).....	79
<b>Ilustración 18.</b> Heatmaps que muestra la abundancia relativa de OTUs bacterianas detectadas por secuenciación Illumina en inóculo y biorreactores operados bajo diferentes condiciones. BR1: biorreactor anóxico y con adición de nitritos; BR2: biorreactor microaeróbico y con adición de nitritos; BR3: biorreactor microaeróbico sin adición de nitritos. Clasificación a nivel de Familia (A) y Género (B). ....	80
<b>Ilustración 19.</b> Gráficos Non-metric multidimensional scaling (NMDS) que ilustran las ordenaciones de las muestras del inóculo y biorreactores, según la similitud relativa de sus comunidades bacterianas analizadas por la secuenciación illumina. En la izquierda, los vectores representan la dirección a lo largo de la ordenación de las abundancias relativas de las unidades taxonómicas operacionales. En la derecha, los vectores representan la fuerza y la influencia direccional a lo largo de la ordenación de las variables abióticas: NO <sub>2</sub> -N en el influente, oxígeno disuelto (DO), NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N en el efluente, NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N en el efluente, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N en el efluente and eficiencia de nitrógeno total (%). Las variables abióticas que mejor explican las distribuciones de los datos bióticos según el análisis bio-env están marcadas con un asterisco (*). ....	87
<b>Ilustración 20.</b> Concentraciones diarias de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N, NO <sub>2</sub> -N, NO <sub>3</sub> -N and COD en los efluentes de los distintos biorreactores. Biorreactor operando sin materia orgánica (R0). Biorreactor funcionando con 100 mgCOD L <sup>-1</sup> (R1). Biorreactor funcionando con 400 mgCOD L <sup>-1</sup> (R2). ....	94
<b>Ilustración 21.</b> Eficiencias de eliminación de los Biorreactores al final del experimento; Biorreactor operando sin materia orgánica (R0). Biorreactor funcionando con 100 mgCOD L <sup>-1</sup> (R1). Biorreactor funcionando con 400 mgCOD L <sup>-1</sup> (R2). Resultados obtenidos en los últimos 10 días. ....	98

- Ilustración 22.** Análisis clúster de Bray-Curtis mostrando la similitud de la comunidad bacteriana en el inóculo y biorreactores: Biorreactor operando sin materia orgánica (R0). Biorreactor funcionando con 100 mgCOD L<sup>-1</sup> (R1). Biorreactor funcionando con 400 mgCOD L<sup>-1</sup> (R2)..... **100**
- Ilustración 23.** Heatmap de las abundancias relativas de las OTUs detectadas por secuenciación con Illumina en las diversas muestras: Inóculo. Biorreactor operando sin materia orgánica (R0). Biorreactor funcionando con 100 mgCOD L<sup>-1</sup> (R1). Biorreactor funcionando con 400 mgCOD L<sup>-1</sup> (R2). A. Clasificación a nivel de phylum. B. Clasificación a nivel de Orden. C. Clasificación a nivel de género. .... **102**
- Ilustración 24.** Gráficos Non-metric multidimensional scaling (NMDS) que ilustran las ordenaciones del inóculo y biorreactores, según la similitud relativa de sus comunidades bacterianas analizadas por la secuenciación illumina. Biorreactor operando sin materia orgánica (R0). Biorreactor funcionando con 100 mgCOD L<sup>-1</sup> (R1). Biorreactor funcionando con 400 mgCOD L<sup>-1</sup> (R2). RD: ratio de desnitrificación heterótrofa. COD eff: eficiencia de eliminación de COD..... **108**
- Ilustración 25.** Concentraciones diarias de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N en los efluentes de los diferentes biorreactores. Biorreactores operando con 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) y 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente..... **114**
- Ilustración 26.** Heatmap de las abundancias relativas de las Otus detectadas por secuenciación con Illumina en las diversas muestras: Inóculo (I). Biorreactores operando con 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) y 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente. A: 15 a los 15 días del comienzo de la fase I. B: a los 30 días desde que comenzó la fase I. C: a los 60 días desde el comienzo de la fase I..... **118**
- Ilustración 27.** Heatmap de las abundancias relativas de las Otus detectadas por secuenciación con Illumina en las diversas muestras: Inóculo (I). Biorreactores operando con 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) y 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente. D: a los 15 días del comienzo de la fase II. E: a los 30 días desde que comenzó la fase II. F: a los 60 días desde el comienzo de la fase II. .... **121**
- Ilustración 28.** Gráficos Non-metric multidimensional scaling (NMDS) que ilustran las ordenaciones los biorreactores (R0, R1, R2 and R3 con 0, 3, 25 y 45 g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente, según la similitud relativa de sus comunidades bacterianas analizadas por la secuenciación illumina NTE: eliminación nitrógeno total; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N Eff.: concentración NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N en el efluente. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N Eff.: concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N en el efluente y salinidad. . A: a los 15 días del comienzo de la fase I. B: a los 30 días desde que comenzó la fase I C: a los 60 días desde el comienzo de la fase I..... **124**
- Ilustración 29.** Gráficos Non-metric multidimensional scaling (NMDS) que ilustran las ordenaciones los biorreactores (R0, R1, R2 and R3 con 0, 3, 25 y 45 g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente, según la similitud relativa de sus comunidades



bacterianas analizadas por la secuenciación illumina NTE: eliminación nitrógeno total; NO<sub>2</sub>-N Eff.: concentración NO<sub>2</sub>-N en el efluente. NO<sub>3</sub>-N Eff.: concentración de NO<sub>3</sub>-N en el efluente y salinidad. D: a los 15 días del comienzo de la fase II. E: a los 30 días desde que comenzó la fase II F: a los 60 días desde el comienzo de la fase II.....**125**

**Ilustración 30.** Análisis clúster de Bray-Curtis mostrando la similitud de la comunidad bacteriana en el inóculo y biorreactores: 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) and 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectively. . A: a los 15 días del comienzo de la fase I. B: a los 30 días desde que comenzó la fase I C: a los 60 días desde el comienzo de la fase I. D: a los 15 días del comienzo de la fase II. E: a los 30 días desde que comenzó la fase II F: a los 60 días desde el comienzo de la fase II.....**127**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Requisitos para vertidos de EDARs en zonas sensibles. Directiva 98/271/CE.....	<b>19</b>
<b>Tabla 2.</b> Implementación de tecnologías anammox a escala real.....	<b>25</b>
<b>Tabla 3.</b> Comparación de diferentes sistemas de eliminación de nitrógeno (Rittmann and McCarty, 2001; Schmidt et al. 2003; McCarthy et al. 1969; Van Dongen et al. 2001; Mulder, 2003).....	<b>30</b>
<b>Tabla 4.</b> Características de los soportes utilizados en cada reactor.....	<b>41</b>
<b>Tabla 5.</b> Cebadores y condiciones de los ciclos de qPCR.....	<b>48</b>
<b>Tabla 6.</b> Resultados del análisis de contraste de cada reactor comparado con reactor 4.....	<b>57</b>
<b>Tabla 7.</b> Resultados del análisis de contraste de cada reactor comparado con reactor 4.....	<b>58</b>
<b>Tabla 8.</b> Condiciones operacionales y resumen de resultados. BR1. Biorreactor bajo condiciones anaeróbicas y con adición de nitritos. BR2. Bajo condiciones aeróbicas y con adición de nitritos. BR3. Bajo condiciones aeróbicas y sin adición de nitritos.....	<b>61</b>
<b>Tabla 9.</b> Número de copias de 16S rRNA bacteriano y AOB cuantificados en inóculo y biorreactores. Abundancia relativa de AOB, expresado como porcentaje de bacterias totales. Los datos seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente de acuerdo con Student's t-test ( $p < 0.05$ ).....	<b>66</b>
<b>Tabla 10.</b> Número de lecturas e índices de diversidad y riqueza: richness (S), Good's coverage, Chao-1, Shannon-Wiener ( $H'$ ) and Simpson evenness. Obtenidos a partir de los datos de secuenciación Illumina en el inóculo y biorreactores. CI: intervalos de confianza al 95% ( $p < 0.05$ ).....	<b>68</b>
<b>Tabla 11.</b> Unidades taxonómicas operacionales (OTUs) que contribuyen mayoritariamente a la similitud global de las comunidades bacterianas en inóculo y biorreactores. BR1: biorreactor anóxico y con adición de nitritos; BR2: biorreactor microaeróbico y con adición de nitritos; BR3: biorreactor microaeróbico sin adición de nitritos. Análisis SIMPER.....	<b>74</b>
<b>Tabla 12.</b> Unidades taxonómicas operacionales (OTUs) que contribuyen mayoritariamente a la no semejanza de las comunidades bacterianas entre las diferentes condiciones de inóculo y BRs: BR1: biorreactor anóxico y con adición de nitritos; BR2: biorreactor microaeróbico y con adición de nitritos; BR3: biorreactor microaeróbico sin adición de nitritos.....	<b>75</b>

<b>Tabla 13.</b> Coeficientes de correlación producto-momento Pearson (r) entre los vectores de la Ilustración 7, que representan las abundancias relativas de las diferentes unidades taxonómicas operacionales detectadas por la secuenciación con Illumina en las muestras bióticas (inóculo y biorreactores) y la variables abióticas: NO <sub>2</sub> -N en el influente, oxígeno disuelto (OD), NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N en el efluente, NO <sub>2</sub> -N en el efluente, NO <sub>3</sub> -N en el efluente and eficiencia de nitrógeno total (%).	<b>80</b>
<b>Tabla 14.</b> Concentraciones de los influentes y condiciones operacionales en los tres Biorreactores con diferentes concentraciones de materia orgánica. Biorreactor operando sin materia orgánica (R0). Biorreactor funcionando con 100 mgCOD L <sup>-1</sup> (R1). Biorreactor funcionando con 400 mgCOD L <sup>-1</sup> (R2).	<b>85</b>
<b>Tabla 15.-</b> Análisis estadístico sobre los últimos 10 días del experimento en los diferentes biorreactores. Biorreactor operando sin materia orgánica (R0). Biorreactor funcionando con 100 mgCOD L <sup>-1</sup> (R1). Biorreactor funcionando con 400 mgCOD L <sup>-1</sup> (R2).	<b>91</b>
<b>Tabla 16.</b> Número de lecturas e índices de diversidad y riqueza: richness (S), Good's coverage, Chao-1, Shannon-Wiener (H') y Simpson evenness. Obtenidos a partir de los datos de secuenciación con Illumina en el inóculo y biorreactores. CI: intervalos de confianza al 95% (p < 0.05). Biorreactor operando sin materia orgánica (R0). Biorreactor funcionando con 100 mgCOD L <sup>-1</sup> (R1). Biorreactor funcionando con 400 mgCOD L <sup>-1</sup> (R2).	<b>91</b>
<b>Tabla 17.</b> OTUs que mayoritariamente contribuyen a la similitud global de la comunidad bacteriana entre los biorreactores BRs según el análisis SIMPER.	<b>95</b>
<b>Tabla 18.</b> OTUs que contribuyen mayoritariamente a la disimilitud entre los diferentes biorreactores. A. Disimilitud media entre R0 x R2. B. Disimilitud media entre R0 x R1. C. Disimilitud media entre R1 x R2.	<b>95</b>
<b>Tabla 19.</b> Coeficientes de correlación producto-momento Pearson (r) las muestras bióticas (inóculo y biorreactores) obtenidas por secuenciación con Illumina y las variables abióticas: Eficiencia de eliminación de Nitrógeno, Eficiencia de eliminación de COD, Ratio de denitrificación heterótrofa y concentración de COD. A. Nivel de Orden. B. Nivel de Género.	<b>101</b>
<b>Tabla 20.</b> Parámetros Operacionales. Ratio y eficiencias obtenidas en los diferentes biorreactores y calculadas en los últimos 15 días de cada una de las fases. TRH: tiempo de retención hidráulico. T <sup>a</sup> : Temperatura. OD: Oxígeno Disuelto. NAR: Acumulación de nitritos sobre nitritos más nitratos. Biorreactores operando con 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) y 45 (R3) g NaCl L <sup>-1</sup> respectivamente.	<b>104</b>
<b>Tabla 21.</b> Concentración de compuestos nitrogenados medidos el último día de cada fase en cada uno de los biorreactores. Biorreactores funcionando con 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) y 45 (R3) g NaCl L <sup>-1</sup> respectivamente.	<b>108</b>

**Tabla 22.** Número de lecturas e índices de diversidad y riqueza: richness (S), Good's coverage, Shannon-Wiener ( $H'$ ) and Simpson evenness. Obtenidos a partir de los datos de secuenciación Illumina en el inóculo y muestreo de los biorreactores. CI: intervalos de confianza al 95% ( $p < 0.05$ ). Biorreactores operando con 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) y 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente. A: a los 15 días del comienzo de la fase I. B: a los 30 días desde que comenzó la fase I C: a los 60 días desde el comienzo de la fase I. D: a los 15 días del comienzo de la fase II. E: a los 30 días desde que comenzó la fase II F: a los 60 días desde el comienzo de la fase II..... **115**

**Tabla 23.** Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) que contribuyen mayoritariamente a la disimilitud en las comunidades bacterianas entre los biorreactores con diferentes concentraciones de salinidad. 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) y 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente. A: a los 15 días del comienzo de la fase I. B: a los 30 días desde que comenzó la fase I C: a los 60 días desde el comienzo de la fase I..... **120**

**Tabla 24.** Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) que contribuyen mayoritariamente a la disimilitud en las comunidades bacterianas entre los biorreactores con diferentes concentraciones de salinidad. 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) y 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente. D: a los 15 días del comienzo de la fase II. E: a los 30 días desde que comenzó la fase II. F: a los 60 días desde el comienzo de la fase II..... **124**



## **1. RESUMEN**

En la actualidad, los métodos más usuales de tratamiento de aguas residuales ricas en Nitrógeno, en estaciones depuradoras de aguas residuales, son los métodos de nitrificación-desnitrificación biológica. Este proceso implica elevados costes de explotación que podrían verse reducidos con el uso de nuevas biotecnologías.

Así, en los últimos años se han propuesto diferentes procesos de eliminación autotrófica del Nitrógeno en aguas residuales. Estas tecnologías se basan en una nitrificación parcial de amonio a nitrito junto con una oxidación anaeróbica de amonio. La combinación de ambos procesos biológicos da lugar a un sistema en el que el amonio es oxidado directamente a Nitrógeno molecular, sin pasar por la forma intermedia del nitrato, y sin necesidad de fuente aporte externo de Carbono orgánico.

En este contexto, en la presente tesis doctoral se ha evaluado una novedosa tecnología basada en procesos Anammox (del inglés Anaerobic Ammonium Oxidation), denominada Canon (del inglés Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite) que se caracteriza por llevarse a cabo en un único reactor y bajo condiciones microaerofílicas, lo cual la convierte en una solución más rentable y respetuosa con el medio ambiente. El proceso se ha desarrollado en biorreactores con la configuración de biofiltro en lecho fijo, utilizando como soporte el material comercializado bajo la marca Filtralite. Actualmente no existe ninguna tecnología de este tipo disponible en el mercado, lo que ha conducido a su patentado por parte del equipo de trabajo de esta investigación.

A lo largo de la investigación se ha estudiado la estructura de la comunidad bacteriana, así como las eficiencias de eliminación de nitrógeno en diferentes biorreactores a escala de laboratorio, trabajando bajo diferentes condiciones en distintos experimentos.

Durante los trabajos realizados se ha llegado a optimizar el arranque y la estabilidad de la biomasa en los biorreactores. Hay que tener presente que el proceso de arranque de estos sistemas es lento debido a la baja tasa de reproducción de las bacterias Anammox.

Dado que las poblaciones microbianas involucradas en estos procesos de eliminación de nitrógeno son microorganismos muy sensibles ante cualquier cambio en sus condiciones operacionales y/o ambientales, en la presente tesis se ha investigado la respuesta de esta tecnología bajo condiciones estresantes para estos microorganismos. En este sentido, se han estudiado dos casos que afectan notablemente a las poblaciones autotróficas de eliminación de nitrógeno, como son la presencia de materia orgánica en el influente y el tratamiento de un influente salino. En ambos casos, los resultados han mostrado eficiencias muy satisfactorias gracias al desarrollo de un consorcio entre diferentes metabolismos microbianos debido a la coexistencia de diferentes poblaciones bacterianas como AOB, Anammox y Desnitrificantes heterótrofas. Con todo ello se ha aumentado el conocimiento de respuesta de la comunidad microbiana y el consecuente funcionamiento de este proceso biotecnológico bajo diferentes condiciones operacionales. En definitiva, los resultados de esta investigación pueden ser importantes para la implantación a escala real de esta tecnología de biofiltración de lecho fijo combinado con sistema Canon.

## ABSTRACT

Currently, the most common methods of treating wastewater rich in nitrogen in wastewater treatment plants are biological methods based on nitrification-denitrification process. These methods involve high operating costs that could be reduced with the use of new biotechnologies.

In recent years several processes based on autotrophic nitrogen removal have been proposed in wastewater treatment. These technologies are based on a partial nitrification of ammonium nitrite and an anaerobic ammonium oxidation. The combination of both biological processes result in a system in which ammonia is oxidized to molecular nitrogen directly without going through the intermediate form of the nitrate, and an external source of organic carbon is not needed.

In this context, a novel technology based on Anammox processes (Anaerobic Ammonium Oxidation), called Canon (Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite) has been evaluated. Canon process is characterized by being carried out in a single reactor and under microaerophilic conditions which makes it a more cost effective and a friendly solution with environment. The process has been developed under the configuration of a fixed bed biofilter using Filtralite as support material. This technology does not currently exist in the market. So it has led to the patent by the research team of this investigation.

Throughout the investigation, we have studied the structure of the bacterial community as well as removal efficiencies of nitrogen in various laboratory scale bioreactors working under different conditions in various experiments.

Along the work developed startup and stability of biomass in bioreactors has been optimized. It must be kept in mind that the boot process of these systems is slow due to the low reproductive rate of the specific bacteria of these systems.

Because microbial populations involved in these nitrogen removal systems are very sensitive to any change in operating and / or environmental conditions, in this thesis the response of this technology under stressful conditions for these organisms has been investigated. So, two cases that significantly affect autotrophic nitrogen removal populations have been studied, such as the presence of organic



matter in the influent and the treatment of saline influent. In both cases, the efficiency results have been very satisfactory. The development of a microbial consortium with different metabolisms due to the coexistence of different bacterial populations as AOB, Anammox and Denitrifying heterotrophic has been observed. This has increased awareness of the microbial community response and subsequent operation of this bioprocess under different operating conditions. Ultimately, the results of this research may be important to implement full-scale Canon system plants using fixed-bed biofiltration technology.

## **2. INTRODUCCIÓN**

El incremento de la población y la actividad humana en las últimas décadas ha determinado que el consumo de agua se haya visto aumentando de forma significativa, y con ello, que el ser humano que no hace muchos años representaba una pequeña parte del ciclo del agua, a día de hoy, se haya convertido en un factor determinante (Balaguer et al. 1998). Además, la consecuencia inmediata de esta realidad, es que la actividad antropogénica ha afectado en gran medida no solo a la cantidad de los recursos hídricos sino también a la calidad de los mismos. En este sentido existe una clara preocupación sobre los posibles deterioros de nuestras aguas subterráneas y superficiales como consecuencia de la actividad humana.

No obstante lo mencionado, de igual modo que el ser humano y su actividad están afectando a las masas de agua, también es el único que tiene capacidad para evitar la contaminación de las mismas. En este sentido, cada vez más, se intenta concienciar a la población y se establecen regulaciones que permiten reducir los contaminantes generados por la industria, la agricultura y los núcleos urbanos, evitando así que los sistemas acuáticos se vean afectados de manera irreversible. La Unión Europea en el año 2000 estableció un marco comunitario para la protección y gestión de las aguas (Directiva Marco 2000/60/CE) mediante el cual establece definiciones y características de las aguas europeas por cuencas y demarcaciones hidrográficas, e incorpora planes de gestión y programas de medidas apropiados para cada masa de agua. Nace una nueva cultura del agua (Prat et al. 2004; Arrojo et al. 2006) con la que se pretende evitar el incremento de los problemas ambientales de los últimos años.

La depuración de las aguas residuales presenta un papel fundamental en este contexto. Mediante la depuración de las aguas residuales se puede mejorar la calidad del agua necesaria para mantener un buen estado ecológico de las masas de agua. No sólo eliminando materia orgánica y sólidos en suspensión (contaminantes principales de un agua residual urbana) sino también controlando el contenido de nutrientes como son el nitrógeno y el fósforo, si el medio receptor es considerado una zona sensible según la Directiva 91/271/CEE.

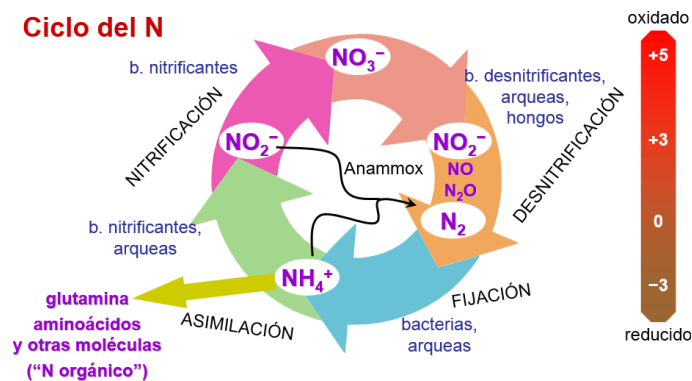
## 2.1. EL NITRÓGENO Y SU PROBLEMÁTICA

El nitrógeno es un nutriente básico para la vida de los seres vivos. Este nutriente está presente en la atmósfera en un 78% en forma de  $N_2$ , aunque solo determinados microorganismos procariotas (fijadores de nitrógeno atmosférico) son capaces de asimilarlo en esta forma molecular. La mayoría de los seres vivos tienen que incorporarlo en forma de amonio ( $NH_4^+$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ) o como aminoácidos, aunque es evidente que estas formas de N no son muy abundantes en la naturaleza, especialmente en sistemas acuáticos de naturaleza oligotrófica.

Existen microorganismos heterotróficos como son *Rhizobium*, *Azotobacter* y *Clostridium*, o fotosintéticos como las cianobacterias capaces de fijar el  $N_2$  (**fijación**) y transformarlo en  $NH_4^+$ . Posteriormente este N combinado o biotransformado a N orgánico o  $NO_3^-$ , puede ser asimilado por distintos organismos (**asimilación**). Además, diferentes microorganismos transforman los compuestos orgánicos nitrogenados en amonio mediante la descomposición de los seres vivos, los excrementos y la orina, a este proceso se le denomina **amonificación**. Las bacterias oxidadoras de amonio (AOB) como *Nitrosomonas* o *Nitrosococcus*, y algunas Archaeas oxidadoras de amonio (AOA) pueden utilizar el amonio presente en el suelo y en el agua y transformarlo en nitrito ( $NO_2^-$ ) en condiciones aerobias. Posteriormente, y también bajo condiciones de aerobiosis, otros microorganismos (NOB) quimiolitotrofos como *Nitrobacter* y *Nitrospira* pueden oxidar el nitrito a nitrato, cumplimentando un proceso biogeoquímico que denominamos **nitrificación**. Por último, cuando se encuentran en condiciones anóxicas, otros microorganismos generalmente procariotas heterótrofos (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paracoccus denitrificans*), pueden transformar el nitrato presente en nitrógeno gas, consumiendo el nitrato presente en el suelo o el agua y limitando su presencia en los mismos. Este proceso biológico es conocido como **desnitrificación**.

Todo el conjunto de pasos mencionados, configura lo que se podría denominar el ciclo biogeoquímico del N convencional. Sin embargo este ciclo fue modificado en los años 90 (**Ilustración 1**) tras la descripción de unas bacterias capaces de oxidar el amonio de un modo diferente al convencional.

Específicamente en esa década se describió un proceso biológico mediante el cual, en condiciones anaerobias unas bacterias amonio oxidantes son capaces de transformar el amonio a nitrógeno molecular utilizando el nitrito como aceptor de electrones. Este proceso de naturaleza autotrófica se conoce como proceso Anammox (Anaerobic Ammonium Oxidation) y lo realizan un grupo de bacterias autótrofas por lo que no necesitan materia orgánica. Algunos ejemplos de estos microorganismos Anammox son *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Jettenia* y *Candidatus Scalindua*.



**Ilustración 1.** Ciclo del Nitrógeno

El aumento de la población y sus actividades están alterando el ciclo del N en la naturaleza. En este sentido, el problema de la contaminación ambiental por nitrógeno deriva de distintas actividades domésticas, industriales y agrícolas que incrementan de forma severa la concentración de fuentes combinadas de N en los hábitats naturales modificando los equilibrios del ciclo del N y provocando ciertos efectos indeseables como el incremento de la concentración de  $\text{N}_2\text{O}$  en la atmósfera, incremento de la concentración de nitratos en las aguas subterráneas o procesos de eutrofización. Por tanto, la presencia de nitrógeno en las aguas residuales urbanas e industriales, fertilizantes de nitrógeno sintéticos, y contaminantes industriales específicos son un evidentemente riesgo ambiental significativo que debe ser eliminado antes de su vertido en aguas naturales. Tanto es así que la Directiva 91/271/CEE posteriormente enmendada en la Directiva 98/271/CE, establece unos requisitos para los vertidos de las Estaciones

Depuradoras De Aguas Residuales (EDARs) en zonas sensibles (**Tabla 1**) con el fin de “proteger el medio ambiente de cualquier efecto adverso debido a la descarga de aguas (no tratadas) urbanas e industriales”.

**Tabla 1.** Requisitos para vertidos de EDARs en zonas sensibles. Directiva 98/271/CE.

Parámetro	Concentración	Porcentaje mínimo de reducción <sup>1</sup>
Fósforo Total	2 mg/L P (10.000-100.000 h-e) 1 mg/L N (> 100.000 h-e)	80
Nitrógeno Total <sup>2</sup> mg/L N	15 <sup>3</sup> mg/L (10.000-100.000 h-e) 10 mg/L (> 100.000 h-e)	70-80

<sup>1</sup>Reducción relacionada con la carga de caudal de entrada.

<sup>2</sup>Nitrógeno Total equivalente a la suma del nitrógeno Kjeldahl total (N orgánico y amoniacal), nitrógeno en forma de nitrato (NO<sub>3</sub>) y nitrógeno en forma de nitrito (NO<sub>2</sub>).

<sup>3</sup>Estos valores de concentración constituyen medias anuales según el punto 3º del apartado A) 2 del Anexo III del RD. 509/96. No obstante, los requisitos relativos al nitrógeno pueden comprobarse mediante medias diarias cuando se demuestre, que de conformidad con el apartado A)1 del Anexo III se obtiene el mismo nivel de protección. En ese caso la media diaria no deberá superar los 20 mg/L de Nitrógeno total para todas las muestras, cuando la temperatura del efluente del reactor biológico sea superior o igual a 12 ° C. En sustitución del requisito relativo a la temperatura, se podrá aplicar una limitación del tiempo de funcionamiento que tenga en cuenta las condiciones climáticas regionales.

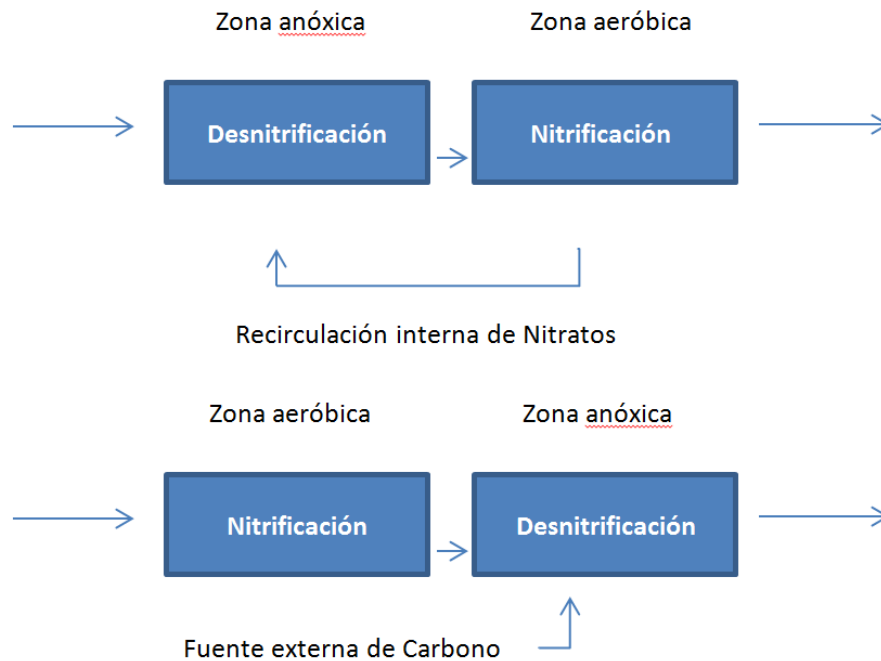
Uno de los retos científicos y tecnológicos más importantes en bioingeniería ambiental en los últimos años, ha sido la búsqueda de sistemas de tratamiento de efluentes con altas concentraciones de nutrientes que permitan reducir de forma eficiente los impactos ambientales que su vertido genera. En este contexto, la búsqueda de tecnologías para la eliminación de nitrógeno en las aguas residuales urbanas e industriales ha sido y es un reto de gran importancia. Hasta la fecha, los sistemas biológicos de eliminación de nitrógeno más usados han sido los que han combinado procesos convencionales de nitrificación-desnitrificación cuyas principales ventajas son alta eficacia de eliminación, alta estabilidad y un control de funcionamiento relativamente fácil. Sin embargo, en los últimos años, en lo que a investigación e implantación se refiere, se han desarrollado diferentes tecnologías de eliminación de nitrógeno basadas en sistemas Anammox (Strous et al. 1998; Jetten et al. 1999). En este sentido, la aplicación técnica de estos procesos

biológicos representan una nueva e innovadora biotecnología de eliminación de nitrógeno y pueden considerarse como una alternativa competitiva por su eficiencia y eficacia a los sistemas convencionales.

## 2.2. SISTEMA CONVENCIONAL DE NITRIFICACIÓN/DESNITRIFICACIÓN.

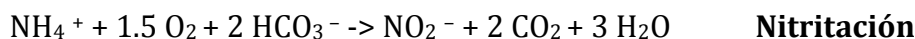
Con carácter general, la mayoría de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) con eliminación de Nitrógeno cuyo influente contiene normalmente amonio, están configuradas con un proceso de nitrificación/desnitrificación biológica (principalmente en las aguas residuales ricas en nitrógeno, pero pobres en carbono orgánico) o con desnitrificación / nitrificación (principalmente en aguas residuales urbanas, con alto contenido en sustancias orgánicas). El hecho de que las bacterias implicadas en estos procesos biológicos proliferen bajo diferentes condiciones determina que los procesos se separen en diferentes reactores y que éstos sean diseñados para cada uno de dichos procesos. Por ello, la mayoría de estos tratamientos biológicos implica una combinación de dos reactores separados bajo condiciones aerobias y anóxicas. En definitiva, la implantación del sistema biológico convencional es posible en dos configuraciones diferentes (**Ilustración 2**): Desnitrificación / Nitrificación o Nitrificación /Desnitrificación.

El sistema de pre-desnitrificación es la combinación de un proceso anóxico seguido de un proceso aeróbico sin adición de carbono orgánico y con recirculación interna del efluente tratado. Por otra parte, la posterior desnitrificación combina primero un proceso aeróbico seguido de un anóxico (Ganczarczyk and Sabaratnam, 1988). La eliminación de Nitrógeno mediante esta disposición no necesita recirculación interna pero requiere una fuente de carbono externa. Es más frecuente encontrar Plantas de Tratamiento de Agua residual con pre-desnitrificación, aunque la otra configuración (post-desnitrificación) es también una alternativa.



**Ilustración 2.** Configuración de procesos convencionales de eliminación de Nitrógeno.

Desde un punto de vista microbiológico, las bacterias oxidadoras de amonio (AOB) más frecuentemente encontradas en los reactores de nitrificación son  $\gamma$ -proteobacteria como *Nitrosococcus oceanus* y *Nitrosococcus halophilus* (Koops et al. 1990), o  $\beta$ -proteobacterias como *Nitrosomonas* y *Nitrospira* (Teske et al. 1994). Estos microorganismos son capaces de oxidar el amonio a nitrito utilizando amonio como fuente de energía y oxígeno como un aceptor terminal de electrones. En cuanto a la oxidación de nitrito, los géneros más comunes encontrados en las plantas de tratamiento de aguas residuales son *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* y *Nitrospina* (Hawkins et al. 2010). Durante esta fase, se convierte el nitrito en nitrato mediante el uso de nitritos como fuente de energía y oxígeno como un aceptor de electrones. En consecuencia el proceso de nitrificación consiste en la conversión de amonio a nitrito seguido de la conversión de nitritos a nitratos, y en el cual el dióxido de carbono es la fuente de carbono ya que es un proceso autotrófico (Rittmann and McCarty, 2001; Henze et al. 2002). Una descripción del proceso se podría representar en las siguientes reacciones metabólicas:



Podríamos mencionar que en la fase de oxidación de amonio a nitrito, por cada mg de nitrógeno de amonio oxidado se requieren 7,07 mg de  $\text{CaCO}_3$ . Debido a que el pH del biorreactor tiende a disminuir, cuando la alcalinidad del agua residual tratada se acerca a su agotamiento por el nitrito producido, si el biorreactor no es capaz de mantener un pH mayor que 7.0, el proceso no es tan eficaz.

Como mencionábamos anteriormente, en los procesos convencionales de nitrificación-desnitrificación, en este segundo proceso biológico el nitrato se reduce a  $\text{N}_2$ , nitrógeno gas, por microorganismos bajo condiciones anóxicas. En este proceso, la fuente de carbono y energía es la materia orgánica, y el nitrato es el aceptor de electrones final. Las bacterias más comunes en desnitrificación son *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Bacillus* (Myrold, 2005). Algunas arqueas halófilas (como *Halobacterium*) también son capaces de desnitrificar (Zumft, 1992). Este proceso de desnitrificación tiene la siguiente relación estequiométrica:



Una desnitrificación anóxica eficiente exige una variedad de donantes de electrones, como el etanol, acetato, metanol, lactato o glucosa (Henze et al. 2002). Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) es probablemente el compuesto más utilizado debido fundamentalmente a su bajo precio en relación a otras fuentes carbonadas pero además es un sustrato que favorece los procesos de desnitrificación heterotróficos (Rittmann and McCarty, 2001). No obstante, el acetato también ha sido profundamente utilizado en diversos trabajos experimentales.

Finalmente, podríamos recalcar que en la tecnología convencional de nitrificación-desnitrificación, el proceso de nitrificación necesita importantes cantidades de oxígeno y el proceso de desnitrificación requiere la adición de una fuente externa de carbono. Así, este sistema exige recursos importantes: 4,57 g  $\text{O}_2$   $\text{g}^{-1}$  N y aproximadamente 4 g COD  $\text{g}^{-1}$  N (Plaza et al. 2001). Obviamente, esta configuración incrementa los costes de la tecnología. Si por el contrario, este



sistema se configura como Desnitrificación/Nitrificación, no habría que añadir una fuente de carbono adicional, pero sería necesario una recirculación interna de los nitratos a la fase de desnitrificación. Este requerimiento junto con la alta demanda de oxígeno de la fase de nitrificación también incrementaría los costes de esta tecnología.

### 2.3. DESNITRIFICACIÓN AERÓBICA

En consonancia con el concepto convencional de eliminación de nitrógeno, la nitrificación requiere la presencia de oxígeno mientras que la desnitrificación debe ocurrir en condiciones anóxicas. Sin embargo, según Zumft (1992) hay algunas excepciones en las que la desnitrificación no precisa rigurosamente condiciones anaerobias. Algunas de las primeras bacterias desnitrificantes observadas en condiciones aerobias fueron *Thiomicrospira denitrificans*, en una planta piloto de tratamiento de aguas residuales (Juan GL et al. 2006), *Paracoccus denitrificans* (Ludwig et al. 1993), o *Pseudomonas stutzeri*, los investigadores observaron que era capaz de reducir nitrato a nitrógeno gas bajo desnitrificación aeróbica (Su et al. 2001).

La desnitrificación heterótrofa (o aeróbica) se ha descrito en muy distintas tecnologías de tratamiento de aguas residuales, tales como filtros de procesos continuos a escala real (Barnard et al. 1994), filtros sumergidos (Halling-Sorensen et al. 1992) y Biorreactores Secuenciales (SBR) (Ho, 1994). En este contexto, la desnitrificación aeróbica puede tener varias ventajas sobre los procesos de nitrificación/desnitrificación anteriormente descritos. En esta tecnología, nitrificación y desnitrificación pueden realizarse en un único biorreactor, no siendo necesario un segundo tanque (anóxico) ya que la nitrificación/desnitrificación ocurren simultáneamente en las mismas condiciones de trabajo, constantes en este sistema así el proceso es más fácil de controlar. Resulta por tanto evidente que la desnitrificación heterótrofa aeróbica es un proceso que abre nuevas vías de investigación y desarrollo tecnológico que a medio plazo puede modificar los conceptos de biotratamiento de efluentes con altas cargas de nitrato.

## 2.4. SISTEMAS AUTOTRÓFICOS DE ELIMINACION DE NITRÓGENO

Las tecnologías de eliminación autotrófica de nitrógeno han surgido recientemente como alternativas prometedoras para el tratamiento de aguas residuales con baja relación C: N. Los procesos de eliminación de nitrógeno autotróficos se basan en el metabolismo de bacterias Anammox. Estas bacterias son capaces de metabolizar nitrito y amonio, generando dinitrógeno gas, eliminando así el nitrógeno de la fase líquida (Hu et al. 2013). Las principales ventajas de un proceso autotrófico en comparación con los procesos de nitrificación-desnitrificación heterotróficos son menor generación de lodos, no requieren fuente de carbono externa y ahorro de costes de aireación, debido a que solo la mitad de amoníaco debe ser convertido a nitrito (Gonzalez-Silva et al. 2017).

Las tecnologías Anammox se basan en dos procesos que se producen bajo diferentes condiciones ambientales. Primero, una nitrificación parcial que exige condiciones aerobias, donde la mitad del amonio es oxidado a nitrito mediante bacterias oxidadoras de amonio (AOB). Seguido por el proceso Anammox que se realiza bajo condiciones anaeróbicas y sin requisitos de fuente de carbono, mediante el cual las bacterias Anammox utilizan el amonio y el nitrito y lo convierten en nitrógeno gas ( $N_2$ ). En la actualidad, la aplicación práctica de estas tecnologías se han desarrollado tanto en sistemas de un único reactor (Canon, Anita MOX® y DEMON) como en dos reactores (nitrificación parcial- Anammox), pudiéndose afirmar que constituyen una alternativa ampliamente implantada a escala real (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Implementación de tecnologías Anammox a escala real.

Tecnología	2 step Anammox	DEMON	CANON	CANON	CANON
Localización	Rotterdam (Holanda)	Apeldoorn (Holanda)	Olburgen (Holanda)	Meihua MSG-I West (China)	Meihua MSG-II East (China)
Biomasa	Granular	Microgranular	Granular	Granular	Granular
Volumen Reactor (m <sup>3</sup> )	72	2900	600	6750	4100
pH	7.5	6.71-6.69	7.0	7.5	7.5
Oxígeno Disuelto (mgO <sub>2</sub> /L)	0	0- 0.3	1.5-2	1.5-2.5	1.5-2.5
Temperatura Celsius (°C)	35	30	35	35	35
Caudal (m <sup>3</sup> /h)	8	42	350	788	642
Concentración de nitrógeno (mg-N/L)	600	200	250	600	600
Carga de nitrógeno tratada (kg-N/d)	500	1200	1200	11000	9000
Influente	Reject water sludge	Reject water sludge	Reject water sludge	Monosodium Glutamate	Monosodium Glutamate
Eficiencia %	93	85	91	90	90
Año de construcción	2002	2010	2006	2009	2010

El sistema Canon (Complete Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite) logra la eliminación del nitrógeno en un único reactor a través de la reacción Anammox, permitiendo la coexistencia entre microorganismos aerobios y anaerobios amonio oxidantes, debido a la configuración de la biomasa granular bajo condiciones constantes de oxígeno (concentraciones de microaerofilia) (Gonzalez-Martinez et al. 2016). La fuerte limitación de oxígeno permite la oxidación de amonio a nitrito, sin embargo, evita la oxidación del nitrito a nitrato, creando condiciones ideales medioambientales para la reacción Anammox (Nielsen et al. 2005). En el reactor de un sistema Canon, la nitrificación parcial y el proceso Anammox ocurren simultáneamente debido a la naturaleza de su biomasa granular. Estas estructuras de biopelículas están organizadas como gránulos compuestos por capas de AOB sobre un núcleo Anammox. Algunos autores han informado de un ahorro energético, en torno a un 63% de la aireación, en comparación con los sistemas convencionales de eliminación de nitrógeno (nitrificación-desnitrificación) (Liu et al. 2012).

Otra tecnología actualmente desarrollada a escala real es el sistema DEMON. Esta tecnología hace posible la eliminación de nitrógeno a través de una sola vía. Se trata de un único biorreactor operando con ciclos de aireación-no aireación controlados por el pH. De esta manera, cuando los valores de pH van en aumento, hay una disminución automática de aireación en el reactor, y viceversa (Gonzalez-Martinez et al. 2015; del Rio et al. 2017). Una ventaja de esta tecnología es que requiere menos aireación en el proceso, logrando un 25% de ahorro en consumo energético en relación a los sistemas convencionales de eliminación de nitrógeno. Así, mientras el consumo de energía de un sistema DEMON es de 1.160 KWh<sup>-1</sup> por kg de N, el consumo de energía de un sistema convencional es 6,5 KW h<sup>-1</sup> por kg N (Wett, 2006). Finalmente este proceso ha sido implementado a escala real (**Tabla 3**), por ejemplo en Strass (Austria), aunque con problemas de arranque, debido a la baja tasa de crecimiento y el complicado control del proceso. Sin embargo cuando el reactor se activa (50 días aproximadamente) el biorreactor se puede considerar como una tecnología óptima para la eliminación de nitrógeno.

ANITA™ Mox® es una tecnología cuyo proceso de eliminación de nitrógeno se realiza también en una única etapa y cuyo reactor contiene soportes que hacen

posible el desarrollo microbiano como biopelícula adherida (Christensson et al. 2013). Existen dos configuraciones diferentes: MBBR (Moving Bed Biofilm Reactor) e IFFAS (Integrated Fixed Film Activated Sludge). ANITA™ Mox® combina los procesos de nitrificación aerobia y la oxidación de amonio anaerobia por Anammox. Estos sistemas se caracterizan por la alta concentración de biomasa en el reactor usando soportes con biopelícula fija y recirculación de fangos (Veuillet et al. 2014). Esta tecnología se utiliza para el tratamiento de influentes con cargas altas de amonio, como efluentes procedentes de digestión anaerobia de lodos y aguas residuales industriales.

El sistema SHARON/Anammox (Nitrificación parcial/Anammox) también es una tecnología basada en procesos autotróficos. Este sistema se lleva a cabo en dos reactores diferentes donde en el primer reactor se realiza la nitrificación parcial, conversión de aproximadamente el 50% del amonio de los afluentes a nitritos por AOA y AOB. Posteriormente el efluente es introducido en un segundo reactor donde la eliminación de nitrógeno es realizado por bacterias Anammox. En este sentido, Anammox implica la reducción del nitrito a óxido nítrico y a continuación, el amonio es combinado con óxido nítrico por hidracina hidrolasa para formar hidracina. Por último, la hidracina es oxidada a dinitrógeno gas a través de la hidracina/hidroxilamina oxidorreductasa. Por lo tanto, el sistema separa ambos procesos en dos diferentes reactores. La eliminación del nitrógeno utilizando esta tecnología tiene un costo inferior al de los sistemas convencionales de eliminación de nitrógeno, y algunos autores han reportado un 90% de ahorro en costes operativos, principalmente en la aireación (Jetten et al. 2001). Además, varios autores han sugerido que la tecnología pSHARON/Anammox es mejor, en términos de eficiencia, que otras tecnologías autotróficas: la tasa de eliminación de nitrógeno es mayor, la aireación requerida es inferior, y las concentraciones de nitratos en los efluentes y las emisiones de óxidos de nitrógeno son inferiores (Sri Shalini y Joseph, 2012). Estos sistemas han demostrado una eliminación eficiente con porcentajes que van desde 26 kg-N m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> a 76 Kg-N m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (Okabe et al. 2011).

Otra tecnología también desarrollada es el sistema OLAND que puede funcionar con uno o dos biorreactores, aunque tiene una tasa de eliminación de

nitrógeno ligeramente menor que otros sistemas Anammox. Aún así, se puede considerar como una biotecnología de bajo costo y eficiente. Sin embargo, sólo unos pocos investigadores han estudiado este proceso debido a la complejidad del mismo (Third et al. 2001; Strous, 2000; Sliemers et al. 2003). El sistema OLAND no requiere un suministro directo de nitrito, y puede tratar directamente aguas residuales ricas en amonio. Sin embargo, la capacidad de eliminación de nitrógeno del sistema no es todavía lo suficientemente alta y debe mejorarse.

En resumen, podemos establecer que hay toda una serie de nuevas biotecnologías basadas en el proceso Anammox que permite la eliminación de nitrógeno en diferentes efluentes industriales y urbanos con la máxima eficiencia, bajo costo y bajo impacto ambiental. Por otra parte, es importante destacar que toda esta nueva área técnica experimental se basa en el conocimiento biológico de un grupo de microorganismos que se descubrieron hace sólo dos décadas.

Indicar que el proceso Anammox no elimina completamente el nitrógeno, generando una pequeña cantidad de nitrato además de nitrógeno gaseoso (Guven et al. 2005; Qiao et al. 2016). La producción de nitrato es causado por la oxidación del nitrito en condiciones anaeróbicas (Tiso et al. 2015). La energía obtenida de la reacción se utiliza para la fijación del CO<sub>2</sub> que permite el crecimiento de las células. Al mismo tiempo, hay un consumo de protones que causan un aumento del pH por actividad Anammox (Yin et al. 2016).

## 2.5. COMPARACIÓN DE LOS DIFERENTES SISTEMAS

La comparación de los distintos sistemas de eliminación de N se encuentra indicada en la **Tabla 3**. Esta tabla muestra que los tradicionales procesos de eliminación de nitrógeno (Nitrificación/Desnitrificación) funcionan bien, pero tienen un costo muy elevado en comparación con los sistemas autotróficos de eliminación de nitrógeno. Por esta razón, la oxidación de amonio anaerobia es considerada como una opción nueva y prometedora para el tratamiento de aguas residuales (Mulder, 1992), especialmente para el tratamiento de efluentes ricos en amonio como los sobrenadantes de digestores anaeróbicos. Podemos afirmar que estas biotecnologías junto con los procesos de nitrificación parcial tienen varias

ventajas, tales como una reducción en el oxígeno y requisitos químicos, una menor producción de nitritos y nitratos, la no adición de compuestos orgánicos como fuente de carbono y una baja producción de fangos. En este sentido, Fux (Fux, 2003) indicó que el costo global para el sistema nitrificación parcial/proceso Anammox es 1,4 veces inferior al del tradicional proceso de nitrificación/desnitrificación heterotrófica.

**Tabla 3.** Comparación de diferentes sistemas de eliminación de nitrógeno (Rittmann and McCarty, 2001; Schmidt et al. 2003; McCarthy et al. 1969; Van Dongen et al. 2001; Mulder, 2003).

	Traditional Nitrification/ Denitrification	Sharon Process	Partial Sharon / Anammox Process	OLAND Process	CANON Process	DEMON Process
Number of bioreactors	2	1	1 (or 2)	1 (or 2)	1	1
Inocula	Activated sludge	Activated sludge	Denitrifying or Anammox bacteria	Nitrifying bacteria	Anammox (80%)+ Nitrifier (20%)	Anammox50%+ nitrifier 50%
Oxygen conditions	Oxic/anoxic	Oxic/anoxic	Oxic/anoxic	Oxygen limited	Oxygen limited	Oxygen limited
Dissolved oxygen requirement (g O <sub>2</sub> /g N)	High 4.57	Medium 3.43	Low 1.71	Low 1.94	Low 1.90	Very low 0.3
Alkalinity (g CaCO <sub>3</sub> /g N)	7.14	7.14	3.57	3.75	3.75	3,75
Performance (Nitrogen removal) (%)	95	90	90	85	90	90
Bacterial growth	Biofilm/ Suspension	Suspension/ Biofilm	Suspension/ Biofilm/ Granules	Biofilm	Biofilm	Biofilm
COD requirement	Yes	Yes	No	No	No	No
Energetic requirement	High	Low	Very Low	Low	Low	Very low
Sludge production	High	Low	Very Low	Very Low	Very Low	Very low
Construction Cost	High	Low	Low	Very Low	Very Low	Very low
Nitrogen removal Cost	High	Medium	Very Low	Very Low	Very Low	Very low
Types of Bacteria	NH <sub>4</sub> and NO <sub>2</sub> oxidizers, Heterotrophic bacteria	Aerobic NH <sub>4</sub> oxidizers, N. eutropha and Heterotrophic bacteria	Planctomycetales such as <i>Scalindua brodae</i> , <i>Wagneri and sorokinii Brocadia anammoxidans</i> , and <i>Kuenenia stuttgartiensis</i>	Autotrophic nitrifiers	Planctomycetales and Aerobic ammonium oxidizers	Planctomycetales and Aerobic ammonium oxidizers

La desventaja principal del sistema de oxidación anaerobia del amonio es su extenso tiempo de arranque causado por la tasa de crecimiento lenta de las bacterias Anammox. Para mitigar este problema, se pueden utilizar diferentes cultivos de laboratorio de microorganismos Anammox para inocular el biorreactor, ya que se necesita la acumulación de una biomasa Anammox suficientemente grande para una puesta en marcha más rápida.

## 2.6. EFECTO DE LAS CONDICIONES OPERACIONALES EN LA COMUNIDAD DE BACTERIAS ANAMMOX.

Las bacterias Anammox son microorganismos muy difíciles de aislar de los hábitats naturales. El crecimiento de la biomasa Anammox es lento, con velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) de  $0.065 \text{ d}^{-1}$  y el tiempo de replicación de 11-22 días (Sobotka et al. 2017), constituyendo este hecho una limitación para el enriquecimiento de los sistemas con microorganismos Anammox. Liu et al. (2015) informó que la tasa específica depende del pH y temperatura y que la actividad Anammox está influenciada por el enriquecimiento de especies y las condiciones ambientales.

Algunas variables importantes a considerar en el proceso Anammox además de la disponibilidad de nitrito son la concentración de amonio, concentración de biomasa, pH, temperatura, salinidad, concentración de materia orgánica y compuestos tóxicos (Jin et al. 2012). Estos parámetros pueden inhibir total o parcialmente la actividad Anammox y también modificar la estructura de la comunidad de estas bacterias

Uno de los principales problemas de las tecnologías Anammox, y específicamente en los procesos de un solo reactor, es la dificultad de mantener los parámetros de control de procesos (pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, equilibrio de compuestos nitrogenados, etc.) dentro de los rangos requeridos (Strous, 1997). En este sentido, podemos afirmar que los sistemas de biopelícula fija pueden ser una solución más robusta y estable, y por lo tanto más fácil de controlar que otras tecnologías basadas en sistemas de cultivo en suspensión, lecho móvil o biomasa granular (Dapena-Mora et al. 2004; Van Hulle, 2008).

### 2.6.1. Influencia del pH

El pH es un factor influyente en los procesos autotróficos de eliminación de nitrógeno. Se trata de un parámetro que varía durante los procesos que intervienen en la eliminación autotrófica de amonio. Durante la nitrificación parcial se tiende a acidificar el medio y el proceso Anammox tiende a elevar el pH



del sistema. A pesar de una amplia divergencia de los efectos reportados del pH sobre la eliminación autotrófica de nitrógeno, parece haber un consenso en que el pH óptimo para tanto los oxidantes de amonio como los oxidantes de nitritos reside entre 7 y 8. Hellinga et al. (1998) observaron una disminución en la tasa de crecimiento de los oxidantes de nitrito a pH 7 en comparación con el pH 8, mientras que la variación en la tasa de crecimiento de los oxidantes de amonio a estos valores de pH es insignificante. Según Egli et al. (2001), la máxima actividad Anammox observada se obtuvo a valores de pH de 7.5 y 8.0. De hecho, anteriores investigaciones han demostrado que el pH óptimo de operación del proceso Anammox es 8, y el rango de actividad Anammox se encuentra entre 6.7-8.3 (Strous et al. 2000; Jetten et al. 1999) no habiendo actividad Anammox para valores de pH inferiores a 6.5.

#### 2.6.2. Influencia de la Temperatura

La temperatura es un parámetro clave que afecta a la estructura de la comunidad microbiana y su metabolismo. Los bioprocesos pueden modificarse por la temperatura, por lo tanto es necesario entender el comportamiento Anammox sometido a cambios en este parámetro para lograr un alto rendimiento en sistemas Autotróficos de eliminación de nitrógeno (Hu et al. 2013a; Gonzalez-Martinez et al. 2016b). Una baja temperatura induce varios problemas en procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales, especialmente en la eliminación biológica de nitrógeno, que muestra una correlación negativa con la disminución de la temperatura. La aplicación de procesos Anammox se han centrado en el tratamiento de las aguas residuales en torno a los 30 °C para optimizar el ratio de eliminación de amonio en el efluente. La óptima actividad Anammox se ha comprobado alrededor de 35-40 °C, observándose que a 45 °C los procesos Anammox muestran una pérdida irreversible de actividad debido a la lisis de las células bacterianas (Dosta et al. 2008). La temperatura óptima de operación de sistemas Anammox es de 30-35 °C (Lotti et al. 2015a), aunque la temperatura difiere de una especie a otra. *Candidatus* Kuenenia muestra la mayor actividad Anammox a 37 °C (Narita et al. 2017) sin embargo *Candidatus* Brocadia muestra mayor actividad Anammox a 40 °C (Strous et al. 1999). Aunque existe cierto consenso de que en las EDARs las temperaturas óptimas para el proceso de

Anammox son entre 30 y 40 ° C (van der Star et al. 2007). Por estas razones, la mayor parte de la investigación ha sido llevada a cabo para valores de temperatura superiores a 30 °C (Ali et al. 2015a; Gonzalez-Martinez et al. 2015a; Sobotka et al. 2017). Numerosas investigaciones de tecnologías Anammox han estudiado diferentes temperaturas, y se observa que el problema se produce cuando la temperatura disminuye por debajo de 15 °C, provocando la acumulación de nitritos y consecuentemente una pérdida de la estabilidad en el sistema (Dosta et al. 2008; Gonzalez-Martinez et al. 2016) provocando pérdidas dramáticas en la eficiencia de eliminación de nitrógeno. Estudios recientes han demostrado que los procesos Anammox podrían ser operados con éxito o adaptarse a bajas temperaturas alrededor de 20 °C, con elevados índices de eliminación de nitrógeno, sin embargo las temperaturas de funcionamiento más bajos inducen la desestabilización del sistema biológico (Gonzalez-Martinez et al. 2016).

### 2.6.3. Influencia de la concentración de Nitritos

La concentración de nitrito es un parámetro importante para controlar la actividad Anammox, ya que la misma puede ser inhibida por un incremento de ella. Sin embargo, no se encuentra uniformidad sobre los valores umbrales de inhibición del nitrito. Dapena-Mora (2010) encontró que para concentraciones de nitrito de 350 mg N L<sup>-1</sup> se obtiene un 50% de inhibición del proceso Anammox. En presencia de más de 100 mg N L<sup>-1</sup> de nitrito, Strous et al. (1999) encontraron que el proceso de Anammox fue completamente inhibido. Por otro lado, también es notable la diferencia en tolerancia para el nitrito entre los diversos géneros Anammox. Los experimentos de inhibición realizados por Strous et al. (1999), anteriormente citados, se realizaron con *Candidatus Brocadia Anammoxidans*. Sin embargo, los experimentos de Egli et al. (2001) con *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* mostraron que el proceso Anammox sólo se inhibió a concentraciones de nitrito superiores a 182 mg N L<sup>-1</sup>. Además, los experimentos de Strous et al. (1999) mostraron que el aumento de la concentración de nitritos cambió la estequiometría del consumo de amonio y nitrito de 1,3 g de nitrito por gramo de amonio para 0.14 gN L<sup>-1</sup> de nitrito a casi 4 g de nitrito por gramo de amonio para 0.7 gN L<sup>-1</sup> de nitrito. De esta estequiometría distorsionada a altas concentraciones de nitrito, se puede concluir que los microorganismos en estas

condiciones no sólo utilizaron amonio como donador de electrones sino que también debieron haber generado un donador interno de electrones para reducir el nitrito.

#### 2.6.4. Influencia de la materia orgánica

En términos generales, se considera que la carga orgánica afecta negativamente al rendimiento de procesos Anammox obteniéndose bajos rendimientos de eliminación de nitrógeno en varios estudios con presencia de materia orgánica (Molinuevo et al. 2009; Filbert et al. 2014). Diferentes autores han demostrado que la materia orgánica tiene un impacto negativo sobre los procesos Anammox, principalmente debido a la competencia existente entre bacterias Anammox y bacterias desnitrificantes heterótrofas por el nitrito (Sabumon, 2007; Takekawa et al. 2014; Bi et al. 2015). Es posible que, en términos de eficacia de la eliminación de nitrógeno, la desnitrificación heterótrofa sea la vía metabólica más importante bajo condición anóxica en sistemas Autotróficos de eliminación de nitrógeno que tratan efluentes con altas cantidades de materia orgánica (Sabumon, 2007).

La actividad competitiva de bacterias Anammox en cultivos mixtos han sido analizadas en diferentes tecnologías (Sliekers *et al.*, 2005; Pathak *et al.*, 2007; Chamchoi et al. 2008). La principal conclusión de estos estudios es la baja capacidad de competición de las bacterias Anammox en comparación con las bacterias desnitrificantes en ambientes anaerobios. Además, varias investigaciones de procesos Anammox concluyeron que la materia orgánica genera un fuerte efecto negativo en el ratio de eliminación de nitrógeno, convirtiéndose este tema en un foco para la investigación con el objeto de establecer concentraciones de COD favorables para la biodegradación y la desnitrificación (Chamchoi et al. 2007; Molinuevo et al. 2009). Podría decirse, que los efectos negativos que tiene la materia orgánica sobre los procesos Anammox podrían ser modulados por la concentración de materia orgánica en los efluentes y por la tecnología empleada. Así, las bacterias Anammox podrían competir con eficacia en el consumo de nitritos en sistemas autotróficos con bajas cargas orgánicas y lograr una alta eliminación de nitrógeno (Li et al. 2015). Por otro lado,

se está investigando la posibilidad de las bacterias Anammox de oxidar una multitud de compuestos orgánicos (como acetato, propionato y methylamines) acoplados a la reducción de nitritos y/o nitratos (Winkler et al. 2012). Capacidad que podría aumentar su potencial aplicación en el tratamiento de efluentes industriales. Sin embargo, por el momento hay poco conocimiento acerca de los procesos de biotransformación de los compuestos orgánicos por bacterias Anammox y es evidente el gran interés biotecnológico de esta área científica.

#### 2.6.5. Influencia de la Salinidad

La concentración de la salinidad de las aguas residuales municipales se encuentra en el rango entre 0,7-3,0 mS cm<sup>-1</sup>, conductividad eléctrica (Rodriguez-Sanchez et al. 2017). No obstante, el uso de la sal para cocinar, agua marina para la cisterna del inodoro y muchos procesos industriales generan efluentes con alta concentración de sal. En este sentido, diversos autores han observado que la salinidad afectan directamente al rendimiento y la dinámica de la población microbiana las tecnologías de tratamiento de aguas residuales (Cortes-Lozano et al. 2012)

La presencia de altas concentraciones de salinidad en sistemas Anammox ha sido estudiado profundamente en los últimos años, y los resultados confirman que, a pesar de que la respuesta depende de las concentraciones de sal, generalmente para concentraciones medias de salinidad de las aguas residuales urbanas el desempeño fue satisfactorio, indicando que el consorcio Anammox es capaz de adaptarse, suficientemente, hasta 15 g de NaCl L<sup>-1</sup> (Yang *et al.*, 2011) y no hubo afecciones en las específicas actividades Anammox (Dapena-Mora *et al.*, 2010).

Aunque las tecnologías de eliminación autotrófica de nitrógeno son ampliamente utilizadas para el tratamiento de efluentes industriales con temperaturas altas y elevadas concentraciones de salinidad, debido a sus altas tasas de eliminación de nitrógeno, la capacidad para eliminar el nitrógeno con concentraciones de hasta 30 g de NaCl L<sup>-1</sup> y la actividad Anammox específica son bajas para condiciones normales (Dapena-Mora et al. 2010). Gonzalez-Silva et al. (2017) encontraron que *Ca. Brocadia* era dominante bajo concentraciones de sal

entre 0-3 g de NaCl L<sup>-1</sup>, mientras que *Ca. Kuenenia* fue dominante en comunidades Anammox a concentraciones de salinidad de hasta 30 g de NaCl L<sup>-1</sup>. Estos resultados sugieren que aunque las comunidades Anammox puedan adaptarse a diferentes condiciones salinas, el incremento en la salinidad determina cambios en la diversidad de las poblaciones bacterianas incluidas las comunidades Anammox.

## 2.7. PERSPECTIVAS FUTURAS.

Desde el inicio de la puesta en marcha de los procesos de Anammox, se señaló su gran potencial para la aplicación a escala real con el fin de eliminar el nitrógeno de las aguas residuales. Hoy en día, hay muchas EDARs de gran escala que ya han sido iniciadas y han sido investigadas por su rendimiento y poblaciones microbianas.

Uno de los mayores problemas para la implementación de la tecnología Anammox son los largos periodos de puesta en marcha, debido al largo tiempo de duplicación de alrededor de 7-22 días para las bacterias Anammox (Lotti et al. 2014), y su bajo rendimiento de biomasa.

Por lo tanto, un aspecto esencial que debe mejorarse en el futuro es cómo mejorar el tiempo de retención de la biomasa. En este sentido, se han utilizado diversas estrategias, como los reactores secuenciales (sequential batch), que generaron resultados exitosos, y hoy en día, se han aplicado estos sistemas a escala real con excelentes resultados.

En el futuro inmediato, las tecnologías Anammox tendrán que resolver algunas cuestiones importantes que deben abordarse para aumentar las posibilidades de aplicar los sistemas Anammox en el tratamiento de aguas residuales urbanas. Específicamente, cómo aplicar estas tecnologías a baja temperatura, y cómo mejorar los rendimientos de eliminación de nitrógeno en efluentes con altas cargas de materia orgánica, son dos preguntas que deben ser solucionadas en el próximo futuro. Sin embargo, no es fácil resolver estas cuestiones, siendo absolutamente necesario expandir el conocimiento de las bacterias Anammox desde el punto de vista metabólico y genético. Además, se requieren nuevos diseños y estrategias operacionales en las plantas de tratamiento

que permitan la adaptación de estos microorganismos a esas condiciones ambientales.

Además, los sistemas de biopelícula fija tienen algunas ventajas complementarias como elevado tiempo de retención del fango, la prevención del lavado de biomasa y una mejor estabilidad del proceso (Sudarno et al. 2011). Por lo tanto, es importante ampliar el conocimiento de los sistemas de biopelícula para evaluar nuevos materiales soporte, comprender el papel que juegan las bacterias Anammox en la formación de estas "ciudades microbianas" y finalmente aplicar todos estos conceptos biológicos al desarrollo de nuevas EDARs. En nuestra opinión, sólo el enfoque multidisciplinario permitirá la correcta resolución de este problema de importancia técnica, científica y medioambiental.

### **3. OBJETIVOS**

Considerando la bibliografía existente y el desarrollo técnico de los sistemas autotróficos de eliminación de nitrógeno para el tratamiento de aguas residuales, la presente tesis doctoral estableció un objetivo principal de actuación y una serie de objetivos secundarios.

#### **3.1. OBJETIVO PRINCIPAL**

El objetivo principal de la presente investigación fue estudiar desde un punto de vista biológico y técnico un sistema innovador de nitrificación parcial-Anammox, configurado como filtro sumergido y construido en un único biorreactor, tecnología no desarrollada hasta la fecha.

Para alcanzar este objetivo, fue necesario desarrollar distintos objetivos secundarios que posibilitaran la consecución de conclusiones cuantificadamente válidas.

#### **3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS**

Los objetivos secundarios que han permitido alcanzar el objetivo general de la tesis, se pueden explicitar en los siguientes:

1. Diseño y construcción de filtros sumergidos a escala de laboratorio que permitieran el desarrollo de biopelículas fijas a soportes con capacidad de nitrificación parcial-Anammox.
2. Estudio de distintos soportes que posibiliten las condiciones más favorables para el desarrollo de las biopelículas y las condiciones más favorables de operación.
3. Establecimiento de un protocolo de puesta en marcha para los sistemas de biofiltros sumergidos de nitrificación parcial-Anammox.
5. Análisis del efecto que provocan ciertas condiciones operacionales al funcionamiento de los biofiltros sumergidos de nitrificación parcial-

Anammox, en concreto diferentes concentraciones de materia orgánica y diferentes concentraciones de salinidad.

6. Estudio de las comunidades bacterianas presentes en las biopelículas fijas desarrolladas en los soportes del biofiltro bajo distintas condiciones operacionales tanto durante el proceso de puesta en marcha de los sistemas como en su estado de estabilidad operativa.

Para poder alcanzar estos objetivos, fue necesario realizar una planificación de experimentos basados en el conocimiento previo de la literatura científica y la aplicación de unos métodos científicamente validados.

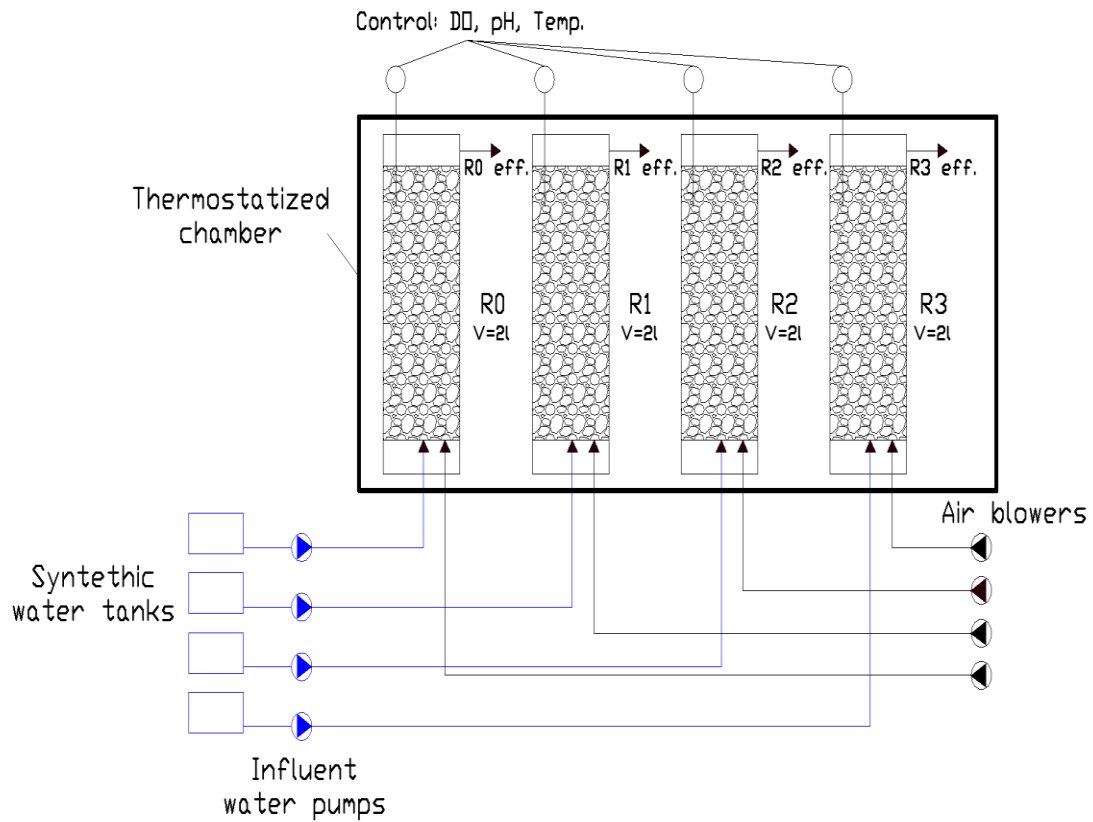


## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. PLANTA A ESCALA DE LABORATORIO**

#### 4.1.1. Esquema de la planta a escala de laboratorio

A continuación se representa un esquema de la composición de la planta utilizada en esta investigación (**Ilustración 3**). Se trata de una planta a escala de laboratorio cuyo diseño y construcción se detalla en un capítulo del presente documento.



**Ilustración 3.** Esquema planta a escala de laboratorio.

#### 4.1.2. Material soporte

Para el presente proyecto de investigación se utilizó un material granular de origen noruego comercializado con el nombre de Filtralite, que se caracteriza por ser un filtro de alta calidad de naturaleza arcillosa que posee un elevado índice de porosidad. Este soporte, permite que el agua circule a través de sus poros formando un filtro que ocupa todo el reactor completo. En la **Tabla 4** se recogen las características de los materiales utilizados en cada reactor.

**Tabla 4.** Características de los soportes utilizados en cada reactor.

<b>Filtralite MC 2.5-4mm</b>	<b>(Reactor 1)</b>	<b>Filtralite 4-8mm</b>	<b>(Reactor 2)</b>
Densidad	625 Kg/m <sup>3</sup>	Densidad	800Kg/m <sup>3</sup>
Diámetro efectivo	2.6mm	Diámetro efectivo	4.6mm
Coefficiente de Uniformidad	<1.5	Coefficiente de Uniformidad	<1.5
Porosidad	56%	Porosidad	48%
Huecos	48%	Huecos	43%
<b>Filtralite HC 2.5-5mm</b>	<b>(Reactor 3)</b>	<b>Filtralite HR 3-6mm</b>	<b>(Reactor 4)</b>
Densidad	800 Kg/m <sup>3</sup>	Densidad	825Kg/m <sup>3</sup>
Diámetro efectivo	2.7mm	Diámetro efectivo	3.5mm
Coefficiente de Uniformidad	<1.5	Coefficiente de Uniformidad	<1.5
Porosidad	43%	Porosidad	46%
Huecos	48%	Huecos	43%

#### 4.1.3. Bomba de agua

La bomba seleccionada para la construcción de esta planta piloto fue una bomba Watson-Marlow 520 S equipada con cuatro cabezales que van conectados desde los depósitos de los influentes a los reactores (**Ilustración 4**).



*Ilustración 4. Bomba Watson Marlow 520 S.*

#### 4.1.4. Bombas de aire

Las bombas de peso ligero (0.35 Kg), se configuraron tal y como se muestra en la **Ilustración 5**. Estas bombas eran capaces de aportar aire mediante burbuja fina en pequeños caudales, cada una con capacidad unitaria de hasta  $2 \times 4 \text{ l min}^{-1}$ . Como se observa, se conectaron llaves de paso a cada uno de los conductos de manera que el caudal de aire pudiera ser regulado.



*Ilustración 5. Disposición de bombas de aire.*

#### 4.1.5. Cámara Termostatzada

En esta investigación a escala de laboratorio, se han mantenido los reactores en un rango de temperatura de  $35\pm 3^{\circ}\text{C}$ . Para mantener esta temperatura se utilizó una cámara termostatzada con un volumen de 200 L en cuyo interior se instalaron los biorreactores a escala de laboratorio (**Ilustración 6**).



*Ilustración 6. Cámara Termostatzada.*

#### 4.2. COMPOSICIÓN DEL AGUA SINTÉTICA

El influente usado en este estudio fue un agua residual urbana sintética cuya composición estaba basada en otras investigaciones previas (Mosquera-Corral et al. 2005; González-Martínez et al. 2013). Los principales compuestos minerales del medio fueron ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1.17),  $\text{NaHCO}_3$  (3.25),  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.3),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.07),  $\text{MgSO}_4$  (0.02), y elementos traza,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Los componentes químicos del agua sintética fueron modificados en algunos experimentos de forma específica en el caso de evaluar la influencia de distintas concentraciones de nitritos, materia orgánica y salinidad. Las modificaciones realizadas en esos casos serán descritas de forma particular en otros apartados de la tesis.

### 4.3. INSTRUMENTOS DE MEDIDA Y EQUIPOS DE LABORATORIO

#### 4.3.1. Medida de pH y Oxígeno Disuelto

La medida del pH en los biorreactores se realizó cada 24 horas directamente utilizando un pHmetro (Crison GLP 91). El equipo fue calibrado diariamente con soluciones tampón de pH 4.0 y 7.0. La concentración de oxígeno disuelto también fue medida diariamente en el biorreactores por medio de un oxímetro de pulso (CRISOL OXI320) el cual fue calibrado antes de cada medida según las instrucciones del fabricante.

#### 4.3.2. Determinación de las concentraciones de amonio, nitrato y nitrito

Las determinaciones de amonio, nitrato y nitrito en los influentes y efluentes tratados en los biorreactores se realizaron mediante cromatografía iónica (Metrohm Ionic Chromatograph). El uso de esta metodología analítica **(Ilustración 7)** ha sido esencial para poder hacer un seguimiento cómodo y preciso de las concentraciones de los cationes y aniones mencionados en las muestras de cada reactor. El muestreo llevado a cabo para cada uno de los experimentos así como para cada uno de los reactores, fue diario. Para la medida de concentración de amonio se utilizó una columna de cationes C2-150 Metrosep, mientras que para la medida de las concentraciones de nitrito y nitrato se utilizó la columna de aniones MetrosepAsupp-4-250. Para calibrar las mediciones fue necesario probar diferentes patrones. En esta investigación, se utilizaron soluciones estándar de amonio, nitrito y nitrato de 10, 200 y 500 mg L<sup>-1</sup>.



*Ilustración 7. Cromatógrafo iónico utilizado en la determinación de cationes e iones.*

#### 4.4. INÓCULO

El inóculo utilizado en esta investigación para la puesta en marcha de los biorreactores, procedió de una planta Anammox de tratamiento de agua residual a escala real en Olburgen (Países Bajos). Para la inoculación de cada uno de los reactores se añadió un volumen de inóculo equivalente al 10% del volumen total del reactor.

#### 4.5. TOMA DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Durante el transcurso de la investigación se han realizado diversos muestreos tanto del inóculo utilizado para la puesta en marcha de los biorreactores como de los diferentes reactores durante su periodo de funcionamiento, con el fin de evaluar los cambios cuantitativos mediante qPCR de las bacterias oxidadoras de amonio (AOB) y bacterias totales, así como poder realizar un estudio de las comunidades bacterianas por secuenciación con Illumina. Las muestras de la biopelícula formada en los soportes de Filtralite fueron recogidas al final de cada periodo experimental. La biomasa se obtuvo utilizando cinco soportes de cada uno de los reactores, tomados a diferentes profundidades (5, 20, 45 cm). Posterior a su toma, se sumergieron en una solución

salina (NaCl al 0.9 %). Cada muestra sumergida en dicha solución salina fue agitada mediante vortex y sonicada durante 3 minutos con el fin de separar la biopelícula adherida a los soportes. Acto seguido la biomasa fue separada de la solución salina por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el sobrenadante (solución salina) fue descartado y el pellet de biomasa se almaceno a -20 °C hasta la extracción de ADN.

#### 4.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las características morfológicas de la biopelícula formada sobre los soportes de cada biorreactor fueron observadas con un Microscopio electrónico Zeiss DMS, SEM (Leo Microscopia Electrónica, Oberkochem, Alemania) funcionando a 10 kV. Cada soporte individual de filtralite fue fijado con glutaraldehído al 5 % (v/v) en una solución tampón de cacodilato de sodio 0.2 M (pH 7.1) lavado y fijado posteriormente en OsO<sub>4</sub>, antes de ser deshidratado con soluciones de etanol (10, 30, 50, 70, 90 y 100 %). Todos los productos químicos fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Las muestras fueron transferidas de etanol fresco 100 % y punto crítico de secado a dióxido de carbono líquido a 36.1 C y 7.37 Pa, utilizando un equipo Samdri 780B (Tousimis, Rockville, EE.UU.). Por último las muestras fueron recubiertas con oro antes de ser examinadas por microscopía electrónica de barrido de presión variable (VP-SEM), modelo LEO 1430 VP-SEM.

#### 4.7. PURIFICACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN

Las muestras de biomasa (500 mg de muestra sólida) se sometieron a extracción y purificación de ADN genómico total. Para este propósito se utilizó el Kit para suelos FastDNA spin-Kit y el equipo FastPrep24 (MP-Bio, Santa Ana, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y calidad del ADN se determinaron espectrofotométricamente a 260 nm de absorbancia. Los ratios de absorbancia (260/280 nm) se calcularon con un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

#### 4.8. ENSAYOS CUANTITATIVOS MEDIANTE qPCR

El número absoluto de copias de bacterias totales y del gen amoA bacteriano fueron cuantificados en cada muestra por qPCR. El número de copias de cada plantilla por ng de los estándares se determinó mediante un Software online. La fórmula para determinar dicho número de copias como describe Jackson et al. (2013):

$$\text{N}^{\circ} \text{ copias por microlitro} = (n \times 6.02 \times 10^{23}) / (l \times 1.0 \times 10^9 \times 650)$$

Donde n es la masa de plantilla utilizada (en nanogramos) y l es la longitud de la plantilla (en pares de base) (Staroscik, 2004). El número de ejemplares de muestras en biorreactores se calculó teniendo en cuenta las curvas estándares de los plásmidos.

Los ensayos qPCR se realizaron en un equipo de PCR Mx3000P (Agilent Technologies). La **Tabla 5** muestra los cebadores utilizados y las condiciones de ciclos seleccionados para cada reacción de qPCR. Se incluyeron controles negativos en todos los ensayos de qPCR y todas las amplificaciones se realizaron por triplicado.



**Tabla 5.** Cebadores y condiciones de los ciclos de qPCR.

**A.**

Group	Gene marker	Primers		References
		Name	Sequence (5'-3')	
Bacteria	V3-	P1 (341F)	CCTACGGGAGGCAGCAG	(Muyzer et al.1993)
	16S rRNA	P2 (534R)	ATTACCGCGGCTGCTGG	
Ammonia oxidizing bacteria (AOB)	<i>amoA</i>	AmoA1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	(Rotthauwe et al. 1997)
		AmoA1R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	

**B.**

	Total Bacteria	Ammonia oxidizing $\beta$ -proteobacteria (AOB)
Initial denaturalization	95°C	95°C
	3 minutes	7 minutes
Denaturalization	95°C	95°C
	30 seconds	30 seconds
Primers annealing	60°C	52°C
	40 seconds	30 seconds
Elongation	72°C	72°C
	30 seconds	30 seconds
Melting curve	60°C-95°C + 2°C/min	
	Fluorescence measured each 15 seconds	
Hold	25°C	

Los análisis de qPCR se realizaron con 25 µl de volumen total de la mezcla de reacción que contenía: 10 µl de una solución (2.5x) tampon Taq True-Start Hot Start (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE.UU.), 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE.UU.), 0,0625 µl de seroalbúmina bovina (BSA, 20 mg ml<sup>-1</sup>; New England Biolabs, UK), 0.15 µl de cada cebador (10 µM, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.), 0.5 µl de dntp (10 mM, MBL, Córdoba, España), 0.125µl SYBR green diluidos en DMSO (20×) y 0.125 µl de TrueStart Hot Start ADN polimerasa Taq (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE.UU.).

Las cuantificaciones absolutas se obtuvieron mediante la construcción de curvas estándar con diluciones en serie de diez (10<sup>-1</sup>-10<sup>-8</sup>) de ADN que contenía la región objetivo, siguiendo los protocolos previamente establecidos por Maza et al. (2016). Para todos los ensayos qPCR, las curvas de calibración mostraron un coeficiente de correlación de  $r^2 > 0.99$ . Las eficiencias de amplificación de bacterias totales y del gen amoA variaron de 90% a 100%. Los intervalos cuantitativos de los valores Ct de las muestras se incluyeron siempre en el intervalo de detección de los valores de Ct de las curvas estándar. La calidad de todas las amplificaciones de qPCR fue confirmada por análisis de las curvas de fusión y electroforesis del gel de agarosa. El número de copias de los genes específicos estimados por qPCR se expresaron por litro de biomasa.

#### 4.9. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA CON ILLUMINA

La composición de la comunidad bacteriana fue determinada por secuenciación masiva usando el kit del reactivo de illumina MiSeq V3 y el secuenciador illumina Miseq (Illumina, Hayward, CA, los E.E.U.U.). Todos los análisis de secuenciación fueron realizados en Testing Research Laboratory (Lubbock, Texas, E.E.U.U., [http:// www.researchandtesting.com](http://www.researchandtesting.com)). Las regiones hipervariable V1-V3 del gen rRNA 16S de bacterias fueron amplificadas usando el primer 530F (5'-CCGCGCNGCTGGCAC-3') y 909R (5'-CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3').

Los datos brutos obtenidos mediante el proceso de secuenciación masiva se analizaron en el software Mothur v 1.39.5 (<http://www.mothur.org>). En primer lugar las secuencias se ensamblaron en “contigs” y luego fueron sometidas a varios procesos sucesivos de análisis de calidad para eliminar las lecturas de mala calidad, secuencias con más de una base ambigua, secuencias con longitud mayor que los dos primers, secuencias con más de 8 homopolímeros, secuencias con errores significativos de alineamiento, etc. Después de realizar un pre-agrupamiento de las secuencias, las de baja calidad y las quimeras fueron eliminadas usando UCHIME v 4.2.40 ejecutado desde Mothur v 1.39.5 (Edgar et al. 2011). Para definir la unidad taxonómica operativa (OTU) a un nivel de similitud del 97% se realizó una matriz de filotipos. Finalmente, las secuencias de alta calidad que pasaron el procedimiento de quimeras fueron clasificadas con una base de datos. En este proyecto se han utilizados las bases de datos Silva y Midas según el experimento llevado a cabo en el mismo (McIlroy et al. 2015).

El software PAST v. 3.06 se usó para calcular las curvas de rarefacción, así como los índices de diversidad ambiental Chao-1,  $H'$ , Simpson, y Pielou' Evenness, con intervalos de confianza del 95%. Este intervalo se obtuvo con el método bootstrap para todas las muestras (Hammer et al. 2001). Por otro lado, el índice de cobertura Good también fue calculado según Good (1953). Para la representación gráfica de la comunidad microbiana presente en las diferentes muestras se realizaron Heatmaps a nivel de phylum, familia, orden y género. Dichos Heatmap se crearon con R-proyect v.3.2.0 mediante los paquetes GPlots y RColor Brewer y teniendo en cuenta las OTUS con abundancias relativas superiores a un 1%.

El programa PRIMER-E v 6.1.18 (Plymouth, UK) se utilizó para realizar los análisis de cluster y los dendogramas. Este programa utiliza el algoritmo interno UPGMA para la creación de los mismos, utilizándose para ello la matriz de semejanza generada a partir de los coeficientes de similitud de Bray-Curtis.

#### 4.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para comprobar las diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos para los distintos soportes probados en el capítulo 1 del presente proyecto, se utilizó el programa SPSS versión 20.0. Además se llevó a

cabo un análisis estadístico comparando las medias con un análisis de varianza (ANOVA) de un factor así como también se realizaron estudios de contraste.

Por otro lado, los datos bióticos se analizaron con el programa PRIMER-E v.6.1.18 (Plymouth, UK). Como hemos comentado en el apartado anterior, las matrices de semejanza de las muestras se generaron con el coeficiente de similitud Bray-Curtis. La escala multidimensional no métrico (NMDS) y las ordenación en dos direcciones (2D) de los datos biológicos se calcularon basándose en la matriz de similitud (García-Ruíz et al. 2018). Según Clarke y Warwick (2001) los niveles de estrés de las representaciones NMDS  $< 0,2$  indican un buen ajuste de la representación de las variables a lo largo de dos ejes.

Se realizó un análisis estadístico multivariante para determinar la influencia de los parámetros operacionales, variables ambientales y abundancias relativas de las OTUs obtenidas a partir de la secuenciación con Illumina. Los datos operacionales y ambientales (excepto el pH) fueron transformados ( $\log(x+1)$ ) y normalizados y el conjunto de datos bióticos fue estandarizado. Las variables bióticas y abióticas se representaron en forma vectorial, y luego se superpusieron en las representaciones NMDS. La dirección y longitud de cada vector ilustran las posibles correlaciones monotónicas entre dichas variables. Finalmente, se calcularon los coeficientes de correlación producto-momento de Pearson ( $r$ ) y los valores del análisis BEST. Las correlaciones de Pearson permiten conocer la fuerza de la asociación lineal entre variables bióticas y abióticas. El cálculo de las variables abióticas mediante BEST explica la ordenación y la distribución de los datos bióticos. Finalmente, el test de significancia global fue determinado por serie de permutaciones globales (permutaciones = 499).

## **5. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE LA PLANTA A ESCALA DE LABORATORIO**

La primera fase de la presente tesis doctoral consistió en el diseño de las plantas piloto utilizadas, y su posterior construcción. Para el diseño fue necesario un estudio previo del trabajo a realizar con el fin de definir los reactores necesarios en el proyecto, el material a emplear en los mismos, el tipo de aireadores a utilizar, etc.

De este trabajo previo se concluyó que precisábamos un sistema compuesto por cuatro reactores (**Ilustración 3**) en paralelo con influentes de flujo ascendente, continuos e independientes ya que, según la fase del proyecto, los influentes podían ser diferentes para cada uno de los reactores. Además, el efluente también debía ser independiente con el fin de tomar muestras de agua de cada uno de los reactores. La salida del efluente de cada uno de los reactores se diseñó por gravedad, con el inconveniente de cambiar de un régimen en lámina libre a un régimen en presión por lo que se optó por poner una cámara transitoria que dotara al efluente de la energía necesaria para introducirse en la tubería de salida sin problemas, además dicha cámara debía de permitir evacuar el agua de la misma a sección llena, evitando la intrusión de aire en los tubos de salida. Con esta solución quedaba correctamente definida la línea piezométrica del sistema sin situaciones críticas.

Respecto a la aireación de los reactores también fue necesario diseñar un sistema que permitiera regular el caudal de aire de manera independiente en cada uno de los reactores, y que además, la aireación consistiese en un sistema de burbuja fina para reproducir la realidad en la mayor medida posible.

Por otro lado se pensó en una bomba peristáltica para introducir el influente, ya que era necesario un bombeo para el influente dado que el flujo era ascendente y por logística y disposición en el laboratorio los depósitos de agua no podían estar a mayor cota que los reactores. La bomba elegida fue idónea para la realización de esta investigación ya que contaba con un control manual por medio de un teclado de membrana en el que se podía ajustar la velocidad del influente, así como el arranque y la parada. Además era clave poder cambiar el caudal del influente que nos permitiera obtener variaciones en el tiempo de retención, y tener

la posibilidad de cebado rápido o purga necesarias en caso por ejemplo de pérdida de biomasa.

Dado que la experimentación precisaba mantener la temperatura de los reactores constante, se decidió introducir los cuatro reactores en una cámara termostática, capaz de mantener la temperatura elegida de funcionamiento a 35 °C, (Strous, 1997). Además se dispusieron termómetros en cada uno de los reactores para poder tener un control independiente de la temperatura en cada uno de ellos.

Para la construcción de los reactores a escala de laboratorio se hizo uso de cuatro probetas de vidrio con un volumen de 2L de capacidad (**Ilustración 8**). Estas probetas fueron taladradas con una broca para vidrio y dispuestas con los tubos de silicona de diámetro 8mm exterior y 6mm interior. En el sellado de los tubos se hizo uso de una silicona impermeable para ambientes muy húmedos, ya que se buscaba la total estanqueidad del sistema.

Se dispuso además de depósitos de entrada y salida para albergar el influente y efluente de la planta, respectivamente. Estos depósitos fueron limpiados de manera cuidadosa para evitar contaminación del agua. Salvo en el capítulo dos del presente proyecto (en el que el depósito del influente era el mismo para los 4 reactores) cada reactor tenía su propio depósito para el influente de cada uno de los reactores.

Previo a la puesta en marcha de la investigación fue necesario realizar varias pruebas hidráulicas para comprobar el correcto funcionamiento de la planta piloto así como la estanqueidad de la misma, comprobando que no había fugas en todo el sistema y que cada uno de los componentes operaba correctamente bajo las condiciones diseñadas.



***Ilustración 8.*** Reactores en su disposición definitiva.

## **6. ESTUDIO COMPARATIVO DE CARRIERS (FILTRALITE)**

En esta investigación se utilizó como material soporte Filtralite, de elevada superficie específica y contrastada eficiencia en otro tipo de procesos de biofiltración pero hay que tener en cuenta que el material soporte Filtralite se comercializa con diferentes especificaciones, y nunca se había utilizado para la aplicación objeto de este proyecto, por lo que en primer lugar se tuvo que determinar el óptimo para la tecnología propuesta.

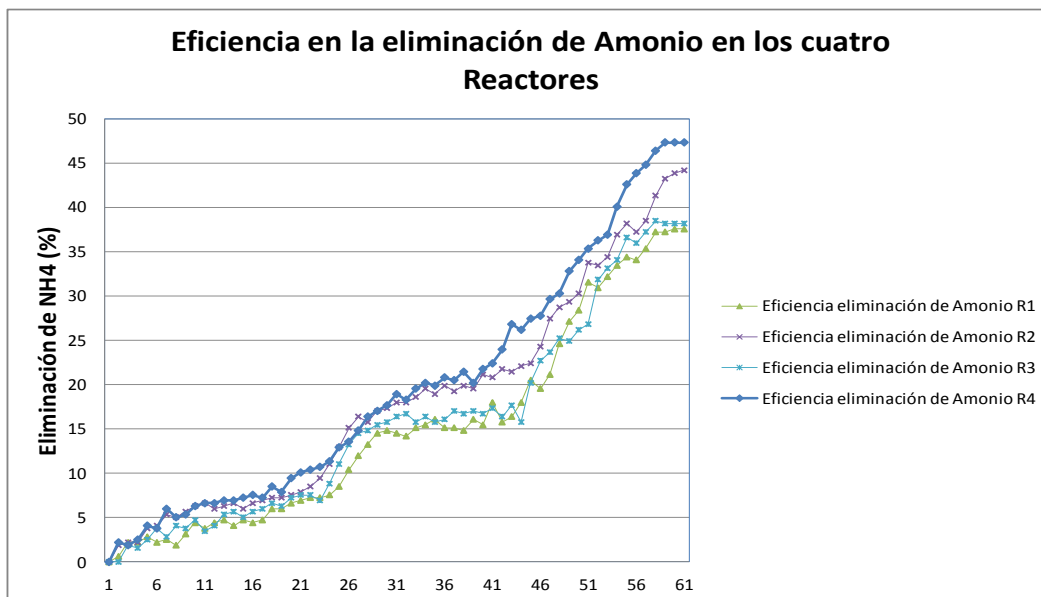
Para llevar a cabo este estudio comparativo se trabajó con una planta a escala de laboratorio que contó con cuatro biorreactores que actuaban de manera independiente, esto es, en paralelo. En cada uno de los biorreactores se utilizó un material Filtralite con características diferentes, fundamentalmente en lo que a granulometría se refiere. Aplicando las mismas condiciones a todos los biorreactores y utilizando el mismo tipo de inóculo, las diferencias en sus rendimientos nos mostró qué tipo de carrier fue el más apropiado para trabajar con el sistema de nitrificación parcial-Anammox con lecho sumergido bajo las condiciones de operación establecidas en nuestro estudio. En este sentido, el influente a tratar contenía  $246 \text{ mg NH}_4^+ \text{ -N L}^{-1}$ ,  $106.5 \text{ mg NO}_2^- \text{ -N L}^{-1}$  y sin contenidos de  $\text{NO}_3^- \text{ - N}$ . La carga de nitrógeno total diaria fue de  $1.2 \text{ Kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Respecto a las condiciones ambientales, se trabajó en ausencia de oxígeno disuelto con el fin de establecer condiciones anaeróbicas en esta fase, y cuya concentración, en su caso, era muy baja ( $0\text{-}0.4 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ ). La temperatura elegida fue de  $35^\circ\text{C}$ , el pH se mantuvo siempre en el rango de 7-8 ud pH y el tiempo de retención hidráulico adoptado fue de 12h. Todas estas condiciones operacionales se mantuvieron constantes en los cuatro biorreactores durante la duración de esta fase.

Las características de los cuatro carriers utilizados se muestran en el apartado de materiales y métodos de esta tesis (**Tabla 4**).

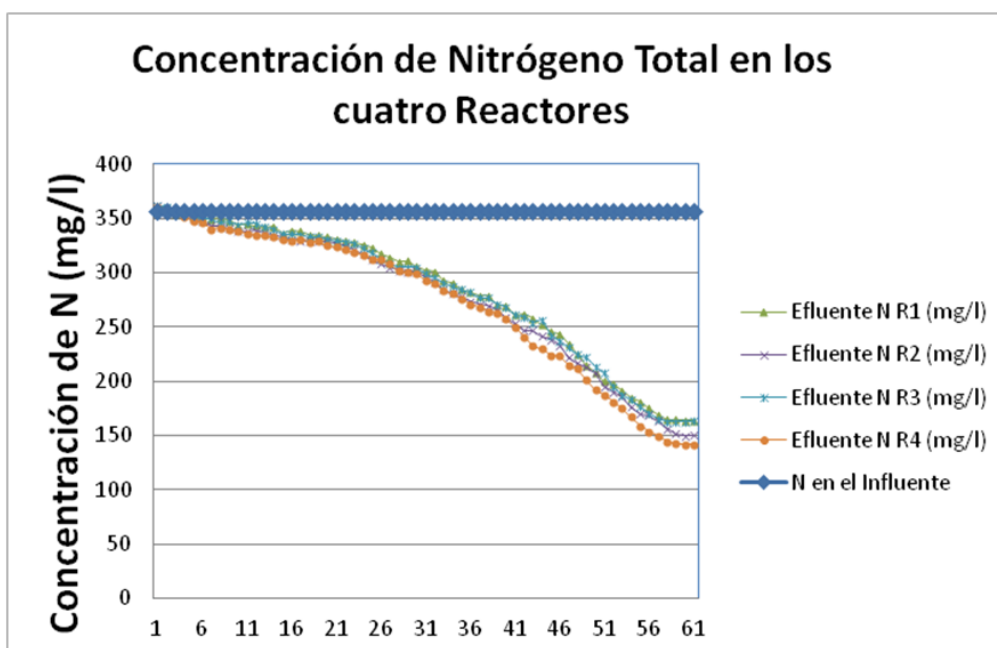
En la **Ilustración 9** se muestran las eficiencias de eliminación de Amonio de cada uno de los reactores. En ella se observa que sin duda el Reactor 4 fue el que mostro mejores resultados al respecto. Además la mejor respuesta del reactor 4, fue también detectada en relación a la capacidad de eliminación de nitrógeno total



**(Ilustración 10).** Obviamente la concentración de Nitrógeno total detectada en los reactores fue elevada **(Ilustración 10)** en todos los casos debido a las características operacionales en el sistema y particularmente a la continua adición de nitrito a los biorreactores.



*Ilustración 9. Eficiencia de eliminación de amonio en cada reactor al final del periodo experimental.*



*Ilustración 10. Concentración de nitrógeno total en los efluentes de cada reactor al final del periodo experimental.*

Para corroborar los resultados obtenidos en cuanto a la selección del soporte que presenta el mejor funcionamiento, se llevaron a cabo análisis estadísticos que consistieron en la comparación de medias mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Igualmente, se llevaron a cabo estudios de contraste con el fin de comprobar que las variables de comparación son compatibles con lo observado en el experimento. El principal objetivo del análisis estadístico fue comprobar cuál de los rellenos funcionó mejor y si existieron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos para los distintos soportes (programa SPSS versión 20.0.).

En primer lugar en la **Tabla 6** se presentan los resultados del estudio de contraste realizado entre los 4 materiales al final de este experimento, comparando cada uno de los materiales con el material 4, que parece ser el más favorable a la vista de los gráficos de resultados (**Ilustraciones 9 y 10**):

**Tabla 6.** Resultados del análisis de contraste de cada reactor comparado con reactor 4.

		Contraste	Valor del contraste	Error típico	t	gl	Sig. (bilateral)
Amonio	Asumiendo igualdad de varianzas	1	14,8667	7,05376	2,108	236	,036
		2	5,1167	7,05376	,725	236	,469
		3	12,6000	7,05376	1,786	236	,075
	No asumiendo igualdad de varianzas	1	14,8667	7,25928	2,048	114,263	,043
		2	5,1167	7,49939	,682	116,678	,496
		3	12,6000	7,26642	1,734	114,355	,086

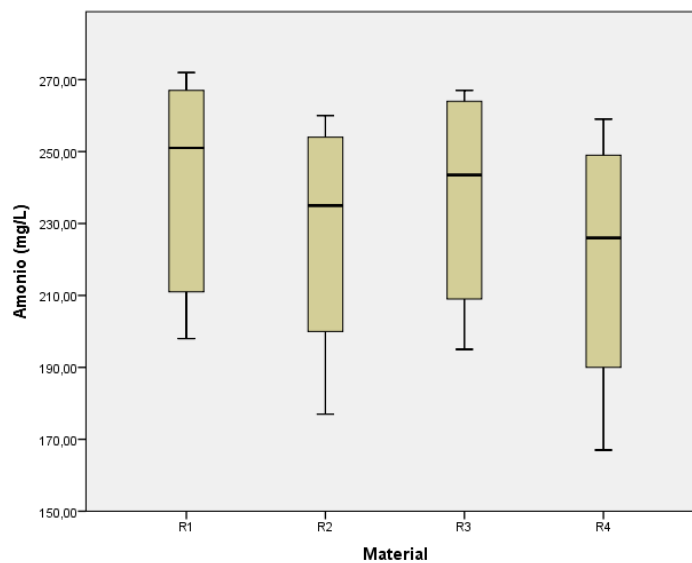
De la tabla anterior, se deduce que el material de R4 presenta diferencias significativas con el R1, pero no con los materiales R2 y R3. Sin embargo, si sólo tenemos en cuenta los valores obtenidos a partir del día 30 de funcionamiento de los reactores, esto es, hacia la mitad del experimento, empiezan a marcarse las diferencias de funcionamiento entre los distintos materiales. Los análisis estadísticos de contraste, muestran los siguientes resultados (**Tabla 7**):

**Tabla 7.** Resultados del análisis de contraste de cada reactor comparado con reactor 4

		Contraste	Valor del contraste	Error típico	t	gl	Sig. (bilateral)
Amonio	Asumiendo igualdad de varianzas	1	21,5333	7,50468	2,869	116	,005
		2	8,8667	7,50468	1,181	116	,240
		3	19,5667	7,50468	2,607	116	,010
	No asumiendo igualdad de varianzas	1	21,5333	7,74793	2,779	57,068	,007
		2	8,8667	7,76616	1,142	57,143	,258
		3	19,5667	7,74577	2,526	57,059	,014

Para el supuesto anteriormente mencionado, se puede establecer que el material R4 presenta diferencias estadísticamente significativas con los materiales R1 y R3, aunque sin presentarlas con el material R2.

A continuación, se acompaña el diagrama de cajas (**Ilustración 11**) que representa la diferencia entre la dispersión de datos en cada uno de los materiales:



**Ilustración 11.** Diagrama de cajas para las concentraciones de amonio de los efluentes según los reactores.

De este diagrama de cajas, y de los estudios de contraste realizados, se puede sugerir que el material que mejor se ha comportado ha sido el R4, existiendo diferencias estadísticamente significativas con los materiales de R1 y R3. En todo caso, hay que destacar que los resultados obtenidos de eliminación de Nitrógeno

para los cuatro reactores han sido exitosos. Aunque, considerando que los datos diarios de consumo de amonio de todos ellos eran muy similares, el biorreactor 4 obtuvo mejores resultados que el resto. Ordenando de mayor a menor por el consumo de amonio, el orden de preferencia en el rendimiento de los soportes utilizados, podemos establecer el siguiente:

1. Reactor 4. Filtralite HR 3-6mm.
2. Reactor 2. Filtralite 4.8mm
3. Reactor 3. Filtralite HC 2.5-5mm.
4. Reactor 1. Filtralite MC 2.5-4mm.

Considerando por tanto las evidencias objetivas, se continuaron los estudios exclusivamente con el carrier 4 (del reactor 4) ya que éste presenta ventajas de rendimientos operacionales en relación al resto de los carrier estudiados.

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS EXPERIMENTOS**

### **7.1. EXPERIMENTO 1: START-UP DE UN SISTEMA DE BIOFILTROS CANON BAJO DIFERENTES CONDICIONES**

Son numerosos los sistemas autotróficos de eliminación de nitrógeno basados en procesos Anammox. Así, podríamos mencionar las tecnologías SHARON/ANAMMOX, DEMON, CANON, y ANITA™ MOX (González-Martínez et al. 2015b; Van Dongen et al. 2001; Christenson et al. 2011). Principalmente estas tecnologías difieren entre ellas en su forma de operación (continuo o discontinuo) y en las características de su biomasa (granular, en suspensión o adherida a un soporte). No obstante, todas ellas poseen como uno de sus principales problemas la inestabilidad de la biomasa celular (Joss et al. 2009), motivo por el cual se continúa investigando en la búsqueda de sistemas más estables y competitivos.

Los sistemas de biorreactores de filtros sumergidos (SFBR) es una alternativa a los sistemas de fangos activos y granulares (Schelegel and Koeser, 2007). En este sentido, la tecnología de filtros sumergido de película fija poseen muchas ventajas, como largos tiempo de retención de la biomasa, prevención del lavado de la biomasa, estabilidad del proceso y alta resistencia a cambios operacionales y sustancias tóxicas (Sudarno et al. 2011). Otras ventajas incluyen un control sencillo, bajos consumos energéticos, bajos costes de operación y mínimos problemas de olores y ruidos (Cortés et al. 2012).

Como se ha descrito en apartados anteriores, uno de los inconvenientes de los sistemas CANON es su largo proceso de puesta en marcha (start-up) debido al lento crecimiento de las bacterias Anammox. En este capítulo se estudia la mejora del proceso de inicio y arranque, de un reactor que combina el sistema CANON con un reactor de lecho fijo (biofiltro sumergido), adicionando diferentes concentraciones de nitritos (**Tabla 8**).

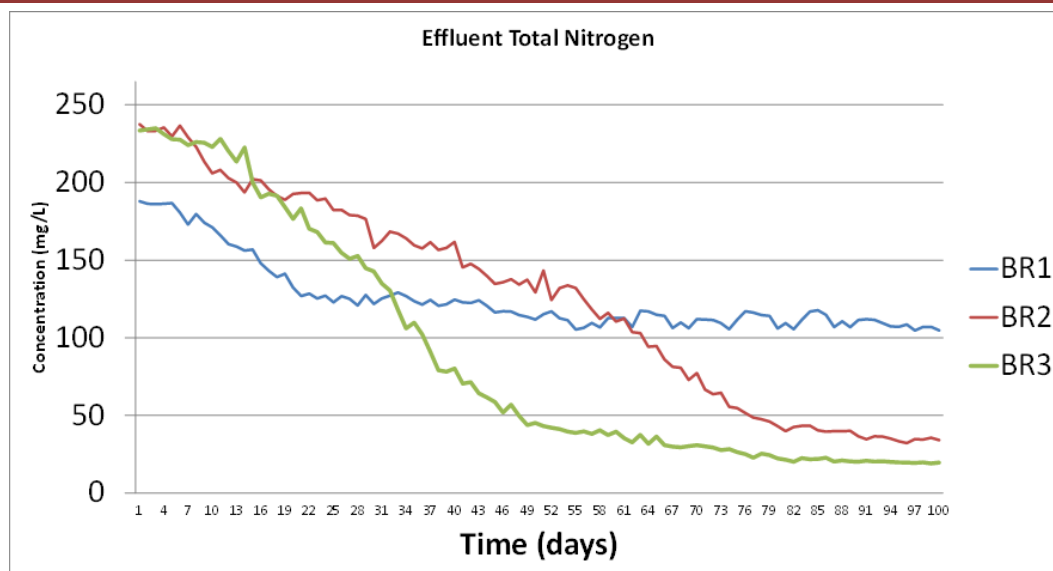
Para ello, se utilizaron tres reactores (BR1, BR2 y BR3) de lecho fijo operando en paralelo, utilizando como material soporte el escogido en el apartado

6 de la presente Tesis (características del material recogidas en **Tabla 4**) e inoculados de igual manera con un 10% del volumen total del reactor con el inóculo descrito en el apartado de materiales y métodos. La siguiente tabla (**Tabla 8**) detalla las condiciones operacionales de cada uno de los biorreactores. La duración de este experimento fue de 100 días.

**Tabla 8.** Condiciones operacionales y resumen de resultados. BR1. Biorreactor bajo condiciones anaeróbicas y con adición de nitritos. BR2. Bajo condiciones aeróbicas y con adición de nitritos. BR3. Bajo condiciones aeróbicas y sin adición de nitritos.

Bioreactor	BR1	BR2	BR3
Influent $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg/L)	246	246	246
Influent $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (mg/L)	106.5	30	0
DO (mg/L)	<0.3	1-1.5	1-1.5
HRT (h)	12	12	12
Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	35	35	35
pH (unit pH)	7-8	7-8	7-8
Effluent $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg/L)	87.19 $\pm$ 4.54	2.08 $\pm$ 0.68	1.76 $\pm$ 1.07
Effluent $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (mg/L)	1.07 $\pm$ 0.12	3.75 $\pm$ 2.48	0.56 $\pm$ 0.17
Effluent $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mg/L)	21.37 $\pm$ 0.86	30.97 $\pm$ 0.80	18.03 $\pm$ 0.35
Effluent Total N (mg/L)	109.64 $\pm$ 3.92	36.81 $\pm$ 3.07	20.37 $\pm$ 0.97
$\text{NH}_4^+\text{-N}$ removal efficiency (%)	65.33 $\pm$ 1.97	99.17 $\pm$ 0.27	99.29 $\pm$ 0.42
Total N removal efficiency (%)	69.57 $\pm$ 1.14	80.78 $\pm$ 1.05	92.00 $\pm$ 0.36

En la **Ilustración 12** se muestran los resultados de la concentración de nitrógeno total obtenida en los efluentes de los tres biorreactores desde el principio del experimento y se observa que la estabilización de la eficiencia de eliminación del nitrógeno se alcanzó en diferentes momentos para cada uno de los biorreactores. Posteriormente, los sistemas continuaron operando en condición estable hasta el fin del estudio.



**Ilustración 12.** Concentración de Nitrógeno total en los efluentes tratados.

Cuando se alcanza la estabilidad de los reactores que funcionaban bajo condiciones microaeróbicas, BR2 (con adición de nitritos) y BR3 (sin nitritos añadidos), la capacidad de eliminación de nitrógeno fue muy satisfactoria. De hecho, una vez estabilizados, las eficiencias de eliminación de nitrógeno total fueron de 80.78% (BR2) y 92.00% (BR3) (valor medio obtenido de los últimos quince días). Cabe destacar que la eficiencia alcanzada en BR3 corresponde aproximadamente al máximo esperado basándonos en la estequiometría de un proceso CANON. Sin embargo, en el caso de BR1, biorreactor que trabajó bajo condiciones anóxicas, evidentemente se obtuvo una capacidad de eliminación de nitrógeno total menor en comparación con los otros dos biorreactores. En este sentido, la máxima eficiencia obtenida en este biorreactor una vez alcanzada la estabilización fue de un 69% (valor medio obtenido de los últimos 15 días). Sin embargo, el tiempo transcurrido entre la inoculación y la estabilización del biorreactor bajo condiciones anóxicas (aproximadamente 30 días) era claramente más corto que el observado en los biorreactores microaeróbicos, BR2 y BR3 (aproximadamente 80 días).

En relación al  $\text{NO}_2^-$ -N, en el biorreactor BR1, se pudo observar el consumo de todo el nitrito añadido una vez conseguidas las condiciones estables porque por estequiometría la cantidad añadida fue menor que la cantidad necesitada para oxidar todo el amonio del influente. No se consideró añadir más cantidad de

nitritos ( $106.5 \text{ mg de NO}_2\text{-N}$ ) porque a partir de ciertas concentraciones de estos compuestos se produce la inhibición de las bacterias Anammox (Dapena- Mora et al. 2004; Strous et al. 1999; Egli et al. 2001). Podemos afirmar, que la puesta en marcha (start-up) de este biorreactor fue muy satisfactoria (ver **Ilustración 12**), como consecuencia de que las condiciones adoptadas en este biorreactor fueron muy adecuadas para la proliferación de la población de bacterias Anammox (condiciones anóxicas y presencia de nitritos).

En los biorreactores BR2 y BR3, el nitrito necesario para la eliminación autotrófica de amonio lo originó el propio sistema, como consecuencia de la actividad de las bacterias oxidadoras de amonio (AOB). De hecho, la adición de nitritos bajo condiciones microaeróbicas (BR2) no mejoró significativamente la eficiencia del sistema. Es más, en BR2 se observó un exceso de nitritos y nitratos en el efluente. Este resultado fue probablemente debido a que el sistema trabajó bajo condiciones adecuadas de aireación para una tecnología CANON, siendo capaz de producir el nitrito necesario para el proceso Anammox. El exceso de concentración de nitritos implicó una transformación de los mismos a nitratos (dadas las condiciones microaeróbicas) provocando un exceso en el efluente de nitratos de  $30.97 \text{ mg NO}_3\text{-N L}^{-1}$  (ver **Tabla 8**). Por último indicar, que en el biorreactor BR3, las concentraciones de los nitritos y de nitratos en el efluente fueron los esperados por estequiometría de un sistema CANON (**Tabla 8**). Además, se pudo comprobar que el start-up del biorreactor BR3 fue muy similar al de BR2, comprobándose como los nitritos generados en este biorreactor (BR3) fueron asimilados completamente por las bacterias Anammox.

Por tanto, según los resultados observados, se puede establecer que la máxima eliminación de nitrógeno se consiguió bajo condiciones microaeróbicas sin adición de nitritos, aunque se recomienda cierta adición de nitrito y condiciones anóxicas para los primeros días de operación para un inicio más rápido del proceso.

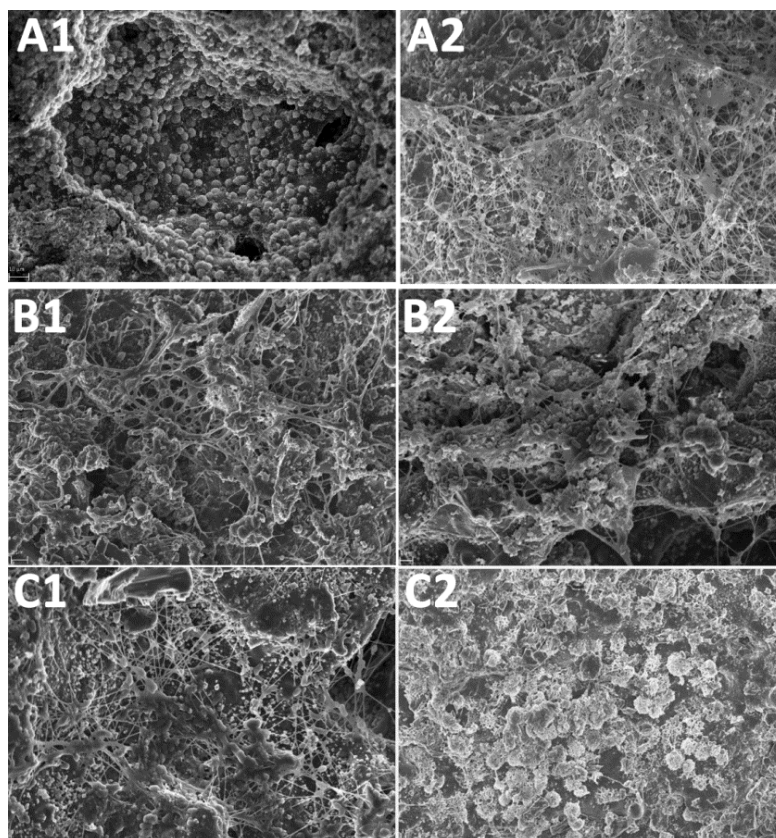
Al ser el oxígeno disuelto un parámetro operacional crítico en la estabilidad de los sistemas Anammox (Lotti et al. 2014), analizamos de forma específica la



influencia de este parámetro sobre este proceso. Así, estudiamos la puesta en marcha bajo condiciones anaeróbica (BR1) o microaeróbica (BR2, BR3) de los biorreactores. Cuando los biorreactores operaron con una concentración de oxígeno disuelto baja (1-1.5 mg/L), el rendimiento final que se obtuvo fue mucho mejor. En concreto las eficiencias de eliminación de nitrógeno fueron elevadas (80.78% en BR2 y 92.00% en BR3). Por otro lado, también hay que destacar en nuestro estudio el uso de un pequeño volumen de inóculo (10% del volumen total) en la puesta en marcha de los biorreactores. Este hecho es extremadamente interesante para la posible aplicación de esta tecnología en una escala industrial.

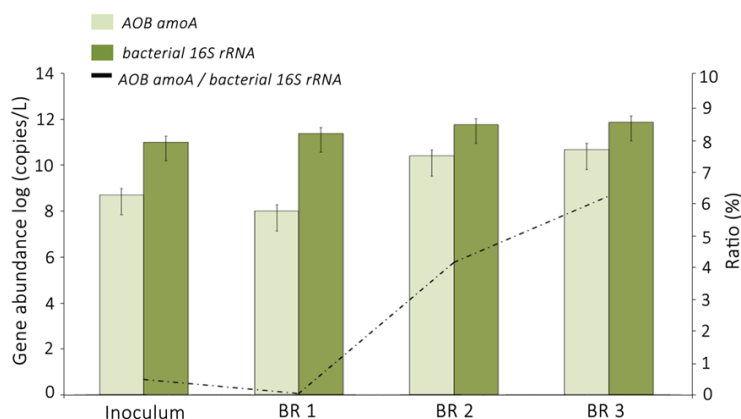
Los tres biorreactores fueron inoculados con un mismo inóculo tal y como se describió en el apartado de Materiales y Métodos. Una vez inoculados se inició el periodo operacional con las distintas condiciones de aireación y concentración de nitritos (**Tabla 8**). En este contexto, con independencia del seguimiento analítico físico-químico se procedió al estudio de la estructura de las comunidades bacterianas realizándose la cuantificación de las poblaciones AOB mediante qPCR y el correspondiente heatmap con las abundancias relativas de las OTUS obtenidas mediante la secuenciación con Illumina (**Ilustraciones 14 y 15**). Los resultados del estudio microbiológico revelaron cambios notables en la estructura de la comunidad bacteriana bajo las distintas condiciones operacionales, aunque se puede sugerir que las comunidades microbianas en los biorreactores de filtro sumergido, configuradas como sistemas CANON pueden adaptarse y cambiar dependiendo de las condiciones operacionales.

La **Ilustración 13** muestra las imágenes del SEM de la formación de biofilm después 90 días de operación de los biorreactores BR1, BR2 y BR3. Las características morfológicas indican que con independencia de las condiciones operacionales, en todos los biorreactores, en su estado de estabilidad operativa, se observa la existencia de biofilm complejos y estructuralmente estables. Este hecho claramente indica que en todos los casos se origina una buena colonización de los soportes (carriers) y la formación de una biopelícula estable, factor esencial en el funcionamiento de los biofiltros.



**Ilustración 13.** Imágenes SEM de la biopelícula formada en los soportes bajo diferentes condiciones. Las imágenes A1 y A2 corresponden al bioreactor microaeróbico con adición de nitrito (BR2); las imágenes B1 y B2 corresponden al al biorreactor microaeróbico sin adición de nitritos (BR3); las imágenes C1 y C2 al biorreactor anaeróbico con adición de nitritos (BR1).

En la **Ilustración 14** se muestra el número medio de copias del genes 16S rRNA de bacterias totales y del gen amoA AOB expresado por litro de fango activo, cuantificado por qPCR. Los bioreactores fueron inoculados con  $1.29 \times 10^{11}$  copias L<sup>-1</sup> de bacterias totales y  $6.2 \times 10^8$  copias L<sup>-1</sup> de AOB. En general, la abundancia absoluta de bacterias totales se mantuvo estable durante las diferentes condiciones de aireación (medias de  $3-9 \times 10^{11}$  copias L<sup>-1</sup>) independientemente de las condiciones operativas (**Tabla 9**). El análisis de varianza (ANOVA) no reveló diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los bioreactores. Los valores medios de bacterias totales detectadas fueron compatible con los encontrados en estudios previos realizados en otros sistemas como: sistema SHARON, fangos activos convencionales (CAS), biorreactores de membrana (MBR), y biorreactores secuenciales (SBR) (Clarke and Warwick, 2001; Reboleiro-Rivas et al. 2015; Xia et al. 2012; Gómez-Silván et al. 2014; Du et al. 2016).



**Ilustración 14.** Número de copias de bacterias 16S rRNA y AOB amoA (en escala logarítmica) por litro de fango activo. Cuantificado mediante qPCR en inóculo y biorreactores. BR1: biorreactor anóxico y con adición de nitritos; BR2: biorreactor microaeróbico y con adición de nitritos; BR3: biorreactor microaeróbico sin adición de nitritos. Línea discontinua representa el ratio AOB amoA/ 16S rRNA bacteriano.

**Tabla 9.** Número de copias de 16S rRNA bacteriano y AOB cuantificados en inóculo y biorreactores. Abundancia relativa de AOB, expresado como porcentaje de bacterias totales. Los datos seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente de acuerdo con Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

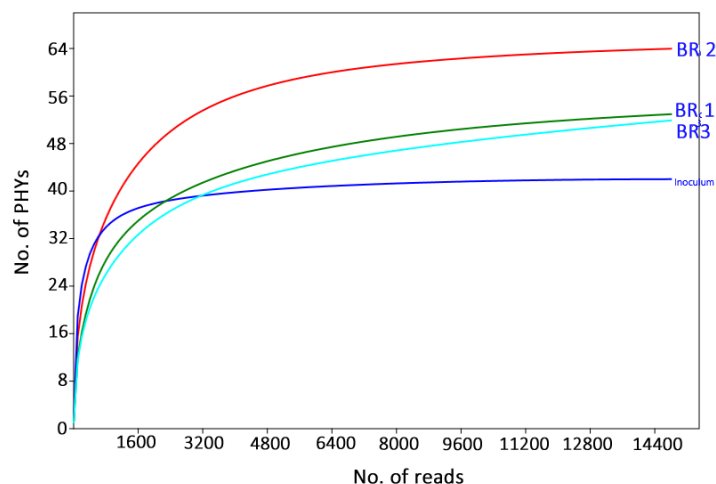
	AOB amoA	Bacterial 16S rRNA	Ratio (%)
Inoculum	$6.2 \times 10^8 \pm 2.3 \times 10^7$ (a)	$1.29 \times 10^{11} \pm 3.3 \times 10^8$ (a)	0.48 (b)
BR1	$1.2 \times 10^8 \pm 3.5 \times 10^8$ (a)	$3.12 \times 10^{11} \pm 3.9 \times 10^9$ (a)	0.04 (a)
BR2	$3.2 \times 10^{10} \pm 2.1 \times 10^9$ (b)	$7.61 \times 10^{11} \pm 3.4 \times 10^9$ (a)	4.18(c)
BR3	$6.18 \times 10^{10} \pm 3.4 \times 10^9$ (b)	$9.88 \times 10^{11} \pm 2.6 \times 10^9$ (a)	6.25 (c)

El número de copias del gen amoA en AOB fue del orden de  $10^{10}$  para los biorreactores BR2 y BR3, mientras que fue de  $10^8$  para el biorreactor BR1. Esto muestra que bajo condiciones anóxicas (BR1) la población AOB decrece dos órdenes de magnitud (**Ilustración 14**). No obstante, el número medio de AOB se encontró dentro del rango de los sistemas SHARON previamente estudiados (Du et al. 2016) (**Tabla 9**). Una confirmación de las diferencias mencionadas, se puede comprobar si analizamos las abundancias relativas de AOB para cada uno de los bioreactores. En concreto, la relación amoA/gen 16S rRNA bacteriano fue de 0.04% durante condiciones anóxicas llegando a alcanzar un 6.25% en uno de los biorreactores microaireados (BR3). Además, mediante la determinación de la Student's t-test se puede comprobar diferencias significativas entre BR1 y los bioreactores BR2 y BR3. Todos estos datos, claramente demuestran que la población de microorganismos oxidadores de amonio (AOB) se ven incrementados en los biofiltros CANON bajo condiciones de microaerofilia en relación a los

sistemas anóxicos, independientemente de la adición de nitrito. No obstante, si podemos mencionar que la adición de nitrito disminuyó ligeramente (2%) el número de copias del gen amoA en el biorreactor BR2 en relación al biorreactor BR3.

Otro de los análisis microbiológicos realizados fue la secuenciación masiva con Illumina. Se detectaron un total de 60.000 secuencias de alta calidad aunque con el objeto de obtener una profundidad de secuenciación similar (Zhang et al. 2012), todas las muestras fueron normalizadas a 15.000 lecturas. Se obtuvieron 69 unidades taxonómicas operacionales (OTUs) para un nivel de identificación secuencial del 97% (punto de corte del 3%). Se observaron diferencias significativas entre los biorreactores y el inóculo utilizado para la puesta en marcha. Así, el número de OTUs detectados en los bioreactores fue mayor que en el inóculo, alcanzándose valores de 60, 69, 55 y 44 OTUs para BR1, BR2, BR3 e inóculo, respectivamente. Estos resultados no quieren decir que las OTUs identificadas en los reactores no estén presentes en el inóculo, sino que la representación de estas OTUs en el inóculo fue posiblemente minoritaria y en consecuencia los criterios utilizados en nuestro estudio no los reflejan. No obstante lo que sí sugieren los datos es que las condiciones de operación establecen un cambio en la abundancia relativa de los distintos OTUs detectados.

Tanto las curvas de rarefacción (**Ilustración 15**) como los índices de cobertura (>99%) (**Tabla 10**) indican que la profundidad del estudio de secuenciación masiva perfectamente nos permite obtener una descripción de la diversidad de la comunidad bacteriana presente tanto en el inóculo utilizado como en las biorreactores. En definitiva, estos análisis nos confirman que el análisis de la biodiversidad microbiana de los biorreactores cumple con criterios de garantía científica y metodológica.



**Ilustración 15.** Curvas de rarefacción generadas a nivel Otus (97% de similitud) para la secuenciación con Illumina filtrada y normalizada según las lecturas totales de bacterias obtenidas para inóculo y biorreactores. BR1: biorreactor anóxico y con adición de nitritos; BR2: biorreactor microaeróbico y con adición de nitritos; BR3: biorreactor microaeróbico sin adición de nitritos.

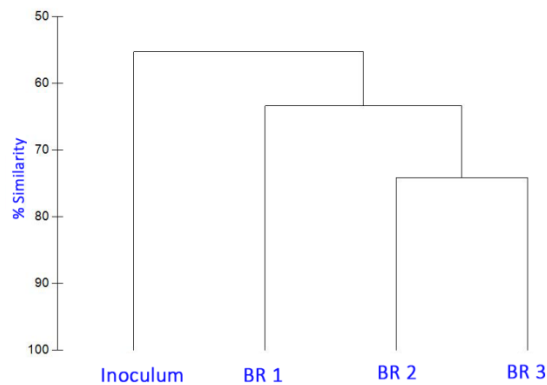
**Tabla 10.** Número de lecturas e índices de diversidad y riqueza: richness (S), Good's coverage, Chao-1, Shannon-Wiener ( $H'$ ) and Simpson evenness. Obtenidos a partir de los datos de secuenciación Illumina en el inóculo y biorreactores. CI: intervalos de confianza al 95% ( $p < 0.05$ )

	No. reads (normalized)	Richness (S)	Good's coverage)	Chao-1	CI 95%
Inoculum	15000	43	99.70	44	43-46
BR1	15000	60	99.59	60	60-78
BR2	15000	68	99.61	68	67-84
BR3	15000	55	99.79	55	54-71
	Shannon-Wiener $H'$	CI 95%	Simpson	CI 95%	
Inoculum	2.354	2.32-2.36	0.8213	0.82-0.83	
BR1	1.777	1.74-1.78	0.7205	0.72-0.73	
BR2	2.055	2.013-2.062	0.7463	0.74-0.75	
BR3	1.733	1.699-1,741	0.7147	0.71-0.72	

Los análisis de la diversidad y de los índices de riqueza mostraron valores similares en todos los biorreactores. Tanto el índice de Chao-1 ( $61.25 \pm 1.76$ )\* como el índice  $H'$  ( $1.86 \pm 0.09$ )\* revelaron que la diversidad de los sistemas era baja, mientras que el índice de Simson ( $0.71 \pm 0.01$ )\* mostro un organización funcional muy alta en la población microbiana (**Tabla 10**). (\*medias de los valores obtenidos en las diferentes muestras). Estos datos sugieren una comunidad bacteriana de alta complejidad y diversidad aunque con un importante grado de especialización funcional. Estos hechos son de gran interés biológico ya que nos muestra unas

biopelículas microbiológicamente diversas pero muy especialidades en su capacidad metabólica.

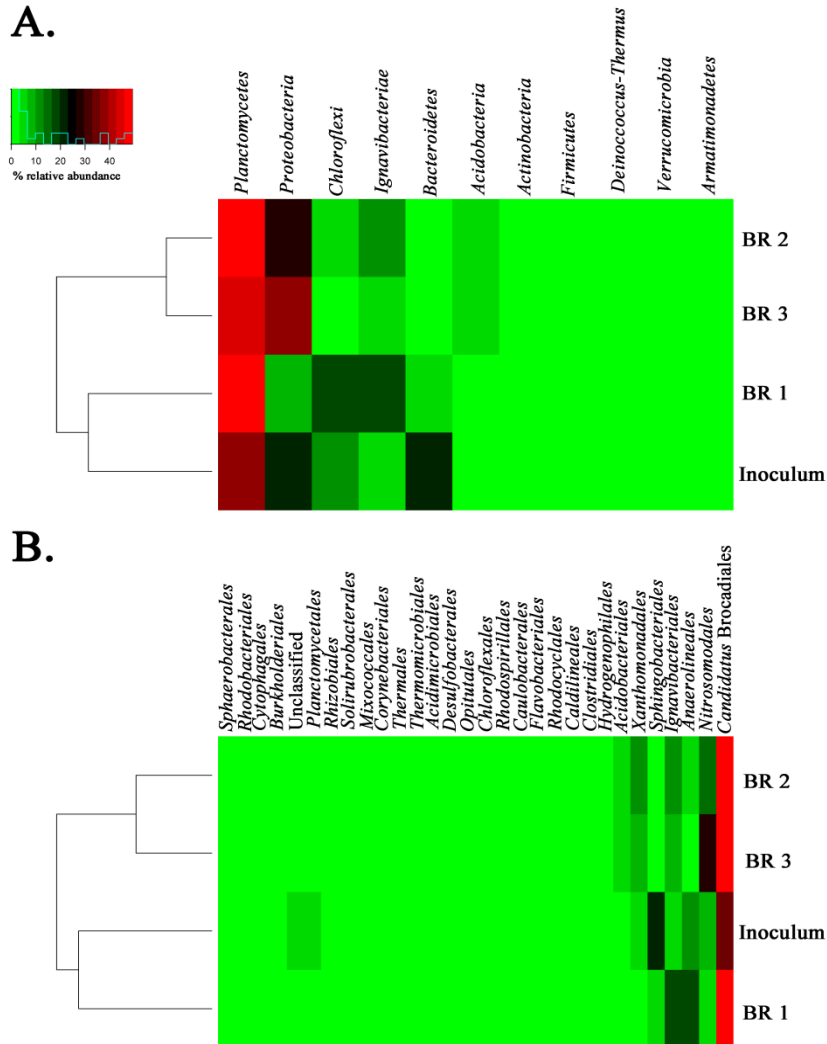
La **Ilustración 16** muestra el análisis cluster basado en la similitud de Bray-Curtis, relacionando la abundancia relativa de las OTUs. Este análisis detectó una estabilidad muy alta de la diversidad poblacional en los biorreactores BR2 y BR3 (similitud > 70%). Además, mostró un mayor grado de similitud entre todos los biorreactores, que entre ellos y el inóculo. En este sentido, el dendrograma mostró que los tres biorreactores se caracterizaron por una similitud de más del 60%, situándose el inóculo como un grupo independiente. Estos resultados confirman los obtenidos con los índices de diversidad.



**Ilustración 16.** Análisis dendrograma que ilustra la similitud de la comunidad bacteriana en el inóculo y biorreactores. Reactor anóxico operando con nitrito (BR1), biorreactor aireado operando con nitrito (BR2) y biorreactor aireado operando sin nitrito (BR3). El clustering fue generado por el algoritmo UPGMA, usando la matriz de la semejanza de la distancia de Bray-Curtis generada de la abundancia relativa de 354 OTUs bacterianas identificadas por Illumina-sequencing.

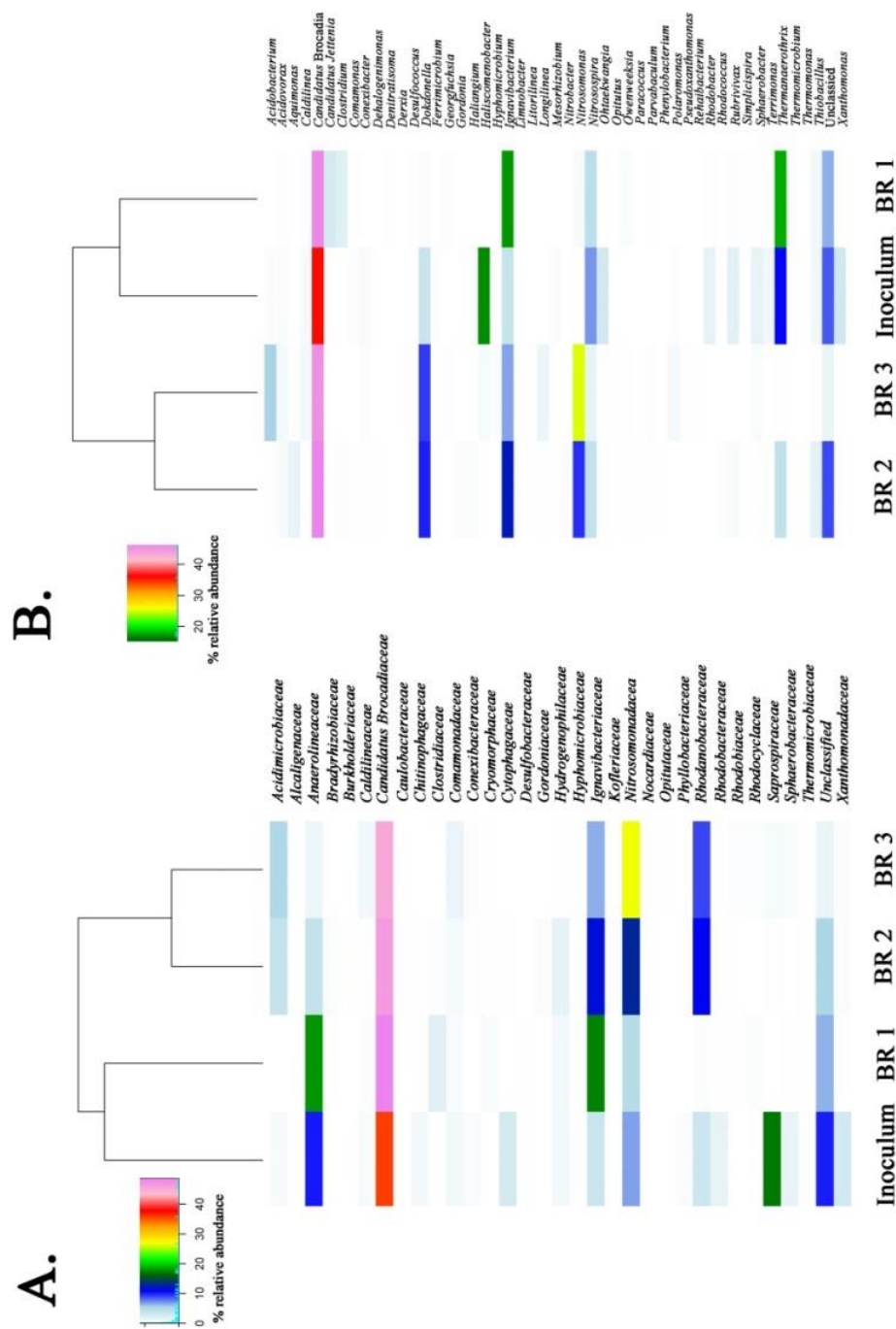
A un nivel de Phylum (**Ilustración 17**), las distintas OTUs se clasificaron en 11 Phylas diferentes con las siguientes abundancias relativas: *Acidobacteria* (1.35%), *Actinobacteria* (0.8%), *Armatimonadetes* (0.005%), *Bacteroidetes* (9.81%), *Chloroflexi* (12.27%), *Deinococcus-Thermus* (0.097%), *Firmicutes* (0.71%), *Ignavibacteriae* (10.73%), *Planctomycetes* (44.93%), *Proteobacterias* (19.21%) y *Verrucomicrobia* (0.011%). El Phylo dominante fue *Planctomycetes*, con una abundancia de 44.93%, seguido de *Proteobacteria* con un 19.21%. Aunque los phyla dominantes detectados fueron *Planctomycetes* (44.93%) y *Proteobacterias* (19.21%), se puede sugerir que desempeñaron comportamientos diferentes según las diferentes condiciones operacionales. En este sentido, *Planctomycetes* fue muy

estable tanto en los biorreactores y como en el inóculo, con abundancias relativas similares para cada uno de ellos. Así, se observó como los *Planctomycetes* llegaron a un 38.12% en el inóculo; 49.26% en BR1; 47.26% en BR2; y 45.37% en BR3. Sin embargo, en cuanto a la abundancia relativa las *Proteobacterias*, se detectaron cambios significativos en función del sistema estudiado: 20.08% en el inóculo, 8.14% en BR1; 29.38% en BR2; y 38.22% en BR3. Es evidente que se produce una marcada disminución en la abundancia relativa de *Proteobacterias* en el biorreactor BR1 operando bajo condiciones anóxicas, en relación a los otros dos biorreactores BR2 y BR3 operando bajo condiciones microaróbicas. De igual modo, entre los bioreactores microaeróbicos la abundancia relativa de *Proteobacterias* fue un 30% mayor en el bioreactor BR3 (operando sin adición de nitritos) en relación al biorreactor BR2 funcionando con adición de nitrito.



**Ilustración 17.** Heatmap que muestra la abundancia relativa de OTUs bacterianas detectadas por secuenciación Illumina en inóculo y biorreactores operados bajo diferentes condiciones. BR1: biorreactor anóxico y con adición de nitritos; BR2: biorreactor microaeróbico y con adición de nitritos; BR3: biorreactor microaeróbico sin adición de nitritos. Clasificación a nivel de Phylum (A) y Orden (B).





**Ilustración 18.** Heatmaps que muestra la abundancia relativa de OTUs bacterianas detectadas por secuenciación Illumina en inóculo y biorreactores operados bajo diferentes condiciones. BR1: biorreactor anóxico y con adición de nitritos; BR2: biorreactor microaeróbico y con adición de nitritos; BR3: biorreactor microaeróbico sin adición de nitritos. Clasificación a nivel de Familia (A) y Género (B).

Respecto de la afiliación taxonómica de las muestras a nivel de familia y género, se realizó un heatmaps representado en la **Ilustración 18**. En total se encontraron 32 familias y 48 géneros del conjunto de datos. El inóculo se caracterizó por las siguientes familias principales: *Candidatus Brocadiaceae* (35.83%), *Saprospiraceae* (16.95%), *Anaerolineaceae* (10.19%), y *Nitrosomonadaceae* (6.8%). Si comparamos los bioreactores BR1, BR2 y BR3, se observa que no hay prácticamente diferencias en la abundancia relativa de la familia *Candidatus Brocadiaceae*, 48.6%, 46.5%, y 45.4% respectivamente. Esto se debe principalmente a que las diferentes condiciones operacionales adoptadas, al final del experimento, favorecen la proliferación de estos microorganismos. En este análisis comparativo de la abundancia relativa de las familias representativas de cada muestra, sí se aprecian cambios en la familia *Anaerolineaceas* que aumentó a un 43.6% bajo condiciones anóxicas (BR1) y en la familia *Nitrosomonadacea* la cual aumenta un 61.4% bajo condiciones microaeróbicas (BR2 y BR3), comparado con la condición anóxica (BR1).

Los resultados de filiación con Illumina demuestran que se produjo un impacto evidente en las  $\beta$ -*Proteobacteria* y en concreto, en el género *Nitrosomonas* (**Ilustración 18**). En este estudio se comprobó que *Nitrosomonas* aumentó aproximadamente un 16 % en el bioreactor que no se adicionó nitritos (BR3) con respecto al bioreactor con adición nitritos (BR2) pero ambos bajo condiciones microaeróbicas. Como era de esperar, en BR1 (condición anóxica), *Nitrosomonas* decreció un 98.12% comparado con BR3 cuya abundancia relativa de este género fue de 25.13% y de 9.22% para BR2 (BR3 y BR2 reactores microaeróbicos). Estos hallazgos coinciden y son compatibles con los obtenidos mediante la cuantificación con qPCR (**Ilustración 14**). Así, los resultados de qPCR revelaron que la población AOB aumentó a 6.25% en BR3, más de 2% respecto a BR2. Además, bajo condiciones anóxicas (BR1) esta población disminuyó dos órdenes de magnitud, llegando a un 0.04% la proporción de bacterias amoA respecto al resto de bacterias.

Mediante el análisis SIMPER (**Tabla 11**) se pudo cuantificar la contribución de cada OTU a la similitud/no-similitud entre el inóculo y los bioreactores. La semejanza global entre el inóculo y los biorreactores fue de un 66.7%. El análisis

reveló que sólo 6 OTUs (con abundancias relativas entre un 5-45 %) contribuyeron en un 90.1 % a la semejanza global entre el inóculo y los tres biorreactores. Además, si nos fijamos en la OTU 5 (43.4% abundancia relativa), clasificada phylogenéticamente como *Candidatus Brocadia*, fue siempre dominante y su contribución a la semejanza global de la comunidad bacteriana fue >60%.

**Tabla 11.** Unidades taxonómicas operacionales (Otus) que contribuyen mayoritariamente a la similitud global de las comunidades bacterianas en inóculo y biorreactores. BR1: biorreactor anóxico y con adición de nitritos; BR2: biorreactor microaeróbico y con adición de nitritos; BR3: biorreactor microaeróbico sin adición de nitritos. Análisis SIMPER.

Average similarity among inoculum and BRs: 66.7%				
OTUs	Taxonomic affiliation	Average rel. abund.	Average similarity among samples	Contribution
OTU05	<i>Candidatus Brocadiales</i>	43.4%	41.09%	61.61%
OTU21	<i>Ignavibacterium</i>	9.7%	6.42%	9.63%
OTU44	<i>Thermanerothrix</i>	8.03%	3.75%	5.62%
OTU14	<i>Dokdonella</i>	5.56%	3.17%	4.76%
OTU28	<i>Nitrosospira</i>	4.10%	2.94%	4.42%
OTU27	<i>Nitrosomonas</i>	8.71%	2.71%	4.06%

Análogamente, este análisis indicó qué OTUs jugaban un papel importante en la no-similitud de la comunidad bacteriana comparando el inóculo con los tres biorreactores (**Tabla 12**). Así mostró que el inóculo fue más similar al biorreactor anóxico (BR1) que a los biorreactores microaeróbicos (BR2 y BR3), cuyos porcentajes de no-similitud fueron de 39.5% (Inóculo-BR1); 43% (Inóculo-BR2); y 51.7% (Inóculo-BR3). En la comparación del inóculo con los biorreactores BR1 y BR2, la OTU 19 (*Haliscomenobacter*) fue la que contribuyó en mayor proporción a esta explicación de la disimilitud en la diversidad bacteriana con un 19.6% en BR2 y un 21.5% en BR1. Así, en el caso de BR3, la OTU que más contribuye a la explicación de las diferencias en la diversidad microbiana entre el inóculo y BR3 fue *Nitrosomonas* con una contribución del 24.3%. Aunque la mayor disimilitud que se encuentra en entre el bioreactor anóxico (BR1) y los bioreactores microaeróbicos (BR2y BR3) con un 43.74%, fue *Nitrosomonas* con un 28.19% a la no similitud. De igual modo, también se observó que la mayor similitud se obtuvo entre los biorreactores microaeróbicos (BR2 y BR3) con un porcentaje de semejanza del 74.2%. Curiosamente la disimilitud entre estos bioreactores se

debe en su mayoría a los microorganismos del genero *Nitrosomonas* con una contribución de 30.81%.

**Tabla 12.** Unidades taxonómicas operacionales (OTUs) que contribuyen mayoritariamente a la no semejanza de las comunidades bacterianas entre las diferentes condiciones de inóculo y BRs: BR1: biorreactor anóxico y con adición de nitritos; BR2: biorreactor microaeróbico y con adición de nitritos; BR3: biorreactor microaeróbico sin adición de nitritos.

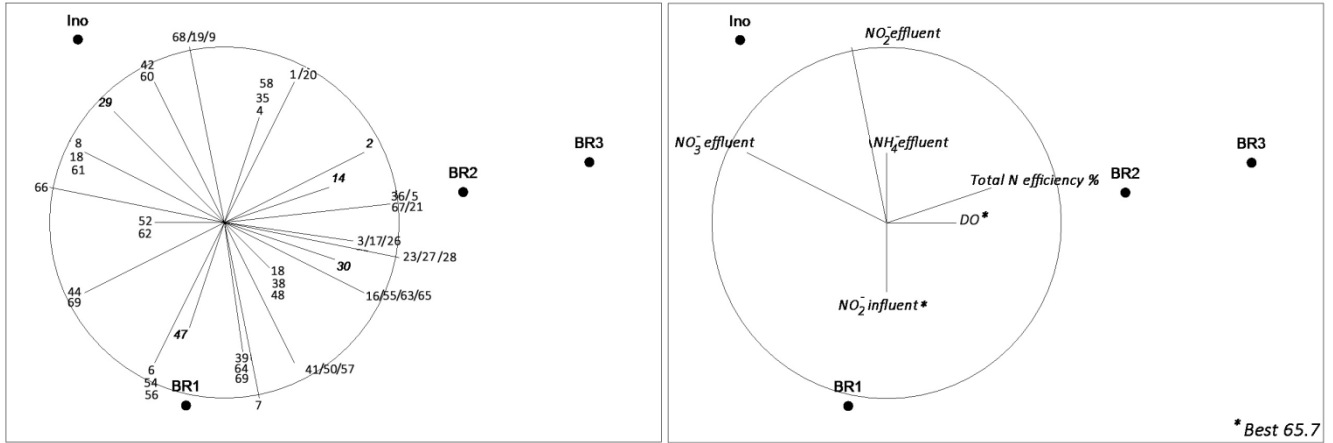
Disimilitud media entre grupos	OTUs	Disimilitud Media	Contribución %	Acumulación %
BR2 x Inoculum (43%)	19	8,42	19,59	19,59
	5	5,34	12,42	32,01
	27	4,6	10,7	42,71
	21	4,04	9,39	52,1
	44	3,15	7,33	59,43
	14	3,05	7,09	66,51
	48	1,86	4,32	70,84
	28	1,51	3,51	74,34
	68	1,43	3,34	77,68
	29	1,43	3,33	81,01
	38	0,78	1,82	82,83
	42	0,76	1,77	84,6
	59	0,75	1,75	86,35
	3	0,74	1,71	88,06
	61	0,67	1,57	89,63
	BR2 x BR 1 (29.44%)	40	0,65	1,52
44		7,04	23,91	23,91
14		4,64	15,76	39,66
27		4,37	14,85	54,52
21		2,84	9,66	64,17
48		1,86	6,31	70,48
59		1,37	4,67	75,15
6		1,31	4,46	79,61
7		0,91	3,08	82,69
3		0,74	2,5	85,19
47		0,45	1,51	86,7
62		0,33	1,13	87,84
65		0,28	0,97	88,8
28	0,27	0,91	89,71	

	5	0,24	0,82	90,53
Inoculum x BR1 (39.5%)	19	8,48	21,46	21,46
	21	6,88	17,42	38,89
	5	5,1	12,91	51,79
	44	3,89	9,84	61,64
	14	1,59	4,03	65,67
	68	1,47	3,72	69,39
	29	1,46	3,7	73,08
	6	1,32	3,34	76,42
	28	1,24	3,14	79,56
	7	0,97	2,46	82,02
	40	0,79	1,99	84,01
	38	0,77	1,94	85,95
	42	0,72	1,82	87,77
	61	0,68	1,73	89,5
	59	0,62	1,57	91,07
BR2 x BR3 (25.83%)	27	7,96	30,81	30,81
	1	2,6	10,08	40,89
	21	2,59	10,04	50,93
	44	1,92	7,42	58,35
	48	1,86	7,19	65,54
	28	1,11	4,28	69,83
	47	0,8	3,08	72,91
	3	0,69	2,65	75,56
	5	0,56	2,18	77,74
	24	0,52	2,01	79,76
	62	0,48	1,85	81,61
	65	0,41	1,6	83,2
	4	0,37	1,44	84,64
	35	0,31	1,19	85,84
	14	0,29	1,12	86,96
	53	0,26	1,01	87,97
	40	0,22	0,86	88,83
	19	0,22	0,85	89,69
	42	0,19	0,74	90,43
Inoculum x BR3 (51.7 %)	27	12,56	24,3	24,3
	19	8,2	15,86	40,16

	44	5,07	9,8	49,96
	5	4,78	9,24	59,2
	14	2,76	5,33	64,53
	28	2,61	5,06	69,59
	1	2,53	4,89	74,48
	29	1,46	2,82	77,3
	21	1,45	2,8	80,1
	68	1,43	2,77	82,86
	59	0,89	1,72	84,58
	40	0,88	1,7	86,28
	38	0,78	1,5	87,78
	61	0,69	1,33	89,11
	42	0,57	1,1	90,21
BR1 x BR3 (43.74 %)	27	12,33	28,19	28,19
	44	8,95	20,47	48,67
	21	5,44	12,43	61,09
	14	4,35	9,95	71,04
	1	2,64	6,03	77,07
	59	1,51	3,45	80,52
	28	1,38	3,14	83,67
	6	1,33	3,03	86,7
	7	0,97	2,21	88,91
	24	0,52	1,2	90,11

Por último, en la **Ilustración 19** se puede observar la representación gráfica de la ordenación NMDS de los diferentes biorreactores e inóculo. Dicha representación también se basa en las abundancias relativas de las OTUs obtenidas mediante la secuenciación con Illumina. La distancia entre los puntos que representan tanto al inóculo como a los biorreactores refleja la semejanza relativa que hay entre ellos. Y los vectores ilustran la interacción entre la ordenación de los biorreactores y el inóculo y dos grupos de variables: (I) abundancia relativa de OTUs prevalentes, que mostraron una elevada contribución como se refleja en el análisis SIMPER (variables bióticas, Gráfico de la izquierda); (II) cambios en los parámetros de operación (variables abióticas, gráfico de la derecha). El

procedimiento BIO-ENV reveló que el oxígeno disuelto (OD) y la concentración de  $\text{NO}_2^-$ -N en el influente fueron las variables que proporcionaron la mejor explicación para los cambios en las poblaciones bacterianas totales analizadas por Illumina (BEST: 65.7%).



OTUs	phylum	class	order	family	génus	OTUs	phylum	class	order	family	génus
1	Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobacterium	35	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Polaromonas
2	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Acidovorax	36	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Pseudoxanthomonas
3	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Rhodanobacteraceae	Aquimonas	37	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Rehaibacterium
4	Chloroflexi	Caldilineae	Caldilineales	Caldilineaceae	Caldilinea	38	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Rhodobacter
5	Planctomycetes	Planctomycetia	Candidatus Brocadiales	Candidatus Brocadiaceae	Candidatus Brocadiia	39	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacterales	Nocardiaceae	Rhodococcus
6	Planctomycetes	Planctomycetia	Candidatus Brocadiales	Candidatus Brocadiaceae	Candidatus Jettenia	40	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Unclassified	Rubrivivax
7	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium	41	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Simplicispira
8	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonas	42	Chloroflexi	Thermomicrobia	Sphaerobacterales	Sphaerobacteraceae	Sphaerobacter
9	Actinobacteria	Thermoleophiia	Solirubrobacterales	Conexibacteraceae	Conexibacter	43	Bacteroidetes	Sphingobacterii	Sphingobacterales	Chitinophagaceae	Terrimonas
10	Chloroflexi	Dehalococcoidia	Unclassified	Unclassified	Dehalogenimonas	44	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Thermanaerotherix
11	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Denitratisoma	45	Chloroflexi	Thermomicrobia	Thermomicrobiales	Thermomicrobiaceae	Thermomicrobium
12	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Derxia	46	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Thermomonas
13	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	Desulfobacteraceae	Desulfococcus	47	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophiales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus
14	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Rhodanobacteraceae	Rhodanobacter	48	Acidobacteria	Acidobacterii	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Unclassified
15	Actinobacteria	Acidimicrobia	Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae	Ferrimicrobium	49	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Unclassified	Unclassified
16	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Georgfuchsia	50	Chloroflexi	Caldilineae	Caldilineales	Unclassified	Unclassified
17	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacterales	Gordoniaceae	Gordonia	51	Chloroflexi	Chloroflexia	Chloroflexales	Unclassified	Unclassified
18	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Koffleriaceae	Haliangium	52	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Unclassified	Unclassified
19	Bacteroidetes	Sphingobacterii	Sphingobacterales	Saprospiraceae	Haliscomenobacter	53	Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Unclassified	Unclassified
20	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Hyphomicrobium	54	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Unclassified	Unclassified
21	Ignavibacteria	Ignavibacteria	Ignavibacteriales	Ignavibacteriaceae	Ignavibacterium	55	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Unclassified	Unclassified
22	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Limnobacter	56	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Unclassified	Unclassified
23	Chloroflexi	Caldilineae	Caldilineales	Caldilineaceae	Litorilinea	57	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Unclassified	Unclassified
24	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Longilinea	58	Chloroflexi	Thermomicrobia	Sphaerobacterales	Unclassified	Unclassified
25	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	Mesorhizobium	59	Bacteroidetes	Sphingobacterii	Sphingobacterales	Unclassified	Unclassified
26	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Nitrobacter	60	Deinococcus-Therr	Deinococci	Thermales	Unclassified	Unclassified
27	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	Nitrosomonas	61	Actinobacteria	Actinobacteria	Unclassified	Unclassified	Unclassified
28	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	Nitrosospira	62	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Unclassified	Unclassified	Unclassified
29	Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	Ohtaekwangia	63	Bacteroidetes	Flavobacterii	Unclassified	Unclassified	Unclassified
30	Verrucomicrobia	Opiritae	Opiritales	Opiritaceae	Opiritus	64	Armatimonadetes	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified
31	Bacteroidetes	Flavobacterii	Flavobacteriales	Cryomorphaceae	Owenweeksia	65	Bacteroidetes	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified
32	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Paracoccus	66	Proteobacteria	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified
33	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhodobiaceae	Parvibaculum	67	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Unclassified	Unclassified
34	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Phenylobacterium	68	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Xanthomonas
						69	Caldilineae	caldilineales	Unclassified	Unclassified	Unclassified

**Ilustración 19.** Gráficos Non-metric multidimensional scaling (NMDS) que ilustran las ordenaciones de las muestras del inóculo y biorreactores, según la similitud relativa de sus comunidades bacterianas analizadas por la secuenciación illumina. En la izquierda, los vectores representan la dirección a lo largo de la ordenación de las abundancias relativas de las unidades taxonómicas operacionales. En la derecha, los vectores representan la fuerza y la influencia direccional a lo largo de la ordenación de las variables abióticas:  $\text{NO}_2^-$ -N en el influente, oxígeno disuelto (DO),  $\text{NH}_4^+$ -N en el efluente,  $\text{NO}_2^-$ -N en el efluente,  $\text{NO}_3^-$ -N en el efluente and eficiencia de nitrógeno total (%). Las variables abióticos que mejor explican las distribuciones de los datos bióticos según el análisis bio-env están marcadas con un asterisco (\*).



El coeficiente de correlación “producto-momento” de Pearson (**Ilustración 19**) se muestra en la **Tabla 13**, y se clasificó como fuerte para valores absolutos de  $r \geq 0,50$  (Cohen, 1988). En general, el procedimiento BIO-ENV demostró una alternancia de las unidades taxonómicas bacterianas dominantes en relación a los cambios en las condiciones operacionales. Los resultados mostraron que la abundancia relativa de las OTUs 26, 27 y 28 relacionadas con *Nitrosomadales* y *Nitrosomonas* tendieron a aumentar en los biorreactores operados bajo condiciones microaeróbicas, apuntando en la dirección de BR2 y BR3 y se correlacionaron positivamente con OD (oxígeno disuelto) ( $r > 0.8$ ). Por otra parte, el análisis multivariante confirmó que la abundancia relativa de las OTUs 5 y 21 relacionadas con *Candidatus Brocadia* e *Ignavibacteriales* fueron correlacionadas positivamente con la eficiencia de eliminación de nitrógeno total ( $r > 0.8$ ).

**Tabla 13.** Coeficientes de correlación producto-momento Pearson ( $r$ ) entre los vectores de la Ilustración 7, que representan las abundancias relativas de las diferentes unidades taxonómicas operacionales detectadas por la secuenciación con Illumina en las muestras bióticas (inóculo y biorreactores) y la variables abióticas:  $\text{NO}_2^-$ -N en el influente, oxígeno disuelto (OD),  $\text{NH}_4^+$ -N en el efluente,  $\text{NO}_2^-$ -N en el efluente,  $\text{NO}_3^-$ -N en el efluente and eficiencia de nitrógeno total (%).

OTUs	Eficiencia N		$\text{NH}_4^+$ -N efluente	$\text{NO}_2$ N efluente	$\text{NO}_3^-$ -N efluente	$\text{NO}_2$ N influyente
	total (%)	OD (mg/L)				
1	0,707	0,447	0,894	0,789	0,000	-0,894
2	0,990	0,894	0,447	0,263	-0,600	-0,447
3	0,894	0,990	-0,141	-0,333	-0,949	0,141
4	0,600	0,316	0,949	0,868	0,141	-0,949
5	0,894	0,647	0,394	0,396	-0,800	0,325
6	-0,707	-0,447	-0,894	-0,789	0,000	0,894
7	-0,124	0,196	-0,98	-1,00	-0,614	0,981
8	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
9	0,124	-0,196	0,981	1,000	0,614	-0,98
10	0,141	0,447	-0,894	-0,96	-0,800	0,894
11	0,141	0,447	-0,894	-0,96	-0,800	0,894
12	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
13	0,141	0,447	-0,894	-0,96	-0,800	0,894
14	1,000	0,949	0,316	0,124	-0,707	-0,316
15	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
16	0,707	0,894	-0,447	-0,614	-1,00	0,447
17	0,894	0,990	-0,141	-0,333	-0,949	0,141
18	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
19	0,124	-0,196	0,981	1,000	0,614	-0,98
20	0,707	0,447	0,894	0,789	0,000	-0,894
21	0,894	0,647	0,394	0,396	-0,800	0,325
22	0,707	0,894	-0,447	-0,614	-1,00	0,447

23	0,868	0,981	0,296	0,385	-0,796	0,196
24	0,868	0,981	-0,196	-0,385	-0,96	0,196
25	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
26	0,894	0,990	0,341	0,233	-0,649	0,141
27	0,868	0,981	0,296	0,385	-0,796	0,196
28	0,868	0,981	0,296	0,385	-0,796	0,196
29	-0,447	-0,707	0,707	0,832	0,949	-0,707
30	0,800	0,949	-0,316	-0,496	-0,99	0,316
31	0,141	0,447	-0,894	-0,96	-0,800	0,894
32	0,707	0,894	-0,447	-0,614	-1,00	0,447
33	0,707	0,894	-0,447	-0,614	-1,00	0,447
34	0,447	0,707	-0,707	-0,832	-0,949	0,707
35	0,600	0,316	0,949	0,868	0,141	-0,949
36	0,894	0,647	0,394	0,396	-0,800	0,325
37	0,868	0,981	-0,196	-0,385	-0,96	0,196
39	-0,179	0,141	-0,99	-1,00	-0,569	0,990
40	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
41	-0,124	0,196	-0,98	-1,00	-0,614	0,981
42	-0,141	-0,447	0,894	0,965	0,800	-0,894
43	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
44	-0,99	-0,894	-0,447	-0,263	0,600	0,447
45	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
46	0,141	0,447	-0,894	-0,96	-0,800	0,894
47	-0,600	-0,316	-0,949	-0,868	-0,141	0,949
48	0,447	0,707	-0,707	-0,832	-0,949	0,707
49	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
51	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
52	-0,949	-1,00	0,000	0,196	0,894	0,000
53	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
54	-0,707	-0,447	-0,894	-0,789	0,000	0,894
55	0,707	0,894	-0,447	-0,614	-1,00	0,447
56	-0,707	-0,447	-0,894	-0,789	0,000	0,894
57	-0,124	0,196	-0,98	-1,00	-0,614	0,981
58	0,600	0,316	0,949	0,868	0,141	-0,949
59	-0,99	-0,894	-0,447	-0,263	0,600	0,447
60	-0,141	-0,447	0,894	0,965	0,800	-0,894
61	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
62	-0,949	-1,00	0,000	0,196	0,894	0,000
63	0,707	0,894	-0,447	-0,614	-1,00	0,447
64	-0,179	0,141	-0,99	-1,00	-0,569	0,990
65	-0,949	-1,00	0,000	0,196	0,894	0,000
66	-0,868	-0,98	0,196	0,385	0,965	-0,196
67	0,894	0,647	0,394	0,396	-0,800	0,325
69	-0,99	-0,894	-0,447	-0,263	0,600	0,447
68	0,124	-0,196	0,981	1,000	0,614	-0,98

Los resultados obtenidos demuestran que las diferentes condiciones operacionales pueden influir en la eficiencia del sistema. El oxígeno disuelto (OD) siempre se correlacionó positivamente con la eficiencia de eliminación de N total y se correlacionó negativamente con la concentración de  $\text{NO}_2^-$ -N. Además, los cambios de la concentración de  $\text{NO}_2^-$ -N y OD influenciaron en la biología y el funcionamiento de los Biorreactores.

Curiosamente, la dinámica de las bacterias Anammox representadas por *Candidatus Brocadia* no cambió bajo las diferentes condiciones. Las bacterias Anammox, que han sido identificadas en muchos ecosistemas naturales, tienen el potencial de contribuir a la eliminación global de nitrógeno (Hamersley et al. 2007; Schmid et al. 2007). Estudios recientes han demostrado que las bacterias Anammox (*Candidatus Brocadia*) tienen un metabolismo versátil, capaz de realizar la oxidación anaerobia de amonio. Además, puede utilizar diversos donantes/aceptadores de electrones (ácidos orgánicos, hierro y manganeso) (Güven et al. 2005; Strous et al. 2006; Kartal et al. 2007). Esta versatilidad podría proporcionar una ventaja competitiva sobre otras bacterias presentes en el sistema. Por el contrario, el oxígeno disuelto favoreció al género *Nitrosomonas* (**Ilustraciones 14 y 18**) que coexiste en el biorreactor con las bacterias Anammox. Los microorganismos del género *Nitrosomonas* (AOB) son ampliamente conocidos dentro de las  $\beta$ -proteobacterias, habiéndose demostrado su asociación cooperativa en los procesos autotróficos de eliminación de amonio, originando no solo el nitrito requerido en el proceso sino al mismo tiempo consumiendo el oxígeno disuelto en el ambiente que resulta tóxico para las mencionadas bacterias Anammox (Sliemers et al. 2003).

Como resumen de lo anteriormente mencionado, podemos afirmar que la combinación de secuenciación masiva mediante Illumina y la cuantificación mediante PCR (qPCR) permitió una identificación en profundidad de la diversidad bacteriana y de las poblaciones microbianas, así como de su dinámica a lo largo del tiempo (**Ilustraciones 14 y 18**). Los resultados demostraron que la comunidad bacteriana estaba dominada por miembros de las familias *Planctomycetes* y *Proteobacterias* como *Candidatus Brocadia* y *Nitrosomonas*. En general, las unidades taxonómicas identificadas en nuestro estudio han sido encontradas

anteriormente en sistemas CANON a escala real, en sistemas Anammox a escala de laboratorio, en biorreactores de nitrificación parcial y biofiltros y en sistemas de aguas residuales (Bassin et al. 2015; Cerrone et al. 2013; González-Martínez et al. 2014; González-Martínez et al. 2016; Nielsen et al. 2005; Van der Star et al. 2007; Van der Star et al. 2008). Además, las bacterias Anammox y nitrificantes se han descrito previamente en diferentes configuraciones de la biomasa como sistemas granulares (González-Martínez et al. 2015; Nielsen et al. 2005; Li et al. 2016), reactores de lecho fijo (Toh et al. 2002), reactores de biopelícula (Li et al. 2016) o reactores de biopelícula con soportes (Rodríguez-Sánchez et al. 2016). Sin embargo, la mayoría de los sistemas operaron en reactores granulares debido a que fomentan la coexistencia de diferentes poblaciones bacterianas (Langone et al. 2014). En este sentido, el hallazgo en nuestro estudio muestra que en un sistema CANON construido como biofiltro sumergido también puede crearse diferente micro-ambiente donde coexisten bacterias Anammox y AOB, estableciéndose los simbiosismos necesarios para un correcto y eficaz sistema de tratamiento de efluentes con alta carga de N amoniacal.

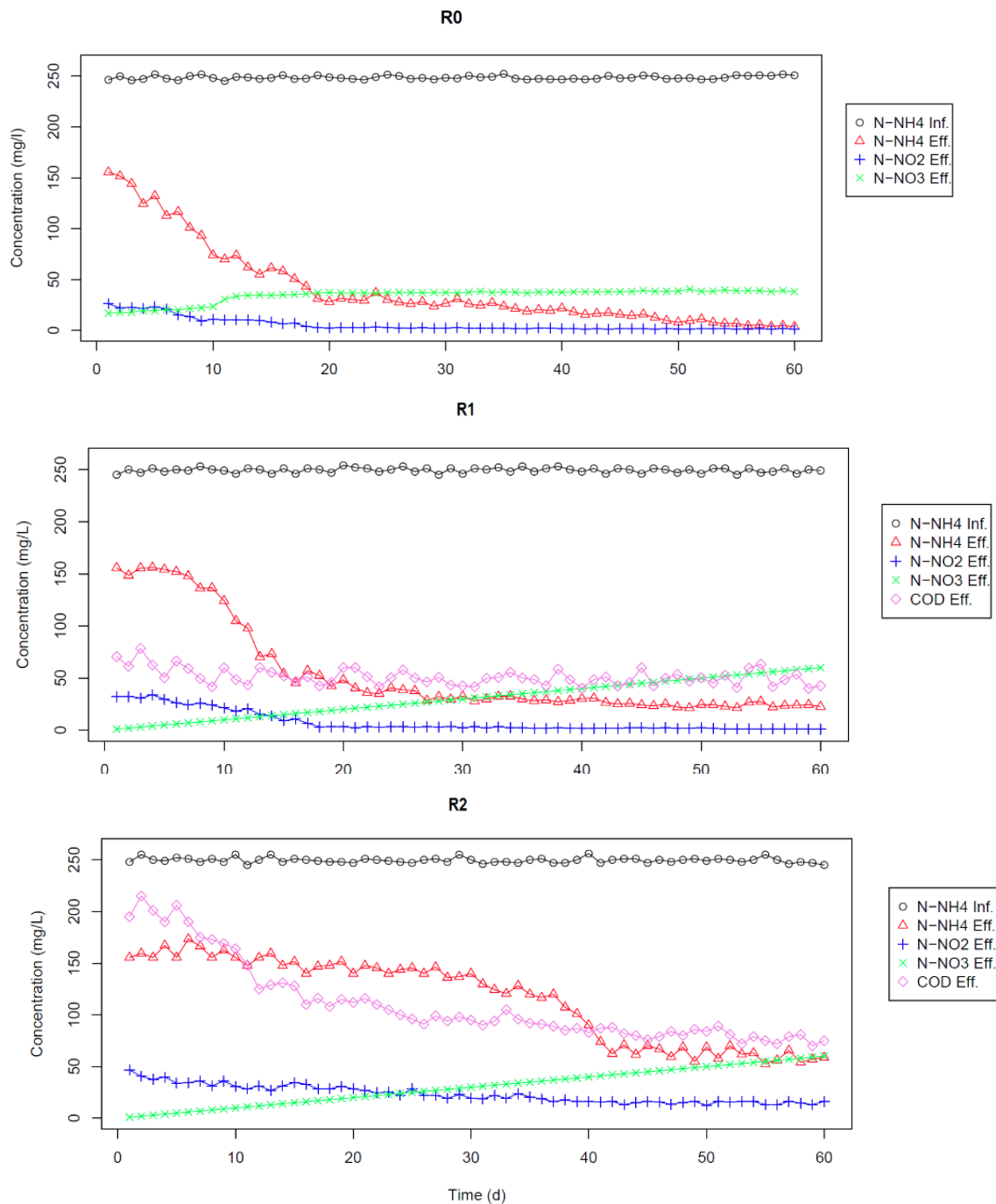
## 7.2. EXPERIMENTO 2: SISTEMA CANON CONFIGURADO COMO FILTROS SUMERGIDOS BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MATERIA ORGÁNICA

Como se ha comentado en la introducción de esta investigación, a los sistemas CANON les afecta notoriamente cualquier variación que se produzca en las condiciones ambientales bajo las que trabaja. En este sentido, en este capítulo se estudia cómo afecta la presencia de materia orgánica al sistema CANON configurado en un reactor de lecho fijo. En concreto se estudia cómo afecta la concentración de materia orgánica a los rendimientos de eliminación de nitrógeno del sistema y a la comunidad microbiana desarrollada en los soportes.

Las diferentes concentraciones de materia orgánica utilizadas fueron: 0, 100 y 400 mg L<sup>-1</sup> en cada uno de los biorreactores R0, R1 y R2, respectivamente. Todos los biorreactores operaron en paralelo durante un período de 60 días. Para todos los reactores se utiliza el material soporte escogido en el apartado 6 de esta tesis (características en **Tabla 4**). Las condiciones operacionales (**Tabla 14**) son las mismas para los tres biorreactores, a excepción de la concentración de materia orgánica. Como se ha comentado, el biorreactor R0, operaba sin ninguna concentración de materia orgánica en su influente, con un tiempo de retención hidráulico de 7 h y con una concentración de oxígeno disuelto muy limitada, en torno a 1.0 -1.5 mg L<sup>-1</sup>, con el objeto de mantener unas condiciones microaeróbicas en el reactor. Respecto al resto de condiciones operacionales, comentar que el pH del sistema siempre se mantuvo estable en torno a 7, y la temperatura en todo el experimento fue de 35° C. La evolución de las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato en el efluente se pueden observar en la **Ilustración 20**. Al comienzo del experimento el rendimiento de eliminación de amonio del biorreactor R0 (sin adición de materia orgánica) fue bastante bajo (**Ilustración 20**). Sin embargo, el sistema rápidamente comenzó a mejorar su eficiencia y, después de 15 días de funcionamiento, el biofiltro sumergido fue capaz de eliminar casi el 75% de amonio presente en el influente.

**Tabla 14.** Concentraciones de los influentes y condiciones operacionales en los tres Biorreactores con diferentes concentraciones de materia orgánica. Biorreactor operando sin materia orgánica (R0). Biorreactor funcionando con 100 mgCOD L<sup>-1</sup> (R1). Biorreactor funcionando con 400 mgCOD L<sup>-1</sup> (R2).

	Influente N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	Influente N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	Influente N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	Influente COD (mg.L <sup>-1</sup> )	OD (mg.L <sup>-1</sup> )	T. °C	TRH h	pH Un. pH
<b>Periodo inoculación</b>	246	0	0	0	1.0-1.5	35	7	7-8
<b>R0</b>	246	0	0	0	1.0-1.5	35	7	7-8
<b>R1</b>	246	0	0	100	1.0-1.5	35	7	7-8
<b>R2</b>	246	0	0	400	1.0-1.5	35	7	7-8



**Ilustración 20.** Concentraciones diarias de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$  y materia orgánica en los efluentes de los distintos biorreactores. Biorreactor operando sin materia orgánica (R0). Biorreactor funcionando con 100 mgCOD L<sup>-1</sup> (R1). Biorreactor funcionando con 400 mgCOD L<sup>-1</sup> (R2).

Por último, cabe destacar, que el bioreactor R0 obtuvo la máxima eficiencia de eliminación de nitrógeno total después de 50 días de funcionamiento llegando a un 84.9% (**Ilustración 20**). Estos resultados sugieren que tanto las bacterias AOB como las bacterias Anammox estaban bien adaptadas a las condiciones de funcionamiento del biofiltro establecidas en nuestro estudio. La estequiometría de un proceso CANON indica que la máxima eficiencia de eliminación de nitrógeno es del 89%, esto se debe a que las bacterias Anammox producen una cierta cantidad de nitratos al asimilar el amonio en dicho proceso (Sliemers et al. 2003). Teniendo en cuenta dicha reacción, los resultados obtenidos en el bioreactor R0 pueden considerarse muy satisfactorios. Además, en los últimos días del experimento (día 50-60), se observa que las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato en el efluente son estables y dentro de los siguientes intervalos 5-10 mg L<sup>-1</sup>, 0-5 mg L<sup>-1</sup> y 25-35 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (**Ilustración 20**).

La insignificante concentración de nitratos en el efluente indica que la actividad de las bacterias NOB fue muy limitada y por consiguiente se deduce una inhibición de este grupo de bacterias como consecuencia del bajo nivel de oxígeno disuelto en el bioreactor aunque también podían influir otros factores como temperatura y pH (Giustinianovich et al. 2016). Dicho lo cual y analizando las concentraciones del efluente de R0, se puede concluir que la eliminación de nitrógeno total se debe a los procesos metabólicos que constituyen el sistema CANON. Además, comparando el rendimiento actual de eliminación de nitrógeno obtenidos con nuestro sistema de biofiltro sumergido con los resultados previos obtenidos en sistemas CANON granulares, podemos concluir que ambos sistemas son muy similares en cuanto a eficiencias, alrededor del 90% (Strous, 2000).

Respecto a los reactores R1 y R2, como ya se ha comentado con anterioridad, operaron bajo diferentes concentraciones de materia orgánica: 100 y 400 mg COD L<sup>-1</sup>, respectivamente. Sin embargo, el resto de las condiciones de funcionamiento eran exactamente las mismas que las del reactor R0. R1 y R2 mostraron patrones similares de eliminación de nitrógeno respecto a R0 (biorreactor de control), aunque con menores eficiencias. Así, R1 y R2 obtuvieron porcentajes de eliminación de nitrógeno de 60 y 40%, respectivamente, durante los primeros 30 días de operación. Sin embargo, cuando el bioreactor R1 estuvo



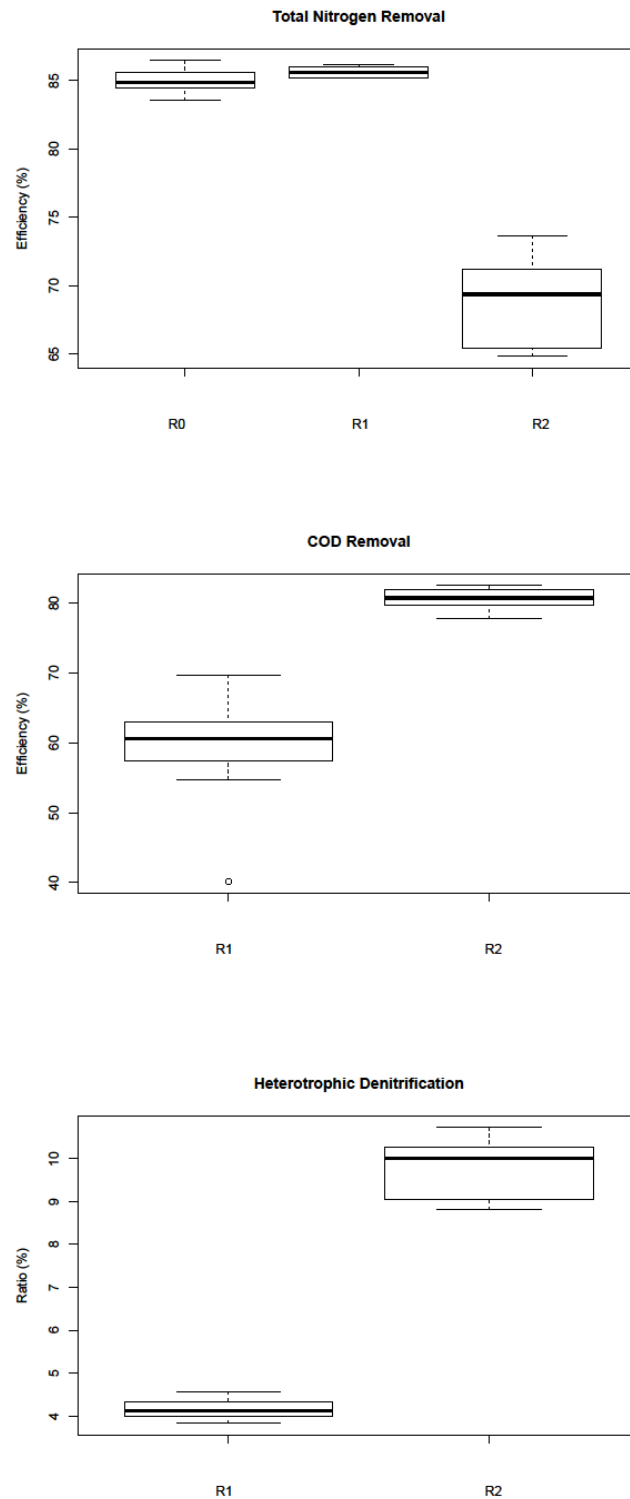
funcionando bajo estas condiciones de materia orgánica presente en el influente durante más de 30 días, la eficiencia de eliminación de nitrógeno fue similar al reactor de control R0, alimentado con aguas residuales sintéticas sin materia orgánica ( **Ilustración 20**). Estos datos sugieren que la presencia de 100 mg COD L<sup>-1</sup> en el influente durante los primeros 30 días de experimento redujo la actividad microbiana en el biorreactor, incluyendo las bacterias AOB y Anammox. Sin embargo, este efecto inhibitorio desapareció después de un período de funcionamiento más largo (después de 50-60 días de operación) y se llegó a alcanzar una eficiencia de eliminación de nitrógeno total del 85.7% en R1. Por consiguiente, la comunidad microbiana del sistema CANON configurado como un biofiltro sumergido, puede adaptarse a la presencia de 100 mg COD L<sup>-1</sup>, probablemente debido al desarrollo y capacidad de adaptación de la biopelícula formada en el soporte.

Cuando el biofiltro sumergido fue alimentado con aguas residuales sintéticas con una concentración de materia orgánica de 400 mg COD L<sup>-1</sup>, la capacidad de eliminación de nitrógeno fue menor comparado con los otros dos reactores, R1 y R0 (**Ilustración 20**). Así, tras un largo período de funcionamiento (60 días) en el biorreactor R2 se obtuvieron menores eficiencias de eliminación de nitrógeno y se pudo observar que el efluente reflejaba mayores valores de nitrito, muy baja concentración de nitratos en comparación con la estequiometría teórica del proceso CANON y peor rendimiento de eliminación de amoníaco.

Estos resultados sugieren que la presencia de una mayor concentración de materia orgánica en las aguas residuales sintéticas induce un efecto inhibitorio en las comunidades autotróficas, lo cual afecta la biotransformación de amonio a nitrato y nitrógeno molecular. En este sentido, la actividad de bacterias Anammox es limitada, lo cual implica la acumulación de nitrito que se observa en la **Ilustración 20** y, al mismo tiempo, esta acumulación de nitrito produce un efecto inhibitorio sobre la actividad de bacterias Anammox.

Nuestros resultados son coherentes con los valores obtenidos en cada uno de los reactores de eliminación de nitrógeno total, eliminación de DQO y ratio desnitrificación heterótrofa (**Ilustración 21**). En la **Tabla 15** se incluyen las medias aritméticas para cada uno de los parámetros así como las desviaciones

estándar, calculadas con los datos de los últimos 10 días del experimento. Estos resultados demuestran que todos los biorreactores se estabilizaron a lo largo del tiempo. Además, los datos obtenidos en el bioreactor R2 sugieren que la desnitrificación heterótrofa contribuye activamente (aproximadamente 9.3%) en la eliminación de nitrógeno y de materia orgánica.



**Ilustración 21.** Eficiencias de eliminación de los Biorreactores al final del experimento; Biorreactor operando sin materia orgánica (R0). Biorreactor funcionando con  $100 \text{ mgCOD L}^{-1}$  (R1). Biorreactor funcionando con  $400 \text{ mgCOD L}^{-1}$  (R2). Resultados obtenidos en los últimos 10 días.

**Tabla 15.-** Análisis estadístico sobre los últimos 10 días del experimento en los diferentes biorreactores. Biorreactor operando sin materia orgánica (R0). Biorreactor funcionando con 100 mgCOD L<sup>-1</sup> (R1). Biorreactor funcionando con 400 mgCOD L<sup>-1</sup> (R2).

	R0		R1		R2	
	Media	Desv. Estan.	Media	Desv. Estan.	Media	Desv. Estan.
NRE	84.9853	0.9099	85.6207	0.4037	68.0825	2.5141
COD.E	0.0000	0.0000	59.1160	7.8330	80.6750	1.4193
HET.DENIT	0.0000	0.0000	4.1491	0.2275	9.6583	0.8971

NRE: eficiencia de eliminación de nitrógeno total; COD.E: Eficiencia de eliminación de COD (materia orgánica); HET\_DENIT: Ratio de desnitrificación heterótrofa.

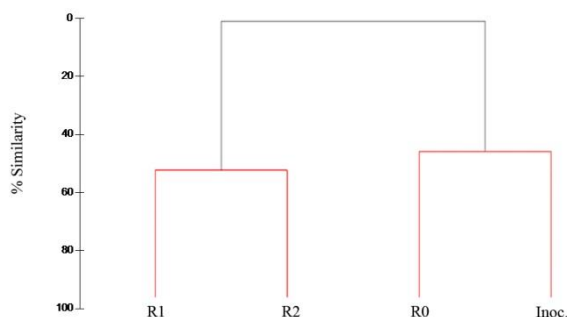
La riqueza de especies secuenciadas de los diferentes biorreactores fue evaluada mediante la realización de curvas de rarefacción (**Tabla 16**). Las curvas de rarefacción y los valores de buena cobertura (>99%) indican que la profundidad de la secuenciación fue suficiente para saturar la curva y describir la diversidad de la comunidad.

**Tabla 16.** Número de lecturas e índices de diversidad y riqueza: richness (S), Good's coverage, Chao-1, Shannon-Wiener (H') y Simpson evenness. Obtenidos a partir de los datos de secuenciación con Illumina en el inóculo y biorreactores. CI: intervalos de confianza al 95% (p < 0.05). Biorreactor operando sin materia orgánica (R0). Biorreactor funcionando con 100 mgCOD L<sup>-1</sup> (R1). Biorreactor funcionando con 400 mgCOD L<sup>-1</sup> (R2).

	No. reads	Richness (S)	Good's coverage	Chao-1	CI 95%	Shannon-Wiener H'	CI 95%	Simpson	CI 95%
Inóculo	694	44	99.68	44	44-47	2.41	2.38-2.43	0.82	0.82-0.83
R0	694	54	99.59	54	32-117	1.75	1.59-1.71	0.69	0.67-0.73
R1	694	110	99.61	192.5	112-181	3.51	3.33-3.56	0.93	0.93-0.95
R2	694	107	99.79	164	130-191	3.41	3.34-3.54	0.93	0.92-0.94

Los índices de diversidad mostraron diferencias significativas entre los biorreactores, en primer lugar respecto al número de OTUs detectados en los bioreactores, así, mientras que en el bioreactor R0 (sin materia orgánica) se identificaron 54 OTUs, en los biorreactores operando con materia orgánica se identificaron un número similar entre ellos (R1 y R2; 110 y 107 OTUs, respectivamente). En el biorreactor R0, la comunidad bacteriana presentó una baja riqueza (Chao- 1: 54) y una organización funcional media (H': 1.75). En contraste, los reactores R1 y R2 mostraron una diversidad con una riqueza media-baja (Chao-1: 192 y 164, respectivamente), y una organización funcional baja (H': 3.51 y 3.41 para R1 y R2 biorreactores, respectivamente).

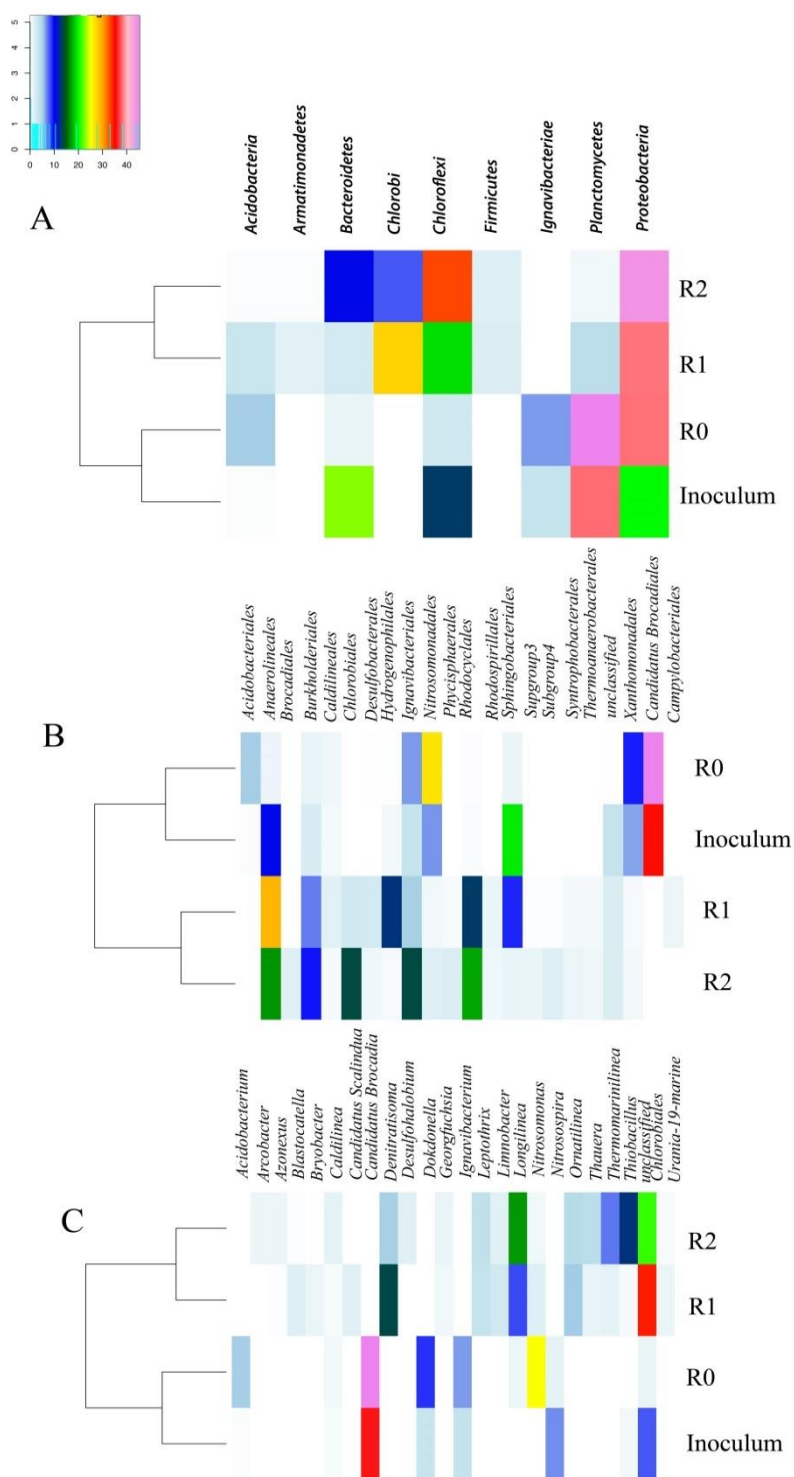
La **Ilustración 22** muestra el análisis de clúster de Bray-Curtis de los tres biorreactores. La gráfica de análisis de cluster demuestra que la estructura de la comunidad tiene dos claras agrupaciones. La primera conteniendo el inóculo procedente de la planta Olburgen y el bioreactor R0. La segunda formada por los biorreactores R1 y R2, ambos con materia orgánica, y una similitud superior al 60%. Estos resultados demuestran que la adición de materia orgánica influye fuertemente en la estructura de la comunidad, lo cual era de esperar basándonos en estudios previos (Rodríguez-Sánchez et al. 2016).



**Ilustración 22.** Análisis clúster de Bray-Curtis mostrando la similitud de la comunidad bacteriana en el inóculo y biorreactores: Biorreactor operando sin materia orgánica (R0). Biorreactor funcionando con 100 mgCOD L-1 (R1). Biorreactor funcionando con 400 mgCOD L-1 (R2).

La **Ilustración 23** muestra un heatmap de la abundancia relativa de OTUs bacterianas a nivel de phylum, orden y género. Las 55 OTUs detectadas en R0 representan un total de 7 phylum, mientras que las 110 y 115 OTUs de R1 y R2 respectivamente, representan un total de 8 phylum. Los phylum dominantes en R0 fueron *Planctomycetes* (45.37%), *Proteobacterias* (38.22%) e *Ignavibacteria* (6.45%). En contraste, *Proteobacterias*, *Chlorobi* y *Chloroflexi* fueron los phylum dominantes cuando se utilizó acetato como materia orgánica con los siguientes porcentajes respectivamente, 38.32%, 19.16% y 27.66% para R1 y el 43.94%, 33.14% y 8.06% para R2. Además, *Chlorobi* y *Armatimonadetes* sólo se detectaron en los biorreactores que operaron con

materia orgánica (R1 y R2), mientras que *Ignavibacteria* se detectó exclusivamente en el biorreactor que funcionó sin materia orgánica (R0). Por otro lado, también se encontraron diferencias interesantes entre los dos biorreactores con diferentes concentraciones de materia orgánica (R1 y R2). *Chloroflexi* fue más abundante en R2 (33.14%), mientras que *Chlorobi* fue más abundante en R1 (27.66%). A nivel de orden, también se detectaron diferencias de identificación taxonómica. Tanto *Candidatus Brocadiales* como *Nitrosomonadales* fueron los órdenes dominantes detectados en R0, sin materia orgánica (45.36% y 26.69% de abundancia relativa). En contraste, *Rhodocyclales* (17.29% y 13.11% de abundancia relativa en R1 y R2, respectivamente) y *Anaerolineales* (16.71% y 29.25% abundancia relativa en R1 y R2, respectivamente) fueron los principales órdenes cuando los biorreactores operaban con materia orgánica. A nivel de género, las mayores abundancias relativas de OTUs pertenecían a *Candidatus Brocadia* (45.36%) y *Nitrosomonas* (25.13%) en el bioreactor R0, mientras que *Rhodocyclales* sin clasificar fue el género dominante en los biorreactores con materia orgánica (34.43% y 21.18% de abundancia relativa, en R1 y R2, respectivamente). Además, se detectaron algunas diferencias entre R1 y R2 que operaban bajo diferentes concentraciones de materia orgánica. En este sentido, *Rhodocyclales* sin clasificar (21.18%), *Longilinea* (16.85%) y *Thiobacillus* (12.68%) fueron los géneros dominantes en R2, mientras que *Rhodocyclales* sin clasificar (34.43%), *Denitratisoma* (13.68%) y *Longilinea* (8.35%) fueron los géneros dominantes en R1.



**Ilustración 23.** Heatmap de las abundancias relativas de las OTUs detectadas por secuenciación con Illumina en las diversas muestras: Inóculo. Biorreactor operando sin materia orgánica (R0). Biorreactor funcionando con 100 mgCOD L-1 (R1). Biorreactor funcionando con 400 mgCOD L-1 (R2). A. Clasificación a nivel de phylum. B. Clasificación a nivel de Orden. C. Clasificación a nivel de género.

A fin de evaluar la contribución de cada OTU a la similitud/disimilitud entre biorreactores (con o sin acetato), se realizó un análisis SIMPER. La similitud global entre los biorreactores fue de 23.62%, donde las OTUs 5, 3, 1, 4 y 6 (filogenéticamente relacionadas con, *Chlorobiales* sin clasificar, *Longilinea*, *Denitratisoma*, *Ornatilinea* y *Leptothrix*) contribuyeron con un 79.59% a explicar esta semejanza (**Tabla 17**). SIMPER corroboró las mayores diferencias entre los biorreactores (operando con y sin de materia orgánica) (**Tabla 18**). Según el análisis, las diferencias entre los biorreactores operando con y sin materia orgánica fueron más del 94%, lo que se explica principalmente por la OTU 118 relacionada filogenéticamente con *Candidatus Brocadia* (una contribución superior al 24%), y la OTU 9 relacionada filogenéticamente con *Nitrosomonas* (una contribución superior al 12%) (**Tabla 18**).

**Tabla 17.** OTUs que mayoritariamente contribuyen a la similitud global de la comunidad bacteriana entre los biorreactores BRs según el análisis SIMPER.

Similitud media entre biorreactores BRs: 23.62%				
OTUs	Afiliación Taxonomica	Abundancia relative media	Similitud media entre muestras	Contribución
5	Unclassified <i>chlorobiales</i>	18.97%	9.4%	39.80%
3	<i>Longilinea</i>	8.77%	4.14%	17.51%
1	<i>Denitratisoma</i>	6.29%	2.07%	8.74%
4	<i>Ornatilinea</i>	3.27%	1.78%	7.53%
6	<i>Leptothrix</i>	2.50%	1.43%	6.07%
9	<i>Nitrosomonas</i>	9.34%	1.42%	6.01%
13	<i>Limnobacter</i>	1.49%	0.69%	2.91%
29	<i>Caldilinea</i>	0.94%	0.63%	2.68%

**Tabla 18.** OTUs que contribuyen mayoritariamente a la disimilitud entre los diferentes biorreactores. A. Disimilitud media entre R0 x R2. B. Disimilitud media entre R0 x R1. C. Disimilitud media entre R1 x R2.

A.

		OTUs 118	OTUs 9	OTUs 5	OTUs 3	Acumulación
Afiliación taxonómica		<i>Candidatus Brocadia</i>	<i>Nitrosomonas</i>	Unclassified <i>Chlorobiales</i>	<i>Longilinea</i>	
R0 X R2	95.53 % Disimilitud media	24.92	13.34	10.92	8.66	
	% Contribución	26.09	13.96	11.43	9.07	60.56

B.

		OTUs 118	OTUs 5	OTUs 9	OTUs 1	OTUs 127	OTUs 3	Acumulación
Afiliación taxonómica		<i>Candidatus Brocadia</i>	Unclassified <i>Chlorobiales</i>	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Denitratisoma</i>	<i>Dokdonella</i>	<i>Longilinea</i>	
R0 X R1	94.54 % Disimilitud media	25.57	18.68	13.03	7.72	5.05	4.10	



	% Contribución	27.05	19.76	13.79	8.16	5.35	4.33	78.43	
C.									
		OTUs 5	OTUs 29	OTUs 3	OTUs 1	OTUs 10	OTUs 11	OTUs 16	Acumulación
	Afiliación taxonómica	Unclassified <i>Chlorobiales</i>	<i>Thiobacillus</i>	<i>Longilinea</i>	<i>Denitratisoma</i>	<i>Thermomarinilinea</i>	<i>Thaurea</i>	<i>Candidatus Scalindua</i>	
R1 X R2	39.07 % Disimilitud media	7.92	7.23	5.08	5.08	3.44	4.64	1.12	
	% Contribución	20.26	18.50	13.00	13.00	8.81	4.19	2.86	80.62

Por otro lado, también se detectaron diferencias claras entre biorreactores que operaban con materia orgánica (>39%). Los principales contribuyentes a explicar estas diferencias fueron OTU 5 (*Chlorobiales* sin clasificar 20.26% de contribución), OTU 29 (*Thiobacillus*, 18.50%), OTU 3 (*Longilinea*, 13%), OTU 1 (*Denitratisoma*, 13%) y OTU 10 (*Thermomarinilinea*, un 8.81%).

En el presente estudio, se encontró que la composición de la estructura bacteriana en los biorreactores R1 y R2 (con materia orgánica) difiere significativamente de la del biorreactor R0 (sin materia orgánica), y estos resultados podrían explicar las diferentes eficiencias en la eliminación de nutrientes observada entre ellos. En este sentido, es evidente que la presencia de altas concentraciones de materia orgánica en el influente determina una mayor diversidad bacteriana y por consiguiente una menor especialización funcional, así, los resultados de Illumina indicaron que *Candidatus Brocadia* y *Nitrosomonas* fueron los taxos dominantes en el biorreactor funcionando sin materia orgánica. La dominancia de *Candidatus Brocadia* y *Nitrosomonas* y su papel en la eliminación del nitrógeno están bien documentados en la literatura (Bassin et al. 2015; Gonzalez-Martínez et al. 2015; Terada et al. 2013). Por lo tanto, el predominio de *Planctomycetes* y *Proteobacteria* está en concordancia con estudios previos, como Anammox a escala de laboratorio, bioreactores de nitrificación parcial y sistema CANON granulares (Bassin et al. 2015; Cerrone et al. 2013; Gonzalez-Martínez et al. 2014a, 2016, 2014b; Rodriguez-Sanchez et al. 2014; Rodríguez-Sánchez et al. 2016).

Como era de esperar, la adición de materia orgánica cambió la estructura de la comunidad bacteriana, como se muestra en el heatmap y en el análisis clúster (**Ilustraciones 22 y 23**). La adición de materia orgánica aumento la proliferación de bacterias heterótrofas relacionadas con los géneros *Longilinea*, *Ornatilinea*, *Thauera*, *Thermomarinilinea*, *Chlorobiales* sin clasificar y *Denitratisoma*. Además, este enriquecimiento heterotrófico ocurrió exclusivamente en los biorreactores que operaban con materia orgánica (R1 y R2). Los resultados sugieren un proceso microbiano adaptativo donde, al final del estudio, bacterias heterótrofas, AOB y Anammox co-existen en el mismo espacio. Además, se detectaron interesantes diferencias en la estructura de la comunidad y en las eficiencias de eliminación de N en ambos biorreactores con materia orgánica (R1 y R2). En el bioreactor R1, las bacterias heterótrofas coexistieron con *Nitrosomonas* (2.01% abundancia relativa) y con *Candidatus Scalindua* (1.87% abundancia relativa). Sin embargo, la abundancia relativa de *Candidatus Scalindua* y *Nitrosomonas* era menor en el bioreactor R2 (0.86% y 0%, respectivamente). Coincidiendo además con que la eficiencia de eliminación de N fue menor en R2. Nuestros resultados demuestran que la eficiencia y la composición de la comunidad bacteriana se vieron afectados por la concentración de materia orgánica.

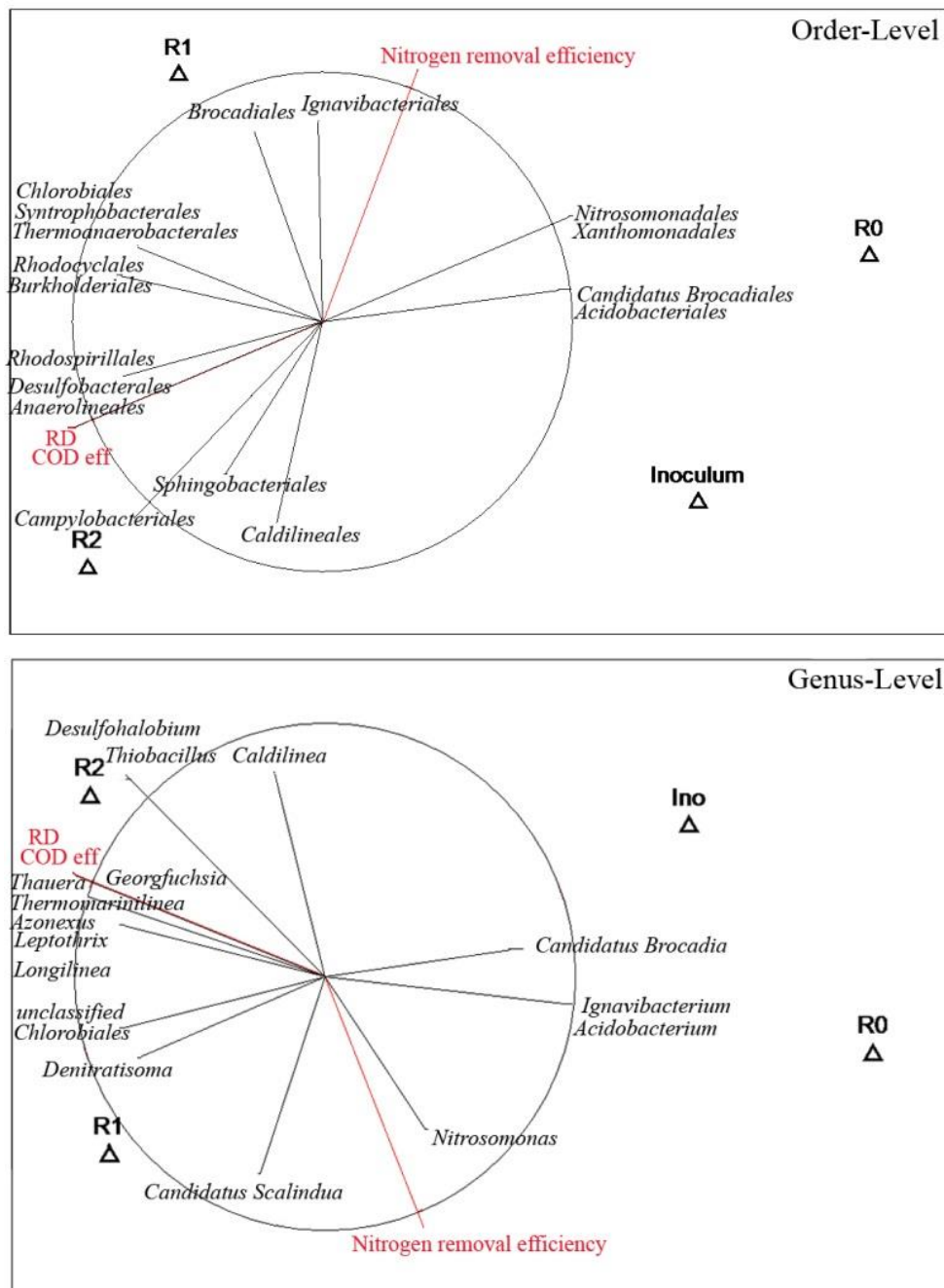
El aumento de la abundancia relativa de bacterias heterótrofas relacionadas con *Thiobacillus*, *Thauera* y *Leptothrix* han sido descritos previamente para sistemas de nitrificación parcial modificados con materia orgánica (Rodríguez-Sanchez et al. 2016). Miembros de *Anaerolineales* y *Chloroflexi* han sido detectados en biorreactores Anammox (Chu et al. 2015; Gonzalez-Martínez et al. 2014a), pero su papel en el sistema necesita ser explorado. Por otra parte, estudios previos (Hiras et al. 2016) han sugerido la diversidad del metabolismo de *Chlorobi*, demostrándose que incluso contienen genes para la asimilación de amonio. *Candidatus Scalindua* ha sido detectada en una amplia variedad de ambientes acuáticos (Hirsch et al. 2011; Kuypers et al. 2003; Woebken et al. 2008), y en diferentes etapas de compostaje (Wang et al. 2017). Además, *Candidatus Scalindua* también está relacionada con la materia orgánica (Awata et al. 2015).

Los hallazgos de nuestro estudio sugieren que la co-existencia de diferentes metabolismos microbianos, como AOB, Anammox y desnitrificantes, no afectan

significativamente a la eliminación y transformación de N y C, como se ha podido ver en R1 biorreactor con baja concentración de materia orgánica (100 mgCOD L<sup>-1</sup>). Esta relación positiva entre bacterias Anammox y desnitrificantes se ha estudiado previamente (Zhang et al. 2011) y futuras investigaciones se centrarán en la comprensión de esta eliminación de nitrógeno. También hemos comprobado que el biorreactor funcionando sin materia orgánica (R0), que se compone de bacterias Anammox y AOB, llegó a obtener unas eficiencias semejantes de eliminación de N a las del bioreactor R1.

Las gráficas de la **Ilustración 24** muestra la ordenación NMDS de los biorreactores, según la abundancia relativa de bacterias a nivel de orden y género, derivados de la secuenciación con Illumina. Independientemente del nivel taxonómico analizado, los biorreactores R1 y R2 se encuentran agrupados, mientras que el bioreactor R0 mostró una evidente separación. Según el análisis de bio-ENV, la variable COD fue la que más participo en la explicación (60%) para ambos niveles taxonómicos analizados (Orden y género). Se pudo observar una fuerte correlación positiva entre la eficiencia de eliminación de nitrógeno con la abundancia relativa de las OTUs clasificadas en los órdenes *Nitrosomonadales*, *Brocadiales* y *Candidatus Brocadiales* ( $r > 0.7$ ). A nivel de género, se pudo detectar una fuerte correlación entre la eficiencia de eliminación de N y la abundancia relativa de *Nitrosomonas* y *Candidatus Scalindua* ( $r > 0.7$ ) (**Ilustración 24** y **Tabla 19**). Por otro lado, desnitrificación y eliminación de DQO estaban estrechamente relacionadas con los géneros *Thauera*, *Chlorobiales no clasificados*, *Thiobacillus*, *Arcobacter*, *Azonexus*, *Desulfohalobium*, *Leptothrix*, *Longilinea* y *Thermomarinilinea* ( $r > 0.9$ ). El análisis BIO-ENV ha demostrado que la eficiencia de eliminación de N y la desnitrificación en los biorreactores se llevó a cabo por diferentes comunidades microbianas. Es ampliamente conocido que *Candidatus Scalindua* y *Nitrosomonas* desempeñan un papel importante en el ciclo del nitrógeno (Gonzalez-Martínez et al., 2014a; Van de Vossenberg et al., 2013). *Thiobacillus* y *Leptothrix* han sido encontrados en nitrificación parcial de biofiltros sometidos a concentraciones de materia orgánica, y vinculados con la desnitrificación (Dolinsek et al. 2013; Rodríguez-Sánchez et al. 2016). *Thauera* generalmente ha sido detectada en sistemas de fangos activos, en los que contribuye significativamente a la desnitrificación (Ma et al. 2015; Zhao et

al. 2013). Los miembros del phylum *Chlorobi* han sido relacionados con el proceso de desnitrificación autotrófica oxidadoras de azufre (Zhang et al. 2015). Y por último, *Denitratisoma* es una bacteria desnitrificante que se encuentra con frecuencia en los sistemas de eliminación de nitrógeno (Li et al. 2017; Ren et al. 2014; Wu et al. 2017).



**Ilustración 24.** Gráficos Non-metric multidimensional scaling (NMDS) que ilustran las ordenaciones del inóculo y biorreactores, según la similitud relativa de sus comunidades bacterianas analizadas por la secuenciación illumina. Biorreactor operando sin materia orgánica (R0). Biorreactor funcionando con 100 mgCOD L<sup>-1</sup> (R1). Biorreactor funcionando con 400 mgCOD L<sup>-1</sup> (R2). RD: ratio de desnitrificación heterótrofa. COD eff: eficiencia de eliminación de COD.

**Tabla 19.** Coeficientes de correlación producto-momento Pearson (r) las muestras bióticas (inóculo y biorreactores) obtenidas por secuenciación con Illumina y las variables abióticas: Eficiencia de eliminación de Nitrógeno, Eficiencia de eliminación de COD, Ratio de desnitrificación heterótrofa y concentración de COD. A. Nivel de Orden. B. Nivel de Género.

A. Nivel Orden				
	Eficiencia Eliminación Nitrógeno	Eficiencia eliminación COD	Ratio Desnitrificación	COD (mg/L)
<i>Acidobacteriales</i>	0,472	-0,964	-0,964	-0,964
<i>Anaerolineales</i>	-0,690	1,000	1,000	1,000
<i>Brocadiales</i>	0,763	-0,059	-0,059	-0,059
<i>Burkholderiales</i>	-0,135	0,811	0,811	0,811
<i>Caldilineales</i>	-0,991	0,585	0,585	0,585
<i>Chlorobiales</i>	0,024	0,707	0,707	0,707
<i>Desulfobacterales</i>	-0,585	0,991	0,991	0,991
<i>Hydrogenophilales</i>	-0,919	0,919	0,919	0,919
<i>Ignavibacteriales</i>	0,928	-0,371	-0,371	-0,371
<i>Nitrosomonadales</i>	0,690	-1	-1,000	-1,000
<i>Phycisphaerales</i>	0,024	0,70711	0,707	0,707
<i>Rhodocyclales</i>	-0,135	0,81068	0,811	0,811
<i>Rhodospirillales</i>	-0,585	0,99083	0,991	0,991
<i>Sphingobacteriales</i>	-0,979	0,82404	0,824	0,824
<i>Subgroup_3</i>	0,024	0,70711	0,707	0,707
<i>Subgroup_4</i>	0,024	0,70711	0,707	0,707
<i>Syntrophobacterales</i>	0,024	0,70711	0,707	0,707
<i>Thermoanaerobacterales</i>	0,024	0,70711	0,707	0,707
<i>unclassified</i>	-0,371	0,92848	0,928	0,928
<i>Xanthomonadales</i>	0,690	-1	-1,000	-1,000
<i>CandidatusBrocadiales</i>	0,472	-0,9638	-0,964	-0,964
<i>Campylobacterales</i>	-0,919	0,91915	0,919	0,919
B. Nivel Género				
	Eficiencia Eliminación Nitrógeno	Eficiencia eliminación COD	Ratio Desnitrificación	COD (mg/L)
<i>Acidobacterium</i>	0,472	-0,964	-0,964	-0,964
<i>Arcobacter</i>	-0,919	0,919	0,919	0,919
<i>Azonexus</i>	-0,646	0,998	0,998	0,998
<i>Blastocatella</i>	0,024	0,707	0,707	0,707
<i>Bryobacter</i>	0,763	-0,059	-0,059	-0,059
<i>Caldilinea</i>	-0,991	0,585	0,585	0,585
<i>Candidatus_Scalindua</i>	0,763	-0,059	-0,059	-0,059
<i>CandidatusBrocadia</i>	0,236	-0,867	-0,867	-0,867
<i>Denitratisoma</i>	0,024	0,707	0,707	0,707
<i>Desulfohalobium</i>	-0,919	0,919	0,919	0,919
<i>Dokdonella</i>	0,472	-0,964	-0,9638	-0,964

<i>Georgfuchsia</i>	-0,690	1,000	1	1,000
<i>Ignavibacterium</i>	0,472	-0,964	-0,9638	-0,964
<i>Leptothrix</i>	-0,646	0,998	0,99827	0,998
<i>Limnobacter</i>	0,024	0,707	0,70711	0,707
<i>Longilinea</i>	-0,585	0,991	0,99083	0,991
<i>Nitrosomonas</i>	0,979	-0,824	-0,824	-0,824
<i>Nitrospira</i>	0,236	-0,867	-0,8666	-0,867
<i>Ornatilinea</i>	0,024	0,707	0,70711	0,707
<i>Thauera</i>	-0,646	0,998	0,99827	0,998
<i>Thermomarinilinea</i>	-0,646	0,998	0,99827	0,998
<i>Thiobacillus</i>	-0,919	0,919	0,91915	0,919
<i>Unclassified chlorobiales</i>	-0,135	0,811	0,81068	0,811
<i>Urania-1B-</i>	0,024	0,707	0,70711	0,707
<i>19_marine_sediment_group</i>				

### 7.3. EXPERIMENTO 3: SISTEMA CANON DE BIOFILTROS BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SALINIDAD.

Bajo el punto de vista técnico, la configuración del sistema y las condiciones operacionales como el pH, la temperatura y la presencia de compuestos inhibitorios son factores que influyen directamente sobre el efecto que la salinidad puede ejercer sobre los procesos de nitrificación. Además la, concentración salina constante o variable en el influente puede cambiar significativamente la eficiencia del tratamiento y, obviamente, la capacidad de adaptación de la comunidad microbiana. En cualquier caso, es necesario buscar soluciones técnicas para lograr la eliminación de nutrientes (especialmente amonio) en los sistemas biológicos con influentes salinos. Además, puede ser esencial para permitir la mejora y optimización de procesos con el objeto de aumentar la eficiencia de eliminación de nitrógeno así como el conocimiento de la diversidad de microorganismos nitrificantes que habitan en biorreactores operando bajo estas condiciones. Particularmente no hay referencias científicas sobre la influencia que ejerce la concentración de sal sobre la biopelícula en un lecho fijo de sistemas CANON, cuyo conocimiento es de gran importancia técnica.

En este estudio, se ha investigado la adaptación y el cambio de la comunidad microbiana, así como la eficiencia de eliminación de nitrógeno en biorreactores CANON de lecho fijo trabajando bajo diferentes concentraciones de sal. Estas concentraciones fueron adoptadas en base a investigaciones anteriores (Cortés-Lorenzo et al. 2012; Glass and Silverstein, 1999; Ramos et al. 2007). Los resultados de nuestro estudio pueden ser importantes para la aplicación del proceso CANON en sistemas de biopelícula sobre lecho fijo a escala real, aumentar el conocimiento sobre respuesta de la comunidad microbiana bajo diferentes concentraciones salinas y, en consecuencia, el rendimiento de este proceso biotecnológico con diferentes influentes salinos.

En concreto, se dispusieron cuatro biorreactores de biopelícula sobre lecho fijo con proceso CANON (R0, R1, R2 y R3) operando bajo diferentes condiciones de salinidad (0, 3, 25, 45 g de NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente). Dichos biorreactores estaban rellenos con una material soporte facilitado por Filtralite y cuyas características son idénticas al material utilizado en los experimentos anteriores (**Tabla 4**) En la



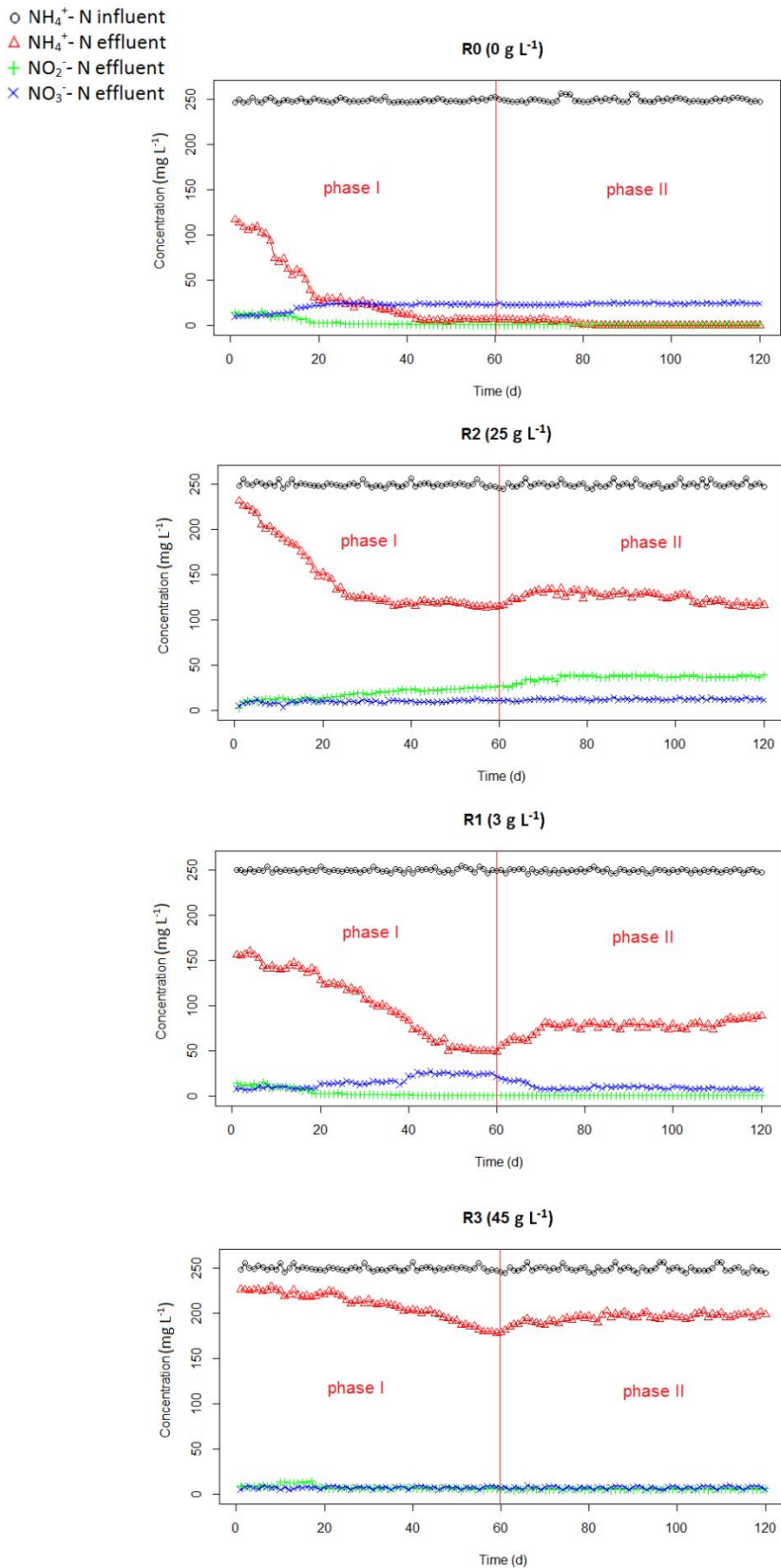
**Tabla 20**, podemos observar las condiciones operativas de este experimento. En este sentido, todas las condiciones ambientales para los diferentes biorreactores se mantuvieron constantes, salvo la salinidad y el tiempo de retención hidráulico (TRH). Respecto al TRH, en el presente capítulo se indican dos fases de estudio, cada una de ellas con un TRH distinto (**ver Tabla 20**). Las condiciones de funcionamiento (pH, DO Y T<sup>a</sup>) seleccionados fueron los valores óptimos para este tipo de procesos (CANON), en base a otros estudios previos, para el desarrollo de las comunidades bacterianas autotróficas para eliminación de nitrógeno (Cortés-Lorenzo et al. 2016).

**Tabla 20.** Parámetros Operacionales. Ratio y eficiencias obtenidas en los diferentes biorreactores y calculadas en los últimos 15 días de cada una de las fases. TRH: tiempo de retención hidráulico. T<sup>a</sup>: Temperatura. OD: Oxígeno Disuelto. NAR: Acumulación de nitritos sobre nitritos más nitratos. Biorreactores operando con 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) y 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente.

Fase	Biorreactor	Salinidad (g·L <sup>-1</sup> )	TRH (h)	T <sup>a</sup> (° C)	pH	OD (mg·L <sup>-1</sup> )	Eficiencia N		
							Total (%)	NAR (%)	Eficiencia NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (%)
I (días 1-60)	R0-C	0	6	35	7-8	1.5-2	87.68±0.35	3.40±0.79	97.42±0.38
	R1-C	3					64.25±3.08	31.89±5.54	78.78±1.75
	R2-C	25					38.79±0.73	69.36±1.55	53.10±0.92
	R3-C	45					19.74±2.73	47.11±5.04	25.28±2.57
II (días 61-120)	R0-F	0	12	35	7-8	1.5-2	89.77±0.17	2.87±0.16	99.96±0.01
	R1-F	3					51.93±2.22	78.07±2.31	66.61±1.92
	R2-F	25					32.72±1.11	74.78±1.47	52.71±1.22
	R3-F	45					14.80±1.71	43.30±6.33	20.28±1.51

La **tabla 20** resume los resultados operacionales más importantes. En ésta se pueden observar diferencias significativas entre los biorreactores con respecto a la eliminación de nitrógeno. En este sentido al final de la Fase I, el bioreactor R0 (sin adición de NaCl), funcionaba correctamente como un sistema CANON con lecho fijo configurado en un único reactor, y llegó a alcanzar un 87.68% de eliminación de nitrógeno total. El sistema se estabilizó en estas cifras a partir de aproximadamente 40 días después de la puesta en marcha (véase la **Ilustración 25**). Los bioreactores R1, R2 y R3, en los que se agregaron NaCl en concentraciones de 3, 25 y 45 g L<sup>-1</sup> respectivamente (Cortés-Lorenzo et al. 2016), se observó que la capacidad de eliminación de nitrógeno disminuyó en comparación con el biorreactor R0, y disminuía también a medida que aumentaba la concentración de NaCl en el influente. Así, la eficiencia de eliminación de nitrógeno total detectada

en R1, R2 y R3 fue 64.49%, 38.42% y 19.88%, respectivamente. En el mismo contexto, alcanzaron 78.78%, 53.10% y 25.28% de eliminación de nitrógeno amoniacal, respectivamente (**tabla 20**). Estos valores se obtuvieron como medias aritméticas de los rendimientos obtenidos en los últimos 15 días de operación en la fase I (45-60 días). Además, después de 15 días desde el inicio del experimento (**Ilustración 25**) se puede observar que, mientras que el biorreactor R0 presentaba una eficiencia de eliminación de nitrógeno total alta (64% NTE), en R1, R2 y R3 se produjo una evidente inhibición en la capacidad de eliminación de nitrógeno al aumentar la concentración salina (18.33%, 20.02% y 5.22%, respectivamente) (She et al. 2016).



**Ilustración 25.** Concentraciones diarias de  $\text{NH}_4^+$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N y  $\text{NO}_3^-$ -N en los efluentes de los diferentes biorreactores. Biorreactores operando con 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) y 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente.

En la **Ilustración 25**, también es posible analizar las acumulaciones de otros compuestos nitrogenados ( $\text{NO}_2^-$ -N y  $\text{NO}_3^-$ -N) a fin de comprender las actividades microbianas establecidas en cada reactor. Durante la fase I, tras 25 días de funcionamiento, el biorreactor R0 mostraba menor acumulación de  $\text{NO}_2^-$ -N y de  $\text{NO}_3^-$ -N que al inicio del experimento, a partir del día 25 en adelante, R0 alcanzó la estabilidad con un ratio NAR del 2.72%. (She et al. 2016) (NAR: acumulación de nitrógeno en forma de nitrito/nitrógeno total que contiene la suma de nitratos más nitritos). De hecho, después de 15 días de funcionamiento, la concentración de  $\text{NO}_3^-$ -N en R0 fue muy baja (**Ilustración 25**). Según estudios previos la relación estequiométrica que tiene lugar en un sistema CANON granular revela que se produce cierta cantidad de nitratos, alrededor del 10%. En nuestro caso, se obtuvieron resultados similares para los biorreactores de lecho fijo confirmándose las referencias (Yao et al. 2015). Cuando los influentes fueron modificados con NaCl, se observaron comportamientos diferentes entre ellos. En este sentido, se observó que el biorreactor R1 mostró una notable acumulación de nitrito al comienzo del experimento (1-25 días), disminuyendo a partir de ese momento a valores de 8.47 mg  $\text{NO}_2^-$ -N  $\text{L}^{-1}$  después de 60 días de operación. La **Tabla 21** muestra las concentraciones en los efluentes de diferentes compuestos nitrogenados para cada biorreactor al final de la fase I y II, después de 60 y 120 días, respectivamente. La comunidad bacteriana se mantuvo prácticamente invariable en el biorreactor R0, sin embargo, el estudio microbiológico en R1 sugiere una adaptación de los microorganismos anaeróbicos oxidantes de amonio (Anammox) al influente salino (3 g NaCl  $\text{L}^{-1}$ ) durante toda la fase I (**Ilustración 26**). Así, se observa que después de 15 días de funcionamiento la abundancia de *Candidatus Brocadia* fue de 4.02%, mientras que al final de la fase (día 60) la abundancia de *Candidatus Brocadia* fue 11.67%. Sin embargo, las AOB (bacterias oxidadoras de amonio) se vieron claramente afectadas por la presencia de 3 g NaCl  $\text{L}^{-1}$  en el agua a tratar. Concretamente, mientras que, después de 15 días de operación en R1, la abundancia de *Nitrosomonas* fue de 25.78%, después de 60 días, la abundancia de este grupo microbiano se redujo a valores de 8.26% sobre la población total. Estos datos indicaban que aunque *Nitrosomonas* representa la OTUs más importante dentro de las bacterias AOB, su abundancia relativa

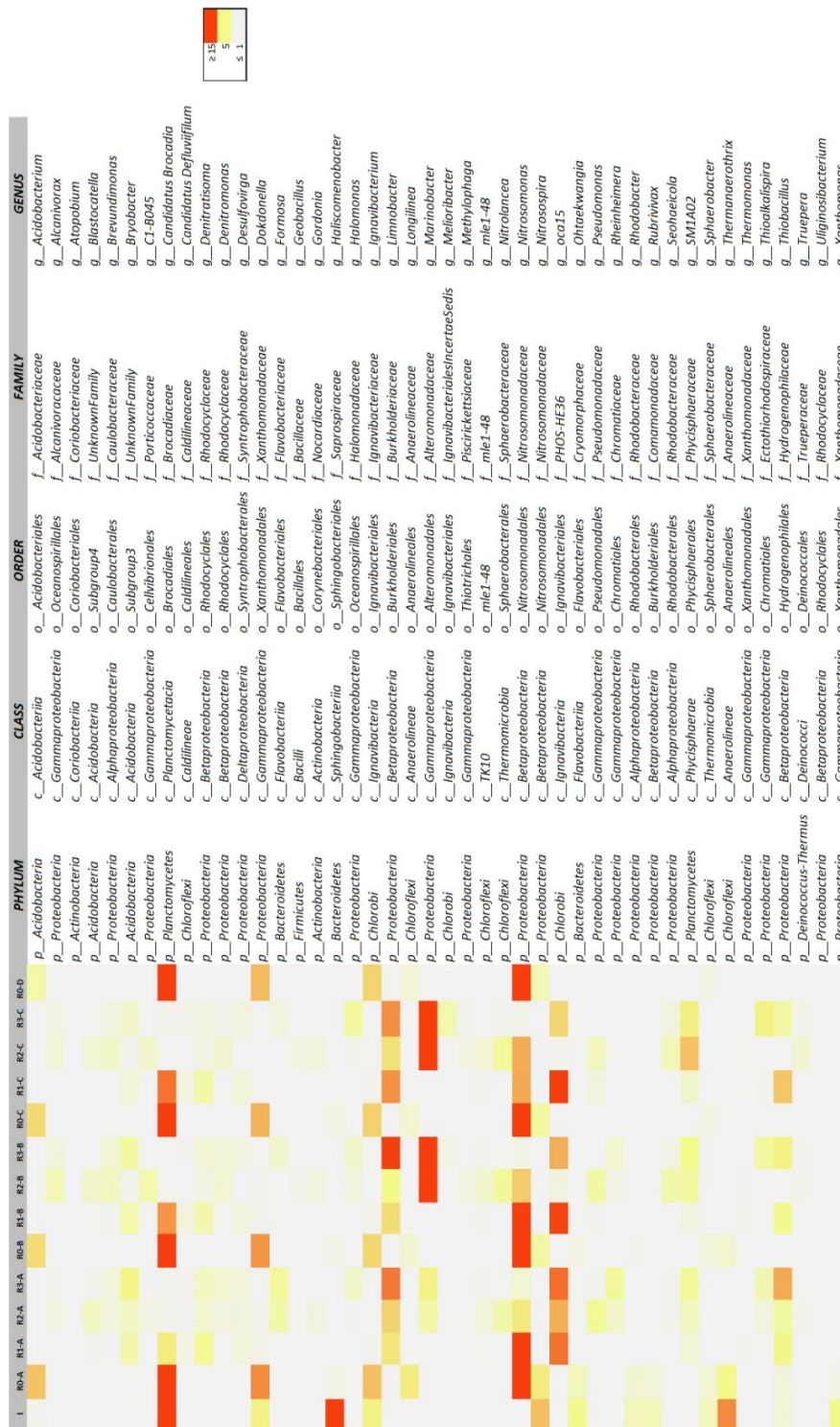
disminuyó considerablemente por la presencia de dicha concentración de salinidad.

**Tabla 21.** Concentración de compuestos nitrogenados medidos el último día de cada fase en cada uno de los biorreactores. Biorreactores funcionando con 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) y 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente.

Fase	Biorreactor	Salinidad (g·L <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg·L <sup>-1</sup> )	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (mg·L <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg·L <sup>-1</sup> )	Efluente N Total (mg·L <sup>-1</sup> )
I (día 60)	R0-C	0	7.46	0.64	23.02	31.14
	R1-C	3	48.79	8.47	21.79	79.05
	R2-C	25	115.23	27.26	11.27	153.77
	R3-C	45	178.46	6.65	7.02	192.12
II (día 120)	R0-F	0	0.08	0.70	24.16	24.96
	R1-F	3	88.7	32.04	6.85	127.60
	R2-F	25	116.33	39.24	11.78	167.37
	R3-F	45	198.66	6.04	5.16	209.70

Cuando se estudió la comunidad microbiana desarrollada en la biopelícula del lecho fijo de los biorreactores CANON con 25 y 45 g de NaCl L<sup>-1</sup> (bioreactor R2 y R3), las poblaciones de AOB y NOB se vieron drásticamente afectadas (**Ilustraciones 26 y 27**). Yang et al. (2011) demostraron una inhibición de la microbiota oxidante de amonio para influentes salinos con concentraciones mayores a 20 g de NaCl L<sup>-1</sup>. De la misma manera, en un reactor Sequencing Batch para tratar aguas residuales hipersalinas, Cui et al. (2016), informaron que la salinidad inhibe la actividad AOB, observándose que aunque el número de AOB disminuyó, no se afectó significativamente a las especies AOB dominantes. Sin embargo, algunos autores han encontrado actividad de las bacterias AOB incluso para niveles de salinidad por encima de 33 g de NaCl L<sup>-1</sup> (Bassin et al. 2011) y 50 g de NaCl L<sup>-1</sup> (Wan et al. 2014; Quartoli et al. 2017). En nuestro estudio, los efluentes tratados en los biorreactores R2 y R3 mostraron valores muy bajos de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N, y sólo en el caso de R2 se observó una cierta acumulación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N. Actualmente se tiene conocimiento por investigaciones previas que las bacterias NOB son más sensibles que las AOB a una elevada concentración de salinidad (Gonzalez-Silva et al. 2017; Dincer and Kargi, 2001; Aslan and Simsek, 2012; Zhao et al. 2016), resultando una acumulación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N en el efluente. Por lo tanto, las concentraciones de compuestos de nitrógeno al final de la fase I (tras 60 días de operación del biorreactor), fueron claramente diferentes entre los biorreactores

R2 y R3. El efluente tratado por el biorreactor R2 mostró las siguientes concentraciones de compuestos nitrogenados:  $130.23 \text{ mg NH}_4^+-\text{N L}^{-1}$ .



**Ilustración 26.** Heatmap de las abundancias relativas de las Otus detectadas por secuenciación con Illumina en las diversas muestras: Inóculo (I). Biorreactores operando con 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) y 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente. A: 15 a los 15 días del comienzo de la fase I. B: a los 30 días desde que comenzó la fase I. C: a los 60 días desde el comienzo de la fase I.

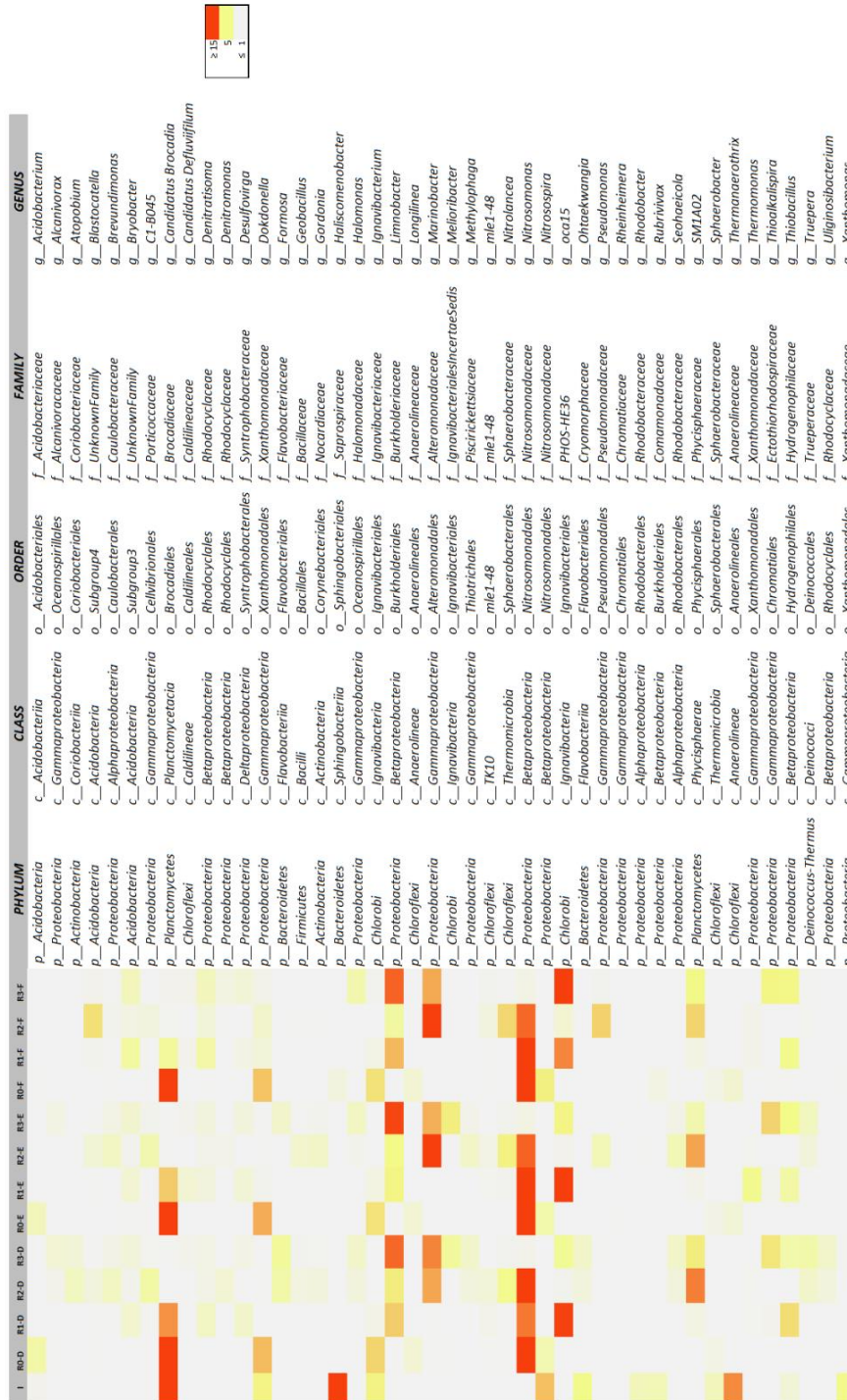
Obviamente, un aumento en la concentración salina afecto directamente a la capacidad de biotransformación de nitrógeno del sistema con una clara inhibición de la comunidad microbiana autotrófica. En particular, bajo condiciones de alta salinidad (25 y 45 g de NaCl L<sup>-1</sup>) y tanto en la fase I como en la fase II (**Ilustraciones 26 y 27**), se observó una notable proliferación de microorganismos heterótrofos como *Marinobacter*, especie capaz de eliminar hasta el 50% del nitrógeno total en influentes hipersalinos (Miao et al. 2015; Miyahara et al. 2010). Tal aumento en grupos heterotróficos cuanto mayor fue la concentración de NaCl podría explicarse como consecuencia de la lisis celular ya que en ningún momento se añadió materia orgánica al experimento. Además, se observa la proliferación de otros grupos de bacterias como *Pseudomonas*, *Halomonas* y *Denitratisomas* que aunque se detectaron con una menor abundancia también podría contribuir a la biotransformación del nitrógeno (Uygun, 2006; Miao et al. 2015; Miyahara et al. 2010; Du et al. 2017). Bastantes estudios recientes informaban de la implicación de estos géneros en la eliminación de nitrógeno (Wang et al. 2016; Quartoli et al. 2017). Por último, cabe destacar que *Nitrosomonas* (8.26% de abundancia relativa) sólo se detectó en el biorreactor R2, confirmando la sensibilidad de estas poblaciones microbianas a altas concentraciones de salinidad (Cui et al. 2016).

Cuando los biorreactores operaban con un TRH de 12 h (fase II del experimento) y bajo las mismas condiciones de salinidad de 0, 3, 25 y 45 g de NaCl L<sup>-1</sup> que en la fase I, se observó que el rendimiento del sistema no mejoró, es más, se detectó una ligera disminución en los rendimientos de los reactores R1, R2 y R3. Este hecho se puede explicar basándonos en los cambios observados en la comunidad bacteriana involucrada en la biotransformación de Nitrógeno como bacterias Anammox y AOB. Nuestras observaciones pueden apoyarse en resultados similares que se obtuvieron en investigaciones previas (Zhang et al. 2010). Quizás, con el objeto de confirmar estos resultados, habría que evaluar la actividad microbiana en los biorreactores a través de estudios metatranscriptómicos. En la **Tabla 20**, se puede observar un empeoramiento de las eficiencias de eliminación de nitrógeno total y nitrógeno amoniacal en todos los biorreactores con o sin adición de NaCl. R1 mostraba una eficiencia del 51.93% trabajando con un TRH de 12 h, mientras que bajo las mismas condiciones de salinidad NaCl (3 g NaCl L<sup>-1</sup>) pero con un TRH de 6 h su eficiencia era de 64.49% para la eliminación de



Nitrógeno total. El análisis de la comunidad microbiana mostró que en la fase II las bacterias Anammox se vieron afectadas, reduciéndose considerablemente la población de *Candidatus Brocadia* a 2.48% del total de la microbiota y no detectándose cuando aumenta la salinidad (**Ilustración 27**) En este sentido, nuestros datos están de acuerdo con Zhang et al. (2010) y Xing et al. (2015) que informaron que *Candidatus Brocadia* comienza a disminuir en biorreactores para una salinidad superior a 10 g de NaCl L<sup>-1</sup>.

Tanto el bioreactor R1 como el R2, mostraron una acumulación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N en los efluentes tratados (32.04 y 39.24 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> en R1 y R2, respectivamente). Estos resultados pueden explicarse por un aumento relativo de la comunidad microbiana de *Nitrosomonas* y una consecuente inhibición de las bacterias oxidadoras de nitrito (NOB). Este hecho ha sido estudiado con anterioridad, y se ha demostrado que la acumulación de nitritos es un inhibidor de este tipo de procesos (Zhang et al. 2008; Kim et al. 2006).



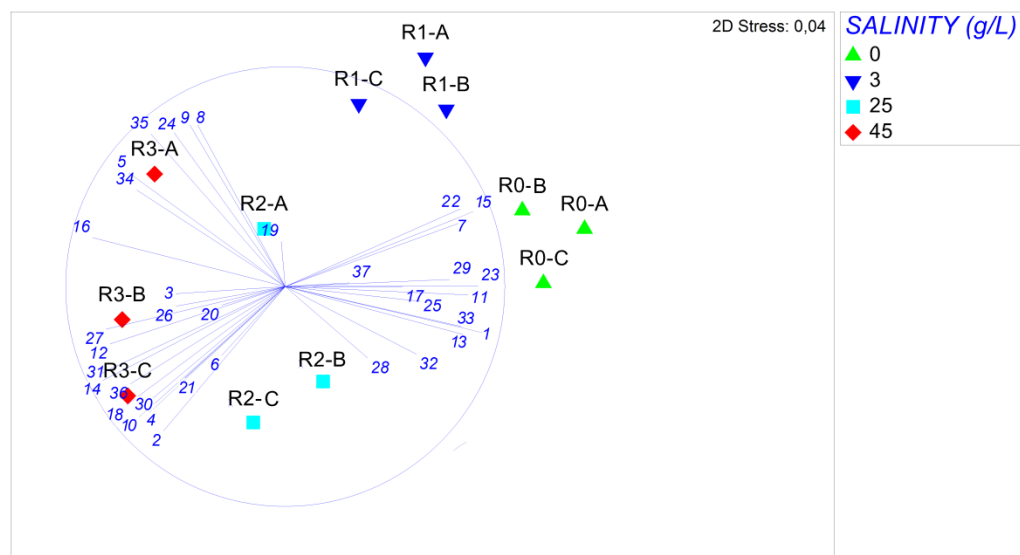
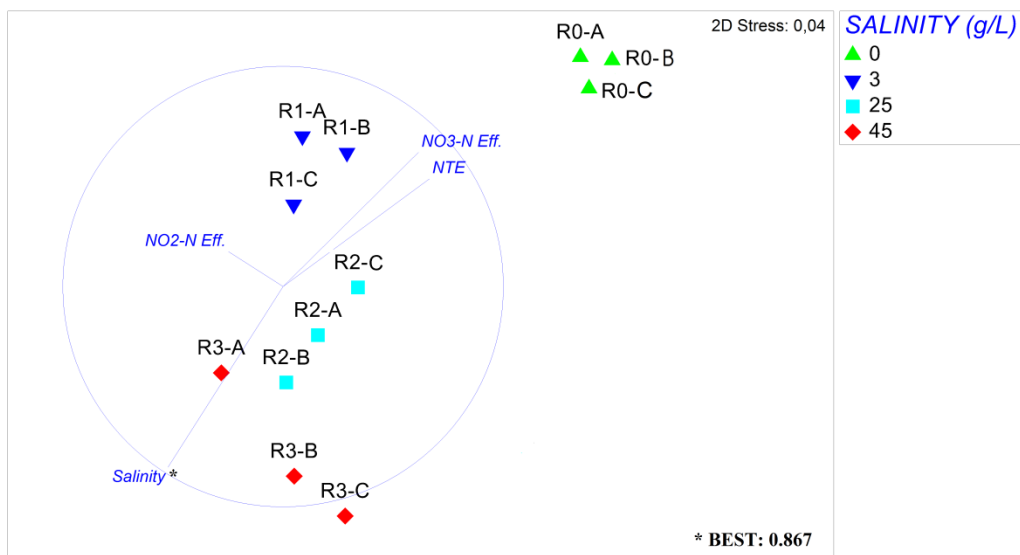
**Ilustración 27.** Heatmap de las abundancias relativas de las *Otus* detectadas por secuenciación con Illumina en las diversas muestras: Inóculo (I). Biorreactores operando con 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) y 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente. D: a los 15 días del comienzo de la fase II. E: a los 30 días desde que comenzó la fase II. F: a los 60 días desde el comienzo de la fase II.

Finalmente, cuando la concentración de NaCl fue de 45 g NaCl L<sup>-1</sup> y el TRH de 12, se observó una disminución en la eficiencia de eliminación de nitrógeno total y de nitrógeno amoniacal, alcanzando valores de 14.80% y 20.28% respectivamente. En este caso, también se detectó una disminución en la abundancia relativa de *Marinobacter* dentro de la comunidad microbiana del biorreactor R3 (**Ilustración 27**). Estos microorganismos, como se mencionó anteriormente, tienen una gran capacidad de eliminación de nitrógeno en entornos halófilo (Chen et al. 2016; Miao et al. 2015). Además, no se observó acumulación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N en el efluente del biorreactor R3, en el cual se registraron valores de 6.04 y 5.21 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> respectivamente, después de 90 días de operación del biorreactor.

La riqueza de especies bacterianas fue cambiando tanto en cada uno de los reactores, a lo largo del período experimental, como al comparar unos reactores con otros (**Tabla 22**). Los valores más altos de riqueza fueron detectados en el biorreactor R2 tanto en la fase I (319-301) como en la fase II (289-257), seguido por R3 (196-253 y 280-249, también para cada una de las fases, fase I y fase II respectivamente). El número de OTUs en R0 se mantuvo prácticamente constante durante el tiempo (en promedio 191-227), sin embargo en R1 se observaron valores levemente inferiores especialmente al final del periodo experimental (200). Los resultados del análisis de los índices de alfa diversidad mostraron que la adición de NaCl aumentó la diversidad bacteriana en los biorreactores salinos a lo largo del período experimental respecto a R0. En este sentido, los valores del índice de Shannon fueron similares en R2 y R3 (2.9355 y 2.9235, respectivamente), seguido de R1 (2.4343) y finalmente R0 (2.003). Esta tendencia fue confirmada por el índice de Simpson de orden 2 que fueron valores en orden creciente de la siguiente manera: R1 (0.8616), R2 (0.8901) y R3 (0.8951) en comparación con el biorreactor R0 (0.7445). El análisis de cobertura (Good' s Coverage) mostró que todas las muestras secuenciadas presentaban una cobertura del 97%, indicando que la secuenciación era suficiente para describir la diversidad de la comunidad bacteriana.

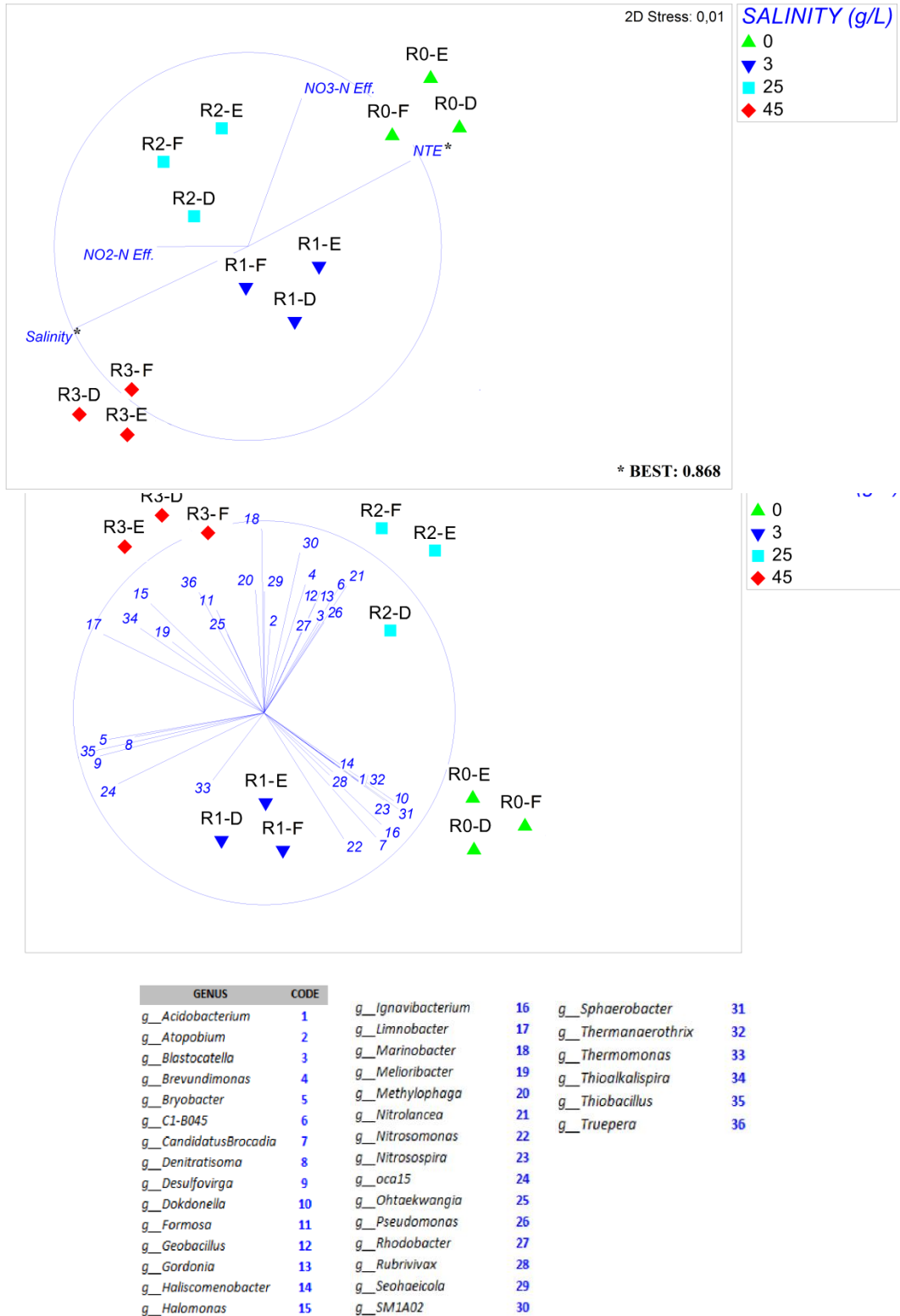
**Tabla 22.** Número de lecturas e índices de diversidad y riqueza: richness (S), Good's coverage, Shannon-Wiener (H') and Simpson evenness. Obtenidos a partir de los datos de secuenciación Illumina en el inóculo y muestreo de los biorreactores. CI: intervalos de confianza al 95% ( $p < 0.05$ ). Biorreactores operando con 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) and 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente. A: a los 15 días del comienzo de la fase I. B: a los 30 días desde que comenzó la fase I. C: a los 60 días desde el comienzo de la fase I. D: a los 15 días del comienzo de la fase II. E: a los 30 días desde que comenzó la fase II. F: a los 60 días desde el comienzo de la fase II

	I	R0-A	R1-A	R2-A	R3-A	R0-B	R1-B	R2-B	R3-B	R0-C	R1-C	R2-C	R3-C
Taxa. S	380	182	180	319	196	193	204	266	241	227	224	301	253
Simpson 1-D	0.8213	0.8804	0.8476	0.8821	0.9072	0.7508	0.8747	0.884	0.8915	0.7317	0.885	0.8886	0.8849
Shannon, H	2.227	2.627	2.415	3.072	3.02	1.988	2.571	2.928	2.825	1.945	2.605	2.913	2.831
Coverage (%)	99.65	99.84	97.56	96.35	98.49	97.84	99.54	96.59	97.67	98.26	97.81	98.15	99.05
	R0-D	R1-D	R2-D	R3-D	R0-E	R1-E	R2-E	R3-E	R0-F	R1-F	R2-F	R3-F	
Taxa. S	200	240	289	280	199	204	274	280	228	200	257	249	
Simpson 1-D	0.7153	0.8672	0.8995	0.9031	0.7024	0.8416	0.9053	0.8925	0.6867	0.8538	0.8836	0.8914	
Shannon, H	1.856	2.482	2.983	3.082	1.817	2.347	3.042	2.96	1.789	2.486	2.675	2.823	
Coverage (%)	98.25	97.46	97.16	99.05	98.17	97.23	99.31	97.46	98.16	99.05	97.28	98.89	



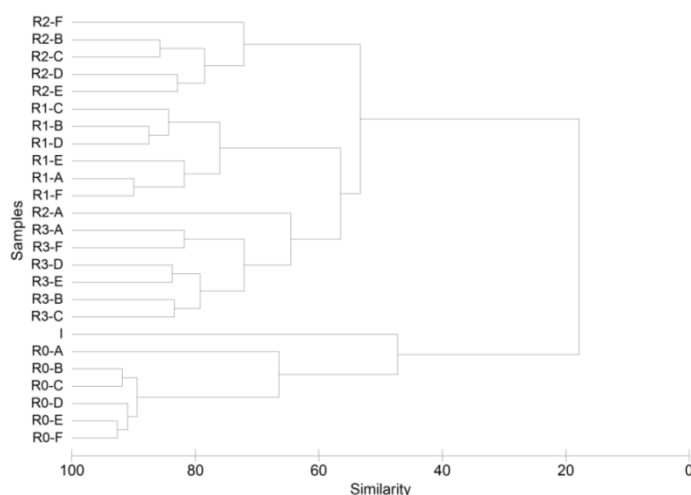
GENUS	CODE	GENUS	CODE	GENUS	CODE
<i>g__Acidobacterium</i>	1	<i>g__Limnobacter</i>	16	<i>g__SM1A02</i>	31
<i>g__Alcanivorax</i>	2	<i>g__Longilinea</i>	17	<i>g__Sphaerobacter</i>	32
<i>g__Blastocatella</i>	3	<i>g__Marinobacter</i>	18	<i>g__Thermanaerotherix</i>	33
<i>g__Brevundimonas</i>	4	<i>g__Melioribacter</i>	19	<i>g__Thioalkalipira</i>	34
<i>g__Bryobacter</i>	5	<i>g__mle1-48</i>	20	<i>g__Thiobacillus</i>	35
<i>g__C1-B045</i>	6	<i>g__Nitrolancea</i>	21	<i>g__Truepera</i>	36
<i>g__Candidatus Brocadia</i>	7	<i>g__Nitrosomonas</i>	22	<i>g__Xanthomonas</i>	37
<i>g__Candidatus Defluviifilum</i>	8	<i>g__Nitrospira</i>	23		
<i>g__Denitratisoma</i>	9	<i>g__oca15</i>	24		
<i>g__Denitromonas</i>	10	<i>g__Ohtaekwangia</i>	25		
<i>g__Dokdonella</i>	11	<i>g__Pseudomonas</i>	26		
<i>g__Formosa</i>	12	<i>g__Rheinheimera</i>	27		
<i>g__Haliscomenobacter</i>	13	<i>g__Rhodobacter</i>	28		
<i>g__Halomonas</i>	14	<i>g__Rubrivivax</i>	29		
<i>g__Ignavibacterium</i>	15	<i>g__Seohaecicola</i>	30		

**Ilustración 28.** Gráficos Non-metric multidimensional scaling (NMDS) que ilustran las ordenaciones los biorreactores (R0, R1, R2 and R3 con 0, 3, 25 y 45 g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente, según la similitud relativa de sus comunidades bacterianas analizadas por la secuenciación illumina NTE: eliminación nitrógeno total; NO<sub>2</sub>-N Eff.: concentración NO<sub>2</sub>-N en el efluente. NO<sub>3</sub>-N Eff.: concentración de NO<sub>3</sub>-N en el efluente y salinidad. . A: a los 15 días del comienzo de la fase I. B: a los 30 días desde que comenzó la fase I. C: a los 60 días desde el comienzo de la fase I.



**Ilustración 29.** Gráficos Non-metric multidimensional scaling (NMDS) que ilustran las ordenaciones los biorreactores (R0, R1, R2 and R3 con 0, 3, 25 y 45 g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente, según la similitud relativa de sus comunidades bacterianas analizadas por la secuenciación illumina NTE: eliminación nitrógeno total; NO<sub>2</sub>-N Eff.: concentración NO<sub>2</sub>-N en el efluente. NO<sub>3</sub>-N Eff.: concentración de NO<sub>3</sub>-N en el efluente y salinidad. D: a los 15 días del comienzo de la fase II. E: a los 30 días desde que comenzó la fase II. F: a los 60 días desde el comienzo de la fase II.

Las **Ilustraciones 28 y 29** muestra la ordenación NMDS de los biorreactores de acuerdo a la abundancia relativa de las OTUs obtenidas mediante la secuenciación con Illumina. Las muestras de cada biorreactor R1, R2 y R3 fueron agrupadas en grupos aislados para cada concentración de salinidad, tanto en la fase I como en la fase II. En este sentido, se obtuvieron resultados similares para el análisis cluster que se realizó utilizando la abundancia relativa de OTUs para las muestras tomadas en cada biorreactor (**Ilustraciones 28 y 29**). Por lo tanto, las muestras fueron agrupadas en cuatro grupos principales según las concentraciones de sal. El análisis BEST determinó que las variables ambientales y operacionales que tenían más influencia en la explicación de la ordenación de la comunidad fueron la salinidad en fase I y NTE y salinidad en la fase II. La contribución de dichas variables a la ordenación de las OTUs fueron de 86.7 % y 86.8 %, respectivamente (**Ilustraciones 28 y 29**). La ordenación NMDS confirmó una fuerte correlación positiva de la salinidad con la NTE tanto en la fase I como en la fase II (**Ilustraciones 28 y 29**). También se detectó una notable correlación negativa entre la variable salinidad y la acumulación de  $\text{NO}_3^-$ -N. Por otro lado, este análisis NMDS mostró que las OTUs se unieron en dos grupos principales basados en la influencia de la concentración de NaCl. Entre ellos, *Candidatus Brocadia* y *Nitrosomonas* estaban relacionadas con las muestras de R0 y R1, mientras que *Limnobacter*, *Oca15* y *Marinobacter* se encontraban positivamente correlacionadas con la salinidad y con las muestras del biorreactor R3 (**Ilustraciones 28 y 29**).



**Ilustración 30.** Análisis clúster de Bray-Curtis mostrando la similitud de la comunidad bacteriana en el inóculo y biorreactores: 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) and 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente. A: a los 15 días del comienzo de la fase I. B: a los 30 días desde que comenzó la fase I. C: a los 60 días desde el comienzo de la fase I. D: a los 15 días del comienzo de la fase II. E: a los 30 días desde que comenzó la fase II. F: a los 60 días desde el comienzo de la fase II.

El análisis SIMPER mostró la contribución de cada OTU a la diferenciación entre diferentes biorreactores en la fase I (**Tabla 23**) y en la fase II (**Tabla 24**). La composición de la comunidad bacteriana de todos los biorreactores pone de manifiesto que las comunidades bacterianas en los biorreactores fueron sometidas a las diferentes concentraciones de NaCl, y que la composición de la población total divergía. Mediante SIMPER se obtuvieron las OTUs que desempeñaron un papel principal en la similitud entre las muestras de los mismos biorreactores, arrojó un número muy bajo de OTUs (5-12 OTUs) que representaban más del 90% de la explicación. Durante la fase I, R0 fue el más estable (82.28% de similitud), seguido por R1 (75.38% de similitud), R3 (69.61% de similitud) y, por último, R2 (del 60.29% de similitud) (**Ilustración 30**). Una tendencia similar se observó durante la fase II, aunque el porcentaje de similitudes aumentó alrededor de un 10% en cada biorreactor (**Tabla 24**). *Candidatus Brocadia* y *Nitrosomonas* contribuyeron a una mejor explicación sobre la similitud de la comunidad bacteriana entre las muestras del biorreactor R0 (34.71 y 32.59%, respectivamente), Oca15 y *Nitrosomonas* contribuyeron en más de un 26% cada una para explicar la similitud en R1. *Nitrosomonas* también contribuyó con un 16.95% a la similitud del biorreactor R2 y por último *Marinobacter* y *Limnobacter* contribuyeron más de



23% y 16%, respectivamente, en el biorreactor R3. Cabe señalar que algunas de las OTUs encontradas en R3 como *Marinobacter*, *Halomonas* y *Thiobacillus* han sido descritas como eficientes eliminadoras de nitrógeno (Chen et al. 2016; Miao et al. 2015; Wang T. et al. 2017; Wang et al. 2017). El análisis SIMPER también mostró que el biorreactor R3 fue el más diferente, con una similitud de 97.72% y 98.21% respecto a R0 durante la fase I y II, respectivamente. Independientemente de la fase de operación y NaCl añadido, los biorreactores R2 y R3 fueron los biorreactores más parecidos (con un promedio de divergencia del 57.44%), seguidos por los biorreactores R1 y R3 (en promedio 62.70%) y finalmente la divergencia observada entre R1 y R2 se mostró en un promedio de 66.61%.

**Tabla 23.** Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) que contribuyen mayoritariamente a la disimilitud en las comunidades bacterianas entre los biorreactores con diferentes concentraciones de salinidad. 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) y 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente. A: a los 15 días del comienzo de la fase I. B: a los 30 días desde que comenzó la fase I C: a los 60 días desde el comienzo de la fase I.

**Factor Groups**

Sample	SALINITY (g L <sup>-1</sup> )
R0-A	0
R0-B	0
R0-C	0
R1-A	3
R1-B	3
R1-C	3
R2-A	25
R2-B	25
R2-C	25
R3-A	45
R3-B	45
R3-C	45

**Group 0**

Average similarity: 82.28

OTUs	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
g__CandidatusBrocadia	34.15	28.56	2.21	34.71	34.71
g__Nitrosomonas	24.89	26.82	84.74	32.59	67.3
g__Dokdonella	9.1	9.28	6.95	11.28	78.58
g__Ignavibacterium	5.91	6.07	16.34	7.38	85.96
g__Acidobacterium	5.57	5.67	27.27	6.89	92.85

**Group 3**

Average similarity: 75.38

OTUs	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
g__oca15	13.82	22.59	7.5	29.97	29.97
g__Nitrosomonas	16.91	19.73	2.23	26.17	56.14
g__CandidatusBrocadia	8.36	10.33	1.87	13.7	69.84
g__Limnobacter	6.33	8.08	15.84	10.72	80.56
g__Thiobacillus	4.17	5.31	13.18	7.04	87.6
g__Denitratisoma	2.34	3.67	15.26	4.87	92.47

**Group 25**

Average similarity: 60.29

OTUs	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
g__Marinobacter	12.21	14.13	0.87	23.44	23.44
g__Nitrosomonas	6.06	10.22	5.88	16.95	40.39
g__Limnobacter	4.44	7.86	3.84	13.03	53.42
g__Nitrolancea	2.4	4.81	14.69	7.97	61.39
g__Pseudomonas	2.16	3.8	3.48	6.31	67.7
g__SM1A02	3.53	3.79	4.37	6.29	73.99
g__Blastocatella	1.12	1.96	3.48	3.25	77.24
g__Brevundimonas	1.11	1.84	3.01	3.06	80.3
g__mle1-48	0.93	1.78	138.35	2.96	83.26
g__Seohaecicola	1.35	1.57	0.96	2.61	85.86
g__Denitromonas	0.86	1.43	2.75	2.37	88.23
g__C1-B045	1.2	1.42	1.8	2.36	90.59

**Group 45**

Average similarity: 69.61

OTUs	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
g__Limnobacter	12.2	18.44	15.44	26.5	26.5
g__Marinobacter	12.64	13.62	1.07	19.57	46.06
g__oca15	8.39	10.91	4.68	15.67	61.74
g__SM1A02	3.1	4.86	11.42	6.98	68.72
g__Thiobacillus	4.67	4.81	3.68	6.91	75.62
g__Thioalkalispira	2.64	3.72	6.84	5.34	80.96
g__Bryobacter	2.29	2.8	2.35	4.02	84.98
g__Halomonas	1.61	2.14	19.56	3.08	88.06
g__Formosa	1.4	1.39	2.95	1.99	90.05

**Groups 0 & 3**

Average dissimilarity = 64.08

OTUs	Group 0	Group 3	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g__CandidatusBrocadia	34.15	8.36	17.5	2.16	27.31	27.31
g__oca15	0	13.82	9.51	8.44	14.84	42.15
g__Dokdonella	9.1	0.18	6.15	6.57	9.6	51.76
g__Nitrosomonas	24.89	16.91	5.94	1.29	9.27	61.03
g__Limnobacter	0.03	6.33	4.33	2.49	6.76	67.78
g__Ignavibacterium	5.91	0.22	3.93	6.41	6.13	73.92
g__Acidobacterium	5.57	0	3.85	5.71	6.01	79.93
g__Thiobacillus	0.25	4.17	2.68	2.36	4.18	84.11
g__Nitrospira	2.88	0	1.99	3.07	3.11	87.23
g__Denitratisoma	0.02	2.34	1.6	6.37	2.49	89.72
g__Longilinea	2.01	0	1.41	1.28	2.2	91.92

**Groups 0 & 25**

Average dissimilarity = 89.65

OTUs	Group 0	Group 25	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g__CandidatusBrocadia	34.15	0.14	24.88	3.07	27.75	27.75
g__Nitrosomonas	24.89	6.06	13.94	7.95	15.55	43.29
g__Marinobacter	0	12.21	8.88	1.62	9.9	53.2
g__Dokdonella	9.1	0.18	6.61	6.41	7.38	60.57
g__Ignavibacterium	5.91	0.01	4.39	6.34	4.89	65.47
g__Acidobacterium	5.57	0	4.14	5.53	4.62	70.09
g__Limnobacter	0.03	4.44	3.28	3.66	3.66	73.75
g__SM1A02	0.02	3.53	2.56	1.46	2.85	76.6
g__oca15	0	2.91	2.23	0.77	2.49	79.09
g__Nitrospira	2.88	0	2.15	3.03	2.4	81.49
g__Nitrospancia	0.05	2.4	1.73	11.81	1.94	83.43
g__Pseudomonas	0	2.16	1.6	3.57	1.79	85.22
g__Longilinea	2.01	0	1.52	1.28	1.69	86.91
g__Thermanaerotherix	1.4	0	1.07	1.01	1.19	88.1
g__Seohaecicola	0	1.35	0.98	1.67	1.09	89.19
g__C1-B045	0.03	1.2	0.85	1.72	0.95	90.14

**Groups 3 & 25**

Average dissimilarity = 65.94

OTUs	Group 3	Group 25	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g__Marinobacter	0.01	12.21	11.65	1.63	17.66	17.66
g__Nitrosomonas	16.91	6.06	10.69	1.39	16.22	33.88

g__oca15	13.82	2.91	10.52	2.88	15.95	49.83
g__CandidatusBrocadia	8.36	0.14	8.02	2.42	12.16	61.99
g__Thiobacillus	4.17	0.83	3.2	1.69	4.86	66.85
g__SM1A02	0.86	3.53	2.55	1.1	3.87	70.72
g__Nitrolancea	0.04	2.4	2.3	15.32	3.49	74.2
g__Limnobacter	6.33	4.44	2.3	1.04	3.48	77.69
g__Pseudomonas	0.28	2.16	1.85	2.81	2.81	80.49
g__Denitratisoma	2.34	0.66	1.63	3.89	2.47	82.96
g__Seohaecicola	0.01	1.35	1.28	1.67	1.94	84.9
g__C1-B045	0.02	1.2	1.13	1.76	1.71	86.62
g__Bryobacter	1.6	0.58	1.11	1.87	1.69	88.3
g__Alcanivorax	0	1.04	1	1.79	1.52	89.82
g__Brevundimonas	0.09	1.11	0.99	3.21	1.49	91.32

### Groups 0 & 45

Average dissimilarity = 97.72

OTUs	Group 0	Group 45	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g__CandidatusBrocadia	34.15	0.2	23.17	3.06	23.71	23.71
g__Nitrosomonas	24.89	0.59	16.73	30.72	17.12	40.83
g__Marinobacter	0	12.64	8.71	1.8	8.91	49.74
g__Limnobacter	0.03	12.2	8.36	5.28	8.56	58.3
g__Dokdonella	9.1	0.06	6.25	6.58	6.4	64.7
g__oca15	0	8.39	5.78	2.79	5.92	70.61
g__Ignavibacterium	5.91	0.01	4.09	6.54	4.18	74.8
g__Acidobacterium	5.57	0	3.86	5.67	3.95	78.75
g__Thiobacillus	0.25	4.67	3.04	1.63	3.12	81.86
g__SM1A02	0.02	3.1	2.13	5.63	2.18	84.04
g__Nitrosospira	2.88	0	2	3.06	2.05	86.09
g__Thioalkalispira	0.06	2.64	1.78	3.33	1.82	87.91
g__Bryobacter	0.05	2.29	1.54	2.39	1.58	89.49
g__Longilinea	2.01	0.01	1.41	1.28	1.44	90.94

### Groups 3 & 45

Average dissimilarity = 59.38

OTUs	Group 3	Group 45	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g__Nitrosomonas	16.91	0.59	14.57	2.14	24.54	24.54
g__Marinobacter	0.01	12.64	11.24	1.8	18.93	43.47
g__CandidatusBrocadia	8.36	0.2	7.27	2.41	12.24	55.71
g__Limnobacter	6.33	12.2	5.19	1.67	8.75	64.46
g__oca15	13.82	8.39	4.92	1.68	8.28	72.74
g__Thioalkalispira	0.11	2.64	2.26	3.24	3.8	76.54
g__Thiobacillus	4.17	4.67	2.15	1.23	3.62	80.16

g__SM1A02	0.86	3.1	2.01	3.82	3.38	83.54
g__Halomonas	0	1.61	1.44	2.53	2.43	85.97
g__Formosa	0	1.4	1.25	1.65	2.11	88.08
g__Denitratisoma	2.34	0.94	1.25	2.67	2.1	90.18

**Groups 25 & 45**

Average dissimilarity = 50.51

OTUs	Group 25	Group 45	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g__Limnobacter	4.44	12.2	7.52	3.14	14.89	14.89
g__Marinobacter	12.21	12.64	7.07	0.99	13.99	28.88
g__oca15	2.91	8.39	5.86	1.61	11.61	40.49
g__Nitrosomonas	6.06	0.59	5.3	3.49	10.5	50.99
g__Thiobacillus	0.83	4.67	3.75	1.34	7.43	58.42
g__Thioalkalispira	0.25	2.64	2.34	2.88	4.63	63.05
g__Nitrolancea	2.4	0.13	2.21	13.76	4.39	67.44
g__Pseudomonas	2.16	0.08	2.05	3.34	4.06	71.5
g__SM1A02	3.53	3.1	1.96	1.5	3.88	75.38
g__Bryobacter	0.58	2.29	1.7	1.74	3.36	78.75
g__Halomonas	0.37	1.61	1.23	1.84	2.44	81.19
g__Formosa	0.72	1.4	1.21	1.62	2.39	83.58
g__C1-B045	1.2	0.02	1.13	1.75	2.24	85.81
g__Seohaecicola	1.35	0.41	1	1.56	1.98	87.8
g__Rheinheimera	0.53	1.23	1	1.19	1.98	89.78
g__Blastocatella	1.12	0.11	0.99	3.11	1.97	91.75

**Tabla 24.** Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) que contribuyen mayoritariamente a la disimilitud en las comunidades bacterianas entre los biorreactores con diferentes concentraciones de salinidad. 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) y 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectivamente. D: a los 15 días del comienzo de la fase II. E: a los 30 días desde que comenzó la fase II. F: a los 60 días desde el comienzo de la fase II

Factor Groups	
Sample	SALINITY (g L <sup>-1</sup> )
R0-D	0
R0-E	0
R0-F	0
R1-D	3
R1-E	3
R1-F	3
R2-D	25

R2-E	25
R2-F	25
R3-D	45
R3-E	45
R3-F	45

**Group 0**

Average similarity: 95.26

OTUs	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
g__CandidatusBrocadia	45.32	48.42	136.88	50.83	50.83
g__Nitrosomonas	28.59	30.67	85.48	32.2	83.03
g__Dokdonella	7.22	7.34	16.44	7.71	90.74

**Group 3**

Average similarity: 73.16

OTUs	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
g__Nitrosomonas	21.68	27.76	2.11	37.95	37.95
g__oca15	14.42	20.77	4.94	28.39	66.34
g__Limnobacter	5.54	7.48	2.46	10.23	76.57
g__CandidatusBrocadia	6.1	6.38	1.81	8.73	85.3
g__Thiobacillus	3.36	4.28	4.54	5.84	91.14

**Group 25**

Average similarity: 71.88

OTUs	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
g__Nitrosomonas	13.92	22.21	76.12	30.9	30.9
g__Marinobacter	13.07	19.01	2.72	26.44	57.34
g__SM1A02	8.3	11.49	3.69	15.99	73.33
g__Nitrolancea	3.89	5.44	6.79	7.57	80.9
g__Limnobacter	3.11	4.55	5.44	6.33	87.23
g__C1-B045	1.57	1.8	1.33	2.51	89.73
g__Blastocatella	2.05	1.19	9.03	1.65	91.39

**Group 45**

Average similarity: 73.43

OTUs	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
g__Limnobacter	13.23	24.24	32.89	33.01	33.01
g__Marinobacter	8.89	15.42	63.02	21	54.01
g__Thioalkalispira	4.43	7.18	5.97	9.78	63.79
g__oca15	7.28	5.62	7.5	7.65	71.44
g__Thiobacillus	2.78	4.57	3.85	6.23	77.67
g__SM1A02	3.01	4.49	3.49	6.12	83.79

g__Halomonas	1.49	2.43	9.76	3.32	87.1
g__Melioribacter	2.13	1.66	0.58	2.26	89.36
g__Bryobacter	1.08	1.57	5.36	2.13	91.49

**Groups 0 & 3**

Average dissimilarity = 61.33

---

OTUs	Group 0		Group 3		Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund	Av.Diss	Diss/SD		
g__CandidatusBrocadia	45.32	6.1	26.25	12.89	42.81	42.81
g__ocal5	0.01	14.42	9.62	4.88	15.69	58.5
g__Nitrosomonas	28.59	21.68	4.77	0.87	7.77	66.27
g__Dokdonella	7.22	0.31	4.63	8.84	7.56	73.82
g__Limnobacter	0.04	5.54	3.72	3.05	6.06	79.88
g__Ignavibacterium	4.87	0.42	2.99	8.65	4.87	84.75
g__Thiobacillus	0.05	3.36	2.24	2.48	3.66	88.41
g__Nitrospira	2.55	0.01	1.7	2.89	2.77	91.18

**Groups 0 & 25**

Average dissimilarity = 79.86

---

OTUs	Group 0		Group 25		Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund	Av.Diss	Diss/SD		
g__CandidatusBrocadia	45.32	0.07	30.55	76.62	38.25	38.25
g__Nitrosomonas	28.59	13.92	9.9	7.03	12.4	50.65
g__Marinobacter	0.03	13.07	8.81	3.74	11.03	61.68
g__SM1A02	0.03	8.3	5.58	3.48	6.99	68.67
g__Dokdonella	7.22	0.43	4.59	7.97	5.74	74.42
g__Ignavibacterium	4.87	0.01	3.28	10.31	4.11	78.53
g__Nitrospira	0.04	3.89	2.6	3.48	3.26	81.79
g__Limnobacter	0.04	3.11	2.08	4.32	2.6	84.39
g__Nitrospira	2.55	0.01	1.71	2.92	2.15	86.54
g__Pseudomonas	0.02	2.49	1.67	0.97	2.09	88.63
g__Blastocatella	0.05	2.05	1.35	0.98	1.7	90.32

**Groups 3 & 25**

Average dissimilarity = 67.28

---

OTUs	Group 3		Group 25		Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund	Av.Diss	Diss/SD		
g__ocal5	14.42	0.46	12.22	4.8	18.16	18.16
g__Marinobacter	0.04	13.07	11.46	3.69	17.04	35.2
g__Nitrosomonas	21.68	13.92	8.17	1.73	12.15	47.35
g__SM1A02	0.44	8.3	6.91	3.29	10.27	57.62
g__CandidatusBrocadia	6.1	0.07	5.34	1.82	7.94	65.56
g__Nitrospira	0.09	3.89	3.34	3.37	4.97	70.53

g_Thiobacillus	3.36	0.02	2.97	2.44	4.42	74.95
g_Limnobacter	5.54	3.11	2.28	1.53	3.39	78.35
g_Pseudomonas	0.02	2.49	2.17	0.97	3.23	81.58
g_Blastocatella	0.11	2.05	1.7	0.95	2.53	84.11
g_C1-B045	0.05	1.57	1.33	2	1.98	86.09
g_Bryobacter	1.43	0.27	1.02	1.62	1.52	87.62
g_Denitratisoma	1.4	0.48	0.84	1.39	1.25	88.87
g_Brevundimonas	0.06	0.98	0.81	1.52	1.2	90.07

### Groups 0 & 45

Average dissimilarity = 98.21

OTUs	Group 0	Group 45	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g_CandidatusBrocadia	45.32	0.13	31.52	45.8	32.1	32.1
g_Nitrosomonas	28.59	0.38	19.68	51.76	20.04	52.13
g_Limnobacter	0.04	13.23	9.21	10.74	9.38	61.51
g_Marinobacter	0.03	8.89	6.18	6.84	6.29	67.81
g_oca15	0.01	7.28	5.02	1.15	5.11	72.92
g_Dokdonella	7.22	0.14	4.94	9.9	5.03	77.95
g_Ignavibacterium	4.87	0.06	3.36	9.69	3.42	81.37
g_Thioalkalispira	0.04	4.43	3.07	4.26	3.13	84.5
g_SM1A02	0.03	3.01	2.07	3.41	2.11	86.61
g_Thiobacillus	0.05	2.78	1.91	4.68	1.94	88.55
g_Nitrospira	2.55	0	1.77	2.92	1.81	90.36

### Groups 3 & 45

Average dissimilarity = 66.02

OTUs	Group 3	Group 45	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g_Nitrosomonas	21.68	0.38	19.29	2.94	29.23	29.23
g_Marinobacter	0.04	8.89	8.13	6.55	12.31	41.53
g_oca15	14.42	7.28	7.86	1.67	11.9	53.44
g_Limnobacter	5.54	13.23	7.02	4.18	10.64	64.07
g_CandidatusBrocadia	6.1	0.13	5.53	1.79	8.38	72.45
g_Thioalkalispira	0.14	4.43	3.96	4	6	78.45
g_SM1A02	0.44	3.01	2.35	2.93	3.56	82
g_Melioribacter	0	2.13	1.98	1.23	3	85
g_Halomonas	0	1.49	1.37	4.95	2.07	87.07
g_Truepera	0.02	1.23	1.12	1.36	1.69	88.76
g_Formosa	0	1.2	1.11	1.12	1.69	90.45

### Groups 25 & 45

Average dissimilarity = 64.37



OTUs	Group 25	Group 45	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g__Nitrosomonas	13.92	0.38	12.55	6.59	19.5	19.5
g__Limnobacter	3.11	13.23	9.4	7.11	14.6	34.1
g__oca15	0.46	7.28	6.23	1.08	9.67	43.77
g__SM1A02	8.3	3.01	4.92	2.06	7.64	51.41
g__Marinobacter	13.07	8.89	4.33	1.55	6.72	58.13
g__Thioalkalispira	0.01	4.43	4.12	4.2	6.39	64.52
g__Nitrolancea	3.89	0.14	3.48	3.38	5.4	69.93
g__Thiobacillus	0.02	2.78	2.55	4.75	3.97	73.89
g__Pseudomonas	2.49	0.08	2.27	0.97	3.53	77.42
g__Melioribacter	0	2.13	2	1.24	3.11	80.53
g__Blastocatella	2.05	0.13	1.78	0.94	2.76	83.29
g__C1-B045	1.57	0.12	1.34	1.91	2.08	85.37
g__Halomonas	0.28	1.49	1.12	3.04	1.74	87.12
g__Formosa	0.71	1.2	1.1	1.23	1.7	88.82
g__Truepera	0.63	1.23	0.88	1.58	1.37	90.19

## **8. CONCLUSIONES**

Concluida la parte experimental y tras el análisis de los resultados obtenidos, se ha elaborado una serie de conclusiones, que se describen a continuación:

1. El proceso CANON desarrollado en un reactor único mediante la tecnología de biofiltración en lecho fijo, es un sistema autotrófico de eliminación de nitrógeno eficaz y competitivo para el tratamiento de aguas residuales. Las eficiencias totales de eliminación de nitrógeno de esta tecnología fueron de 80.78% y 92.00% para los biorreactores que operaron bajo condiciones microaeróbicas, después de haber añadido 30 y 0 mg  $\text{NO}_2^-$ -N  $\text{L}^{-1}$  en el influente, respectivamente. Obteniendo una eficiencia menor, del 69.57%, para la eliminación de nitrógeno total en el biorreactor anóxico (con una adición de nitrito de 106.5 mg  $\text{NO}_2^-$ -N  $\text{L}^{-1}$ ). Sin embargo, en condiciones anóxicas se logró la máxima eficiencia después de aproximadamente 30 días mientras que en el caso de los biorreactores microaeróbicos se tardó aproximadamente 80 días en alcanzar sus máximas eficiencias.

2. La máxima eliminación de nitrógeno en un sistema CANON construido como biofiltro sumergido se consigue para las condiciones microaeróbicas sin adición de nitrito, pero se recomienda la adición de nitrito y condiciones anóxicas durante los primeros días de operación para una puesta en marcha del proceso de CANON y una estabilización de la biomasa más rápida. Una vez alcanzadas las condiciones óptimas del proceso, no será necesario añadir  $\text{NO}_2^-$  debido al enriquecimiento de bacterias Anammox y AOB en el bioreactor funcionando bajo condiciones microaeróbicas.

3. El proceso CANON en biofiltros le lecho fijo con material soporte Filtralite permite el desarrollo de una biopelícula perfectamente estructurada, donde las bacterias AOB y Anammox coexisten. En concreto, se encontró que los géneros *Candidatus Brocadia* y *Nitrosomonas* jugaron un papel esencial en la eliminación de nitrógeno total.

4. Los sistemas CANON ensayados funcionaron correctamente en presencia de materia orgánica de 100 mg DQO  $\text{L}^{-1}$ , alcanzando el 85.62% en eficiencia de eliminación de nitrógeno total. Estos resultados eran ligeramente mejores o muy similares a los obtenidos en el bioreactor sin adición de materia orgánica, lo que confirma que un sistema CANON configurado como un biofiltro sumergido puede adaptarse a la presencia de un cierto nivel de materia orgánica.

5. Concentraciones de materia orgánica de 400 mg DQO L<sup>-1</sup> en el sistema CANON configurado como biofiltro sumergido, determinan una inhibición parcial del proceso biológico de eliminación de N, alcanzando rendimientos totales de remoción del 68.1%. No obstante esta disminución de eficiencia, los valores de eliminación podemos considerarlos como aceptables.

6. La adición de materia orgánica a los sistemas CANON, modificó la estructura de la comunidad bacteriana y provocó la proliferación de bacterias heterótrofas relacionadas con los géneros de *Thauera*, *Longilinea*, *Ornatilinea*, *Thermomarinilinea*, *Chlorobiales no clasificados*, y *Denitratisoma*. Además, aunque en menor abundancia, *Nitrosomonas* y *Candidatus Scalindua* continúan estando presentes. Por lo tanto, se puede hablar de la coexistencia de diferentes metabolismos microbianos, tales como AOB, Anammox y desnitrificantes, que permiten alcanzar satisfactorias eficiencias de eliminación de Nitrógeno total.

7. La presencia de altas concentraciones de NaCl (3, 25 y 45 g NaCl L<sup>-1</sup>) en los influentes aplicados a un sistema CANON de biofiltración con lecho fijo determina una inhibición en la capacidad de eliminación de nitrógeno.

8. Un aumento en la concentración salina origina cambios en la estructura de la comunidad bacteriana debido a la inhibición de *Candidatus Brocardia* y *Nitrosomonas* mientras que algunos microorganismos como *Marinobacter* y *Limnobacter* fueron favorecidos. Por otra parte, se observa una adaptación de las bacterias anaeróbicas oxidantes de amonio (Anammox) para un influente con 3 g de NaCl L<sup>-1</sup> mientras que para concentraciones superiores estos microorganismos reducen su presencia drásticamente. En un mismo sentido las poblaciones de AOB y NOB sufren una drástica reducción para concentraciones de 45 g de NaCl L<sup>-1</sup>.

## **CONCLUSIONS**

1. This thesis has applied a CANON process in a single reactor by fixed bed biofiltration technology. This process is a system for autotrophic removal of nitrogen from wastewater. Total nitrogen removal efficiencies were 80.78% and 92.00% for bioreactors operated under microaerobic conditions, after adding 30 and 0 mg NO<sub>2</sub>-N L<sup>-1</sup> in the influent, respectively. Obtaining a lower efficiency, 69.57%, for the removal of total nitrogen in the anoxic bioreactor (with an addition of nitrite of 106.5 mg NO<sub>2</sub>-N L<sup>-1</sup>). However, the maximum efficiency under anoxic conditions was achieved after about 30 days while in the case of microaerobic bioreactors it took approximately 80 days to reach their maximum efficiencies.

2. According the results obtained in the experiments, the maximum nitrogen removal is achieved for microaerobic conditions without addition of nitrite, but the addition of nitrite and anoxic conditions are recommended during the first days of operation for implementation of the process CANON and to stabilize biomass faster. After reaching the optimum process conditions, addition of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> will not be necessary due to the enrichment of Anammox and AOB bacteria in the bioreactor operating under microaerobic conditions.

3. This CANON process with fixed bed biofilters using Filtralite as material support, allows the development of well structured biofilm where AOB and Anammox bacteria coexist. Specifically, it was found that *Candidatus Brocadia* and *Nitrosomonas* genus played an essential role in the total nitrogen removal.

4. The proposed system functioned correctly under the presence of organic matter of 100 mg COD · L<sup>-1</sup>, reaching 85.62% of total nitrogen removal efficiency. These results were slightly better or very similar to those obtained in the bioreactor without the addition of organic matter, confirming that a CANON system configured as a submerged biofilter could adapt to the presence of some level of organic matter.

5. An increase in concentration (i.e., 400 mg COD · L<sup>-1</sup>) of organic matter in the CANON process with fixed bed biofilters led to a partial inhibition of the biological process (but acceptable, reaching total N-removal yields 68.1%).

6. The addition of organic matter changed the structure of the bacterial community and led to the proliferation of heterotrophic bacteria related genus *Thauera*, *longilinear*, *Ornatilinea*, *Thermomarinilinea*, *Chlorobiales not classified*, and *Denitratisoma*. Although with lesser abundance, *Nitrosomonas* and *Candidatus Scalindua* are still present.

Therefore, our results show the coexistence of different microbial metabolisms, such as AOB, Anammox and Denitrifying, whose consortium allowed achieving satisfactory Total Nitrogen removal efficiencies.

7. When CANON process by means of biofiltration system with fixed bed was evaluated to treat saline influent (0, 3, 25 and 45 g NaCl L<sup>-1</sup>), the results obtained in our study showed obvious inhibition of the ability to remove nitrogen when influent containing high concentrations of NaCl was applied (25 and 45 g NaCl L<sup>-1</sup>).

8. An increase of salinity concentration produced changes on bacterial community structure. One of the main changes was the inhibition of *Candidatus Brocardia* and *Nitrosomonas* while some microorganisms as *Marinobacter* and *Limnobacter* were favored. Moreover, an adaptation of oxidizing ammonium anaerobic (Anammox) bacteria for the influent with 3 g NaCl L<sup>-1</sup> was observed, but higher concentrations declined sharply their presence. AOB and NOB populations were drastically reduced for the concentration of 45 g NaCl L<sup>-1</sup>.

## **9. REFERENCIAS**

- Ali M., Oshiki M., Awata T. et al. Physiological characterization of anaerobic ammonium oxidizing bacterium "Candidatus Jettenia caeni". *Environ Microbiol*, 2015. 170, 2172–89.
- Arrojo B., Mosquera-Corral A., Campos J.L. and Mendez R. Effects of mechanical stress on Anammox granules in a sequencing batch reactor (SBR). *Journal of Biotechnology*, 2006. 123 (4), 453-463.
- Aslan S. and Simsek E., Influence of salinity on partial nitrification in a submerged biofilter, *Bioresour. Technol.*, 2012, 118, 24–29.
- Awata T., Kindaichi T., Ozaki N., Ohashi A., Biomass yield efficiency of the marine anammox bacterium, "Candidatus Scalindua sp." is affected by salinity. *Microbes environ.* 2015. 30(1), 86-91.
- Balaguer M.D., Colprim J., Martín M., Poch M., Rodríguez-Roda I., *Tractament biologic d'aigües residuals urbanes*. Programa de doctorat Technologies del medi ambient. Monografia nº1. Universitat de Girona (1998)..
- Barnard J., Reid Crowther and Partners, Burnaby BC. Canada: Personal communication, 1994.
- Bassin JP, Abbas B, Vilela CLS, Kleerebezem R, Muyzer G, Rosado AS, van Loosdrecht MC, Dezotti M. Tracking the dynamics of heterotrophs and nitrifiers in moving bed biofilm reactors operated at different COD/ N ratios. *Bioresour Technol.* 2015. 192: 131-141.
- Bassin JP, M. Pronk, G. Muyzer, R. Kleerebezem, M. Dezotti, M.C.M. van Loosdrecht, Effect of elevated salt concentrations on the aerobic granular sludge process: linking microbial activity with microbial community structure, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011. 77, 7942–7953.
- Bi Z, Takekawa M, Park G et al. Effects of the C/N ratio and bacterial populations on nitrogen removal in the simultaneous anammox and heterotrophic denitrification process: mathematic modeling and batch experiments. *Chem Eng J*, 2015. 280, 606–13.
- Glass C. and Silverstein J., Denitrification of high-nitrate high-salinity wastewater, *Water Res.* 1999. 33, 223–229.
- Cerrone F, Poyatos JM, Molina-Muñoz M, Cortes Lorenzo C, Gonzalez Lopez J, Rodelas B. Prevalence of Nitrosomonas cluster 7 populations in the ammonia oxidizing community of a submerged membrane bioreactor treating urban wastewater under different operation conditions. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 2013. 36, 901-910.
- Chamchoi N, Nitisravut S, Schmidt JE. Inactivation of ANAMMOX communities under concurrent operation of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) and denitrification. *Bioresour Technol* 2008. 99, 3331–6.

- Chamchoi N, Nitorisavut S. Anammox enrichment from different conventional sludges. *Chemosphere*, 2007. 66, 2225–32.
- Chen J., Y. Han, Y. Wang, B. Gong, J. Zhou, X. Qing, Start-up and microbial communities of a simultaneous nitrogen removal system for high salinity and high nitrogen organic wastewater via heterotrophic nitrification, *Bioresour. Technol.*, 2016. 216, 196–202.
- Christensson M, Ekström S, Lemaire R, Vaillant E, Bundgaard E, Chauzy J, Stalhandske L, Hong Z, Ekemberg M. ANITA Mox—a biofarm solution for fast start-up of deammonifying MBBRs. WEFTEC11 Los Angeles CA; 2011.
- Christensson M., Ekström S., Andersson Chan A., Le Vaillant E., Lemaire R., Experience from start-ups of the first ANITA Mox plants, *Water Sci Technol.*, 2013. 67(12), 2677-84.
- Chu Z.R., Wang K., Li X.K., Zhu M.T., Yang L., and Zhang J., Microbial characterization of aggregates within a one-stage nitritation–anammox system using high through put amplicon sequencing. *Chem. Eng. J.*, 2015. 262, 41-48.
- Clarke KR, Warwick RM. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. *Plymouth Marine Laboratory Plymouth UK*; 2001.
- Cohen, J., *Statistical power analysis for the behavioral sciences*, Second ed., Erlbaum, Hillsdale NJ, USA, 1988.
- Cortés-Lorenzo C, Rodríguez-Díaz M, Lopez-Lopez C et al. Effect of salinity on enzymatic activities in a submerged fixed bed biofilm reactor for municipal sewage treatment. *Bioresour Technol* 2012. 121, 312–9.
- Cortés-Lorenzo C., González-Martínez A., Smidt H., González-López J., Rodelas B., Influence of salinity on fungal communities in a submerged fixed bed bioreactor for wastewater treatment, *Chem. Eng. J.*, 2016. 285, 562–572.
- Cui Y.W., H.Y. Zhang, J.R. Ding, Y.Z. Peng, The effects of salinity on nitrification using halophilic nitrifiers in a Sequencing Batch Reactor treating hypersaline wastewater, *Sci. Rep.*, 2016. 6, 24–25.
- Dapena-Mora A, Van Hulle SWH, Campos JL, Mendez R, Vanrolleghem PA, Jetten M, Enrichment of Anammox biomass from municipal activated sludge: experimental and modeling results. *J. Biotechnol.*, 2004. 79, 1421–1428.
- Dapena-Mora A, Vazquez-Pad JR, Campos JL et al. Monitoring the stability of an anammox reactor under high salinity conditions. *Biochem Eng J*, 2010. 51, 167–71.
- Del Río AV, Fuentes AP, Giustinianovich EA et al. Anammox process: technologies and application to industrial effluents, *Wastewater*, 2017. 10, 264–89.
- Dincer A.R., F. Kargi, Performance of rotating biological disc system treating saline wastewater, *Process Biochem.*, 2001. 31, 901-906.

- Dolinsek, J., Lagkouvardos, I., Wanek, W., Wagner, M., Daims, H., Interactions of nitrifying bacteria and heterotrophs: identification of a Micavibrio-like putative predator of *Nitrospira* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013. 79, 2027–2037.
- Du WL, Huang Q, Miao L, Liu Y, Liu Z. Association of running manner with bacterial community dynamics in a partial short-term nitrifying bioreactor for treatment of piggery wastewater with high ammonia content. *AMB Express.*, 2016. 6, 76-86.
- Du R., Cao S., Li B., Niu M., Wang S., Peng Y., Performance and microbial community analysis of a novel DEAMOX based on partial-denitrification and anammox treating ammonia and nitrate wastewaters, *Water Res.*, 2017. 108, 46–56.
- Edgar R.C., B.J. Haas, J.C. Clemente, C. Quince, R. Knight, UCHIME improves sensitive and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27 (2011) 2194–2200.
- Egli K, Fanger U, Alvarez PJJ, Siegrist H, Van Der Meer JR, Zehnder AJB. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Archives of Microbiol* 2001; 175: 198-207.
- Filbert EM, Agrawal S, Karst SM et al. Low temperature partial nitritation/anammox in a moving bed biofilm reactor treating low strength wastewater. *Environ Sci Technol* 2014;48;884– 8792.
- Fux C. Biological nitrogen elimination of ammonium-rich sludge digester liquids. PhD Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland, 2003.
- Ganczarczyk JJ, Sabaratnam S. Nitrification process in waste water treatment. US4720344 1988.
- Giustinianovich, E.A., Campos, J.L., Roedel, M.D., 2016. The presence of organic matter during autotrophic nitrogen removal: Problem or opportunity?. *Separation and Purification Technology* 166, 102-108.
- Gómez-Silván C, Vilchez-Vargas R, Arevalo J, Gomez MA, Gonzalez Lopez J, Pieper DH, Rodelas B. Quantitative response of nitrifying communities to environmental variables in a full-scale membrane bioreactor. *Bioresour Technol.* 2014; 126-133.
- Gonzalez-Martinez A, Osorio F, Morillo JA et al. Comparison of bacterial diversity in full scale anammox bioreactors operated under different conditions. *Biotechnol Progr* 2015b;31:1464–72.
- González-Martinez A, Rodríguez-Sánchez A, Martínez-Toledo MV, García-Ruiz MJ, Hontoria E, Osorio-Robles F, González-López J. Effect of ciprofloxacin antibiotic on the partial-nitritation process and bacterial community structure of a submerged biofilter. *Sci Total Environ.* 2014b; 476-477.
- González-Martinez, A., Osorio, F., Rodríguez-Sánchez, A., Martínez-Toledo, M.V., González-López, J., Lotti, T., van Loosdrecht, M.C.M., 2014a. Bacterial community structure of a lab-scale anammox membrane bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 31, 183-193.



- González-Martínez, A., Rodríguez-Sánchez, A., García-Ruiz, M.J., Muñoz-Palazon, B., Cortes-Lorenzo, C., Osorio, F., Vahala, R., 2016. Performance and bacterial community dynamics of a CANON bioreactor acclimated from high to low operational temperatures. *Chemical Eng. J.* 287, 557-567
- Gonzalez-Martinez, A., Rodriguez-Sanchez, A., Rodelas, B., Abbas, B., Martinez-Toledo, M.V., van Loosdrecht, M.C.M., Osorio, F., Gonzalez-Lopez, J., 2015a. 454-Pyrosequencing analysis of bacterial communities from autotrophic nitrogen removal bioreactors utilizing universal primers: effect of annealing temperature. *BioMed Research International*, 892013 (Open Access).
- González-Martínez, K., Calderón, A., Albuquerque, E., Hontoria, J., González-López, I.M., Guisado, F., Osorio, F. Biological and technical study of a partial-SHARON reactor at laboratory scale: effect of hydraulic retention time, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36 (2013) 173–184.
- Gonzalez-Silva B.M., A.J. Rønning, I.K. Andreassen, I. Bakke, F.J. Cervantes, K. Østgaard, O. Vadstein, Changes in the microbial community of an anammox consortium during adaptation to marine conditions revealed by 454 pyrosequencing, *Appl Microbiol Biotechnol.* 101 (2017) 5149–5162.
- Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika.* 1953; 40 (3-4) 237-264.
- Güven, D., Dapena, A., Kartal, B., Schmid, M.C., Maas, B., Van De Pas-Schoonen, K., Sozen, S., Mendez, R., Op Den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Strous, M., Schmidt, I., 2005. Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1066-1071.
- Halling-Sorensen B, Hjuler H. Simultaneous nitrification and denitrification with upflow fixed bed reactor applying clinoptilolite as media. *Wat. Treat* 1992; 7: 77-88.
- Hamersley MR, Lavik G, Woebken Det, Rattray JE, Lam P, Hopmans EC, Damseté JSS, Krüger S, Graco M, Gutiérrez D, Kuypers MMM. Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone. *Limnol Oceanogr.* 2007; 52 : 923–933.
- Hamme Ø. r, D.A.T. Harper, P.D. Ryan, PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis, *Palaeontol. Electron.* 4 (2001) XIX–XX (Open Access).
- Hawkins S, Robinson K, Layton A, Sayler G. Limited impact of free ammonia on *Nitrobacter* spp. Inhibition assessed by chemical and molecular techniques. *Bioresour Technol* 2010; 101: 4513–19.
- Hellinga, C., Schellen, A.A.J.C., Mulder, J.W., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 1998. The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater. *Water Science and Technology* 37, 135-142.
- Henze M, Harremoens P, Jansen JLC, Arvin E. *Wastewater treatment: Biological and Chemical Processes.* Heidelberg: Springer 2002.

- Hiras J., Wu YW., Eichorst SA., Simmons BA., Singer SW., 2016. Redefining the phylum Chlorobi by resolving the phylogeny and metabolic potential of the representative of a deeplybranching, uncultivated lineage. *The ISME Journal* 10, 833-845.
- Hirsch MD., Long ZT., Song B., 2011. Anammox bacterial diversity in various aquatic ecosystems based on the detection of hydrazine oxidase genes (hzoA/hzoB). *Microb. Ecol.* 61,264-276.
- Ho K. Biological nutrient removal in activated sludge processes with low F/M, sludge bulking control. PhD thesis, University of Queensland, Australia, 1994
- Hu Z, van Alen T, Jetten MSM et al. Lysozyme and penicillin inhibit the growth of anaerobic ammoniumoxidizing planctomycetes. *Appl Environ Microb* 2013b;79: 7763–9.
- J. Dosta, I. Fernández, J.R. Vázquez-Padín, A. Mosquera-Corral, J.L. Campos, J. Mata-Álvarez, R. Méndez, Short- and long-term effects of temperature on the Anammox process, *Journal of Hazardous Materials* 154 (2008) 688–693.
- Jackson, G.A., Livingston, R.S., Riley, L.K., Livingston, B.A., Franklin, C.L.,. Development of a PCR assay for the detection of *Spironucleus muris*. *J. Am. Assoc. Lab. Animal Sci.* 2013 52 (2), 165e170.
- Jetten MSM, Wagner M, Fuerst J, van Loosdrecht M, Kuenen G, Strous M. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('ANAMMOX') process. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12:283–288.
- Jetten, M.S.M., Strous, M., Van de Pas-Schoonen, K.T., Schalk, J., Van Dongen, L., Van de Graaf, A.A., Logemann, S., Muyzer, G., Van Loosdrecht, M.C.M. and Kuenen, J.G. (1999). The anaerobic oxidation of ammonia. *FEMS Microbiol. Reviews* 22 (5), 421-437.
- Jin RC, Yang GF, Ma C et al. Influence of effluent recirculation on the performance of Anammox process. *Chem Eng J* 2012;200– 202:176–85.
- Joss A, Salzgeber D, Eugster J, König R, Rottermann K, Burger S, Fabijan P, Leumann S, Mohn J, Siegrist H. Full-Scale Nitrogen Removal from Digester Liquid with Partial Nitrification and Anammox in One SBR. *Environ Sci Technol.* 2009; 43: 5301-5306.
- Juan GL, Alfonso C, Juan MG, Jose Antonio A, Emilio I, María José M. Nitrate promotes biological oxidation of sulfide in wastewaters: Experiment at plant-scale. *Biotechnol Bioeng* 2006; 93: 801-811.
- Kartal B, Rattray J, van Niftrik L A, van de Vossenberg J, Schmid M C, Webb R I, Schouten S, Fuerst J A, Damsté J S, Jetten M S. *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol.* 2007; 30:39–49.
- Kim D.J., D.I. Lee, J. Keller, Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH, *Bioresour. Technol.* 3 (2006) 459–468.

- Koops, H.-P., BOTTCHEER, B., MOLLER, U. C., POMMERENING-ROSER, A. & STEHR, G. (1990). Description of a new species of Nitrosococcus. *Archives of Microbiology* 154, 244-248.
- Kuypers, M.M.M., A.O. Sliemers, G. Lavik, M. Schmid, B.B. Jørgensen, J.G. Kuenen, J.S.S. Damsté, M. Strous, and M.S.M. Jetten., 2003. Anaerobic ammonium oxidation by Anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* 422, 608–611.
- Langone M, Yan J, Haaijer SC, Op den camp HJM, Jetten MSM, Andreottola G (2014) Coexistence of nitrifying anammox and denitrifying bacteria in a sequencing batch reactor. *Frontiers in Microbiology* 5:28.
- Li K., Wang H., Wang C., Chen Y., Guo J., Wang X., Jiang F., 2017. Pathways of N removal and N<sub>2</sub>O emission from a one-stage autotrophic N removal process under anaerobic conditions. *Sci. Rep.* 7, 42072.
- Li X, Sun S, Badgley BD, Sung S, Zhang H, He Z (2016) Nitrogen removal by granular nitritation-anammox in an upflow membrane-aerated biofilm reactor. *Water Res* 94: 23-31.
- Liu S, Zhang Z, Ni J. Behavior detection and activity recovery of damaged anammox bacteria culture after accidental overheating. *Chem Eng J* 2015;259:70–8.
- Lotti T, Kleerebezem R, Hu Z, Kartal B, Jetten MSM, van Loosdrecht MCM. Simultaneous partial nitritation and anammox at low temperature with granular sludge. *Water Res.* 2014; 66: 111-121.
- Lotti T, Kleerebezem R, Lubello C et al. Physiological and kinetic characterization of a suspended cell anammox culture. *Water Res* 2014;60:1–14.
- Ludwig W, Mittenhuber G, Friedrich CG. Transfer of *Thiosphaera pantotropha* to *Paracoccus denitrificans*. *Int J Syst Bacteriol* 1993; 43: 363–7.
- M. Strous, E.V. Gerven, P. Zheng, J.G. Kuenen, M.S.M. Jetten, Ammonium removal from concentrate waste water streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations, *Water Res.* 31 (1997) 1955–1962.
- M.J. García-Ruiz, P. Maza-Márquez, J. González-López, F. Osorio, Nitrogen removal capacity and bacterial community dynamics of a Canon biofilter system at different organic matter concentrations, *Chemosphere* 193 (2018) 591–601.
- Ma, Q., Qu, Y., Shen, W., Zhang, Z., Wang, J., Liu, Z., Li, D., Li, H., Zhou, J., 2015. Bacterial community compositions of coking wastewater treatment plants in steel industry revealed by Illumina high-throughput sequencing. *Bioresour. Technol.* 179, 436–443.
- Maza-Marquez P, Vilchez-Vargas R, Boon N, Gonzalez-Lopez J, Martinez-Toledo MV, Rodelas B. The ratio of metabolically active versus total Mycolata populations triggers foaming in a membrane bioreactor. *Water Res.* 2016; 92: 208-217.
- Miao Y., R. Liao, X-X. Zhang, B. Liu, Y. Li, B. Wu, A. Li, Metagenomic insights into salinity effect on diversity and abundance of denitrifying bacteria and genes in an expanded granular

- sludge bed reactor treating high-nitrate wastewater, *Chemical Engineering Journal* 277 (2015) 116–123.
- Miyahara M., S.W. Kim, S. Fushinobu, K. Takaki, T. Yamada, A. Watanabe, K. Miyauchi, G. Endo, T. Wakagi, H. Shoun, Potential of aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* TR2 to reduce nitrous oxide emissions from wastewater treatment plants, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 4619–4625.
- Molinuevo B, García MC, Karakashev D et al. Anammox for ammonia removal from pig manure effluents: effect of organic matter content on process performance. *Bioresource Technol* 2009;100:2171–5.
- Mosquera-Corral A., F. González, J.L. Campos, R. Méndez, Partial nitrification in a Sharon reactor in the presence of salts and organic carbon compounds, *Process Biochem.* 40 (2005) 3109–3118.
- Mulder A. Anaerobic ammonium oxidation. US5078884 1992.
- Mulder A. The quest for sustainable nitrogen removal technologies. *Wat Sci Tech* 2003; 48(1): 67-75.
- Myrold, D. Transformations of nitrogen. In: Sylvia, D., Hartel, P., Fuhrmann, J. and Zuberer, D. Eds. *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice Hall, New Jersey 2005: pp. 333-72.
- Narita Y, Zhang L, Kimura ZI et al. Enrichment and physiological characterization of an anaerobic ammonium-oxidizing bacterium “*Candidatus Brocadia sapporoensis*.” *Syst Appl Microbiol* 2017;40:448–57
- Nielsen M, Bollmann A, Sliemers O, Jetten M, Schmid M, Strous M, Revsbech NP (2005) Kinetics, diffusional limitation and microscale distribution of chemistry and organisms in a CANON reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51:247–256.
- Pathak BK, Kazama F, Saiki Y et al. Presence and activity of anammox and denitrification process in low ammonium-fed bioreactors. *Bioresource Technol* 2007;98:2201–6
- Plaza E, Trela J, Hultman B. Impact of seeding with nitrifying bacteria on nitrification process efficiency. *Wat. Sci. Tech* 2001; 43(1): 155-63.
- Prat, N. (2004). Alternativas para una gestión sostenible del agua en Cataluña. *Ambienta* 39, 3-40.
- Quartaroli L., L.C.F. Silva, C.M. Silva, H.S. Lima, Ammonium removal from high-salinity oilfield-produced water: assessing the microbial community dynamics at increasing salt concentrations, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101(2017) 859.
- Ramos, A.F., M.A. Gómez, E. Hontoria, J. González-López, Biological nitrogen and phenol removal from saline industrial wastewater by submerged fixed-film reactor, *J. Hazard. Mater.* 142 (2007) 175–183.

- Reboleiro-Rivas P, Martin-Pascual J, Juarez-Jimenez B, Poyatos JM, Vilchez-Vargas R, Vlaeminck SE, Rodelas B, Gonzalez-Lopez J. Nitrogen removal in a moving bed membrane bioreactor for municipal sewage treatment: Community differentiation in attached biofilm and suspended biomass. *Chemical Eng J.* 2015; 277: 209-218.
- Ren Y., Li D., Li X., Yang L., Ding A., Zhang J., 2014. High-rate nitrogen removal and microbial community of an up-flow anammox reactor with ceramics as biomass carrier. *Chemosphere* 113, 125-131
- Rittmann BE, McCarty PL. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. New York: International Edition: McGraw- Hill Education 2001
- Rodríguez-Sánchez A, Leyva-Díaz JC, Poyatos JM et al. Performance and kinetics of membrane and hybrid moving bed biofilm-membrane bioreactors treating salinity wastewater. *AIChE J* 2017a;63:3329–42
- Rodríguez-Sánchez A, Mikola A, Muñoz-Palazon B, Vahala R, González-Martínez A. Performance and bacterial community structure of a submerged biofilter subjected to high ammonium and high organic carbon concentrations. *Int Biodet Biodeg.* 2016; 115:224-233.
- S. Okabe, M. Oshiki, Y. Takahashi, H. Satoh , N<sub>2</sub>O emission from a partial nitrification-anammox process and identification of a key biological process of N<sub>2</sub>O emission from anammox granules, *Water Res.*, 45 (19) (2011), pp. 6461-6470.
- S. Qiao, N. Zheng, T. Tian, C. Yu, J. Zhou, Effects of short-term exposure to linear anionic surfactants (SDBS, SLS and SDS) on anammox biomass activity, *RSC Adv.*, 6 (2016), pp. 53004-53011.
- S.J. McIlroy, A.M. Saunders, M. Albertsen, M. Nierychlo, B. McIlroy, A.A. Hansen, S.M. Karst, J.L. Nielsen, P.H. Nielsen, *MIIDAS: the field guide to the microbes of activated sludge*, Database ,Oxford, 2015.
- Sabumon PC. Anaerobic ammonia removal in presence of organic matter: A novel route. *J Hazard Mater* 2007;149:49–59
- Schlegel S, Koeser H. Wastewater treatment with submerged fixed bed biofilm reactor systems-design rules, operating experiences and ongoing developments. *Water Sci Technol.* 2007; 55: 83-89.
- Schmid MC, Risgaard-Petersen N, van de Vossenberg J, Kuypers MM, Lavik G, Petersen J, Hulth S, Thamdrup B, Canfield D, Dalsgaard T, Rysgaard S, Sejr MK, Strous M, den Camp HJ, Jetten MS. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity. *Environ Microbiol.* 2007; 9:1476–1484.
- Schmidt I, Sliemers A, Schmid M, et al. New concept of microbial treatment process for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiol* 2003; 27: 481-92.

- She Z., L. Zhao, X.Zhang, C. Jin, L. Guo, S. Yang, Y. Zhao, M. Gao, Partial nitrification and denitrification in a sequencing batch reactor treating high-salinity wastewater, *Chemical Engineering Journal* 288 (2016) 207–215.
- Sliekers A, Third K, Abma W, Kuenen JG, Jetten MSM. CANON and Anammox in a gas-lift reactor. *FEMS Microbiol Letters* 2003; 218: 339-44.
- Sliekers AO, Haaijer SCM, Stafsnes MH et al. Competition and coexistence of aerobic ammonium- and nitrite-oxidizing bacteria at low oxygen concentrations. *Appl Microbiol Biot* 2005;68:808–17.
- Sobotka D., A. Tuszynska, P. Kowal, S. Ciesielski, K. Czerwionka, J. Makinia, Long-term performance and microbial characteristics of the anammox-enriched granular sludge cultivated in a bench-scale sequencing batch reactor, *Biochemical Engineering Journal*, 2017, 120: 125-135.
- Sri Shalini S, Joseph K., Nitrogen management in landfill leachate: application of SHARON, ANAMMOX and combined SHARON-ANAMMOX process, *Waste Manag.* 2012 Dec;32(12):2385-400
- Staroscik A. 2004. URI Genomics and Sequencing Center: calculator for determining the number of copies of a template.
- Strous M, Pelletier E, Mangenot S, Rattei T, Lehner A, Taylor MW, Horn M, Daims H, Bartol-Mavel D, Wincker P, Barbe V, Fonknechten N, Vallenet D, Segurens B, Schenowitz-Truong C, Médigue C, Collingro A, Snel B, Dutilh BE, Op den Camp HJM, van der Drift C, Cirpus I, van de Pas-Schoonen KT, Harhangi HR, van Niftrik L, Schmid M, Keltjens J, van de Vossenberg J, Kartal B, Meier H, Frishman D, Huynen MA, Mewes HW, Weissenbach J, Jetten MSM, Wagner M, Le Paslier D. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*. 2006; 440: 790–794.
- Strous M. Microbiology of anaerobic ammonium oxidation. PhD Thesis, Technical University of Delft, Holanda, 2000.
- Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1998). The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotech.* **50** (5), 589-596.
- Su JJ, Liu BY, Liu CY. Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of piggery wastewater treatment system. *J Appl Microbiol* 2001; 90: 457– 462
- Sudarno U, Winter J, Gallert C. Effect of varying salinity, temperature, ammonia and nitrous acid concentrations on nitrification of saline wastewater in fixed-bed reactors. *Bioresour Technol.* 2011; 102:5665-5673.

- T. Liu, D. Li, H. Zeng, X. Li, T. Zeng, X. Chang, Y. Cai, J. Zhang, Biodiversity and quantification of functional bacteria in completely autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON) process, *Bioresour. Technol.* 118 (2012) 399–406.
- Takekawa M, Park G, Soda S et al. Simultaneous anammox and denitrification (SAD) process in sequencing batch reactors. *Bioresour. Technol.* 2014;174:159–66
- Terada, A., Sugawara, S., Yamamoto, T., Zhou, S., Koba, K., Hosomi, M., 2013. Physiological characteristics of predominant ammonia-oxidizing bacteria enriched from bioreactors with different influent supply regimes. *Biochem. Eng. J.* 79, 153-161.
- Teske A, Alm E, Regan JM, Toze S, Rittmann BE, Stahl DA. (1994). Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J Bacteriol* 176: 6623–6630.
- Third KA, Sliemers O, Kuenen JG, Jetten MSM. The CANON system (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria. *Syst Appl Microbiology* 2001; 24: 588-96
- Tiso M, Schechter AN. Nitrate reduction to nitrite, nitric oxide and ammonia by gut bacteria under physiological conditions. *PLoS One* 2015;10:0119712.
- Toh SK, Webb RI, Ashbolt NJ (2002) Enrichment of Autotrophic Anaerobic Ammonium-Oxidizing Consortia from Various Wastewaters. *Microb Ecol* 43: 154-167
- Uygur A., SpeciWc nutrient removal rates in saline wastewater treatment using sequencing batch reactor, *Proc. Biochem.* 41 (2006) 61–66.
- Van de Vossenberg, J., Woebken, D., Maalcke, W.J., Wessels, H.J., Dutilh, B.E., Kartal, B., Janssen-Megens, E.M., Roeselers, G., Yan, J., Speth, D., Gloerich, J., Geerts, W., van der Biezen, E., Pluk, W., Francoijs, K.J., Russ, L., Lam, P., Malfatti, S.A., Tringe, S.G., Haaijer, S.C., op den Camp, H.J.M., Stunnenberg, H.G., Amann, R., Kuypers, M.M.M., Jetten, M.S.M., 2013. The metagenome of the marine anammox bacterium “*Candidatus Scalindua profunda*” illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium. *Environ. Microbiol.* 15, 1275–1289.
- Van der Star W R L, van de Graaf M J, Kartal B, Picioreanu C, Jetten M S M, van Loosdrecht M C M. Response of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria to hydroxylamine. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74:4417–4426.
- van der Star WRL, Abma WR, Blommers D et al. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Res* 2007;41:4149–63
- Van Dongen LGJM, Jetten MSM, van Loosdrecht MCM. The Combined Sharon/Anammox process. STOWA Report, IWA Publishing, London, UK, 2001.
- Van Dongen U, Jetten MSM, van Loosdrecht MCM. The SHARON®-Anammox® process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Sci Technol.* 2001; 44(1): 153-160.

- Van Hulle SWH, Maertens J, Vanrolleghem PA (2008) Performance of a CANON and an Anammox biofilm system under different hydrodynamic conditions, OAI identifier: oai:CiteSeerX.psu:10.1.1.72.7114.
- Veuillet F., Lacroix S., Bausseron A., Gonidec E., Ochoa J., Christensson M., Lemaire R., Integrated fixed-film activated sludge ANITA™Mox process--a new perspective for advanced nitrogen removal, *Water Sci Technol.* 2014;69(5):915-22
- Wan C., X. Yang, D.J. Lee, X. Liu, S. Sun, C. Chen, Partial nitrification of wastewaters with high NaCl concentrations by aerobic granules in continuous-flow reactor, *Bioresour. Technol.* 152 (2014) 1–6.
- Wang Z., G. Luo, J. Li, S.Y. Chen, Y. Li, W.T. Li, A.M. Li, Response of performance and ammonia oxidizing bacteria community to high salinity stress in membrane bioreactor with elevated ammonia loading, *Bioresour. Technol.* 216 (2016) 714–721.
- Wang T., J. Li, L.H. Zhang, Y. Yu, Y.M. Zhu, Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at high concentrations of NaCl and ammonia nitrogen by *Halomonas* bacteria, *Water Sci. Technol.* 2 (2017) 386–395.
- Wang J., B. Gong, Y. Wang, Y. Wen, J. Zhou, Q. He, The potential multiple mechanisms and microbial communities in simultaneous nitrification and denitrification process treating high carbon and nitrogen concentration saline wastewater, *Bioresour. Technol.* 243 (2017) 708–715.
- Wett B. Solved up-scaling problems for implementing deammonification of rejection water. *Water Sci Technol* 2006; 53(12): 121- 128.
- Winkler MK, Yang J, Kleerebezem R et al. Nitrate reduction by organotrophic Anammox bacteria in a nitrification/anammox granular sludge and a moving bed biofilm reactor. *Bioresour Technol* 2012;114;217–23.
- Woebken, D., Lam, P., Kuypers, M.M.M., Naqvi, S.W.A., Kartal, B., Strous, M., Jetten, M.S.M., Fuchs, B.M., Amann., R. 2008. A microdiversity study of anammox bacteria a novel *Candidatus Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environ. Microbiol.* 10, 3106–3119.
- Wu, S., Shankar-Bhattacharjee, A., Goel, R., 2016. Comparison of performance and microbial communities in single stage suspended and attached growth partial nitrification/Anammox reactors under different temperatures. *Environmental Engineering Science* (In press; DOI: 10.1089/ees.2016.0224)
- Xia S, Jia R, Feng F, Xie K, Li H, Jing D, Xu X. Effect of solids retention time on antibiotics removal performance and microbial communities in an A/O-MBR process. *Bioresour Technol.* 2012; 106:36-43.
- Xing B., Q. Guo, G. Yang, J. Zhang, T. Qin, P. Li, W. Ni, R. Jin, The influences of temperature, salt and calcium concentration on the performance of anaerobic ammonium oxidation (anammox) process, *Chemical Engineering Journal* 265 (2015) 58–66.



- Yang J, Zhang L, Hira D et al. Anammox treatment of highsalinity wastewater at ambient temperature. *Bioresource Technol* 2011;102:2367–72
- Yao Z., P. Lu, D. Zhang, X. Wan, Y. Li, S. Peng, Stoichiometry and kinetics of the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) with trace hydrazine addition, *Bioresour. Technol.* 198 (2015) 70–76.
- Yin Z, dos Santos CED, Vilaplana JG et al. Importance of the combined effects of dissolved oxygen and pH on optimization of nitrogen removal in anammox-enriched granular sludge. *Process Biochem* 2016;51:1274–82.
- Zhang L., P. Zheng, C. Tang, R. Jin, Anaerobic ammonium oxidation for treatment of ammonium-rich wastewaters, *J. Zhejiang Univ. Sci.* 9 (2008) 416–426.
- Zhang Z.J., S.H. Chen, P. Wu, L.F. Lin, H.Y. Luo, Start-up of the canon process from activated sludge under salt stress in a sequencing batch biofilm reactor (SBBR), *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 6309–6314.
- Zhang, L., Yang, J., Fujii, T., Zhang, W., Furukawa, K., 2011.High-rate nitrogen removal fromanaerobic digester liquor using an up-flow anammox reactor with polyethylene sponge as a biomass carrier.*Journal of bioscience and bioengineering* 111(3), 306-311.
- Zhang, L., Zhang, C., Hu, C., Liu, H., Qu, J., 2015. Denitrification of groundwater using asulfur-oxidizing autrophic denitrifying anaerobic fluidized-bed MBR: performance and bacterialcommunity structure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2815-2827.
- Zhao, Y., Huang, J., Zhao, H., Yang, H., 2013. Microbial community and N removal of aerobic granular sludge at high COD and N loading rates. *Bioresour. Technol.* 143, 439–446.
- Zhao Y.Y., H.D. Park, J.H. Park, F.S. Zhang, C. Chen, X.K. Li, D. Zhao, F.B. Zhao, Effect of different salinity adaptation on the performance and microbial community in a sequencing batch reactor, *Bioresour. Technol.* 216 (2016) 808–816.
- Zumft WG. The denitrifying prokaryotes. In: Balows A, Truper HG, Dworkin M, HarderW, Schleifer KH, Eds. *The prokaryotes A handbook on the biology of bacteria: ecophysiol isolation identification appli*, 2nd ed. New York, NY: Springer-Verlag 1992: 1, pp. 554-82.

---

**ANEXOS**



Anexo I: Publicaciones

---



## Publicación 1

---

**Título: Performance and bacterial community structure in three autotrophic submerged biofilters operated under different conditions**

**Autores: María J. García-Ruiz; Paula Maza-Márquez; Alejandro González-Martínez; Elena Campos; Jesús González-López; Francisco Osorio**

**Año: 2018**

**Revista: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology***

**Indicio de calidad: Indexada en JCR.**

**Índice de impacto en JCR: 3. 135**

**Posición: Q1, categoría "Engineering, Chemical".**

**DOI: [10.1002/jctb.5598](https://doi.org/10.1002/jctb.5598) (Publicado online).**

## Title: **Performance and bacterial community structure in three autotrophic submerged biofilters operated under different conditions**

Short Running title: *Effect of nitrite in autotrophic biofilters*

**María J. García-Ruiz<sup>1\*</sup>; Paula Maza-Márquez<sup>1</sup>; Alejandro González-Martínez<sup>2</sup>; Elena Campos<sup>3</sup>; Jesús González-López<sup>1</sup>; Francisco Osorio<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Water, University of Granada; Ramón y Cajal, 4, 18071, Granada, Spain

<sup>2</sup> Department of Built Environment, Aalto University; P.O. Box 11000, FI-00076, Aalto, Finland

<sup>3</sup> R&D Department, Valoriza Agua S.L.; Pº de la Castellana, 83-85, Madrid, Spain

\* Corresponding author: Email.- [mjgruiz@ugr.es](mailto:mjgruiz@ugr.es), Phone.- 34-958249463, Fax.- 34-958246138

### **Acknowledgements**

We are grateful to the Centre for the Development of Industrial Technology (CDTI, Ministry of Economy and Competitiveness, Spain), and the European Economic Area for funding by the Program in Science, Technology and Environmental and Climate Change (EEA Grants) (Ref.: IDI 20140117).

### **Abstract**

**BACKGROUND:** Autotrophic nitrogen removal was evaluated in three bench-scale bioreactors filled with Filtralite. This configuration is an alternative to the conventional technologies for nitrogen removal. One of the main problems associated with these new technologies, based on anammox (anaerobic ammonium oxidation) processes, is the stability of biomass. In this research the bioreactors performance and the stability of bacterial community were studied under the following conditions: dissolved oxygen (0.3-1.5 mg O<sub>2</sub>/L), influent N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration 246 mg/L, and different NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N concentrations (106.5, 30 and 0 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N/L).

**RESULTS:** Total nitrogen removal efficiencies were 80.78% and 92.00% for bioreactors operated under microaerobic conditions (less than 1.5 mg O<sub>2</sub>/L) and 30 and 0 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N /L respectively. Bioreactors attained maximum efficiency after about 80 days. In contrast, the total nitrogen removal efficiency was only 69.57% for the bioreactor operated under anoxic conditions and 106.5 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N/L, but maximum efficiency was achieved after approximately 30 days. The presence of oxygen increased the relative abundance of AOB, which reached 6% in bioreactors with a low dissolved oxygen concentration. The relative abundance of *Candidatus Brocadia* remained stable in all bioreactors.

**CONCLUSIONS:** The results showed that nitrite and anoxic conditions led to a quicker start-up of a single reactor process during the initial days of operation. The combination of quantitative real-time PCR (qPCR) and Illumina sequencing revealed that the operational conditions changed the bacterial community structure. The relative abundance of *Candidatus Brocadia* remained stable in all bioreactors, whereas significant differences were detected for *Nitrosomonas*.

**Keywords:** Nitrogen removal; Biofilter technology; Anammox Biotechnology; Microbial ecology; Illumina sequencing; qPCR; Non-metric multidimensional scaling (NMDS)

## 1. Introduction

To date, most autotrophic nitrogen removal technologies consist of the combination of partial nitrification and Anaerobic Ammonium Oxidation, Anammox, for the elimination of nitrogen. Anammox bacteria have been identified in many natural environments (e.g. marine sediments) and engineered environments (e.g. wastewater treatment plants) [1,2]. In fact, the autotrophic, anaerobic ammonium oxidation carried out by anammox bacteria is the basis for promising nitrogen-removal technologies, such as partial nitrification/anammox, DEMON, OLAND, and CANON [3,4]. Given this context, it is hardly surprising that anammox bacteria have come to play an important role in both natural and engineered systems. More specifically, one-step autotrophic nitrogen removal systems are of particular interest because in such processes, partial nitrification and anammox reaction occur inside the same bioreactor.

Of the anammox technologies that remove nitrogen in a single bioreactor, the Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite (CANON) is one of the most relevant. CANON autotrophically removes nitrogen through partial nitrification and anammox reaction. Such technologies are worth studying because nitrogen removal occurs in a single bioreactor [5], where both reactions take place at the same time. This is achieved as a result of the coexistence of ammonium-oxidizing bacteria (AOB) and anammox bacteria. Both bacteria coexist in an environment where there is very little oxygen [6]. The bacteria that oxidize the nitrite are controlled by the fact that the AOB compete for oxygen and the anammox bacteria compete for nitrite [7]. A more in-depth understanding of the microbial community implicated in N removal is essential to enhance the design, control and operation maintenance system [8,9,10].

One of the main problems in anammox technologies, and specifically in one-step processes, is the difficulty in maintaining the process control parameters (pH, oxygen concentration, balance of nitrogen compounds, etc.) within the ranges required [11]. The fixed-bed system is a more robust and stable solution, and thus easier to control than other technologies based on suspension culture systems, moving bed, or granular biomass [12,13]. This study evaluated fixed-bed biofiltration technology. In addition, the support material used in our research was Filtralite, a material that has proved its efficiency in other water treatment experiments [14,15,16,17,18,19] and more specifically in wastewater treatment.

The main objective of this research was to study the startup of a canon process in submerged biofilters. For this purpose, we operated three bioreactors under different conditions. More specifically, different dissolved oxygen and  $\text{NO}_2^-$ -N concentrations were applied in the bioreactors. This experiment focused on the following: (1) evaluation of the total N removal of



three bench-scale bioreactors during a 100-day period; (2) quantification of the total bacteria and AOB by means of qPCR; (3) identification of communities by Illumina-sequencing; (4) linking of the biological data to changes in the operating parameters by using multivariate analyses.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bench-scale plant and experimental setup

The experiment was conducted in three bench-scale bioreactors (BR), working in parallel and operating under different environmental conditions (Table 1). Each bioreactor consisted of a 2-L glass chamber, filled with support material. Fig. 1 shows a schematic diagram of the experimental plants.

First, each bioreactor was inoculated with an equivalent volume of inoculant (10% of the bioreactor volume), which was obtained from a full-scale anammox plant in Olburgen (Netherlands). With this percentage of inoculum, the system was operated in recirculation under different operational conditions (Table 1) for one week, when a mature biofilm appeared on the surface of the carriers. This was confirmed by optical and electronic microscopy. From that moment, the bioreactors operated continuously, feeding from an inlet tank containing synthetic water, this influent contained (in g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1.17),  $\text{NaHCO}_3$  (3.25),  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.3),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.07),  $\text{MgSO}_4$  (0.02), and trace elements ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (composition based on Mosquera-Corral et al. (2005) and González-Martínez et al. (2013) [20,21]). In regard to aeration, the first of the three bioreactors (BR1) operated continuously under anoxic conditions ( $\text{DO} < 0.3 \text{ mg O}_2/\text{L}$ ), while the other two bioreactors (BR2 and BR3) operated under microaerobic conditions,  $\text{DO} = 1.0\text{-}1.5 \text{ mg O}_2/\text{L}$ , values shown to be optimal for the CANON process [22].

One differentiating parameter in experimental settings was the nitrite concentration added to the influent. In the case of BR1, operating under anoxic conditions, nitrite was added to the influent in sufficient concentration ( $106.5 \text{ mg NO}_2^- \text{-N/L}$ ) to facilitate the start-up of the anammox process. In BR2,  $30 \text{ mg NO}_2^- \text{-N/L}$  of nitrite was also added, which was substantially less than in the case of BR1, based on Liang et al. (2015) [23]. Finally, nitrite was not added to BR3. This made it possible to compare the performance and microbial diversity of BR1 and BR2 (with nitrite) with that of BR3 (without nitrite).

In all of the experiments, the temperature was maintained at  $35^\circ\text{C}$ , which was within the optimal range for autotrophic nitrogen removal systems [11]. To ensure a constant temperature, the bioreactors were installed inside a thermostated chamber (Fig.1).

The hydraulic retention time was 12 hours for all bioreactors, based on previous experiments in which a similar influent was used González-Martínez et al. (2013) [21]. In addition, the pH, which was continuously monitored in the bioreactors, was always within the range of 7-8, a good value for the operation of the microbial populations [11].

In all of the bioreactors, Filtralite was the material used for the support of the biofilm. Filtralite is a granular material of clayey nature, which has a high level of porosity, 46%, and a large specific surface area, 1430 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> (See Table S1 for a detailed list of its characteristics.)

## **2.2. Determination of ammonium, nitrite, and nitrate concentrations**

Nitrite, nitrate, and ammonium levels were calculated daily as described in González-Martínez et al. (2013) [21]. Ammonium concentrations were measured with the cation column of the Metrosep C2-150, whereas nitrite and nitrate concentrations were measured with the anion column of the MetrosepAsupp-4-250. To calibrate the measurements, it was necessary to test different patterns. In this research, the following concentrations were used: 10, 200, and 500 mg/L.

## **2.3. Microbiological studies**

### **2.3.1. Samples collection**

After 95 days when the three bioreactors were found to operate under stable conditions, biological sampling was performed. To assess the quantitative changes of AOB and total bacteria, as well as the diversity of the total bacteria by Illumina-sequencing, samples of inoculum and samples from all bioreactors (BR1, BR2 and BR3) were collected. For DNA extraction, carrier samples were taken at depths of 20, 40, 60, and 80 cm in each bioreactor and submerged in a saline solution (0.9% NaCl). The contents were vortexed in order to detach the fixed biofilm. The saline solution containing the detached biofilm was then centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes at room temperature to precipitate the biomass into a pellet. The saline solution supernatant was then discarded and the pelleted biomass was stored at -20 °C until further DNA extraction.

### **2.3.2. SEM**

The morphological characteristics of the biofilm formed on the carriers in each bioreactor were observed with a SEM Zeiss DMS SEM (Leo Electron Microscopy, Oberkochen, Germany) operating at 10 kV. For this purpose, various Filtralite granules were

taken at depths of 20, 40, 60, and 80 cm in each bioreactor and fixed with glutaraldehyde in a paraformaldehyde solution, as described in Gong et al. (2007) [24].

### 2.3.3. Nucleic acids extraction and purification

The extraction and purification of the total genomic DNA of each sample was performed. For this purpose, a FastDNA-SPIN kit for Soil and FastPrep24 instrument (MP-Bio, Santa Ana, CA, USA) were used Maza et al. (2016) [25]. DNA concentration and quality were spectrophotometrically determined at 260 nm of absorbance. Absorbance ratios (260/280 nm) were calculated with a NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). To obtain a representation of the total community, the nucleic acids extracted from each bioreactor (four samples taken at depths of 20, 40, 60, and 80 cm) were mixed with an equal volume for further analysis.

### 2.3.4. qPCR assays

Absolute quantification of activated sludge samples were calculated by constructing standard curves with serial dilutions of linearized plasmids (10<sup>-1</sup>-10<sup>-8</sup>) harbouring PCR-amplified insert of the targeted genes (AOB and total bacteria). 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) [26]:

$$\text{no. of copies per microliter} = \left( n \times 6.02 \times 10^{23} \right) / \left( l \times 1.0 \times 10^9 \times 650 \right),$$

Where  $n$  the mass of template used (in nanograms) and  $l$  is the length of the template (in basepairs) [27]. The number of copies of activated sludge samples in bioreactors were calculated taking into account the standard curves of the plasmids.

The qPCR assays were conducted in an Mx3000P PCR System (Agilent Technologies). Table S2 shows the selected primers and cycling conditions for each qPCR reaction. Negative controls were included in all qPCR assays and all amplifications were performed in triplicate.

Each 25  $\mu$ l total volume of reaction mixture contained 2.5  $\mu$ l of 10 $\times$ True-Start Hot Start Taq Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 1.5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 0.0625  $\mu$ l of bovine serum albumin (BSA, 20 mg/ml; New England Biolabs, UK), 0.15  $\mu$ l of each primer (10  $\mu$ M, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.5  $\mu$ l of dNTPs (10 mM, MBL, Córdoba, Spain), 0.125  $\mu$ l SYBR green diluted in DMSO (20 $\times$ ) and 0.125  $\mu$ l of TrueStart Hot Start Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Absolute quantifications were obtained by constructing standard curves with serial tenfold dilutions ( $10^{-1}$ - $10^{-8}$ ) of plasmid DNA containing the target region, following the protocols in [25]. For all of the qPCR assays, the calibration curves showed a correlation coefficient of  $r^2 > 0.99$ . Amplification efficiencies for total bacteria and the *amoA* gene ranged from 90% to 100%. The quantitative ranges of the Ct values of the activated sludge samples were always included in the interval of the detection of Ct values of the standard curves. The quality of all qPCR amplification was confirmed by melting curve analysis and agarose gel electrophoresis. The number of copies of the targeted genes estimated by qPCR was shown per liter of activated sludge.

### 2.3.5. Analysis of diversity by Illumina-sequencing

Illumina-sequencing was done for the investigation of diversity and relative abundance of Total Bacteria. For this purpose, primer pair 530F (5'-CCGCNGCNGCTGGCAC-3) and 909R (5'-CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3) [28] was used to amplify the hypervariable V4 region of the 16S rRNA gene of Bacteria. RTL Genomics (Lubbock, Texas, USA, <http://www.researchandtesting.com>) proceeded with Illumina-sequencing using the Miseq apparatus (Illumina, Hayward, CA, USA).

An iTag sequencing process [29] was performed, using Illumina Miseq equipment and the Illumina MiSeq reagent v3 kit. The PCR amplification conditions for the high-throughput sequencing process started with a 3 min cycle at 95°C, and then proceeded with 32 cycles of 30 s at 94°C, 40 s at 60°C, and 60 s at 72°C. The amplification ended with an elongation step of 5 min at 72°C.

The biocomputing of Illumina data was performed with the software Mothur v.1.34.4 [30]. Firstly, the raw data was made into contigs, which successively passed several quality requirements: (1) sequences with more than one ambiguous base; (2) sequences of a greater length than the two primers; (3) sequences with more than 8 homopolymers; (4) sequences with significant alignment errors. A preclustering of the sequences was carried out to eliminate low-quality reads [31]. Finally, chimeric sequences were detected with UCHIME v4.2.40 implemented in Mothur v1.34.4 [32] and eliminated. The number of reads after this procedure was 15,000-21,568. To conduct an ecological analysis, all samples were rarefied to 15,000 reads for proper ecological comparison.

For each sample, a Phylip distance matrix was calculated using the rarefied 15,000 high-quality reads. The Phylip matrices were then individually clustered into OTUs at a 97% identity level to cluster the sequences into operational taxonomic units (OTUs). The OTUs within each sample were taxonomically identified using the SILVA database. Finally, a taxonomic consensus for all OTUs in each sample was carried out. The sequences were uploaded to the NCBI database under the accession numbers MG099723-MG099766.

PAST v.3.06 was used to calculate rarefaction curves as well as environmental diversity indexes Chao-1,  $H'$ , Simpson, and Pielou's evenness, with 95% confidence intervals. This was done with the bootstrap method for all samples [33]. Good's coverage index was also calculated as described in (Good 1953) [34]. Heatmaps representing the microbial community at the taxonomical levels of Phylum, Family Order, and Genus were constructed. Heatmaps were created, using the gplots and RColor Brewer packages for R v.3.2.0. The relative abundance of the OTU samples was used as weight for cluster analysis, and a dendrogram was subsequently generated with the UPGMA algorithm. The cluster analysis was based on the Bray Curtis similarity matrix and was conducted in PRIMER v.6.1.18 (PRIMER-E, Plymouth, UK).

#### **2.4. Statistical analysis**

IBM-SPSS Statistics v.20 (SPSS INC., IBM, USA) was selected for the analysis of variance (ANOVA) with a 95% significance level ( $p < 0.05$ ). The biotic data derived from Illumina were analyzed with PRIMER software v.6.1.18 (PRIMER-E, Plymouth, UK). Sample resemblance matrices, an ANOSIN analysis, and the non-metric multidimensional scaling (NMDS) of the biological data were calculated as previously described [25]. The stress level of the NMDS plots  $< 0.2$  showed a good fit for the representation of the variables in two-dimensional spaces, according to [35].

Multivariate statistical analysis was performed to determine the influence of the operational parameters and environmental variables on patterns in the dataset of the relative abundance of OTUs obtained from Illumina sequencing. The operational and environmental data (except pH) were transformed ( $\log(x+1)$ ) and normalized, whereas the biotic data set was standardized. The biotic and abiotic variables were represented in vector form, and were then overlaid on the NMDS plots. The direction and length of each vector illustrate the potential monotonic correlations between them. Finally, the Pearson product-moment correlation coefficients ( $r$ ) and BEST values were calculated. The Pearson correlations showed the strength of the linear association between biotic and abiotic variables. BEST calculated the abiotic

variable that best explained the ordination of the biotic data distribution. The global test of significance was assessed by a global permutation test (permutations=499) [25].

### 3. Results

#### 3.1. Bioreactors operation

Figure 2 shows the results of the effluent total nitrogen concentration obtained in the three bioreactors from the beginning of the experiments. The bioreactors were operated over a period of 100 days. The stabilization of the nitrogen removal efficiency was different for each bioreactor (Figure 2). Subsequently, the systems continued operating in a stable condition until the end of the study.

As can be observed in Table 1, during the stability period of the bioreactors operating under microaerobic conditions amended with nitrite (BR2) or unamended with nitrite (BR3), nitrogen removal capacity was very satisfactory. In fact, once stability was achieved, the total nitrogen removal efficiencies were 80.78% (BR2) and 92.00% (BR3) (average value for the last fifteen days), of the total nitrogen present in the influent. BR3 efficiency approximately corresponds to the maximum expected on the basis of the CANON process stoichiometry. However, the bioreactor under anoxic condition (BR1) evidently had a lower nitrogen removal capacity in comparison to the BR2 and BR3 bioreactors. Thus, the maximum attainable efficiency observed after bioreactor stabilization was approximately 69% (average value for the last fifteen days).

However, the maximum efficiency for each bioreactor was achieved after about 30 days in the case of the anoxic bioreactor and about 80 days in the case of microaerobic bioreactors. In this sense, in relation to  $\text{NO}_2^-$ -N, in BR1, the anoxic bioreactor, once the stable conditions are achieved, it is totally consumed, because we approximately added the amount needed on the basis of the anammox process stoichiometry. Thus, the start-up of this bioreactor is very satisfactory (see Figure 2), and this is due to the optimal conditions adopted in this bioreactor for the optimum proliferation of anammox bacteria population (anoxic conditions and presence of nitrites). In BR2 and BR3 bioreactors, the system produces itself the  $\text{NO}_2^-$ -N needed. The addition of nitrites under microaerobic conditions (BR2) does not improve significantly the efficiency of the system. Indeed, in BR2 a certain excess of nitrites and nitrates is observed in the effluent. This is due to the fact that if the system works under optimal aeration conditions for a canon technology, it is capable of producing the nitrite necessary for the process. The only thing that is achieved by adding nitrite is an excess of it observed in the effluent (3.75 mg  $\text{NO}_2^-$ -N/ L), and a certain transformation of it into nitrates (a nitrate excess is also observed in the effluent of BR2, 30.97 mg  $\text{NO}_3^-$ -N/ L - see Table 1) In BR3, the concentrations of nitrites and

nitrites in the effluent are those expected according to the stoichiometry of a canon system (Table 1). The start-up of BR3 is very similar to that of BR2 in terms of efficiency, at least the first days of the operation. In BR3 the nitrites generated in the system are assimilated in their entirety by the anammox reactions that occur in the bioreactor.

In short, according to these results, the maximum nitrogen removal is achieved for microaerobic conditions without addition of nitrite, but addition of nitrite and anoxic conditions for the first days of operation is recommended for a quicker start-up of the canon process.

## 3.2. Microbiological Analysis

### 3.2.1. Microscopic observation

Fig.S1 shows the SEM images of biofilm formation after the bioreactors had been operating for 90 days. The morphological characteristics indicate that steady state conditions were reached in all of the bioreactors in which a complete colonization and complex biofilm formation were detected. As it is well known, the formation of a complex biofilm is an important factor in the stability of the community. The SEM images showed a good colonization and stable biofilm structure.

### 3.2.2. Absolute and relative quantification of AOB

Fig. 3 displays the average number of copies of total bacterial 16S rRNA genes and the AOB *amoA* gene expressed per liter of activated sludge, as quantified by qPCR. The bioreactors were inoculated with  $1.29 \times 10^{11}$  copies/L of total bacteria and  $6.2 \times 10^8$  copies/L of AOB. Overall, the absolute abundance of total bacteria remained stable throughout the different aeration conditions (averages of  $3-9 \times 10^{11}$  copies/L) regardless of the operating conditions (Table S3). The analysis of variance (ANOVA) did not reveal significant differences ( $p > 0.05$ ) between different bioreactors. The average numbers of total bacteria detected were consistent with findings in studies of other systems such as the SHARON system, conventional activated sludge (CAS), membrane bioreactor (MBR), and sequencing biofilm batch bioreactors (SBBR) [35-39].

The AOB *amoA* gene copy number was on the order of  $10^{10}$  for bioreactors BR2 and BR3, and  $10^8$  for the BR1 bioreactor. The average number of AOB was in the range previously studied in the SHARON system [39]. Student's *t*-test showed significant differences between BR1 with the others bioreactors (BR2 and BR3) (Table S3). *amoA* abundance was significantly lower (two logarithmic units) in anoxic conditions. These results seem to indicate that the experimental conditions influenced the AOB community. The relative abundance of AOB was in the range of 0.04-6%. Bacterial *amoA* / bacterial 16S rRNA gene ratio was 0.04% during

anoxic conditions. However, this percentage increased to 6.25 % in one of the microaerated bioreactors (BR3).

### 3.2.3. Study of bacterial community by Illumina

A total of 90,000 normalized high-quality sequences were detected (15,000 sequences per sample). In order to obtain a similar sequencing depth [40], sequences in all samples were standardized to 15,000. A total of 69 operational taxonomic units (OTUs) were detected at a 97% sequence identity threshold (cut-off point of 3%), and the average number of OTUs was  $61.25 \pm 4.18$ . Clear differences between inoculum and bioreactors were detected. A total of 44 OTUs were detected in the inoculum. However, the number of OTUs was significantly higher in the bioreactors: 60, 69, and 55 OTUs (BR1, BR2 and BR3, respectively).

### 3.2.4. Rarefaction, coverage analysis, and diversity indices

The rarefaction curves (Fig. S2) and Good's coverage values (>99%) (Table S4) indicate that the depth of sequencing applied accurately described the diversity of the bacterial community. The Chao-1 and Shannon-Wiener  $H'$  species richness indexes, and Simpson's index of the inoculum and bioreactors are shown in Table S4. At the inoculum stage, the Chao-1 diversity and richness indexes (44) and  $H'$  indexes (2.35) described a low species diversity, whereas the Simpson's index ( $0.821 \pm 0.01$ ) reflected the high functional organization of the community (Table S4).

Diversity and richness indexes showed similar values in the bioreactors. The Chao-1 values ( $61.25 \pm 1.76$ ) and  $H'$  indexes ( $1.86 \pm 0.09$ ) described a medium-low species diversity, while the Simpson's index ( $0.71 \pm 0.01$ ) evidenced the high functional organization of the community (Table S4).

### 3.2.5. Cluster analysis

Fig. S3 shows the Bray-Curtis similarity-based cluster analysis relating the relative abundance of the 69 OTUs. Cluster analysis detected a high stability of the population diversity in bioreactors BR2 and BR3 (similarity >70%). Moreover, phylogeny-based cluster analysis showed greater similarity between the all bioreactors (similarity > 60%) than with the inoculum. In this sense, the dendrogram showed that three bioreactors were characterized by a similarity of



over 60%, leaving the inoculum as an independent group. These results confirm those obtained with diversity indexes.

### 3.2.6. Bacterial diversity

Fig. 4 shows the heatmaps of the relative abundance of bacterial OTUs at the Family and Genus levels in the inoculum and different bioreactors. The heatmap at the Phylum/Orders level is depicted in Fig S4. Overall, the 69OTUs were classified in 11 different Phyla: *Acidobacteria* (1.35% average relative abundance), *Actinobacteria* (0.8%), *Armatimonadetes* (0.005%), *Bacteroidetes* (9.81%), *Chloroflexi* (12.27 %), *Deinococcus- Thermus* (0.097%), *Firmicutes* (0.71%), *Ignavibacteriae* (10.73%), *Planctomycetes* (44.93 %), *Proteobacteria* (19.21%) and *Verrucomicrobia* (0.011%).

The dominant Phyla were *Planctomycetes* (44.93%) and *Proteobacteria* (19.21%). However, they played different roles in different operational conditions. *Planctomycetes* was very stable in the bioreactors and inoculum. In fact, they were the dominant Phyla with a relative abundance of 38.12% in the inoculum; 49.26% in BR1; 47.26% in BR2; and 45.37% in BR 3. However, the following significant changes in the relative abundance of *Proteobacteria* Phyla were detected: 20.08% in the inoculum, 8.14% in BR1; 29.38% in BR2; and 38.22% in BR3. The relative abundance of *Proteobacteria* was similar in the inoculum and BR2. However, there was a marked decrease of approximately 66.7% in BR1 operated under anoxic conditions. In addition, when bioreactors that operated with microaerobic conditions were compared, the relative abundance of *Proteobacteria* was 30% higher in the bioreactor BR3 (operated without nitrite).

A total of 32 Families and 48 Genus were found in the entire data set (Fig 4). Differences in bacterial diversity were detected when the bioreactors and inoculum were compared. In the inoculum, the main Families were *Candidatus Brocadiaceae* (35.83%), *Saprospiraceae* (16.95%), *Anaerolineaceae* (10.19%), and *Nitrosomonadaceae* (6.8%). *Candidatus Brocadiaceae* was stable in the different bioreactors with a relative abundance of 48.6%, 46.5%, and 45.4% in BR1, BR2, and BR3, respectively. However, the relative abundance of *Anaerolineaceas* increased to 43.6% under anoxic conditions (BR1), and that of *Nitrosomonadaceae* also increased to 61.4% under microaerobic conditions (BR2 and BR3).

The SIMPER analysis (see Table 2) showed the contribution of each OTU to the dis(similarity) between inoculum and different BR conditions. The global similarity between the inoculum and the BRs was 66.7%. The analysis revealed that only 6 OTUs with relative abundances, ranging from 5 to 45, contributed a 90.1 % explanation to the global similarity

between the inoculum and the three BRs. In addition, OTU 5 (43.4% relative global abundance), phylogenetically related to *Candidatus Brocadia*, was always the dominant OTU, and its contribution to the global similarity of the bacterial community was >60%.

SIMPER also calculated which OTUs played a major role in the dissimilarity of the bacterial communities in the inoculum and BRs (Table S5). SIMPER showed that the inoculum was more similar to the anoxic bioreactor (BR1) than to the aerated bioreactors (BR2 and BR3) with dissimilarity percentages of 39.5% (BR1); 43% (BR2); and 51.7% (BR3). OTU 19, phylogenetically related to *Haliscomenobacter*, contributed to an explanation of the differences in bacterial diversity between the inoculum and microaerobic bioreactor operated with nitrite (BR2) (19.6%); and the inoculum and anoxic bioreactor (BR1) (21.5%). However, OTU 27, phylogenetically related to *Nitrosomonas*, contributed the most to explain the differences between the inoculum and microaerobic bioreactor (BR 3) (24.3%). The greatest dissimilarity (43.74%) was found between the anoxic bioreactor (BR1) and microaerobic bioreactors (BR2 and BR3), where OTU 27 played the most important role in the explanation of this dissimilarity (28.19% contribution). The SIMPER analysis showed that aerated bioreactors (BR2 and BR3) had the greatest resemblance with a similarity percentage of 74.2%, whereas OTU 27 contributed the most to explain the dissimilarity between them with a dissimilarity percentage of 30.81%.

3.2.7. Linking bacterial community structure and population dynamics with operational parameters and environmental variables (NMDS and BIO-ENV).

The plots in Fig. 5 display the NMDS ordinations of the different bioreactors and inoculum, based on the relative abundance of operational taxonomic unit derived from Illumina-sequencing. The distance between bioreactors and inoculum points reflects their relative similarity. The vectors in the plots illustrate the interaction between the ordination of the bioreactors and two groups of variables: (i) relative abundance of bacteria taxa of the prevalent OTUs, which displayed a high contribution as reflected in the SIMPER analysis (biotic variables, left column); (ii) changes in the operation parameters (abiotic variables, right column). The BIO-ENV procedure revealed that dissolved oxygen (DO) and  $\text{NO}_2^-$ -N influent were the variables that provided the best explanation for the shifts in the total bacterial populations analyzed by Illumina (65.7%).

The Pearson product-moment correlations coefficient (see Fig. 5) are shown in Table S6, and were rated as strong for absolute values of  $r \geq 0.50$  [41]. Overall, the BIO-ENV procedure demonstrated an alternation of the dominant bacterial taxa in relation to the changes in the operational conditions. The results showed that the relative abundance of OTUs 26, 27 and 28 related to *Nitrosomadales* and *Nitrosomonas* tended to increase in the bioreactors

operated under microaerobic conditions, pointed in the direction of BR2 and BR3 and were positively correlated with DO ( $r>0.8$ ). Moreover, multivariate analysis confirmed that relative abundance of OTUs 5 and 21 related to *Candidatus Brocadia* and *Ignavibacteriales* were positively correlated with total N removal efficiency ( $r>0.8$ ).

The results obtained show that different operational conditions can influence the efficiency of the system. DO was always positively correlated with total N removal efficiency and negatively correlated with  $\text{NO}_2^-$ -N concentration. In addition, changes of the  $\text{NO}_2^-$ -N concentration and DO influenced on the biology and performance of the bioreactors. In that context, it was observed that the relative abundance of *Nitrosomadales* and *Nitrosomonas* increased under microaerobic conditions and consequently, enhanced the total N removal.

#### 4. Discussion

There are many different technologies for nitrogen removal: SHARON/ANAMMOX, DEMON, CANON, and ANITA MOX [3,42-45]. They mainly differ in their operation (continuous or discontinuous) and in the presentation of biomass. For example, some of these systems work with flocculent sludge with biomass accumulation (DEMON), whereas others work with granular sludge (CANON) or with sludge as a biofilm moving bed (ANITA MOX). However, one of the main problems associated with these technologies is the stability of biomass [46].

The submerged fixed-bed biofilm bioreactor (SFBR) is an alternative to the traditional activated sludge or granular sludge systems [47]. Submerged fixed-film technology has many advantages, such as a long sludge retention time, prevention of wash-out of biomass, and better process stability in terms of withstanding shock loading or short-term disturbing effects [48]. Other advantages include simple control and minimal low-energy requirements, low-operating costs, and minimized odors and noise [49].

Also confirm the long-term stability of the autotrophic nitrogen-removal community. Furthermore, system startup (generally very slow in autotrophic technologies) was very satisfactory, reaching stability in less than two months of operation.

The inoculum volume used in our study was only 10% of the total bioreactor volume. This means that a one-stage system could be started up in a reasonable time with a reduced volume of inoculum. This favorably compares even with two-stage systems, which also require a low volume of inoculum for starting [50]. Bioreactors start with a single inoculum source of microorganisms that have the potential to respond differently to operational conditions (Table 1). In that context, quantifications of AOB populations, clustering analysis, and heatmaps

(Figs.3, S3, 4) revealed notable changes in the bacterial community structure indifferent operational conditions. Our study suggests that microbial communities in biofilters could adapt and change, depending on operational conditions. The time period between the inoculation and stabilization of the bioreactor in anoxic condition (about 30 days) was clearly shorter than that observed in microaerobic bioreactors, BR2 and BR3 (about 80 days). Finally, it should be highlighted that the use of a small inoculant volume (10% of the total volume) was sufficient for the startup of the bioreactors, independently of subsequent operational conditions. This fact could be extremely relevant for the possible application of this technology at an industrial scale.

In addition to the differences in bacterial community, differences in N removal were detected in bioreactors. When the bioreactors were operating with low dissolved oxygen concentration (1-1.5 mg/L), performance was greatly improved. More specifically, total N removal efficiency was high (80.78% in BR2 and 92.00% in BR3). These results suggest that low DO levels are not suitable for anammox populations. Dissolved oxygen has been reported to be a critical operational parameter in the stability of the anammox process [51]. Moreover, oxygen had an evident impact on the changes in  $\beta$ -*Proteobacteria* and members of the genus *Nitrosomonas* (Fig.4). Findings were homogeneous and consistent with AOB quantifications (Fig. 3). Our study suggest that AOB populations quantified by qPCR experienced an increase in *Nitrosomonas*. In this context, *Nitrosomonas* increased approximately 16 % in the bioreactor operated without nitrite and microaerobic condition (BR3) with respect to the bioreactor amended with nitrite and operated under microaerobic condition (BR2). Consequently, the AOB ratio increased to 6.25% (more than 2% in respect to the BR2). However, in BR1, *Nitrosomonas* decreased about 98.12% in comparison to the other bioreactors with a relative abundance of 25.13% (BR3) and 9.22% (BR2). In addition, quantification showed that under anoxic conditions (BR1), AOB populations decreased two orders of magnitude (Fig.3). Thus, the bacterial *amoA*/bacterial 16S rRNA gene ratio decreased to 0.04%.

Interestingly, the dynamics of anammox bacteria represented by *Candidatus Brocadia* did not change under different conditions . Anammox bacteria, which have been identified in many natural ecosystems, have the potential to contribute to the global fixed nitrogen loss [52,53]. Recent studies have shown that anammox bacteria *Candidatus Brocadia* have a versatile metabolism, capable of the anaerobic oxidation of ammonium. Furthermore, it can use different electron donors/acceptors (organic acids, iron and manganese) [54-56]. This versatility could provide a competitive advantage over other bacteria present in the system.

Otherwise, dissolved oxygen favored genus *Nitrosomonas* (Fig. 3,4) that coexist with anammox bacteria. *Nitrosomonas* sp are widely known  $\beta$ -*Proteobacteria* AOB and has been found to prevent oxygen for anammox bacteria, which would inhibit their metabolism [57].

The combination of Illumina-sequencing with quantitative real-time PCR (qPCR) permitted an in-depth identification of bacterial diversity and microbial populations as well as their dynamics over time (Fig. 3,4). The results demonstrated that the bacterial community was dominated by members of the *Planctomycetes* and Proteobacteria such as *Candidatus Brocadia* and *Nitrosomonas*. In general, the taxa identified in our study have been previously found in the CANON system, lab scale anammox, partial-nitritation bioreactors and biofilters, and wastewater systems [58-65]. In addition, anammox and nitrifying bacteria has been described previously in different substratum attachment such as granular [3,62,66], fixed bed reactor [67], biofilm reactor [66] or carriers [7]. However, most of the systems were operated in granular reactors due to allow different environmental condition and consequently, promoted the coexistence of different bacterial populations [68]. Interestingly, the finding in our study shows that submerged biofilter also can create different micro-environment where anammox bacteria and AOB coexist.

## 5. Conclusion

In this study, biofilter technology in a single reactor was applied to autotrophic nitrogen removal from wastewater. Microbial community structure was studied by Illumina-sequencing and quantitative real-time PCR.

The total nitrogen removal efficiencies were 80.78 and 92.00 % for bioreactors operating under microaerobic conditions, having added 30 and 0 mg  $\text{NO}_2^-$ -N/L in the influent, respectively. The total nitrogen removal in the anoxic bioreactor, with the addition of nitrite to the system, 106.5 mg  $\text{NO}_2^-$ -N/L, was 69.57%. However, the maximum efficiency for each bioreactor was achieved after about 30 days in the case of the anoxic bioreactor and about 80 days in the case of microaerobic bioreactors. Thus, according to the results, the maximum nitrogen removal is achieved for microaerobic conditions without addition of nitrite, but addition of nitrite and anoxic conditions for the first days of operation is recommended for a quicker start-up of the canon process. In the optimum conditions of the process,  $\text{NO}_2^-$  addition is not needed due to anammox and AOB enrichment inside the bioreactor under microaerobic conditions.

In that context, biofiltration system with Filtralite produced a perfectly structured biofilm, where AOB and anammox bacteria coexisted. The genus *Candidatus Brocadia* and *Nitrosomonas* bacteria were found to play an essential role in total nitrogen removal.

## References

- [1] Kotay SM, Mansell BL, Hogsett M, Pei H, Goel R. Anaerobic ammonia oxidation (ANAMMOX) for side-stream treatment of anaerobic digester filtrate process performance and microbiology. *Biotechnol Bioeng.* 2013; 110:1180-1192.
- [2] Ganesh S, Parris DJ, DeLong EF, Stewart FJ. Metagenomic analysis of size-fractionated picoplankton in a marine oxygen minimum zone. *Isme J.* 2014; 8: 187-211.
- [3] González-Martínez A, Osorio F, Morillo JA, Rodríguez-Sánchez A, González-López J, Abbas BA, van Loosdrecht MCM. Comparison of Bacterial Diversity in Full Scale Anammox Bioreactors Operated Under Different Conditions. *Biotechnol Prog.* 2015; 31:1464-1472.
- [4] González-Martínez A, Poyatos JM, Hontoria E, González-López J, Osorio F. Treatment of effluents polluted by nitrogen with new biological technologies based on autotrophic nitrification-denitrification processes. *Recent Pat Biotechnol.* 2011; 5: 74–84.
- [5] Third KA, Sliemers AO, Kuenen JG, Jetten. MSM The CANON system (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) under ammonium limitation: Interaction and competition between three groups of bacteria. *Syst Appl Microbiol.* 2001; 596:588–596.
- [6] Abbas G, Zheng P, Wang L, Li W, Shahzad K, Zhang H, Hashmi MZ, Zhang J, Zhang M (2014) Ammonia Nitrogen Removal by Single-stage Process: A Review, *J.Chem.Soc.Pak.* 36(4): 775-782.
- [7] Rodríguez-Sánchez A, Mikola A, Muñoz-Palazon B, Vahala R, González-Martínez A. Performance and bacterial community structure of a submerged biofilter subjected to high ammonium and high organic carbon concentrations. *Int Biodet Biodeg.* 2016; 115:224-233.
- [8] Wagner M, Loy A, Nogueira R, Purkhold U, Lee N Daims H. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2002; 81: 665-680.
- [9] Biswas K, Taylor MW, Turner SJ. Successional development of biofilms in moving bed biofilm reactor (MBBR) systems treating municipal wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014; 98: 1429-1440
- [10] Vanwonterghem I, Jensen PD, Ho DP, Batstone DJ, Tyson GW. Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. *Curr Opin Biotechnol.* 2014; 27: 55-64.

- [11] Strous M, Gerven EV, Zheng P, Kuenen JG, Jetten MSM. Ammonium removal from concentrate waste water streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations. *Water Res.* 1997; 31:1955-1962.
- [12] Dapena-Mora A, Van Hulle SWH, Campos JL, Mendez R, Vanrolleghem PA, Jetten M (2004) Enrichment of Anammox biomass from municipal activated sludge: experimental and modeling results. *J. Biotechnol.* 79:1421–1428.
- [13] Van Hulle SWH, Maertens J, Vanrolleghem PA (2008) Performance of a CANON and an Anammox biofilm system under different hydrodynamic conditions, OAI identifier: oai:CiteSeerX.psu:10.1.1.72.7114.
- [14] Heistad A, Paruch A, Vrale L, Adam K, Jenssen PD. A high-performance compact filter system treating domestic wastewater. *Ecol Eng.* 2006; 28(4): 374–379.
- [15] Jenssen PD, Adam K, Mæhlum T, Krogstad T, Hellström D, Brix H, Paruch AM, Jonsson L, Arias CA, Yli-Halla M, Vra°le L, Heistad A, Valve M. Filter beds in the Nordic Countries – on site treatment with high removal efficiency. In: *Seventh Specialised Conference on Small Water and Wastewater Systems*; 2006.
- [16] Osorio F, Torres JC, Hontoria E. Study of biological aerated filters for the treatment of effluents from the citrus industry. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2006; 41: 2683–2697.
- [17] Farabegoli G, Chiavola A, Rolle E. The biological aerated filter (BAF) as alternative treatment for domestic sewage. Optimization of plant performance. *J Hazard Mater.* 2009; 171:1126–1132.
- [18] Matamoros V, Arias C, Brix H, Bayona JM. Preliminary screening of small-scale domestic wastewater treatment systems for removal of pharmaceutical and personal care products. *Water Res.* 2009; 43:55–62.
- [19] Osorio F, Torres JC, Hontoria E. Media size optimization in BAFs treating citrus waste. *PI Civil Eng-Wat M.* 2010; 163:3, 133-138.
- [20] Mosquera-Corral A, González F, Campos JL, Méndez R. Partial nitrification in a Sharon reactor in the presence of salts and organic carbon compounds. *Process Biochem.* 2005; 40:3109–3118.

- [21] González-Martínez A, Calderón K, Albuquerque A, Hontoria E, González-López J, Guisado IM, Osorio F. Biological and technical study of a partial-SHARON reactor at laboratory scale: effect of hydraulic retention time. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2013; 36:173-184.
- [22] Hao X, Heijnen JJ, Van Loosdrecht MCM. Sensitivity analysis of a biofilm model describing a one-stage completely autotrophic nitrogen removal (CANON) process. *Biotechnol Bioeng.* 2002; 77(3):266-277.
- [23] Liang Y, Li D, Zhang X, Zeng H, Zhang J. Performance and influence factors of completely autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON) process in a biofilter packed with volcanic rocks. *Environ Technol.* 2015; 36(5-8): 946-952.
- [24] Gong Z, Yang F, Liu S, Bao H, Hu S, Furukawa K. Feasibility of a membrane-aerated biofilm reactor to achieve single-stage autotrophic nitrogen removal based on Anammox. *Chemosphere.* 2007; 69 (5): 776-784.
- [25] Maza-Marquez P, Vilchez-Vargas R, Boon N, Gonzalez-Lopez J, Martinez-Toledo MV, Rodelas B. The ratio of metabolically active versus total Mycolata populations triggers foaming in a membrane bioreactor. *Water Res.* 2016; 92: 208-217.
- [26] Jackson, G.A., Livingston, R.S., Riley, L.K., Livingston, B.A., Franklin, C.L., Development of a PCR assay for the detection of *Spironucleus muris*. *J. Am. Assoc. Lab. Animal Sci.* 2013 52 (2), 165e170.
- [27] Staroscik A. 2004. URI Genomics and Sequencing Center: calculator for determining the number of copies of a template.
- [28 ] García-Ruíz MJ., Maza-Márquez P., González-López J., Osorio F., 2018. Nitrogen removal capacity and bacterial community dynamics of a Canon biofilter system at different organic matter concentrations. *Chemosphere* 193:591-601.
- [29] Degnan PH, Ochman H. Illumina-based analysis of microbial community diversity. *Isme J.* 2012; 6:183-194.
- [30] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing Mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75 :(23)7537-7541.



- [31] Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch DM. Accuracy and quality of massively-parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biol.* 2007; 8: (7) R143.
- [32] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitive and speed of chimera detection. *Bioinformatics.* 2011; 27: 2194-2200.
- [33] Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron.* 2001; 4 (1) 9pp.
- [34] Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika.* 1953; 40 (3-4) 237-264.
- [35] Clarke KR, Warwick RM. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. *Plymouth Marine Laboratory Plymouth UK;* 2001.
- [36] Reboleiro-Rivas P, Martin-Pascual J, Juarez-Jimenez B, Poyatos JM, Vilchez-Vargas R, Vlaeminck SE, Rodelas B, Gonzalez-Lopez J. Nitrogen removal in a moving bed membrane bioreactor for municipal sewage treatment: Community differentiation in attached biofilm and suspended biomass. *Chemical Eng J.* 2015; 277: 209-218.
- [37] Xia S, Jia R, Feng F, Xie K, Li H, Jing D, Xu X. Effect of solids retention time on antibiotics removal performance and microbial communities in an A/O-MBR process. *Bioresour Technol.* 2012; 106:36-43.
- [38] Gómez-Silván C, Vilchez-Vargas R, Arevalo J, Gomez MA, Gonzalez Lopez J, Pieper DH, Rodelas B. Quantitative response of nitrifying communities to environmental variables in a full-scale membrane bioreactor. *Bioresour Technol.* 2014; 126-133.
- [39] Du WL, Huang Q, Miao L, Liu Y, Liu Z. Association of running manner with bacterial community dynamics in a partial short-term nitrifying bioreactor for treatment of piggery wastewater with high ammonia content. *AMB Express.* 2016; 6:76.
- [40] Zhang T, Shao MF, Ye L. 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J.* 2012; 6(6): 1137-1147.
- [41] J. Cohen, Statistical power analysis for the behavioral sciences, Second ed., Erlbaum, Hillsdale NJ, USA, 1988.
- [42] Van Dongen U, Jetten MSM, van Loosdrecht MCM. The SHARON®-Anammox® process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Sci Technol.* 2001; 44(1): 153-160.

- [43] Wett B. Development and implementation of a robust deammonification process. *Water Sci Technol.* 2007; 56:81–88.
- [44] Abma WR, Driessen W, Haarhuis R, van Loosdrecht MCM. Upgrading of sewage treatment plant by sustainable and cost-effective separate treatment of industrial wastewater. *Water Sci Technol.* 2010; 61:1715–1722.
- [45] Christensson M, Ekström S, Lemaire R, Vaillant E, Bundgaard E, Chauzy J, Stalhandske L, Hong Z, Ekemberg M. ANITA Mox—a biofarm solution for fast start-up of deammonifying MBBRs. *WEFTEC11 Los Angeles CA*; 2011.
- [46] Joss A, Salzgeber D, Eugster J, König R, Rottermann K, Burger S, Fabijan P, Leumann S, Mohn J, Siegrist H. Full-Scale Nitrogen Removal from Digester Liquid with Partial Nitrification and Anammox in One SBR. *Environ Sci Technol.* 2009; 43: 5301-5306.
- [47] Schlegel S, Koeser H. Wastewater treatment with submerged fixed bed biofilm reactor systems—design rules, operating experiences and ongoing developments. *Water Sci Technol.* 2007; 55: 83-89.
- [48] Sudarno U, Winter J, Gallert C. Effect of varying salinity, temperature, ammonia and nitrous acid concentrations on nitrification of saline wastewater in fixed-bed reactors. *Bioresour Technol.* 2011; 102:5665-5673.
- [49] Cortes-Lorenzo C, Rodriguez-Diaz M, Lopez-Lopez C, Sanchez-Peinado M, Rodelas B, Gonzalez-Lopez J. Effect of salinity on enzyme activities in a submerged fixed bed biofilm reactor for municipal sewage treatment. *Bioresour Technol.* 2012; 121: 312-319.
- [50] Jaroszyński LW, Oleszkiewicz JA. Autotrophic ammonium removal from reject water: Partial nitrification and anammox in one-reactor versus two-reactor systems. *Environ Technol.* 2011; 32 (3), 289-294.
- [51] Lotti T, Kleerebezem R, Hu Z, Kartal B, Jetten MSM, van Loosdrecht MCM. Simultaneous partial nitrification and anammox at low temperature with granular sludge. *Water Res.* 2014; 66: 111-121.
- [52] Hamersley MR, Lavik G, Wobken Det, Rattray JE, Lam P, Hopmans EC, Damseté JSS, Krüger S, Graco M, Gutiérrez D, Kuypers MMM. Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone. *Limnol Oceanogr.* 2007; 52 : 923–933.
- [53] Schmid MC, Risgaard-Petersen N, van de Vossenberg J, Kuypers MM, Lavik G, Petersen J, Hulth S, Thamdrup B, Canfield D, Dalsgaard T, Rysgaard S, Sejr MK, Strous M, den Camp

HJ, Jetten MS. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity. *Environ Microbiol.* 2007; 9:1476–1484.

[54] Güven D, Dapena A, Kartal B, Schmid M C, Maas B, van de Pas-Schoonen K, Sozen S, Mendez R, Op den Camp H J M, Jetten MSM, Strous M, Schmidt I. Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71:1066–1071.

[55] Strous M, Pelletier E, Mangenot S Rattei T, Lehner A, Taylor MW, Horn M, Daims H, Bartol-Mavel D, Wincker P, Barbe V, Fonknechten N, Vallenet D, Segurens B, Schenowitz-Truong C, Médigue C, Collingro A, Snel B, Dutilh BE, Op den Camp HJM, van der Drift C, Cirpus I, van de Pas-Schoonen KT, Harhangi HR, van Niftrik L, Schmid M, Keltjens J, van de Vossenberg J, Kartal B, Meier H, Frishman D, Huynen MA, Mewes HW, Weissenbach J, Jetten MSM, Wagner M, Le Paslier D. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature.* 2006; 440: 790–794.

[56] Kartal B, Rattray J, van Niftrik L A, van de Vossenberg J, Schmid M C, Webb R I, Schouten S, Fuerst J A, Damsté J S, Jetten M S. *Candidatus* “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol.* 2007; 30:39–49.

[57] Sliemers AO, Third KA, Abma W, Kuenen JG, Jetten MSM. CANON and Anammox in a gas-lift reactor. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 218:339-344.

[58] Bassin JP, Abbas B, Vilela CLS, Kleerebezem R, Muyzer G, Rosado AS, van Loosdrecht MC, Dezotti M. Tracking the dynamics of heterotrophs and nitrifiers in moving bed biofilm reactors operated at different COD/ N ratios. *Bioresour Technol.* 2015; 192: 131-141.

[59] Cerrone F, Poyatos JM, Molina-Muñoz M, Cortes Lorenzo C, Gonzalez Lopez J, Rodelas B. Prevalence of Nitrosomonas cluster 7 populations in the ammonia oxidizing community of a submerged membrane bioreactor treating urban wastewater under different operation conditions. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2013; 36: 901-910.

[60] González-Martínez A, Rodríguez-Sánchez A, Martínez-Toledo MV, García-Ruiz MJ, Hontoria E, Osorio-Robles F, Gonzalez-lopez J. Effect to ciprofloxacin antibiotic on the partial-nitrification process and bacterial community structure of a submerged biofilter. *Sci Total Environ.* 2014b; 476-477.

[61] González-Martínez A, Rodríguez-Sánchez A, García-Ruiz MJ, Muñoz-Palazon B, Cortes-Lorenzo C, Osorio F, Vahala R. Performance and bacterial community dynamics of a CANON

bioreactor acclimated from high to low operational temperatures. *Chemical Eng J.* 2016; 287: 557-567.

[62] Nielsen M, Bollmann A, Sliemers O, Jetten M, Schmid M, Strous M, Revsbech NP (2005) Kinetics, diffusional limitation and microscale distribution of chemistry and organisms in a CANON reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51:247–256.

[63] Rodríguez-Sánchez A, González-Martínez A, Martínez-Toledo MV, García-Ruiz MJ, Osorio F, González-López J. The Effect of Influent Characteristics and Operational Conditions over the Performance and Microbial Community Structure of Partial Nitrification Reactors. *Water.* 2014; 6: 1905-1924.

[64] Van der Star W R L, Abma W R, Blommers D, Mulder JW, Tokutomi T, Strous M, Picioreanu C, van Loosdrecht MCM. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Res.* 2007; 41 : (18) 4149–4163.

[65] Van der Star W R L, van de Graaf M J, Kartal B, Picioreanu C, Jetten M S M, van Loosdrecht M C M. Response of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria to hydroxylamine. *Appl Environ Microbiol.* 2008a; 74:4417–4426.

[66] Li X, Sun S, Badgley BD, Sung S, Zhang H, He Z (2016) Nitrogen removal by granular nitrification-anammox in an upflow membrane-aerated biofilm reactor. *Water Res* 94: 23-31.

[67] Toh SK, Webb RI, Ashbolt NJ (2002) Enrichment of Autotrophic Anaerobic Ammonium-Oxidizing Consortia from Various Wastewaters. *Microb Ecol* 43: 154-167

[68] Langone M, Yan J, Haaijer SC, Op den camp HJM, Jetten MSM, Andreottola G (2014) Coexistence of nitrifying anammox and denitrifying bacteria in a sequencing batch reactor. *Frontiers in Microbiology* 5:28.

## Figure Captions

**Fig.1.** Scheme of the pilot plant constructed at bench-scale used in the study.

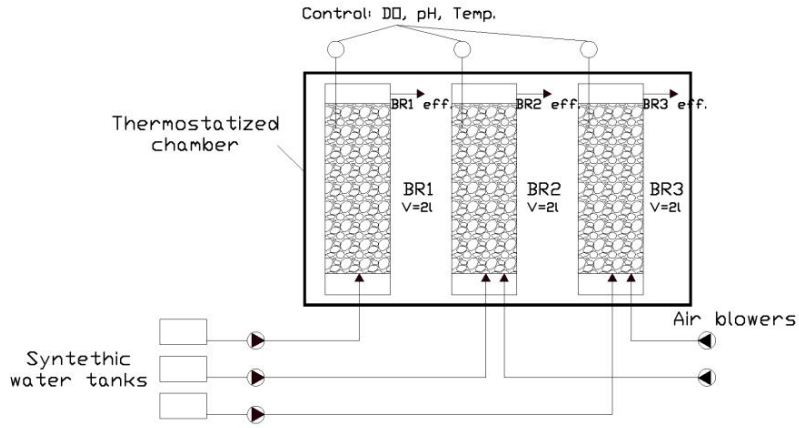
**Fig.2.** Effluent total nitrogen in the submerged biofilters: BR1. Anoxic conditions and amended with nitrite. BR2. Microaerobic conditions and amended with nitrite. BR3. Microaerobic conditions and unamended with nitrite

**Fig.3.** Numbers of copies of bacterial 16S rRNA and AOB *amoA* (in logarithmic scale), per liter of activated sludge, quantified by qPCR in the inoculum and BRs: anoxic bioreactor amended with nitrite (BR1), bioreactor with nitrite and microaerobic conditions (BR2) and bioreactor without nitrite and microaerobic conditions (BR3). Dotted line represents AOB *amoA*/ bacterial 16S rRNA gene ratio of AOB.

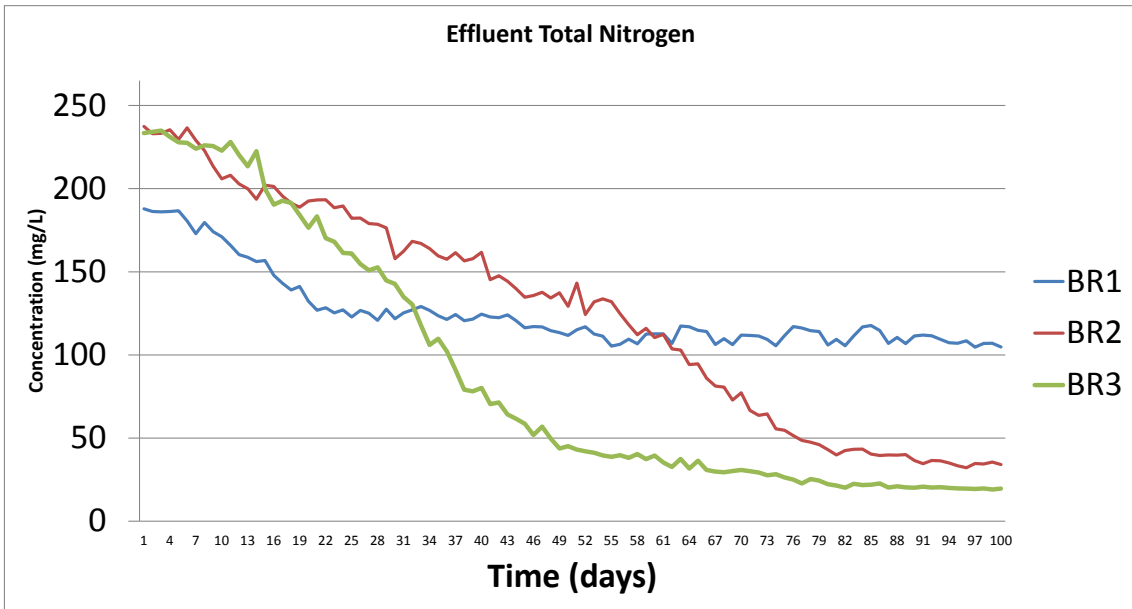
**Fig.4.** Heatmaps showing the relative abundances of bacterial taxa detected by Illumina-sequencing in inoculum and bioreactors operated under different conditions: anoxic bioreactor amended with nitrite (BR1), bioreactor with nitrite and microaerobic conditions (BR2) and bioreactor without nitrite and microaerobic conditions (BR3). **A.** Classification of bacterial OTUs at Family. **B.** Classification of bacterial OTUs at Genus level.

**Fig.5.** Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plots, illustrating the ordinations of the samples retrieved from the inoculum and bioreactors, according to the relative similarity of their bacterial communities analyzed by Illumina-sequencing. In the left column plots, the vectors represent the direction throughout the ordination of the relative abundances of the operational taxonomic units. In the right column plots, the vectors represent the strength and directional influence throughout the ordination of abiotic variables:  $\text{NO}_2^-$ -N influent, dissolved oxygen (DO),  $\text{NH}_4^+$ -N effluent,  $\text{NO}_2^-$ -N effluent,  $\text{NO}_3^-$ -N effluent and Total N efficiency (%). The abiotic variables which best explained the distributions of the biotic data according to BIO-ENV analysis are marked with an asterisk (\*).

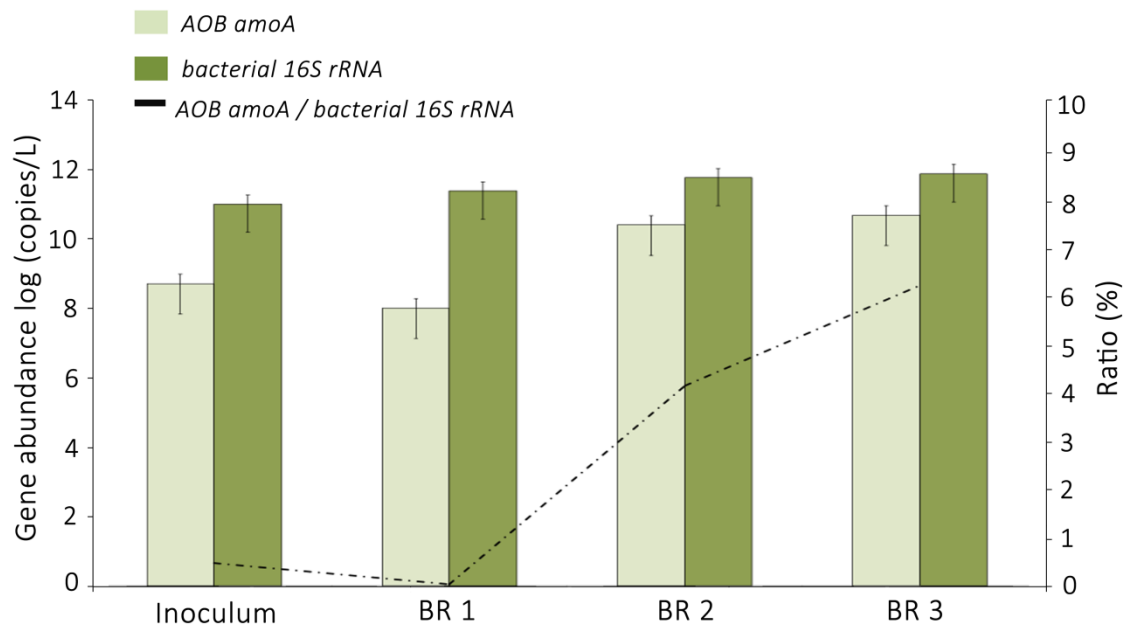
**FIGURES**



(FIGURE 1)



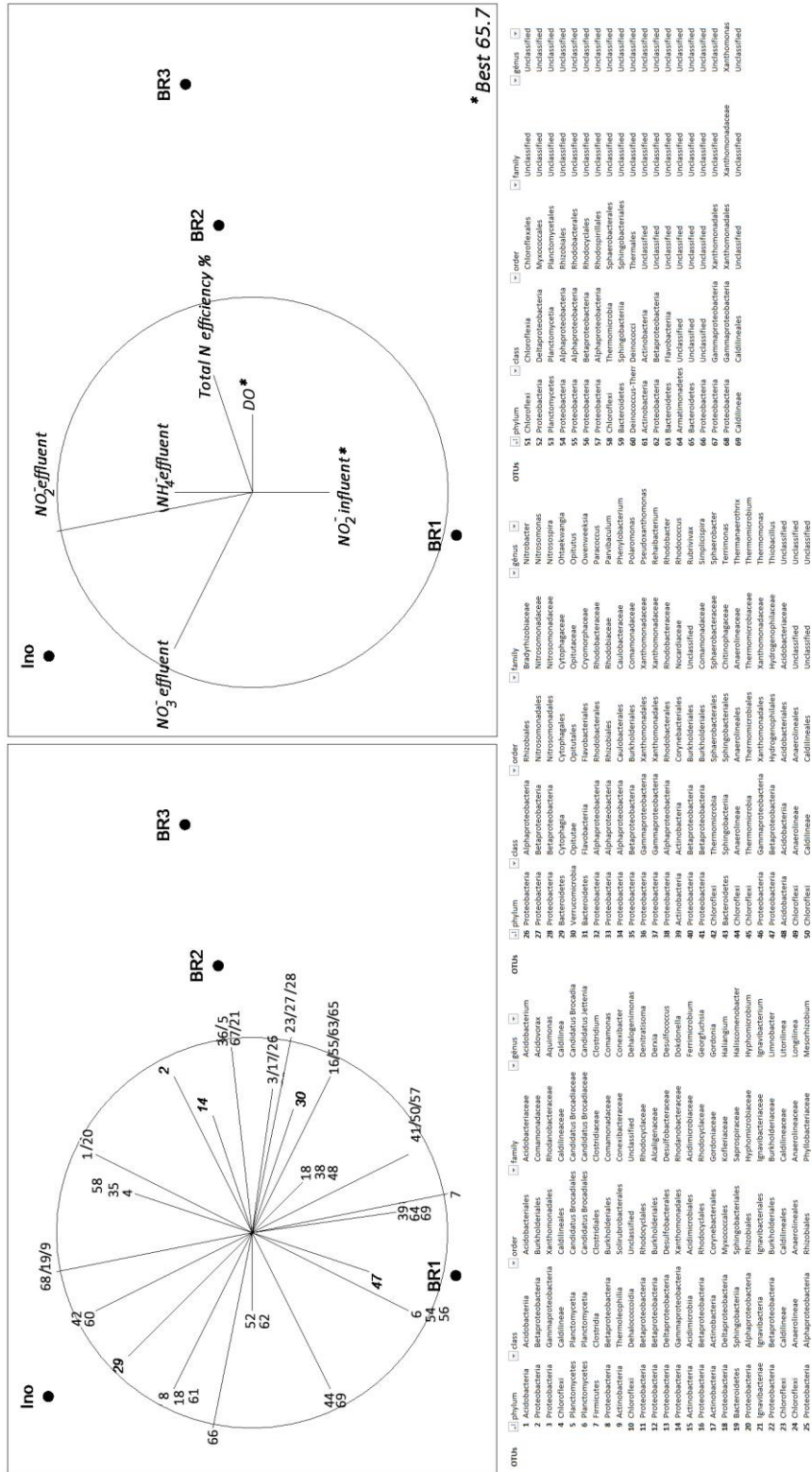
(FIGURE 2)



(FIGURE 3)







(FIGURE 5)

**TABLES**

**Table 1. Operational conditions and summary of results:** BR1. Anoxic conditions and amended with nitrite. BR2. Microaerobic conditions and amended with nitrite. BR3. Microaerobic conditions and unamended with nitrite.

Bioreactor	BR1	BR2	BR3
Influent NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	246	246	246
Influent NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	106.5	30	0
DO (mg/L)	<0.3	1-1.5	1-1.5
HRT (h)	12	12	12
Temperature (°C)	35	35	35
pH (unit pH)	7-8	7-8	7-8
Effluent NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	87.19± 4.54	2.08 ± 0.68	1.76 ± 1.07
Effluent NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	1.07± 0.12	3.75± 2.48	0.56 ± 0.17
Effluent NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	21.37± 0.86	30.97± 0.80	18.03± 0.35
Effluent Total N (mg/L)	109.64± 3.92	36.81± 3.07	20.37± 0.97
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N removal efficiency (%)	65.33 ± 1.97	99.17± 0.27	99.29± 0.42
Total N removal efficiency (%)	69.57 ± 1.14	80.78± 1.05	92.00± 0.36

**Table 2. Operational taxonomic units (OTUs) which mostly contribute to the global similarity of the bacterial communities in the inoculum and BRs:** BR1. Anoxic conditions and amended with nitrite. BR2. Microaerobic conditions and amended with nitrite. BR3. Microaerobic conditions and unamended with nitrite, according to SIMPER analysis.

Average similarity among inoculum and BRs: 66.7%

OTUs	Taxonomic affiliation	Average relative abundance	Average similarity among samples	Contribution
OTU05	<i>CandidatusBrocadiales</i>	43.4%	41.09%	61.61%
OTU21	<i>Ignavibacterium</i>	9.7%	6.42%	9.63%
OTU44	<i>Thermanerothrix</i>	8.03%	3.75%	5.62%
OTU14	<i>Dokdonella</i>	5.56%	3.17%	4.76%
OTU28	<i>Nitrosospira</i>	4.10%	2.94%	4.42%
OTU27	<i>Nitrosomonas</i>	8.71%	2.71%	4.06%

**Supplementary material for:**

**Title: Performance and bacterial community structure in three autotrophic submerged biofilters operated under different operational conditions.**

**María J. García-Ruiz<sup>1\*</sup>; Paula Maza-Márquez<sup>1</sup>; Alejandro González-Martínez<sup>2</sup>; Elena Campos<sup>3</sup>; Jesús González-López<sup>1</sup>; Francisco Osorio<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Water, University of Granada; Ramón y Cajal Street, 4, 18071, Granada, Spain

<sup>2</sup> Department of Built Environment, Aalto University; P.O. Box 11000, FI-00076, Aalto, Finland

<sup>3</sup> R&D Department, Valoriza Agua S.L.; Pº de la Castellana, 83-85, Madrid, Spain

\* Corresponding author: Email.- [mjgruiz@ugr.es](mailto:mjgruiz@ugr.es), Phone.- 34-958249463, Fax.- 34-958246138

**I. Supplementary Tables S1-S6.**

**Table S1.** Characteristics of the support material used

<b>Filtralite HR 3-6mm</b>	
Density	825Kg/m <sup>3</sup>
Effective diameter	3.5mm
Uniform coefficient	<1.5
Porosity	46%
Voids Index	43%

**Table S2. (A)** Primer used for quantification of total bacteria and nitrifiers by qPCR. **(B)** qPCR conditions for quantification of total bacteria and Ammonia oxidizing  $\beta$ -proteobacteria (AOB).

**A.**

Group	Gene marker	Primers		References
		Name	Sequence (5'-3')	
Bacteria	V3-	P1 (341F)	CCTACGGGAGGCAGC AG	<a href="#">(Muyzer et al.1993)</a>
	16S rRNA	P2 (534R)	ATTACCGCGGCTGCT GG	
Ammonia oxidizing bacteria (AOB)	<i>amoA</i>	AmoA1F	GGGGTTTCTACTGGT GGT	(Rotthauwe et al. 1997)
		AmoA1R	CCCCTCKGSAAAGCC	

TTCTTC

**B.**

	Total Bacteria	Ammonia oxidizing $\beta$ - proteobacteria (AOB)
Initial denaturalization	95°C	95°C
	3 minutes	7 minutes
Denaturalization	95°C	95°C
	30 seconds	30 seconds
Primers annealing	60°C	52°C
	40 seconds	30 seconds
Elongation	72°C	72°C
	30 seconds	30 seconds
Melting curve	60°C-95°C + 2°C/min Fluorescence measured each 15 seconds	
Hold	25°C	

**Table S3** Number of copies of total bacterial 16S rRNA and AOB quantified in the inoculum and BRs. Relative abundance of AOB, expressed as percentage of total Bacteria. Data followed by the same lower-case letter do not significantly differ according to the Student's test ( $p < 0.05$ ).

	AOB amoA	Bacterial 16S rRNA	Ratio (%)
Inoculum	$6.2 \times 10^8 \pm 2.3 \times 10^7$ (a)	$1.29 \times 10^{11} \pm 3.3 \times 10^8$ (a)	0.48 (b)
BR1	$1.2 \times 10^8 \pm 3.5 \times 10^8$ (a)	$3.12 \times 10^{11} \pm 3.9 \times 10^9$ (a)	0.04 (a)
BR2	$3.2 \times 10^{10} \pm 2.1 \times 10^9$ (b)	$7.61 \times 10^{11} \pm 3.4 \times 10^9$ (a)	4.18(c)
BR3	$6.18 \times 10^{10} \pm 3.4 \times 10^9$ (b)	$9.88 \times 10^{11} \pm 2.6 \times 10^9$ (a)	6.25 (c)

**Table S4.** Number of reads, richness (S), Good's coverage, and diversity indices Chao-1, Shannon-Wiener ( $H'$ ) and Simpson evenness, calculated from the Illumina sequencing data of the total community in the inoculum and bioreactors. CI: confidence intervals at 95% ( $p < 0.05$ ).

	<b>No. reads (normalized)</b>	<b>Richness (S)</b>	<b>Good's coverage)</b>	<b>Chao- 1</b>	<b>CI 95%</b>
Inoculum	15000	43	99,70	44	43-46
BR1	15000	60	99,59	60	60-78
BR2	15000	68	99,61	68	67-84
BR3	15000	55	99,79	55	54-71

	<b>Shannon- Wiener <math>H'</math></b>	<b>CI 95%</b>	<b>Simpson</b>	<b>CI 95%</b>
Inoculum	2,354	2.32-2.36	0,8213	0.82-0.83
BR1	1,777	1.74-1.78	0,7205	0.72-0.73
BR2	2,055	2.013-2.062	0,7463	0.74-0.75
BR3	1,733	1,699-1,741	0,7147	0,71-0,72

**Table S5.** Operational taxonomic units (OTUs) which mostly contribute to the dissimilarity of the bacterial communities between the different conditions of inoculum and BRs: anoxic bioreactor (BR 1), aerated bioreactor operated with nitrite (BR 2) and aerated bioreactor operated without nitrite (BR 3).

<b>Average dissimilarity among groups</b>	<b>OTUs</b>	<b>Average dissimilarity</b>	<b>Contribution %</b>	<b>Cumulative %</b>
BR2 x Inoculum (43%)	19	8,42	19,59	19,59
	5	5,34	12,42	32,01
	27	4,6	10,7	42,71
	21	4,04	9,39	52,1
	44	3,15	7,33	59,43
	14	3,05	7,09	66,51
	48	1,86	4,32	70,84
	28	1,51	3,51	74,34

	68	1,43	3,34	77,68
	29	1,43	3,33	81,01
	38	0,78	1,82	82,83
	42	0,76	1,77	84,6
	59	0,75	1,75	86,35
	3	0,74	1,71	88,06
	61	0,67	1,57	89,63
	40	0,65	1,52	91,15
BR2 x BR 1 (29.44%)	44	7,04	23,91	23,91
	14	4,64	15,76	39,66
	27	4,37	14,85	54,52
	21	2,84	9,66	64,17
	48	1,86	6,31	70,48
	59	1,37	4,67	75,15
	6	1,31	4,46	79,61
	7	0,91	3,08	82,69
	3	0,74	2,5	85,19
	47	0,45	1,51	86,7
	62	0,33	1,13	87,84
	65	0,28	0,97	88,8
	28	0,27	0,91	89,71
	5	0,24	0,82	90,53
Inoculum x BR1 (39.5%)	19	8,48	21,46	21,46
	21	6,88	17,42	38,89
	5	5,1	12,91	51,79
	44	3,89	9,84	61,64
	14	1,59	4,03	65,67

	68	1,47	3,72	69,39
	29	1,46	3,7	73,08
	6	1,32	3,34	76,42
	28	1,24	3,14	79,56
	7	0,97	2,46	82,02
	40	0,79	1,99	84,01
	38	0,77	1,94	85,95
	42	0,72	1,82	87,77
	61	0,68	1,73	89,5
	59	0,62	1,57	91,07
BR2 x BR3 (25.83%)	27	7,96	30,81	30,81
	1	2,6	10,08	40,89
	21	2,59	10,04	50,93
	44	1,92	7,42	58,35
	48	1,86	7,19	65,54
	28	1,11	4,28	69,83
	47	0,8	3,08	72,91
	3	0,69	2,65	75,56
	5	0,56	2,18	77,74
	24	0,52	2,01	79,76
	62	0,48	1,85	81,61
	65	0,41	1,6	83,2
	4	0,37	1,44	84,64
	35	0,31	1,19	85,84
	14	0,29	1,12	86,96
	53	0,26	1,01	87,97
	40	0,22	0,86	88,83

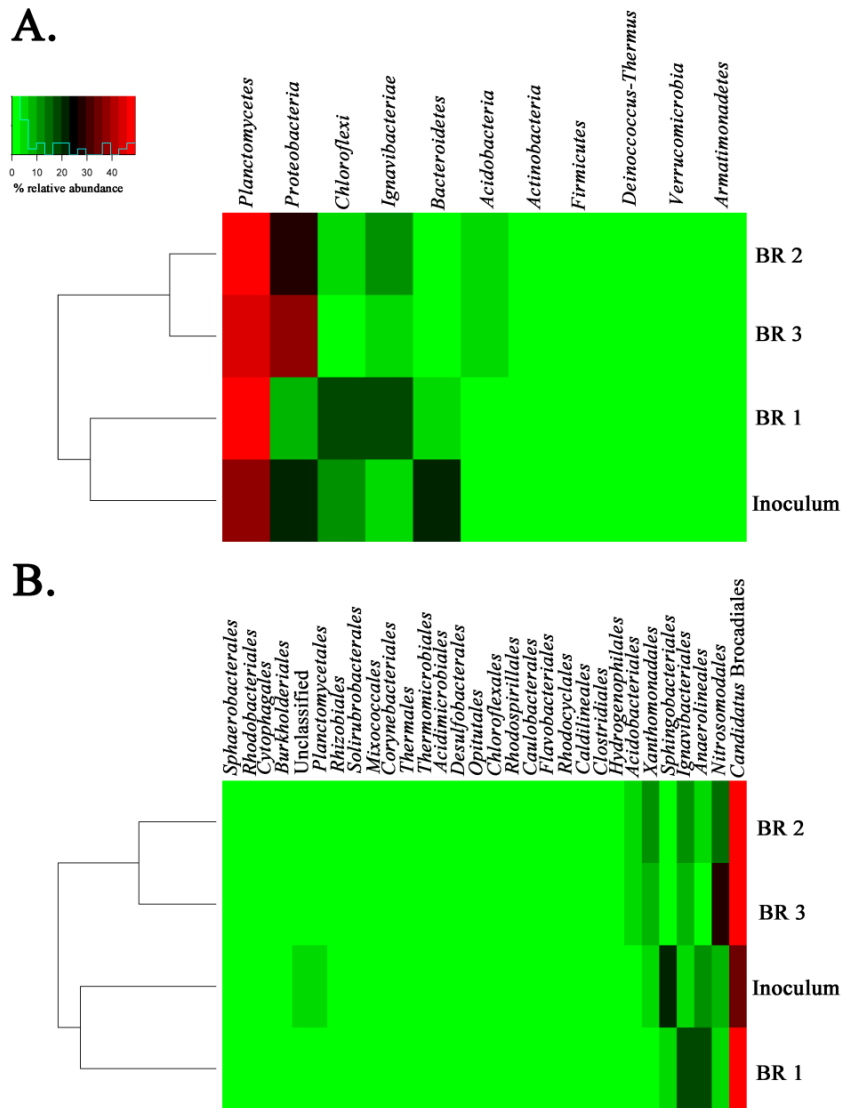
	19	0,22	0,85	89,69
	42	0,19	0,74	90,43
Inoculum x BR3 (51.7 %)	27	12,56	24,3	24,3
	19	8,2	15,86	40,16
	44	5,07	9,8	49,96
	5	4,78	9,24	59,2
	14	2,76	5,33	64,53
	28	2,61	5,06	69,59
	1	2,53	4,89	74,48
	29	1,46	2,82	77,3
	21	1,45	2,8	80,1
	68	1,43	2,77	82,86
	59	0,89	1,72	84,58
	40	0,88	1,7	86,28
	38	0,78	1,5	87,78
	61	0,69	1,33	89,11
	42	0,57	1,1	90,21
BR1 x BR3 (43.74 %)	27	12,33	28,19	28,19
	44	8,95	20,47	48,67
	21	5,44	12,43	61,09
	14	4,35	9,95	71,04
	1	2,64	6,03	77,07
	59	1,51	3,45	80,52
	28	1,38	3,14	83,67
	6	1,33	3,03	86,7
	7	0,97	2,21	88,91
	24	0,52	1,2	90,11



**Table S6.** Pearson product-moment correlation coefficients(r) between the vectors in Fig. 5, which represent the relative abundances of the different operational taxonomic unit detected by Illumina-sequencing in the biotic samples (inoculum and bioreactors) and the abiotic variables: NO<sub>2</sub><sup>-</sup>N influent, dissolved oxygen (DO), NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N effluent, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>N effluent, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>N effluent and Total N efficiency (%)

OTUs	Total N efficiency (%)	DO(mg/L)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N effluent	NO <sub>2</sub> N effluent	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> N effluent	NO <sub>2</sub> N influent
1	0,707	0,447	0,894	0,789	0,000	-0,894
2	0,990	0,894	0,447	0,263	-0,600	-0,447
3	0,894	0,990	-0,141	-0,333	-0,949	0,141
4	0,600	0,316	0,949	0,868	0,141	-0,949
5	0,894	0,647	0,394	0,396	-0,800	0,325
6	-0,707	-0,447	-0,894	-0,789	0,000	0,894
7	-0,124	0,196	-0,98	-1,00	-0,614	0,981
8	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
9	0,124	-0,196	0,981	1,000	0,614	-0,98
10	0,141	0,447	-0,894	-0,96	-0,800	0,894
11	0,141	0,447	-0,894	-0,96	-0,800	0,894
12	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
13	0,141	0,447	-0,894	-0,96	-0,800	0,894
14	1,000	0,949	0,316	0,124	-0,707	-0,316
15	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
16	0,707	0,894	-0,447	-0,614	-1,00	0,447
17	0,894	0,990	-0,141	-0,333	-0,949	0,141
18	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
19	0,124	-0,196	0,981	1,000	0,614	-0,98
20	0,707	0,447	0,894	0,789	0,000	-0,894
21	0,894	0,647	0,394	0,396	-0,800	0,325
22	0,707	0,894	-0,447	-0,614	-1,00	0,447
23	0,868	0,981	0,296	0,385	-0,796	0,196
24	0,868	0,981	-0,196	-0,385	-0,96	0,196
25	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
26	0,894	0,990	0,341	0,233	-0,649	0,141
27	0,868	0,981	0,296	0,385	-0,796	0,196
28	0,868	0,981	0,296	0,385	-0,796	0,196
29	-0,447	-0,707	0,707	0,832	0,949	-0,707
30	0,800	0,949	-0,316	-0,496	-0,99	0,316
31	0,141	0,447	-0,894	-0,96	-0,800	0,894
32	0,707	0,894	-0,447	-0,614	-1,00	0,447
33	0,707	0,894	-0,447	-0,614	-1,00	0,447
34	0,447	0,707	-0,707	-0,832	-0,949	0,707
35	0,600	0,316	0,949	0,868	0,141	-0,949
36	0,894	0,647	0,394	0,396	-0,800	0,325
37	0,868	0,981	-0,196	-0,385	-0,96	0,196
39	-0,179	0,141	-0,99	-1,00	-0,569	0,990

40	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
41	-0,124	0,196	-0,98	-1,00	-0,614	0,981
42	-0,141	-0,447	0,894	0,965	0,800	-0,894
43	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
44	-0,99	-0,894	-0,447	-0,263	0,600	0,447
45	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
46	0,141	0,447	-0,894	-0,96	-0,800	0,894
47	-0,600	-0,316	-0,949	-0,868	-0,141	0,949
48	0,447	0,707	-0,707	-0,832	-0,949	0,707
49	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
51	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
52	-0,949	-1,00	0,000	0,196	0,894	0,000
53	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
54	-0,707	-0,447	-0,894	-0,789	0,000	0,894
55	0,707	0,894	-0,447	-0,614	-1,00	0,447
56	-0,707	-0,447	-0,894	-0,789	0,000	0,894
57	-0,124	0,196	-0,98	-1,00	-0,614	0,981
58	0,600	0,316	0,949	0,868	0,141	-0,949
59	-0,99	-0,894	-0,447	-0,263	0,600	0,447
60	-0,141	-0,447	0,894	0,965	0,800	-0,894
61	-0,707	-0,894	0,447	0,614	1,000	-0,447
62	-0,949	-1,00	0,000	0,196	0,894	0,000
63	0,707	0,894	-0,447	-0,614	-1,00	0,447
64	-0,179	0,141	-0,99	-1,00	-0,569	0,990
65	-0,949	-1,00	0,000	0,196	0,894	0,000
66	-0,868	-0,98	0,196	0,385	0,965	-0,196
67	0,894	0,647	0,394	0,396	-0,800	0,325
69	-0,99	-0,894	-0,447	-0,263	0,600	0,447
68	0,124	-0,196	0,981	1,000	0,614	-0,98



**Figura.S1.** Heatmaps que muestra la abundancia relativa de OTUs bacterianas detectadas por secuenciación Illumina en inóculo y biorreactores operados bajo diferentes condiciones. BR1: biorreactor anóxico y con adición de nitritos; BR2: biorreactor microaeróbico y con adición de nitritos; BR3: biorreactor microaeróbico sin adición de nitritos. Clasificación a nivel de Phylum (A) y Orden (B).

## Publicación 2

---

**Título: Nitrogen removal capacity and bacterial community dynamics of a Canon biofilter system at different organic matter concentrations.**

**Autores: María J. García-Ruiz; Paula Maza-Márquez; Jesús González-López; Francisco Osorio**

**Año: 2018**

**Revista: *Chemosphere***

**Indicio de calidad: Indexada en JCR.**

**Índice de impacto en JCR: 4,208**

**Posición: Q1, categoría "Environmental Sciences".**

**DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.066>**

**Title: Nitrogen removal capacity and bacterial community dynamics of a Canon biofilter system at different organic matter concentrations**

**María J. García-Ruiz<sup>1\*</sup>; Paula Maza-Márquez<sup>1</sup>; Jesús González-López<sup>1</sup>; Francisco Osorio<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Water, University of Granada; Ramón y Cajal Street, 4, 18071, Granada, Spain

\* Corresponding author: Email.- mjgruiz@ugr.es, Phone.- 34-958249463

**Abstract**

Three Canon bench-scale bioreactors with a volume of 2 L operating in parallel were configured as submerged biofilters. In the present study we investigated the effects of a high ammonium concentration ( $320 \text{ mgNH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ ) and different concentrations of organic matter (0, 100 and 400  $\text{mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$ ) on the nitrogen removal capacity and the bacterial community structure. After 60 days, the Canon biofilters operated properly under concentrations of 0 and 100  $\text{mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$  of organic matter, with nitrogen removal efficiencies up to 85%. However, a higher concentration of organic matter (400  $\text{mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$ ) produced a partial inhibition of nitrogen removal (68.1% efficiency). The addition of higher concentrations of organic matter modified the bacterial community structure in the Canon biofilter, increasing the proliferation of heterotrophic bacteria related to the genera of *Thauera*, *Longilinea*, *Ornatilinea*, *Thermomarinilinea*, unclassified *Chlorobiales* and *Denitratisoma*. However, heterotrophic bacteria co-exist with *Nitrosomonas* and *Candidatus Scalindua*. Thus, our study confirms the co-existence of different microbial activities (AOB, Anammox and denitrification) and the adaptation of a fixed-biofilm system to different concentrations of organic matter.

**Keywords:** nitrogen removal; biofilter technology; Illumina sequencing; qPCR; non-metric multidimensional scaling (MDS)

**Funding sources**

We are grateful to the Centre for the Development of Industrial Technology (CDTI, Ministry of Economy and Competitiveness, Spain), and the European Economic Area for funding by the Program in Science, Technology and Environmental and Climate Change (EEA Grants) (Ref.: IDI 20140117).

## 1. Introduction

The most widespread system of nitrogen removal in wastewater treatment plants is a conventional method involving a biological process that combines aerobic nitrification with heterotrophic denitrification in the absence of oxygen. Usually, each process is conducted in a different bioreactor. In some cases, if a post-denitrification configuration is implemented to complete denitrification, the addition of an external carbon source is also needed. These methods incur high costs, and in the 1990s a number of new technologies were developed based on the autotrophic removal of nitrogen: including the so-called Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) process. A partial-nitrification Anammox process involves two reactions in series: the first consists of the aerobic oxidation of ammonium to nitrite by ammonium oxidising bacteria (AOB) and the second is an anoxic oxidation of ammonium to nitrogen gas with nitrite as an electron acceptor by the action of Anammox bacteria. The processes can take place in two reactors (partial nitrification reactor and Anammox reactor) or in a single reactor where the AOB and Anammox bacteria co-exist. One of the most promising technologies in a single reactor is known as Completely Autotrophic Nitrogen Removal Over Nitrite (Canon) (Slijkers et al. 2003).

Autotrophic Nitrogen-Removal technologies, such as the Canon and Demon systems among others, offer several advantages with respect to conventional nitrogen removal, such as lower energy consumption, lower sludge production, and therefore lower operational cost (González-Martínez et al. 2016). These technologies are widely used in urban and industrial wastewater treatment, with a high nitrogen content and low concentration of organic matter (González-Martínez et al. 2011), such as supernatants from anaerobic digesters. However, several studies have reported that the technologies based on Autotrophic Nitrification–Denitrification processes can be influenced by different environmental factors (Strous et al. 1997). For example, the ammonium–nitrite mixture must be composed of 50% ammonium and 50% nitrite, and the organic carbon concentration should be strictly controlled. Therefore, different authors (Sabumon 2007; Rodríguez-Sánchez et al. 2016) have shown that organic matter has a negative

impact on the Anammox process, because it cannot compete for nitrite with heterotrophic denitrifying populations.

In previous studies the adverse effect of the presence of organic matter in the growth of AOB and Anammox bacteria has been reported. Thus, when high concentrations of Chemical Oxygen Demand (COD) are present in the influent, the efficiency of the autotrophic nitrogen-removal systems undergoes clear inhibition processes. In addition, it has been shown that when there is a significant increase in COD, the heterotrophic bacterial community also increases significantly (Sabumon 2007). Under these circumstances a competition between autotrophic bacteria (AOB and Anammox) and the heterotrophic bacteria take place, causing a decrease in the efficiency of the Autotrophic Nitrogen-Removal processes (Bassin et al. 2012; Kim et al. 2011; Onnis-Hayden et al. 2007). Moreover, some researchers also observed inhibition of Anammox activity by organic compounds, such as methanol (Güven et al. 2005; Isaka et al. 2008).

Autotrophic removal systems under different configurations (flocular, granular or fixed-biofilm) have been described in the last decade (Gonzalez-Martinez et al. 2016). Moreover, autotrophic systems of two bioreactors and autotrophic systems of a single bioreactor have been developed. However, one of the drawbacks of the processes operating in a single reactor is the need to maintain the operating conditions (temperature, oxygen concentration, organic matter and Hydraulic Retention Time) within their optimal ranges to achieve a stable system.

The balance between the different microbial groups involved in autotrophic nitrogen removal is very important. Aside from growing and sustaining the slow-growing Anammox bacteria, the balanced activity of AOB bacteria needs to be established in line with a suppression or out selection of nitrite oxidizing bacteria. The growth rates of AOB bacteria are usually higher than those of NOB bacteria at elevated temperatures ( $> 30^{\circ}\text{C}$ ), which makes selective washout of NOB bacteria possible in suspended biomass systems for partial nitrification, by adjusting the solids' retention time (SRT) to a minimum level (Hellings et al. 1998). That concept, however, is not applicable for biofilm systems (Fux et al. 2004), because biofilms can sustain

microorganisms with different growth kinetics due to the undefined SRT and their distinct substrate gradients (Bryers, 2000).

To the best of our knowledge, no previous studies using submerged biofilter technology have been developed in autotrophic nitrogen-removal systems in a single bioreactor. Fixed-bed technologies are more robust, stabler and easier to control than other technologies based on suspension culture systems, a moving bed, or granular biomass (Rodriguez-Sanchez et al. 2014; Albuquerque et al. 2012; Osorio et al. 2006).

For this reason, in this study a single bioreactor submerged biofilter has been adopted, in order to evaluate the influence of the concentration of organic matter on the efficiency of the system, and also the effect of the organic matter on the microbial communities growing in the bioreactor using Illumina sequencing techniques. In this context, three bioreactors operating in parallel with different C/N ratios were operated. Illumina sequencing was used to determine the structure of the bacterial community and identify the key player in the nitrogen removal. Multivariate analysis (non-metric multidimensional scaling and BIO-ENV) was conducted to link the influence of operational/environmental variables to microbial communities.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Experimental set-up**

Three identical glass bench-scale plants were configured as a submerged bed with a volume of 2 L. The bioreactors, named R0, R1 and R2, were filled with the same support material. The material used as fixed bed in the biofilter consisted of Filtralite, a granular material, of a clay-ish nature, that has a high rate of porosity. The characteristics of this material can be found in the supplementary material provided (Table S1). A schematic diagram of the biofilter is shown in Fig. 1.



The three experimental bioreactors were simultaneously inoculated with inoculum from the full scale Anammox plant of Olburgen (The Netherlands: 52°23'89.96"N, 5°97'92.96"E). This plant showed high efficiency of nitrogen removal. For the start-up of the bench-scale plants an inoculum volume equivalent to 10% of the total volume of each bioreactor was used. Inoculation of the bioreactors was held in a previous phase. In this period, bioreactors were operated in recirculation under the same operational conditions (Table 1). This phase ended when a stable biofilm was observed on the surface of the carriers. This was confirmed by optical and electron microscopy. The start-up of the bench-scale plants took place over ten days under our operational conditions.

After the period of acclimatization of the microbiota in the inoculated bench-scale plants, they were continuously fed by a peristaltic pump (Watson Marlow s-520), which pumped the synthetic water at a constant flow rate (0.285 l/h) from an inlet tank containing standard synthetic wastewater. The main mineral medium used in this study contained (in g·L<sup>-1</sup>): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.17), NaHCO<sub>3</sub> (3.25), CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.3), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.07), MgSO<sub>4</sub> (0.02), and trace elements (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Mosquera-Corral et al. 2005; González-Martínez et al. 2013). The synthetic water was the same for all the bioreactors, except the influent COD concentration. Different concentrations of acetate were added to the synthetic water, in order to obtain different COD concentrations in R0, R1 and R2 bioreactors (0, 100 and 400 mgCOD·L<sup>-1</sup>, respectively), in agreement with previous indications (Paredes et al. 2007; Xiaojing et al. 2015). Throughout all experiments, the bioreactors operated under microaerophilic conditions (Table 1). With regard to temperature, the bioreactors were installed inside a thermostated chamber (Fig. 1), in order to keep the temperature constant, at 35°C. The three bioreactors ran in a continuous mode at a hydraulic retention time (HRT) of 7 h. The pH in each bioreactor was always within the range of 7–8, suitable for the correct operation of the involved microbial populations (Strous et al. 1997). In order to examine the structure of the bacterial community in the different bioreactors, Illumina sequencing was performed.

Equation (1), based on the Canon process stoichiometry, was used to calculate the denitrification rate. Therefore, the effluent N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration was compared with the N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration generated theoretically by the Canon reaction. (Eq. 1)

$$(1) Y (\text{Denitrification rate}) = \frac{((N-NH_4^+)_{INF} - (N-NH_4^+)_{EFF}) * 0.11 - (N-NO_3^-)_{EFF}}{(NT)_{INF} - (NT)_{EFF}} \quad (\text{Xiaojing et al. 2015})$$

## 2.2. Analytical methods.

The concentrations of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in the influent and effluent were measured daily, using a Metrohm ionic chromatograph (González-Martínez et al. 2013). To measure the ammonium concentrations a cation column Metrosep C2-150 was used, whereas for the nitrite and nitrate concentrations, an anion column MetrosepA supp-4-250 was used. The calibration curves were developed with the following concentrations: 10, 200 and 500 mg·L<sup>-1</sup>. The pH was determined potentiometrically with a digital, portable pH meter. The DO level was measured with a digital, portable DO meter. The analysis of the COD concentrations was carried out by standard methods (ALPHA 2002).

## 2.3. Microbiological studies

### 2.3.1. Sample collection

Biomass samples from the biofilm formed on the Filtralite were collected at the end of the experimental period. The biofilm was obtained using seven carrier elements taken at different depths (5, 20, 45 cm). The biomass attached to the carrier samples was sonicated for 3 min. The biomass attached was separated by centrifugation at 3000 rpm for 15 min and then washed off for DNA extraction, following previous protocols (Rodríguez-Sánchez et al. 2016).

### 2.3.2. Nucleic acid extraction and purification.

The FastDNA-SPIN kit for Soil and the FastPrep24 instrument (MP-Bio, Santa Ana, CA, USA) was used for the extraction and purification of genomic DNA, according to previous protocols (Maza-Márquez et al. 2016). DNA quality was determined by 260/280-nm absorbance ratios, measured electrophotometrically (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific).

### 2.3.3. Illumina sequencing

The composition of the bacterial community was determined by Illumina sequencing using the Illumina MiSeq Reagent Kit v3 and the Illumina MiSeq apparatus (Illumina, Hayward, CA, USA), Research and Testing Laboratory (Lubbock, Texas, USA, <http://www.researchandtesting.com>). Hypervariable V1-V3 regions of the 16S rRNA gene of bacteria were amplified using the forward primer 530F (5'-CCGCNGCNGCTGGCAC-3') and reverse primer 909R (5'-CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3').

Mothur V1.39.5 software (<http://www.mothur.org>) was used for the demultiplexed and quality filtering of the raw data, as previously described in Rodríguez-Sánchez et al. (2016). Low-quality and chimera sequences were removed using UCHIME v4.2.40 implemented in Mothur V1.39.5 (Edgar et al. 2011). In order to define the operational taxonomic unit at the 97% similarity level (OTU), a Phylip matrix was performed. Finally, the Silva database was used to align sequences of sufficient quality and assign taxonomic ranks.

Rarefaction curves for each sample were calculated employing RarefactWin software, developed by S. Holland (University of Georgia, Athens; <http://strata.uga.edu/software/>). Heatmaps were constructed for all consensus OTUs with at least > 1% relative abundance at different taxonomical levels: a) Phylum; b) Order; and c) Genus. Heatmaps were calculated using the Vegan package v.2.0 implemented on the statistical software R-Project v.2.15.1. Good's coverage index (Good 1953) and environmental diversity indices (Chao-1,  $H'$ , Simpson, and Pielou's evenness) were calculated for each sample using PAST v.3.06 (Hammer et al. 2001).

Primer software (PRIMER-E v. 6.1.18, Plymouth, UK) was used for cluster analysis and to generate a dendrogram using the UPGMA algorithm. The cluster analysis was based on sample-resemblance matrices generated using the Bray–Curtis coefficient of similarity matrix.

#### **2.4. Statistical analysis**

Primer software v.6.1.18 (PRIMER-E, Plymouth, UK) was used to analyse the biotic data derived from the Illumina sequencing. Sample-resemblance matrices were generated with the Bray–Curtis coefficient of similarity. Non-metric multidimensional scaling (MDS) and 2D ordination plots of the biological data were calculated based on the similarity matrix (Maza-Márquez et al. 2016). According to Clarke and Warwick (2001), stress levels of non-metric multidimensional scaling plots  $< 0.2$  indicate a good fit for the representation of the variables data along two axes.

All the operational and environmental data were transformed ( $\log(x+1)$ ) and normalized, and the biotic data from Illumina sequencing were standardized by total (Maza-Márquez et al. 2016). The biotic and operational/environmental variables were represented in vector forms generated by a multiple correlation algorithm, which indicates the correlation between the biotic and the operational/environmental variables. To this end, Spearman's rank coefficients and Pearson's correlation coefficients ( $r$ ) were calculated. Finally, a BEST analysis determined the operational/environmental variables that had the most influence on the the community ordination. The significance of the vector and BEST analyses was shown by a sample using a global permutation test (with 499 permutations).

### **3. Results and discussion.**

#### **3.1. Bioreactor performance at different C/N ratios**

As mentioned previously, in this study, three different concentrations of COD were used: 0, 100 and 400  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  in the R0, R1 and R2 bioreactors, respectively. All the bioreactors ran in parallel for a period of 60 days. The operational conditions (Table 1) were the same for the three

bioreactors except for the concentration of organic matter. In the case of the R0 bioreactor, this was operated with no organic matter added to its influent and an HRT of 7 h. The evolution of ammonium, nitrite and nitrate concentrations in the effluent can be observed in Fig. 2. In addition, the concentration of dissolved oxygen was rather limited, about 1.0–1.5 mg·L<sup>-1</sup>, the pH of the system was always stable at around 7, and the temperature remained constant at 35°C.

At the beginning of the experiments the ammonium-removal performance of the R0 bioreactor (without addition of organic matter) was fairly low (Fig. 2). However, the system quickly began to improve its efficiency and, after 15 days of operation, the submerged biofilter was able to remove almost 75% of the ammonium present in the influent. Finally, the R0 bioreactor achieved a maximum total nitrogen-removal efficiency of 84.9% after 50 days of operation (Fig. 3). These results suggest that both AOB and Anammox bacteria were well adapted to the operating conditions of the biofilter established in our study. The stoichiometry of the Canon process indicates that the maximum nitrogen-removal efficiency is 89%, because the Anammox bacteria produce a certain amount of nitrates in the Canon process (Slikers et al. 2003). Bearing this in mind, the results obtained in the R0 bioreactor can be considered as very satisfactory. Moreover, in the last days (days 50–60) of the experiment, the concentrations of ammonium, nitrite and nitrate in the effluent were stable and within the ranges 5–10 mg·L<sup>-1</sup>, 0–5 mg·L<sup>-1</sup> and 25–35 mg·L<sup>-1</sup>, respectively (Fig. 2). The negligible nitrate concentration in the effluent indicates negligible activity of NOB bacteria, suggesting the inhibition of this bacterial group as a consequence of the low level of dissolved oxygen in the bioreactor, although the insignificant NOB activity could be a consequence of multiple factors including temperature and pH (Giustinianovich et al. 2016). Also our study suggests that the nitrogen removal was total during the biological process associated with the Canon system. In addition, if the current yield of nitrogen removal achieved by a fixed-bed biofiltration system is compared with previous results obtained in a granular Canon system, we can conclude that both systems have very similar efficiencies, around 90% (Third et al. 2001). The R1 and R2 bioreactors, as mentioned previously, had different concentrations of COD: 100 and 400 mg·L<sup>-1</sup>, respectively. However,

the rest of the operating conditions of the R1 and R2 bioreactors were exactly the same as the R0 experimental set-up. R1 and R2 bioreactors showed nitrogen-removal patterns similar to the control bioreactor R0, although with lower nitrogen-removal efficiencies. Thus, the R1 and R2 bioreactors exhibited a lower percentages of 60 and 40% respectively, during the first 30 days of operation. However, when the R1 bioreactor was fed continually (periods longer than 30 days) with synthetic wastewater, with  $100 \text{ mgCOD}\cdot\text{L}^{-1}$  added, the nitrogen-removal efficiency was similar to the control bioreactor fed with synthetic wastewater without organic matter (Fig. 2). This data could suggest that the presence of  $100 \text{ mgCOD}\cdot\text{L}^{-1}$  in the influent reduced during the first 30 days of experiment the microbial activity in the bioreactor, including AOB and Anammox bacteria. However, this inhibitory effect disappeared after long periods of operation with a total nitrogen-removal efficiency of 85.7% after 50-60 days of operation. Consequently, the Canon system, configured as a submerged biofilter, can be adapted to the presence of  $100 \text{ mgCOD}\cdot\text{L}^{-1}$ , probably due to the sorption capacity of the biofilm formed on the carrier, although the presence of organic matter degrader microorganisms should be also considered.

When the submerged biofilter was fed with synthetic wastewater with  $400 \text{ mgCOD}\cdot\text{L}^{-1}$  added, the nitrogen-removal capacity was lower than that of the control bioreactor fed with synthetic wastewater without organic matter (Fig. 2). Thus, after a long period of operation (60 d) the R2 bioreactor showed lower nitrogen-removal efficiencies than those produced in the control bioreactor without the addition of organic matter. Moreover, after 60 days, the R2 effluent showed higher values of nitrite, the worst performance of ammonia removal, and very low nitrate concentration compared to the theoretical stoichiometry of the process. These results suggest that the presence of a high concentration of organic matter in synthetic wastewater induces an inhibitory effect on autotrophic communities, which affects the biotransformation of ammonium to nitrite and nitrogen. In this regard, the activity of Anammox bacteria is limited, which implies the accumulation of nitrite and, at the same time, this accumulation of nitrite inhibits the activity of Anammox bacteria.

Our suggestions are consistent with the values of total nitrogen removal, COD removal, and heterotrophic denitrification ratio for each bioreactor (Table 2). Table 2 includes the arithmetical values (for each variable: average and standard deviation), calculated with the data from the last 10 days of the experiments, and shows that all the bioreactors became stable through time. Also, data obtained from R2 bioreactor suggest that heterotrophic denitrification actively contributes (about 9.3%) to the nitrogen removal and organic matter.

### **3.2. Microbial community composition obtained by Illumina sequencing**

The species richness of the different bioreactors was evaluated by the conformation of rarefaction curves (Table 3). The rarefaction curves and the values of Good's coverage (> 99%, Table 3) show that the depth of sequencing was sufficient to saturate the curve and describe the diversity of the community (Table 3).

The diversity index showed significant differences between the bioreactors, with the lowest number of OTUs detected in the R0 bioreactor (without organic matter). In contrast, a similar number of OTUs were detected in the bioreactors operated with organic matter (R1 and R2; 110 and 107 OTUs, respectively). In the R0 bioreactor, the community was composed of a low richness (Chao-1: 54) and medium functional organization ( $H'$ : 1.75). In contrast, the R1 and R2 bioreactors were composed by low-medium richness diversity (Chao-1: 192 and 164, respectively), and low functional organization ( $H'$ : 3.51 and 3.41 for R1 and R2 bioreactors, respectively).

Fig. 4 displays the Bray–Curtis cluster analysis of the three different bioreactors. The plots of the cluster analyses shows that the structure of the community has two separate branchings. The first branch contained the samples from the Olburgen plant inoculum and the R0 bioreactor. The second branch was formed by the R1 and R2 bioreactors amended with organic matter, which showed a similarity greater than 60%. These results show that the addition of organic

matter strongly influenced the structure of the community, which is consistent with previous studies (Rodriguez-Sanchez et al. 2016).

Fig. 5 shows a heatmap of the relative abundance of bacterial OTUs at the levels of Phylum, Order and Genus. The 55 detected OTUs from R0 represent a total of 7 Phyla, whereas the 110 and 115 OTUs from R1 and R2 represent a total of 8 phyla. The dominant phyla in R0 were *Planctomycetes* (45.37% relative abundance), *Proteobacteria* (38.22%) and *Ignavibacteria* (6.45%). In contrast, *Proteobacteria*, *Chloroflexi* and *Chlorobi* were the dominant phyla when acetate was used as organic matter, at, respectively, 38.32%, 19.16%, and 27.66% for R1 and 43.94%, 33.14%, and 8.06% for R2. In addition, *Armatimonadetes* and *Chlorobi* were only detected in bioreactors operating with organic matter (R1 and R2), whereas *Ignavibacteria* was detected exclusively from the bioreactor operating without organic matter (R0). On the other hand, interesting differences were also found between the two bioreactors operating with different concentrations of organic matter (R1 and R2). *Chloroflexi* was most abundant in R2 (33.14%), whereas *Chlorobi* was most abundant in R1 (27.66%).

At the Order level, differences in taxonomic resolution were also detected, based on the composition of the influent. *Candidatus Brocadiales* and *Nitrosomonadales* were the dominant orders detected when the bioreactor operated without organic matter (45.36% and 26.69% relative abundance). In contrast, *Rhodocyclales* (17.29% and 13.11% relative abundance in R1 and R2, respectively) and *Anaerolineales* (16.71% and 29.25% relative abundance in R1 and R2, respectively) were the dominant orders when the bioreactors operated with organic matter.

At the Genus level, the highest relative abundance of OTUs affiliated to *Candidatus Brocadia* (45.36%) and *Nitrosomonas* (25.13%) were detected in the R0 bioreactor, whereas unclassified *Rhodocyclales* was the dominant genus in bioreactors operating with organic matter (34.43% and 21.18% relative abundance, in R1 and R2, respectively). In addition, some differences were detected in the bioreactors operating under different organic matter concentrations. Unclassified *Rhodocyclales* (21.18% relative abundance), *Longilinea* (16.85%) and *Thiobacillus* (12.68%)



were the dominant genera in R2, whereas unclassified *Rhodocyclales* (34.43%), *Denitratisoma* (13.68%) and *Longilinea* (8.35%) were the dominant genera in R1.

In order to evaluate the contribution of each OTU alongside the similarity/dissimilarity between bioreactors (with or without acetate), SIMPER analyses were conducted. The global similarity between the bioreactors was 23.62%, where OTUs 5, 3, 1, 4, and 6 (phylogenetically related with unclassified *Chlorobiales*, *Longilinea*, *Denitratisoma*, *Ornatilinea*, and *Leptothrix*) contributed 79.59% to explaining this similarity (Table 4). SIMPER corroborated the greater differences between bioreactors operating with and without organic matter (Table S2). According to the SIMPER analyses, the dissimilarities between the bioreactors operating with and without organic matter were more than 94%, which was explained mostly by OTU 118 related phylogenetically to *Candidatus Brocadia* (a contribution greater than 24%), and OTU 9 related phylogenetically to *Nitrosomonas* (a contribution greater than 12%) (Table S2).

On the other hand, clear differences were also detected between bioreactors operating with organic matter (> 39%). The major contributors to explaining these differences were OTUs 5 (unclassified *Chlorobiales*, 20.26% contribution), 29 (*Thiobacillus*, 18.50%), 3 (*Longilinea*, 13%), 1 (*Denitratisoma*, 13%) and 10 (*Thermomarinilinea*, 8.81%).

In the present study, it was found that the structure of the bacterial composition in bioreactors operating with organic matter differed significantly from that in the bioreactor operating without organic matter, and these results could explain the different efficiencies in nutrient removal observed between them. In this sense, Illumina sequencing indicated that *Candidatus Brocadia* and *Nitrosomonas* were the dominant taxa in the bioreactor operating without organic matter. The dominance of *Candidatus Brocadia* and *Nitrosomonas* and their role in nitrogen removal are well documented in the literature (Bassin et al. 2015; González-Martínez et al. 2015; Terada et al. 2013). Hence, the dominance of *Planctomycetes* and *Proteobacteria* are in accordance with previous studies, such as lab-scale Anammox, partial-nitrification bioreactors and the

Canon system (Bassin et al. 2015; Cerrone et al. 2013; González-Martínez et al. 2014a, 2014b; González-Martínez et al. 2016; Rodríguez-Sánchez et al. 2014; Rodríguez-Sánchez et al. 2016).

As expected, the addition of organic matter changed the bacterial community structure, as shown in the heatmap and cluster analysis (Figs 4 and 5). At start-up, the three bioreactors were inoculated with a mix of AOB bacteria (*Nitrosomonas*) and Anammox bacteria (*Candidatus Brocadia*) from the full-scale Anammox plant of Olburgen. The addition of organic matter increased the proliferation of heterotrophic bacteria related to the genera of *Thauera*, *Longilinea*, *Ornatilinea*, *Thermomarinilinea*, unclassified *Chlorobiales* and *Denitratisoma*. Moreover, the heterotrophic enrichment was exclusively for the bioreactors operating with organic matter (R1 and R2). The results suggest an adaptive microbial process where, at the end of the study, heterotrophic, AOB and Anammox bacteria co-existed in the same space. In addition, interesting differences in community structure and N-removal efficiencies were detected in both bioreactors operating with organic matter (R1 and R2). In the R1 bioreactor, the heterotrophic bacteria co-existed with *Nitrosomonas* (2.01% relative abundance) and *Candidatus Scalindua* (1.87% relative abundance). In contrast, the relative abundance of *Nitrosomonas* and *Candidatus Scalindua* were less in the R2 bioreactor (0.86% and 0%), where the efficiency of the N removal was lower. Our results demonstrate that the community and yield efficiency were affected by the concentration of organic matter.

The increased relative abundance of heterotrophic bacteria related with *Thiobacillus*, *Thauera*, *Leptothrix* have been described previously for partial-nitrification systems amended with organic matter (Rodríguez-Sánchez et al. 2016). *Chloroflexi* and members of *Anaerolineales* have been detected in Anammox bioreactors (Chu et al. 2015; González-Martínez et al. 2014a), but their role in the system needs to be explored. Furthermore, previous studies (Hiras et al. 2016) have suggested the diverse metabolism of *Chlorobi*, and highlight that they even have genes for ammonium assimilation. *Candidatus Scalindua* has been detected in a broad variety of aquatic environments (Hirsch et al. 2011, Kuypers et al. 2003; Woebken et al. 2008), and at

different stages of composting (Wang et al. 2017). In addition, *Candidatus Scalindua* is also related with organic matter (Awata et al. 2015).

The findings of our study in R1 bioreactor treated effluent with low organic matter concentration ( $100 \text{ mgCOD}\cdot\text{L}^{-1}$ ) suggest that the co-existence of different microbial metabolisms, such as AOB, Anammox and denitrification, do not significantly affect the removal and transformation of N and C. In this sense, the bioreactor operated without organic matter (R0), which was composed of Anammox and AOB bacteria, reached similar removal efficiencies to the R1 bioreactor. The positive relationship between Anammox bacteria and denitrifiers has been previously reported (Zhang et al. 2011). Future research will focus on understanding this removal of nitrogen.

### **3.3. Linking bacterial community with operational parameters (MDS and BIO-ENV)**

The plots in Fig. 6 show the MDS ordering of the bioreactors, according to the relative abundance of bacteria at the Order/Genus level, derived from Illumina sequencing. Regardless of the taxonomic level analysed, bioreactors R1 and R2 find themselves grouped together, whereas bioreactor R0 showed an evident separation. According to the BIO-ENV analysis, the COD variable was the best explanation (60%) for the ordering of both taxonomic levels analysed (Order and Genus).

A strong positive correlation of nitrogen removal efficiency with the relative abundances of OTUs classified in the orders *Nitrosomonadales*, *Brocadiales* and *Candidatus Brocadiales* ( $r > 0.7$ ) was observed. In addition, a strong correlation was also detected between the N-removal efficiencies and the relative abundances of *Nitrosomonas* and *Candidatus Scalindua* ( $r > 0.7$ ) (Fig. 6 and Table S3).

On the other hand, denitrification and COD removal was strongly related with the genus *Thauera*, the unclassified *Chlorobiales*, *Thiobacillus*, *Arcobacter*, *Azonexus*, *Desulfohalobium*, *Leptothrix*, *Longilinea* and *Thermomarinilinea* ( $r > 0.9$ ). The BIO-ENV analysis demonstrated that the N-removal efficiency and denitrification in the bioreactors was carried out by different

microbial communities. It is widely known that *Nitrosomonas* and *Candidatus Scalindua* play an important role in the nitrogen cycle (González-Martínez et al. 2014a; Vossenberg et al. 2013). *Thiobacillus* and *Leptothrix* have been found in partial nitrification biofilters subjected to organic matter, and linked to denitrification (Dolinsek et al. 2013; Rodríguez-Sánchez et al. 2016). *Thauera* is usually detected in activated sludge systems, in which it contributes significantly to the denitrification (Ma et al. 2015; Zhao et al. 2013). Members of the phyla *Chlorobi* have been related with the sulphur-oxidizing autotrophic denitrification process (Zhang et al. 2015). *Denitratisoma* denitrifying bacteria is frequently found in nitrogen-removal systems (Li et al. 2017; Ren et al. 2014; Wu et al. 2016).

#### **4. Conclusions**

The addition of organic matter affected the performance and microbial communities of an autotrophic nitrification-denitrification bioreactor configured as a submerged biofilter. The proposed system operated properly in the presence of organic matter of 100 mgCOD·L<sup>-1</sup>, achieving 85.62% of total nitrogen removal, results which were slightly better than or similar to those obtained in a bioreactor without the addition of organic matter, confirming that a Canon system configured as a submerged biofilter could adapt to the presence of a certain level of organic matter.

However, an increase in concentration (i.e. 400 mgCOD·L<sup>-1</sup>) of organic matter led to a partial inhibition of the biological process (although acceptable, reaching total N-removal yields of 68.1%). The addition of organic matter changed the bacterial community structure, and increased the proliferation of heterotrophic bacteria related with the genera of *Thauera*, *Longilinea*, *Ornatilinea*, *Thermomarinilinea*, unclassified *Chlorobiales*, and *Denitratisoma*, although the heterotrophic bacterial co-exist with *Nitrosomonas* and *Candidatus Scalindua*. Thus, our results show the co-existence of different microbial metabolisms, such as AOB and Anammox, denitrifiers, and also show that a fixed-biofilm system can adapt to certain concentrations of organic matter without significant modification of its performance.

## Acknowledgments

We are grateful to the Centre for the Development of Industrial Technology (CDTI, Ministry of Economy and Competitiveness, Spain), and the European Economic Area for funding by the Program in Science, Technology and Environmental and Climate Change (EEA Grants) (Ref.: IDI 20140117).

## 5. References

- Albuquerque, A., González-Martínez, A., Osorio, F., 2012. Effect of aeration on steady-state conditions in non- and partially aerated low-loaded biofilter. *International Journal of Environmental Science and Technology* 9(3), 395-408.
- Awata T., Kindaichi T., Ozaki N., Ohashi A., 2015. Biomass yield efficiency of the marine anammox bacterium, "*Candidatus Scalindua* sp." is affected by salinity. *Microbes environ.* 30(1), 86-91.
- Bassin, J.P., Kleerebezem, R., Rosado, A.S., Van Loosdrecht, M.C.M., Dezotti, M., 2012. Effect of different operational conditions on biofilm development, nitrification, and nitrifying microbial population in moving-bed biofilm reactors. *Environmental, Science and Technology* 46, 1546-1555.
- Bassin, J.P., Abbas, B., Vilela, C.L.S., Kleerebezem, R., Muyzer, G., Rosado, A.S., van Loosdrecht, M.C.M., Dezotti, M., 2015. Tracking the dynamics of heterotrophs and nitrifiers in moving-bed biofilm reactors operated at different COD/N ratios. *Biores. Technol.* 192, 131-141.
- Bryers, J.D., 2000. *Biofilms*. 451 J. Wiley Interscience. New York.
- Cerrone, F., Poyatos, J.M., Molina-Muñoz, M., Cortes-Lorenzo, C., Gonzalez-Lopez, J., Rodelas, B., 2013. Prevalence of *Nitrosomonas* cluster 7 populations in the ammonia oxidizing community of a submerged membrane bioreactor treating urban wastewater under different operation conditions. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36, 901-910.
- Chu, Z.R., Wang, K., Li, X.K., Zhu, M.T., Yang, L., and Zhang, J., 2015. Microbial characterization of aggregates within a one-stage nitritation–anammox system using high through put amplicon sequencing. *Chem. Eng. J.* 262, 41-48.
- Clarke, K.R., Warwick, R.M., 2001. *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*. Plymouth Marine Laboratory. Plymouth, UK.
- Dolinsek, J., Lagkouravdos, I., Wanek, W., Wagner, M., Daims, H., 2013. Interactions of nitrifying bacteria and heterotrophs: identification of a *Micavibrio*-like putative predator of *Nitrospira* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2027–2037.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitive and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194-2200.

- Fux, C., Marchesi, V., Brunner, I., Siegrist, H., 2004. Anaerobic ammonium oxidation of ammonium-rich waste streams in fixed-bed reactors. *Water Science and Technology* 49, 77-82.
- Giustinianovich, E.A., Campos, J.L., Roeckel, M.D., 2016. The presence of organic matter during autotrophic nitrogen removal: Problem or opportunity?. *Separation and Purification Technology* 166, 102-108.
- González-Martínez, A., Poyatos, J.M., Hontoria, E., Gonzalez-Lopez, J., Osorio, F., 2011. Treatment of effluents polluted by nitrogen with new biological technologies based on autotrophic nitrification-denitrification processes. *Recent Patents on Biotechnology* 5, 74-84.
- González-Martínez, A., Calderón, K., Albuquerque, A., Hontoria, E., González-López, J., Guisado, I.M., Osorio, F., 2013. Biological and technical study of a partial-SHARON reactor at laboratory scale: effect of hydraulic retention time. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36, 173-184.
- González-Martínez, A., Rodríguez-Sánchez, A., Martínez-Toledo, M.V., García-Ruiz, M.J., Hontoria, E., Osorio-Robles, F., Gonzalez-López, J., 2014a. Effect of ciprofloxacin antibiotic on the partial-nitrification process and bacterial community structure of a submerged biofilter. *Sci. Total Environ.* 476-477, 276-287.
- González-Martínez, A., Osorio, F., Rodríguez-Sánchez, A., Martínez-Toledo, M.V., Gonzalez-Lopez, J., Lotti, T., van Loosdrecht, M.C.M., 2014b. Bacterial community structure of a lab scale anammox membrane bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 31, 183-193.
- Gonzalez-Martínez, A., Rodríguez-Sánchez, A., Rodelas, B., Abbas, B., Martínez-Toledo, M.V., van Loosdrecht, M.C.M., Osorio, F., Gonzalez-Lopez, J., 2015. 454-Pyrosequencing analysis of bacterial communities from autotrophic nitrogen removal bioreactors utilizing universal primers: effect of annealing temperature. *BioMed Research International*, 892013 (Open Access).
- González-Martínez, A., Rodríguez-Sánchez, A., García-Ruiz, M.J., Muñoz-Palazon, B., Cortes-Lorenzo, C., Osorio, F., Vahala, R., 2016. Performance and bacterial community dynamics of a CANON bioreactor acclimated from high to low operational temperatures. *Chemical Eng. J.* 287, 557-567.
- Good, I.J., 1953. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40 (3-4), 237-264.
- Güven, D., Dapena, A., Kartal, B., Schmid, M.C., Maas, B., Van De Pas-Schoonen, K., Sozen, S., Mendez, R., Op Den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Strous, M., Schmidt, I., 2005. Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1066-1071.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(1), XIX-XX (Open Access).
- Hellinga, C., Schellen, A.A.J.C., Mulder, J.W., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 1998. The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater. *Water Science and Technology* 37, 135-142.

Hiras J., Wu YW., Eichorst SA., Simmons BA., Singer SW., 2016. Redefining the phylum Chlorobi by resolving the phylogeny and metabolic potential of the representative of a deeplybranching, uncultivated lineage. *The ISME Journal* 10, 833-845.

Hirsch MD., Long ZT., Song B., 2011. Anammox bacterial diversity in various aquatic ecosystems based on the detection of hydrazine oxidase genes (*hzoA/hzoB*). *Microb. Ecol.* 61,264-276.

Isaka, K., Suwa, Y., Kimura, Y., Yamagishi, T., Sumino, T., Tsuneda, S., 2008. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) irreversibly inhibited by methanol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81, 379-385.

Kim, Y.M., Cho, H.U., Lee, D.S., Park, D., Park, J.M., 2011. Influence of operational parameters on nitrogen removal efficiency and microbial communities in a full-scale activated sludge process. *Water Research* 45, 5785-5795.

Kuypers, M.M.M., A.O. Sliekers, G. Lavik, M. Schmid, B.B. Jørgensen, J.G. Kuenen, J.S.S. Damsté, M. Strous, and M.S.M. Jetten., 2003. Anaerobic ammonium oxidation by Anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* 422, 608–611.

Li K., Wang H., Wang C., Chen Y., Guo J., Wang X., Jiang F., 2017. Pathways of N removal and N<sub>2</sub>O emission from a one-stage autotrophic N removal process under anaerobic conditions. *Sci. Rep.* 7, 42072.

Mosquera-Corral, A., González, F., Campos, J.L., Méndez, R., 2005. Partial nitrification in a Sharon reactor in the presence of salts and organic carbon compounds. *Process Biochem.* 40, 3109–3118.

Ma, Q., Qu, Y., Shen, W., Zhang, Z., Wang, J., Liu, Z., Li, D., Li, H., Zhou, J., 2015. Bacterial community compositions of coking wastewater treatment plants in steel industry revealed by Illumina high-throughput sequencing. *Bioresour. Technol.* 179, 436–443.

Maza-Marquez, P., Vilchez-Vargas, R., Boon, N., Gonzalez-Lopez, J., Martinez-Toledo, M.V., Rodelas, B., 2016. The ratio of metabolically active versus total Mycolata populations triggers foaming in a membrane bioreactor. *Water Res.* 92, 208-217.

Onnis-Hayden, A., Pedros, P.B., Reade, J., 2007. Total nitrogen removal from high-strength ammonia recycle stream using a single submerged attached growth bioreactor. *Water Science and Technology* 55, 59-65.

Osorio, F., Torres, J.C., Hontoria, E., 2006. Study of biological aerated filters for the treatment of effluents from the citrus industry. *Journal of Environmental Science and Health - Part A* 41(2), 2683-2697.

Paredes, D., Kuschik, P., Mbwette, T.S.A., Müller, R.A., Köser, H., 2007. New aspects of microbial nitrogen transformations in the context of wastewater treatment- a review. *Engineering in Life Sciences* 7, 13-25.

Ren Y., Li D., Li X., Yang L., Ding A., Zhang J., 2014. High-rate nitrogen removal and microbial community of an up-flow anammox reactor with ceramics as biomass carrier. *Chemosphere* 113, 125-131.

- Rodríguez-Sánchez, A., González-Martínez, A., Martínez-Toledo, M.V., García-Ruiz, M.J., Osorio, F., González-López, J., 2014. The Effect of Influent Characteristics and Operational Conditions over the Performance and Microbial Community Structure of Partial Nitrification Reactors. *Water* 6, 1905-1924.
- Rodríguez-Sánchez, A., Mikola, A., Muñoz-Palazón, B., Vahala, R., González-Martínez, A., 2016. Performance and bacterial community structure of a submerged biofilter subjected to high ammonium and high organic carbon concentrations. *Int. Biodet. Biodeg.* 115, 224-233.
- Sabumon, P.C., 2007. Anaerobic ammonia removal in presence of organic matter: A novel route. *Journal of Hazardous Materials* 149, 49-59.
- Sliemers, A.O., Third, K.A., Abma, W., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., 2003. CANON and Anammox in a gas-lift reactor. *FEMS Microbiology Letters* 218, 339-344.
- Strous, M., Gerven, E.V., Zheng, P., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., 1997. Ammonium removal from concentrate waste water streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations. *Water Res.* 31, 1955-1962.
- Terada, A., Sugawara, S., Yamamoto, T., Zhou, S., Koba, K., Hosomi, M., 2013. Physiological characteristics of predominant ammonia-oxidizing bacteria enriched from bioreactors with different influent supply regimes. *Biochem. Eng. J.* 79, 153-161.
- Third, K.A., Sliemers, A.O., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., 2001. The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation: Interaction and competition between three groups of bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 24, 588-596.
- Van de Vossenberg, J., Woebken, D., Maalcke, W.J., Wessels, H.J., Dutilh, B.E., Kartal, B., Janssen-Megens, E.M., Roeselers, G., Yan, J., Speth, D., Gloerich, J., Geerts, W., van der Biezen, E., Pluk, W., Francoijs, K.J., Russ, L., Lam, P., Malfatti, S.A., Tringe, S.G., Haaijer, S.C., op den Camp, H.J.M., Stunnenberg, H.G., Amann, R., Kuypers, M.M.M., Jetten, M.S.M., 2013. The metagenome of the marine anammox bacterium "*Candidatus Scalindua profunda*" illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium. *Environ. Microbiol.* 15, 1275-1289.
- Wang T., Cheng L., Zhang W., Xu X., eng Q., Sun X., Liu H., Li H., Sun Y., 2017. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in cow manure composting, 2017. *Journal of Microbiology and Biotechnology* (In press; DOI: 10.4014/jmb.1702.02065).
- Woebken, D., Lam, P., Kuypers, M.M.M., Naqvi, S.W.A., Kartal, B., Strous, M., Jetten, M.S.M., Fuchs, B.M., Amann, R. 2008. A microdiversity study of anammox bacteria a novel *Candidatus Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environ. Microbiol.* 10, 3106-3119.
- Wu, S., Shankar-Bhattacharjee, A., Goel, R., 2016. Comparison of performance and microbial communities in single stage suspended and attached growth partial nitrification/Anammox reactors under different temperatures. *Environmental Engineering Science* (In press; DOI: 10.1089/ees.2016.0224).
- Xiaoqing, Z., Hongzhong, Z., Changming, Y., Mingbao, W., Jingjing D., 2015. Effect of COD/N ratio on nitrogen removal and microbial communities of CANON process in membrane bioreactors. *Bioresource Technology* 189, 302-308.



Zhang, L., Yang, J., Fujii, T., Zhang, W., Furukawa, K., 2011. High-rate nitrogen removal from anaerobic digester liquor using an up-flow anammox reactor with polyethylene sponge as a biomass carrier. *Journal of bioscience and bioengineering* 111(3), 306-311.

Zhang, L., Zhang, C., Hu, C., Liu, H., Qu, J., 2015. Denitrification of groundwater using a sulfur-oxidizing autotrophic denitrifying anaerobic fluidized-bed MBR: performance and bacterial community structure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2815-2827.

Zhao, Y., Huang, J., Zhao, H., Yang, H., 2013. Microbial community and N removal of aerobic granular sludge at high COD and N loading rates. *Bioresour. Technol.* 143, 439-446.

## Figure Captions

**Figure 1.** Scheme of the three bench-scale bioreactors (R0, R1 and R2).

**Figure 2.** Time course of  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_2$  and  $\text{NO}_3$  in the influent and effluent in the different bioreactors. Bioreactor operated without organic matter (R0). Bioreactor operated with  $100 \text{ mg COD}\cdot\text{L}^{-1}$  (R1). Bioreactor operated with  $400 \text{ mgCOD}\cdot\text{L}^{-1}$  (R2).

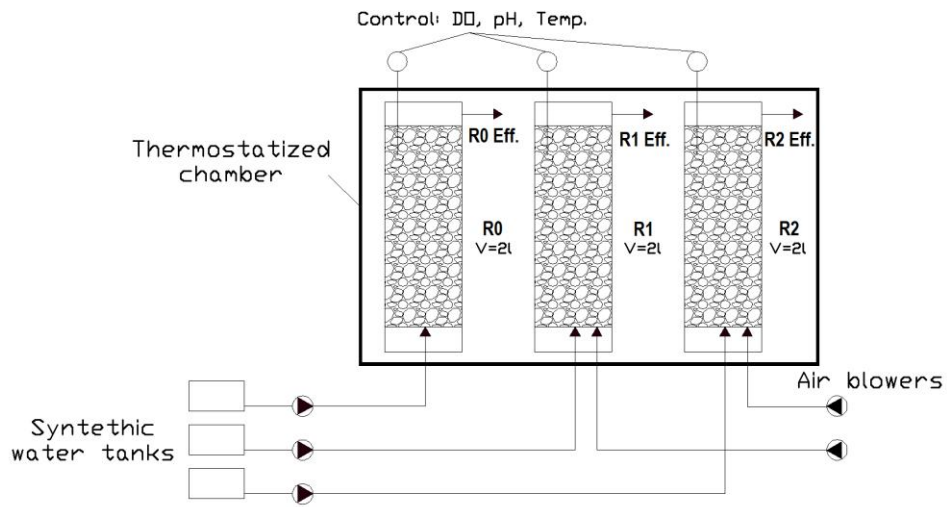
**Figure 3.** Removal efficiencies of the bioreactors (R0 without organic matter, R1 with  $100 \text{ mg COD}\cdot\text{L}^{-1}$  and R4 with  $400 \text{ mg COD}\cdot\text{L}^{-1}$ ) at the end of the study: Total Nitrogen Removal efficiency, COD Removal Efficiency and Heterotrophic Denitrification Ratio (Averages of the last ten days).

**Figure 4.** Bray-Curtis cluster analysis showing the similarity of the bacterial community in the inoculum and bioreactors: bioreactor without organic matter (R0), bioreactor operated with  $100 \text{ mg COD}\cdot\text{L}^{-1}$  (R1) and bioreactor operated with  $400 \text{ mg COD}\cdot\text{L}^{-1}$  of (R2).

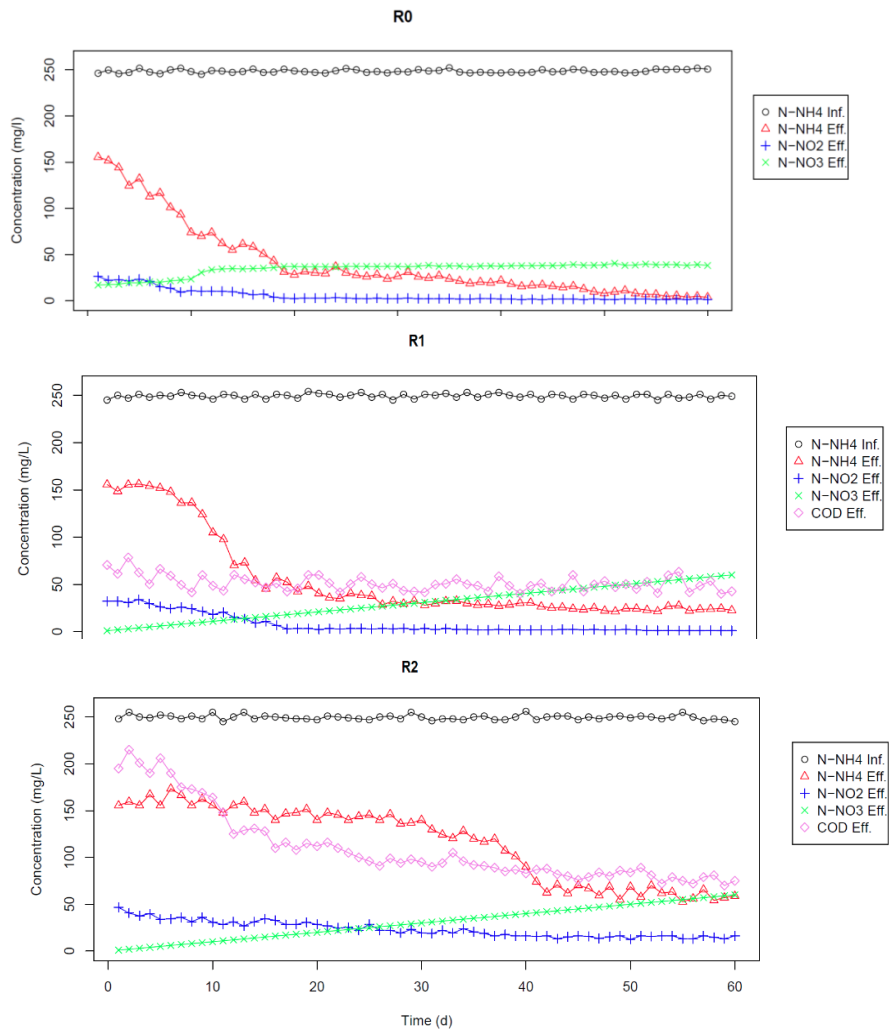
**Figure 5.** Heatmap of the relative abundances of the OTUs detected by Illumina-sequencing in the different samples: Inoculum, bioreactor without organic matter (R0) and bioreactor operated with different organic matter concentrations (R1 and R2,  $100$  and  $400 \text{ mg COD}\cdot\text{L}^{-1}$  respectively). A. Classification at Phylum level. B) Classification at Order level. C. Classification at Genus level.

**Figure 6.** Non-metric multidimensional scaling (MDS) plots showing the ordination of the inoculum and bioreactors (R0, R1 and R2 with  $0, 100$  and  $400 \text{ mg COD}\cdot\text{L}^{-1}$  respectively) according to the relative similarity of all OTUs analyzed by Illumina-sequencing. A. Order level B. Genus level. NTeff: total nitrogen removal efficiency; HDRatio: Heterotrophic denitrification ratio; COD efficiency: COD removal efficiency

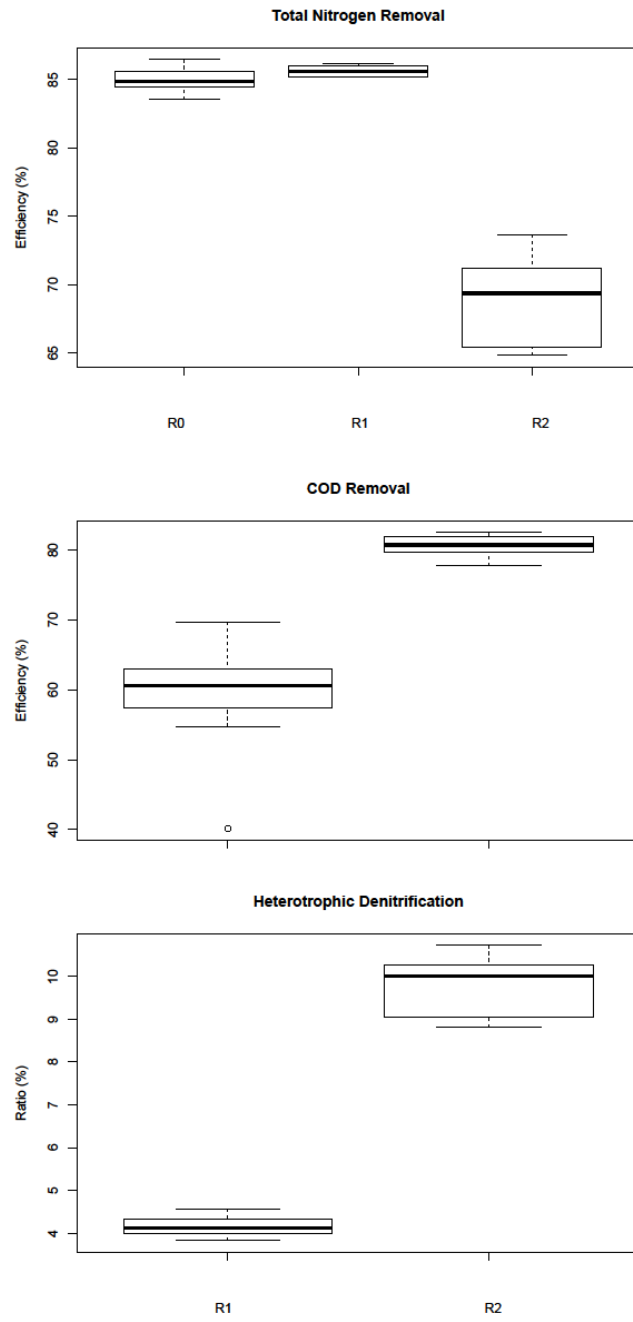
**FIGURES**



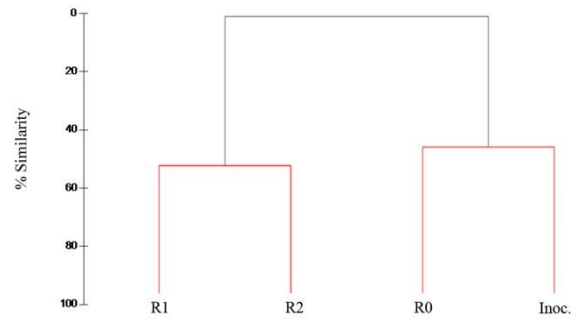
(FIGURE 1)



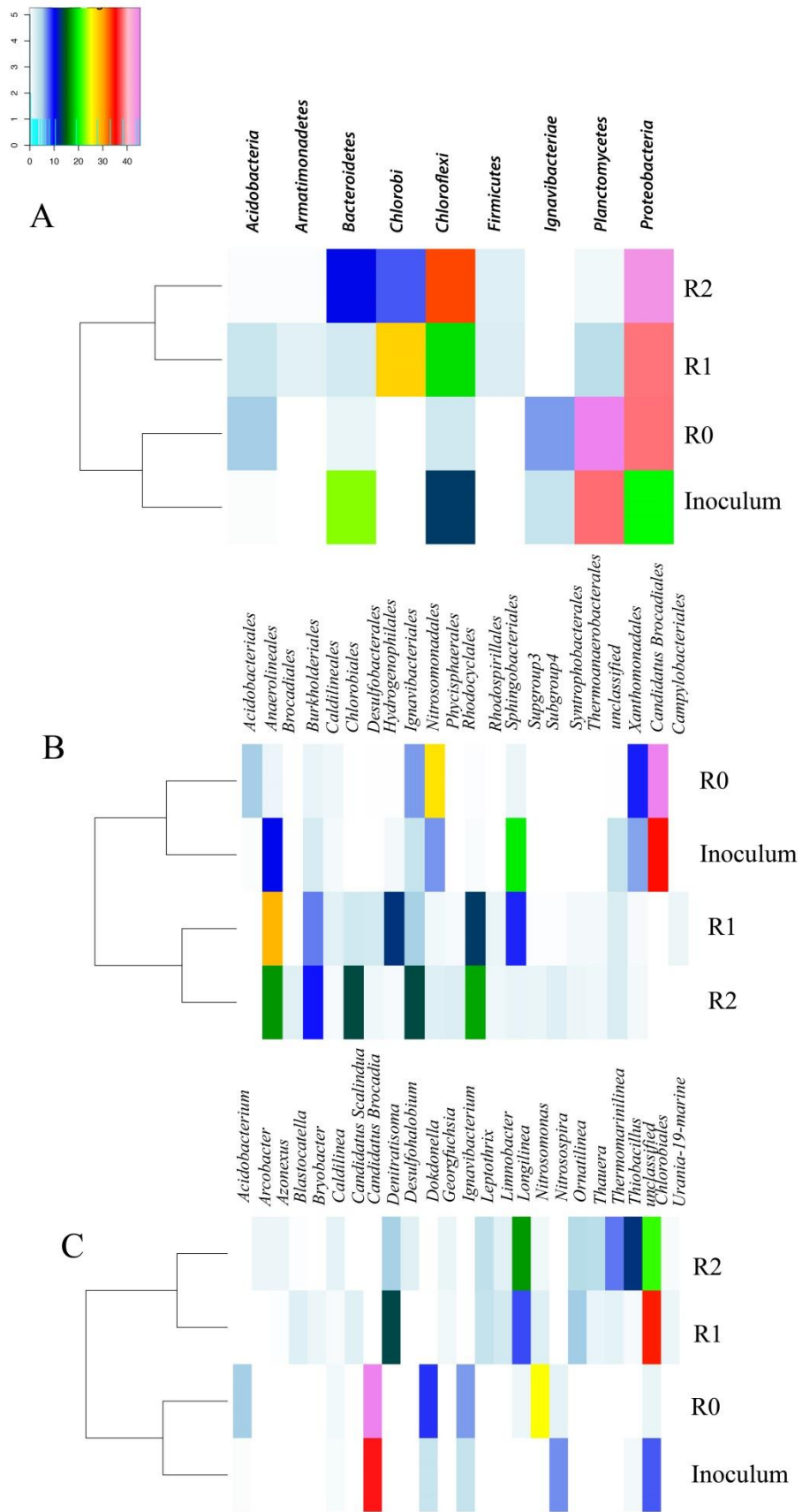
(FIGURE 2)



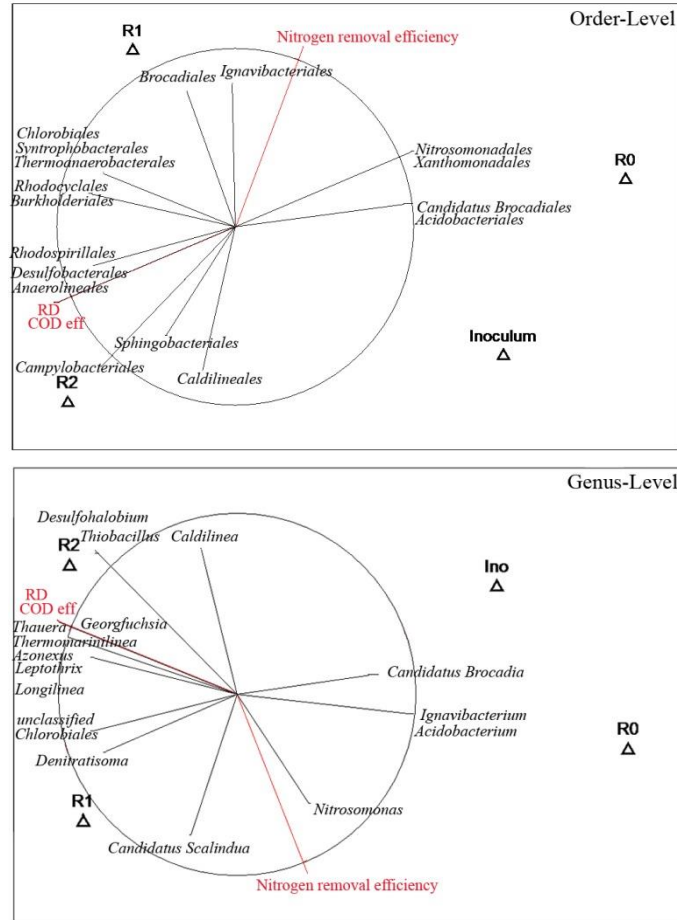
(FIGURE 3)



(FIGURE 4)



(FIGURE 5)



(FIGURE 6)



**Supplementary material for:**

**Title:** Performance and bacterial community dynamics of a Canon biofilter system at different organic matter concentrations.

**Table S1.** Characteristics of the support material used

<b>Filtralite HR 3-6mm</b>	
Density	825Kg.m <sup>-3</sup>
EffectiveDiameter	3.5mm
UniformityCoefficient	<1.5
Porosity	46%
Voids Index	43%

**Table S2.** A. OTUs which mostly contribute to the dissimilarity of the bacterial communities between the different bioreactors A) Average dissimilarity between bioreactors R0xR2. B) Average dissimilarity between bioreactors R0xR1. C) Average dissimilarity between bioreactors R1xR2.

A.

			OTUs 118	OTUs 9	OTUs 5	OTUs 3	Acumulación
	Afiliación taxonómica		<i>Candidatus Brocadia</i>	Nitrosomonas	Unclassified <i>Chlorobiales</i>	Longilinea	
R0 X R2	95.53 % Disimilitud media		24.92	13.34	10.92	8.66	
	% Contribución		26.09	13.96	11.43	9.07	60.56

B.

			OTUs 118	OTUs 5	OTUs 9	OTUs 1	OTUs 127	OTUs 3	Acumulación
	Afiliación taxonómica		<i>Candidatus Brocadia</i>	Unclassified <i>Chlorobiales</i>	Nitrosomonas	Denitratisom a	Dokdonell a	Longiline a	
R0 X R1	94.54 % Disimilitud media		25.57	18.68	13.03	7.72	5.05	4.10	
	% Contribución		27.05	19.76	13.79	8.16	5.35	4.33	78.43

C.

			OTUs 5	OTUs 29	OTUs 3	OTUs 1	OTUs 10	OTUs 11	OTUs 16	Acumulación
	Afiliación taxonómica		Unclassified <i>Chlorobiales</i>	<i>Thiobacillus</i>	Longilinea	Denitratisom a	<i>Thermomarinilinea</i>	<i>Thaurea</i>	Candidatus Scalindua	
R1 X R2	39.07 % Disimilitud media		7.92	7.23	5.08	5.08	3.44	4.64	1.12	
	% Contribución		20.26	18.50	13.00	13.00	8.81	4.19	2.86	80.62

**Table S3.** Pearson product-moment correlation coefficients (r) between the biotic samples from Illumina-sequencing and the operational/environmental variables: N removal efficiency, COD removal efficiency, ratio of denitrification and COD (mg/L). A. Order level. B. Genus level.

A. Order level

	Nitrogen Removal Efficiency	COD Removal efficiency	Ratio of Denitrification	COD (mg/L)
<i>Acidobacteriales</i>	0,472	-0,964	-0,964	-0,964
<i>Anaerolineales</i>	-0,690	1,000	1,000	1,000
<i>Brocadiales</i>	0,763	-0,059	-0,059	-0,059
<i>Burkholderiales</i>	-0,135	0,811	0,811	0,811
<i>Caldilineales</i>	-0,991	0,585	0,585	0,585
<i>Chlorobiales</i>	0,024	0,707	0,707	0,707
<i>Desulfobacterales</i>	-0,585	0,991	0,991	0,991
<i>Hydrogenophilales</i>	-0,919	0,919	0,919	0,919
<i>Ignavibacteriales</i>	0,928	-0,371	-0,371	-0,371
<i>Nitrosomonadales</i>	0,690	-1	-1,000	-1,000
<i>Phycisphaerales</i>	0,024	0,70711	0,707	0,707
<i>Rhodocyclales</i>	-0,135	0,81068	0,811	0,811
<i>Rhodospirillales</i>	-0,585	0,99083	0,991	0,991
<i>Sphingobacteriales</i>	-0,979	0,82404	0,824	0,824
<i>Subgroup_3</i>	0,024	0,70711	0,707	0,707
<i>Subgroup_4</i>	0,024	0,70711	0,707	0,707
<i>Syntrophobacterales</i>	0,024	0,70711	0,707	0,707
<i>Thermoanaerobacterales unclassified</i>	-0,371	0,92848	0,928	0,928
<i>Xanthomonadales</i>	0,690	-1	-1,000	-1,000
<i>CandidatusBrocadiales</i>	0,472	-0,9638	-0,964	-0,964
<i>Campylobacterales</i>	-0,919	0,91915	0,919	0,919

B. Genus level

	Nitrogen Removal Efficiency	COD Removal efficiency	Ratio of Denitrification	COD (mg/L)
<i>Acidobacterium</i>	0,472	-0,964	-0,964	-0,964
<i>Arcobacter</i>	-0,919	0,919	0,919	0,919
<i>Azonexus</i>	-0,646	0,998	0,998	0,998
<i>Blastocatella</i>	0,024	0,707	0,707	0,707
<i>Bryobacter</i>	0,763	-0,059	-0,059	-0,059
<i>Caldilinea</i>	-0,991	0,585	0,585	0,585
<i>Candidatus_Scalindua</i>	0,763	-0,059	-0,059	-0,059
<i>CandidatusBrocadia</i>	0,236	-0,867	-0,867	-0,867
<i>Denitratisoma</i>	0,024	0,707	0,707	0,707
<i>Desulfohalobium</i>	-0,919	0,919	0,919	0,919

<i>Dokdonella</i>	0,472	-0,964	-0,9638	-0,964
<i>Georgfuchsia</i>	-0,690	1,000	1	1,000
<i>Ignavibacterium</i>	0,472	-0,964	-0,9638	-0,964
<i>Leptothrix</i>	-0,646	0,998	0,99827	0,998
<i>Limnobacter</i>	0,024	0,707	0,70711	0,707
<i>Longilinea</i>	-0,585	0,991	0,99083	0,991
<i>Nitrosomonas</i>	0,979	-0,824	-0,824	-0,824
<i>Nitrospira</i>	0,236	-0,867	-0,8666	-0,867
<i>Ornatilinea</i>	0,024	0,707	0,70711	0,707
<i>Thauera</i>	-0,646	0,998	0,99827	0,998
<i>Thermomarinilinea</i>	-0,646	0,998	0,99827	0,998
<i>Thiobacillus</i>	-0,919	0,919	0,91915	0,919
<i>Unclassified chlorobiales</i>	-0,135	0,811	0,81068	0,811
<i>Urania-1B-19_marine_sediment_group</i>	0,024	0,707	0,70711	0,707

## Publicación 3

---

**Título: Effects of salinity on the nitrogen removal efficiency and bacterial community structure in fixed-bed biofilm CANON bioreactors**

**Autores: M.J. García-Ruiz, A. Castellano-Hinojosa, J. González-López, F. Osorio**

**Año: 2018**

**Revista: Chemical Engineering Journal**

**Indicio de calidad: Indexada en JCR.**

**Índice de impacto en JCR: 6,216.**

**Posición: Q1, categoría "Engineering, Chemical"**

**DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.067>**

**Title: Effects of salinity on the nitrogen removal efficiency and bacterial community structure in fixed-bed biofilm CANON bioreactors**

Authors:

**M. J. García-Ruiz<sup>1\*</sup>, A. Castellano-Hinojosa<sup>1</sup>, J. González-López<sup>1</sup>, F. Osorio<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Water, University of Granada, Ramón y Cajal Street, 4, 18071, Granada, Spain

<sup>2</sup>Department of Civil Engineering, Campus of Fuentenueva, University of Granada, 18071, Granada, Spain

\* Corresponding author: Email: mjgruiz@ugr.es, Phone: 34-958249463

**Abstract**

The discovery of anaerobic ammonium oxidation processes led to the development of innovative nitrogen removal technologies, which are more cost-effective and environmentally friendly than conventional activated sludge systems. In this study, the bacterial community structure was determined as well as the nitrogen removal efficiencies in four fixed-bed biofilm bioreactors, working under different salt concentrations (0, 3, 25, and 45 g L<sup>-1</sup> of sodium chloride (NaCl)) and at hydraulic retention times (HRT) of 6 and 12 h. The influent total nitrogen concentration was 250 mg L<sup>-1</sup>. The results showed a clear inhibition in the nitrogen removal capacity of the process that was directly related to the salt concentration in the influent, most likely due to changes in the bacterial community structure; increases in the NaCl concentration provoked the inhibition of *Candidatus Brocardia* and *Nitrosomonas*, whereas heterotrophic phylotypes such as *Marinobacter* proliferated. An evident adaptation of the anammox microorganisms at 3 g NaCl L<sup>-1</sup> was observed, whereas ammonia and nitrite oxidizing bacteria drastically decreased at 25 and 45 g NaCl L<sup>-1</sup>. Total nitrogen efficiencies for 6h of HRT were 87.68, 64.25, 38.79, and 19.74%, for 0, 3, 25, and 45 g NaCl L<sup>-1</sup>, respectively. No significant effects were detected on the performance of the bioreactors and bacterial diversity under different HRT. Our study may be useful for the implementation of CANON

systems at real-scale, by increasing the knowledge on the bacterial community at different NaCl concentrations and the performance of this novel technology for saline wastewater treatment.

### **Keywords**

Nitrogen removal, anammox, Salinity effect, fixed-bed biofilm, heterotrophic nitrification, 16S rRNA sequencing.

### **Introduction**

For many years, nitrogen has been removed from wastewater using activated sludge technology, which comprises nitrification and denitrification as essential biochemical steps. However, the requirements of the Directive 91/271/EEC highlight the development of new biotechnological processes for water management solutions. In this way, the discovery of the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process about two decades ago led to the development of autotrophic nitrogen removal technologies, which are more cost-effective and environmentally friendly than conventional activated sludge systems due to the lower oxygen consumption needed for nitrogen removal [1,2]. The developed technologies – such as the partial nitrification/anammox process, DEamMONification (DEMON) process, Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrate (CANON) process, and the ANITA™ MOX process – have a high potential efficiency for nitrogen removal in a complex transformation to dinitrogen gas. In this way, the application of these autotrophic nitrogen removal technologies should also be regarded as innovative and cost-efficient solutions in wastewater treatment (WWT) plants.

The main advantages of autotrophic processes in comparison with nitrification–denitrification processes are lower sludge generation, no requirements for an external carbon source, and cost savings from aeration as only half of the ammonia needs to be converted to nitrite [3]. Nitrogen removal via anammox requires equimolar concentrations of ammonium and nitrite. Under general conditions, wastewater contains high concentrations of ammonium and low concentrations of nitrite. Thus, the ammonium is converted to nitrite in a partial nitrification for the anammox reaction to take place. Therefore, the purpose of the anammox system is to first

oxidise half the ammonium from the influent to nitrite, and then, in the second reactor, remove all ammonium and nitrite [4]. The main issue is that these processes occur under two different environmental conditions: partial nitrification requires aerobic conditions, whereas the anammox process occurs under anaerobic conditions and without requirements of a carbon source. The practical application of this technology has been developed as single (CANON, ANITA™ MOX, and DEMON systems) or double (partial nitrification/anammox) bioreactor WWT technologies.

CANON technology achieves nitrogen removal through the anammox reaction, allowing coexistence between aerobic ammonium oxidising microorganisms and anaerobic ammonium oxidisers, due to the configuration of biomass in the same reactor under constant oxygen conditions (microaerophilic concentrations) at the same time [5]. The strong limitation of oxygen allows the oxidation of ammonium to form nitrite, while avoiding the oxidation of nitrite to nitrate, thus creating ideal environmental conditions for the anammox reaction to take place [6]. In the CANON reactor, partial nitrification and anammox occur simultaneously due to the nature of its spontaneously-generated biomass. Some authors have reported that 63% of the aeration energy is saved compared to conventional nitrification–denitrification nitrogen removal systems [7].

Salinity in municipal wastewater ranges between 0.7–3.0 mS cm<sup>-1</sup> electrical conductivity [8]. Many industrial processes generate effluents with high-salinity and, among others, the use of salt for cooking, snow melting activities, and utilisation of marine water for toilet flushing can raise salinity in wastewater [9]. Control of salinity is an important parameter in WWT plants due to the effect it has on microbial communities and the performance of systems, reducing the bioavailability of compounds or generating bacterial lysis by osmotic pressure [8].

The presence of high-salinity in anammox systems had been studied deeply in the last decade, and the results confirm that although the response depends on the salt concentration, the performance is usually satisfactory in average salinity urban wastewater, indicating that the enriched anammox consortium is sufficiently adapted to 15 g NaCl L<sup>-1</sup> [10] without affecting

the specific anammox activity [11]. Furthermore, high salinity does not have a long-time harmful effect on the configuration of the biomass, and even promotes the anammox biomass [12]; a concentration of between 3–15 g NaCl L<sup>-1</sup> causes an increase in specific anammox activity for adapted and non-adapted biomass [11].

Although autotrophic nitrogen removal technologies are widely used for industrial WWT at high temperatures and at high salinity due to their high rates of nitrogen removal, specific anammox activity and the capacity to remove nitrogen has been shown to be lowered in saline concentrations of up to 30 g NaCl L<sup>-1</sup> [11]. Gonzalez-Silva et al. [3] found that *Candidatus Brocadia* dominated under low salinity (0–3 g NaCl L<sup>-1</sup>), while *Candidatus Kuenenia* dominated in anammox communities acclimated to salinities of up to 30 g NaCl L<sup>-1</sup>. These results suggest that although the anammox communities adapt to different saline conditions, the increase in salinity determines changes in bacterial diversity populations including the anammox bacteria.

In nitrification–denitrification processes, it has been shown that high-salinity has a definitive impact [13] in the microbiome as a consequence of significant changes in the microbial community structure due to salinity stress, including a clear inhibition of the ammonia-oxidizing bacteria, AOB, microbial populations [14–16]. It is also known that nitrite oxidisers are more sensitive to high salinity concentration than ammonium oxidisers; Schenk and Hegemann [17] and Dincer and Kargi [18] suggested that the response of the microbial populations to high saline concentrations depends on the microbial group. Moreover, many different studies have reported the inhibitory effect of saline on the performance of nitrogen removal activity in WWT systems. Y. Wang et al. [19] reported that 20 g L<sup>-1</sup> of salt significantly decreased the ammonium removal capacity of the bioreactors treated, and in the same context, Z. Wang et al. [20] did not achieve effective ammonium removal from wastewater with salt concentrations higher than 40 g L<sup>-1</sup>.

Although several studies have been carried out to determine the effect that salinity has on the anammox processes, very few have reported adaptation strategies of anammox bacteria to



wastewater containing salt. In this sense, Kartal et al. [21] conducted a study investigating the adaptation of a freshwater anammox population to high-salinity wastewater. They reported that the anammox bacteria from a freshwater system successfully adapted to salt concentrations that gradually increased to as high as  $30 \text{ g L}^{-1}$ . In a similar study, Bassin et al. [22] explored the effect of different salt acclimatisation strategies on the microbial diversity, activity, and settling properties of a nitrifying sludge including anammox microorganisms, with the objective of developing microbial communities adapted to high salt concentrations, thus increasing the efficiency of WWT processes. Consequently, building a microbial community of salt-tolerant halophilic microorganisms that can improve the adaptability of systems is key to treating high-salinity wastewater. Unfortunately, the applications of adapted microbial populations to high saline concentrations at real-scale are practically unknown [23,24].

From a technical point of view, system configuration and experimental conditions such as pH, temperature, and the presence of inhibitory compounds are factors that directly influence the effect of saline on the nitrification process. Furthermore, the variable or constant saline concentration in the influent can significantly change the efficiency of the treatment and the adaptation capacity of the microbial community. In any case, it is necessary to seek technical solutions to achieve nutrient removal (particularly ammonium) in biological systems with high-salinity influents. In addition, to allow the improvement and optimisation of processes, with the aim of increasing the efficiency of nitrogen removal, knowledge of the diversity of nitrifying microorganisms that inhabit bioreactors operating under saline conditions can be essential. Particularly, there are no scientific references on the influence that salt concentrations exert on fixed-bed biofilm CANON systems, which is of great technical importance.

In this study, we investigated the adaptation and change of the microbial community as well as the nitrogen removal efficiencies in four fixed-bed biofilm CANON bioreactors working under different salt concentrations (0, 3, 25, and  $45 \text{ g NaCl L}^{-1}$ ). These concentrations have been adopted on the basis of previous research [9,25,26]. The results of our study may be important for the implementation of fixed-bed biofilm CANON systems at full-scale, increasing the

knowledge of the response of the microbial community to different saline concentrations and consequently the performance of this biotechnological process at different saline influents.

## Materials and methods

### Experimental set-up

Four bioreactors were configured as a submerged bed using Filtralite as support material. Filtralite is a granular material of a clay-like nature with high rate of porosity (see Table S1 in supplementary material for further characteristics).

The bioreactors operated in parallel and were mounted on a bench-scale to evaluate the total nitrogen removal at different saline concentrations: 0, 3, 25, and 45 g NaCl L<sup>-1</sup>. These bioreactors were named R0, R1, R2, and R3, respectively. The bioreactor unit volume was 2 L, and they were simultaneously inoculated with 10% of the total volume. The inoculum was from the full scale Anammox plant of Olburgen with high efficiency of nitrogen removal (The Netherlands: 52°23'89.96"N, 5°97'92.96"E). A schematic diagram of the plant is shown in Fig. 1.

All the bioreactors operated under the same environmental conditions [27], but with different salinity levels. The influent total nitrogen concentration was 250 mg L<sup>-1</sup>. The pH, temperature, and dissolved oxygen remained constant: the pH was maintained in the range 7.0–8.0, suitable for the correct operation of the involved microbial populations [28], when needed pH values was adjusted to 7.2 using HCl 0.1 N. The temperature was maintained constant at 35°C, all the reactors were inside a thermostatic chamber that maintained the temperature constant. This temperature was checked with thermometers in each reactor. And the dissolved oxygen was maintained in the range of 1.5–2 mg L<sup>-1</sup> by aeration with an air pump and diffusers located at the bottom of the bioreactors, air flow range was 2–4 L min<sup>-1</sup>. The four bioreactors ran in a continuous mode at a hydraulic retention time (HRT) of 6 h during phase I and at a HRT of 12 h during phase II. The operational period of phase I was 60 days, and after this time, the flow rate

was decreased and thus the HRT was increased. The operational period of phase II was also 60 days.

The influent used in this study was a standard synthetic urban wastewater, previously described in other research [29,30]. The mineral medium used in this study was the same for all bioreactors except saline concentration; the necessary amount of NaCl was added to the influent of each reactor. This influent contained (in  $\text{g L}^{-1}$ ):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1.17),  $\text{NaHCO}_3$  (3.25),  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.3),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.07),  $\text{MgSO}_4$  (0.02), and trace elements ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).

Each bioreactor was continuously fed by a peristaltic pump (Watson Marlow s-520), which pumped the synthetic water at a constant flow rate ( $0.333 \text{ L h}^{-1}$  in phase I and  $0.166 \text{ L h}^{-1}$  in phase II) from an inlet tank containing the respective influent. A summary of operational conditions is shown in Table 1.

#### Analytical methods

In this experiment, the concentrations of ammonium, nitrite, and nitrate of the effluents of each bioreactor were measured daily, as well as the ammonium concentrations of each influent. For this purpose, a Metrohm ionic chromatograph was used, which measured the ammonium concentration with a cation column Metrosep C2-150, and the nitrite and nitrate concentrations with an anion column Metrosep A sup-4-250. Calibration curves were developed with the following concentrations: 10, 200, and  $500 \text{ mg L}^{-1}$  [30]. The pH and DO were daily monitored used portables instruments in order to verify that they remained stable. Microbiological studies

#### *Sample collection*

Biomass samples from the biofilm formed on the carriers were collected at 15, 30, and 60 days from the beginning of the experiment in phase I (samples A, B, C, respectively) and at 75, 90,

and 120 days from the beginning of the experiment in phase II (samples D, E, F, respectively). The biofilm was obtained from 5 carriers located at different heights for each bioreactor (5, 20, and 45 cm). Carrier samples were submerged in saline solution (0.9% NaCl), vortexed, and sonicated for 3 minutes to separate the biomass adhered to them. Then, biomass was separated by centrifugation at 3000 rpm for 15 min at room temperature to form a pellet. Finally, pellet samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further DNA extraction.

#### *Nucleic acid extraction and purification.*

The FastDNA-SPIN kit for Soil and the FastPrep24 instrument (MP-Bio, Santa Ana, CA, USA) were used for the extraction and purification of genomic DNA, according to previous protocols [31]. Quality and size of DNA were checked by electrophoresis on 1% agarose and DNA concentration was measured using NanoDrop™ spectrophotometer. DNA was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

#### *Illumina sequencing*

The composition of the bacterial community was determined by Illumina sequencing using the Illumina MiSeq Reagent Kit v3 and the Illumina MiSeq apparatus (Illumina, Hayward, CA, USA), Research and Testing Laboratory (Lubbock, Texas, USA, <http://www.researchandtesting.com>). Hypervariable V1–V3 regions of the 16S rRNA gene of bacteria were amplified using the forward primer 530F (5'-CCGCNGCNGCTGGCAC-3') and reverse primer 909R (5'-CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3').

The raw data, obtained through a high-throughput sequencing process, were analysed in Mothur V1.39.5 software (<http://www.mothur.org>). First, sequences were assembled into contigs and then were subjected to a quality trimming to eliminate poor-quality end reads. Briefly, low-quality and chimera sequences were removed using UCHIME v4.2.40 implemented in Mothur V1.39.5 [32]. In order to define the operational taxonomic unit at the 97% similarity level

(OTU), a Phylip matrix was performed. Finally, high-quality sequences that passed the chimera procedure were classified with the Midas database [33].

Heat maps were generated accounting for all consensus OTUs with at least 1% relative abundance in at least one of the biological samples, in order to determine the differences of the most represented bacterial OTUs within them. Hill diversity indices of order 1 (Shannon index) and order 2 (Simpson index) were calculated for each sample using PAST v.3.06 software [34]. Redundancy abundance-weighted coverage analysis was done using NonPareil software [35]. Primer software (PRIMER-E v. 6.1.18, Plymouth, UK) was used for cluster analysis and to generate a dendrogram using the UPGMA algorithm. The cluster analysis was based on sample-resemblance matrices generated using the Bray–Curtis coefficient of similarity matrix.

#### *Statistical analysis*

The biotic data were analysed with Primer software v.6.1.18 (PRIMER-E, Plymouth, UK). Sample-resemblance matrices were generated with the Bray–Curtis coefficient of similarity. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) and 2D ordination plots of the biological data were calculated based on the similarity matrix [31]. According to Clarke and Warwick [36], stress levels of non-metric multidimensional scaling plots  $<0.2$  indicate a good fit for the representation of the variables' data along two axes.

All the operational and environmental data were transformed ( $\log(x+1)$ ) and normalised, and the biotic data from Illumina sequencing were standardised by total [31]. The biotic and operational/environmental variables were represented in vector forms generated by a multiple correlation algorithm, which indicates the correlation between the biotic and the operational/environmental variables. To this end, Spearman's rank coefficients and Pearson's correlation coefficients ( $r$ ) were calculated. Finally, a BEST analysis determined the operational/environmental variables that had the most influence on the community ordination. The significance of the vector and BEST analyses was shown by a sample using a global permutation test (with 499 permutations).

## Results and Discussions

At the end of phase I, the R0 bioreactor (without added NaCl) was working optimally as a fixed-bed biofilm CANON system configured in a single reactor, reaching 87.68% of total nitrogen removal. The system stabilises in these yields after approximately 40 days from the start up (see Fig. 2). R1, R2, and R3 bioreactors, where NaCl was added at concentrations of 3, 25, and 45 g L<sup>-1</sup> [37], had a decreased nitrogen removal capacity; the total nitrogen removal efficiencies detected in the R1, R2, and R3 bioreactors were 64.49%, 38.42%, and 19.88% respectively. In the same context, they respectively reached 78.78%, 53.10%, and 25.28% of ammonia nitrogen removal (see Table 1). These values are the averages of the yields obtained in the final 15 days of operation in phase I (days 45–60). Moreover, after 15 days of bioreactor operation (Fig. 2) it can be observed that, whereas the total nitrogen removal efficiency was high in the R0 bioreactor (64% total nitrogen removal, NTE), in the R1, R2, and R3 bioreactors the total nitrogen removal capacity was evidently inhibited (18.33%, 20.02%, and 5.22% respectively) [38].

From Fig. 2, it is possible to analyse the accumulations of other nitrogen compounds (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) during phase I in order to understand the microbial activities established in each reactor. After 15 days of R0 bioreactor operation, the NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N concentration was very low (Fig. 2), and after 25 days, it showed less accumulation of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N than NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N. Furthermore, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N concentrations were henceforth stable in the R0 bioreactor for the remainder of the experiment, with a NAR ratio [38] (nitrogen accumulation in the form of nitrite/nitrogen in the nitrite plus nitrate forms) of 2.72%. Previous studies on the stoichiometric reactions that take place in a granular CANON system have revealed that a certain amount of nitrates are produced – around 10%. In our case, we obtained similar results in fixed-bed biofilm CANON bioreactors, corroborating previous references [39].

When the reactors were amended with NaCl, different behaviours were observed within them. In this sense, it was observed that the R1 bioreactor showed a significant accumulation of nitrite

at the beginning of the experiment (1–25 days), decreasing from that moment to values of 8.47 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> after 60 days of operation.

Table 2 shows the effluent concentrations of different nitrogen compounds and NAR for each bioreactor at the end of phases I and II (after 60 and 120 days respectively). The bacterial community remained largely unchanged in the R0 bioreactor, however the microbiological study of the R1 bioreactor suggests an adaptation of the anammox microorganisms to the 3 g NaCl L<sup>-1</sup> saline influent during phase I (Fig. 3A). It was observed that after 15 days, the abundance of *Candidatus Brocadia* was 4.02%, and at the end of the phase (day 60) the abundance of *Candidatus Brocadia* was 11.67%. However, AOB were clearly affected by the presence of 3 g NaCl L<sup>-1</sup> in the wastewater treated; after 15 days the abundance of *Nitrosomonas* was 25.78%, whereas by 60 days the abundance of this microbial group was reduced to 8.26% of the total population. These data could indicate that although *Nitrosomonas* represents the most important OTU within the AOB bacteria, its relative abundance was reduced by the presence of a certain salinity.

When the microbial community was studied in the fixed-bed biofilm CANON bioreactors with 25 and 45 g NaCl L<sup>-1</sup> (bioreactors R2 and R3), AOB and nitrite-oxidizing bacteria, NOB, populations were drastically affected (Figs. 3A and 3B). The literature offers differing findings in this sense. Yang et al. [40] suggested that inhibition of the ammonium oxidising microbiota occurs at saline concentrations greater than 20 g NaCl L<sup>-1</sup>, and in the same way, in a sequencing batch reactor treating hypersaline wastewater, Cui et al. [41] reported that salinity inhibited AOB activity as well as the number of dominant AOB, but did not significantly affect the dominant AOB species. However, some authors have found AOB activity even for salinity levels above 33 g NaCl L<sup>-1</sup> [22] and 50 g NaCl L<sup>-1</sup> [42,43]. In our study, the effluents treated in bioreactors R2 and R3 showed very low values of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N, and only in the case of R2, a certain accumulation of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N was observed. It is known that NOB are more sensitive to high salinity than AOB [3,18,44,45], resulting in an accumulation of this nitrogenous form in the effluent. Thus, the concentrations of nitrogen compounds at the end of phase I (60 days of bioreactor

operation) were clearly different between the R2 and R3 bioreactors. Effluents produced in the R2 bioreactor contained 130.23 mg  $\text{NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$ , 27.26 mg  $\text{NO}_2^-\text{-N L}^{-1}$ , and 11.49 mg  $\text{NO}_3^-\text{-N L}^{-1}$ ; while effluents produced in the R3 bioreactor contained 178.46 mg  $\text{NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$ , 6.65 mg  $\text{NO}_2^-\text{-N L}^{-1}$ , and 7.05 mg  $\text{NO}_3^-\text{-N L}^{-1}$ . As already indicated, the NTEs reached at the end of phase I were 38.79% and 19.74% for R2 and R3 respectively.

Obviously, an increase in the saline concentration directly affects the nitrogen biotransformation capacity of the system with a clear inhibition of the autotrophic microbial community. Particularly, under high salinity conditions (25 and 45 g  $\text{NaCl L}^{-1}$ ) and in both phase I and II (Figs. 3A and 3B), a notable proliferation of heterotrophic microorganisms such as *Marinobacter* species was observed, able to remove up to 50% of total nitrogen in hypersaline influents [47,48]. This increase in heterotrophic groups in the reactor with the highest NaCl concentration could be explained as a consequence of cell lysis, as organic matter was not added. Moreover, a proliferation of other bacterial groups was noted – such as *Pseudomonas*, *Denitratisomas*, and *Halomonas* – that, although present with a lower abundance, could also contribute to the nitrogen biotransformation [14,47,48,49]. Thus, some of these genera could be implicated in nitrogen removal as many studies recently reported [20,43]. Finally, it is noteworthy that, while *Nitrosomonas* had an abundance in the R2 bioreactor of 8.26% of the total population, it was not detected in the R3 bioreactor, confirming the sensitivity of these microbial populations to high salinity [41].

. The aforementioned results seem to indicate that increasing the HRT from 6 to 12 h does not improve the performance of the bioreactors under salinity conditions, especially when the bioreactors are fed with high NaCl concentrations. An explanation to this fact can be related to the changes observed in the microbial communities involved in the biotransformation of N such as the anammox bacteria and AOB. Similar results that can support our observations have been previously reported by other authors [50]. However, in order to confirm our results, it would be necessary evaluate the microbial activity in the bioreactors through metatranscriptomic studies. From Table 1 we can see a worsening of the efficiencies of total nitrogen and ammoniacal



nitrogen removal in all four of the bioreactors. The R1 bioreactor showed an efficiency of 64.49% NTE working at an HRT of 6 h (phase I), however at an HRT of 12 h (phase II) the efficiency dropped to 51.93% NTE. Analysis of the R1 microbial community showed that in phase II, anammox bacteria were affected considerably, with the population of *Candidatus Brocadia* reduced to 2.48% of the total microbiota, disappearing when salinity increased from this level (Fig. 3B) In this sense, our data are in agreement with Zhang et al. [50,51], who reported that *Candidatus Brocadia* began to decrease when salinity was greater than 10 g NaCl L<sup>-1</sup>.

Total nitrogen removal capacity in the R2 bioreactor was 32.72% in phase II. However, the ammoniacal nitrogen removal was practically the same as that in phase I (52.71%). These results are likely a consequence of similar microbial communities in both phases, independent of the HRT used (Fig. 3A and 3B).

The relative abundance of *Marinobacter* was observed to be higher in the R2 bioreactor respect to R1 bioreactor in both phases. These microorganisms have been previously reported in halophilic environments and are involved in nitrogen removal [52]. Moreover, R1 and R2 bioreactors showed an accumulation of nitrite (32.04 and 39.24 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> in R1 and R2 respectively). These results can be explained by a relative increase in the microbial community of *Nitrosomonas* and a clear inhibition of the nitrite oxidising bacteria, which results in an accumulation of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N in the treated water. Furthermore, it is known that the accumulation of nitrites is an inhibitor of anammox processes [53,54].

Finally, when the NaCl concentration and HRT were increased to 45 g NaCl L<sup>-1</sup> and 12 h (R3 bioreactor, phase II), a decrease in the efficiencies of total nitrogen and ammonia nitrogen removal was observed, reaching values of 14.80% NTE and 20.28% NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N removal. In this case, a decrease in the relative abundance of *Marinobacter* was also detected within the microbial community of the R3 bioreactor (Fig. 3B). These microorganisms have been reported to have significant nitrogen removal capacity in halophilic environments [46,47]. Moreover, no

accumulation of  $\text{NO}_2^-$ -N or  $\text{NO}_3^-$ -N was detected in the effluent of the R3 bioreactor, with values of  $6.04 \text{ mg NO}_2^- \text{ N L}^{-1}$  and  $5.21 \text{ mg NO}_3^- \text{ N L}^{-1}$  after 90 days of bioreactor operation.

The richness of the bacterial species varied along the experimental period in all four fixed-bed biofilm CANON bioreactors (Table S2). The highest richness values were detected in the R2 bioreactor, both in phase I (319–301) and in phase II (289–257), followed by the R3 bioreactor (196–253 and 280–249 respectively). The number of OTUs in the R0 bioreactor remained largely unchanged (average 191–227), whereas slightly lower values were detected in the R1 bioreactor, especially towards the end of the experimental period (200 taxa). Results of  $\alpha$ -diversity index analyses showed that the addition of salt increased the bacterial diversity in the bioreactors with added NaCl along the experimental period with respect to the R0 bioreactor. In this sense, Shannon index values were similar in the R2 and R3 bioreactors (2.9355 and 2.9235 respectively), followed by the R1 (2.4343) and finally R0 (2.003) bioreactors. This tendency was confirmed by the Simpson index of order 2; the values of which, in increasing order, are as follows: R1 (0.8616), R2 (0.8901), and R3 (0.8951) bioreactors, as compared to R0 bioreactor (0.7445). Redundancy abundance-weighted coverage analysis showed a coverage higher than 97% for all of the sequencing samples.

The plots in Fig. 4 display the NMDS ordinations of the bioreactors according to the relative abundance of bacterial OTUs derived from Illumina sequencing. Samples from the R1, R2, and R3 bioreactors were grouped in isolated groups for each salinity concentration in both phase I and II. In this sense, similar results were obtained when a cluster analysis was performed using the relative abundance of OTUs in Illumina sequencing samples for each bioreactor (Fig. S1). Thus, samples were clustered in four main groups as stated by the salinity concentration.

According to the BEST analysis, the operational/environmental variables that had the most influence on the community ordination were salinity in phase I and NTE and salinity in phase II (86.7% and 86.8% respectively), explaining the ordination of OTUs (Figs. 4A and 4B). NMDS ordinations confirmed a strong positive correlation of salinity with NTE in both phase I and II

(Figs. 4A and 4B). It was noteworthy that the salinity was negatively correlated with  $\text{NO}_3^-$ -N accumulation. NMDS analysis showed that the OTUs joined in two main groups based on the influence of the NaCl concentration. Among them, *Candidatus Brocadia* and *Nitrosomonas* were related to samples from R0 and R1 bioreactors, whereas *Limnobacter*, *oca15*, and *Marinobacter* positively correlated with salinity and then with samples from the R3 bioreactor (Fig. 4A and 4B).

The SIMPER analysis showed the contribution of each OTU to the dis(similarity) between different bioreactors either in phase I (Table S3) or in phase II (Table S4). Bacterial community compositions in the bioreactors were subjected to each NaCl concentration, and the composition of the total populations diverged. SIMPER calculated which OTUs played a key role in the similarity among samples from bioreactors; a very low number (5–12 OTUs) accounted more than 90% of explanation. During phase I, the R0 bioreactor was the most stable (82.28% similarity), followed by R1 (75.38% similarity), R3 (69.61% similarity), and finally R2 (60.29% similarity). A similar tendency was observed during phase II, although the percentages of similarities increased by around 10% in each bioreactor (Table S4). *Candidatus Brocadia* and *Nitrosomonas* contributed the most to explain the similarity of the bacteria community among the samples from R0 bioreactor (34.71 and 32.59% respectively), while *oca15* and *Nitrosomonas* each contributed >26% to the similarity in the R1 bioreactor. *Nitrosomonas* also contributed 16.95% towards the similarity in the R3 bioreactor, with *Marinobacter* and *Limnobacter* contributing a further >23% and >16% respectively. It is noted that some of the OTUs found in the R3 bioreactor – such as *Marinobacter*, *Halomonas*, and *Thiobacillus* – have been previously described as efficient nitrogen removal groups [46,47,55,56]. SIMPER analysis also showed that the R3 bioreactor had the most dissimilarity, with 97.72% and 98.21% of dissimilarity with respect to R0 during phase I and II respectively. Among the bioreactors with added NaCl, regardless of the phase of operation, R2 and R3 had the most similarity (on average 57.44% dissimilarity), followed by R1 and R3 (on average 62.70% dissimilarity), and finally R1 and R2 (on average 66.61% dissimilarity).

## Conclusions

The results obtained in our study showed an evident inhibition in the nitrogen removal capacity when influents with high NaCl concentrations were treated in fixed-bed biofilm CANON bioreactors. The effect of increased salinity on the bacterial community structure was mainly due to the inhibition of *Candidatus Brocardia* and *Nitrosomonas* whereas some microorganisms such as *Marinobacter* and *Limnobacter* were favoured. Moreover, an adaptation of the autotrophic ammonium oxidising (anammox) bacteria at 3 g NaCl L<sup>-1</sup> was observed, whereas AOB and NOB populations were drastically decreased at 25 and 45 g NaCl L<sup>-1</sup> concentrations. However, no significant effects of the HRT were observed on performance and bacterial diversity in the CANON bioreactors under the same NaCl condition.

## References

- [1] A. Gonzalez-Martinez, A. Rodriguez-Sanchez, B. Rodelas, B. Abbas, M.V. Martinez-Toledo, M.C.M. van Loosdrecht, F. Osorio, J. Gonzalez-Lopez, 454-Pyrosequencing analysis of bacterial communities from autotrophic nitrogen removal bioreactors utilizing universal primers: effect of annealing temperature, *BioMed Res. Int.* (2015), 892013 (Open Access).
- [2] W. Li, X.Y. Lin, J.J. Chen, C.Y. Cai, G. Abbas, Z.Q. Hu, P. Zheng, Enrichment of denitrating bacteria from a methylotrophic denitrifying culture, *Appl. Microb. Biotechnol.* 100, 23 (2016) 10203–10213.
- [3] B.M. Gonzalez-Silva, A.J. Rønning, I.K. Andreassen, I. Bakke, F.J. Cervantes, K. Østgaard, O. Vadstein, Changes in the microbial community of an anammox consortium during adaptation to marine conditions revealed by 454 pyrosequencing, *Appl Microbiol Biotechnol.* 101 (2017) 5149–5162.
- [4] A. González-Martinez, F. Osorio, J.A. Morillo, A. Rodriguez-Sanchez, J. Gonzalez-Lopez, B.A. Abbas, M.C.M. van Loosdrecht, Comparison of Bacterial Diversity in Full Scale Anammox Bioreactors Operated Under Different Conditions, *Biotechnol. Prog.* 31 (2015) 1464–1472.

- [5] A. González-Martínez, A. Rodríguez-Sánchez, M.J. García-Ruiz, B. Muñoz-Palazon, C. Cortés-Lorenzo, F. Osorio, R. Vahala, Performance and bacterial community dynamics of a CANON bioreactor acclimated from high to low operational temperatures, *Chem. Eng. J.* 287 (2016) 557–567.
- [6] M. Nielsen, A. Bollmann, O. Sliemers, M. Jetten, M. Schmid, M. Strous, N.P. Revsbech, Kinetics, diffusional limitation and microscale distribution of chemistry and organisms in a CANON reactor, *FEMS Microbiol. Ecol.* 51 (2005) 247–256.
- [7] T. Liu, D. Li, H. Zeng, X. Li, T. Zeng, X. Chang, Y. Cai, J. Zhang, Biodiversity and quantification of functional bacteria in completely autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON) process, *Bioresour. Technol.* 118 (2012) 399–406.
- [8] A. Rodríguez-Sánchez, J.C. Leyva-Díaz, A. González-Martínez, J.M. Poyatos, Linkage of microbial kinetics and bacterial community structure of MBR and hybrid MBBR–MBR systems to treat salinity-amended urban wastewater, *Biotechnol. Prog.* 33, 6 (2017) 1483–1495.
- [9] C. Cortés-Lorenzo, M. Rodríguez-Díaz, C. López-López, M. Sánchez-Peinado, B. Rodelas, J. González-López, Effect of salinity on enzymatic activities in a submerged fixed bed biofilm reactor for municipal sewage, *Bioresour. Technol.* 121 (2012) 312–319.
- [10] X.P. Yang, S.M. Wang, D.W. Zhang, L.X. Zhou, Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying–denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* AI, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 854–862.
- [11] A. Dapena-Mora, J. Vázquez-Padín, J. Campos, A. Mosquera-Corral, M. Jetten, R. Méndez, Monitoring the stability of an anammox reactor under high salinity conditions, *Biochem. Eng. J.* 51 (2010) 167–171.
- [12] D.R. Speth, I. Lagkourdos, Y. Wang, Draft Genome of *Scalindua rubra* obtained from the interface above the discovery deep brine in the red sea, sheds light on potential salt adaptation strategies in anammox bacteria, *Microb. Ecol.* 74 (2017), 1-5.

- [13] J. Colt, J. Tomasso, Hatchery water supply and treatment, in: G.A. Wedemeyer (Ed.), Fish hatchery management, second ed., American Fisheries Society, Bethesda, (2001), 91–186.
- [14] A. Uygur, SpeciWc nutrient removal rates in saline wastewater treatment using sequencing batch reactor, Proc. Biochem. 41 (2006) 61–66.
- [15] E.R. Rene, S.J. Kim, H.S. Park, Effect of COD/N ratio and salinity on the performance of sequencing batch reactors, Bioresour. Technol. 99 (2008) 839–846.
- [16] Q. Fontenot, C. Bonvillain, M. Kilgen, R. Boopathy, Effects of temperature, salinity, and carbon: nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater, Bioresour. Technol. 98 (2007) 1700–1703.
- [17] H. Schenk, W. Hegemann, Inhibition of nitrification by high salt concentrations in the aerobic biological treatment of tannery wastewater, Gwf, Wasser-Abwasser, 136 (1995) 465–470.
- [18] A.R. Dincer, F. Kargi, Performance of rotating biological disc system treating saline wastewater, Process Biochem. 36 (2001) 901–906.
- [19] Y. Wang, J. Chen, S. Zhou, X. Wang, Y. Chen, X. Lin, Y. Yan, X. Ma, M. Wu, H. Han, 16S rRNA gene high-throughput sequencing reveals shift in nitrogen conversion related microorganisms in a CANON system in response to salt stress, Chem. Eng. J. 317 (2017) 512–521.
- [20] Z. Wang, G. Luo, J. Li, S.Y. Chen, Y. Li, W.T. Li, A.M. Li, Response of performance and ammonia oxidizing bacteria community to high salinity stress in membrane bioreactor with elevated ammonia loading, Bioresour. Technol. 216 (2016) 714–721.
- [21] B. Kartal, J. Rattray, L.A. van Niftrik, J. van de Vossenberg, M.C. Schmid, R.I. Webb, S. Schouten, J.A. Fuerst, J.S. Damsté, M.S. Jetten, *Candidatus “Anammoxoglobus propionicus”* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria, Syst. Appl. Microbiol. 30 (2007) 39–49.

- [22] J.P. Bassin, M. Pronk, G. Muyzer, R. Kleerebezem, M. Dezotti, M.C.M. van Loosdrecht, Effect of elevated salt concentrations on the aerobic granular sludge process: linking microbial activity with microbial community structure, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 7942–7953.
- [23] M. Chen, W. Wang, Y. Feng, X. Zhu, H. Zhou, Z. Tan, X. Li, Impact resistance of different factors on ammonia removal by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium *Aeromonas sp.* HN-02, *Bioresour. Technol.* 167 (2014) 456–461.
- [24] J. Duan, H. Fang, B. Su, J. Chen, J. Lin, Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater, *Bioresour. Technol.* 179 (2015) 421–428.
- [25] C. Glass, J. Silverstein, Denitrification of high-nitrate high-salinity wastewater, *Water Res.* 33 (1999) 223–229.
- [26] A.F. Ramos, M.A. Gómez, E. Hontoria, J. González-López, Biological nitrogen and phenol removal from saline industrial wastewater by submerged fixed-film reactor, *J. Hazard. Mater.* 142 (2007) 175–183.
- [27] S.W.H. Van Hulle, H.J.P. Vandeweyer, B.D. Meesschaert, P.A. Vanrolleghem, P. Dejans, A. Dumoulin, Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams, *Chem. Eng. J.* 162 (2010) 1–20.
- [28] M. Strous, E.V. Gerven, P. Zheng, J.G. Kuenen, M.S.M. Jetten, Ammonium removal from concentrate waste water streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations, *Water Res.* 31 (1997) 1955–1962.
- [29] A. Mosquera-Corral, F. González, J.L. Campos, R. Méndez, Partial nitrification in a Sharon reactor in the presence of salts and organic carbon compounds, *Process Biochem.* 40 (2005) 3109–3118.

- [30] A. González-Martínez, K. Calderón, A. Albuquerque, E. Hontoria, J. González-López, I.M. Guisado, F. Osorio, Biological and technical study of a partial-SHARON reactor at laboratory scale: effect of hydraulic retention time, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36 (2013) 173–184.
- [31] M.J. García-Ruíz, P. Maza-Márquez, J. González-López, F. Osorio, Nitrogen removal capacity and bacterial community dynamics of a Canon biofilter system at different organic matter concentrations, *Chemosphere* 193 (2018) 591–601.
- [32] R.C. Edgar, B.J. Haas, J.C. Clemente, C. Quince, R. Knight, UCHIME improves sensitive and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27 (2011) 2194–2200.
- [33] S.J. McIlroy, A.M. Saunders, M. Albertsen, M. Nierychlo, B. McIlroy, A.A. Hansen, S.M. Karst, J.L. Nielsen, P.H. Nielsen, *MiDAS: the field guide to the microbes of activated sludge, Database*, Oxford, 2015.
- [34] Ø. Hammer, D.A.T. Harper, P.D. Ryan, PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis, *Palaeontol. Electron.* 4 (2001) XIX–XX (Open Access).
- [35] L.M. Rodriguez-R, K.T. Konstantinidis, Estimating coverage in metagenomic data sets and why it matters, *ISME J.* 8 (2014) 2349–2351.
- [36] K.R. Clarke, R.M. Warwick, *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*, Plymouth Marine Laboratory, Plymouth, UK, 2001.
- [37] C. Cortés-Lorenzo, A. González-Martínez, H. Smidt, J. González-López, B. Rodelas, Influence of salinity on fungal communities in a submerged fixed bed bioreactor for wastewater treatment, *Chem. Eng. J.* 285 (2016) 562–572.
- [38] Z. She, L. Zhao, X. Zhang, C. Jin, L. Guo, S. Yang, Y. Zhao, M. Gao, Partial nitrification and denitrification in a sequencing batch reactor treating high-salinity wastewater, *Chemical Engineering Journal* 288 (2016) 207–215.



- [39] Z. Yao, P. Lu, D. Zhang, X. Wan, Y. Li, S. Peng, Stoichiometry and kinetics of the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) with trace hydrazine addition, *Bioresour. Technol.* 198 (2015) 70–76.
- [40] J. Yang, L. Zhang, D. Hira, Y. Fukuzaki, K. Furukawa, Anammox treatment of high-salinity wastewater at ambient temperature, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 2367–2372.
- [41] Y.W. Cui, H.Y. Zhang, J.R. Ding, Y.Z. Peng, The effects of salinity on nitrification using halophilic nitrifiers in a Sequencing Batch Reactor treating hypersaline wastewater, *Sci. Rep.* 6 (2016) 24–25.
- [42] C. Wan, X. Yang, D.J. Lee, X. Liu, S. Sun, C. Chen, Partial nitrification of wastewaters with high NaCl concentrations by aerobic granules in continuous-flow reactor, *Bioresour. Technol.* 152 (2014) 1–6.
- [43] L. Quartaroli, L.C.F. Silva, C.M. Silva, H.S. Lima, Ammonium removal from high-salinity oilfield-produced water: assessing the microbial community dynamics at increasing salt concentrations, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101(2017) 859.
- [44] S. Aslan, E. Simsek, Influence of salinity on partial nitrification in a submerged biofilter, *Bioresour. Technol.* 118 (2012) 24–29.
- [45] Y.Y. Zhao, H.D. Park, J.H. Park, F.S. Zhang, C. Chen, X.K. Li, D. Zhao, F.B. Zhao, Effect of different salinity adaptation on the performance and microbial community in a sequencing batch reactor, *Bioresour. Technol.* 216 (2016) 808–816.
- [46] J. Chen, Y. Han, Y. Wang, B. Gong, J. Zhou, X. Qing, Start-up and microbial communities of a simultaneous nitrogen removal system for high salinity and high nitrogen organic wastewater via heterotrophic nitrification, *Bioresour. Technol.* 216 (2016) 196–202.
- [47] Y. Miao, R. Liao, X-X. Zhang, B. Liu, Y. Li, B. Wu, A. Li, Metagenomic insights into salinity effect on diversity and abundance of denitrifying bacteria and genes in an expanded

granular sludge bed reactor treating high-nitrate wastewater, *Chemical Engineering Journal* 277 (2015) 116–123.

[48] M. Miyahara, S.W. Kim, S. Fushinobu, K. Takaki, T. Yamada, A. Watanabe, K. Miyauchi, G. Endo, T. Wakagi, H. Shoun, Potential of aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* TR2 to reduce nitrous oxide emissions from wastewater treatment plants, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 4619–4625.

[49] R. Du, S. Cao, B. Li, M. Niu, S. Wang, Y. Peng, Performance and microbial community analysis of a novel DEAMOX based on partial-denitrification and anammox treating ammonia and nitrate wastewaters, *Water Res.* 108 (2017) 46–56.

[50] Z.J. Zhang, S.H. Chen, P. Wu, L.F. Lin, H.Y. Luo, Start-up of the canon process from activated sludge under salt stress in a sequencing batch biofilm reactor (SBBR), *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 6309–6314.

[51] B. Xing, Q. Guo, G. Yang, J. Zhang, T. Qin, P. Li, W. Ni, R. Jin, The influences of temperature, salt and calcium concentration on the performance of anaerobic ammonium oxidation (anammox) process, *Chemical Engineering Journal* 265 (2015) 58–66.

[52] S.F. Corsino, M. Capodici, C. Morici, M. Torregrossa, G. Viviani, Simultaneous nitrification–denitrification for the treatment of high-strength nitrogen in hyper saline wastewater by aerobic granular sludge, *Water Res.* 88 (2016) 329–336.

[53] L. Zhang, P. Zheng, C. Tang, R. Jin, Anaerobic ammonium oxidation for treatment of ammonium-rich wastewaters, *J. Zhejiang Univ. Sci.* 9 (2008) 416–426.

[54] D.J. Kim, D.I. Lee, J. Keller, Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH, *Bioresour. Technol.* 3 (2006) 459–468.

[55] T. Wang, J. Li, L.H. Zhang, Y. Yu, Y.M. Zhu, Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at high concentrations of NaCl and ammonia nitrogen by Halomonas bacteria, *Water Sci. Technol.* 2 (2017) 386–395.

[56] J. Wang, B. Gong, Y. Wang, Y. Wen, J. Zhou, Q. He, The potential multiple mechanisms and microbial communities in simultaneous nitrification and denitrification process treating high carbon and nitrogen concentration saline wastewater, *Bioresour. Technol.* 243 (2017) 708–715.

## Figure Captions

**Figure 1.** Scheme of the three bench-scale bioreactors (R0, R1, R2 and R3).

**Figure 2.** Time course of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  and  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  in effluent in the different bioreactors. Bioreactors operated with 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) and 45 (R3) g  $\text{NaCl L}^{-1}$  respectively.

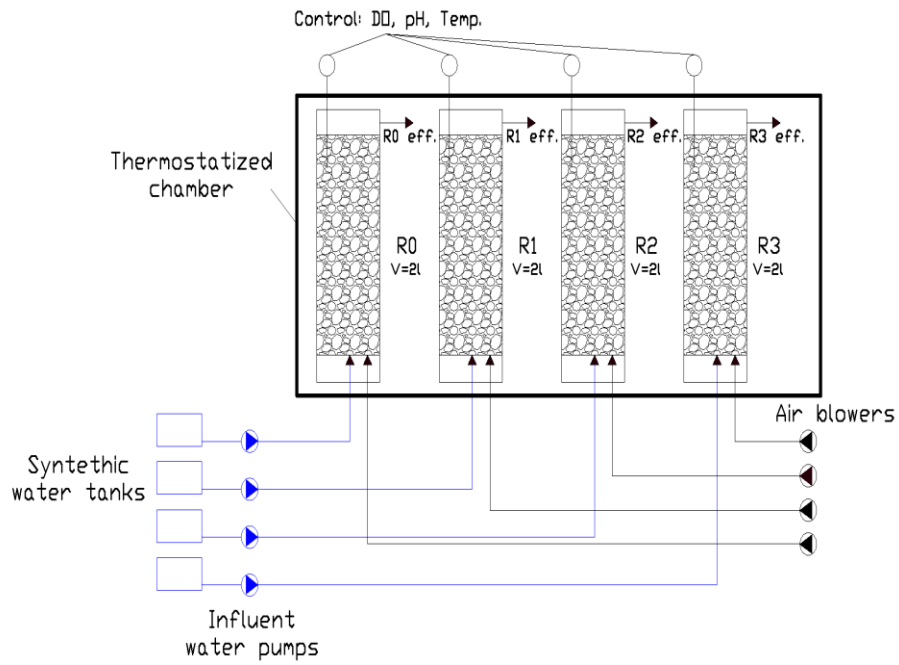
**Figure 3A.** Heatmap of the relative abundances of the OTUs detected by Illumina-sequencing in the different samples: Inoculum (I). Bioreactors operated with 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) and 45 (R3) g  $\text{NaCl L}^{-1}$  respectively. A: 15 days to start the phase I. B: 30 days to start the phase I. C: 60 days to start the phase I.

**Figure 3B.** Heatmap of the relative abundances of the OTUs detected by Illumina-sequencing in the different samples: Inoculum (I). Bioreactors operated with 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) and 45 (R3) g  $\text{NaCl L}^{-1}$  respectively. D: 15 days to start the phase II. E: 30 days to start the phase II. F: 60 days to start the phase II.

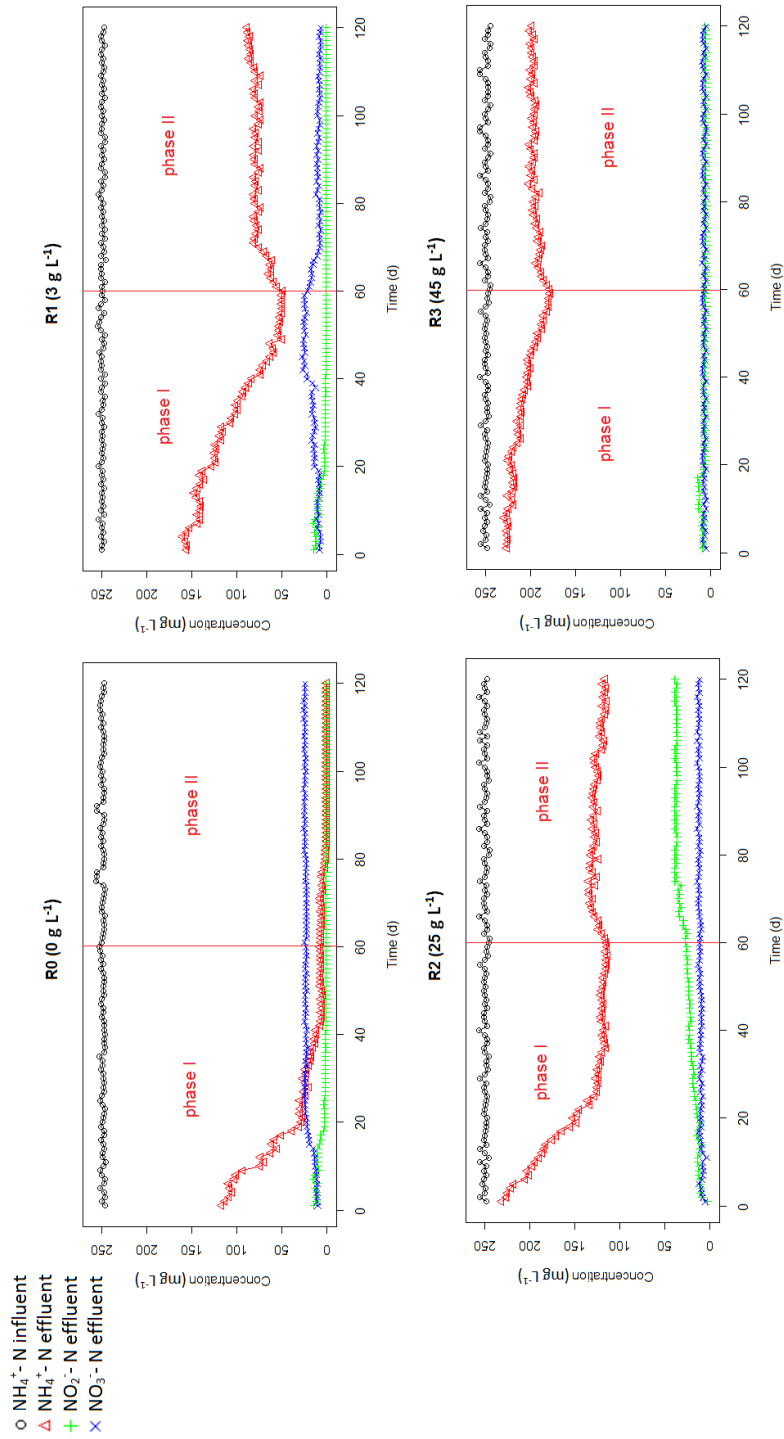
**Figure 4A.** Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plots showing the ordination of the bioreactors (R0, R1, R2 and R3 with 0, 3, 25 and 45 g  $\text{NaCl L}^{-1}$  respectively) according to the relative similarity of all OTUs analyzed by Illumina-sequencing. NTE: total nitrogen removal efficiency;  $\text{NO}_2^-\text{-N Eff.}$ :  $\text{NO}_2\text{-N}$  concentration effluent.  $\text{NO}_3^-\text{-N Eff.}$ :  $\text{NO}_3\text{-N}$  concentration effluent and Salinity. Phase I.

**Figure 4B.** Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plots showing the ordination of the bioreactors (R0, R1, R2 and R3 with 0, 3, 25 and 45 g  $\text{NaCl L}^{-1}$  respectively) according to the relative similarity of all OTUs analyzed by Illumina-sequencing. NTE: total nitrogen removal efficiency;  $\text{NO}_2^-\text{-N Eff.}$ :  $\text{NO}_2\text{-N}$  concentration effluent.  $\text{NO}_3^-\text{-N Eff.}$ :  $\text{NO}_3\text{-N}$  concentration effluent and Salinity. Phase II.

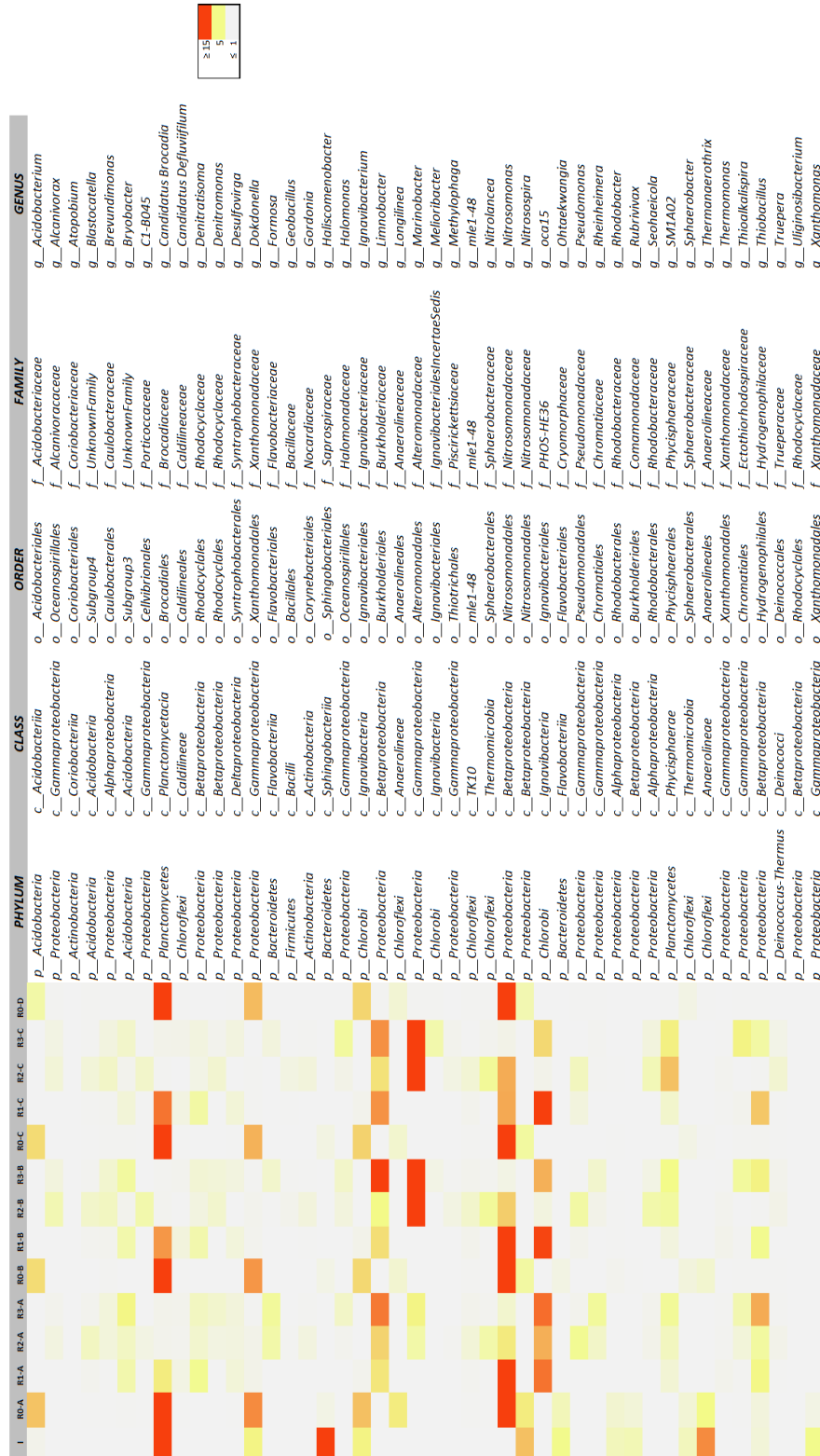
**FIGURES**



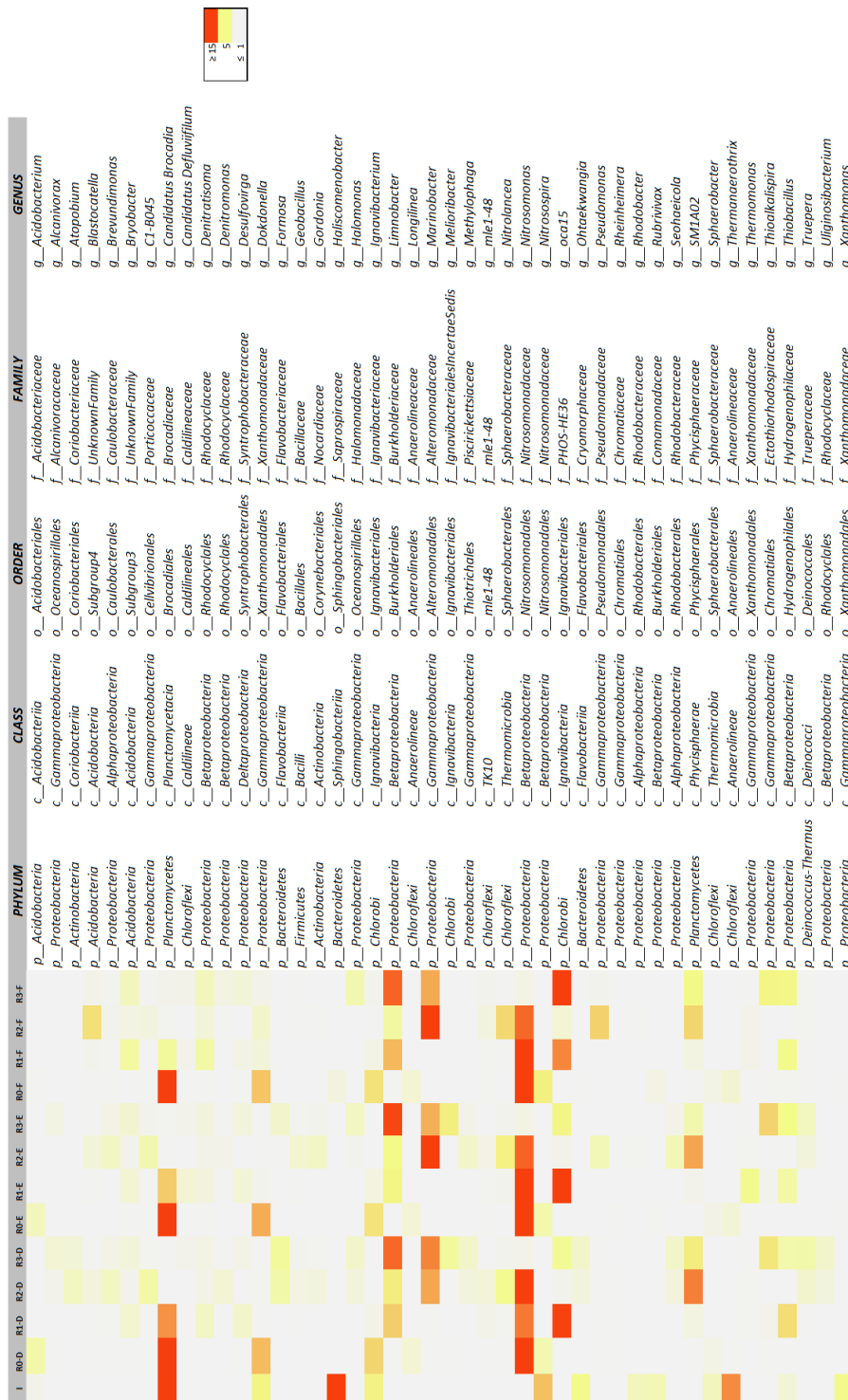
(FIGURE 1)



(FIGURE 2)

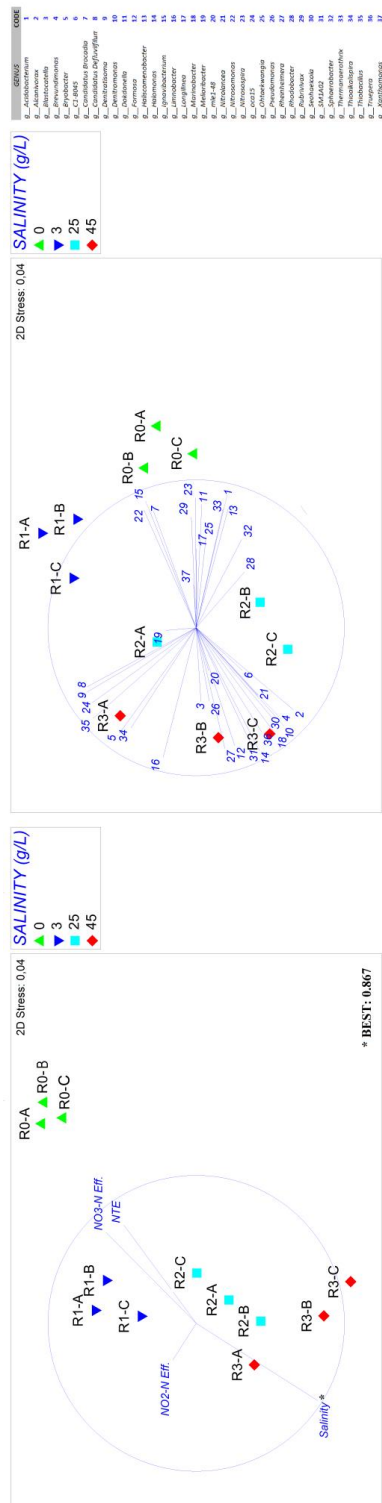


(FIGURE 3A)

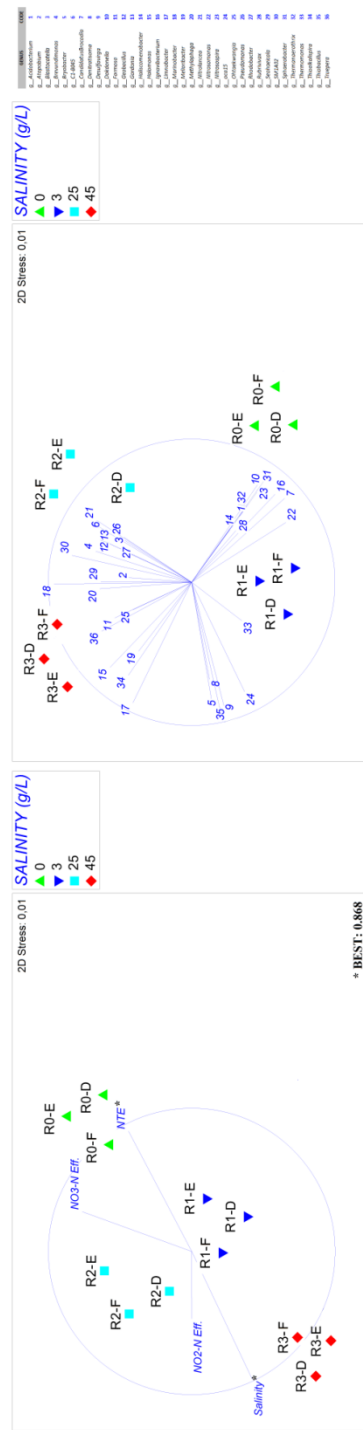


(FIGURE 3B)





(FIGURE 4A)



(FIGURE 4B)

**ble 1.** Operational parameters. Ratio and efficiencies obtained in different bioreactor and calculated in last 15 days of each phase. HRT, hydraulic retention time; T, temperature; DO, dissolved oxygen; NAR, nitrite acumulation over nitrite plus nitrate. Bioreactors operated with 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) and 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectively.

Phase	Bioreactor	Salinity (g·L <sup>-1</sup> )	HRT (h)	T <sup>a</sup> (° C)	pH	DO (mg·L <sup>-1</sup> )	Total N Efficiency (%)	NAR (%)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N Efficiency (%)
I (days 1-60)	R0-C	0	6	35	7-8	1.5-2	87.68±0.35	3.40±0.79	97.42±0.38
	R1-C	3					64.25±3.08	31.89±5.54	78.78±1.75
	R2-C	25					38.79±0.73	69.36±1.55	53.10±0.92
	R3-C	45					19.74±2.73	47.11±5.04	25.28±2.57
II (days 61-120)	R0-F	0	12	35	7-8	1.5-2	89.77±0.17	2.87±0.16	99.96±0.01
	R1-F	3					51.93±2.22	78.07±2.31	66.61±1.92
	R2-F	25					32.72±1.11	74.78±1.47	52.71±1.22
	R3-F	45					14.80±1.71	43.30±6.33	20.28±1.51

**Table 2.** Compounds nitrogen concentrations in the bioreactor effluents obtained on the last day of each phase. Bioreactors operated with 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) and 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectively.

Phase	Bioreactor	Salinity (g·L <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg·L <sup>-1</sup> )	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (mg·L <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg·L <sup>-1</sup> )	Total N Effluent (mg·L <sup>-1</sup> )
I (day 60)	R0-C	0	7.46	0.64	23.02	31.14
	R1-C	3	48.79	8.47	21.79	79.05
	R2-C	25	115.23	27.26	11.27	153.77
	R3-C	45	178.46	6.65	7.02	192.12
II (day 120)	R0-F	0	0.08	0.70	24.16	24.96
	R1-F	3	88.7	32.04	6.85	127.60
	R2-F	25	116.33	39.24	11.78	167.37
	R3-F	45	198.66	6.04	5.16	209.70

**I. Supplementary Tables S1-S4.**
**Table S1.** Characteristics of the support material used (Filtralite)

Filtralite HR 3-6mm	
Density	825 Kg/m <sup>3</sup>
Effective diameter	3.5 mm
Uniformity Coefficient	<1.5
Porosity	46%
Void Index	43%

**Table S2.** Number of reads, richness (S), Good's coverage, and diversity indices Shannon-Wiener ( $H'$ ) and Simpson evenness, calculated from the Illumina sequencing data of the total community in the inoculum and bioreactors different samples. Bioreactors operated with 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) and 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectively.

	I	R0-A	R1-A	R2-A	R3-A	R0-B	R1-B	R2-B	R3-B	R0-C	R1-C	R2-C	R3-C
Taxa. S	380	182	180	319	196	193	204	266	241	227	224	301	253
Simpson 1-D	0.8213	0.8804	0.8476	0.8821	0.9072	0.7508	0.8747	0.884	0.8915	0.7317	0.885	0.8886	0.8849
Shannon, H	2.227	2.627	2.415	3.072	3.02	1.988	2.571	2.928	2.825	1.945	2.605	2.913	2.831
Coverage (%)	99.65	99.84	97.56	96.35	98.49	97.84	99.54	96.59	97.67	98.26	97.81	98.15	99.05
	R0-D	R1-D	R2-D	R3-D	R0-E	R1-E	R2-E	R3-E	R0-F	R1-F	R2-F	R3-F	
Taxa. S	200	240	289	280	199	204	274	280	228	200	257	249	
Simpson 1-D	0.7153	0.8672	0.8995	0.9031	0.7024	0.8416	0.9053	0.8925	0.6867	0.8538	0.8836	0.8914	
Shannon, H	1.856	2.482	2.983	3.082	1.817	2.347	3.042	2.96	1.789	2.486	2.675	2.823	
Coverage (%)	98.25	97.46	97.16	99.05	98.17	97.23	99.31	97.46	98.16	99.05	97.28	98.89	

**Table S3.** Operational taxonomic unit (OTUs) which mostly contribute to the dissimilarity of the bacterial communities between the Bioreactors with different salinity concentrations. PHASE I (days 1-60). Bioreactors operated with 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) and 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectively.

Factor Groups	
Sample	SALINITY (g L <sup>-1</sup> )
R0-A	0
R0-B	0
R0-C	0

R1-A	3
R1-B	3
R1-C	3
R2-A	25
R2-B	25
R2-C	25
R3-A	45
R3-B	45
R3-C	45

**Group 0**

Average similarity: 82.28

---

OTUs	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
g__CandidatusBrocadia	34.15	28.56	2.21	34.71	34.71
g__Nitrosomonas	24.89	26.82	84.74	32.59	67.3
g__Dokdonella	9.1	9.28	6.95	11.28	78.58
g__Ignavibacterium	5.91	6.07	16.34	7.38	85.96
g__Acidobacterium	5.57	5.67	27.27	6.89	92.85

**Group 3**

Average similarity: 75.38

---

OTUs	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
g__oca15	13.82	22.59	7.5	29.97	29.97
g__Nitrosomonas	16.91	19.73	2.23	26.17	56.14
g__CandidatusBrocadia	8.36	10.33	1.87	13.7	69.84
g__Limnobacter	6.33	8.08	15.84	10.72	80.56
g__Thiobacillus	4.17	5.31	13.18	7.04	87.6
g__Denitratisoma	2.34	3.67	15.26	4.87	92.47

**Group 25**

Average similarity: 60.29

---

OTUs	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
g__Marinobacter	12.21	14.13	0.87	23.44	23.44
g__Nitrosomonas	6.06	10.22	5.88	16.95	40.39
g__Limnobacter	4.44	7.86	3.84	13.03	53.42
g__Nitrolancea	2.4	4.81	14.69	7.97	61.39
g__Pseudomonas	2.16	3.8	3.48	6.31	67.7
g__SM1A02	3.53	3.79	4.37	6.29	73.99
g__Blastocatella	1.12	1.96	3.48	3.25	77.24
g__Brevundimonas	1.11	1.84	3.01	3.06	80.3
g__mle1-48	0.93	1.78	138.35	2.96	83.26
g__Seohaecicola	1.35	1.57	0.96	2.61	85.86
g__Denitromonas	0.86	1.43	2.75	2.37	88.23
g__C1-B045	1.2	1.42	1.8	2.36	90.59

**Group 45**

Average similarity: 69.61

---

OTUs	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
g__Limnobacter	12.2	18.44	15.44	26.5	26.5
g__Marinobacter	12.64	13.62	1.07	19.57	46.06
g__oca15	8.39	10.91	4.68	15.67	61.74
g__SM1A02	3.1	4.86	11.42	6.98	68.72
g__Thiobacillus	4.67	4.81	3.68	6.91	75.62
g__Thioalkalispira	2.64	3.72	6.84	5.34	80.96
g__Bryobacter	2.29	2.8	2.35	4.02	84.98
g__Halomonas	1.61	2.14	19.56	3.08	88.06
g__Formosa	1.4	1.39	2.95	1.99	90.05

### Groups 0 & 3

Average dissimilarity = 64.08

OTUs	Group 0	Group 3	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g__CandidatusBrocadia	34.15	8.36	17.5	2.16	27.31	27.31
g__oca15	0	13.82	9.51	8.44	14.84	42.15
g__Dokdonella	9.1	0.18	6.15	6.57	9.6	51.76
g__Nitrosomonas	24.89	16.91	5.94	1.29	9.27	61.03
g__Limnobacter	0.03	6.33	4.33	2.49	6.76	67.78
g__Ignavibacterium	5.91	0.22	3.93	6.41	6.13	73.92
g__Acidobacterium	5.57	0	3.85	5.71	6.01	79.93
g__Thiobacillus	0.25	4.17	2.68	2.36	4.18	84.11
g__Nitrospira	2.88	0	1.99	3.07	3.11	87.23
g__Denitratisoma	0.02	2.34	1.6	6.37	2.49	89.72
g__Longilinea	2.01	0	1.41	1.28	2.2	91.92

### Groups 0 & 25

Average dissimilarity = 89.65

OTUs	Group 0	Group 25	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g__CandidatusBrocadia	34.15	0.14	24.88	3.07	27.75	27.75
g__Nitrosomonas	24.89	6.06	13.94	7.95	15.55	43.29
g__Marinobacter	0	12.21	8.88	1.62	9.9	53.2
g__Dokdonella	9.1	0.18	6.61	6.41	7.38	60.57
g__Ignavibacterium	5.91	0.01	4.39	6.34	4.89	65.47
g__Acidobacterium	5.57	0	4.14	5.53	4.62	70.09
g__Limnobacter	0.03	4.44	3.28	3.66	3.66	73.75
g__SM1A02	0.02	3.53	2.56	1.46	2.85	76.6
g__oca15	0	2.91	2.23	0.77	2.49	79.09
g__Nitrospira	2.88	0	2.15	3.03	2.4	81.49
g__Nitroloancea	0.05	2.4	1.73	11.81	1.94	83.43
g__Pseudomonas	0	2.16	1.6	3.57	1.79	85.22
g__Longilinea	2.01	0	1.52	1.28	1.69	86.91
g__Thermanaerotherix	1.4	0	1.07	1.01	1.19	88.1
g__Seohaecicola	0	1.35	0.98	1.67	1.09	89.19
g__C1-B045	0.03	1.2	0.85	1.72	0.95	90.14

**Groups 3 & 25**

Average dissimilarity = 65.94

OTUs	Group 3	Group 25	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g__Marinobacter	0.01	12.21	11.65	1.63	17.66	17.66
g__Nitrosomonas	16.91	6.06	10.69	1.39	16.22	33.88
g__oca15	13.82	2.91	10.52	2.88	15.95	49.83
g__CandidatusBrocadia	8.36	0.14	8.02	2.42	12.16	61.99
g__Thiobacillus	4.17	0.83	3.2	1.69	4.86	66.85
g__SM1A02	0.86	3.53	2.55	1.1	3.87	70.72
g__Nitrolancea	0.04	2.4	2.3	15.32	3.49	74.2
g__Limnobacter	6.33	4.44	2.3	1.04	3.48	77.69
g__Pseudomonas	0.28	2.16	1.85	2.81	2.81	80.49
g__Denitratisoma	2.34	0.66	1.63	3.89	2.47	82.96
g__Seohaecicola	0.01	1.35	1.28	1.67	1.94	84.9
g__C1-B045	0.02	1.2	1.13	1.76	1.71	86.62
g__Bryobacter	1.6	0.58	1.11	1.87	1.69	88.3
g__Alcanivorax	0	1.04	1	1.79	1.52	89.82
g__Brevundimonas	0.09	1.11	0.99	3.21	1.49	91.32

**Groups 0 & 45**

Average dissimilarity = 97.72

OTUs	Group 0	Group 45	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g__CandidatusBrocadia	34.15	0.2	23.17	3.06	23.71	23.71
g__Nitrosomonas	24.89	0.59	16.73	30.72	17.12	40.83
g__Marinobacter	0	12.64	8.71	1.8	8.91	49.74
g__Limnobacter	0.03	12.2	8.36	5.28	8.56	58.3
g__Dokdonella	9.1	0.06	6.25	6.58	6.4	64.7
g__oca15	0	8.39	5.78	2.79	5.92	70.61
g__Ignavibacterium	5.91	0.01	4.09	6.54	4.18	74.8
g__Acidobacterium	5.57	0	3.86	5.67	3.95	78.75
g__Thiobacillus	0.25	4.67	3.04	1.63	3.12	81.86
g__SM1A02	0.02	3.1	2.13	5.63	2.18	84.04
g__Nitrospira	2.88	0	2	3.06	2.05	86.09
g__Thioalkalispira	0.06	2.64	1.78	3.33	1.82	87.91
g__Bryobacter	0.05	2.29	1.54	2.39	1.58	89.49
g__Longilinea	2.01	0.01	1.41	1.28	1.44	90.94

**Groups 3 & 45**

Average dissimilarity = 59.38

OTUs	Group 3	Group 45	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				

g__Nitrosomonas	16.91	0.59	14.57	2.14	24.54	24.54
g__Marinobacter	0.01	12.64	11.24	1.8	18.93	43.47
g__CandidatusBrocadia	8.36	0.2	7.27	2.41	12.24	55.71
g__Limnobacter	6.33	12.2	5.19	1.67	8.75	64.46
g__oca15	13.82	8.39	4.92	1.68	8.28	72.74
g__Thioalkalispira	0.11	2.64	2.26	3.24	3.8	76.54
g__Thiobacillus	4.17	4.67	2.15	1.23	3.62	80.16
g__SM1A02	0.86	3.1	2.01	3.82	3.38	83.54
g__Halomonas	0	1.61	1.44	2.53	2.43	85.97
g__Formosa	0	1.4	1.25	1.65	2.11	88.08
g__Denitratisoma	2.34	0.94	1.25	2.67	2.1	90.18

**Groups 25 & 45**

Average dissimilarity = 50.51

**Table S4.**  
Operational taxonomic unit (OTUs) which mostly contribute to the dissimilarity of the bacterial communities between the Bioreactors with different salinity concentrations. PHASE II (days 61-120). Bioreactors operated with 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) and 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectively.

OTUs	Group 25		Group 45		Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund	Av.Abund	Av.Abund				
g__Limnobacter	4.44	12.2	7.52	3.14	14.89	14.89		
g__Marinobacter	12.21	12.64	7.07	0.99	13.99	28.88		
g__oca15	2.91	8.39	5.86	1.61	11.61	40.49		
g__Nitrosomonas	6.06	0.59	5.3	3.49	10.5	50.99		
g__Thiobacillus	0.83	4.67	3.75	1.34	7.43	58.42		
g__Thioalkalispira	0.25	2.64	2.34	2.88	4.63	63.05		
g__Nitrolancea	2.4	0.13	2.21	13.76	4.39	67.44		
g__Pseudomonas	2.16	0.08	2.05	3.34	4.06	71.5		
g__SM1A02	3.53	3.1	1.96	1.5	3.88	75.38		
g__Bryobacter	0.58	2.29	1.7	1.74	3.36	78.75		
g__Halomonas	0.37	1.61	1.23	1.84	2.44	81.19		
g__Formosa	0.72	1.4	1.21	1.62	2.39	83.58		
g__C1-B045	1.2	0.02	1.13	1.75	2.24	85.81		
g__Seohaecicola	1.35	0.41	1	1.56	1.98	87.8		
g__Rheinheimera	0.53	1.23	1	1.19	1.98	89.78		
g__Blastocatella	1.12	0.11	0.99	3.11	1.97	91.75		

**Factor Groups**

Sample	SALINITY (g L <sup>-1</sup> )
R0-D	0
R0-E	0
R0-F	0
R1-D	3
R1-E	3
R1-F	3
R2-D	25
R2-E	25
R2-F	25
R3-D	45



R3-E 45  
 R3-F 45

**Group 0**

Average similarity: 95.26

---

OTUs	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
g__CandidatusBrocadia	45.32	48.42	136.88	50.83	50.83
g__Nitrosomonas	28.59	30.67	85.48	32.2	83.03
g__Dokdonella	7.22	7.34	16.44	7.71	90.74

**Group 3**

Average similarity: 73.16

---

OTUs	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
g__Nitrosomonas	21.68	27.76	2.11	37.95	37.95
g__oca15	14.42	20.77	4.94	28.39	66.34
g__Limnobacter	5.54	7.48	2.46	10.23	76.57
g__CandidatusBrocadia	6.1	6.38	1.81	8.73	85.3
g__Thiobacillus	3.36	4.28	4.54	5.84	91.14

**Group 25**

Average similarity: 71.88

---

OTUs	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
g__Nitrosomonas	13.92	22.21	76.12	30.9	30.9
g__Marinobacter	13.07	19.01	2.72	26.44	57.34
g__SM1A02	8.3	11.49	3.69	15.99	73.33
g__Nitrolancea	3.89	5.44	6.79	7.57	80.9
g__Limnobacter	3.11	4.55	5.44	6.33	87.23
g__C1-B045	1.57	1.8	1.33	2.51	89.73
g__Blastocatella	2.05	1.19	9.03	1.65	91.39

**Group 45**

Average similarity: 73.43

---

OTUs	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%	Cum.%
g__Limnobacter	13.23	24.24	32.89	33.01	33.01
g__Marinobacter	8.89	15.42	63.02	21	54.01
g__Thioalkalispira	4.43	7.18	5.97	9.78	63.79
g__oca15	7.28	5.62	7.5	7.65	71.44
g__Thiobacillus	2.78	4.57	3.85	6.23	77.67
g__SM1A02	3.01	4.49	3.49	6.12	83.79
g__Halomonas	1.49	2.43	9.76	3.32	87.1
g__Melioribacter	2.13	1.66	0.58	2.26	89.36
g__Bryobacter	1.08	1.57	5.36	2.13	91.49

**Groups 0 & 3**

Average dissimilarity = 61.33

OTUs	Group 0	Group 3	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g_CandidatusBrocadia	45.32	6.1	26.25	12.89	42.81	42.81
g_oca15	0.01	14.42	9.62	4.88	15.69	58.5
g_Nitrosomonas	28.59	21.68	4.77	0.87	7.77	66.27
g_Dokdonella	7.22	0.31	4.63	8.84	7.56	73.82
g_Limnobacter	0.04	5.54	3.72	3.05	6.06	79.88
g_Ignavibacterium	4.87	0.42	2.99	8.65	4.87	84.75
g_Thiobacillus	0.05	3.36	2.24	2.48	3.66	88.41
g_Nitrospira	2.55	0.01	1.7	2.89	2.77	91.18

**Groups 0 & 25**

Average dissimilarity = 79.86

OTUs	Group 0	Group 25	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g_CandidatusBrocadia	45.32	0.07	30.55	76.62	38.25	38.25
g_Nitrosomonas	28.59	13.92	9.9	7.03	12.4	50.65
g_Marinobacter	0.03	13.07	8.81	3.74	11.03	61.68
g_SM1A02	0.03	8.3	5.58	3.48	6.99	68.67
g_Dokdonella	7.22	0.43	4.59	7.97	5.74	74.42
g_Ignavibacterium	4.87	0.01	3.28	10.31	4.11	78.53
g_Nitrolancea	0.04	3.89	2.6	3.48	3.26	81.79
g_Limnobacter	0.04	3.11	2.08	4.32	2.6	84.39
g_Nitrospira	2.55	0.01	1.71	2.92	2.15	86.54
g_Pseudomonas	0.02	2.49	1.67	0.97	2.09	88.63
g_Blastocatella	0.05	2.05	1.35	0.98	1.7	90.32

**Groups 3 & 25**

Average dissimilarity = 67.28

OTUs	Group 3	Group 25	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g_oca15	14.42	0.46	12.22	4.8	18.16	18.16
g_Marinobacter	0.04	13.07	11.46	3.69	17.04	35.2
g_Nitrosomonas	21.68	13.92	8.17	1.73	12.15	47.35
g_SM1A02	0.44	8.3	6.91	3.29	10.27	57.62
g_CandidatusBrocadia	6.1	0.07	5.34	1.82	7.94	65.56
g_Nitrolancea	0.09	3.89	3.34	3.37	4.97	70.53
g_Thiobacillus	3.36	0.02	2.97	2.44	4.42	74.95
g_Limnobacter	5.54	3.11	2.28	1.53	3.39	78.35
g_Pseudomonas	0.02	2.49	2.17	0.97	3.23	81.58

g__Blastocatella	0.11	2.05	1.7	0.95	2.53	84.11
g__C1-B045	0.05	1.57	1.33	2	1.98	86.09
g__Bryobacter	1.43	0.27	1.02	1.62	1.52	87.62
g__Denitratisona	1.4	0.48	0.84	1.39	1.25	88.87
g__Brevundimonas	0.06	0.98	0.81	1.52	1.2	90.07

**Groups 0 & 45**

Average dissimilarity = 98.21

OTUs	Group 0	Group 45	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g__CandidatusBrocadia	45.32	0.13	31.52	45.8	32.1	32.1
g__Nitrosomonas	28.59	0.38	19.68	51.76	20.04	52.13
g__Limnobacter	0.04	13.23	9.21	10.74	9.38	61.51
g__Marinobacter	0.03	8.89	6.18	6.84	6.29	67.81
g__oca15	0.01	7.28	5.02	1.15	5.11	72.92
g__Dokdonella	7.22	0.14	4.94	9.9	5.03	77.95
g__Ignavibacterium	4.87	0.06	3.36	9.69	3.42	81.37
g__Thioalkalispira	0.04	4.43	3.07	4.26	3.13	84.5
g__SM1A02	0.03	3.01	2.07	3.41	2.11	86.61
g__Thiobacillus	0.05	2.78	1.91	4.68	1.94	88.55
g__Nitrospira	2.55	0	1.77	2.92	1.81	90.36

**Groups 3 & 45**

Average dissimilarity = 66.02

OTUs	Group 3	Group 45	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g__Nitrosomonas	21.68	0.38	19.29	2.94	29.23	29.23
g__Marinobacter	0.04	8.89	8.13	6.55	12.31	41.53
g__oca15	14.42	7.28	7.86	1.67	11.9	53.44
g__Limnobacter	5.54	13.23	7.02	4.18	10.64	64.07
g__CandidatusBrocadia	6.1	0.13	5.53	1.79	8.38	72.45
g__Thioalkalispira	0.14	4.43	3.96	4	6	78.45
g__SM1A02	0.44	3.01	2.35	2.93	3.56	82
g__Melioribacter	0	2.13	1.98	1.23	3	85
g__Halomonas	0	1.49	1.37	4.95	2.07	87.07
g__Truepera	0.02	1.23	1.12	1.36	1.69	88.76
g__Formosa	0	1.2	1.11	1.12	1.69	90.45

**Groups 25 & 45**

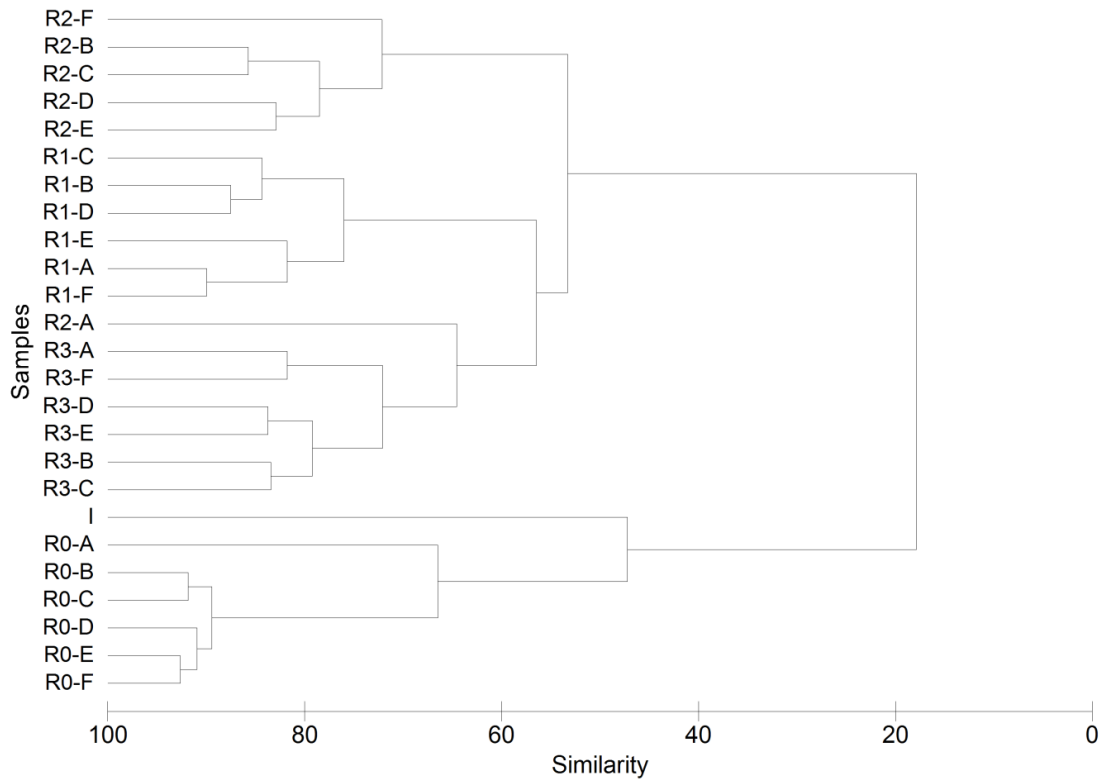
Average dissimilarity = 64.37

OTUs	Group 25	Group 45	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%	Cum.%
	Av.Abund	Av.Abund				
g__Nitrosomonas	13.92	0.38	12.55	6.59	19.5	19.5

g__Limnobacter	3.11	13.23	9.4	7.11	14.6	34.1
g__oca15	0.46	7.28	6.23	1.08	9.67	43.77
g__SM1A02	8.3	3.01	4.92	2.06	7.64	51.41
g__Marinobacter	13.07	8.89	4.33	1.55	6.72	58.13
g__Thioalkalipira	0.01	4.43	4.12	4.2	6.39	64.52
g__Nitrolancea	3.89	0.14	3.48	3.38	5.4	69.93
g__Thiobacillus	0.02	2.78	2.55	4.75	3.97	73.89
g__Pseudomonas	2.49	0.08	2.27	0.97	3.53	77.42
g__Melioribacter	0	2.13	2	1.24	3.11	80.53
g__Blastocatella	2.05	0.13	1.78	0.94	2.76	83.29
g__C1-B045	1.57	0.12	1.34	1.91	2.08	85.37
g__Halomonas	0.28	1.49	1.12	3.04	1.74	87.12
g__Formosa	0.71	1.2	1.1	1.23	1.7	88.82
g__Truepera	0.63	1.23	0.88	1.58	1.37	90.19

II. Supplementary Figure S1.

**Fig.S1.** Dendrogram analysis illustrating the similarity of the bacterial community using Bray-Curtis distance similarity matrix generated from the relative abundance of the OTUs identified by Illumina-sequencing. The inoculum and bioreactors samples operated with 0 (R0), 3 (R1), 25 (R2) and 45 (R3) g NaCl L<sup>-1</sup> respectively. A: 15 days to start the phase I. B: 30 days to start the phase I. C: 60 days to start the phase I. D: 15 days to start the phase II. E: 30 days to start the phase II. F: 60 days to start the phase II.



## Anexo II: Patente

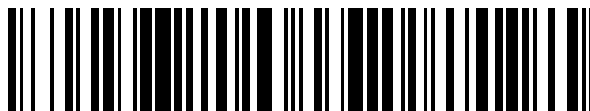
---

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 379**

21 Número de solicitud: 201531526

51 Int. Cl.:

**C02F 3/30** (2006.01)

**C02F 101/16** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**23.10.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**03.03.2016**

71 Solicitantes:

**VALORIZA AGUA S.L (100.0%)**  
**Paseo de la Castellana 83-85**  
**28046 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**CAMPOS POZUELO, Elena;**  
**TERRERO RODRÍGUEZ, Patricia;**  
**ZARZO MARTÍNEZ, Domingo;**  
**OSORIO ROBLES, Francisco;**  
**GARCÍA RUIZ, María Jesús;**  
**GONZÁLEZ MARTÍNEZ, Alejandro y**  
**GONZÁLEZ LÓPEZ, Jesús**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

54 Título: **Método y sistema de eliminación autotrófica de nitrógeno en aguas residuales mediante biofiltración en lecho fijo**

57 Resumen:

Método y sistema de eliminación autotrófica de nitrógeno en aguas residuales mediante biofiltración en lecho fijo. Consiguen la eliminación de nitrógeno en un influente de aguas residuales con un contenido de nitrógeno inferior a 1500 mgN<sub>total</sub>/L y una relación de DBO<sub>5</sub>/N<sub>total</sub> de entre 0,01 y 1 mediante un proceso biopelícula de oxidación anaerobia autotrófica en el que se hace pasar al influente por un biofiltro en lecho fijo constituido por un conjunto de partículas granulares colonizadas por bacterias AOB y bacterias ANAMMOX, teniendo dichas partículas granulares un tamaño efectivo ( $d_{10}$ ) comprendido entre 2,0–8,0 mm y una superficie específica mínima de 800 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>.

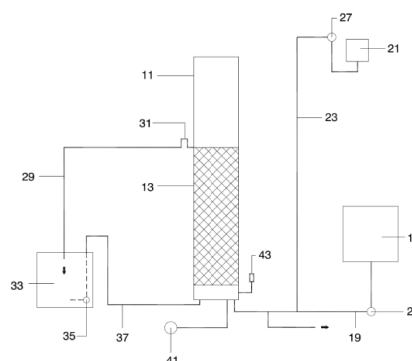


FIG. 1