

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología



TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL URBANA  
CON SALINIDAD VARIABLE

Carmen Cortés Lorenzo

TESIS DOCTORAL

2012

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Microbiología

# TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL URBANA CON SALINIDAD VARIABLE

Memoria que presenta la Licenciada en Dña. Carmen Cortés Lorenzo para aspirar al grado de Doctor con mención internacional (doctorado europeo)

Fdo. **Dña. Carmen Cortés Lorenzo**

VºBº El director

VºBº El director

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

**Dra. Dña. María Belén Rodelas González**  
Profesora Titular de Microbiología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada

**Granada, 2012**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Carmen Cortés Lorenzo  
D.L.: GR 225-2013  
ISBN: 978-84-9028-308-0

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada dentro del grupo de investigación “Microbiología Ambiental” (Ref. PAI: RNM-270) y subvencionada por el proyecto de investigación de excelencia de la Junta de Andalucía P06-RMN-01533.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral se obtuvieron gracias a la estancia realizada por la doctoranda en el grupo “Molecular Ecology” del Laboratory of Microbiology, perteneciente a Wageningen UR (University and Research centre, Holanda), bajo la dirección del Professor D. Hauke Smidt.

*A mis padres, Carmen y Alfonso*  
*A mis hermanos, Alfonso y Pablo*  
*A Pierpaolo*

*“In comparison to what is known about the cells themselves, very little is known about the biofilm matrix”*

*Philip S. Stewart*



II.2.3.3. pH.....	70
II.2.3.4. Conductividad.....	70
II.2.3.5. Sólidos en suspensión totales (SST) .....	70
II.2.3.6. Sólidos en suspensión volátiles (SSV) .....	71
II.2.3.7. Determinación de nitrato, nitrito y amonio.....	72
II.2.4. Análisis estadístico.....	74
<b>II.3. RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
II.3.1. Caracterización fisicoquímica del sistema de filtro sumergido.....	75
II.3.1.1. Demanda biológica de oxígeno (DBO <sub>5</sub> ).....	75
II.3.1.2. Demanda química de oxígeno (DQO) .....	76
II.3.1.3. pH.....	77
II.3.1.4. Sólidos en suspensión totales (SST) .....	78
II.3.1.5. Sólidos en suspensión volátiles (SSV) .....	80
II.3.2. Efecto de la salinidad en la nitrificación .....	81
<b>II.4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>84</b>
<b>II.5. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>88</b>

### ***III. CAPÍTULO 3: Actividades enzimáticas como índice de actividad biológica en la depuración de aguas residuales urbanas con salinidad variable***

<b>III.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>95</b>
III.1.1. Actividades enzimáticas en el tratamiento biológico de aguas residuales .....	95
III.1.2. Actividad enzimática fosfatasa acida y fosfatasa alcalina.....	97
III.1.3. Actividad enzimática $\alpha$ -glucosidasa .....	98
III.1.4. Actividad enzimática proteasa.....	99
III.1.5. Actividad enzimática esterasa.....	100
<b>III.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>101</b>
III.2.1. Extracción de la biopelícula del material de relleno.....	102
III.2.2. Actividades enzimáticas en la biopelícula .....	102
III.2.2.1. Actividad enzimática fosfatasa .....	102
III.2.2.2. Actividad enzimática $\alpha$ -glucosidasa .....	105
III.2.2.3. Actividad enzimática proteasa .....	106
III.2.2.4. Actividad enzimática esterasa .....	107



III.2.3. Análisis estadístico multivariante.....	108
<b>III.3. RESULTADOS .....</b>	<b>109</b>
III.3.1. Determinación de la actividad fosfatasa ácida bajo el efecto de un influente salino.....	109
III.3.2. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina bajo el efecto de un influente salino.....	111
III.3.3. Determinación de la actividad $\alpha$ -glucosidasa bajo el efecto de un influente salino.....	113
III.3.4. Determinación de la actividad esterasa bajo el efecto de un influente salino.....	114
III.3.5. Determinación de la actividad proteasa bajo el efecto de un influente salino.....	116
III.3.6. Análisis estadístico multivariante.....	117
<b>III.4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>122</b>
<b>III.5. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>125</b>

***IV. CAPÍTULO 4: Evolución de la biodiversidad en la biopelícula en el tratamiento de un agua residual urbana con salinidad variable***

<b>IV.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>133</b>
IV.1.1. Aplicaciones de las técnicas de biología molecular al estudio de la diversidad microbiana en ecosistemas complejos .....	134
<b>IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>138</b>
IV.2.1. Extracción de ADN total de la biopelícula del SFBBR.....	139
IV.2.3. Amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S por PCR para el estudio de la comunidad de Bacteria presentes en el SFBBR.....	141
IV.2.4. Amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 18S por PCR para el estudio de la comunidad de hongos presentes en el SFBBR.....	145
IV.2.5. Amplificación de fragmentos del codificante del ARNr 16S por PCR para el estudio de la comunidad de arqueas presentes en el SFBBR.....	148
IV.2.6. Amplificación de fragmentos del gen estructural de la subunidad $\alpha$ de la enzima amonio-monooxigenasa ( <i>amoA</i> ) mediante PCR para el estudio de la comunidad de bacterias oxidadoras de amonio (AOB) presentes en el SFBBR.....	150
IV.2.7. Separación de las muestras mediante electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE).....	152
IV.2.7.1. Preparación del gel de acrilamida .....	152
IV.2.7.2. Separación de las muestras mediante DGGE .....	156
IV.2.7.3. Tinción y visualización del DGGE .....	156

IV.2.8. Análisis informático de los perfiles de DGGE .....	158
<b>IV.3. RESULTADOS.....</b>	<b>159</b>
IV.3.1. Perfiles de biodiversidad de Bacteria en las muestras de biopelícula .....	159
IV.3.2. Perfiles de biodiversidad de hongos en las muestras de biopelícula .....	167
IV.3.3. Perfiles de biodiversidad de arqueas en las muestras de biopelícula.....	174
IV.3.4. Perfiles de biodiversidad de bacterias oxidadoras de amonio (basado en la secuencia del gen <i>amoA</i> ) en las muestras de biopelícula .....	180
<b>IV.4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>187</b>
<b>IV.5. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>194</b>

**V. CAPÍTULO 5: English summary**

<b>V.1. INTRODUCTION .....</b>	<b>203</b>
<b>V.2. MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>206</b>
V.2.1. Description of the pilot-scale SFBBR experimental plant and operating conditions .....	206
V.2.2. Biofilm recovery .....	207
V.2.3. Physic-chemical analysis .....	207
V.2.4. Evolution of microbial enzymatic activities .....	208
V.2.5. DNA extraction.....	209
V.2.6. PCR amplification of partial bacterial 16S rRNA genes.....	209
V.2.7. PCR amplification of partial fungae 18S rRNA genes .....	209
V.2.8. PCR amplification of partial archaea 16S rRNA genes.....	210
V.2.9. PCR amplification of partial <i>amoA</i> gene .....	210
V.2.10. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) .....	211
V.2.11. Cluster analysis of DGGE fingerprints .....	211
<b>V.3. RESULTS and DISCUSSION.....</b>	<b>212</b>
V.3.1. Analysis of physic-chemical parameters and efficiency of the SFBBR for the removal of organic matter and nitrification .....	212
V.3.2. Evolution of microbial enzymatic activities .....	214
V.3.3. Analysis of the biodiversity patterns along a salinity gradient by DGGE .....	216
<b>V.4. REFERENCES .....</b>	<b>221</b>

**VI. CAPÍTULO 6: Discusión General**

<b>VI.1. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>229</b>
VI.1.1. Análisis del efecto de la salinidad en los parámetros fisicoquímicos característicos del agua residual.....	229
VI.1.2. Análisis del efecto de la salinidad en el proceso de nitrificación.....	230
VI.1.3. Análisis del efecto de la salinidad en las actividades enzimáticas hidrolíticas ....	232
VI.1.4. Análisis del efecto de la salinidad en la biodiversidad de las comunidades microbianas presentes en la biopelícula.....	232
<b>V.2. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>234</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>237</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>239</b>

ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura I.1.** Descripción general de los birreactores de biopelícula fija más utilizados para el tratamiento de aguas residuales ..... 5

**Figura I.2.** Etapas en la formación y desarrollo de las biopelículas ..... 13

**Figura I.3.** Procesos en la biopelícula ..... 16

**Figura I.4.** Biopelícula madura donde coexisten diferentes especies microbianas en diferentes nichos ambientales ..... 18

**Figura I.5.** Desprendimiento de células en la biopelícula ..... 19

**Figura I.6.** Etapas en la formación y desarrollo de las biopelículas por hongos filamentosos ..... 20

**Figura I.7.** Instalación y funcionamiento de una planta de filtros sumergidos aireados ..... 21

**Figura I.8.** Filtro a contracorriente ..... 22

**Figura I.9.** Filtro a co-corriente ..... 22

**Figura I.10.** Diagrama de flujos simplificados del proceso de depuración de una planta de filtros sumergidos ..... 24

**Figura I.11.** Formas del Nitrógeno en las aguas residuales ..... 28

**Figura I.12.** Proceso de oxidación de amonio, nitrificación fase I ..... 32

**Figura I.13.** Proceso de oxidación de nitrito, nitrificación fase II ..... 33

**Figura I.14.** Esquema de las posibles rutas metabólicas para el proceso ANAMMOX ..... 36

**Figura I.15.** Esquema general de los sistemas en post-desnitrificación ..... 37

**Figura I.16.** Esquema general de los sistemas en pre-desnitrificación ..... 38

**Figura II.1.** Variación en la eliminación de DQO a diferentes concentraciones salinas ..... 59

**Figura II.2.** Fotografías del material de relleno plástico poroso Bioflow 9® ..... 63

**Figura II.3.** Esquema y fotografía de la planta piloto de filtro sumergido a escala de laboratorio utilizada en nuestro estudio ..... 64

**Figura II.4.** Situación geográfica de Estación Depuradora del Sur, EMASAGRA S.A. (Granada) ..... 65

**Figura II.5.** Vista general del decantador primario de la estación depuradora del Sur (EMASAGRA) ..... 66

**Figura II.6.** Esquema de los experimentos realizados en este estudio ..... 67

**Figura II.7.** Fotografía del cromatógrafo iónico Methrom IC Net® ..... 73

**Figura II.8.** Concentración de DBO<sub>5</sub> (mg O<sub>2</sub>/L) en el influente y en el efluente en los 4 experimentos ..... 76

**Figura II.9.** Concentración de DQO (mg O<sub>2</sub>/L) en el influente y en el efluente en los 4 experimentos ..... 77

**Figura II.10.** Medida de pH en el influente y en el efluente durante los 4 experimentos ..... 78

<b>Figura II.11.</b> Concentración de SST (mg/L) en el influente y en el efluente en los 4 experimentos .....	79
<b>Figura II.12.</b> Concentración de SSV (mg/L) en el influente y en el efluente en los 4 experimentos .....	80
<b>Figura II.13.</b> Evolución de la concentración de amonio (mg/L) en el influente y en el efluente en los 4 experimentos .....	82
<b>Figura II.14.</b> Evolución de la concentración de nitrito (mg/L) en el influente y en el efluente en los 4 experimentos .....	83
<b>Figura II.15.</b> Evolución de la concentración de nitrato (mg/L) en el influente y en el efluente en los 4 experimentos .....	84
<b>Figura III.1.</b> Ecuación general que describe la reacción catalizada por fosfatasa ácida y alcalina .....	97
<b>Figura III.2.</b> Ecuación general que describe la reacción catalizada por $\alpha$ -glucosidasa .....	98
<b>Figura III.3.</b> Ecuación general que describe la reacción catalizada por proteasas .....	99
<b>Figura III.4.</b> Estructura 3D de esterasa extracelular de <i>Lactobacillus johnsonii</i> LJ0536 .....	100
<b>Figura III.5.</b> Esquema de los experimentos realizados en este estudio .....	101
<b>Figura III.6.</b> Ecuación general que describe la reacción del <i>p</i> -nitrofenil $\alpha$ -D-glucopiranosido .....	105
<b>Figura III.7.</b> Actividad enzimática fosfatasa ácida y SSV en el SFBBR en los 4 experimentos.	110
<b>Figura III.8.</b> Media de la actividad fosfatasa ácida en cada uno de los 4 experimentos .....	111
<b>Figura III.9.</b> Actividad enzimática fosfatasa alcalina y SSV en el SFBBR en los 4 experimentos .....	112
<b>Figura III.10.</b> Media de la actividad fosfatasa básica en cada uno de los 4 experimentos .....	113
<b>Figura III.11.</b> Actividad enzimática $\alpha$ -glucosidasa y SSV en el SFBBR en los 4 experimentos	113
<b>Figura III.12.</b> Media de la actividad $\alpha$ -glucosidasa en cada uno de los 4 experimentos .....	114
<b>Figura III.13.</b> Actividad enzimática esterasa y SSV en el SFBBR en los 4 experimentos .....	115
<b>Figura III.14.</b> Media de la actividad esterasa en cada uno de los 4 experimentos .....	116
<b>Figura III.15.</b> Actividad enzimática proteasa y SSV en el SFBBR en los 4 experimentos .....	116
<b>Figura III.16.</b> Media de la actividad proteasa en cada uno de los 4 experimentos .....	117
<b>Figura III.17.</b> Diagrama de ordenación <i>biplot</i> del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre las actividades enzimáticas en las muestras de biopelícula del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos del influente medidos durante la operación en los cuatro experimentos .....	119
<b>Figura III.18.</b> Diagrama de ordenación <i>biplot</i> del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre las actividades enzimáticas en las muestras de biopelícula del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos del influente estadísticamente significativos medidos durante la operación en los cuatro experimentos.....	120

<b>Figura IV.1.</b> Estructura y componentes del ribosoma procariota (70S) y eucariota (80S) .....	135
<b>Figura IV.2.</b> Regiones hipervariables presentes en el ARN 16S procariótico .....	136
<b>Figura IV.3.</b> Esquema de los experimentos realizados en este estudio .....	138
<b>Figura IV.4.</b> Instrumento FastPrep® para la extracción de ADN .....	139
<b>Figura IV.5.</b> Estructura secundaria del ARNr 16S de <i>E. Coli</i> .....	142
<b>Figura IV.6.</b> Posición de los cebadores utilizados en la reacción de PCR en las regiones hipervariables del ARNr 18S .....	145
<b>Figura IV.7.</b> Estructura secundaria del ARNr 18S de <i>S. Cerevisiae</i> .....	146
<b>Figura IV.8.</b> Cristales, espaciadores y abrazaderas y ensamblamiento de los mismos para la realización del “sándwich” .....	153
<b>Figura IV.9.</b> Bomba peristáltica y cubeta generadora de gradientes .....	155
<b>Figura IV.10.</b> Sistema “DCode Universal Mutation Detection System®” .....	156
<b>Figura IV.11.</b> Marcador utilizado en la DGGE .....	156
<b>Figura IV.12.</b> Análisis de la biodiversidad microbiana de la comunidad de Bacteria en las muestras de biopelícula procedentes del SFBBR mediante la técnica de DGGE durante los experimentos 1, 2, 3 y 4.....	160
<b>Figura IV.13.</b> Dendrograma obtenido al analizar perfiles de bandas del DGGE de las comunidades de Bacteria presentes en las muestras de biopelícula del SFBBR, utilizando el programa Gel Compar II, aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Pearson .....	161
<b>Figura IV.14.</b> Dendrogramas obtenidos al analizarlos perfiles de bandas del DGGE de las comunidades de Bacteria presentes en las muestras de biopelícula del SFBBR, utilizando el programa Gel Compar II, aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice.....	163
<b>Figura IV.15.</b> Diagrama de ordenación <i>biplot</i> del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre la estructura de la comunidad de Bacteria en las muestras del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos medidos durante la operación en los cuatro experimentos .....	165
<b>Figura IV.16.</b> Diagrama de ordenación <i>biplot</i> del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre la distribución de las clases de banda de la comunidad de Bacteria en las muestras del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos medidos durante la operación en los cuatro experimentos .....	167
<b>Figura IV.17.</b> Análisis de la biodiversidad fúngica en las muestras de biopelícula procedentes del SFBBR mediante la técnica de DGGE .....	168
<b>Figura IV.18.</b> Dendrograma obtenido al analizar perfiles de bandas del DGGE de las comunidades de hongos presentes en las muestras de biopelícula del SFBBR, utilizando el programa Gel Compar, aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficientes de Pearson .....	169
<b>Figura IV.19.</b> Dendrogramas obtenidos al analizar los perfiles de bandas del DGGE de las comunidades de hongos presentes en las muestras de biopelícula del SFBBR, utilizando el programa Gel Compar II, aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficientes de Dice .....	170
<b>Figura IV.20.</b> Diagrama de ordenación <i>biplot</i> del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre la estructura de la comunidad de hongos en las muestras del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos medidos durante la operación en los cuatro experimentos .....	17

**Figura IV.21.** Diagrama de ordenación *biplot* del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre la distribución de las clases de banda de la comunidad de hongos en las muestras del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos medidos durante la operación en los cuatro experimentos .....173

**Figura IV.22.** Análisis de la biodiversidad microbiana de arqueas en las muestras de biopelícula procedentes del SFBBR mediante la técnica de DGGE durante los experimentos 1, 2, 3 y 4 ..... 174

**Figura IV.23.** Dendrograma obtenido al analizar los perfiles de bandas del DGGE de las comunidades de arqueas presentes en las muestras de biopelícula del SFBBR, utilizando el programa Gel Compar II, aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficientes de Pearson ..... 175

**Figura IV.24.** Dendrogramas obtenidos al analizar los perfiles de bandas del DGGE de las comunidades de arqueas presentes en las muestras de biopelícula del SFBBR, utilizando el programa Gel Compar II, aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficientes Dice .....177

**Figura IV.25.** Diagrama de ordenación *biplot* del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre la estructura de la comunidad de arqueas en las muestras del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos medidos durante la operación en los cuatro experimentos ..... 179

**Figura IV.26.** Diagrama de ordenación *biplot* del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre la distribución de las clases de banda de la comunidad de arqueas en las muestras del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos medidos durante la operación en los cuatro experimentos .....180

**Figura IV.27.** Análisis de la biodiversidad microbiana de Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio (*amoA*) en las muestras de biopelícula procedentes del SFBBR mediante la técnica de DGGE durante los experimentos 1, 2, 3 y 4 ..... 181

**Figura IV.28.** Dendrograma obtenido al analizar los perfiles de bandas del DGGE de las comunidades de bacterias nitrificantes de fase I presentes en las muestras de biopelícula del SFBBR, utilizando el programa Gel Compar II, aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Pearson ..... 182

**Figura IV.29.** Dendrogramas obtenidos al analizar los perfiles de bandas del DGGE de las comunidades de Beta-proteobacterias nitrificantes de fase I presentes en las muestras de biopelícula del SFBBR, utilizando el programa Gel Compar II, aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice ..... 184

**Figura IV.30.** Diagrama de ordenación *biplot* del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre la estructura de la comunidad de Beta-proteobacteria oxidadoras de amonio en las muestras del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos medidos durante la operación en los cuatro experimentos ..... 185

**Figura IV.31.** Diagrama de ordenación *biplot* del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre la distribución de las clases de banda de la comunidad de Beta-proteobacteria oxidadoras de amonio en las muestras del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos medidos durante la operación en los cuatro experimentos .....186

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.1.</b> Clasificación de bacterias amonioxidantes y bacterias nitritoxidantes .....	31
<b>Tabla II.1.</b> Curva patrón para la DQO .....	69
<b>Tabla II.2.</b> Patrones utilizados para calibrar el cromatógrafo .....	74
<b>Tabla II.3.</b> Análisis estadístico de la DBO <sub>5</sub> en el influente y en el efluente en el SFBBR en los 4 experimentos .....	76
<b>Tabla II.4.</b> Análisis estadístico de la DQO en el influente y en el efluente en el SFBBR en los 4 experimentos .....	76
<b>Tabla II.5.</b> Análisis estadístico del pH en el influente y en el efluente en el SFBBR en los 4 experimentos .....	77
<b>Tabla II.6.</b> Análisis estadístico de los sólidos en suspensión totales en el influente y en el efluente en el SFBBR en los 4 experimentos .....	79
<b>Tabla II.7.</b> Análisis estadístico de los sólidos en suspensión volátiles en el influente y en el efluente en el SFBBR en los 4 experimentos .....	80
<b>Tabla II.8.</b> Análisis estadístico de la concentración de amonio en el influente y en el efluente en el SFBBR en los 4 experimentos .....	81
<b>Tabla II.9.</b> Análisis estadístico de la concentración de nitritos en el influente y en el efluente en el SFBBR en los 4 experimentos .....	82
<b>Tabla II.10.</b> Análisis estadístico de la concentración de nitratos en el influente y en el efluente en el SFBBR en los 4 experimentos .....	83
<b>Tabla III.1.</b> Recta de calibrado para la determinación de la actividad fosfatasa ácida .....	84
<b>Tabla III.2.</b> Recta de calibrado para la determinación de la actividad fosfatasa alcalina .....	103
<b>Tabla III.3.</b> Recta de calibrado para la determinación de la actividad $\alpha$ -glucosidasa .....	104
<b>Tabla III.4.</b> Recta de calibrado para la determinación de la actividad esterasa .....	106
<b>Tabla III.5.</b> Resultados del análisis de redundancia (RDA), realizado con los datos de las especies (actividades enzimáticas) y las variables ambientales del influente en el SFBBR (SST, DQO, DBO <sub>5</sub> , pH, salinidad y día de muestreo) en los cuatro experimentos. ....	108
<b>Tabla III.6.</b> Resultados del análisis de redundancia (RDA), realizado con los datos de las especies (actividades enzimáticas) y las variables ambientales del influente en el SFBBR (salinidad y día de muestreo) en los cuatro experimentos.....	119
<b>Tabla IV.1.</b> Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR para la amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S .....	121
<b>Tabla IV.2.</b> Reactivos empleados en la reacción de la PCR efectuada para amplificar fragmentos del gen codificante del ARNr 16S correspondientes a la regiones hipervariables V6-V8 en un volumen final de 50 $\mu$ L.....	143
<b>Tabla IV.3.</b> Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR para la amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 18S .....	145
<b>Tabla IV.4.</b> Reactivos empleados en la reacción de la PCR efectuada para amplificar fragmentos del gen codificante del ARNr 18S .....	147



<b>Tabla IV.5.</b> Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR para la amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S .....	148
<b>Tabla IV.6.</b> Reactivos empleados en la reacción de la PCR efectuada para amplificar fragmentos del gen codificante del ARNr 16S correspondientes a la regiones hipervariables V6-V8 en un volumen final de 50 µL .....	149
<b>Tabla IV.7.</b> Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR semianidada .....	151
<b>Tabla IV.8.</b> Reactivos empleados en la reacción de la PCR semianidada efectuada para amplificar fragmentos del gen estructural de la subunidad $\alpha$ de la enzima amonio-monooxigenasa ( <i>amoA</i> ) en un volumen final de 50 µL .....	151
<b>Tabla IV.9.</b> Gradientes de electroforesis para los diferentes grupos microbianos .....	155
<b>Tabla IV.10.</b> Resultados del análisis de redundancia (RDA), realizado con los datos de las especies (presencia/ausencia de las clases de banda de Bacterias del DGGE) y las variables ambientales del influente en el SFBBR (SST, DQO, DBO <sub>5</sub> , pH, salinidad y día de muestreo) en los cuatro experimentos .....	166
<b>Tabla IV.11.</b> Resultados del análisis de redundancia (RDA), realizado con los datos de las especies (presencia/ausencia de las clases de banda de hongos del DGGE) y las variables ambientales del influente en el SFBBR (SST, DQO, DBO <sub>5</sub> , pH, salinidad y día de muestreo) en los cuatro experimentos .....	179
<b>Tabla IV.12.</b> Resultados del análisis de redundancia (RDA), realizado con los datos de las especies (presencia/ausencia de las clases de banda de arqueas del DGGE) y las variables ambientales del influente en el SFBBR (SST, DQO, DBO <sub>5</sub> , pH, salinidad y día de muestreo) en los cuatro experimentos .....	179
<b>Tabla IV.13.</b> Resultados del análisis de redundancia (RDA), realizado con los datos de las especies (presencia/ausencia de las clases de banda de Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio del DGGE) y las variables ambientales del influente en el SFBBR (SST, DQO, DBO <sub>5</sub> , pH, salinidad y día de muestreo) en los cuatro experimentos .....	186
<b>Table V.1.</b> Operational parameters of experiments conducted in the submerged fixed bed reactor during the experiments 1, 2, 3 and 4 .....	212
<b>Table V.2.</b> Ammonium, nitrate and nitrite concentration conducted in the submerged fixed bed reactor during the experiments 1, 2, 3 and 4 .....	214

## ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AHLs</b>	N-Acyl Homoserine Lactones, N-Acil Homoserina Lactonas
<b>AMO</b>	Ammonia Monooxygenase, Amonio Monooxigenasa
<b>ANAMMOX</b>	Anaerobic Ammonia Oxidation, Oxidación de Amonio Anaerobia
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance, Analisis de la Varianza
<b>AOA</b>	Ammonia Oxidizing Archaea, Arqueas Oxidadoras de Amonio
<b>AOB</b>	Ammonia Oxidizing Bacteria, Bacterias Oxidadoras de Amonio
<b>APS</b>	Ammonium Persulfate, Persulfato de Amonio
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ARNr</b>	Ácido Ribonucleico Ribosómico
<b>AS</b>	Activated Sludge, Fangos Activos
<b>BAF</b>	Biological Aerated Filter, Filtros Sumergidos Aireados
<b>BOD<sub>5</sub></b>	Biochemical Oxygen Demand
<b>CEDEX</b>	Centro de Estudios y Experimentación de Obras Publicas
<b>COA</b>	Canonical Ordination Axis, Eje de Ordenamiento Canónico
<b>COD</b>	Chemical Oxygen Demand
<b>c.s.p.</b>	Cantidad Suficiente Para
<b>DBO<sub>5</sub></b>	Demanda Biológica de Oxígeno
<b>DCA</b>	Detrended Correspondence Analysis, Análisis de Correspondencias sin tendencias
<b>DGGE</b>	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante
<b>DQO</b>	Demanda Química de Oxígeno
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>DWA</b>	German Association for Water, Wastewater and Waste, Asociación Alemana para Aguas, Aguas Residuales y Residuos
<b>EDAR</b>	Estación Depuradora de Aguas Residuales
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid, Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EPA</b>	U.S. Environmental Protection Agency, Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
<b>EPS</b>	Extracellular Polymeric Substances, Sustancias Poliméricas Extracelulares
<b>FBBR</b>	Fixed Bed Biofilm Bioreactor, Biorreactor de Biopelícula Fija
<b>HAO</b>	Hydroxylamine Oxidoreductase, Hidroxilamina Oxidorreductasa
<b>HRT</b>	Hydraulic Retention Time
<b>IC</b>	Ion Chromatography
<b>LSD</b>	Least Significant Difference
<b>MBR</b>	Biorreactor de Membrana
<b>MDS</b>	Mínimas Diferencias Significativas
<b>NOB</b>	Nitrite Oxidizing Bacteria, Bacterias Oxidadoras de Nitrito
<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Nitrógeno Amoniacal
<b>OD</b>	Oxígeno Disuelto
<b>OECD</b>	The Organisation for Economic Co-operation and Development
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction, Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PE</b>	Polyethylene, Polietileno
<b>PP</b>	Polypropylene, Polipropileno

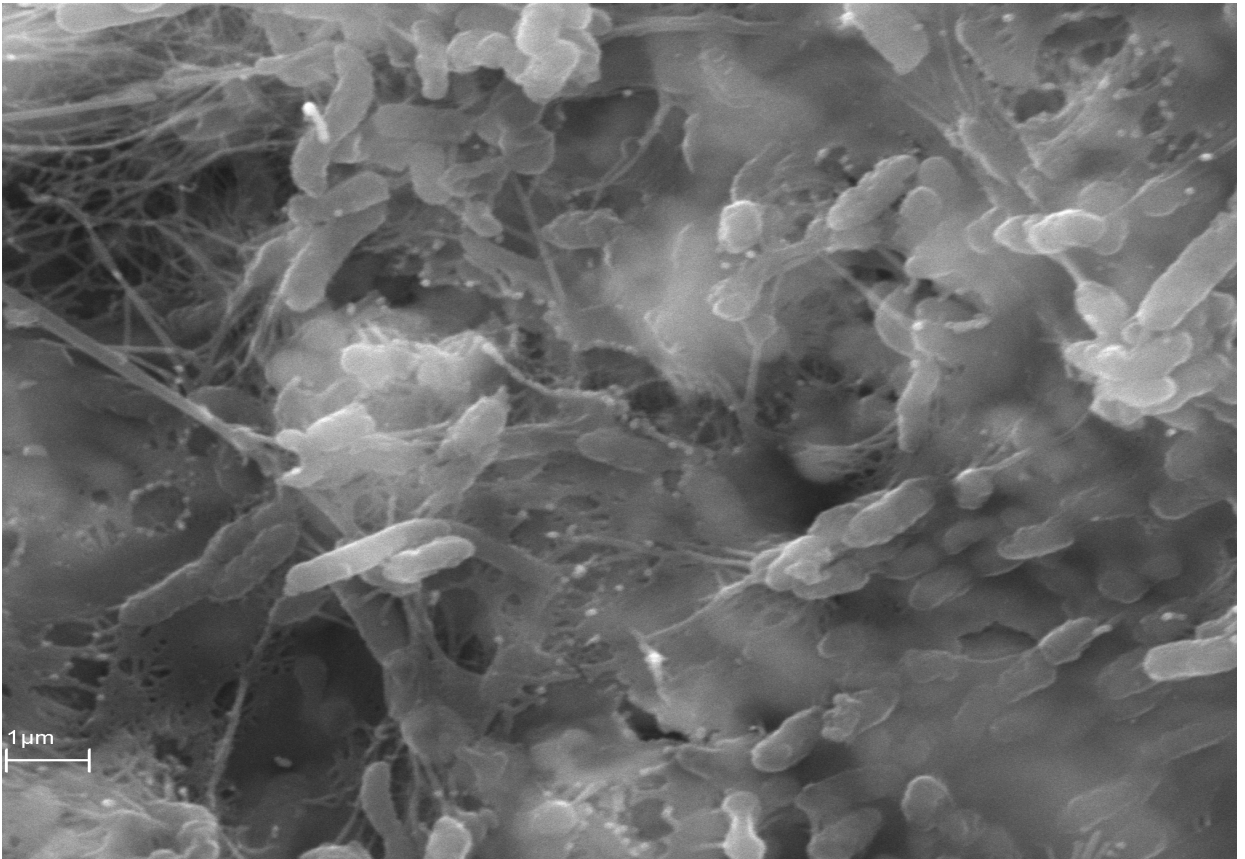
## Acrónimos y Abreviaturas

---

<b>PVC</b>	Polyvinyl chloride, Cloruro de Polivinilo
<b>RBC</b>	Rotating Biological Contactors, Biodiscos Biológicos Rotativos
<b>RDA</b>	Redundancy Analysis, Análisis de Redundancia
<b>RNAr</b>	Ribosomal Ribonucleic Acid
<b>SFBBR</b>	Submerged Fixed Bed Biofilm Bioreactor, Biorreactor de Biopelícula Fija Sumergida
<b>SSP</b>	Species, Especies
<b>SST</b>	Sólidos en Suspensión Totales
<b>SSV</b>	Sólidos en Suspensión Volátiles
<b>TAE</b>	Tris-Acetate-EDTA, Tris-Acetato-EDTA
<b>TBE</b>	Tris-Borate-EDTA, Tris-Borato-EDTA
<b>TCA</b>	Trichloroacetic acid, Ácido Tricloroacético
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylenediamine, Tetrametiletilendiamina
<b>TF</b>	Trickling Filter, Filtros Percoladores
<b>TGGE</b>	Temperature Gradient Gel Electrophoresis, Electroforesis en Gel con Gradiente de Temperatura
<b>TKN</b>	Total Kjeldahl Nitrogen, Nitrógeno Kjeldahl Total
<b>TRC</b>	Tiempo de Retención Celular
<b>TRH</b>	Tiempo de Retención Hidráulica
<b>TSS</b>	Total Suspended Solids
<b>TWS</b>	Tribal Water Systems Program
<b>UPGMA</b>	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, Algoritmo para Análisis Filogenético
<b>UV</b>	Ultraviolet, Ultravioleta
<b>VSS</b>	Volatile Suspended Solids
<b>WHO</b>	World Health Organization, Organización Mundial de la Salud
<b>WSD</b>	Water Supplies Department
<b>WWTP</b>	Wastewater Treatment Plant

# Capítulo I

## Introducción general y Objetivos



### I.1. INTRODUCCIÓN

La escasez de agua y la falta de servicios de saneamiento siguen siendo un problema en todo el mundo. En 2008, unos 900 millones de personas carecían de acceso al agua potable y 2,6 mil millones de personas se quedaron sin acceso a un saneamiento adecuado (WHO, 2010). La gravedad de este problema puede reflejarse en el hecho de que aproximadamente el 80% de todas las enfermedades que ocurren en los países en desarrollo están relacionadas con el agua (OECD, 2006), y causan la pérdida de 2,2 millones de vidas de niños cada año (WHO, 2010).

Para cumplir con los objetivos de desarrollo de Naciones Unidas hay que mejorar el saneamiento de 1000 millones de personas para el año 2015. El crecimiento demográfico, la urbanización y el calentamiento global asociado al cambio climático, afectan el ciclo urbano del agua. Para hacer frente a estos crecientes problemas globales y para satisfacer la demanda de agua dulce y los requisitos de saneamiento, es necesario identificar recursos hídricos alternativos más económicos y ecológicos.

Con objeto de ahorrar agua dulce, debido a la escasez de la misma, en la década de los 50 en Hong Kong, se comenzó a aplicar un sistema de abastecimiento de agua dual, que proporcionaba agua dulce para usos potables y agua de mar para la descarga de inodoros. En 2008/09 se emplearon un promedio de 750.000 m<sup>3</sup>/día de agua de mar para los inodoros, cubriendo de este modo el 80% de las necesidades de 7 millones de habitantes. Es uno de los mayores sistemas alternativos de suministro de agua en el mundo. El agua de mar empleada para el abastecimiento de los inodoros procede directamente de la playa (Leung *et al.*, 2012).

Sin embargo, a pesar de su éxito en el ahorro de alrededor del 20% del suministro total de agua en Hong Kong (WSD, 2009), las aguas residuales salinas generadas (que contienen un 20-30% de agua de mar) causan problemas en los tratamientos biológicos de depuración de las mismas. Los microorganismos en un medio con alta salinidad, deben mantener un nivel de agua intracelular lo suficientemente alto para su actividad metabólica, de lo contrario se produciría el fracaso del tratamiento biológico de las aguas residuales.

Teniendo en consideración el notable aumento de la llegada de aguas residuales salinas a las estaciones depuradoras procedentes de diferentes industrias, la intrusión

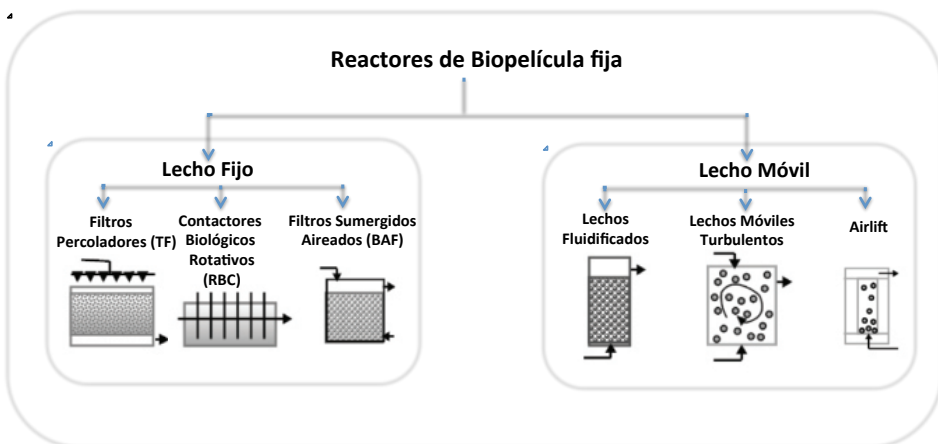
marina, etc... es preciso el tratamiento efectivo de estas aguas residuales con el fin de evitar la contaminación de los cauces receptores. Es importante buscar soluciones alternativas a los procesos actuales de tratamiento, así como incrementar el conocimiento del efecto, que estos efluentes con salinidad variable pueden ejercer sobre el correcto funcionamiento de los sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales, con el objetivo de cumplir con los límites de vertido y de calidad del agua exigidos.

Con este fin se han empleado diferentes tecnologías, pero algunas de ellas no son siempre adecuadas y su aplicación supone un alto coste energético y de reactivos. En este sentido, no todos los sistemas de depuración se adaptan a los cloruros de igual forma (Yang *et al.*, 1995). Según Smythe *et al.* (1997), dependiendo del sistema de tratamiento, se pueden tratar los influentes con rendimientos aceptables a partir de unos niveles de concentración de sales. Así, un sistema convencional de fangos activos puede tratar influentes de concentraciones salinas inferiores al 5%; sistemas anaerobios concentraciones inferiores al 1,5% y sistemas de lecho fluidificado, filtros sumergidos, etc... hasta un 10%, ofreciendo de este modo los filtros sumergidos una serie de ventajas frente a los demás sistemas para el tratamiento de efluentes salinos.

### **I.1.1. Procesos de biopelícula fija en el tratamiento de aguas residuales**

Existen numerosos sistemas de biopelícula fija utilizados en la depuración biológica de las aguas residuales. La aplicación de estos sistemas de biopelícula fija son una alternativa a los fangos activos (AS), presentando varias ventajas con respecto a los sistemas en suspensión. Flexibilidad operativa, bajos requerimientos de espacio, reducción del tiempo de retención hidráulica (TRH), resistencia a los cambios en el medio ambiente, aumento del tiempo de residencia de la biomasa, alta concentración de biomasa activa, mayor capacidad para degradar compuestos recalcitrantes, así como una tasa de crecimiento microbiano más lento con una menor producción de fangos son algunos de los beneficios de los procesos de biopelícula (Verma *et al.*, 2006; Wilderer y McSwain, 2004; Chen y Chen, 2000; Lazarova y Manem, 2000). Estos sistemas también permiten un mayor control de las velocidades de reacción y la dinámica de la población (Lazarova y Manem, 2000).

Los sistemas de biopelícula comercialmente más importantes se pueden clasificar de acuerdo a la movilidad de los soportes o “carrier” en procesos de lecho fijo y de lecho móvil, como se muestra en la Figura I.1. Los sistemas de lecho fijo incluyen todos aquellos donde se forma la biopelícula sobre un material de soporte en medios estáticos, es decir, el material de relleno esta inmóvil (Lazarova y Manem, 2000). Los sistemas de lecho móvil comprenden todos los procesos de biopelícula fija en los que el medio se encuentra en continuo movimiento, suspendiendo libremente el material de relleno dentro del reactor mediante aire o agua a alta velocidad o agitación mecánica (Rodgers y Zhan, 2003).



**Figura I.1. Descripción general de los biorreactores de biopelícula fija más utilizados para el tratamiento de aguas residuales.**

Los procesos de biopelícula en el tratamiento biológico de aguas residuales se comenzaron a usar a finales del siglo XIX en Gales (Gran Bretaña) construyéndose los primeros tipos de lechos bacterianos (trickling filter, TF) y biodiscos biológicos rotativos (rotating biological contactors, RBC). La experiencia con otros reactores de biopelícula fija (FBBRs) es de carácter más reciente. Los reactores de biopelícula fija sumergida (SFBBR o BAF) constituyen una tecnología emergente, que comercialmente ha sido introducida en Europa en las últimas dos décadas. Desde entonces, el uso de este proceso se ha ampliado y su fiabilidad ha sido establecida de una forma incuestionable (Schlegel y Koeser, 2007). Como hemos visto con anterioridad, esta nueva generación de sistemas de biopelícula fija tienen el medio sumergido en el fluido a tratar.

### I.1.2. Biopelículas

Podemos definir biopelícula o "*biofilm*", como una estructura compleja formada por agregados celulares (grupos de células densamente empaquetados) y huecos intersticiales, adherida a un material o interfase que puede ser de naturaleza abiótica (rocas, metales, vidrios, plásticos, etc.) o biótica (mucosa intestinal, plantas, etc.) (Lewandowski *et al.*, 1994).

La génesis del término "biopelícula" comienza con el descubrimiento de los microorganismos en 1684, atribuido a Antoni van Leeuwenhoek, quien fue el primero en publicar las observaciones microscópicas de bacterias, a las que bautizó como "animálculos" (Madigan *et al.*, 2003). A pesar de que la forma más común de crecimiento de los microorganismos en la Tierra es en comunidades asociadas a superficies (Stoodley *et al.*, 2002; Sutherland, 2001a), no es hasta 1934 cuando Claude Zobell examina poblaciones marinas empleando microscopía directa y concluye que estas bacterias son capaces de adherirse a una superficie formando así una población estable.

Durante las décadas de 1960 y 1970 la investigación sobre "limos microbianos" avanza. En 1964, Ralph Mitchell y Kevin Marshall estudiaron la formación de una biopelícula por bacterias en cultivo puro y distinguieron entre una fase inicial donde la bacteria se adhiere a la superficie de forma reversible y una segunda fase donde se establece una unión irreversible. Posteriormente se ha demostrado como la bacteria sufre cambios en su fenotipo cuando, adherida a una superficie, forma parte integrante de una biopelícula (Costerton, 1999). Sin embargo, el término "biopelícula" no fue unánimemente formulado hasta el año 1984 (Bryers, 2000).

En la actualidad está bien establecido el hecho de que el estilo de vida bacteriano más común en los ambientes naturales es aquel en que las bacterias se adhieren a una superficie formando biopelículas (Danese *et al.*, 2000; Decho, 2000; Watnick y Kolter, 2000), donde encuentran las necesidades fundamentales para su desarrollo (Gómez, 2000). De hecho, podemos considerar que las bacterias que no se encuentren formando parte de una biopelícula constituyen la fase inicial de la formación de otra biopelícula en una nueva superficie (Watnick y Kolter, 2000).

Los microorganismos en las biopelículas producen sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que mantienen los agregados de células unidos y forman la estructura



de la matriz del biofilm (Stewart y Franklin, 2008; Flemming *et al.*, 2007; Branda *et al.*, 2005). El hecho de que el EPS se produce incluso en condiciones limitantes de crecimiento, a pesar del alto consumo de energía que requiere, hace hincapié en las ventajas de las células bacterianas en las biopelículas (Castonguay *et al.*, 2006). La matriz de las biopelículas protege a las células bacterianas de los agentes antimicrobianos y el estrés ambiental, actuando como una barrera física (Davey y O'Toole, 2000).

Otras ventajas ecológicas de las biopelículas son la cooperación metabólica, la presencia de microhábitats y la mejora en la tasa de transferencia de genes. Cooperación metabólica eficiente o dependencia mutua, con frecuencia se desarrollan dentro de los biofilms entre especies debido a intercambios de sustratos facilitados por la proximidad espacial de las células. La existencia de microhábitats con diversas concentraciones de oxígeno y de nutrientes dentro de los biofilms, crean las condiciones favorables para determinadas especies microbianas, estableciendo condiciones fisiológicas diferenciadas. A menudo se detecta en las comunidades del biofilm una mejora de la tasa de transferencia de genes, lo que garantiza una evolución progresiva, y la diversidad genética aumenta la competitividad de las células bacterianas (Wimpenny *et al.*, 2000).

Las biopelículas se consideraron inicialmente como sistemas homogéneos de células atrapadas en una matriz, pero investigaciones recientes apuntan en la dirección opuesta. Hoy en día, la percepción de la heterogeneidad fisiológica y genética en las biopelículas es generalmente aceptada (Stoodley *et al.*, 2002; Wimpenny *et al.*, 2000). Los biofilms naturales suelen albergar un gran número de especies microbianas que forman complejas comunidades diferenciadas capaces de desarrollar estructuras muy complicadas, a menudo separadas por una red de canales de agua (Kolter y Greenberg, 2006; Stoodley *et al.*, 2002). Esto requiere de una organización sofisticada, que en algunos organismos es controlada por un sistema de comunicación intercelular, conocido como percepción de quórum o “quorum sensing”. La estructura del biofilm también se ve afectada por muchas otras condiciones, tales como propiedades de la superficie y de la interfase, disponibilidad de nutrientes, composición de la comunidad microbiana y la hidrodinámica (Davey y O'Toole, 2000).

El fluido en el que crezca la biopelícula afectará al desarrollo de la misma, principalmente como resultado de la mezcla y los patrones de flujo característicos del

entorno o del reactor, y su geometría. La transferencia de masas desde el agua a la biopelícula depende del régimen dinámico de la primera. En condiciones laminares, la transferencia de masas es mucho más lenta comparada con aquella en condiciones de flujo turbulento (Characklis y Wilderer, 1989).

### **I.1.2.1. Composición de las biopelículas en sistemas de tratamiento de aguas residuales**

Las biopelículas están formadas por microorganismos asociados a una superficie, atrapados en una matriz altamente hidratada formada por sustancias poliméricas extracelulares (EPS), es decir, polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN extracelular (Anderson *et al.*, 2011; Flemming *et al.*, 2007). La producción de una matriz extracelular es un requisito previo para la formación de las biopelículas (Flemming *et al.*, 2007; Kolter y Greenberg, 2006; Branda *et al.*, 2005). La matriz de la biopelícula generalmente está compuesta de hasta un 97% de agua, un 2,5% de biomasa celular, un 3,6% de EPS y de iones (Sutherland, 2001a).

#### **I.1.2.1.1. Biomasa celular**

El contenido de biomasa celular de las biopelículas en el tratamiento de aguas residuales es muy variable, pudiendo oscilar entre el 10% y el 90% de la materia orgánica. Los sistemas naturales de biopelícula son una comunidad compleja de bacterias, hongos, arqueas, protozoos y otros meso y macro-invertebrados en una capa viscosa en la superficie de soporte del medio filtrante (Lee Man Chu y Wong, 2006; Davey y O'Toole, 2000). Dependiendo de las condiciones ambientales las biopelículas van a estar formadas por numerosas especies de microorganismos diferentes.

Lee Man Chu y Wong (2006) indican que las biopelículas en tratamientos de aguas residuales están constituidas principalmente por bacterias y hongos. Las bacterias constituyen la población mayoritaria, tanto en número como en biomasa, siendo las primeras en aparecer en una biopelícula en formación. Los principales géneros de bacterias presentes en las biopelículas son *Zoogloea*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Beggiatoa*, *Alcaligenes*, *Sphaerotilus*, *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* (Lee Man Chu y Wong, 2006).

Los hongos también son comunes en las regiones aeróbicas y puede desarrollarse a pH bajo o en alto contenido de materia orgánica. Debido a la formación de micelios pueden producir bloqueos en los intersticios del biofilm, impidiendo el drenaje y la aireación, dando lugar al fenómeno conocido como “*ponding*” (estancamiento del agua debido a la colmatación del biofiltro). Los géneros más comunes son *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Mucor*, *Ascoidea*, *Subbaromyces* y *Sepedonium* (Lee Man Chu y Wong, 2006).

Las algas, que se encuentran en la parte de la biopelícula expuesta a la luz (por lo general en los primeros 5 cm), contribuyen relativamente poco al tratamiento de aguas residuales (Lee Man Chu y Wong, 2006).

La biopelícula microbiana es consumida por protozoos, nematodos, rotíferos, anélidos y larvas de insectos. Estos organismos ayudan a eliminar la capa externa de células, permitiendo a la biopelícula proliferar (Fried *et al.*, 2000). Más de 200 especies de protozoos han sido aislados y más del 50% son ciliados como el *Paramecium* spp., *Vorticella* spp. y *Opercularia* spp., obteniendo el alimento de las células bacterianas que son de libre flotación en el medio acuoso, o directamente de la propia biopelícula. Amebas, como la *Ameba* spp. y flagelados como *Trigonomonas* spp. también están presentes. Se alimentan de células dispersas de bacterias y ayudan a clarificar el efluente (Lee Man Chu y Wong, 2006).

### **1.1.2.1.2. Sustancias poliméricas extracelulares (EPS)**

El EPS se compone normalmente de polisacáridos 40-95%, proteínas 10-60%, ácidos nucleicos 10-20% y lípidos 10-40% (Flemming y Wingender, 2002). La composición del EPS varía con la composición de los consorcios microbianos y las condiciones ambientales (Kolter y Greenberg, 2006). Los carbohidratos se han identificado como el componente mayoritario del EPS de muchos cultivos puros (Liu y Fang, 2002; Cescutti *et al.*, 1999; Sutherland y Kennedy, 1996). Sin embargo estudios recientes de poblaciones mixtas en sistemas de tratamientos de aguas residuales indican que el componente mayoritario del EPS son las proteínas (Liu y Fang, 2002; Veiga *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 1996), probablemente debido a la gran cantidad de exoenzimas atrapadas en el mismo (Liu y Fang, 2002; Dignac *et al.*, 1998).

La fracción proteica del EPS es en general muy grande, pero, sin embargo, se sabe muy poco sobre su papel en las biopelículas. Por ejemplo, no está claro si la función de las proteínas es como componentes estructurales o si tienen otras funciones con independencia de la integridad mecánica (Stewart, 2006). Para algunas especies bacterianas se demuestra que las proteínas tienen una función importante en la adhesión inicial a la superficie. Proteínas adhesinas, proteínas asociadas a la superficie celular como pili, los flagelos, curli y fibras amiloides se cree que son factores importantes para la formación de biofilms (Flemming *et al.*, 2007; Larsen *et al.*, 2007; Gohl *et al.*, 2006), así como un grupo de homólogos de las grandes proteínas, conocidas como proteínas asociadas a la biopelícula, que se encuentran por ejemplo, en *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* y *Salmonella* (Latasa *et al.*, 2006).

Aparte de adhesinas, a menudo se detectan enzimas extracelulares en la matriz del biofilm. La presencia de proteasas principalmente, pero también glucosidasas retenidas en el EPS sugiere que están involucradas en el metabolismo de la comunidad (Romaní *et al.*, 2008).

Los ácidos nucleicos detectados en el EPS se creyó en un principio que se originaban como consecuencia de la contaminación intracelular durante el procedimiento de extracción o que procedían de la presencia de células muertas en la matriz. Sin embargo, Whitchurch *et al.* (2002) demostraron que el ADN extracelular es necesario para el establecimiento inicial de biofilms por *Pseudomonas aeruginosa* y posteriormente Böckelmann *et al.* (Böckelmann *et al.*, 2007; Böckelmann *et al.*, 2006) demostraron la importancia estructural del ADN en las biopelículas. La estructura del biofilm se estabiliza por redes de filamentos de ADN extracelular, los cuales podrían estar protegidos de la digestión enzimática por metilación. El ADN extracelular tiene una secuencia diferente a la del ADN genómico implicando producción activa y transporte (Böckelmann *et al.*, 2006).

La fracción lipídica del EPS es probablemente la menos investigada y se origina de tres fuentes: 1. absorción directa del medio de las aguas residuales; 2. procedente de la lisis celular; 3. del metabolismo microbiano. Estudios sobre el EPS a partir de gránulos de fangos activos revelan la presencia de glicolípidos, fosfolípidos, lípidos neutros y lipopolisacáridos (Conrad *et al.*, 2003). Los lípidos del EPS no son estructuralmente

importantes (Adav *et al.*, 2008), pero sin embargo, juegan un papel importante en las propiedades hidrófobas del EPS (Conrad *et al.*, 2003).

La fracción de hidratos de carbono del EPS se compone principalmente de polisacáridos. En las biopelículas, los exopolisacáridos se postulan como los responsables de la estabilidad estructural y la arquitectura del biofilm (Sutherland, 2001b). Los exopolisacáridos son esencialmente moléculas grandes, con un peso molecular de 500-2000 kDa y a menudo se asocian para formar moléculas aún más grandes.

Los carbohidratos encontrados en exopolisacáridos bacterianos son muy diversos. Algunos de los exopolisacáridos son homopolímeros, por ejemplo, celulosa, dextrano y ácido siálico, pero la gran mayoría son heteropolímeros como alginato, gelano y xantano por mencionar algunos (Sutherland, 2001b, Sutherland, 1990). Las cadenas de polisacáridos pueden ser lineales o ramificadas. Para complicar aún más la situación, es común que una cepa pueda producir más de un tipo de exopolisacárido (Stewart, 2006; Sutherland, 2001b). Polisacáridos bacterianos se componen de una gran variedad de derivados de monosacáridos. Entre los más comunes son la D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, L-fucosa, L-ramnosa, L-arabinosa, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina, así como ácidos urónicos como ácido D-glucurónico, ácido D-galacturónico y D-manurónico. Otros monosacáridos menos frecuentes son la D-ribosa y D-xilosa (Saravanan *et al.*, 2006; Bahat-Samet *et al.*, 2004; Sutherland, 1990).

La composición y conformación de los monosacáridos tiene un enorme impacto en las propiedades de los polisacáridos y por lo tanto también en las propiedades de la matriz del biofilm. Por ejemplo, una fracción de ácidos urónicos alta conlleva polímeros polianiónicos, los cuales fácilmente interactúan con cationes, estabilizando la conformación de polisacáridos (Sutherland, 1990). En *Azospirillum brasilense* se ha encontrado que los polisacáridos con un alto contenido en arabinosa tienen la capacidad de inducir la agregación de células (Bahat-Samet *et al.*, 2004; Burdman *et al.*, 2000).

Las propiedades físicas de los polisacáridos dependen de la disposición de monosacáridos y la asociación de la cadena de polisacáridos (Kumar *et al.*, 2007). La síntesis de polisacáridos de cada especie bacteriana es generalmente independiente de la fuente de carbono disponible. Sin embargo, las cepas capaces de sintetizar más de un polisacárido pueden producir diferentes productos dependiendo del sustrato de carbono

presente. Un ejemplo es *Pseudomonas syringae* que produce levano cuando el sustrato es la sacarosa y alginato cuando el sustrato es la glucosa (Sutherland, 1990). La cantidad de exopolisacáridos producidos también depende del sustrato de carbono. La disponibilidad de nutrientes como el nitrógeno o el fósforo, en relación con el carbono, puede determinar si la célula utiliza su energía para la división celular o la producción de exopolisacáridos. En general, las bajas concentraciones de nitrógeno, fósforo u otros sustratos necesarios para la división celular y la alta concentración de sustrato de carbono promueven la producción de exopolisacáridos (Alves *et al.*, 2002; Sutherland, 1990).

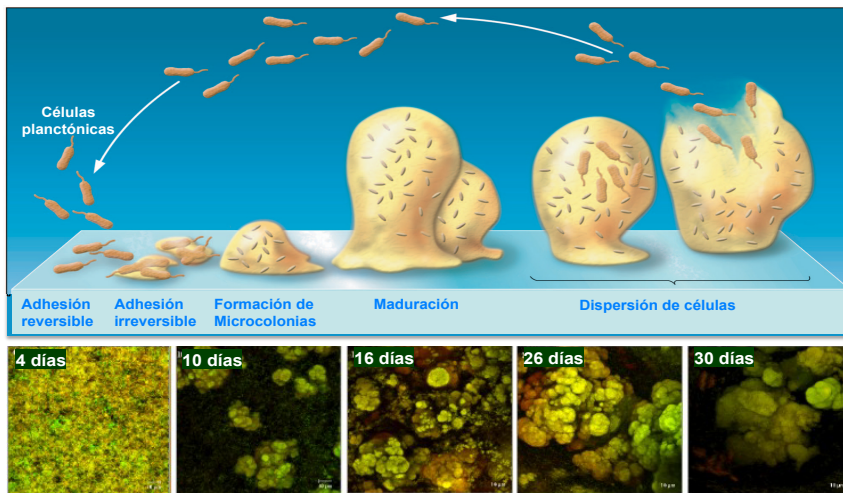
Las funciones que ejerce el EPS son consecuencia de su naturaleza biológica y de sus características químicas y físicas, que lo hacen ser el principal agente estructural de las biopelículas (Decho, 2000). Entre sus características se encuentran las de:

- Permitir, establecer y mantener asociaciones entre microorganismos, y entre éstos y su medio ambiente (Decho, 2000).
- En la biopelícula la división celular es muy baja, en su lugar el exceso de energía lo emplean en sintetizar EPS, de tal forma que estas constituyen una fuente de reserva de energía y carbono (Liu y Fang, 2002; Decho, 2000).
- Protege a las exoenzimas, enzimas secretadas por la bacteria que no están en contacto directo con la membrana celular y cuya función es la de hidrolizar moléculas orgánicas de alto peso molecular (Hoppe, 1991).
- En la mayoría de los casos el EPS actúa como protector. Así, la presencia de exopolisacáridos confiere a la célula bacteriana una protección frente a la desecación dada la capacidad de estos polímeros de retener agua debido a su carácter hidrófilo (Potts, 1994; Whitfield y Valvano, 1993).
- Actúa como una esponja donde quedan atrapados y concentrados moléculas orgánicas e iones del medio acuoso. Este proceso favorece la concentración de nutrientes bacterianos en el interior de la biopelícula (Guibaud *et al.*, 2003; Decho, 2000).
- Juega un papel crucial en la floculación (Frølund *et al.*, 1996; Rudd *et al.*, 1984) de los fangos activos y en la estructura de los flóculos que lo forman (Schmidt y Ahring, 1996).

- Capacidad quelante de metales tóxicos y otros contaminantes (Decho, 2000).
- Confieren a la célula protección frente a agentes líticos, fagocíticos, ataque de protozoos e incluso frente a los bacteriófagos. Además inhiben la acción de determinados agentes antimicrobianos.

### I.1.2.2. Formación y desarrollo de biopelículas bacterianas

Las características generales y la complejidad tridimensional logradas en algunas biopelículas llevaron a la idea de que la formación de éstas se produce a través de los mismos pasos clave en varios entornos (O'Toole *et al.*, 2000; Escher y Characklis, 1990). Las fases consisten en una secuencia ordenada de varias etapas de desarrollo (Watnick y Kolter, 1999; Palmer *et al.*, 1997), cada una de las cuales se requiere para alcanzar finalmente un nivel de madurez (O'Toole *et al.*, 2000; Costerton, 1999). Distintas etapas esenciales en el proceso de formación de biopelículas han sido identificadas y un esquema simplificado de las más importantes se puede ver en la Figura I.2.



Gilmore *et al.*, 2003 *Inf. Imm.* 71: 4759

**Figura I.2. Etapas en la formación y desarrollo de las biopelículas: I. Adhesión reversible; II. Adhesión irreversible; III. Maduración I: Formación de microcolonias; IV. Maduración; V. Dispersión de células.**

La transición de las células planctónicas de vida libre a un modo complejo de biofilm es un proceso de desarrollo altamente regulado. El inicio de este proceso se cree que es provocado por determinadas señales ambientales, como la disponibilidad de nutrientes (Rosén *et al.*, 1998). La respuesta de cada especie bacteriana a estas señales puede, sin embargo, ser diferente. Por ejemplo, *Escherichia coli* O517: H7 forma biofilms sólo en los medios con bajo contenido de nutrientes (Stephenson y Stephenson, 1992) mientras que otras cepas de *E. coli* requieren específicamente de suplementos de aminoácidos para producir biopelículas en medio mínimo (Van Limbergen *et al.*, 1998). Las bacterias se van a unir a una superficie u otra en función de que el medio donde se encuentran sea rico o no en nutrientes, es decir, cuando el medio es rico en nutrientes se unen a cualquier superficie, pero cuando ocurre lo contrario se fijan sobre una superficie rica en éstos (Watnick y Kolter, 2000). Esta adaptación asegura a la bacteria el acceso a los nutrientes en ambientes tanto ricos como pobres en estos.

Además del contenido nutricional, otras señales ambientales como la temperatura, osmolaridad, pH y la disponibilidad de oxígeno también van a influir en la formación de biopelículas (Gottenbos *et al.*, 1999), aunque algunos organismos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* son capaces de formar biopelículas en la mayoría de las condiciones que favorecen el crecimiento bacteriano (Wilderer y McSwain, 2004).

Generalmente las superficies son acondicionadas con la deposición de sustancias nutritivas (macromoléculas orgánicas) las cuales pueden ser atractivas a los sistemas quimiotácticos bacterianos, permitiendo la adherencia de las bacterias y el desarrollo de la biopelícula (Vila *et al.*, 2008; Reisner *et al.*, 2005). La película acondicionadora que se crea en esta primera etapa modifica las propiedades fisicoquímicas de la superficie, actuando como fuente concentrada de nutrientes y elementos metálicos traza requeridos. Al mismo tiempo suprime la liberación de iones metálicos tóxicos y tiene un papel detoxificador de sustancias inhibitoras disueltas (Percival *et al.*, 2000).

En el inicio de este proceso, las células planctónicas emiten radialmente señales moleculares, que difunden a través del medio. El aumento de la concentración de estas señales en la zona próxima a la superficie (donde la difusión de las mismas está impedida) hará sentir a las bacterias su proximidad (Costerton, 1999).

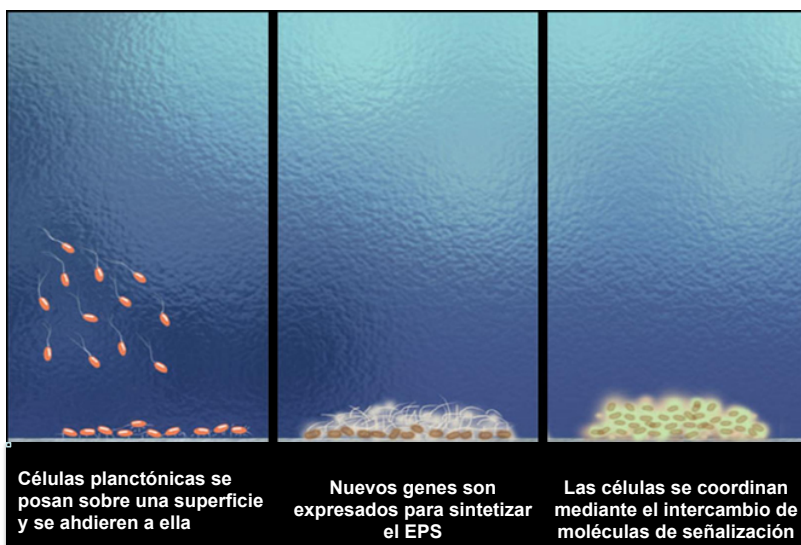


Tras el acondicionamiento de la superficie tiene lugar la deposición y adhesión reversible de las células bacterianas. Este fenómeno ocurre pasivamente por movimiento browniano y simple sedimentación o por movimiento activo de bacterias flageladas, lo que permite el establecimiento de interacciones físicas y electrostáticas entre las bacterias y la superficie (Lindsay y Holy, 2008; Tenke *et al.*, 2006). En esta adhesión reversible hay un continuo intercambio entre células libres, las cuales se incorporan a la biopelícula y células fijadas, que sufren un proceso de desorción, desprendiéndose.

Ridgway (1988) observó que sólo ciertas bacterias pueden adherirse a esta etapa de desarrollo de la biopelícula y que hay un número limitado de sitios de unión. Parece ser, que las propiedades del agua de alimentación (por ejemplo, pH, concentración de nutrientes, temperatura, fuerza iónica, presencia de cationes multivalentes, velocidad de flujo, etc), así como las propiedades de las superficies pueden promover o desalentar la adhesión microbiana (Schneider *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2004; Redman *et al.*, 2004). La hidrofobicidad de la superficie celular y la presencia de apéndices filamentosos extracelulares pueden influir en la velocidad y en el grado de adhesión microbiana. La hidrofobicidad de la superficie celular es importante en la adhesión debido a que las interacciones hidrofóbicas tienden a aumentar con un aumento de la naturaleza no polar de una o ambas superficies implicadas, es decir, la célula microbiana y la superficie de adherencia (Simoës *et al.*, 2010; Donlan, 2002). De acuerdo con Drenkard y Ausubel (2002), la capacidad de las bacterias para unirse entre sí y a las superficies depende en parte de la interacción de dominios hidrofóbicos.

Inmediatamente después de la adhesión reversible y el crecimiento inicial, las bacterias comienzan a producir sustancias poliméricas extracelulares (EPS), lo que lleva a la colonización irreversible de la superficie (Donlan y Costerton, 2002; Davies *et al.*, 1993). La producción de EPS juega un papel clave en la unión de las células (Kachlany *et al.*, 2001; Tsuneda *et al.*, 2001) y es necesario para el desarrollo de la arquitectura del biofilm (Sutherland, 2001a; Danese *et al.*, 2000; Veiga *et al.*, 1997; Allison y Sutherland, 1987). Una vez que se inicia la producción de EPS, la biopelícula crece a través de una combinación de la división celular y el reclutamiento de otros microorganismos integrados dentro de la matriz de exopolisacáridos, dando lugar a la formación de microcolonias.

En esta fase de adhesión irreversible, las bacterias emplean flagelos y pilis para moverse a lo largo de la superficie hasta que contactan con otras bacterias, formando una microcolonia o aumentando la ya existente (Costerton, 1999; Watnick y Kolter, 1999; O'Toole y Kolter, 1998; Pratt y Kolter, 1998). Las microcolonias se expanden para formar una capa que cubre la superficie (Kumar y Anand, 1998).



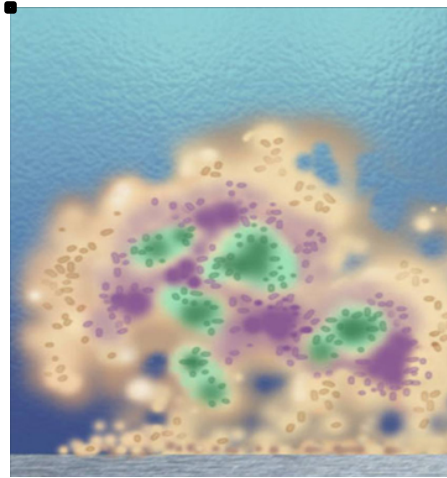
**Figura I.3. Procesos en la biopelícula. Células planctónicas que se adhieren a una superficie, sufriendo un cambio en la expresión génica (Dirckx, Center for Biofilm Engineering, Montana State University-Bozeman).**

Durante la formación de la biopelícula, las células sufren una diferenciación en el patrón de expresión génica en comparación con las células planctónicas. Para que las bacterias puedan ser miembros de una biopelícula han de reprimir la síntesis de flagelos que desestabilizarían la estructura, y activar la síntesis de exopolisacáridos que la refuerzan (Watnick y Kolter, 2000). Esto evidencia la expresión de determinados genes únicamente en las condiciones favorables para la formación de la biopelícula. Dicha expresión está regulada por mecanismos de comunicación célula-célula, tales como el mecanismo denominado percepción de quórum (Decho, 2000; Watnick y Kolter, 2000; Costerton, 1999; Kolter y Losick, 1998). Este mecanismo regulador permite a las bacterias

monitorizar la densidad de sus poblaciones y requiere la acumulación en el medio de compuestos “señal permeables” a través de la membrana celular. Cuando se alcanza un nivel umbral de concentración la molécula señal interacciona con proteínas activadoras de la transcripción y se induce la expresión de genes en respuesta a la densidad celular. Las moléculas señal mejor conocidas pertenecen a la familia de las N-acil-homoserina lactonas (AHLs) (Rodelas *et al.*, 1999). Así este mecanismo permite a un grupo de células microbianas comportarse como una “unidad coordinada”, influyendo en actividades microbianas tan importantes como: patogénesis, transferencia de plásmidos de conjugación, bioluminescencia y actividad de enzimas extracelulares (Decho, 2000). Davies *et al.* (1998) demostraron como mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* incapaces de producir AHLs no pueden formar una biopelícula estable y madura.

Tras la adsorción irreversible se produce la maduración de la biopelícula. Corresponde con un incremento en el número de células de la biopelícula a expensas del sustrato sin descartar que a su vez las células puedan también producir o formar cantidades importantes de productos, excretando algunos de ellos, como por ejemplo el EPS que queda constituyendo parte de la biopelícula, o las AHLs. En esta etapa, cuando las biopelículas alcanzan su madurez y máximo grosor, se puede considerar que el crecimiento neto de la microbiota es cero. En estas circunstancias las bacterias no se dividen pero son viables y cultivables. Así en las biopelículas maduras la división celular es infrecuente (al contrario que en las células planctónicas, que consumen nutrientes para su multiplicación fundamentalmente) utilizando esa energía en exceso para producir EPS que podría ser digerido por las células en momentos de carencia (Watnick y Kolter, 2000).

Las biopelículas maduras son comunidades heterogéneas, espacial y temporalmente dinámicas (figura I.4), que pueden adoptar diferentes arquitecturas en función de las características del entorno (la disponibilidad de nutrientes, pH, temperatura, las fuerzas de cizallamiento, osmolaridad), así como la formación de los consorcios microbianos (De Lancey Pulcini, 2001). Se trata de estructuras complejas rodeadas por canales de agua de alta permeabilidad, lo que facilita el transporte de nutrientes y oxígeno al interior de la biopelícula (Kolter y Greenberg, 2006; Stoodley *et al.*, 2002; De Lancey Pulcini, 2001).



**Figura I.4. Biopelícula madura donde coexisten diferentes especies microbianas en diferentes nichos ambientales (Dirckx, Center for Biofilm Engineering, Montana State University-Bozeman).**

El proceso de formación de la biopelícula es bastante lento, a menudo se requiere de varios días para alcanzar la madurez estructural (Stoodley *et al.*, 2002). Una biopelícula madura es una construcción dinámica, con una organización avanzada que se adapta continuamente con el entorno, lo que significa que en condiciones adversas las bacterias pueden dejar su existencia protegida dentro de la comunidad del biofilm en la búsqueda de un nuevo hábitat, más favorable para establecerse. Esta etapa se conoce como desprendimiento o dispersión.

Debido a la naturaleza heterogénea de las células en la biopelícula madura, sólo una subpoblación de células se someterá a lisis. Para algunos sistemas de biopelículas bien estudiados, los reguladores genéticos, los efectores y sus modos de acción para matar a una subpoblación de células son conocidos (McDougald *et al.*, 2011; Rice *et al.*, 2009; Webb *et al.*, 2003). Estas células muertas proporcionan nutrientes a las bacterias que se convertirán en las células de dispersión. En contraste con la dispersión pasiva, resultante de desprendimiento de las células y la erosión de la biopelícula, la producción de células específicas de dispersión en la fase final del ciclo de vida biopelícula es una respuesta activa y altamente regulada que conduce a la producción de células diferenciadas y altamente móviles, conocidas como células de dispersión. Estas células especializadas pueden

colonizar nuevas superficies para iniciar las fases asociadas a la formación de una nueva biopelícula (McDougald *et al.*, 2011).

Las dispersion de células mediante la evacuación coordinada por parte de puntos



de ruptura (Purevdorj-Gage *et al.*, 2005) lleva al vaciamiento característico de microcolonias de la biopelícula que se observa durante la etapa de dispersión (Figura I.5) (McDougald *et al.*, 2011).

**Figura I.5. Desprendimiento de células en la biopelícula (Dirckx, Center for Biofilm Engineering, Montana State University-Bozeman).**

En la dispersión de células, genes que codifican las características de la biopelícula, tales como exopolisacáridos y fimbrias, están poco regulados, mientras que los genes que codifican factores que son importantes para un estilo de vida móvil o planctónico, incluyendo flagelos y proteínas implicadas en la quimiotaxis, están altamente regulados (McDougald *et al.*, 2011; Rollet *et al.*, 2009; Barraud *et al.*, 2006).

### **I.1.2.3. Formación y desarrollo de las biopelículas por hongos filamentosos**

Harding *et al.* (2009) han propuesto un modelo similar al de formación de biopelículas por bacterias para la formación y desarrollo de biopelículas por hongos filamentosos (figura I.6), diferenciándose las siguientes fases:

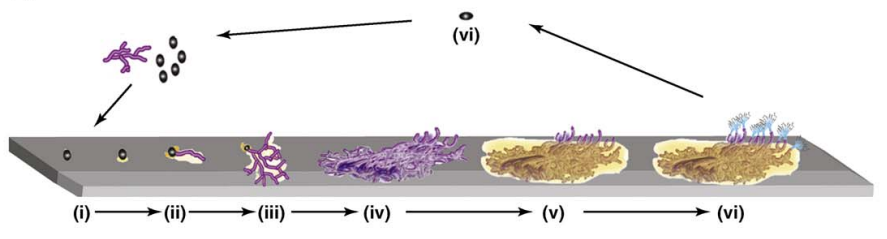
- (i) Fase de propágulos. Esta fase es comparable a la etapa de adhesión reversible en modelos bacterianos. Para los hongos filamentosos, esto incluye la deposición de esporas u otros propágulos tales como fragmentos de hifas o esporangios. Este paso implica esencialmente el contacto físico del organismo con una superficie.
- (ii) Adhesión activa a una superficie. En hongos filamentosos esto a menudo incluye la secreción de sustancias adhesivas por esporas en germinación y esporofitos activos.

(iii) Formación de microcolonias I. Esta fase es comparable a las primeras etapas de la formación de microcolonias en bacterias. Las etapas iniciales de crecimiento y colonización de la superficie en los hongos implican la elongación apical y ramificación de las hifas. Las hifas exploran el sustrato, se ramifican a través de superficies como una monocapa, y/o se convierten en invasivas. Esta etapa implica la producción de una matriz polimérica extracelular que le permite a la colonia creciente adherirse tenazmente al sustrato.

(iv) Formación de microcolonias II o maduración inicial. Esta fase es comparable a las últimas etapas de la formación de microcolonias en bacterias. Se trata de la formación de redes compactadas de hifas o micelios de adhesión e hifa-hifa. Esto incluye capas, la formación de haces de hifas 'pegados' juntos por la matriz exopolimérica, y la formación de canales de agua a través de repulsión hidrofóbica entre las hifas o haces de hifas.

(v) Maduración o desarrollo reproductivo. Esta fase es comparable a la maduración de la biopelícula bacteriana. Se caracteriza por la formación de cuerpos fructíferos, células esporógenas, esclerocios y otras estructuras de supervivencia. El crecimiento aéreo es a menudo una característica clave de la fructificación de los hongos y la dispersión.

(vi) Dispersión o fase planctónica. Esta fase es comparable a la dispersión o el desprendimiento que tiene lugar en las biopelículas bacterianas, y consiste en la dispersión de esporas o la liberación, o la dispersión de los fragmentos de biofilm. Las células desprendidas pueden actuar como propágulos nuevos para volver a iniciar el ciclo.



Harding *et al.*, 2009 *Trends Microbiol.* 17: 475-480.

**Figura I.6. Etapas en la formación y desarrollo de las biopelículas por hongos filamentosos: (i) Fase de propágulos; (ii) Adhesión activa; (iii) Formación de microcolonias I; (iv) Formación de microcolonias II; (v) Maduración; (vi) Dispersión.**

### I.1.3. Biofiltros sumergidos

Los biofiltros sumergidos aireados (BAF ó SFBBR) fueron diseñados con la finalidad de reducir el volumen de los reactores biológicos. Son sistemas que combinan el proceso biológico de depuración llevado a cabo por los microorganismos adheridos a un material de soporte y el de retención de sólidos en suspensión, unificando dos etapas en un mismo reactor.

El material de soporte se encuentra con carácter general totalmente sumergido, mejorando significativamente la eficacia de la filtración biológica (OECD, 1994).



**Figura I.7. Instalación y funcionamiento de una planta de filtros sumergidos aireados (SFBBR).**

Para Tejero (2002) en estos reactores biológicos se distinguen tres fases: una fase sólida, constituida por un material granular que asegura la retención de la materia en suspensión por filtración y actúa como soporte para el desarrollo de la biopelícula encargada del proceso biológico de depuración del agua residual; una fase líquida, en la que está inmerso el material y que se renueva constantemente con la llegada de agua residual nueva; y una fase gaseosa, generada por la introducción de burbujas de aire en el biorreactor por la parte inferior del mismo.

En este sistema el agua residual tras pasar por una decantación primaria, se introduce en el reactor, bien por la parte superior o inferior del lecho (flujo ascendente o descendente), mientras la aireación se realiza por la parte inferior del mismo (Zamorano y Hontoria, 2001).

Rogalla y Sibony (1992) y Çeçen y Gönenç (1994) clasificaron estos sistemas en función del sentido de los flujos de agua y aire en el biorreactor, pudiéndose distinguir procesos en contracorriente o flujo descendente (figura I.8), donde el influente entra por la parte superior y el aire por la parte inferior del reactor, y procesos de co-corriente o flujo ascendente (figura I.9), en los cuales tanto el influente como el aire entran por la parte inferior del reactor.

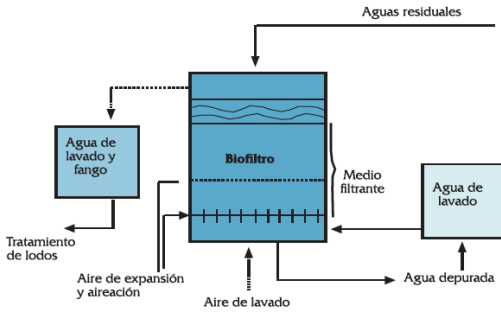


Figura I.8. Filtro a contracorriente.

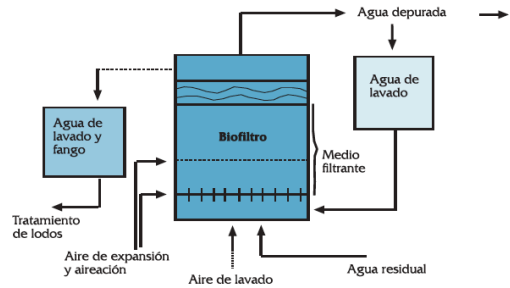


Figura I.9. Filtro a co-corriente.

Los biorreactores que operan a contracorriente presentan una serie de ventajas con respecto a los biorreactores que funcionan a co-corriente. El flujo descendente determina una mayor transferencia de materia y oxígeno, ya que el tiempo de residencia de las burbujas de aire a través del relleno es superior, siendo menos probable la obstrucción de las boquillas de recogida del agua tratada al estar situadas en el lado opuesto a las del influente o agua residual. Además el lavado del sistema es más sencillo, hay un mayor efecto de filtro mecánico y es más fácil obtener una adecuada distribución del aire en el interior del biorreactor (Grady *et al.*, 1999; Tejero, 1998).

El relleno empleado para los SFBBRs puede ser de origen natural (arena, grava, piedra, ect.) o sintético (PVC, vidrio, polietileno, ect.), no obstante, se utiliza casi exclusivamente como apoyo o soporte para la biopelícula en SFBBRs materiales de tipo



granular normalmente de plástico. Se componen de polietileno moldeado (PE), polipropileno (PP) o cloruro de polivinilo (PVC) principalmente. A menudo el material de relleno es fabricado en forma de bloques que consisten en tubos cilíndricos perforados horizontales (PE) o tubos formados por láminas delgadas onduladas (PVC y PP) (Schlegel y Koeser, 2007).

Las características del soporte determinan la eficiencia del proceso, siendo los principales requisitos (Tejero, 2002): alto grado de adherencia; escasa resistencia al flujo del agua, superficie específica; alta porosidad; estabilidad química y biológica; capacidad para atrapar sólidos en suspensión; durabilidad y resistencia mecánica a la destrucción y abrasión; tamaño granular uniforme o espaciado uniforme de placas permitiendo uniformidad del flujo a través del lecho; densidad similar a la del agua para que no provoque una pesada carga sobre las estructuras sumergidas o sobre el fondo del tanque, facilitando de esta manera las operaciones de lavado; inerte; de bajo coste y fácil de transportar, fabricar y construir.

Un mayor espacio vacío permite una transferencia más alta de oxígeno en la masa de la biopelícula y reduce los riesgos de obstrucción de los canales que deben seguir las burbujas de aire mientras pasan por el filtro para llegar a la superficie por una excesiva formación de biopelícula. Una mayor densidad de superficie permite una mayor biomasa por unidad de volumen, por lo que se necesitan menores volúmenes de reactor que en otros tratamientos (Schlegel y Koeser, 2007). Este factor hace que la biomasa crezca mucho más rápido de lo que puede desprenderse, colmatando el relleno del reactor y aumentando la pérdida de carga.

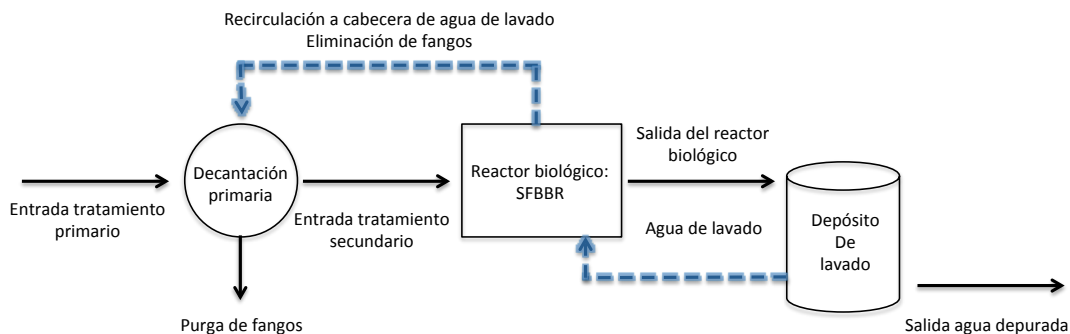
Como hemos visto anteriormente, durante el funcionamiento del filtro se va produciendo su colmatación tanto por los sólidos en suspensión retenidos, como por el crecimiento de las poblaciones microbianas formadoras de la biopelícula. Esto provoca la aparición de zonas anaeróbicas dentro del biofilm, facilitándose su desprendimiento que así mismo incrementarían la pérdida de carga del sistema y la disminución de calidad del efluente (Gálvez, 2001).

Para evitar esto y conseguir un óptimo funcionamiento del SFBBR es necesario realizar un lavado periódico con agua depurada y aire a contracorriente. Esta fase de lavado puede tener 3 etapas (Gálvez, 2001):

- Esponjamiento del relleno, usándose en esta fase sólo aire.
- Lavado con agua y aire.
- Lavado sólo con agua depurada.

El lavado es un procedimiento importante pero mal caracterizado cuando operan reactores de biopelícula fija. Cambios en el proceso de lavado generan diferencias en la respuestas de rendimiento a las distintas condiciones de operación del reactor. Li *et al.* (2012) comprobaron que dos parámetros del lavado a contracorriente, la frecuencia e intensidad, afectan a la estructura y función de las comunidades microbianas en los reactores de biopelícula fija. El aumento de la frecuencia de retrolavado causó menos trastornos de la comunidad microbiana en comparación con un incremento de la intensidad de lavado.

Los fangos eliminados en el lavado pasan a una balsa y el agua de lavado vuelve al tratamiento primario de la estación depuradora para continuar con el proceso de depuración (figura I.10).



**Figura I.10. Diagrama de flujos simplificados del proceso de depuración de una planta de filtros sumergidos.**

Los reactores aireados de biopelícula fija sumergida se utilizan comercialmente como (Schlegel y Koeser, 2007):

- Pretratamiento, sobre todo para las aguas residuales industriales.
- Tratamiento biológico de aguas residuales con o sin nitrificación.
- Etapa de nitrificación por separado dentro de un proceso de varias etapas de tratamiento.

De acuerdo con la DWA (asociación alemana para aguas, aguas residuales y residuos, 1997), los SFBBRs operando en un rango de temperatura de  $15 \pm 5^{\circ}\text{C}$  proporcionan a las aguas residuales urbanas tasas de eliminación de  $\text{DBO}_5$  (demanda biológica de oxígeno)  $\geq 95\%$ , de DQO (demanda química de oxígeno)  $\geq 80\%$  y de TKN (nitrógeno kjeldahl total)  $\geq 90\%$ .

Según Zamorano y Hontoria (2001) los rendimientos de estos sistemas de depuración pueden alcanzar el 95% en eliminación de  $\text{DBO}_5$  y el 95% en eliminación de sólidos en suspensión.

### **I.1.3.1. Ventajas e inconvenientes de la utilización de biofiltros sumergidos**

La utilización de SFBBRs presenta una serie de ventajas con respecto a otros sistemas de tratamiento biológico, siendo referenciada en la literatura las siguientes ventajas para estos tratamientos (García-Mesa, 2010; Gómez-Villalba, 2003; Tejero, 2002; Osorio F, 1998; Séguret y Racault, 1998; Hamoda y Al-Ghusain, 1998; Pujol *et al.*, 1994):

- La concentración de biomasa desarrollada en los sistemas de filtros sumergidos es superior a la de los procesos de fangos activos.
- No necesita decantación secundaria ya que con el efecto de biofiltrado además de producirse una reducción de la contaminación biológica se produce una clarificación del agua.
- Es un sistema aplicable tanto a la eliminación de contaminación orgánica como de materia nitrogenada amoniacal.

- Reducción de la necesidad de espacio, ya que al trabajar con cargas orgánicas e hidráulicas mayores se puede necesitar solamente un cuarto de la superficie requerida por otros tratamientos secundarios de depuración. Además al no necesitar decantación secundaria la superficie total de la planta de depuración puede reducirse hasta la mitad en relación con otras plantas que empleen otros sistemas.
- Es un sistema de depuración bastante flexible y por ello apropiado para municipios con población variable.
- Es un sistema aplicable a aguas residuales industriales, siendo el sistema que acepta un mayor número de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano, así como el que tiene una menor relación  $DBO_5/DQO$ , soportando relativamente bien las sustancias tóxicas.
- Tiene una rápida puesta en marcha ya que se produce un crecimiento masivo de microorganismos, incluso si ha estado parado durante varios meses.
- Se adapta con facilidad a aguas residuales diluidas y concentradas.
- Facilidad de montaje, automatización y, tras la puesta en marcha, de explotación, ya tiene una operación muy estable en el tiempo y no exige conocimientos sobre biología del proceso como índice de decantación o edad del fango.
- No se produce el fenómeno “bulking” desapareciendo los problemas de flotabilidad de fangos.
- Tiene un bajo requerimiento energético para la aireación del reactor.
- No presenta problemas de decantabilidad, espumas o aparición de bacterias filamentosas propios de los sistemas de fangos activos.
- Tiene mayor superficie específica media de relleno que otros tratamientos de biopelícula como los filtros percoladores o biodiscos, lo cual hace que tengan mayor carga microbiana y requieran menores tiempos de retención hidráulica.

En cuanto a sus desventajas se podían enumerar las siguientes:

- Necesidad de lavado de los biofiltros para evitar su atoramiento, precisando de un bombeo importante.

- Los costes de instalación pueden resultar en algún caso superiores a otras tecnologías convencionales.

### **I.1.4. Eliminación de nitrógeno en las aguas residuales**

El nitrógeno y el fósforo son los principales nutrientes en las aguas residuales. Los vertidos que contienen nitrógeno y fósforo pueden acelerar la eutrofización de lagos, ríos y embalses, y estimular el crecimiento de algas y plantas acuáticas arraigadas a cursos de agua poco profundos.

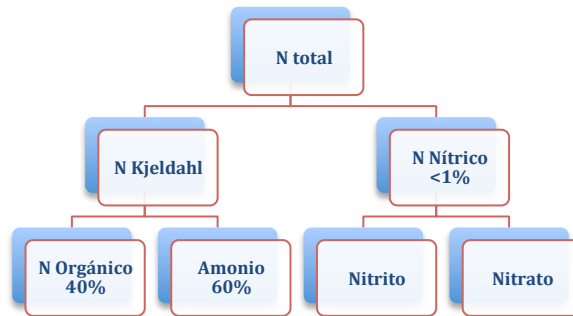
El tratamiento biológico convencional de aguas residuales urbanas está dirigido habitualmente a la biodegradación de la materia orgánica. Sin embargo, por los problemas de eutrofización en los ambientes acuáticos naturales y debido también a que el amoníaco es tóxico para las especies acuáticas, la eliminación del nitrógeno de las aguas residuales se ha convertido en una preocupación emergente en todo el mundo (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

Además, la eliminación de nitrógeno amoniacal durante el tratamiento de aguas residuales es necesario para evitar el agotamiento de oxígeno de las aguas receptoras así como la ineficacia de la desinfección con cloro para la reutilización del agua (Ahn, 2006; Metcalf y Eddy, 2003). El  $\text{N-NH}_4^+$  de un agua residual por reacción con el cloro conduce a la formación de cloraminas y tricloruro de nitrógeno, los cuales tienen un poder desinfectante inferior al del cloro y pueden ser responsables de olores desagradables en las aguas residuales.

#### **I.1.4.1. Formas de nitrógeno en el agua residual**

El nitrógeno en las aguas residuales se puede encontrar en diferentes formas, como N orgánico,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ , y en concentraciones variables. En aguas residuales urbanas normalmente el nitrógeno suele presentarse mayoritariamente en sus formas reducidas, es decir, como nitrógeno amoniacal en una proporción de un 60% y como nitrógeno orgánico en un 40%, mientras que la presencia de las formas nitrosas y nítricas es inferior a un 1% (EPA, 1993) (figura I.11). La fracción orgánica de nitrógeno consiste en una mezcla compleja de compuestos que incluyen aminoácidos, aminoazúcares y proteínas (polímeros

de aminoácidos), que se convierte fácilmente en amoníaco a través de la degradación de la estructura carbonada por microorganismos en el medio ambiente acuático (Metcalf y Eddy, 2003).



**Figura I.11. Formas del nitrógeno en las aguas residuales.**

### I.1.4.2. Procesos de eliminación biológica de nitrógeno

En las EDARs urbanas, entre un 5-10% del nitrógeno total contenido en el agua residual influente es eliminado en la decantación primaria en forma de nitrógeno orgánico particulado. Por otro lado, en un sistema de fangos activos convencional, se elimina entre un 10-30% del nitrógeno total para satisfacer las necesidades nutricionales de la biomasa, que se estiman entre un 12-13% en peso de la biomasa formada (Sedlak, 1991). En la mayoría de los casos esta eliminación no es suficiente para conseguir cumplir requisitos de vertido por lo que se requiere de la aplicación de tratamientos adicionales.

El proceso más aceptado y utilizado corresponde con el proceso biológico en dos etapas de nitrificación-desnitrificación, que se basa en transformar el nitrógeno contenido en las aguas residuales en nitrógeno gas. La eliminación biológica de nitrógeno ha sido ampliamente aplicada debido a su eficacia y bajo costo (Ahn, 2006).

#### I.1.4.2.1. Nitrificación

La nitrificación consiste en la transformación del nitrógeno amoniacal en nitrato por acción de un conjunto de bacterias autótrofas nitrificantes.

La nitrificación del nitrógeno amoniacal se realiza en dos etapas llevadas a cabo por dos grupos diferentes de microorganismos. El  $\text{NH}_4^+$  se oxida a  $\text{NO}_2^-$  (fase I) por organismos oxidadores de amonio y este posteriormente se oxida a  $\text{NO}_3^-$  (fase II) mediante organismos nitritoxidantes.

La oxidación del amoníaco a menudo es el paso limitante de la nitrificación en una amplia variedad de entornos, y por lo tanto fundamental para la eliminación de nitrógeno de aguas residuales (Almstrand *et al.*, 2012; Bernhard *et al.*, 2010; Choi y Hu, 2008; Hu *et al.*, 2003).

Originalmente, las bacterias responsables del proceso de nitrificación fueron agrupadas en una familia, llamada Nitrobacteraceae, donde las bacterias amonioxidantes (AOB) se caracterizan por el prefijo *Nitroso-* y las bacterias nitritoxidantes (NOB) se denominan con el prefijo *Nitro-* (Watson *et al.*, 1989). Sin embargo, posteriores estudios filogenéticos han concluido que las AOB y NOB no están estrechamente relacionadas (Teske *et al.*, 1994; Woese *et al.*, 1985).

Las bacterias de los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* y *Nitrospira* participan en la primera etapa de la nitrificación, es decir, son bacterias amonioxidantes. La segunda fase la llevan a cabo las bacterias de los géneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* y *Nitrospina* (Meincke *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1986; Watson, 1971). Sólo algunos microorganismos heterótrofos, como algunas bacterias (*Arthrobacter*) y algunos hongos (*Aspergillus*), contribuyen en algún grado a la nitrificación, si bien esta nitrificación heterotrófica no parece que tenga un papel destacado en la conversión de amonio a nitrito y a nitrato (Atlas y Bartha, 2001).

Descubrimientos recientes, como bacterias anammox (Strous *et al.*, 1999) y arqueas oxidadoras de amonio (AOA) (Könneke *et al.*, 2005), muestran el hecho de que nuestra actual comprensión de la profundidad y la amplitud de los microorganismos oxidadores de amonio esta incompleta (Bernhard *et al.*, 2010).

Cada vez hay más evidencias que muestran que hay dos grandes grupos microbianos que participan en la oxidación del amonio: bacterias oxidadoras de amonio (AOB) y arqueas oxidadoras de amonio (AOA). Mientras que las AOB se consideran esenciales en la nitrificación, recientemente estudios biológicos moleculares demostraron que los miembros del reino Crenarchaeota, dentro del dominio Archaea, juegan un papel

importante en la nitrificación en los suelos y los sistemas acuáticos (You *et al.*, 2009; Hansel *et al.*, 2008; Tourna *et al.*, 2008; Könneke *et al.*, 2005). Könneke *et al.* (2005) aislaron una nueva cepa marina de AOA, *Nitrosopumilus maritimus*, que contiene genes putativos de las tres subunidades de amonio-monooxigenasa (*amoA*, *amoB* y *amoC*), la enzima responsable de la oxidación del amoníaco. *Cenarchaeum symbiosum* también se destaca por albergar los genes de la oxidación del amonio, a pesar de que en cultivo puro no están disponibles (You *et al.*, 2009; Hallam *et al.*, 2006a,b). La tabla I.1 indica los distintos géneros de bacterias nitrificantes fase I y II que se han descrito hasta la fecha.

Las bacterias autótrofas nitrificantes están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se encuentran en la mayoría de los ambientes aerobios donde hay presentes considerables cantidades de amonio. Ambos grupos de bacterias se desarrollan en lagos y corrientes de agua, que tienen aportes de amonio, y en la termoclina de los lagos, donde tanto el amonio como el oxígeno están presentes. Sin embargo, de acuerdo con sus características ecofisiológicas, se ha observado que varias especies aparecen sólo o mayoritariamente en sitios concretos, por ejemplo, en ríos, lagos de agua dulce, lagos salados, océanos, aguas salobres, plantas de tratamiento de aguas residuales, rocas o piedras naturales de edificios históricos, y suelos ácidos (Koops y Pommerening-Roser, 2001; Mansch y Bock, 1998; Boer *et al.*, 1991).

Algunas especies tienen un requisito de sal necesario para su desarrollo, otras prefieren ambientes eutróficos u oligotróficos y pueden tolerar temperaturas altas o bajas (Koops *et al.*, 1991; Golovacheva, 1976). Además, las bacterias nitrificantes se encuentran en ambientes ya sea con una concentración de oxígeno baja o condiciones anóxicas, como en los lagos de la Antártida y a una profundidad de 60 m en los suelos de permafrost (Wagner *et al.*, 2001; Voytek *et al.*, 1999).

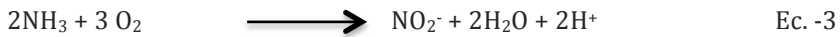
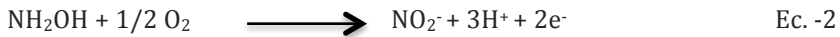
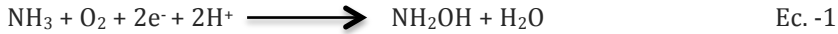
Desde su descubrimiento hace varios años, las arqueas oxidadoras de amonio se han encontrado en una gran variedad de entornos, incluyendo distintos suelos y sedimentos (Bernhard *et al.*, 2010; Leininger *et al.*, 2006; Francis *et al.*, 2005; Treusch *et al.*, 2005), capas marinas oxigenadas y subóxicas (Beman *et al.*, 2008; Coolen *et al.*, 2007; Mincer *et al.*, 2007; Wuchter *et al.*, 2006), estuarios (Moin *et al.*, 2009; Santoro *et al.*, 2008; Caffrey *et al.*, 2007), entornos subterráneos (Weidler *et al.*, 2007), aguas residuales, lodos (Park *et al.*, 2006), corales (Beman *et al.*, 2007) y esponjas (Hallam *et al.*, 2006b).



Tabla I.1. Clasificación de bacterias amonioxidantes y bacterias nitrtoxidantes (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2005). Bases de datos on-line del National Centre for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Taxonomy Browser.

		Clase	Orden	Familia	Género	Especie	
Dominio Archaea	Phylum Thaumarchaeota		Nitrosopumilales	Nitrosopumilaceae	<i>Nitrosopumilus</i>	<i>N. maritimus</i> <i>Candidatus N. salaria</i>	Nitrificantes fase I: Amonioxidantes
			Cenarchaeales	Cenarchaeaceae	<i>Cenarchaeum</i>	<i>C. symbiosum</i>	
Dominio Bacteria	Phylum Proteobacteria	β-proteobacteria	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	<i>Nitrosomonas</i>	<i>N. aestuarii</i> <i>N. communis</i> <i>N. europaea</i> <i>N. eutropha</i> <i>N. halophila</i> <i>N. marina</i> <i>N. nitrosa</i> <i>N. oligotropha</i> <i>N. ureae</i> <i>N. mobilis</i> <i>N. cryotolerans</i>	Nitrificantes fase II: Nitrtoxidantes
					<i>Nitrospira</i>	<i>N. briensis</i> <i>N. multiformis</i> <i>N. tenuis</i>	
	γ-proteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	<i>Nitrosococcus</i>	<i>N. oceani</i> <i>N. halophilus</i>		
			Ectothiorhodospiraceae	<i>Nitrococcus</i>			
	α-proteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Nitrobacter</i>	<i>N. alkalicus</i> <i>N. hamburgensis</i> <i>N. vulgaris</i> <i>N. winogradskyi</i> <i>N. mobilis</i>		
	β-proteobacteria			<i>Candidatus Nitrotoga</i>	<i>Candidatus N. arctica</i>		
	δ-proteobacteria	Desulfobacterales	Noctuoidea	<i>Nitrospina</i>	<i>N. gracilis</i>		
Phylum Nitrospirae		Nitrospirales	Nitrospiraceae	<i>Nitrospira</i>	<i>N. marina</i> <i>N. moscoviensis</i> <i>Candidatus N. bockiana</i>		

En la nitrificación fase I se realizan una sucesión de transformaciones catalizadas por enzimas (Wood, 1986). Las reacciones de oxidación del amoníaco son las siguientes (You *et al.*, 2009):



La oxidación de amonio a hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) (Ec. -1) es catalizada por la enzima amonio-monooxigenasa (AMO), la cual incorpora uno de los átomos de oxígeno a la molécula de  $\text{NH}_3$  y el segundo paso, la oxidación de hidroxilamina a nitrito (Ec. -2), se cataliza por la hidroxilamina oxidoreductasa (HAO). En primer lugar, la hidroxilamina se oxida con una molécula de agua a nitrosilo ( $\text{HNO}$ ) que permanece unido al sitio activo, el cual se oxida finalmente a nitrito (Castillo-Rodríguez y Roldán-Ruiz, 2005), generándose protones que acidifican el medio. Estos son convertidos en agua por una oxidasa terminal que utiliza oxígeno atmosférico (Atlas y Bartha, 2001) (Figura I.12). La ecuación 3 (Ec. -3) describe la reacción global de oxidación de amonio, nitrificación fase I.

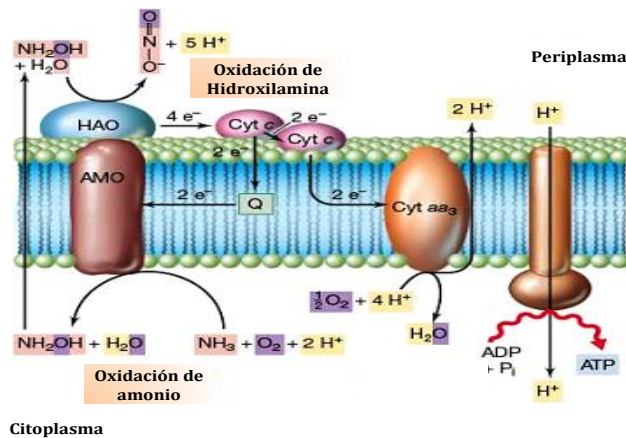


Figura I.12. Proceso de oxidación de amonio, nitrificación fase I (Brock y Madigan, 1991).

En la nitrificación fase II, la reacción de oxidación de nitrito se ajusta a la siguiente ecuación (Metcalf y Eddy, 2003):



La oxidación de nitrito a nitrato es un proceso de una sola etapa catalizado por la enzima nitrito oxidoreductasa (NOR o NXR).

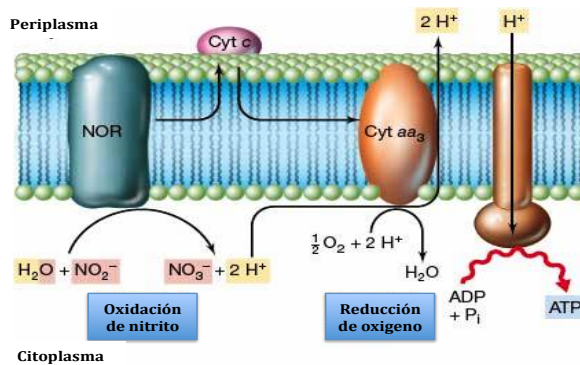


Figura I.13. Proceso de oxidación de nitrito, nitrificación fase II (Brock y Madigan, 1991).

En la etapa de nitrificación se consigue oxidar el nitrógeno amoniacal a nitrato, pero para transformar ese nitrato a nitrógeno gas, y por tanto poder reducir el contenido de nitrógeno del agua residual, se requiere de una segunda etapa, denominada desnitrificación.

#### I.1.4.2.2. Desnitrificación

Muchos microorganismos tienen la capacidad de reducir los óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ) en condiciones anóxicas, cuando dichos compuestos sustituyen al oxígeno como aceptor terminal de electrones en la cadena respiratoria. Si la reducción continúa hasta la generación de gases  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$ , el proceso es conocido como desnitrificación.

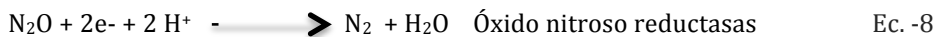
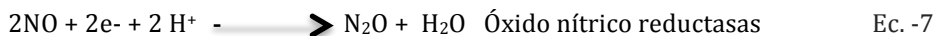
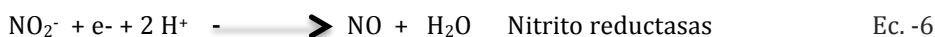
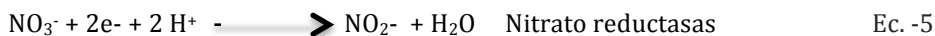
La desnitrificación biológica consiste por tanto en la reducción desasimilatoria de nitrato y nitrito a los gases nitrógeno, óxido nítrico y óxido nitroso (Payne, 1981). Es

realizada por numerosas bacterias, principalmente heterótrofas, con amplia distribución taxonómica.

El ión nitrato o nitrito son empleados como últimos aceptores de electrones en una cadena respiratoria en ausencia de oxígeno, el cual puede inhibir el proceso, aunque se han descrito casos de desnitrificación en aerobiosis (Patureau *et al.*, 1994).

La desnitrificación es un proceso complejo en el que intervienen numerosas enzimas con sus correspondientes sustratos y productos finales. El proceso es una cadena respiratoria en la que los sustratos son aceptores de electrones procedentes, mediante otras rutas metabólicas, de fuentes de carbono en microorganismos heterótrofos, o bien de oxidaciones de productos inorgánicos en autótrofos.

Cada uno de los compuestos anteriores se puede comportar como sustratos en la desnitrificación, dando N<sub>2</sub> como producto final.



Hay que destacar que no todos los pasos se dan en todos los microorganismos desnitrificantes, los cuales pueden emplear distintos sustratos y dar diferentes productos (Gómez *et al.*, 2000a).

La desnitrificación es un proceso casi exclusivo de procariotas, y dentro de éstos son pocos los microorganismos capaces de respirar usando óxidos de nitrógeno como último aceptor de electrones, aunque están ampliamente distribuidos a nivel taxonómico.

Existen más de 70 géneros con especies capaces de desnitrificar. De entre ellos es el género *Pseudomonas* (bacilos aerobios Gram negativos heterótrofos) el que cuenta con un mayor número de especies, aisladas mayoritariamente de aguas y suelos. En las zonas anaerobias del mar también es frecuente la desnitrificación activa, llevada a cabo principalmente por *Pseudomonas* (Heitzer y Ottow, 1976). Una característica de los

desnitrificantes es su gran variedad morfológica: no sólo hay descritos bacilos aerobios Gram negativos, sino también cocos Gram negativos (Jeter e Ingraham, 1981).

A la variedad morfológica se le une una gran variedad fisiológica, existiendo desnitrificantes entre los anaerobios facultativos (Zumft, 1992), bacterias del azufre, termófilos o bacterias fototróficas.

Dentro de las bacterias Gram positivas también encontramos numerosas especies, pero en menor cantidad y con menor variedad fisiológica que las anteriores (Gómez *et al.*, 2000b).

En los últimos años se ha encontrado que muchos hongos (eucariotas) presentan distintas actividades desnitrificantes, a pesar que se consideraba que el proceso de desnitrificación se limitaba a las bacterias (procariotas), y se ha caracterizado el sistema de desnitrificación de hongos (Shoun *et al.*, 2012; Laughlin y Stevens, 2002).

### **I.1.4.2.3. Eliminación de amonio en condiciones anaerobias (ANAMMOX)**

El proceso de oxidación de amonio en condiciones anaerobias (ANAMMOX, anaerobic ammonia oxidation), desarrollado por la Universidad de Delft (Holanda) en los años 90, es un proceso de bajo coste para eliminación de N de las aguas residuales (Fux *et al.*, 2002; Strous *et al.*, 1999; Van de Graaf *et al.*, 1995). En el proceso ANAMMOX, el amonio es oxidado a nitrógeno gas por bacterias amonioxidantes anaerobias con el nitrito como aceptor de electrones. Al ser bacterias autótrofas no se necesita adicionar carbono porque el CO<sub>2</sub> funciona como la principal fuente de carbono (Van de Graaf *et al.*, 1996).

Debido a las bajas tasas de crecimiento de las bacterias involucradas en este proceso, los sistemas para su desarrollo requieren de altos TRC (tiempo de retención celular) para mantener adecuadas concentraciones de biomasa, especialmente durante la puesta en marcha (Zhu *et al.*, 2008).

Pocos años después del descubrimiento del proceso ANAMMOX, Van de Graaf *et al.* (1997) propusieron una posible ruta metabólica para el proceso (Figura I.14). La hidracina (N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) y la hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH) se sabe que son algunos productos intermedios del proceso ANAMMOX (Jetten *et al.*, 1999; Schalk *et al.*, 1998; Van de Graaf *et al.*, 1997). Recientemente, ha sido propuesta una nueva ruta metabólica por Strous *et al.* (2006) que

se muestra también en la Figura I.14. Strous *et al.* (2006) propusieron una ruta involucrando al óxido nítrico (NO) como intermediario en lugar de la hidroxilamina, como se había asumido previamente.

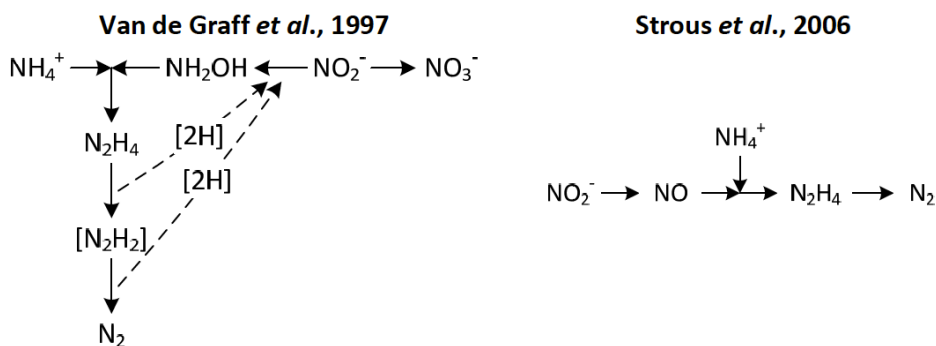


Figura I.14. Esquema de las posibles rutas metabólicas para el proceso ANAMMOX.

### I.1.4.3. Procesos de nitrificación-desnitrificación mediante biorreactores de filtros sumergidos

Una vez conocido el proceso biológico de nitrificación-desnitrificación (apartado I.5.2.1. y I.5.2.2), se han desarrollado multitud de diseños para eliminar este nutriente. Se pueden clasificar en función de la adición o no de una fuente de carbono externa para permitir la actividad desnitrificante. En tal caso, hablamos de pre-desnitrificación cuando la fuente de carbono la aporta el propio influente, y post-desnitrificación cuando se requiere la adición de una fuente de carbono externa.

#### I.1.4.3.1. Post-desnitrificación

El proceso de post-desnitrificación consiste en dos reactores en serie, uno aireado y el otro no. El agua entra en el primer reactor aireado (nitrificación) para pasar al segundo reactor anóxico (desnitrificación) (Figura I.15). Se precisa una previa oxidación de la materia orgánica para que no interfiera en el proceso de la nitrificación (microorganismos

autótrofos) y posteriormente se debe adicionar una fuente de carbono fácilmente asimilable, que facilite la actividad desnitrificante (microorganismos heterótrofos).

Se consiguen altos rendimientos de eliminación de nitrógeno, siendo el metanol y el etanol las fuentes de carbono más utilizadas por su alto índice de desnitrificación, ser fácilmente biodegradables y tener bajo coste (Chudoba *et al.*, 1998); otros autores hablan del ácido acético (Constantin y Fick, 1997), sacarosa y metanol (Gómez *et al.*, 2000a) y otras muchas fuentes.

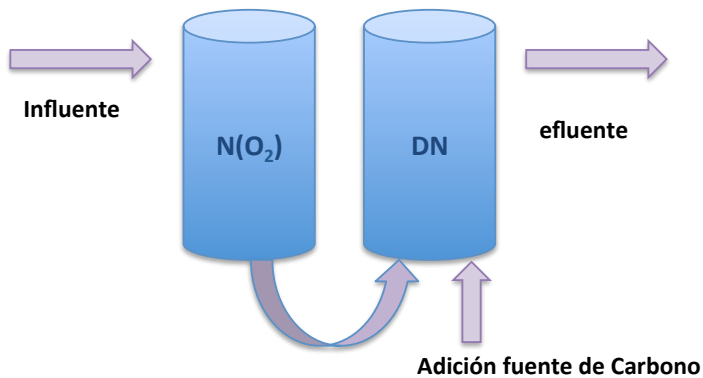


Figura I.15. Esquema general de los sistemas en post-desnitrificación.

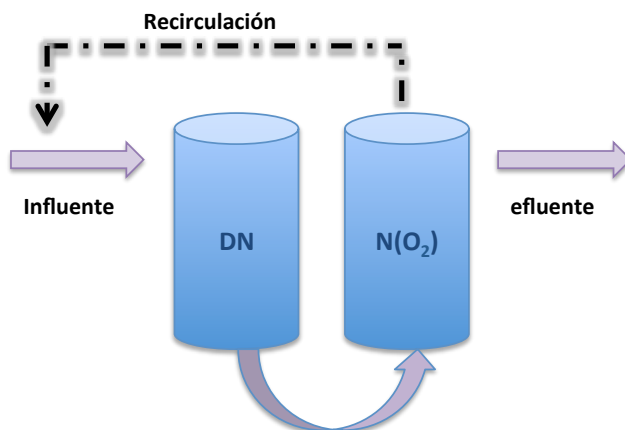
Los sistemas de post-desnitrificación están indicados para influentes pobres en donadores de electrones. Para influentes ricos en fuente de carbono sería un sistema poco rentable, debido a que la fuente de carbono se consumiría en la columna óxica necesiéndose después adicionarle una fuente externa a la columna anóxica, donde se encuentran los microorganismos desnitrificantes (heterótrofos).

#### I.1.4.3.2. Pre-desnitrificación

En el proceso de pre-desnitrificación inicialmente se elimina la materia orgánica en una columna anóxica y posteriormente se nitrifica en una columna aireada. El influente obtenido en la segunda columna (el cual contendrá nitrato) se recirculará a la columna

anóxica, donde en presencia de fuente de carbono del influente, la microbiota desnitrificante transformará el nitrato en nitrógeno molecular (Pujol *et al.*, 1994).

Este sistema, por lo general, no precisa de la adición externa de fuente de carbono, sino que utiliza la del propio influente (Figura I.16).



**Figura I.16. Esquema general de los sistemas en pre-desnitrificación.**

### I.2. OBJETIVOS

Como ha quedado referenciado en la introducción, la utilización de biorreactores de filtros sumergidos para el tratamiento de aguas residuales urbanas va ocupando día a día un mayor interés en la eliminación de materia orgánica y nutrientes presentes en aguas residuales, en sustitución de los sistemas convencionales obteniéndose mediante este tipo de biorreactores una calidad de agua depurada que cumple con los requisitos exigibles por la legislación para su reutilización.

Aguas residuales urbanas y aguas residuales industriales con alto contenido en salinidad determinan la entrada en las estaciones depuradoras (EDARs) de influentes con valores de salinidad variable, hecho que dificulta el funcionamiento de las instalaciones y específicamente de los reactores biológicos. Los sistemas de biopelícula presentan mayor estabilidad a los cambios ambientales que los sistemas de fangos activos, motivo por el cual, resultan menos afectados por alteraciones en la osmolaridad.



La pregunta clave a responder es, como en este tipo de reactores biológicos los cambios en la salinidad pueden afectar a la estructura y biodiversidad de las biopelículas, así como a sus actividades enzimáticas responsables de la eficacia depurativa del proceso.

Bajo esta hipótesis de trabajo y como objetivo principal de esta investigación se pretende estudiar el proceso de depuración de aguas residuales domésticas en condiciones de salinidad variable mediante un sistema de filtro sumergido aerobio desde un punto de vista técnico y biológico, así como detectar los posibles efectos que la salinidad induce sobre la biodiversidad microbiana y su actividad biológica (actividades enzimáticas) en dicho biorreactor.

Para la obtención de dicho objetivo principal, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la influencia de la salinidad en las variables de funcionamiento de un sistema de filtros sumergidos para el tratamiento de aguas residuales urbanas con salinidad variable. Para ello en el **capítulo 2** se determinará la eliminación de materia orgánica y otros nutrientes, como el nitrógeno, bajo condiciones de salinidad variables en el biorreactor.
2. Determinación de las actividades enzimáticas llevadas a cabo por los microorganismos presentes en la biopelícula del SFBBR. En el **capítulo 3** se estudiará la evolución de las actividades enzimáticas y su variación por el efecto de las diferentes concentraciones de salinidad presentes en el agua residual empleada en este trabajo.
3. Estudios de perfiles de biodiversidad en el SFBBR utilizando la técnica de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) empleándose cebadores de PCR específicos para los grupos bacterianos más representativos responsables del proceso depurativo. Estos ensayos (**capítulo 4**) permitirán describir la diversidad de las comunidades microbianas frente a la presencia de la salinidad.

### I.3. BIBLIOGRAFÍA

**Almstrand, R., Lydmark, P., Lindgren, P.E., Sörensson, F., Hermansson, M.,** 2012. Dynamics of specific ammonia-oxidizing bacterial populations and nitrification in response to controlled shifts of ammonium concentrations in wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology* online.

**Adav, S.S., Lee, D.J., Tay, J.H.,** 2008. Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule. *Water Research* 42: 1644-1650.

**Ahn, Y.H.,** 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry* 41: 1709-1721.

**Allison, D.G., Sutherland, I.W.,** 1987. Role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *Journal of General Microbiology* 133: 1319-1327.

**Alves, C.F., Melo, L.F., Vieira, M.J.,** 2002. Influence of medium composition on the characteristics of a denitrifying biofilm formed by *Alcaligenes denitrificans* in a fluidised bed reactor. *Process Biochemistry* 37: 837-845.

**Andersson, S., Dalhammar, G., Kuttuva Rajarao, G.,** 2011. Influence of microbial interactions and EPS/polysaccharide composition on nutrient removal activity in biofilms formed by strains found in wastewater treatment systems. *Microbiological Research* 166: 449-457.

**Atlas, R.M., Bartha, R.,** 2001. Microbial ecology, fundamentals and applications. Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., an imprint of Addison Wesley Longman, Inc. Menlo Park, California.

**Bahat-Samet, E., Castro-Sowinski, S., Okon, Y.,** 2004. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters* 237: 195-203.

**Barraud, N., Hassett, D.J., Hwang, S-H., Rice, S.A., Kjelleberg, S., Webb, J.S.,** 2006. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 188: 7344-7353.

**Beman, J.M., Roberts, K.J., Wegley, L., Rohwer, F., Francis, C.A.,** 2007. Distribution and diversity of archaeal ammonia monooxygenase genes associated with corals. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5642-5647.

**Beman, J.M., Popp, B.N., Francis, C.A.,** 2008. Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. *International Society for Microbial Ecology Journal* 2: 429-441.

**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,** 2005. 3rd Edition, Vol. 1 Garrity, G. Boone, D.R. Castenholz, R.W. (Eds). Springer-Verlag, NY, USA.

**Bernhard, A.E., Landry, Z.C., Blevins, A., De la Torre, J.R., Giblin, A.E., Stahl, D.A., 2010.** Abundance of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria along an Estuarine Salinity Gradient in Relation to Potential Nitrification Rates. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 1285-1289.

**Böckelmann, U., Janke, A., Kuhn, R., Neu, T.R., Wecke, J., Lawrence, J.R., Szewzyk, U., 2006.** Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiology Letters* 262: 31-38.

**Böckelmann, U., Lünsdorf, H., Szewzyk, U., 2007.** Ultrastructural and electron energy-loss spectroscopic analysis of an extracellular filamentous matrix of an environmental bacterial isolate. *Environmental Microbiology* 9: 2137-2144.

**Boer, W., Klein, W., Gunnewiek, P.J.A., Veenhuis, M., Bock, E., Laanbroek, H.J., 1991.** Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3600-3604.

**Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R., 2005.** Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology* 13: 20-26.

**Brock, T., Madigan, M., 1991.** Microbiología. ed. Prentice Hall Hispanoamérica. México.

**Bryers, J.D., 2000.** Biofilms: an introduction, in Biofilms II: process analysis and applications, Bryers JD, Editor. Wiley-Liss: New York. p. 3-11.

**Burdman, S., Jurkevitch, E., Soria-Díaz, M.E., Serrano, A.M., Okon, Y., 2000.** Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiology Letters* 189: 259-264.

**Caffrey, J.M., Bano, N., Kalanetra, K., Hollibaugh, J.T., 2007.** Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. *International Society for Microbial Ecology Journal* 1: 660-662.

**Castillo-Rodríguez, F., Roldán-Ruiz, M.D., 2005.** Biotecnología ambiental. Editorial Tébar. Madrid

**Castonguay, M.H., van der Schaaf, S., Koester, W., Krooneman, J., van der Meer, W., Harmsen, H., Landini, P., 2006.** Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. *Research in Microbiology* 157: 471-478.

**Çeçen, F., Gönenç, I.E., 1994.** Nitrogen removal characteristics of nitrification and denitrification filters. *Water Science and Technology* 29: 409-416.

**Cescutti, P., Toffanin, R., Pollesello, P., Sutherland, I.W., 1999.** Structural determination of the acidic exopolysaccharide produced by a *Pseudomonas* sp. strain 1.15. *Carbohydrate Research* 315: 159-168.

**Characklis, W.G., Wilderer, P.A.,** 1989. Structure and function of biofilms, Dahlem Conference Life Science Research Report No. 46. Wiley, Berlin.

**Chen, C-Y., Chen, S-D.,** 2000. Biofilm characteristics in biological denitrification biofilm reactors. *Water Science and Technology* 41: 147-154.

**Choi, O.K., Hu, Z.Q.,** 2008. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental Science and Technology* 42: 4583-4588.

**Chudoba, P., Pannier, M., Truc, A., Pujol, R.,** 1998. A new fixed-film mobile bed bioreactor for denitrification of wastewater. Proceedings of 19th IAWQ Biennial Conference. Vancouver, Canada.

**Conrad, A., Suutari, M.K., Keinänen, M.M., Cadoret, A., Faure, P., Mansuy-Huault, L., Block, J.C.,** 2003. Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Journal of Lipids* 38: 1093-1105.

**Constantin, H., Fick, M.,** 1997. Influence of C-sources on the denitrification rate of high-nitrate concentrated industrial wastewater. *Water Research* 31: 583-589.

**Coolen, M.J.L., Abbas, B., Van Bleijswijk, J., Hopmans, E.C., Kuypers, M.M.M., Wakeham, S.G., Sinninghe Damste, J.S.,** 2007. Putative ammonia-oxidizing Crenarchaeota in suboxic waters of the Black Sea: a basinwide ecological study using 16S ribosomal and functional genes and membrane lipids. *Environmental Microbiology* 9: 1001-1016.

**Costerton, J.W.,** 1999. Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents* 11: 217-221.

**Danese, P., Pratt, L., Kolter, R.,** 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm Architecture. *Journal of Bacteriology* 182: 3593-3596.

**Davey, M.E., O'Toole, G.A.,** 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 847-867.

**Davies, D.G., Chakrabarty, A.M., Geesey, G.G.,** 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1181-1186.

**Davies, D., Parsek, M., Pearson, J., Iglewski, B., Costerton, J., Greenberg, E.,** 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm. *Science* 280: 295-298.

**De Lancey Pulcini, E.,** 2001. Bacterial Biofilms: a review of current research. *Néphrologie* 22: 439-441.

**Decho, A.,** 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 20: 1257-1273.

- Dignac, M.F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D., Scribe, P.**, 1998. Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure. *Water Science and Technology* 38: 45-53.
- Donlan, R.M.**, 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8: 881-890.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W.**, 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 167-193.
- Drenkard, E., Ausubel, F.M.**, 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416: 740-743.
- DWA/ATV**, 1997. Plants with Submerged Fixed Beds. *ATV Manual for Biological and Advanced Wastewater Treatment* (in German), 4th edn, Ernst und Sohn, Berlin, p. 197-213.
- Escher, A., Characklis, W.G.**, 1990. Modelling the initial events in biofilm accumulation. In: Characklis, W. G., and K. C. Marshall (ed.). *Biofilms*. New York. Wiley. p. 445-486.
- EPA**, 1993. Process design manual: nitrogen control. EPA.
- Fang, H.H.P., Chen, T., Li, Y.Y., Chui, H.K.**, 1996. Degradation of phenol in wastewater in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Research* 30: 1353-1360.
- Flemming, H-C., Wingender, J.**, 2002. Extracellular Polymeric Substances (EPS): Structural, Ecological and Technical aspects, in *Encyclopedia of environmental microbiology*, Bitton G, Editor. John Wiley & Sons: New York. p. 1223-1231.
- Flemming, H-C., Neu, T.R., Wozniak, D.J.**, 2007. The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells". *Journal of Bacteriology* 189: 7945-7947.
- Francis, C.A., Roberts, K. J., Beman, J.M., Santoro, A.E., Oakley, B.B.**, 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 14683-14688.
- Fried, J., Mary, G., Berger, H., Traunspurger, W., Psenner, R., Lemmer, H.**, 2000. Monitoring protozoa and metazoa biofilm communities for assessing wastewater quality impact and reactor up-scaling effects. *Water Science and Technology* 41: 309-316.
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H.**, 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using cation exchange resin. *Water Research* 30: 1749-1758.
- Fux, C., Bohler, M., Huber, P., Brunner, I., Siegrist, H.**, 2002. Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitrification and subsequent anaerobic ammonium oxidation (Anammox) in a pilot plant. *Journal of Biotechnology* 99: 295-306.

**Gálvez, J.**, 2001. Eliminación de la materia orgánica y del Nitrógeno en el agua residual urbana mediante lechos inundados. Tesis doctoral, Departamento de Microbiología, Instituto del Agua, Universidad de Granada.

**García-Mesa, J.J.**, 2010. Influencia de los procesos biológicos de depuración en la distribución y tamaño de partículas en tratamientos de aguas residuales urbanas. Tesis doctoral, Departamento de Ingeniería Civil, Instituto del Agua, Universidad de Granada.

**Gilmore, K.S., Srinivas, P., Akins, D.R., Hatter, K.L., Gilmore, M.S.**, 2003. Growth, Development, and Gene Expression in a Persistent *Streptococcus gordonii* Biofilm. *Infection and Immunity* 71: 4759-4766.

**Gohl, O., Friedrich, A., Hoppert, M., Averhoff, B.**, 2006. The thin pili of *Acinetobacter* sp. strain BD413 mediate adhesion to biotic and abiotic surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1394-1401.

**Golovacheva, R.S.**, 1976. Thermophilic nitrifying bacteria from hot springs. *Microbiology* 45: 329-331.

**Gómez, M.A.**, 2000. Los patógenos en la reutilización de aguas. Jornadas de Desalación y Reutilización. Ciudad Autónoma de Melilla. Universidad de Granada.

**Gómez, M.A., González-López, J., Hontoria-García, E.**, 2000a. Influence of carbon source on nitrate removal of contaminated groundwater in a denitrifying submerged filter. *Journal of Hazardous Materials* 80: 69-80.

**Gómez, M.A., Moreno, B., González-López, J., Hontoria, E.**, 2000b. Eliminación biológica de aguas subterráneas, mediante filtros sumergidos. *Alquibla* 6: 121-137.

**Gómez-Villalba, B.**, 2003. Estudio de la microbiota de sistemas de lechos inundados para la depuración de aguas residuales urbanas. Tesis doctoral, Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

**Gottenbos, B., van der Mei, H.C., Busscher, H.J.**, 1999. Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. *Methods in Enzymology* 310: 523-534.

**Grady, L., Daigger, G.T., Lim, H.C.**, 1999. Biological wastewater treatment. Ed. MarcelDekker, Inc. New York.

**Guibaud, G., Tixier, N., Bouju, A., Baudu, M.**, 2003. Relation between extracellular polymers composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere* 52: 1701-1710.

**Hallam, S.J., Konstantinidis, K.T., Putnam, N., Schleper, C., Watanabe, Y.-I., Sugahara, J., Preston, C., De La Torre, J., Richardson, P.M., DeLong, E.F.**, 2006a. Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 18296-18301.

**Hallam, S.J., Mincer, T.J., Schleper, C., Preston, C.M., Roberts, K., Richardson, P.M., DeLong, E.F.,** 2006b. Pathways of carbón assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *PLoS Biology* 4: 520-536.

**Hamoda, M.F., Al-Ghusain, I.A.,** 1998. Analysis of organic removal rates in the aerated submerged fixed film process. *Water Science and Technology* 38: 213-212.

**Hansel, C.M., Fendorf, S., Jardine, P.M., Francis, C.A.,** 2008. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 1620-1633.

**Harding, M.W., Marques, L.L., Howard, R.J., Olson, M.E.,** 2009. Can filamentous fungi form biofilms?. *Trends in Microbiology* 17: 475-480.

**Heitzer, R.D., Ottow, J.C.G.,** 1976. New denitrifying bacteria isolated from Red Sea sediments. *Marine Biology* 37: 1-10.

**Hoppe, H.G.,** 1991. Microbial extracellular enzyme activity: a new key parameter in aquatic ecology. En: Chrost, R.J. (ed) *Microbial Enzymes in Aquatics Environments*, p.60-83. Springer, Berlin.

**Hu, Z.Q., Chandran, K., Grasso, D., Smets, B.F.,** 2003. Nitrification inhibition by ethylenediamine-based chelating agents. *Environmental Engineering Science* 20: 219-228.

**Jeter, R.M., Ingraham, J.L.,** 1981. The denitrifying prokaryotes. En: *The Prokaryotes*, 1<sup>a</sup> edition (M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, y H. G. Schlegel, eds): p. 913-925. Springer, Berlin.

**Jetten, M.S.M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K.T., Schalk, J., Udo van Dongen, G.J.M., van de Graaf, A.A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen, J.G.,** 1999. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Review* 22: 421-437.

**Kachlany, S.C., Levery, S.B., Kim, J.S., Reuhs, B.L., Lion, L.W., Ghiorse, W.C.,** 2001. Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environmental Microbiology* 3: 774-784.

**Kang, S.T., Subramani, A., Hoek, E.M.V., Deshusses, M.A., Matsumoto, M.R.,** 2004. Direct observation of biofouling in cross-flow microfiltration: mechanisms of deposition and release. *Journal of Membrane Science* 244: 151-165.

**Kolter, R., Losick, R.,** 1998. One for all and all for one. *Science* 298: 226-227.

**Kolter, R., Greenberg, E.P.,** 2006. Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature* 441: 300-302.

**Könneke, M., Bernhard, A., De la Torre, J., Walker, C., Waterbury, J., Stahl, D.,** 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543-546.

**Koops, H.-P., Böttcher, B., Möller, U.C., Pommerening-Röser, A., Stehr, G.,** 1991. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov. and *Nitrosomonas halophila* sp. nov. *Journal of General Microbiology* 137: 1689-1699.

**Koops, H.-P., Pommerening-Röser, A.,** 2001. Distribution and ecophysiology of nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology* 1255: 1-9.

**Kumar, C.G., Anand, S.K.,** 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 42: 9-27.

**Kumar, A.S., Mody, K., Jha, B.,** 2007. Bacterial exopolysaccharides - a perception. *Journal of Basic Microbiology* 47: 103-117.

**Larsen, P., Nielsen, J.L., Dueholm, M.S., Wetzel, R., Otzen, D., Nielsen, P.H.,** 2007. Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environmental Microbiology* 9: 3077-3090.

**Latasa, C., Solano, C., Penades, J.R., Lasa, I.,** 2006. Biofilm-associated proteins. *Comptes Rendus Biologies* 329: 849-857.

**Lazarova, V., Manem, J.,** 2000. Innovative biofilm treatment technologies for water and wastewater treatment, in *Biofilms II: process analysis and applications*, Bryers JD, Editor. Wiley-Liss: New York. p. 159-206.

**Laughlin, R.J., Stevens, R.J.,** 2002. Evidence for Fungal Dominance of Denitrification and Codenitrification in a Grassland Soil. *Soil Science Society of America Journal* 66: 1540-1548.

**Lee Man Chu, Wong P.K.,** 2006. Microbes in Environmental Biotechnology. Municipal Wastewater Treatment. *Microbial Biotechnology, principles and Applications*, 2 edn, Chapter 16: 644-650.

**Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C.,** 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442: 806-809.

**Leung, R.W., Li, D.C., Yu, W.K., Chui, H.K., Lee, T.O., van Loosdrecht, M.C., Chen, G.H.,** 2012. Integration of seawater and grey water reuse to maximize alternative water resource for coastal areas: the case of the Hong Kong International Airport. *Water Science and Technology* 65: 410-417.

**Lewandowski, Z., Stoodley, P., Roe, F.,** 1994. Internal mass transport in heterogeneous biofilms: recent advances. *Corrosion* 95, *The NACE International Annual Conference and Corrosion Show*, Paper 222.



**Lindsay, D., von Holy, A.,** 2008. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Hospital Infection* 64: 313-325.

**Li, X., Yuen, W., Morgenroth, E., Raskin, L.,** 2012. Backwash intensity and frequency impact the microbial community structure and function in a fixed-bed biofilm reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* online.

**Liu, H., Fang, H.H.P.,** 2002. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology* 95: 249-256.

**Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J.,** 2003. Brock Biology of Microorganisms. 10 ed. New Jersey: Pearson Education, Inc.

**Mansch, R., Bock, E.,** 1998. Biodeterioration of natural stone with special reference to nitrifying bacteria. *Biodegradation* 9: 47-64.

**McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S.,** 2011. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology* 10: 39-50.

**Meincke, M., Krieg, E., Bock, E.,** 1989. *Nitrosovibrio* spp., the dominant ammonia-oxidizing bacteria in building sandstone. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2108-2110.

**Metcalf, Eddy,** 2003. Wastewater Engineering: Treatment and reuse 4th ed. New York: McGraw-Hill.

**Mincer, T.J., Church, M.J., Taylor, L.T., Preston, C., Karl, D.M., DeLong, E.F.,** 2007. Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environmental Microbiology* 9: 1162-1175.

**Moin, N.S., Nelson, K.A., Bush, A., Bernhard, A.E.,** 2009. Distribution and diversity of archaeal and bacterial ammonia-oxidizers in salt marsh sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75: 7461-7468.

**OECD,** 1994. Biotechnology for a clean environment. *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), Paris, France.

**OECD,** 2006. Policy Brief: Improving Water Management: Recent OECD Experience. *Organisation for Economic and Cooperation Development*.

**Osorio, F.,** 1998. Optimización de lechos inundados con soporte de residuos reciclados. Tesis doctoral, Departamento de Ingeniería Civil, Instituto del Agua, Universidad de Granada.

**O'Toole, G.A., Kolter, R.,** 1998. The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology* 28: 449-461.

**O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R.,** 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* 54: 49-79.

**Palmer, R.J. Jr., White, D.C.,** 1997. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends in Microbiology* 5: 435-440.

**Park, H.-D., Wells, G.F., Bae, H., Criddle, C.S., Francis, C.A.,** 2006. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5643-5647.

**Patureau, D., Davison, J., Bernet, N., Moletta, R.,** 1994. Denitrification under various aeration conditions in *Comamonas* sp., strain SGLY2. *FEMS Microbiology Ecology* 14: 71-78.

**Payne, W.J.,** 1981. Denitrification. Wiley- Interscience, New York.

**Percival, S.L., Walker, J.T., Hunter, P.R.,** 2000. Microbiological aspects of Biofilms and drinking water. CRC Press LLC. Boca Raton, Florida.

**Potts, M.,** 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiology Reviews* 58: 755-805.

**Pratt, L.A., Kolter, R.,** 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: defining the roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology* 30: 285-293.

**Pujol, R., Hamon, H., Kandel, X., Lemmel, H.,** 1994. Biofilters, flexible, reliable biological reactors. *Water Science and Technology* 29: 33-38.

**Purevdorj-Gage, B., Costerton, W.J., Stoodley, P.,** 2005. Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbiology* 151: 1569-1576.

**Redman, J.A., Walker, S.L., Elimelech, M.,** 2004. Bacterial adhesion and transport in porous media: role of the secondary energy minimum. *Environmental Science and Technology* 38: 1777-1785.

**Reisner, A., Tøiby, N., Tolker-Nielsen, T., Molin, S.,** 2005. Microbial pathogenesis and biofilm development. In: Concepts in bacterial virulence. Russel W, Herwald H, Eds. Contrib Microbiol Basel, Karger 12: 114-131.

**Rice, S.A., Tan, C.H., Mikkelsen, P.J., Kung, V., Woo, J. Tay, M., Hauser, A., McDougald, D., Webb, J.S., Kjelleberg, S.,** 2009. The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 3: 271-282.

**Ridgway, H.,** 1988. Microbial adhesion and biofouling of reverse osmosis membranes. In: Parekh, B. S., and M. Dekker (ed.). Reverse Osmosis Technology: application for highpurity water production. New York p. 429-481.

**Rodelas, B., Lithgow, J.K., Wisniewsky-Dyé, F., Hardman, A., Wilkinson, A., Economou, A., Williams, P., Downie, A.J.,** 1999. Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (rhi) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. *Journal of Bacteriology* 181: 3816-3823.

**Rodgers, M., Zhan, X.M.,** 2003. Moving-Medium Biofilm Reactors. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2: 213-224.

**Rogalla, F., Sibony, J.,** 1992. Biocarbone aerated filters-ten years after: past, present, and plenty of potential. *Water Research* 26: 2043-2048.

**Rollet, C., Gal, L., Guzzo, J.,** 2009. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* 290: 135-142.

**Romani, A.M., Fund, K., Artigas, J., Schwartz, T., Sabater, S., Obst, U.,** 2008. Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microbial Ecology* 56: 427-436.

**Rosén, M., Welander, T., Löfqvist, A., Holmgren, J.,** 1998. Development of new process for treatment of a pharmaceutical wastewater. *Water Science and Technology* 37: 251-258.

**Rudd, T., Sterritt, R.M., Lester, J.N.,** 1984. Extraction of extracellular polymers from activated sludge. *Biotechnology Letters* 5: 327-332.

**Santoro, A.E., Francis, C.A., De Sieyes, N.R., Boehm, A.B.,** 2008. Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary. *Environmental Microbiology* 10: 1068-1079.

**Saravanan, P., Nancharaiyah, Y.V., Venugopalan, V.P., Rao, T.S., Jayachandran, S.,** 2006. Biofilm formation by *Pseudoalteromonas ruthenica* and its removal by chlorine. *Biofouling* 22: 371-381.

**Schalk, J., Hege, O., Kuene, G.J., Jetten, M.S.M.,** 1998. The anaerobic oxidation of hydrazine: a novel reaction in microbial nitrogen metabolism. *FEMS Microbiology Letters* 158: 61-67.

**Schlegel, S., Koeser, H.,** 2007. Wastewater treatment with submerged fixed bed biofilm reactor systems-design rules, operating experiences and ongoing developments. *Water Science and Technology* 55: 83-89.

**Schneider, R.P., Ferreira, L.M., Binder, P., Bejarano, E.M., Goes, K.P., Slongo, E., Machado, C.R., Rosa, G.M.Z.,** 2005. Dynamics of organic carbon and of bacterial populations in a conventional pretreatment train of a reverse osmosis unit experiencing severe biofouling. *Journal of Membrane Science* 266: 18-29.

**Schmidt, J.E., Ahring, B.K.,** 1996. Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42: 457-462.

**Sedlak, R.**, 1991. Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater. Principle and practice. 2nd Edition. Lewis Publishers.

**Séguret, F., Racault, Y.**, 1998. Hydrodynamic behaviour of a full-scale submerged biofilter and its possible influence on performances. *Water Science and Technology* 38: 249-256.

**Shoun, H., Fushinobu, S., Jiang, L., Kim, S.W., Wakagi, T.**, 2012. Fungal denitrification and nitric oxide reductase cytochrome P450nor. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367: 1186-1194.

**Simões, M., L.C. Simões, L.C., Vieira, M.J.**, 2010. "A review of current and emergent biofilm control strategies." *LWT - Food Science and Technology* 43: 573-583.

**Smythe, G., Matelli, G., Bradford, M., Rocha, C.**, 1997. Biological treatment of salty wastewater. *Environmental Progress* 16: 179-183.

**Stephenson, D., Stephenson, T.**, 1992. Bioaugmentation for enhancing biological wastewater treatment. *Biotechnological advances* 10: 549-559.

**Stewart, P.S.**, 2006. Matrix mysteries hold keys to controlling biofilms. *Biofilm Perspectives*. February ([www.biofilmsonline.com](http://www.biofilmsonline.com)).

**Stewart, P.S., Franklin, M.J.**, 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 6: 199-210.

**Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton J.W.**, 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* 56: 187-209.

**Strous, M., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M.**, 1999. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3248-3250.

**Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M.W., 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, B.E., Op den Camp, H.J., van der Drift, C., Cirpus, I., van de Pas-Schoonen, K.T., Harhangi, H.R., van Niftrik, L., Schmid, M., Keltjens, J., van de Vossenberg, J., Kartal, B., Meier, H., Frishman, D., Huynen, M.A., Mewes, H.W., Weissenbach, J., Jetten, M.S., Wagner, M., Le Paslier, D.**, 2006. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* 440: 790-794.

**Sutherland, I.W.**, 1990. *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*. 1 ed. Cambridge studies in biotechnology, ed. Sir James Baddiley NHC, I. J. Higgins, W. G. Potter. Vol. 9. New York: Cambridge University Press.

**Sutherland, I.W., Kennedy, L.**, 1996. Polysaccharide lyases from gellan-producing *Sphingomonas* spp. *Microbiology* 142: 867-872.

**Sutherland, I.W.**, 2001a. The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* 9: 222-227.

**Sutherland, I.W.**, 2001b. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147: 3-9.

**Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Stensel, H.D.**, 2003. Metcalf & Eddy, Inc.'s Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse, 4th Edition. McGraw-Hill, Inc., New York. p. 1819.

**Tenke, P., Kovacs, B., Jäckel, M., Nagy, E.**, 2006. The role of biofilm infection in urology. *The World Journal of Urology* 24: 13-20.

**Tejero, I.**, 1998. Procesos biológicos de película fija. En *XVI Curso sobre tratamiento de aguas residuales y explotación de estaciones depuradoras*, CEDEX, Madrid

**Tejero, I.**, 2002. Procesos biológicos de película fija. En *XX Curso sobre tratamiento de aguas residuales y explotación de estaciones depuradoras*, CEDEX, Madrid.

**Teske, A., Alm, E., Regan, J.M., Toze, S., Rittmann, B.E., Stahl, D.A.**, 1994. Evolutionary relationship among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology* 176: 6623-6630.

**Tourna, M., Freitag, T.E., Nicol, G.W., Prosser, J.I.**, 2008. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology* 10: 1357-1364.

**Treusch, A.H., Leininger, S., Kietzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.P., Schleper, C.**, 2005. Novel genes for nitrite reductase and *Amo*-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology* 7: 1985-1995.

**Tsuneda, S., Park, S., Hayashi, H., Jung, J., Hirate, A.**, 2001. Enhancement of nitrifying biofilm formation using selected EPS produced by heterotrophic bacteria. *Water Science and Technology* 46: 197-204.

**Van de Graaf, A.A., Mulder, A., de Bruijn, P., Jetten, M., Robertson, L.A., Kuenen, J.G.**, 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1246-1251.

**Van de Graaf, A.A., de Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M., Kuenen, J.G.**, 1996. Autotrophic growth of anaerobic, ammonium-oxidising microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 142: 2187-2196.

**Van de Graaf, A.A., de Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M., Kuenen, J.G.**, 1997. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of <sup>15</sup>N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 143: 2415-2421.

**Van Limbergen, H., Top, E.M., Verstraete, W.,** 1998. Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50: 16-23.

**Veiga, M.C., Mahendra, K.J., Wu, W.M., Hollingsworth, R.I., Zeikus, J.G.,** 1997. Composition and role of extracellular polymers in methanogenic granules. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 403-407.

**Verma, M., Brar, S.K., Blais, J.F., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y.,** 2006. Aerobic Biofiltration Processes - Advances in Wastewater Treatment. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste Management* 10: 264-276.

**Vila, J., Soriano, A., Mensa, J.,** 2008. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica* 26: 48-55.

**Voytek, M.A., Priscu, J.C., Ward, B.B.,** 1999. The distribution and relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria in lakes of the McMurdo Dry Valley, Antarctica. *Hydrobiology* 401: 113-130.

**Wagner, D., Spieck, E., Bock, E., Pfeiffer, E.-M.,** 2001. Microbial life in terrestrial permafrost: Methanogenesis and nitrification in gelsols as potentials for exobiological processes. In G. Horneck and C. Baumstark-Khan (Eds.), *Astrobiology - the quest for the conditions of life* (p. 143-159). Berlin, Germany: Springer-Verlag.

**Watnick, P.I., Kolter, R.,** 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology* 34: 586-595.

**Watnick, P.I., Kolter, R.,** 2000. Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology* 182: 2675-2679.

**Watson, S.W.,** 1971. Taxonomic considerations of the family *Nitrobacteraceae* Buchanan. *International Journal of Systematic Bacteriology* 21: 254-270.

**Watson, S.W., Bock, E., Valois, F.W., Waterbury, J.B., Schlosser, U.,** 1986. *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: A chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. *Archives of Microbiology* 144: 1-7.

**Watson, S.W., Bock, E., Harms, H., Koops, H.-P., Hooper, A.B.,** 1989. Nitrifying bacteria. In J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig and J.G. Holt (Eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore, MD 3: 1808-1834.

**Webb, J.S., Thompson, L.S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., Kjelleberg, S.,** 2003. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of Bacteriology* 185: 4585-4592.

**Weidler, G.W., Dornmayr-Pfaffenhuemer, M., Gerbl, F.W., Heinen, W., Stan-Lotter, H.,** 2007. Communities of Archaea and Bacteria in a subsurface radioactive thermal spring in the Austrian Central Alps, and evidence of ammonia-oxidizing Crenarchaeota. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 259-270.

**Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S.,** 2002. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science* 295: 1487.

**Whitfield, C., Valvano, M.,** 1993. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in Gram-negative bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 35: 136-231.

**WHO,** 2010. UN-Water Global Annual Assessment of Sanitation and Drinking-Water (GLAAS) 2010: Targeting Resources for Better Results. World Health Organization, WHO Press. Switzerland. ISBN 978-92-4-159935-1.  
Available from: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/glaas/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/glaas/en/).

**Wilderer, P.A., McSwain, B.S.,** 2004. The SBR and its biofilm application potentials. *Water Science and Technology* 50: 1-10.

**Wimpenny, J., Manz, W., Szewzyk, U.,** 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 661-671.

**Woese, C.R., Weisburg, W.G., Hahn, C.M., Paster, B.J., Zablen, L.B., Lewis, B.J., Macke, T.J., Ludwig, W., Stackebrandt, E.,** 1985. The phylogeny of purple bacteria: The gamma subdivision. *Systematic and Applied Microbiology* 6: 25-33.

**Wood, P.M.,** 1986. Nitrification as bacterial energy source. Special publication *Society for General Microbiology* 20: 39-61.

**WSD,** 2009. Annual Report 2008/2009. Water Supply Department, Hong Kong SAR Government.

**Wuchter, C., Abbas, B., Coolen, M.J.L., Herfort, L., Van Bleijswijk, J., Timmers, P., Strous, M., Teira, E., Herndl, G.J., Middleburg, J.J., Schouten, S., Sinninghe Damste, J.S.,** 2006. Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 12317-12322.

**Yang, P., Nitorisavut, S., Wu, J.S.,** 1995. Nitrate removal using a mixed-culture entrapped microbial cell immobilization process under high salt conditions. *Water Research* 29: 1525-1532.

**You, J., Das, A., Dolan, E.M., Hu, Z.,** 2009. Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. *Water Research* 43: 1801-1809.

**Zamorano, M., Hontoria, E.,** 2001. Depuración de aguas con filtros inundados. Utilización de nuevos materiales. *Ingeniería del agua* 8: 219-227.

**Zhu, G.B., Peng, Y.Z., Li, B., Guo, J., Yang, Q., Wang, S.Y.,** 2008. Biological removal of nitrogen from wastewater. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 192: 159-195.

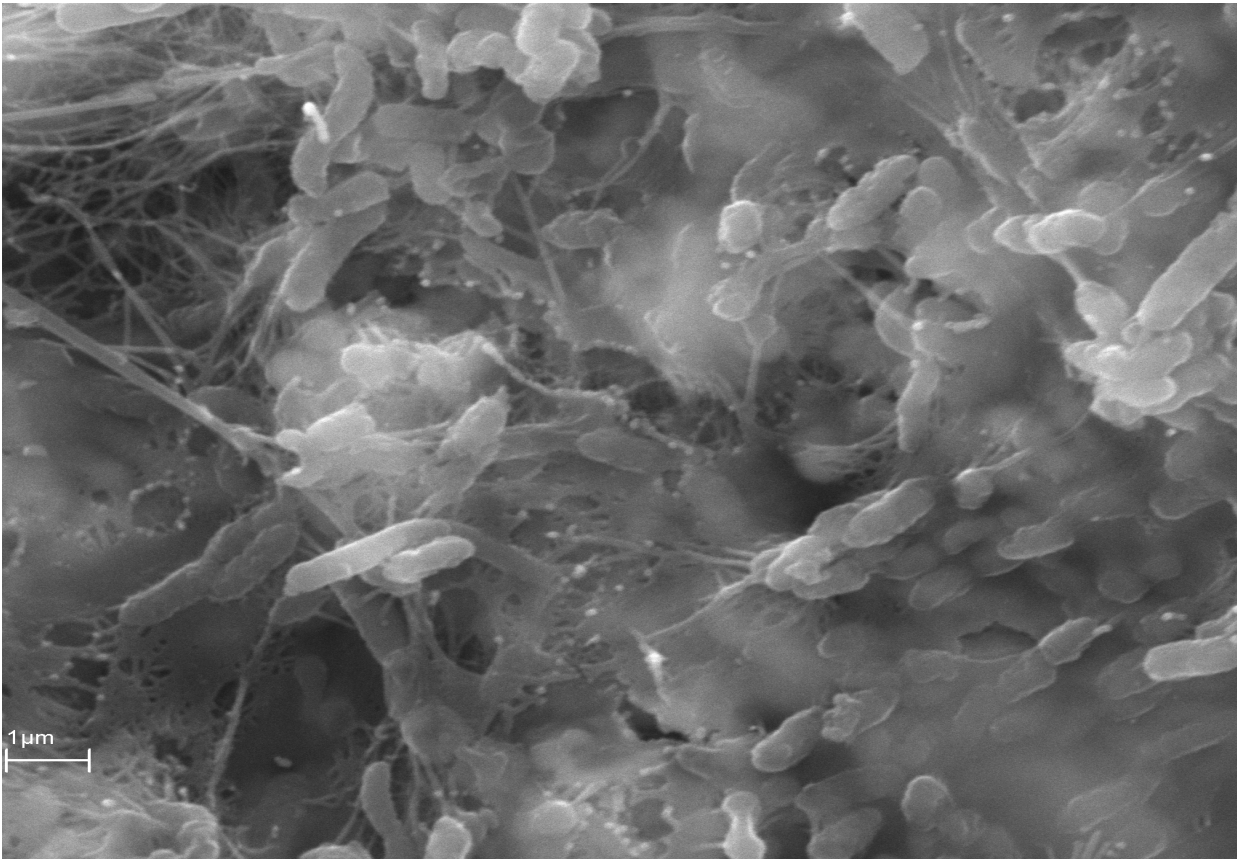
**Zumft, W.G.,** 1992. The denitrifying prokaryotes. En: *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, 2<sup>a</sup> edition (A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, y K. H. Schleifer, eds): p. 554-582. Springer-Verlag, New York, N.Y.

**[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)**



## Capítulo II

# Efecto de la salinidad en el tratamiento biológico de aguas residuales urbanas mediante un sistema de filtro sumergido



## II.1. INTRODUCCIÓN

### II.1.1. Efecto de la salinidad en el tratamiento biológico de aguas residuales urbanas mediante un sistema de filtro sumergido

Cuando los procesos biológicos se aplican al tratamiento de aguas residuales salinas, las altas concentraciones de sales inorgánicas pueden afectar negativamente a la oxidación de carbono, nitrificación, desnitrificación y eliminación de fósforo, e incluso pueden causar que los sistemas de tratamiento de aguas residuales no produzcan los rendimientos deseados (Wu *et al.*, 2008; Sharrer *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 1998; Kargi y Dincer, 1996).

La sal puede ocasionar cambios en el metabolismo microbiano, en las propiedades de sedimentación del lodo y de los flóculos en sistemas de fangos activos, así como en la arquitectura de las biopelículas. También la salinidad puede alterar la composición del biofilm/sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y afectar directamente la solubilidad máxima de oxígeno y su tasa de transferencia en la fase líquida (Bassin *et al.*, 2012; Bassin *et al.*, 2011; Van't Riet y Tramper, 1991).

### II.1.2. Procedencia de las aguas residuales salinas

Los efluentes salinos se pueden encontrar tanto en aguas residuales industriales como en aguas residuales urbanas. Por lo general, los efluentes salinos se encuentran asociados a procesos industriales de fabricación y manufactura de conservas de productos marinos y vegetales (Soto *et al.*, 1990; Nemerow, 1977). La industria química genera efluentes altamente salinos durante el proceso de producción de pesticidas, peróxidos orgánicos, y algunos productos farmacéuticos, entre otros. Grandes cantidades de salmuera también se producen durante las operaciones de recuperación de gasolina y aceites (Woolard e Irvine, 1994).

Las aguas residuales urbanas también pueden verse afectadas por otras fuentes salinas que no sean industriales. Como cita tenemos el caso de ciudades isleñas y costeras, donde el agua dulce escasea, y por tal motivo se suministra agua de mar para alimentar los inodoros (Peng *et al.*, 2005; Mikucki y Poon, 1976). Hong Kong ha estado utilizando agua de mar para el inodoro desde los años 50, lo que ahorra 270 millones de metros cúbicos de agua dulce anualmente y ofrece un recurso alternativo de agua económico y sostenible para

el saneamiento en ciudades costeras con recursos hídricos limitados (Aslan y Simsek, 2012; Wang *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2010).

Otra situación, en la que se produce contaminación salina de las aguas residuales sucede en ciudades donde, durante la estación de invierno, se recurre al deshielo de sus calles mediante el empleo de sal común, la cual en una red de alcantarillado unitario, pasa a formar parte del caudal de agua residual urbana, elevando su concentración salina a valores promedio de hasta 2.000 ppm (Ludzack y Noran, 1965).

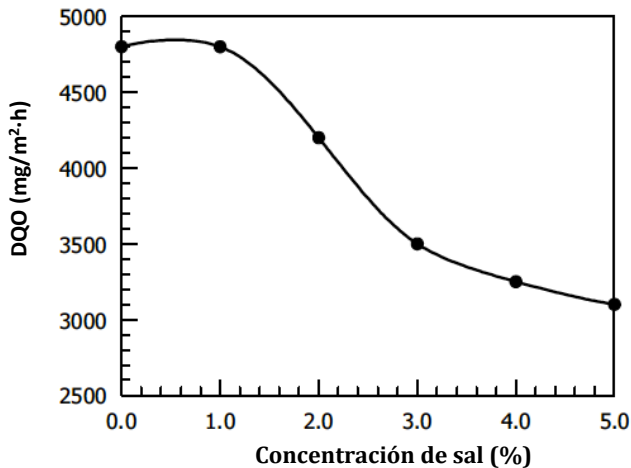
También, en las redes de alcantarillado de ciudades costeras, se pueden producir entradas de agua de mar durante los ciclos de marea alta, o incluso de forma permanente mediante infiltración salina (Castillo *et al.*, 1995). Un caso específico, es la ciudad española del Puerto de Santa María (Cádiz), en el que los colectores de aguas residuales sufren la intrusión marina como consecuencia de los ciclos de marea. Este hecho, determina la salinización variable de las aguas residuales que llegan a la EDAR de las Galeras, donde se realiza el tratamiento de dichas aguas.

### II.1.3. Depuración biológica en medio salino

Las aguas residuales orgánicas altamente salinas son a menudo mal biodegradadas en las plantas convencionales de tratamiento debido a la no adaptación de la biomasa al efecto tóxico del sodio presente en las aguas residuales, lo que se refleja en una pobre eliminación de materia orgánica (Vyrides y Stuckey, 2009; Kargi y Dincer, 2000). Concentraciones de sales superiores al 1% causan plasmólisis y/o pérdida de la viabilidad celular (Aslan y Simsek, 2012). Estudios anteriores informan que la operación del proceso de fangos activos con un contenido de sal superior a 20 g/L se caracteriza por floculación pobre, alto contenido de sólidos en el efluente, y una grave disminución de la tasa de utilización de sustrato (Burnett, 1974).

Kargi y Uygur (1996) investigaron los efectos de altos niveles de salinidad en contactores biológicos rotativos (RBC). Los resultados indicaron que la velocidad y la eficiencia de eliminación de DQO (demanda química de oxígeno) disminuyeron significativamente con el aumento del contenido en sal por encima de 10 g/L. La eficiencia en la eliminación de DQO en aguas residuales salinas (1% de sal) fue del 95%. Debido a los efectos adversos de la sal en los microorganismos, la eliminación de DQO se redujo a 60%

cuando el contenido en sal es del 5%. El aumento del contenido en sal provoca una reducción lineal de la tasa de eliminación de DQO, como se muestra en la figura II.1.



**Figura II.1.** Variación en la eliminación de DQO a diferentes concentraciones salinas (Kargi y Uygur, 1996).

El número de estudios sobre tratamiento de aguas residuales salinas es limitado, especialmente en cuanto al conocimiento del efecto que este factor ambiental ejerce sobre las poblaciones microbianas (Yoshie *et al.*, 2004).

Los problemas más importantes, que puede originar un incremento en la salinidad de un agua residual, se pueden resumir en cuatro categorías:

1. Capacidad de adaptación de la microbiota a cambios en la osmolaridad del sistema.

Para algunos microorganismos, la adaptación a nuevas concentraciones de sal es fisiológicamente imposible. Así, bacterias adaptadas a elevadas o bajas concentraciones salinas pueden morir al modificarse dicha concentración (Kincannon y Gaudy, 1968). Este hecho, se observa especialmente cuando las bacterias adaptadas proceden del medio marino. En este caso, los microorganismos son más sensibles a cambios en la concentración de los iones del medio (Pillard *et al.*, 1999).

2. Efectos adversos sobre la eficacia de la depuración por cambios rápidos en la concentración salina.

Los sistemas sujetos a cambios bruscos en la carga de sal responden con una menor eficiencia en la eliminación de materia orgánica, un incremento en los sólidos del efluente y una pérdida de la fracción volátil de los fangos. La magnitud de estos efectos, a su vez depende del tipo de microorganismos, de la carga contaminante y de la velocidad del cambio. Se ha comprobado que los cambios rápidos en la concentración de sal causan más disfunciones que los lentos (Burnett, 1974). De igual manera, los cambios desde una concentración mayor a otra menor son más perjudiciales que a la inversa (Kincannon y Gaudi, 1968).

En el contexto antes referenciado, la estabilización salina de los efluentes a tratar en una EDAR, se puede considerar como una de las primeras consideraciones a tener en cuenta en el diseño de las plantas depuradoras (Stover y Obayashi, 1991).

3. Reducción en la cinética de degradación de compuestos en respuesta a un incremento en la concentración salina.

Uno de los fenómenos asociados al incremento de la salinidad en las aguas residuales, tanto urbanas como industriales es la reducción de forma significativa de las constantes cinéticas de eliminación de materia orgánica y de nitrógeno, las cuales permanecen reducidas mientras la salinidad sea elevada (Vredendregt *et al.*, 1997). Resulta por tanto evidente que modificaciones temporales o sostenidas en la salinidad de los efluentes pueden afectar de una forma directa a la capacidad de mineralización de los sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales.

4. Incremento en la concentración de sólidos en suspensión en el efluente.

Como consecuencia del efecto tóxico que un incremento de salinidad ejerce sobre las poblaciones de protozoos y organismos filamentosos, los efluentes salinos se caracterizan por una mayor concentración de sólidos en suspensión que los efluentes con bajas concentraciones de sal (Wong, 1992). Moussa *et al.* (2006) observaron que rotíferos, protozoos y nematodos no podían sobrevivir cuando la concentración de sal en el influente

era mayor de 8 g/L de NaCl. Este hecho, determina una menor sedimentabilidad en los reactores biológicos y en consecuencia, una dificultad añadida en la explotación de las EDARs. También el incremento de los sólidos en suspensión en un efluente salino puede ser consecuencia de la lisis celular de la microbiota responsable de la depuración biológica originada como resultado de un incremento en la salinidad (Bassin *et al.*, 2012; Urbain *et al.*, 1993; Burnett, 1974).

#### **II.1.4. Efecto de la salinidad en el proceso de nitrificación**

La eliminación de nitrógeno de las aguas residuales, incluidas las aguas salinas, es fundamental para cumplir los criterios de descarga de aguas residuales. Por ello, la eliminación biológica de nitrógeno en las EDARs debe funcionar correctamente para cambios limitados de la salinidad en los influentes (Sudarno *et al.*, 2011). El proceso de nitrificación se considera como el paso limitante para la eliminación de los compuestos nitrogenados en el proceso general de tratamiento de aguas residuales biológicas, debido a la baja tasa de crecimiento de los organismos involucrados (Almstrand *et al.*, 2012; Sudarno *et al.*, 2011).

La salinidad, como hemos comentado anteriormente, afecta a la actividad metabólica de los microorganismos y específicamente a las bacterias nitrificantes, reduciendo el crecimiento microbiano y las tasas de oxidación de amonio (Moussa *et al.*, 2006).

Diferentes investigaciones han mostrado el efecto de la salinidad sobre el proceso de nitrificación (Aslan y Simsek, 2012; Bassin *et al.*, 2012; Bassin *et al.*, 2011; Sudarno *et al.*, 2011; Moussa *et al.*, 2006). Sin embargo, los resultados obtenidos son difíciles de comparar y son a menudo contradictorios. La configuración del sistema biológico y la inestabilidad de las condiciones de experimentación (en relación con el pH, la temperatura y la presencia de compuestos inhibidores) se encuentran entre los factores que directamente influyen en el grado de efecto de la sal en el proceso de nitrificación (Bassin *et al.*, 2012; Bassin *et al.*, 2011). Por otra parte, la forma en que la sal es introducida en el sistema (como un pulso o por aumento gradual), así como las características de la biomasa presente en el reactor (cultivo puro o mixto, bacterias adaptadas o no adaptadas a la salinidad) puede influir considerablemente en los resultados (Bassin *et al.*, 2012; Bassin *et al.*, 2011; Moussa *et al.*,

2006).

Las sales de cloruro se encuentran a menudo en las aguas residuales. No obstante su efecto en la nitrificación parece estar condicionado por su concentración en el influente. Cantidades superiores a 1% (p/v) se han considerado frecuentemente como responsables de procesos de inhibición de la nitrificación (Kargi y Uygur, 1996), aunque siempre estos resultados se pueden ver afectados por diferentes variables de explotación.

Las bacterias oxidadoras de amoníaco (AOB) y las bacterias oxidadoras de nitrito (NOB) responden de manera diferente a los cambios de las condiciones ambientales como la salinidad variable (Sudarno *et al.*, 2011). Así, diversos estudios realizados sobre la dinámica microbiana de estos organismos nitrificantes, bajo diferentes concentraciones de sal, han demostrado que las AOB son más resistentes a los efectos de la salinidad que las NOB (Aslan y Simsek, 2012; Bassin *et al.*, 2011; Vendramel *et al.*, 2011; Sudarno *et al.*, 2010; Moussa *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2003; Dincer y Kargi, 2001). Este hecho explica que en agua de mar el nitrito se acumule, incluso cuando los géneros marinos nitrificantes, adaptados a las altas concentraciones salinas, estuvieron presentes (Sudarno *et al.*, 2010; Catalán *et al.*, 1997).

Pocas experiencias se han realizado sobre el efecto que la salinidad ejerce en las biotransformación de la materia orgánica y el proceso de nitrificación en sistemas de biopelícula, que permiten retener los microorganismos de crecimiento lento, lo que favorece la adaptación gradual a las condiciones estresantes (Vendramel *et al.*, 2011). Es por ello, que en nuestro proyecto hemos considerado interesante evaluar estos factores en biorreactores de lecho sumergido con el objetivo de comprobar cómo un proceso sometido a salinidad variable puede afectar al funcionamiento de estos sistemas.

## II.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin conocer el efecto de la salinidad sobre el funcionamiento del filtro sumergido se empleó una planta piloto a escala de laboratorio, la cual se ubicó en las instalaciones del Instituto del Agua de la Universidad de Granada.

Se realizó un estudio comparativo entre cuatro ensayos experimentales, cada uno de los cuales tuvo una duración de 45 días, variándose la concentración salina del agua

residual de entrada y manteniéndose constantes todos los demás parámetros establecidos en la planta piloto.

### II.2.1. Descripción de la planta piloto a escala de laboratorio

El biorreactor de filtro sumergido diseñado consistió en una columna cilíndrica de metacrilato de 65 cm de altura y un diámetro de 15 cm. El metacrilato utilizado en la construcción de la columna permitió visualizar el material de relleno contenido en el interior de la misma, así como el posterior crecimiento de la biopelícula sobre dicho material de soporte.

Se utilizó como material de relleno un soporte plástico poroso, Bioflow 9®, con una superficie específica de  $800 \text{ m}^2/\text{m}^3$  y una densidad aparente de  $145 \text{ Kg}/\text{m}^3$  (figura II.2), especialmente indicado para el tratamiento biológico de aguas residuales mediante sistemas de filtros sumergidos. Los medios filtrantes realizados con material plástico tienen mayor superficie específica y porosidad que la piedra partida, lo que proporciona mejores resultados (Ferrer y Seco, 2007).



**Figura II.2. Fotografías del material de relleno plástico poroso Bioflow 9®.**

En la parte inferior de dicha columna se dispuso una placa porosa y en la parte superior una rejilla con la finalidad de retener el material de soporte a una altura óptima para el tratamiento del agua residual urbana, que se comprobó que era de 55 cm.



En el sistema de filtro sumergido se establecieron condiciones de flujo a contracorriente, de modo que la entrada del influente se realizó por la parte superior de la columna, con un caudal de 50 mL/min mediante una bomba peristáltica (Watson Marlow® 505 S), produciéndose un flujo descendente, y el flujo de aire del proceso fue ascendente mediante un difusor de aire situado en la base de la columna. También se instaló un manorreductor y un rotámetro que permitió medir y controlar el caudal de aire en el proceso (figura II.3).

La planta piloto se instaló en el interior de un armario termostatzado (Aqualytic®, Alemania), con el objetivo de aislarla de la luz y mantener la temperatura constante a 25°C durante la realización de este trabajo. La variación de la temperatura influye notablemente en la calidad del efluente de los filtros sumergidos, ya que afecta a las propiedades físicas del agua, así como a la capacidad e intensidad de las acciones biológicas, químicas y bioquímicas (Seoanez, 1999).

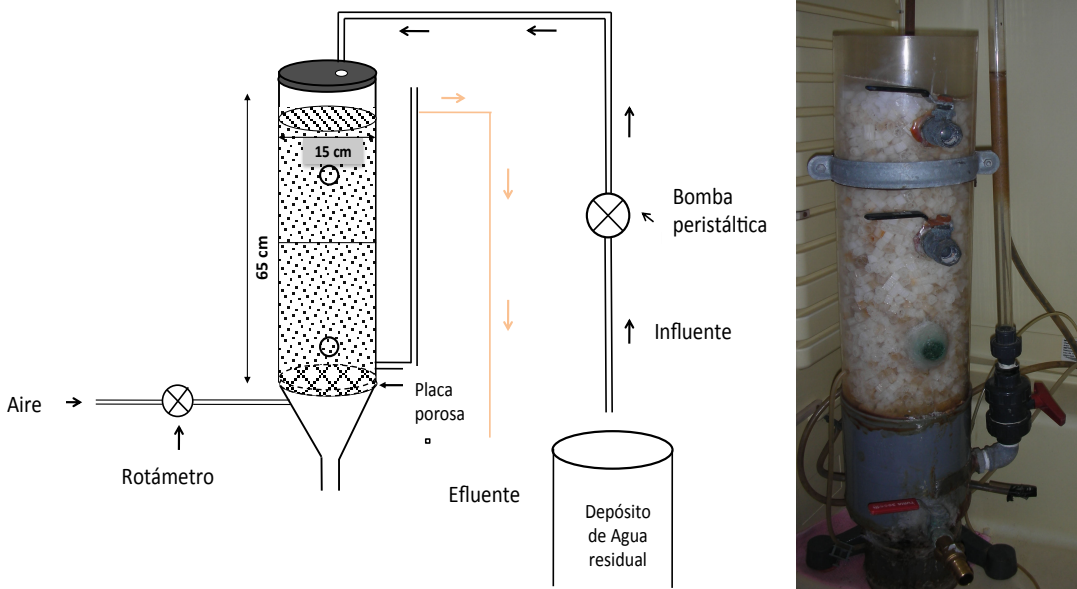


Figura II.3. Esquema y fotografía de la planta piloto de filtro sumergido a escala de laboratorio utilizada en nuestro estudio.

- Lavado de la planta

A lo largo del tratamiento del influente con el sistema de filtro sumergido, este se fue colmatando debido a los sólidos retenidos y al crecimiento de la biopelícula microbiana, por lo que resultó necesario el lavado del sistema. Se establecieron ciclos de lavado cada 15 días, siguiéndose la siguiente secuencia (Gálvez, 2001):

1. Esponjado con aire ( $80 \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{h}$ ) durante 30 segundos.
2. Lavado con agua y aire ( $15 \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{h}$  y  $60 \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{h}$ ) durante 30 segundos
3. Aclarado con agua ( $15 \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{h}$ ) durante 30 segundos.

Tanto el aire como el agua del lavado se introducen por la parte inferior de la columna. El agua empleada para el lavado es una fracción del efluente depurado.

Como cada ensayo tenía una duración de 45 días, se establecieron 3 ciclos de funcionamiento de 15 días del sistema, debido a la colmatación del filtro sumergido, en cada una de las diferentes salinidades.

### II.2.2. El influente

El agua residual empleada como influente en el sistema de filtro sumergido procedía de la planta de depuración de aguas residuales (EDAR), Estación Depuradora del Sur (figura II.4) propiedad de la Empresa Municipal de Aguas y Saneamiento de Granada, EMASAGRA, S.A.



Figura II.4. Situación geográfica de Estación Depuradora del Sur, EMASAGRA S.A. (Granada).

El influente urbano proporcionado por EMASAGRA S.A. para esta investigación fue recogido del decantador primario de la EDAR (figura II.5) con una periodicidad semanal, mediante depósitos de almacenamiento con una capacidad de 200 L.



**Figura II.5. Vista general del decantador primario de la estación depuradora del Sur (EMASAGRA).**

Para el funcionamiento de la planta se introdujo el agua residual urbana en el biorreactor mediante una bomba peristáltica Watson Marlow® 505 S, siendo los conductos o tubos de conexión de silicona.

En el primer experimento se introdujo directamente en el sistema un influente procedente del decantador primario de la EDAR, con una conductividad de 1,5 mS, mientras que en los experimentos 2, 3 y 4, a dicha agua residual se le adicionó concentraciones de NaCl de 3,7 g/L, 24,1 g/L y 44,1 g/L, obteniéndose un influente con una conductividad de 12 mS, 24 mS y 48 mS respectivamente.

### II.2.3. Caracterización fisicoquímica del agua en la planta piloto

Para caracterizar fisicoquímicamente tanto el influente como el efluente del sistema de filtro sumergido en los 4 experimentos establecidos a diferentes salinidades se determinaron diariamente parámetros como: pH, conductividad, DQO, DBO<sub>5</sub> (demanda biológica de oxígeno), SST (sólidos en suspensión totales) y SSV (sólidos en suspensión volátiles), mientras que la concentración de nitratos, nitritos y amonio se midió con una periodicidad de 2 veces por semana, tanto del influente como del efluente de la planta piloto (figura II.6).

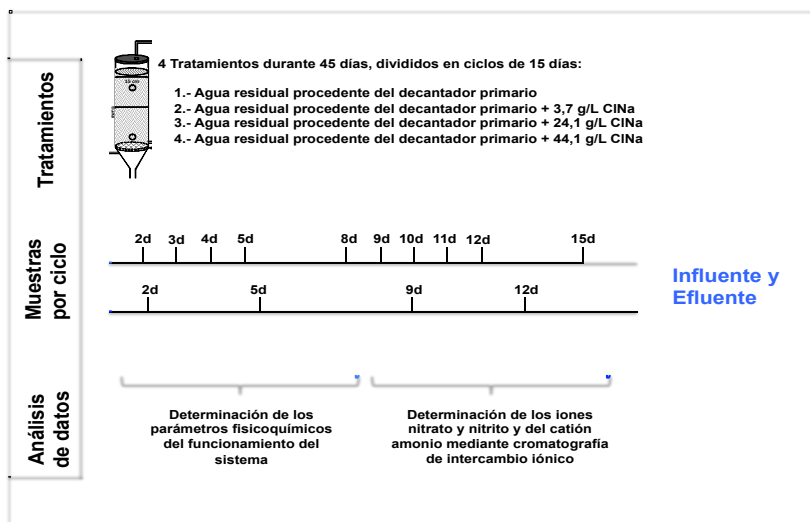


Figura II.6. Esquema de los experimentos realizados en este estudio.

#### II.2.3.1. Demanda biológica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>)

La demanda biológica de oxígeno podemos considerarla como una estimación de la cantidad de materia orgánica biodegradable presente en una muestra de agua. Este parámetro se basa en la capacidad de los microorganismos presentes en la muestra de consumir los compuestos orgánicos en un ambiente aeróbico (Gómez y Hontoria, 2003).

Atendiendo a esto podemos definir la DBO<sub>5</sub> como la cantidad de O<sub>2</sub> necesaria para la oxidación de toda la materia orgánica biodegradable por medio de microorganismos aerobios (Xu y Hasselblad, 1996; Ferrer y Seco, 2007).

Para determinar la  $DBO_5$  se utilizó el método manométrico, el cual se aplicó al agua de entrada y al agua de salida.

Con un matraz aforado de 164 mL de capacidad se midió un volumen concreto de agua de entrada, 82 mL, y otro de agua de salida, 164 mL. Estos volúmenes se introdujeron en frascos de vidrio color topacio con un imán y en el receptáculo del cuello de la botella se añadieron 1 o 2 lentejas de hidróxido sódico (Panreac®). Estos frascos se cerraron con tapones Oxitop® (WTW, Alemania) sin ajustar y se incubaron en un agitador magnético WWT Oxitop® IS6 (WTW, Alemania) durante 30 minutos a 20°C para atemperar la muestra.

Transcurridos los 30 minutos, se cerraron los tapones perfectamente y dejamos incubar a 20°C durante 5 días. Pasados estos 5 días tomamos la lectura del  $O_2$  en mg  $O_2/L$ .

### II.2.3.2. Demanda química de oxígeno (DQO)

La DQO podemos definirla como una forma de estimar la materia orgánica presente en la muestra de agua, a través de la determinación por vía química de la cantidad de oxígeno necesario para oxidarla. Mediante este método se oxida tanto la materia orgánica biodegradable como la que no lo es, sin posibilidad de diferenciar entre ellas (Gómez y Hontoria, 2003).

El proceso se basa en una oxidación química de la materia orgánica, empleando dicromato potásico ( $K_2Cr_2O_7$ ) como oxidante en medio ácido fuerte (exceso de  $H_2SO_4$ ). El proceso ha de realizarse en caliente (150°C) durante 2 horas, utilizando plata ( $Ag^+$ ) como catalizador.

En el proceso analítico podemos diferenciar 2 fases, por un lado la fase de oxidación y por otro la valoración. Este parámetro se midió tanto a la entrada como a la salida del sistema de filtro sumergido.

- Procedimiento analítico
  1. Fase de oxidación. Se limpiaron perfectamente los tubos de digestión empleando una mezcla sulfocrómica y se aclararon con abundante agua destilada. Sobre el tubo limpio y seco, se adicionaron 3 mL de la muestra, previamente preparada ya

que presentan una alta salinidad. Para ello se precipitaron los cloruros con 0,1 mg de  $\text{AgNO}_3$  y se filtró con filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Una vez obtenidas las muestras, se les añadió 4 mL de la solución ácida y 2 mL de la solución oxidante. Cerramos y agitamos el tubo manteniéndolo a 150°C durante 2 horas en un bloque térmico.

2. Valoración espectrofotométrica. Una vez los tubos fríos, medimos la absorbancia a 600 nm y mediante interpolación en la gráfica de calibrado obtendremos el valor de la DQO.

#### Solución oxidante de dicromato potásico 0,25 N ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )

Se adicionaron en un matraz aforado 12,25 g del  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  sobre 500 mL de agua destilada en agitación, hasta disolución. Una vez disuelto, se añadieron dejando escurrir por la pared del matraz 167 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) dejando escurrir por la pared del matraz. Enrasar hasta 1 L con agua destilada.

#### Solución ácida

Sobre 500 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 98% en agitación, añadimos 6,6 g de sulfato de plata ( $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ) hasta disolución. Enrasamos hasta 100 mL con ácido sulfúrico. Dejamos reposar al menos 24 horas.

#### Solución madre de Ftalato ácido de potasio 1mg/mL ( $\text{HOCC}_6\text{H}_4\text{COOK}$ )

En un matraz aforado, sobre 500 mL de agua destilada en agitación se adicionaron 850,34 mg de Ftalato ácido de potasio hasta disolución. Enrasar hasta 1 litro con agua destilada y conservar a 4°C.

- Obtención de la curva de calibración

A partir de la solución madre de Ftalato ácido de potasio y empleando matraces aforados de 100 mL se prepararon los diferentes patrones para la curva de calibración, realizando diluciones seriadas tal y como se indica en la tabla II.1.

Tabla II.1. Curva patrón para la DQO (Gómez y Hontoria, 2003).

Puntos de la recta de calibrado	1	2	3	4	5	6	7
Concentración	0	50	100	200	500	800	1000
mL Sol. de Ftalato	0	5	10	20	50	80	100
mL Agua Destilada	100	95	90	80	50	20	0

### II.2.3.3. pH

La determinación del pH es una de las pruebas más importantes utilizadas en el análisis fisicoquímico de aguas, tanto en el tratamiento de aguas residuales como en el de aguas potables.

El valor del pH dependerá de la actividad del ión  $H^+$  a una determinada temperatura, razón por la cual este parámetro dependerá directamente de la temperatura (Gómez y Hontoria, 2003).

Para medir este parámetro de manera exacta utilizamos un pH-metro de la casa comercial Crison modelo GLP91 (Crison instruments S.A., Barcelona, España), basado en una determinación potenciométrica. El pH-metro consta de un electrodo de membrana de vidrio y un electrodo de referencia conectados a un potenciómetro, y de un compensador de temperatura, que ajusta el valor de ésta a 25°C.

### II.2.3.4. Conductividad

La conductividad nos indica el grado de mineralización de un agua. Determina la capacidad del agua para conducir la corriente eléctrica y su valor depende de la concentración y tipos de iones presentes en el agua, así como de la temperatura (Gómez y Hontoria, 2003).

La conductividad se midió en el influente diariamente con el fin de comprobar que la conductividad del agua de entrada era la calculada teóricamente al añadir el NaCl, con un conductímetro con compensación de temperatura de la marca Crison (Crison instruments S.A., Barcelona, España). La medida se realiza mediante un proceso electrométrico, con una sensibilidad de hasta 1  $\mu S/cm$ .

### II.2.3.5. Sólidos en suspensión totales (SST)

Los sólidos en suspensión totales son partículas que comprenden principalmente arena, arcilla, otros minerales, organismos microscópicos, etc... (Fifield y Haines, 2000). Tales partículas varían de tamaño desde aproximadamente 10 nm hasta 0,1 mm de diámetro, aunque normalmente se considera que la materia en suspensión es aquella que

no pasa a través de un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro (Vanous *et al.*, 1982; Fabuss y Fabuss, 1974).

Para la determinación del contenido de sólidos en suspensión totales del agua de entrada y del agua de salida de nuestra planta piloto seguimos el protocolo descrito por Gómez y Hontoria (2003), basado en un método gravimétrico. Para ello utilizamos un sistema de filtración.

En el sistema de filtración colocamos un filtro de fibra de vidrio de 0,45 µm previamente pesado y haciéndose pasar, con ayuda de una bomba de vacío, un volumen determinado, 25 mL. A continuación quitamos el filtro del sistema y se introduce en una estufa a 105°C durante 1 hora. Se deja enfriar en un desecador y se pesa.

Para calcular los sólidos en suspensión totales empleamos la siguiente expresión:

$$SST(\text{mg/L}) = \frac{P_1 - P_i}{V}$$

siendo:

$P_1$  el peso del filtro después de la desecación a 105°C.

$P_i$  el peso inicial del filtro.

$V$  el volumen de agua residual filtrado.

### II.2.3.6. Sólidos en suspensión volátiles (SSV)

En los tipos de sólidos que podemos encontrar en el agua residual cabe distinguir una fracción volátil (después de una incineración a 550°C), que está relacionada con la materia orgánica, y una fracción mineral, que se relaciona con los compuestos inorgánicos (Philbert, 1982).



La determinación de la fracción volátil se basó en la pérdida de peso de la muestra de sólidos tras su incineración. Al someterlo a altas temperaturas, se consigue la volatilización de los compuestos orgánicos pasando a CO<sub>2</sub>, mientras que la materia inorgánica se mantiene en el filtro (Gómez y Hontoria, 2003).

Para calcular los SSV utilizamos los filtros obtenidos en la determinación de los SST (P<sub>1</sub>) y los incineramos en un horno mufla a 550°C durante 20 minutos. Se deja enfriar, primero en el horno y después en un desecador, y se pesa (P<sub>2</sub>). Por diferencia de pesada obtenemos los SSV.

$$\text{SSV (mg/L)} = \frac{P_1 - P_2}{V}$$

siendo:

P<sub>1</sub> el peso del filtro después de la desecación a 105°C.

P<sub>2</sub> el peso del filtro después de la incineración a 505°C.

V el volumen de agua residual filtrado.

### II.2.3.7. Determinación de nitrato, nitrito y amonio

Para la determinación de los aniones, nitrato y nitrito, y del catión amonio se han propuesto numerosos métodos, basados en técnicas muy distintas. Entre estas técnicas se encuentra la cromatografía iónica o de intercambio iónico (Fabuss y Fabuss, 1974), que fue la empleada para conocer la concentración de estos iones.

El término cromatografía se utiliza generalmente para una amplia gama de separaciones fisicoquímicas, donde los componentes de una muestra son separados mediante una fase móvil que pasa a través de una columna de separación. Para la separación de iones se utiliza una fase móvil líquida que arrastra la muestra a una columna de intercambio iónico compuesta por una resina, donde los distintos iones saldrán de la

columna a distintos tiempos de retención debido a la interacción existente entre las cargas de la resina y los iones presentes en las muestras. A la salida de la columna es medida la conductividad en continuo, saliendo cada ión que se quiere determinar a un tiempo de residencia característico. Además, se cuantifica la cantidad de ese ión mediante el área de conductividad que existe a la salida con respecto al eluyente.

En nuestro caso, se utilizó un cromatógrafo iónico de la casa METHROM IC Net® (Dionex® DX-300; Dionex Corporation, Sunnyvale, USA), con detector de conductividad iónica (figura II.7).



**Figura II.7. Fotografía del cromatógrafo iónico Methrom IC Net®.**

El equipo se calibró para la determinación de nitritos, nitratos, amonio. Esta calibración se realizó introduciendo tres concentraciones conocidas de cada uno de los cationes y aniones (tabla II.2).

**Tabla II.2. Patrones utilizados para calibrar el cromatógrafo.**

Aniones y Cationes	1, ppm	2, ppm	3, ppm
Nitrito	10	1	0.1
Nitrato	200	20	2
Amonio	100	20	2

Las muestras, previa entrada a las columnas de cromatografía, fueron filtradas mediante filtros de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  (HAWP; Millipore Massachusetts, USA). Para la separación de los aniones, nitrato y nitrito, el agua residual se introdujo en la fase móvil, utilizándose como eluyente una solución de carbonato/bicarbonato. La fase móvil se hizo pasar a través una columna Metrosep ASUPP5 (fase estacionaria), empleándose ácido sulfúrico como regenerante.

Para la determinación del catión amonio el procedimiento fue similar al empleado para los aniones, utilizándose la columna Metrosep CO2150 con ácido tartárico/dipicolínico como eluyente.

---

#### **Solución de carbonato/bicarbonato**

3,2 mM Carbonato sódico

1 mM Bicarbonato sódica

50 mM supresor químico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

#### **Solución ácido tartárico/dipicolínico**

4 mM Ácido dipicolínico

0,75 mM Ácido tartárico

#### **II.2.4. Análisis estadístico**

Los datos experimentales obtenidos en los 4 experimentos se sometieron a tratamiento estadístico, empleando los programas Statgraphics plus v. 5.0 (Statistical Graphics, Corp.), Statistica (StatSoft, Inc.).

El tratamiento consistió en :

Statgraphics plus y Statistica:

- Análisis de la varianza (ANOVA) de una vía.
- Test de mínimas diferencias significativas (MDS) entre medias y test de rango múltiple (t de Student).
- Análisis de correlación de Pearson.

## **II.3. RESULTADOS**

### **II.3.1. Caracterización fisicoquímica del sistema de filtro sumergido**

#### **II.3.1.1. Demanda biológica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>)**

La DBO<sub>5</sub> se determinó diariamente tanto en el influente como en el efluente del SFBBR. Los valores de DBO<sub>5</sub> obtenidos en los 4 experimentos se muestran en la figura II.8. A pesar de que en el agua de entrada no se observa una uniformidad en los valores de este parámetro, no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en los valores de DBO<sub>5</sub> en el influente entre los 4 experimentos.

Los valores de DBO<sub>5</sub> en el agua de salida fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) en los distintos experimentos. En el experimento 1, los valores de DBO<sub>5</sub> obtenidos en el efluente fueron conformes a los límites de vertido establecidos por la Directiva 91/271/CEE, la cual establece el límite en 25 mg/L. A medida que se incrementa la salinidad en el influente (experimentos 2, 3 y 4), el SFBBR pierde capacidad de eliminación de materia orgánica biodegradable, no cumpliendo los límites de vertido exigibles por la legislación actual.



Figura II.8. Concentración de DBO<sub>5</sub> (mg O<sub>2</sub>/L) en el influente y en el efluente en los 4 experimentos.

Tabla II.3. Análisis estadístico de la DBO<sub>5</sub> en el influente y en el efluente en el SFBBR en los 4 experimentos.

Experimento	DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /L) influente	DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /L) efluente
1	425 ± 97,83 <sup>a</sup>	17 ± 6,51 <sup>a</sup>
2	418 ± 72,46 <sup>a</sup>	163 ± 42,22 <sup>b</sup>
3	370 ± 78,04 <sup>a</sup>	247,33 ± 75,42 <sup>c</sup>
4	416 ± 65,05 <sup>a</sup>	358,66 ± 65,26 <sup>d</sup>
MDS	57,34	23,87

### II.3.1.2. Demanda química de oxígeno (DQO)

Para poder establecer el efecto de la salinidad en la eliminación de la materia orgánica en el SFBBR se determinó la DQO tanto en el influente como en el efluente diariamente, a las diferentes concentraciones de NaCl estudiadas. La figura II.9 muestra los resultados obtenidos en la determinación de este parámetro.

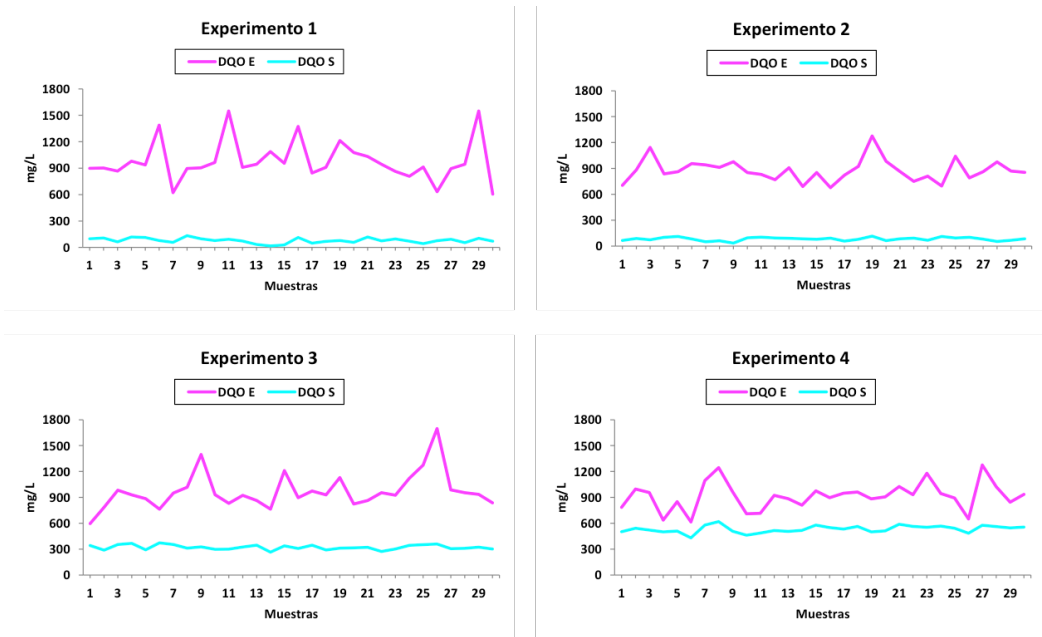


Figura II.9. Concentración de DQO (mg O<sub>2</sub>/L) en el influente y en el efluente en los 4 experimentos.

Tabla II.4. Análisis estadístico de la DQO en el influente y en el efluente en el SFBBR en los 4 experimentos.

Experimento	DQO (mg O <sub>2</sub> /L) influente	DQO (mg O <sub>2</sub> /L) efluente
1	980,26 ± 233,05 <sup>a</sup>	78,47 ± 28,64 <sup>a</sup>
2	877,13 ± 129,82 <sup>a</sup>	89,50 ± 19,59 <sup>a</sup>
3	971,17 ± 209,74 <sup>a</sup>	312,76 ± 34,21 <sup>b</sup>
4	915,37 ± 160,25 <sup>a</sup>	553,14 ± 54,04 <sup>c</sup>
MDS	135,48	48,12

En el influente, los valores de DQO no presentaron diferencias significativas entre los 4 experimentos, lo que nos sugiere que la salinidad no afectó a la DQO de entrada en el biorreactor. Sin embargo, los valores experimentales de DQO obtenidos en el agua de salida ponen de manifiesto el funcionamiento eficiente de la planta en la eliminación de materia orgánica a bajas concentraciones salinas, en los experimentos 1 y 2, siendo dichos valores

acordes con los requerimientos exigibles (125 mg O<sub>2</sub>/L) mediante la normativa actual (Directiva 91/271/CEE). A partir del experimento 3, el SFBBR pierde capacidad de eliminación de materia orgánica, no cumpliendo con la directiva actual. En los resultados obtenidos en el experimento 4 esta tendencia es aun más evidente, siendo por tanto observable que los valores en salinidad del agua residual de 24,1 g/L y 44,1 g/L, determinan claramente un efecto negativo en la eliminación de materia orgánica en el biorreactor de filtro sumergido.

### II.3.1.3. pH

La medida del pH se realizó diariamente tanto en el agua de entrada como en la de salida del SFBBR. La figura II.10 muestra los datos de pH obtenidos en los 4 experimentos.

Durante el experimento 1 el pH varió entre 6,92 y 7,81; en el experimento 2 los valores obtenidos variaron entre 7 y 8,65; en el experimento 3, el pH osciló entre 7 y 8,08 y durante el experimento 4 los valores fueron desde 6,81 hasta 7,97.

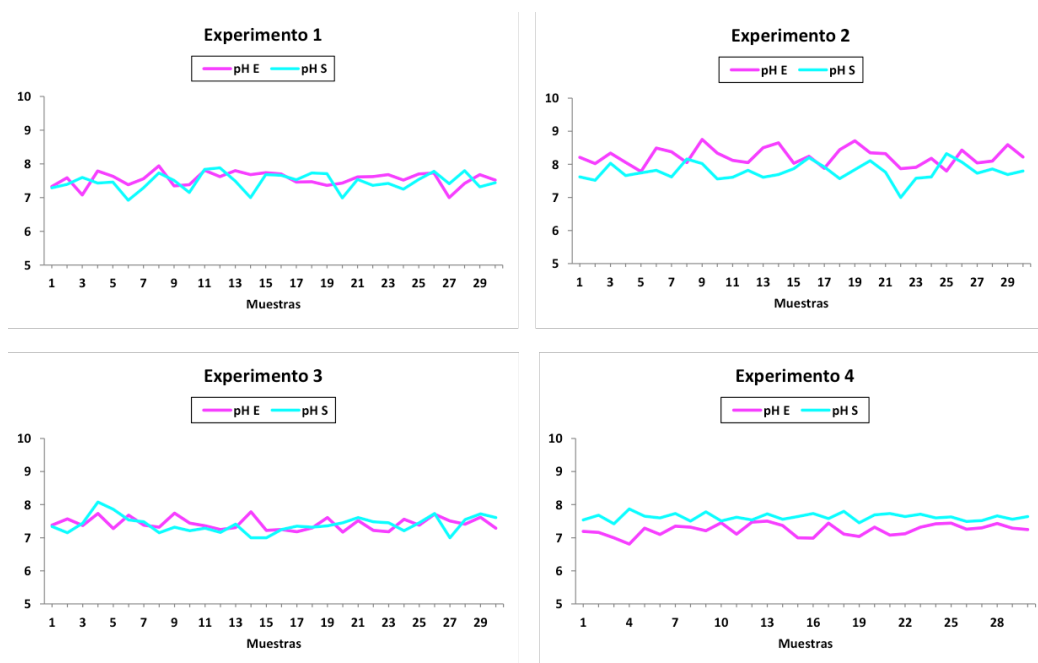


Figura II.10. Medida de pH en el influente y en el efluente durante los 4 experimentos.

Tabla II.5. Análisis estadístico del pH en el influente y en el efluente en el SFBBR en los 4 experimentos.

Experimento	pH influente	pH efluente
1	7,55 ± 0,21 <sup>c</sup>	7,46 ± 0,26 <sup>a</sup>
2	8,20 ± 0,28 <sup>d</sup>	7,78 ± 0,31 <sup>c</sup>
3	7,42 ± 0,18 <sup>b</sup>	7,39 ± 0,27 <sup>a</sup>
4	7,23 ± 0,17 <sup>a</sup>	7,62 ± 0,11 <sup>b</sup>
MDS	0,11	0,12

### II.3.1.4. Sólidos en suspensión totales (SST)

Como podemos observar en la figura II.11, los SST en el influente presentan gran variedad en cuanto a concentración. Sin embargo, esta variabilidad se mantuvo durante los 4 experimentos, no existiendo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el valor de los SST entre los 4 experimentos, lo que indicó que la salinidad no afecto a este parámetro.



Figura II.11. Concentración de SST (mg/L) en el influente y en el efluente en los 4 experimentos.



Tabla II.6. Análisis estadístico de los sólidos en suspensión totales en el influente y en el efluente en el SFBBR en los 4 experimentos.

Experimento	SST (mg/L) influente	SST (mg/L) efluente
1	622,43 ± 398,95 <sup>a</sup>	19,48 ± 7,61 <sup>ab</sup>
2	746,00 ± 207,54 <sup>a</sup>	24,31 ± 8,62 <sup>c</sup>
3	467,00 ± 423,31 <sup>a</sup>	16,05 ± 4,83 <sup>a</sup>
4	661,00 ± 298,43 <sup>a</sup>	22,54 ± 7,96 <sup>bc</sup>
MDS	139,67	4,05

El SFBBR consiguió reducir significativamente los SST en el efluente en todos los experimentos, obteniéndose valores adecuados a los exigidos por la legislación vigente, menos de 35 mg/L.

### II.3.1.5. Sólidos en suspensión volátiles (SSV)

Al igual que el resto de los parámetros fisicoquímicos, los SSV se determinaron diariamente en el agua de entrada y en el agua de salida del sistema. En la figura II.12 podemos observar los resultados obtenidos en la determinación de los SSV.

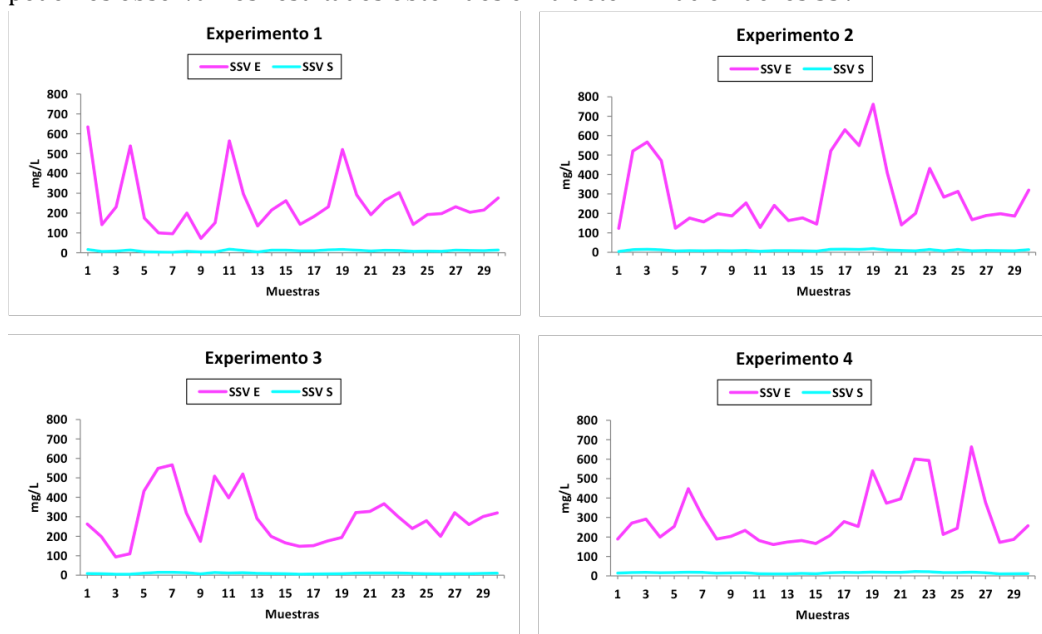


Figura II.12. Concentración de SSV (mg/L) en el influente y en el efluente en los 4 experimentos.

**Tabla II.7. Análisis estadístico de los sólidos en suspensión volátiles en el influente y en el efluente en el SFBBR en los 4 experimentos.**

Experimento	SSV (mg/L) influente	SSV (mg/L) efluente
1	520,48 ± 153,24 <sup>a</sup>	13,10 ± 6,14 <sup>ab</sup>
2	640,71 ± 165,12 <sup>a</sup>	14,62 ± 5,84 <sup>ab</sup>
3	370,32 ± 83,65 <sup>a</sup>	10,91 ± 4,58 <sup>a</sup>
4	541,65 ± 94,03 <sup>a</sup>	16,53 ± 6,32 <sup>b</sup>
MDS	65,79	3,86

Los SSV presentaron un comportamiento similar a los SST. No se observaron diferencias significativas en los SSV en el influente entre los 4 experimentos ( $p > 0,05$ ). A pesar de las diferentes concentraciones de sal (NaCl) en los experimentos, el sistema eliminó de forma efectiva los SSV.

### II.3.2. Efecto de la salinidad en la nitrificación

Para conocer el efecto de las distintas concentraciones de sal en el proceso de nitrificación, mediante el cromatógrafo iónico de aniones y cationes Metrohm IC Net® se obtuvieron las concentraciones (mg/L) de los aniones nitratos y nitritos, y del catión amonio, del agua de entrada y salida del sistema de filtro sumergido en los 4 experimentos. (figuras II.13, II.14 y II.15).

Como podemos observar en las figuras II.13, II.14 y II.15, en el sistema de filtro sumergido durante los experimentos 1 y 2, el amonio es transformado en nitrito y posteriormente en nitrato. Así podemos observar como en el efluente aumenta la concentración de nitrato y disminuye la de amonio.

La nitrificación pone de manifiesto que en estos 2 experimentos, en el efluente disminuya considerablemente la concentración de amonio, el cual se ha transformado en nitrito, pero el nitrito no aumenta (figura II.14) porque es transformado a nitrato, el cual se acumula (figura II.15). Este proceso se lleva a cabo en condiciones aerobias.

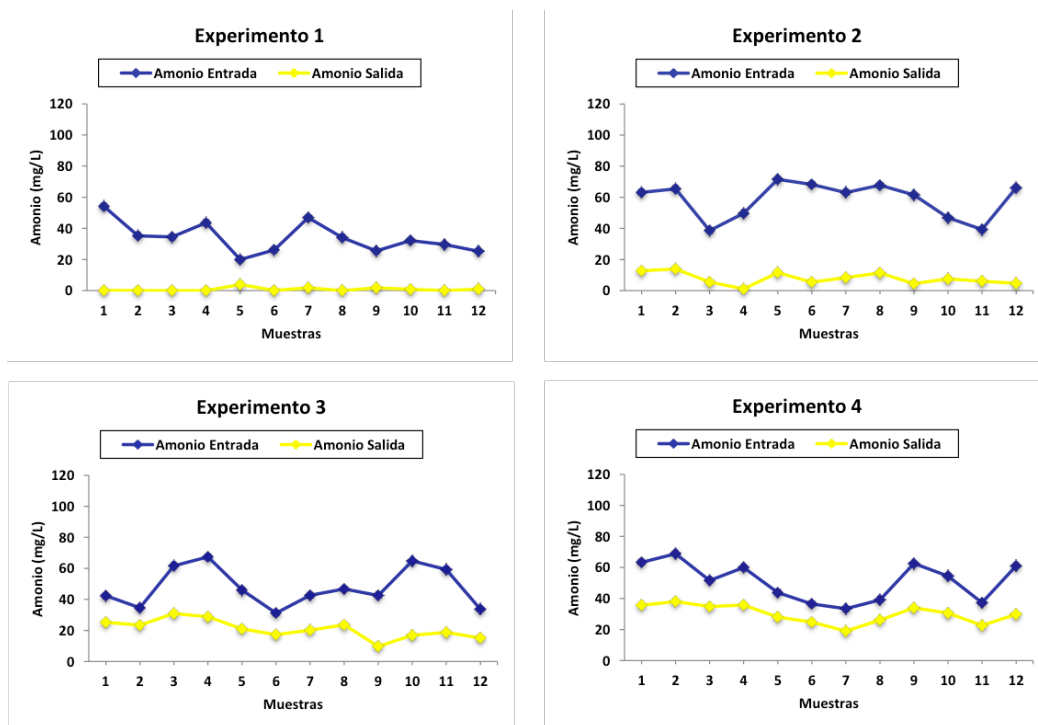


Figura II.13. Evolución de la concentración de amonio (mg/L) en el influente y en el efluente en los 4 experimentos.

Tabla II.8. Análisis estadístico de la concentración de amonio en el influente y en el efluente en el SFBBR en los 4 experimentos.

Experimento	Amonio (mg/L) influente	Amonio (mg/L) efluente
1	33,90 ± 9,97 <sup>a</sup>	0,80 ± 1,21 <sup>a</sup>
2	58,45 ± 11,63 <sup>b</sup>	7,73 ± 3,93 <sup>b</sup>
3	47,74 ± 12,56 <sup>c</sup>	20,90 ± 5,93 <sup>c</sup>
4	51,00 ± 12,42 <sup>bc</sup>	29,94 ± 5,97 <sup>d</sup>
MDS	9,62	3,85

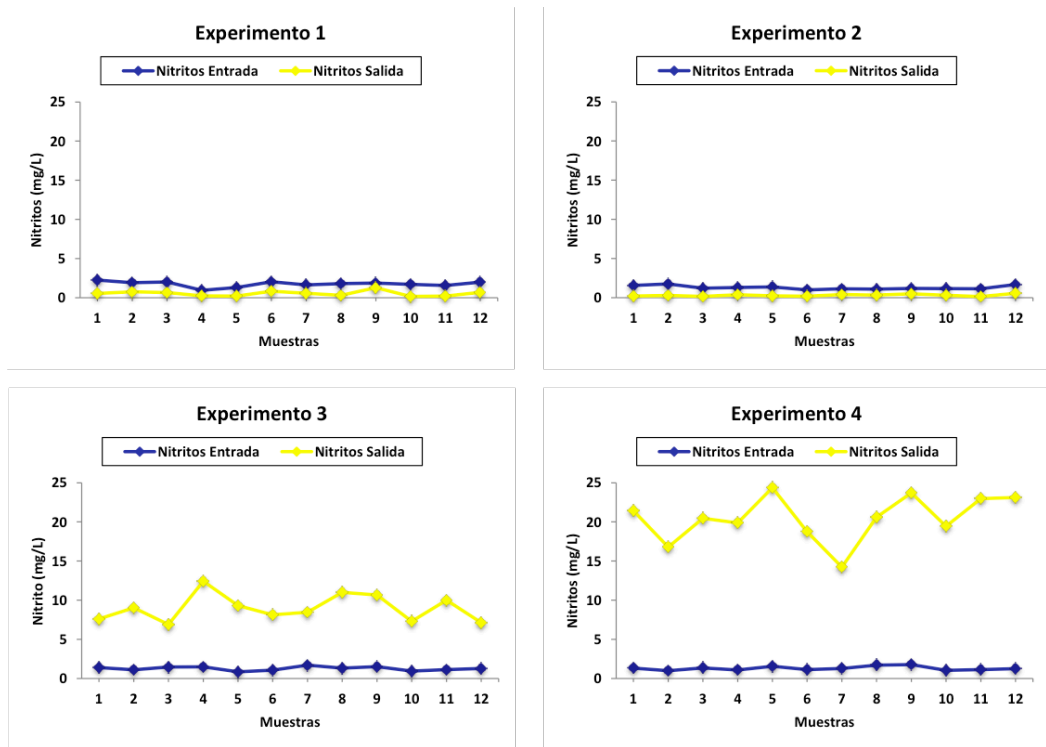


Figura II.14. Evolución de la concentración de nitrito (mg/L) en el influente y en el efluente en los 4 experimentos.

Tabla II.9. Análisis estadístico de la concentración de nitritos en el influente y en el efluente en el SFBBR en los 4 experimentos.

Experimento	Nitritos (mg/L) influente	Nitritos (mg/L) efluente
1	1,74 ± 0,36 <sup>b</sup>	0,53 ± 0,33 <sup>a</sup>
2	1,29 ± 0,24 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,13 <sup>a</sup>
3	1,26 ± 0,25 <sup>b</sup>	8,99 ± 1,74 <sup>b</sup>
4	1,29 ± 0,26 <sup>b</sup>	20,48 ± 2,65 <sup>c</sup>
MDS	0,23	1,42

A partir del experimento 3 se produce una disminución en la nitrificación, disminuyendo la concentración de nitrato en el efluente, acumulándose nitrito y reduciéndose la eliminación de amoníaco.

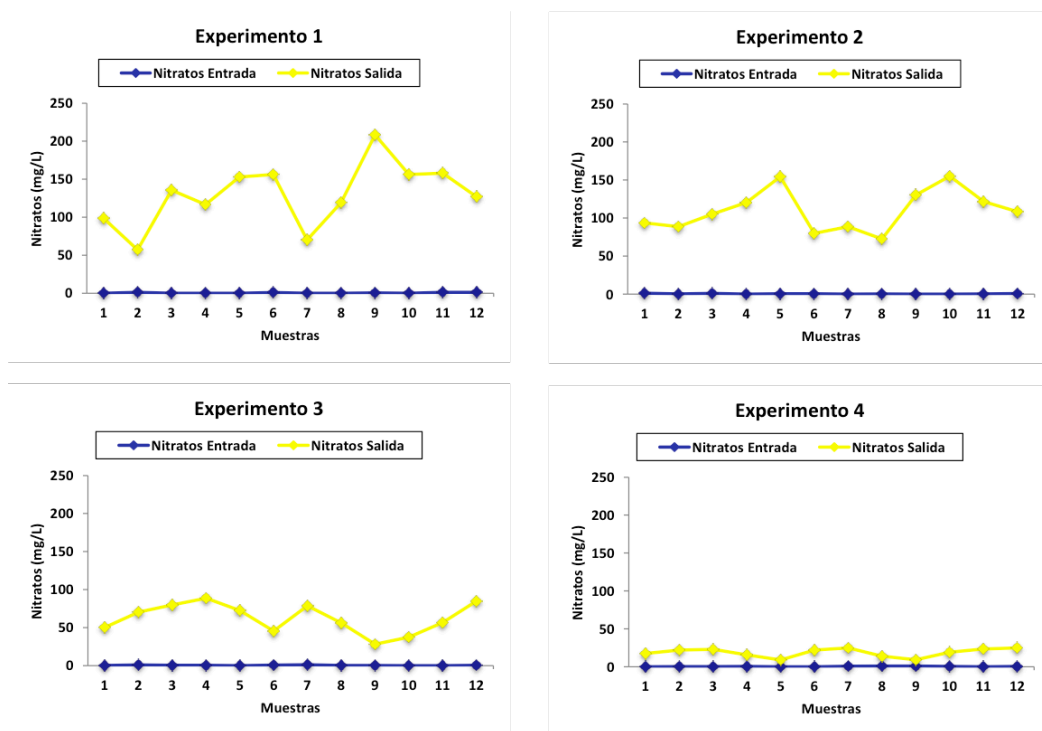


Figura II.15. Evolución de la concentración de nitrato (mg/L) en el influente y en el efluente en los 4 experimentos.

Tabla II.10. Análisis estadístico de la concentración de nitratos en el influente y en el efluente en el SFBBR en los 4 experimentos.

Experimento	Nitratos (mg/L) influente	Nitratos (mg/L) efluente
1	0,37 ± 0,52 <sup>a</sup>	129,57 ± 41,62 <sup>d</sup>
2	0,31 ± 0,37 <sup>a</sup>	100,74 ± 33,24 <sup>c</sup>
3	0,35 ± 0,36 <sup>a</sup>	55,58 ± 25,44 <sup>b</sup>
4	0,31 ± 0,33 <sup>a</sup>	19,20 ± 5,87 <sup>a</sup>
MDS	0,33	24,40

## II.4. DISCUSIÓN

Las aguas residuales altamente salinas son a menudo peor biodegradadas en las plantas convencionales de tratamiento de aguas residuales, debido a los efectos tóxicos de su contenido en sodio en la biomasa, que no ha sido previamente adaptada a las

condiciones salinas (Ludzack y Noran, 1965). Las altas concentraciones de sal pueden provocar plasmólisis celular debido al aumento de la presión osmótica y los cambios en el metabolismo microbiano (Bassin *et al.*, 2011; Vyrides y Stuckey, 2009).

En este estudio, durante el experimento 1, los resultados obtenidos mostraron la capacidad del sistema (SFBBR) para eliminar materia orgánica bajo las condiciones establecidas de trabajo. El sistema cumplió con la legislación vigente, obteniéndose un efluente con una DQO < 125 mg O<sub>2</sub>/L y una DBO<sub>5</sub> < 25 mg O<sub>2</sub>/L (nivel de tratamiento propuesto por la Directiva 91/271/CEE). Por otro lado, el sistema permaneció estable frente a las variaciones en la concentración de materia orgánica del influente incluso cuando las variaciones de estas fueron muy pronunciadas, obteniéndose un efluente muy homogéneo en la concentración de este parámetro. Los resultados obtenidos concuerdan con los previamente observados por Gálvez (2001) y por Gómez-Villalba (2003) en estudios realizados con este mismo tipo de sistemas, aunque en estos casos el relleno utilizado fue material cerámico.

Los resultados obtenidos indicaron que las diferentes concentraciones de sal en el agua residual urbana no tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre los parámetros fisicoquímicos analizados en el influente. Sin embargo, los datos muestran que la biotransformación de materia orgánica, expresada como DBO<sub>5</sub>, en el biorreactor se reduce cuando la salinidad aumentó en el influente. La DBO<sub>5</sub> no cumplió con la legislación vigente a partir del segundo experimento (3,7 g/L NaCl). Estudios anteriores sobre el tratamiento de aguas residuales salinas, mostraron resultados análogos a los obtenidos en este estudio, en los que la salinidad disminuye la eliminación de DBO<sub>5</sub> en sistemas de fangos activos (Kargi y Dincer, 1998; Dalmacija *et al.*, 1996; Woolard e Irvine, 1995).

La DQO en el agua tratada también disminuyó cuando la concentración de sal en el influente aumento considerablemente (> 24,1 g/L de NaCl) obteniéndose valores de DQO que no cumplían con la legislación vigente. Un resultado análogo fue observado por Kargi y Uygur (1996) en un filtro percolador y en un contactor biológico rotatorio, en condiciones aerobias. La eficiencia de la eliminación de DQO disminuyó significativamente con un aumento en el contenido de sal >20 g/L.

En el tratamiento de aguas residuales, hay estudios con resultados contradictorios sobre la influencia de la sal en los procesos biológicos. Algunos informes han indicado

efectos claramente adversos de altos niveles de salinidad, o choques de NaCl, sobre la eliminación de materia orgánica (Kargi y Uygur, 1996; Burnett, 1974). Otros estudios, como los realizados por Hamosa y Al-Attar (1995) en fangos activos con agua residual sintética, han puesto de manifiesto que la presencia de altas concentraciones de sal en aguas residuales no inhibió la actividad biológica, y por lo tanto la biotransformación de la materia orgánica no se vio afectada. Esto sugiere que la aclimatación de la biomasa y el nivel de sal, son factores importantes que pueden explicar estos diferentes resultados, así como la naturaleza del agua residual.

La eutrofización de las aguas, causada por concentraciones elevadas de nitrógeno y fósforo, esta considerada como una de las más amenazantes formas de contaminación de lagos, estuarios y aguas costeras, aunque el entorno marino por su gran capacidad de dilución, le pone freno a su desarrollo. Es por ello que la eliminación biológica de nitrógeno y fósforo en las aguas residuales, es fundamental (Ramos *et al.*, 2007). La nitrificación, oxidación de amonio a nitrato vía nitrito, es un proceso clave en el ciclo del nitrógeno y juega un papel importante en los procesos biológicos de eliminación de nitrógeno (Aslan y Simsek, 2012; Bassin *et al.*, 2012; Ye y Zhang, 2010). La nitrificación es susceptible a la inhibición por la sal, que ha sido considerada un factor de inestabilidad en muchas plantas de tratamiento de aguas residuales (Aslan y Simsek, 2012; Bassin *et al.*, 2012; Moussa *et al.* 2006). Comúnmente, se considera como el paso limitante del proceso global de tratamiento de aguas residuales debido a la baja tasa de crecimiento de los organismos involucrados.

Diversos autores han puesto de manifiesto que para superar la inhibición provocada por los compuestos orgánicos y el efecto perjudicial de sales en la nitrificación de las aguas residuales industriales un enfoque interesante es la utilización de reactores de biopelícula, que permiten retener los microorganismos de crecimiento lento, favoreciendo la adaptación gradual a las condiciones estresantes (Vendramel *et al.*, 2010; Ferrai *et al.*, 2009; Artiga *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2008).

Los resultados sobre el proceso de nitrificación obtenidos en el presente estudio están en concordancia con muchas de las investigaciones precedentes realizadas sobre como influye la salinidad en dicho proceso (Aslan y Simsek, 2012; Bassin *et al.*, 2012; Bassin *et al.*, 2011; Vendramel *et al.*, 2011; Moussa *et al.*, 2006; Uygur y Kargi, 2004). Durante los experimentos 1 y 2 el proceso de nitrificación no presento diferencias

significativas, por lo que una concentración menor de 5 g/L de NaCl no afectó a la eliminación de amonio del sistema. Uygur y Kargi (2004) y Bassin *et al.* (Bassin *et al.*, 2012; Bassin *et al.*, 2011) también observaron que la tasa de eliminación del amonio no se vio afectada significativamente por el contenido de sal cuando su concentración fue inferior a 10 g/L de NaCl. Sin embargo, Aslan y Simsek (2012) comprobaron en un filtro sumergido que concentraciones de NaCl inferiores al 1%, no solo no ejercían un efecto negativo sobre el proceso sino que favorecían el proceso de nitrificación.

A partir del experimento 3 se observó una disminución en el proceso de nitrificación, comprobándose que cuando las concentraciones de sal (NaCl) en el influente fueron elevadas (>24,1 g NaCl/L) se acumuló nitrito en el sistema, lo que sugiere que las bacterias oxidadoras de nitrito (NOB) se vieron más afectadas por la salinidad que las bacterias oxidadoras de amonio (AOB), por lo tanto las bacterias oxidadoras de nitrito son más sensibles a la salinidad que las bacterias oxidadoras de amonio.

Resultados análogos fueron obtenidos por diversos autores (Aslan y Simsek, 2012; Moussa *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2003; Dincer y Kargi, 2001). Además la acumulación de nitrito y amonio puede tener un efecto inhibitorio sobre el proceso de nitrificación (Sudarno *et al.*, 2011). Una considerable disminución de la velocidad de oxidación del amoníaco con el aumento de sal también fue observado por Moussa *et al.* (2006) y Bassin *et al.* (Bassin *et al.* 2012; Bassin *et al.*, 2011). La salinidad se sabe que afecta a la actividad metabólica de las bacterias nitrificantes, reduciendo el crecimiento microbiano y las tasas de oxidación de amonio (Moussa *et al.* 2006).



## II.5. BIBLIOGRAFÍA

**Almstrand, R., Lydmark, P., Lindgren, P.E., Sörensson, F., Hermansson, M.,** 2012. Dynamics of specific ammonia-oxidizing bacterial populations and nitrification in response to controlled shifts of ammonium concentrations in wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology* online.

**Artiga, P., García-Toriello, G., Méndez, R., Garrido, J.M.,** 2008. Use of a hybrid membrane bioreactor for the treatment of saline wastewater from a fish canning factory. *Desalination* 221: 518-525.

**Aslan, S., Simsek, E.,** 2012. Influence of salinity on partial nitrification in a submerged biofilter. *Bioresource Technology* 118: 24-29.

**Bassin, J.P., Dezotti, M., Sant'Anna, G.L.Jr.,** 2011. Nitrification of industrial and domestic saline wastewaters in moving bed biofilm reactor and sequencing batch reactor. *Journal of Hazardous Materials* 185: 242-248.

**Bassin, J.P., Kleerebezem, R., Muyzer, G., Rosado, A.S., Van Loosdrecht, M.C.M., Dezotti, M.,** 2012. Effect of different salt adaptation strategies on the microbial diversity, activity, and settling of nitrifying sludge in sequencing batch reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93: 1281-1294.

**Burnett, W.E.,** 1974. The effect of salinity variations on the activated sludge process. *Water and Sewage Works* 37-55.

**Castillo, P., Bezanilla, J., Amieva, J., Jácome, A., Tejero, I.,** 1995. Depuración de agua residual con salinidad variable empleando un proceso de Biodiscos (RBC). *Ingeniería del agua* 2: 25-30.

**Catalan, M.A.B., Wang, P.C., Matsumura, M.,** 1997. Nitrification performance of marine nitrifiers immobilized in polyester and macroporous cellulose carriers. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84: 563-571.

**Chen, G.H., Wong, M.T., Okabe, S., Watanabe, Y.,** 2003. Dynamic response of nitrifying activated sludge batch culture to increased chloride concentration. *Water Research* 37: 3125-3135.

**Chen, G.H., Brdjanovic, D., Ekama, G.A., van Loosdrecht, M.C.M.,** 2010. Seawater as alternative water resource. In: 7th IWA Leading-edge Technology on Water and Wastewater conference (LET2010), June 2-4, 2010, Arizona, USA.

**Dalmacija, B., Karlovic, V., Tamas, Z., Miskovic, D.,** 1996. Purification of high salinity wastewater by activated sludge process. *Water Research* 30: 295-298.

**Dincer, A.R., Kargi, F.,** 2001. Performance of rotating biological disc system treating saline wastewater. *Process Biochemistry* 36: 901-906.

**Fabuss, M.A., Fabuss, B. M.,** 1974. Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis. Vol 19: New York: John Wiley & Sons.

**Ferrai, M., Guglielmi, G., Andreottola, G.,** 2010. Modelling respirometric tests for the assessment of kinetic and stoichiometric parameters on MBBR biofilm for municipal wastewater treatment. *Environmental Modelling and Software* 25: 626-632.

**Ferrer, J., Seco, A.,** 2007. Tratamientos biológicos de aguas residuales. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.

**Fifield, F.W., Haines, P.j.,** 2000. Environmental Analytical Chemistry. Second edition. Blackwell Scientific, Oxford ISBN 9780632053834.

**Gálvez, J.,** 2001. Eliminación de la materia orgánica y del Nitrógeno en el agua residual urbana mediante lechos inundados. Tesis doctoral, Departamento de Microbiología, Instituto del Agua, Universidad de Granada.

**Gómez, M.A., Hontoria, E.,** 2003. Técnicas analíticas en el control de la ingeniería ambiental. Editorial Plácidos Cuadros.

**Gómez-Villalba, B.,** 2003. Estudio de la microbiota de sistemas de lechos inundados para la depuración de aguas residuales urbanas. Tesis doctoral, Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

**Hamoda, M.F., Al-Attar, I.M.S.,** 1995. Effects of high sodium chloride concentrations on activated sludge treatment. *Water Science and Technology* 31: 61-72.

**Kargi, F., Dincer, A.R.,** 1996. Effect of salt concentration on biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation. *Enzyme and Microbial Technology* 19: 529-537.

**Kargi, F., Dincer, A.R.,** 1998. Saline wastewater treatment by halophile-supplemented activated sludge culture in an aerated rotating biodisc contactor. *Enzyme and Microbial Technology* 22: 427-433.

**Kargi, F., Dincer, A.R.,** 2000. Use of halophilic bacteria in biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation. *Water Environment Research* 72: 170-174.

**Kargi, F., Uygur, A.,** 1996. Biological treatment of saline wastewater in a rotating biodisc contactor by using halophilic organisms. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 17: 81-85.

**Kincannon, D.F., Gaudy, A.F.,** 1968. Response of biological waste treatment systems to changes in salt concentration. *Biotechnology and Bioengineering* 10: 483-496.

**Ludzack, f.J., Noran, D.K.,** 1965. Tolerance of high salinities by conventional wastewaters treatment processes. *Journal Water Pollution Control Federation* 37: 1404-1416.

**Mikucki, W.J., Poon, C.P.C.**, 1976. An evaluation of the bio-surf process for the treatment of saline-domestic wastewater. Proceedings of the 8th Annual Offshore Technology Conference. Houston, p. 293-298.

**Moussa, M.S., Sumanasekera, D.U., Irahim, S.H., Lubberding, H.J., Hooijmans, C.M., Gijzen, H.J., van Loosdrecht, M.C.M.**, 2006. Long term effects of salt on activity, population structure and floc characteristics in enriched bacterial cultures of nitrifiers. *Water Research* 40: 1377-1388.

**Nemerow, N.L.**, 1977. Aguas Residuales Industriales. Teorías, aplicaciones, tratamiento. H. Blume Ediciones. Madrid.

**Peng, Y.Z., Zhu, G.B., Wang, S.Y., Yu, D.S., Cui, Y.W., Meng, X.S.**, 2005. Pilot-scale studies on biological treatment of hypersaline wastewater at low temperatura. *Water Science and Technology* 52: 129-137.

**Philbert, F.J.**, 1982. Physical Parameters en Van Loon, J.C. (ed), Chemical Analysis of Inorganic Constituents of Water: Boca Ratón. CRC Press.

**Pillard, D.A., DuFresne, D.L., Tietge, J.E., Evans J.M.**, 1999. Response of mysid shrimp (*Mysidopsis bahia*), sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), and inland silverside minnow (*Menidia beryllina*) to changes in artificial seawater salinity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 430-435.

**Ramos, A.F., Gómez, M.A., Hontoria, E., González-López, J.**, 2007. Biological nitrogen and phenol removal from saline industrial wastewater by submerged fixed-film reactor. *Journal of Hazardous Materials* 142: 175-183.

**Rosa, M.F., Furtado, A.L., Albuquerque, R.T., Leite, S.G.F., Medronho, R.**, 1998. Biofilm development and ammonium removal in the nitrification of a saline wastewater. *Bioresource Technology* 65: 135-138.

**Seoáñez, M.**, 1999. Aguas residuales urbanas: tratamientos naturales de bajo costo y aprovechamiento. 2ª edición. Ediciones Mundi-Prensa.

**Sharrer, M.J., Tal, Y., Ferrier, D., Hankins, J.A., Summerfelt, S.T.**, 2007. Membrane biological reactor treatment of a saline backwash flow from a recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering* 36: 159-176.

**Soto, M., Méndez, R., Iema, J.M.**, 1990. Efluentes residuales en la industria de procesamiento de productos marinos. *Ingeniería Química* 203-209.

**Stover, E., Obayashi, A.W.**, 1991. High TDS wastewater treatability study—design considerations. *45th Purdue industrial waste conference proceedings* p. 281-286.

**Sudarno, U., Bathe, S., Winter, J., Gallert, C.**, 2010. Nitrification in fixed-bed reactors treating saline wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 2017-2030.

**Sudarno, U., Winter, J., Gallert, C.,** 2011. Effect of varying salinity, temperature, ammonia and nitrous acid concentrations on nitrification of saline wastewater in fixed-bed reactors. *Bioresource Technology* 102: 5665–5673.

**Urbain, V., Block, J.C., Manen, J.,** 1993. Bioflocculation of activated sludge: an analytical approach. *Water Research* 27: 829–838.

**Uygur, A., Kargi, F.,** 2004. Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a sequencing batch reactor. *Enzyme and Microbial Technology* 34: 313-318.

**Vanous, R.D., Larson, P.E., Hach, C.C.,** 1982. The Theory and Measurement of Turbidity and Residue en Minear, R.A. y Keith, L.H., Wather Analysis, Vol. 1. Inorganic Species, Part 1: New York: Academic Press.

**Van't Riet, K., Tramper, J.,** 1991. Basic Bioreactor Design, Marcel Dekker, New York.

**Vredenbregt, L.H.J., Nielsen, K., Potma, A.A., Kristensen, G.H.,** 1997. Fluid bed biological nitrification and denitrifacation in high salinity wastewater. *Water Science and Technology* 36: 93-100.

**Vendramel, S., Dezotti, M., Sant'Anna G.L.Jr.,** 2011. Nitrification of an industrial wastewater in a moving-bed biofilm reactor: effect of salt concentration. *Environmental Technology* 32: 837-846.

**Vyrides, I., Stuckey, D.C.,** 2009. Adaptation of anaerobic biomass to saline conditions: Role of compatible solutes and extracellular polysaccharides. *Enzyme and Microbial Technology* 44: 46-51.

**Wang, J., Shi, M., Lu, H., Wu, D., Shao, M.F., Zhang, T., Ekama, G.A., van Loosdrecht, M.C., Chen G.H.,** 2011. Microbial community of sulfate-reducing up-flow sludge bed in the SANI® process for saline sewage treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 2015-2025.

**Wong, J.M.,** 1992. Biotreatment of contaminated ground-water with high organics and salinity contents. In *Proceedings of 46th Annual Purdue Industrial Waste Conference* Lewis, Chelsea, MI.

**Woolard, C., Irvine, R.,** 1994. Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. *Water Environment Research* 66: 230-235.

**Wu, G., Guan, Y., Zhan, X.,** 2008. Effect of salinity on the activity, settling and microbial community of activated sludge in sequencing batch reactors treating synthetic saline wastewater. *Water Science and Technology* 58: 351-358.

**Xia, S., Li, J., Wang, R.,** 2008. Nitrogen removal performance and microbial community structure dynamics response to carbon nitrogen ratio in a compact suspended carrier biofilm reactor. *Ecological Engineering* 32: 256-262.

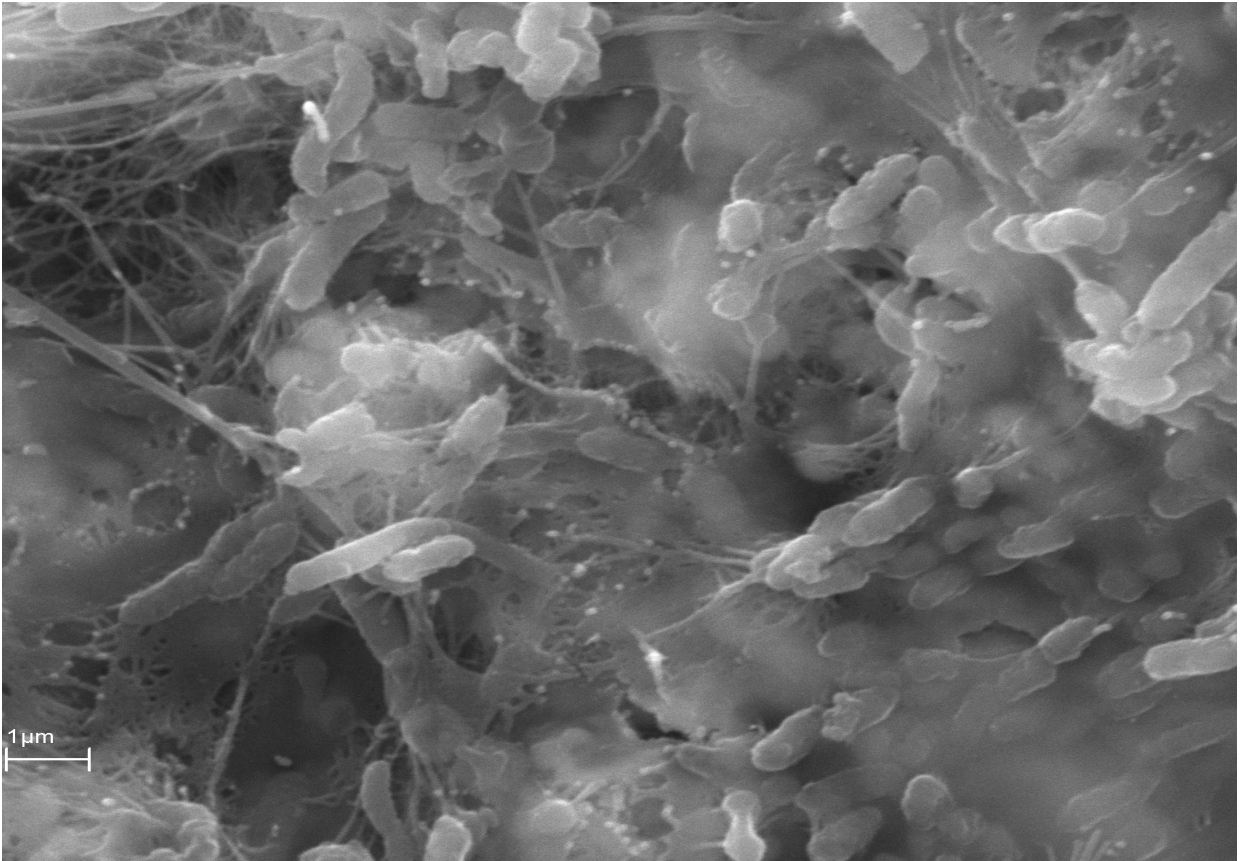
**Ye, L., Zhang, T.,** 2010. Estimation of nitrifier abundances in a partial nitrification reactor treating ammonium-rich saline wastewater using DGGE, T-RFLP and mathematical modeling. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88: 1403-1412.

**Yoshie, S., Noda, N., Tsuneda, S., Hirata, A., Inamori, Y.,** 2004. Design of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe and microbial community analysis in the denitrification process of a saline industrial wastewater treatment system. *FEMS Microbiology Letters* 235: 183-189.

**Xu, S., Hasselblad, S.,** 1996. A simple biological method to estimate the readily biodegradable organic matter in wastewater. *Water Resources* 30: 1023-1025.

### **Capítulo III**

## **Actividades enzimáticas como índice de actividad biológica en la depuración de aguas residuales urbanas con salinidad variable**



### III.1. INTRODUCCIÓN

#### III.1.1. Actividades enzimáticas en el tratamiento biológico de aguas residuales

La eliminación de materia orgánica por oxidación biológica (por ejemplo, en procesos de fangos activos) depende de la actividad de una comunidad mixta de organismos heterótrofos (Burgess y Pletschke, 2008; Nybroe *et al.*, 1992). Numerosos estudios han demostrado que los compuestos orgánicos macromoleculares deben ser enzimáticamente hidrolizados a subunidades pequeñas antes de que puedan ser captados y metabolizados por células microbianas (Li y Chróst, 2006; Watson *et al.*, 2004; Gessesse *et al.*, 2003). Por ello, para controlar estos procesos es indispensable reconocer los factores que regulan la actividad biológica de los microorganismos, disponiendo de métodos rápidos y efectivos para la determinación de la actividad microbiana en dichos sistemas.

Inicialmente, para determinar la actividad microbiana de los fangos activos se utilizaron métodos basados en la medida de los sólidos en suspensión totales (SST) o en la de los sólidos en suspensión volátiles (SSV), en el tanque de aireación; sin embargo, de esta forma se determina, únicamente, la cantidad total o la fracción volátil de células y de sólidos inertes presentes en el medio, nunca la actividad celular, ya que no se distingue entre células vivas y células muertas.

Numerosos investigadores han intentado cuantificar la biomasa activa utilizando métodos más específicos. En el caso de los sistemas aerobios, la eliminación de sustrato viene acompañada por la oxidación biológica del mismo, siendo el aceptor final de electrones el oxígeno disuelto (OD) en el medio. Por ello, la velocidad de asimilación de OD por los microorganismos ha sido utilizada por gran cantidad de investigadores como medida para la determinación de la actividad del fango activo (Spanjers y Olsson, 1992; Wong y Smith, 1992; Huang *et al.*, 1985).

Como el proceso de transferencia de electrones desde el sustrato al oxígeno resulta catalizado por unas enzimas, conocidas como deshidrogenasas, su actividad se puede emplear para determinar la del fango activo (Liwarska-Bizukojc y Ledakowicz, 2003). El proceso de oxidación biológica, catalizado por las deshidrogenasas, transcurre en el interior de las células, por lo que la materia orgánica debe estar en forma de moléculas sencillas que sean capaces de atravesar la pared celular.

La materia orgánica transportada por las aguas residuales urbanas es una compleja mezcla de hidratos de carbono simples, aminoácidos, alcoholes y ácidos grasos volátiles mezclados con los polímeros y heteropolímeros de proteínas, polisacáridos y lípidos (Raunkjaer *et al.*, 1994). Una gran parte de la materia orgánica de aguas residuales (30%-85%) se compone de partículas mayores de 0,1  $\mu\text{m}$  (Nabarlatz *et al.*, 2010; Levine *et al.*, 1985) lo que les impide ser directamente asimiladas por los microorganismos. En la mayoría de los casos, sólo los monómeros y oligómeros (<1000 Da de peso molecular) son capaces de atravesar la membrana bacteriana a través de transportadores activos específicos (Egli, 1995; Gottschalk, 1986) mientras que los compuestos de alto peso molecular serán hidrolizados por las enzimas extracelulares para que puedan ser asimilados por las células y usados como fuentes de energía y carbono.

La hidrólisis de dichos compuestos orgánicos complejos es el primer paso, en ocasiones limitante, en los procesos de tratamiento biológico de las aguas residuales, como lo demuestra el hecho de que estos compuestos se hidrolizan lentamente (Xie *et al.*, 2010; Anupama *et al.*, 2008; Sangave y Pandit, 2006; Eliosov y Argaman, 1995). Por tanto, las actividades enzimáticas encargadas de dicha hidrólisis (fosfatasas, glucosidasa, proteasa y esterasa) son algunas de las más importantes actividades que ocurren durante el tratamiento biológico del agua residual y dichas actividades nos dan una estimación de la biomasa activa (Molina-Muñoz *et al.*, 2010).

Las variaciones temporales de las tasas de hidrólisis se explican por dos factores principales: los cambios de la biomasa activa y el cambio de las poblaciones dominantes de bacterias en el reactor biológico en respuesta a los componentes de los lodos y aguas residuales y de las condiciones del medio ambiente (tales como la concentración de sustratos disponibles, aceptores de electrones, pH y temperatura) (Li y Chróst, 2006; Cadoret *et al.*, 2002; Boczar *et al.*, 2001; Nybroe *et al.*, 1992).

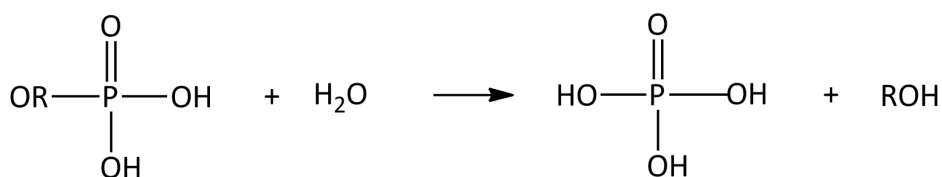
Por lo tanto, las variaciones de estas actividades enzimáticas son un excelente indicador de la fisiología de la mezcla de especies de la comunidad de los lodos (Calderon *et al.*, 2012). Por otra parte, también proporcionan una forma de evaluar el impacto de las variaciones en las condiciones de operación, tales como la concentración de SSV (Macomber *et al.*, 2005).



En los últimos años, ha habido un creciente interés en el estudio de las actividades enzimáticas en el tratamiento de aguas residuales (Calderon *et al.*, 2012; Li y Chróst, 2006; Kim *et al.*, 2002; Boczar *et al.*, 2001; Goel *et al.*, 1998). Se cree que el enfoque enzimático contribuirá de manera significativa al conocimiento de los factores bioquímicos, control de los tratamientos de aguas residuales y lodos, y puede ayudar en gran medida a la optimización del proceso de hidrólisis y de mineralización de los contaminantes orgánicos (Li y Chróst, 2006).

### III.1.2. Actividad enzimática fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina

La fosfatasa es un enzima hidrolítica extracelular que cataliza reacciones que conducen a la liberación de fosfato inorgánico a partir de ésteres de fosfato.



**Figura III.1. Ecuación general que describe la reacción catalizada por fosfatasas ácidas y alcalinas.**

Una gran proporción del fósforo total presente en el agua residual esta en forma orgánica. Por tanto, las enzimas hidrolíticas son esenciales para la eliminación eficiente de fósforo durante el tratamiento del agua residual (Xie *et al.*, 2010).

Las fosfatasas son producidas por bacterias, hongos y levaduras, y las enzimas difieren en su reacción sobre diferentes sustratos (Anupama *et al.*, 2008; Hollander, 1971). Son muchos los factores que afectan a la actividad y a las propiedades cinéticas de las fosfatasas, tales como iones metálicos (Huang y Shindo, 2000; Flint y Hopton, 1977), disponibilidad de N y P (Olander y Vitousek, 2000), la temperatura y el pH (Criquet *et al.*, 2004). Los diferentes tipos de fosfatasas, ácida y alcalina, presentan diferencias en cuanto al pH óptimo de catálisis y difieren en su reacción sobre diferentes sustratos (Goel *et al.*, 1998).

La fosfatasa existe como fosfomonoesterasa, alcalina y ácida (EC 3.1.3.1 y EC 3.1.3.2, respectivamente) y como fosfodiesterasas (EC 3.1.4), pero a menudo el término "fosfatasa" se usa como sinónimo de fosfomonoesterasa (Jansson *et al.*, 1988). Ambas fosfatasas, alcalina y ácida, se han encontrado en los ecosistemas acuáticos, el suelo y los lodos de depuración (Xie *et al.*, 2010; Anupama *et al.*, 2008).

Las especies químicas y sus concentraciones correspondientes, que pueden ser responsables de la actividad y las propiedades cinéticas de la fosfatasa, son importantes para la comprensión del ciclo del fósforo en el tratamiento de aguas residuales (Xie *et al.*, 2010).

### III.1.3. Actividad enzimática $\alpha$ -glucosidasa

Las glucosidasas son enzimas extracelulares que hidrolizan disacáridos procedentes de la degradación de polisacáridos. La  $\alpha$ -glucosidasa (EC 3.2.1.20) hidroliza sacarosa y maltosa, mientras que la  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21) hidroliza la celobiosa (Goel *et al.*, 1998).

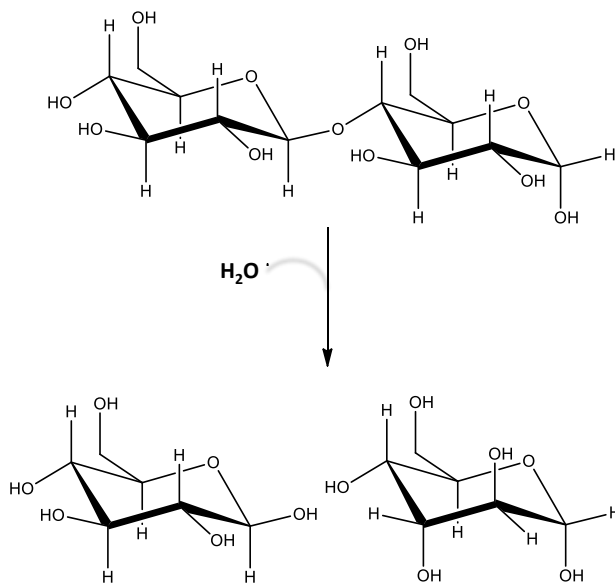
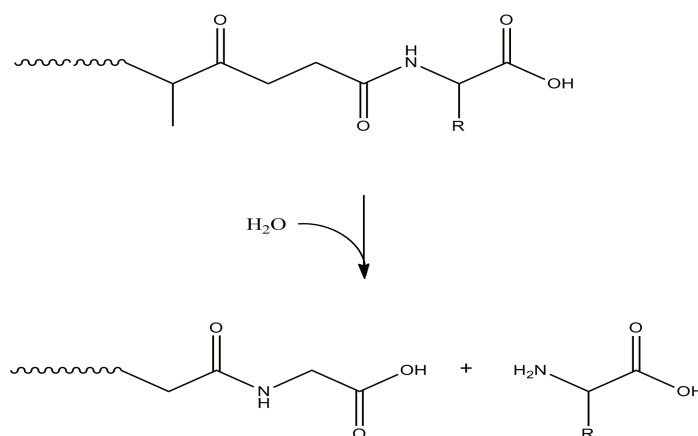


Figura III.2. Ecuación general que describe la reacción catalizada por  $\alpha$ -glucosidasa.

La presencia y actividad de las glucosidasas se ha demostrado en varios sistemas (Watson y Pletschke, 2006), incluyendo un reactor discontinuo de fagos activos (Goel *et al.*, 1998), en biofilms (Roth y Lemmer, 1994) y en flóculos completos y dispersos, mediante ultrasonidos, en fangos activos (Cadoret *et al.*, 2002), entre otros sistemas. Cadoret *et al.* (2002) informó que el 5% de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa se asoció a las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) de los flóculos.

#### II.1.4. Actividad enzimática proteasa

La degradación hidrolítica de las cadenas peptídicas que constituyen las proteínas transcurre según un proceso catalizado por las enzimas denominadas proteasas (EC 3.4), dando lugar a péptidos de diferente tamaño, según la siguiente reacción:



**Figura III.3. Ecuación general que describe la reacción catalizada por proteasas.**

Para determinar la actividad proteasa se utilizaron inicialmente métodos basados en la determinación del incremento de grupos amino libres, entre los que cabe destacar la reacción con ninhidrina (Moore y Stein, 1948), fluorescamina (Felix *et al.*, 1975), *o*-ftalaldehído (Medina Hernández *et al.*, 1991; García Álvarez-Coque *et al.*, 1989) o con el ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (Adler-Nissen, 1979; Snyder y Sobocinski, 1975). Con posterioridad, esta actividad fue determinada por un método que se basa en el cambio en la

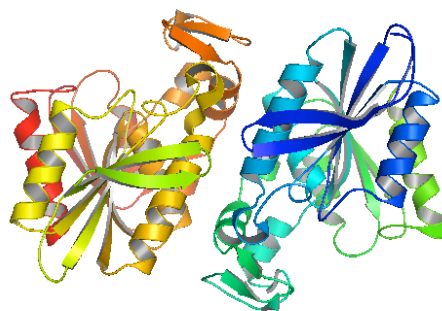
solubilidad de una proteína en ácido tricloroacético (TCA) cuando se somete a la acción de una enzima proteolítica. Como enzima proteolítica normalmente se utiliza caseína y cuando esta actúa sobre la proteína, el promedio de péptidos solubles producidos están en proporción a la cantidad de enzima y el tiempo de acción (Whitaker, 1994). Pueden utilizarse también derivados de proteínas, como azocaseína y azoalbúmina.

Con sustratos cromogénicos, la determinación de la actividad proteasa se basa en la solubilidad de péptidos coloreados de bajo peso molecular en un sobrenadante, después de la precipitación de fragmentos grandes de azocaseína (Sarath *et al.*, 1989). Este es el fundamento del método colorimétrico descrito por Goel *et al.* (1998), utilizando azocaseína al 0,5% para la determinación de la actividad proteasa en fangos activos.

### II.1.5. Actividad enzimática esterasa

Enzimas como las esterasas son muy ubicuas en el medio ambiente (Boczar *et al.*, 2001), han sido identificadas en todos los dominios de la vida (Bacteria, Archaea y EuKarya) y en algunos virus.

Las esterasas (EC 3.1.1.3) se definen como enzimas que catalizan la hidrólisis de polímeros con grupos ésteres. Las esterasas se diferencian de las lipasas en que ellas muestran preferencia por ácidos grasos de cadena corta (< 10 átomos de carbono) (Levisson, 2009). Aunque la determinación de la actividad de las esterasas a través de la hidrólisis no aporta ninguna información sobre la degradación de sustancias específicas, se ha considerado como una medida de la actividad heterótrofa general en fangos activos (Bozcar *et al.*, 2001).



**Figura III.4. Estructura 3D de esterasa extracelular de *Lactobacillus johnsonii* LJ0536 (Brenda Base data).**

### III.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de determinar las actividades enzimáticas y la evolución de las mismas en los cuatro ensayos experimentales realizados en la planta piloto a diferentes concentraciones salinas, se empleó como muestra de partida una suspensión de la biopelícula en solución salina estéril. Para ello se extrajo la biopelícula del material de relleno del sistema de filtro sumergido los días 2, 5, 9 y 12 de cada ciclo de funcionamiento de dicho sistema, midiéndose 3 ciclos de funcionamiento por cada concentración salina (figura III.5). Las muestras correspondientes al primer ciclo en cada experimento se denominaron 1, 2, 3 y 4; las correspondientes al segundo ciclo, 5, 6, 7 y 8; y las pertenecientes al tercer ciclo, 9, 10, 11 y 12.

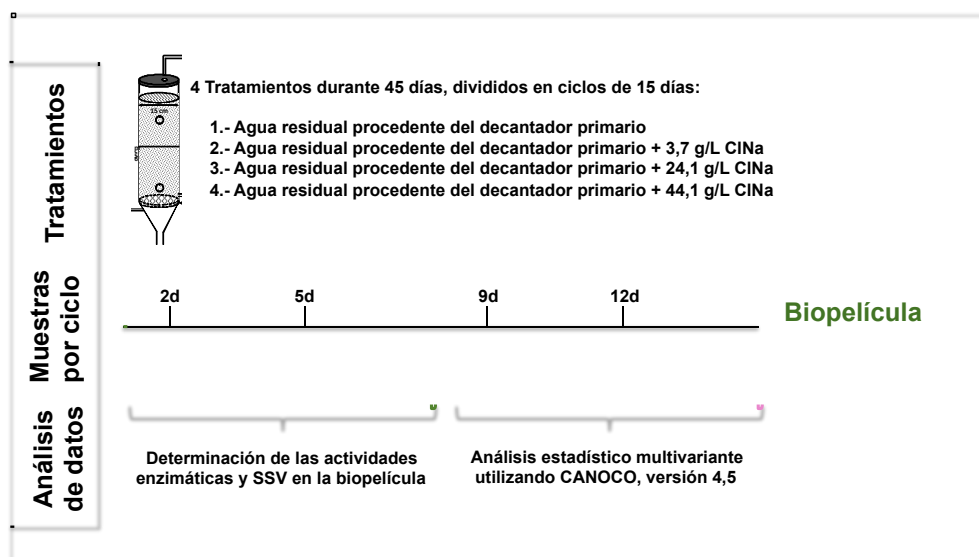


Figura III.5. Esquema de los experimentos realizados en este estudio.

Con objeto de cuantificar las actividades de las hidrolasas se propusieron una serie de sustratos sintéticos, cuya hidrólisis da lugar a productos coloreados, resistentes al metabolismo celular, que se pueden determinar posteriormente mediante el empleo de técnicas espectrofotométricas. El desarrollo de estos sustratos sintéticos vendría justificado por la imposibilidad de utilizar macromoléculas naturales, pues la cuantificación de los

productos de hidrólisis, tales como aminoácidos procedentes de la hidrólisis de proteínas o azúcares de los polisacáridos, no sería posible debido a su inmediata asimilación por el metabolismo celular.

### III.2.1. Extracción de la biopelícula del material de relleno

Se partió de una cantidad de material soporte del biofiltro con biopelícula adherida de 25 g. De este material se logró extraer la biopelícula mediante:

Primero: Suspensión del material en 50 mL de solución salina estéril.

Segundo: Sonicación en baño sonicador Ultrasons Selecta durante 1 min.

Tercero: Agitación orbital a 125 rpm durante 1 h.

Cuarto: Recuperación del relleno y repetición de los pasos primero a tercero.

Se reúnen las dos fracciones de la extracción obteniéndose al final la biopelícula recuperada en 100 mL de solución salina estéril (Vílchez, 2005; Gómez-Villalba, 2003).

### III.2.2. Actividades enzimáticas en la biopelícula

Se realizaron medidas de las actividades enzimáticas fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina o básica,  $\alpha$ -glucosidasa, esterasa y proteasa. Dichos ensayos se realizaron por triplicado.

#### III.2.2.1. Actividad enzimática fosfatasa

El procedimiento empleado para la determinación de la actividad fosfatasa, ácida y alcalina, está basado en métodos colorimétricos descritos por Richards *et al.* (1984) y modificados por Goel *et al.* (1998), utilizando en ambos casos un sustrato incoloro *p*-nitrofenil fosfato, el cual se transformará en *p*-nitrofenol (compuesto coloreado) por acción de la fosfatasa.

Fosfatasa ácida:

- Procedimiento:

Para la determinación de la actividad fosfatasa ácida se tomó 1 mL de la suspensión obtenida en el apartado III.2.1 y se mezcló con 2 mL de tampón acetato-acético 0,1 M a pH 4,8.

Se añadió 1 mL del sustrato (*p*-nitrofenol fosfato, sal sódica, Sigma®) al 1% en agua destilada y se incubó a 37°C en oscuridad durante 30 min.

Transcurrido el tiempo de incubación se detuvo la reacción adicionando 2 mL de NaOH 0,2 M. A continuación, se centrifugó a 1.300 g (3500 rpm) durante 10 min en una centrífuga Kokusan 4103N y se midió el desarrollo de color del producto *p*-nitrofenol en un espectrofotómetro Shimadzu UV1800 a  $\lambda = 410$  nm.

La actividad fosfatasa ácida se expresó en mM *p*-nitrofenol/min·gSSV.

**Tampón acetato-acético 0,1 M a pH 4,8**

Se empleó una solución de acetato sódico trihidratado 0,1 M (13,61 g de CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O en 1 L de agua destilada) y ácido acético 0,1 M. Se mezclaron 59 mL de la solución de acetato sódico trihidratado 0,1 M con 41 mL de ácido acético 0,1 M obteniéndose el tampón a pH 4,8.

- Obtención de la curva de calibración:

Para la construcción de la curva de calibrado se prepararon diez concentraciones crecientes de *p*-nitrofenol partiendo de una solución madre de *p*-nitrofenol 0,6 mM. En la Tabla III.1 se muestran los volúmenes empleados para la elaboración de la curva de calibrado.

**Tabla III.1. Recta de calibrado para la determinación de la actividad fosfatasa ácida.**

Puntos de la recta de calibrado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\mu\text{L } p\text{-nitrofenol } 0,6 \text{ mM}$	0	10	20	40	80	100	200	500	700	1000
$\mu\text{L de Agua Destilada}$	2000	1990	1980	1960	1920	1900	1800	1500	1300	1000
$\text{mL de tampón } \text{CH}_3\text{COO}^- / \text{CH}_3\text{COOH}$	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
$\text{mL de disolución de NaOH}$	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

La curva patrón se preparó para cada lote de reactivos.

Fosfatasa alcalina o básica:

- Procedimiento:

Para determinar la fosfatasa alcalina se utilizó la metodología descrita previamente para la fosfatasa ácida. La única diferencia consistió en la utilización de un tampón carbonato-bicarbonato 0,1 M a pH 9,6 en lugar del tampón acetato-acético 0,1 M a pH 4,8.

La actividad fosfatasa alcalina se expresó en mM *p*-nitrofenol/min·gSSV.

**Tampón carbonato-bicarbonato 0,1 M a pH 9,6**

Se utilizaron dos soluciones: una de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·10 H<sub>2</sub>O 0,1 M (28,62 g en 1 L de agua destilada) y otra solución de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M (8,40 g en 1 L de agua destilada). Para obtener el tampón al pH deseado se mezclaron 33 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> con 67 mL de NaHCO<sub>3</sub>.

- Obtención de la curva de calibración:

La preparación de la curva de calibrado fue realizada de la misma manera que la de la actividad fosfatasa ácida (tabla III.2).

**Tabla III.2. Recta de calibrado para la determinación de la actividad fosfatasa alcalina.**

Puntos de la recta de calibrado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μL <i>p</i> -nitrofenol 0,6 mM	0	10	20	40	80	100	200	500	700	1000
μL de Agua Destilada	2000	1990	1980	1960	1920	1900	1800	1500	1300	1000
mL de tampón HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
mL de disolución de NaOH	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

La curva de calibrado se preparó para cada lote de reactivos.



### III.2.2.2. Actividad enzimática $\alpha$ -glucosidasa

La cuantificación de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa se realizó por el método colorimétrico descrito originalmente por Awong *et al.* (1985) y modificado por Goel *et al.* (1998) utilizando tampón tris-HCl y *p*-nitrofenil  $\alpha$ -D-glucopiranosido.

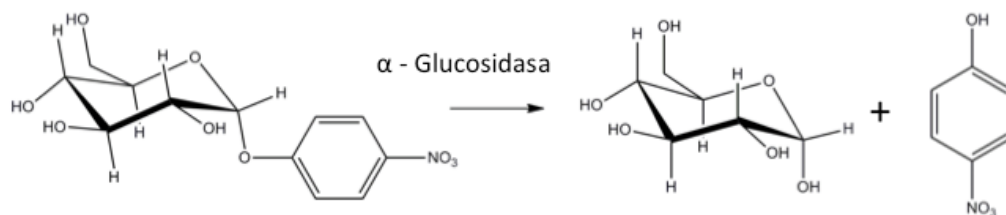


Figura III.6. Ecuación general que describe la reacción del *p*-nitrofenil  $\alpha$ -D-glucopiranosido.

- Procedimiento:

Se tomó 1 mL de la suspensión obtenida en el apartado III.2.1 y se mezcló con 2 mL de tampón Tris-HCl 0,2 M con un pH de 7,6.

Se añadió 1 mL de sustrato de la reacción que es *p*-nitrofenil  $\alpha$ -D-glucopiranosido al 1% en agua destilada. Dicha mezcla se incubó a 37°C en oscuridad durante 60 min. Para detener la reacción se mantuvieron las muestras en un baño con una temperatura de 100°C durante 5 min.

A continuación, se centrifugó a 1.300 g (3500 rpm) durante 10 min en una centrífuga Kokusan 4103N y el color resultante de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa (*p*-nitrofenol) fue determinado en un espectrofotómetro Shimadzu UV1800 a  $\lambda=410$  nm.

La actividad  $\alpha$ -glucosidasa se expresó en mM *p*-nitrofenol/min·gSSV

#### Tampón Tris-HCl 0,2 M a pH 7,6

Se mezclaron 50 mL de una solución Tris 0,1 M (12,11 g en 1 L de agua destilada) con 38,5 mL de HCl (37%) y se enrasó hasta 100 mL con agua destilada.

- Obtención de la curva de calibración:

El procedimiento para la obtención de la curva de calibración de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa es el mismo que el descrito anteriormente para la actividad fosfatasa alcalina y ácida. La curva de calibrado se preparó para cada lote de reactivos, como se indica en la tabla III.3.

**Tabla III.3. Recta de calibrado para la determinación de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa.**

Puntos de la recta de calibrado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\mu\text{L } p\text{-nitrofenol } 0,6 \text{ mM}$	0	10	20	40	80	100	200	500	700	1000
$\mu\text{L de Agua Destilada}$	2000	1990	1980	1960	1920	1900	1800	1500	1300	1000
$\text{mL de tampón Tris HCl } 0,2\text{M}$	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

### III.2.2.3. Actividad enzimática proteasa

La determinación de la actividad enzimática proteasa fue medida por el método colorimétrico descrito por Cadoret *et al.* (2002), utilizando azocaseína al 0,2%.

- Procedimiento:

Se tomaron 25 mL de la suspensión obtenida en el apartado III.2.1 y se mezclaron con 25 mL de azocaseína al 0,2% en tampón fosfato 10 mM pH 7,6. Se agitó a 150 rpm en un agitador magnético hasta su completa disolución.

De la muestra se tomaron alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  a tiempos regulares de 10 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 500  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) al 10% en agua destilada. La mezcla se mantuvo en hielo durante 10 min.

Las muestras se centrifugaron a 1.300 g durante 10 min en una centrífuga Kokusan 4103N. El desarrollo del color se midió a  $\lambda=340 \text{ nm}$  en un espectrofotómetro Shimadzu UV1800.

Esta actividad no requiere la obtención de una curva de calibración, porque las unidades de esta enzima se calculan como el incremento de la absorbancia (Cadoret *et al.*, 2002). La actividad proteasa se expresó por tanto como  $\Delta$ Absorbancia/min·gSSV.

#### **Tampón fosfato 10 mM pH 7,6**

Se utilizó una disolución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 M y otra de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5 M. Se mezclaron 147 mL de la solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5 M con 13 mL de la solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 M y se enrasó hasta 1 L con agua destilada, obteniéndose el tampón a pH 7,6.

#### **III.2.2.4. Actividad enzimática esterasa**

El procedimiento descrito por Boczar *et al.* (2001) fue empleado para determinar la actividad esterasa total.

- Procedimiento:

Se tomó 1 mL de muestra (suspensión obtenida en el apartado III.2.1) y se añadió el sustrato preparado previamente. Para preparar el sustrato (ésteres de acetato, butirato, caproato, caprilato, laurato y palmitato) se tomaron 0,1 mg de cada uno de los productos anteriores y se disolvieron en 1 mL de acetona y 1 mL de tritón X-100. Las disoluciones se secaron bajo una corriente de helio. Posteriormente, se mezclaron con 50 mL de tampón fosfato 60 mM pH 7,2.

Esta mezcla se mantuvo a 25°C durante 120 min y transcurrido este tiempo se tomaron 5 mL de la alícuota y se mezcló con 10 mL de acetona para detener la reacción.

Se centrifugó a 10.000 g en una centrífuga Beckman Avanti J25 durante 3 min y se recogió el sobrenadante. Se midió el desarrollo de color del producto (*p*-nitrofenol) en un espectrofotómetro Shimadzu UV1800 a  $\lambda = 400$  nm.

La actividad esterasa se expresó en mM *p*-nitrofenol/min·gSSV.

#### **Tampón fosfato 60 mM pH 7,2**

Se utilizó una solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (71,64 g/L) y otra solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (31,21 g/L). Se mezclaron 144 mL de la solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5M con 28 mL de la solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 M y se enrasó hasta 1 L con agua destilada, obteniéndose el tampón a pH 7,2.

- Obtención de la curva de calibración:

Para la construcción de una curva de calibrado se prepararon 10 concentraciones diferentes de *p*-nitrofenol, partiendo de una disolución madre de concentración 3 mM (Tabla III.4). La curva de calibración se preparó para cada lote de reactivos.

**Tabla III.4. Recta de calibrado para la determinación de la actividad esterasa.**

Puntos de la recta de calibrado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μL <i>p</i> -nitrofenol 3 mM	0	100	300	500	800	1000	1300	1500	1800	2000
μL de Agua Destilada	2000	1900	1700	1500	1200	1000	700	500	300	0
mL de tampón fosfato	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
mL de Acetona	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

### III.2.3. Análisis estadístico multivariante

Los datos experimentales obtenidos en la determinación de las actividades enzimáticas, apartado III.2.2, se sometieron a tratamiento estadístico, empleando los programas Statgraphics plus v. 5.0 (Statistical Graphics, Corp., Rockville, MD, EE.UU), Statistica (StatSoft, Inc.) y Canoco v. 4.5 (ScientiaPro, Budapest, Hungría).

El tratamiento consistió en :

#### Statgraphics y Statistica:

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

**Canoco:**

- Análisis de correspondencias sin tendencias (DCA), para obtener la longitud del gradiente (LG) del análisis.
- Análisis de redundancia (RDA) y test de permutación de Monte Carlo para la obtención de un diagrama *biplot* del análisis RDA.

**III.3. RESULTADOS**

A continuación se detallan los resultados obtenidos tras analizar el efecto de las distintas concentraciones de sal aplicadas en el influente del biorreactor de filtro sumergido (3,7 g/L, 24,1 g/L y 44,1 g/L de NaCl) sobre las actividades enzimáticas llevadas a cabo en la biopelícula del sistema (fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina,  $\alpha$ -glucosidasa, esterasa y proteasa).

Como paso previo a la ejecución de estos experimentos, se llevó a cabo la determinación de dichas actividades enzimáticas cuando el sistema fue alimentado con un influente obtenido directamente del decantador primario de la estación depuradora, sin adición de NaCl. Estos datos fueron considerados como el experimento 1.

Además de las actividades enzimáticas en los diferentes muestreos, se determinaron los SSV en la biopelícula en cada uno de los experimentos (ver apartado II.2.3.7). En el primer experimento los SSV variaron entre 15,400 g/L y 13,322 g/L; en el segundo experimento, los SSV evolucionaron entre valores de 16,033 g/L y 13,7425 g/L; valores comprendidos entre 8,039 g/L y 9,8756 g/L se obtuvieron en el tercer experimento. En el 4 experimento los SSV fueron desde 6,1673 g/L como valor máximo a 4,3206 g/L como valor mínimo. Todos los resultados obtenidos en las determinaciones de SSV en los diferentes muestreos se pueden observar en las figuras III.7, III.9, III.11, III.13 y III.15.

**III.3.1. Determinación de la actividad fosfatasa ácida bajo el efecto de un influente salino**

La Figura III.7 muestra la evolución temporal de la actividad enzimática fosfatasa ácida en el reactor biológico durante los cuatro experimentos, en los 3 ciclos de cada experimento (ver apartado III.2).

La evolución temporal de la actividad fosfatasa dentro de cada experimento, es decir, en los 3 ciclos de cada experimento, fue similar, sin diferencias estadísticamente significativas entre ciclos ( $p>0,05$ ).

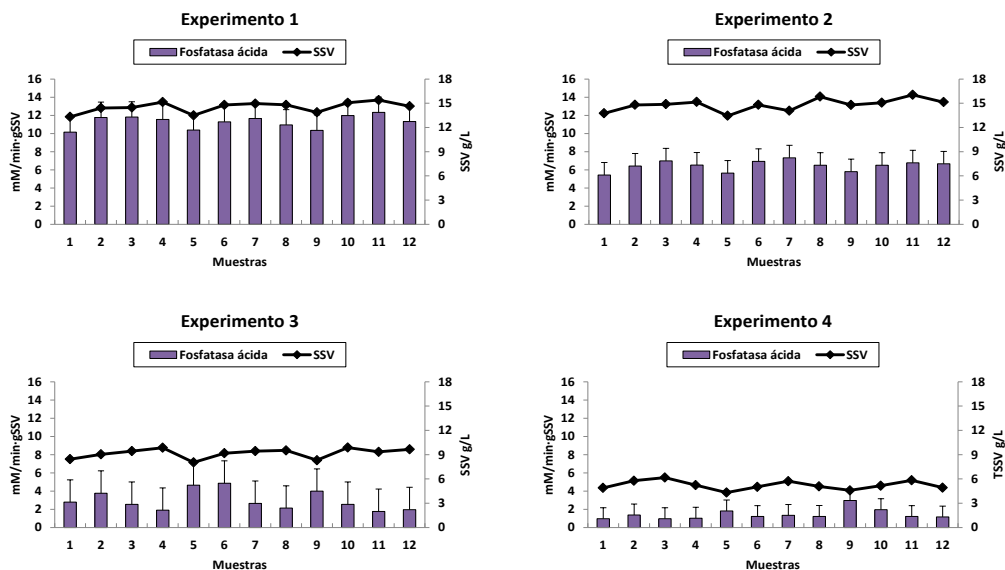
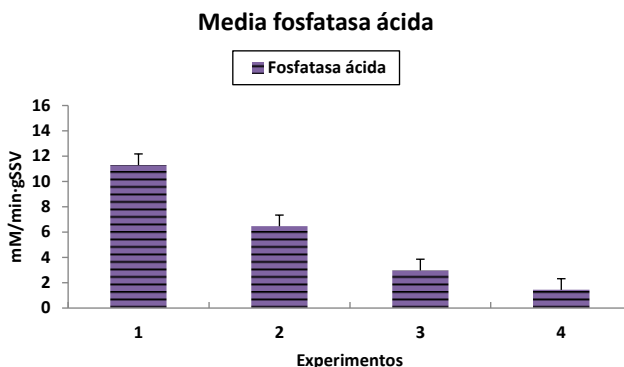


Figura III.7. Actividad enzimática fosfatasa ácida y SSV en el SFBBR en los 4 experimentos. Experimento 1 (MDS=1,69), experimento 2 (MDS=1,38), experimento 3 (MDS=2,45) y experimento 4 (MDS=1,20).

Por otra parte, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad fosfatasa ácida ( $p<0,05$ ) en los 4 experimentos, comprobándose una disminución en dicha actividad a medida que aumenta la concentración salina en el influente. El valor máximo se detectó en el primer experimento, en el tercer día de muestreo del tercer ciclo de actividad, con un valor 12,3285 mM/min-gSSV.

En relación a los niveles de la actividad fosfatasa ácida detectados a lo largo de los experimentos, si calculamos la media en cada experimento (figura III.8) se observa, como la actividad fosfatasa ácida se ve influenciada por las diferentes concentraciones salinas en el influente. La actividad fosfatasa ácida presentó un valor mínimo de 0,9675 mM/min-gSSV en el primer muestreo del primer ciclo del 4 experimento.



**Figura III.8. Media de la actividad fosfatasa ácida en cada uno de los 4 experimentos (MDS=0,88).**

### III.3.2. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina bajo el efecto de un influente salino

La evolución temporal de la actividad enzimática fosfatasa alcalina se muestra en la figura III.9. Al igual que la actividad fosfatasa ácida (apartado III.3.1), la fosfatasa alcalina no presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en los diferentes ciclos de cada experimento.

En los experimentos 1 y 2 la actividad enzimática no presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ), permaneciendo estable a bajas concentraciones salinas. Sin embargo se puede observar como en el segundo experimento, es decir, cuando la concentración salina es de 3,7 g/L de NaCl en el influente, la actividad fosfatasa básica es más estable e incluso ligeramente superior a dicha actividad en el experimento 1.

En los experimentos 3 y 4 se observa una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) de la actividad fosfatasa alcalina respecto a los experimentos 1 y 2, la cual es mayor conforme aumenta la concentración de sal en el influente.

Para la actividad fosfatasa básica, el valor máximo se detectó en el primer experimento, el primer día de muestreo del tercer ciclo de actividad, con un valor de 16,4012 mM/min·gSSV. El valor mínimo para dicha actividad fue de 5,235 mM/min·gSSV durante el primer muestreo del segundo ciclo del último experimento.

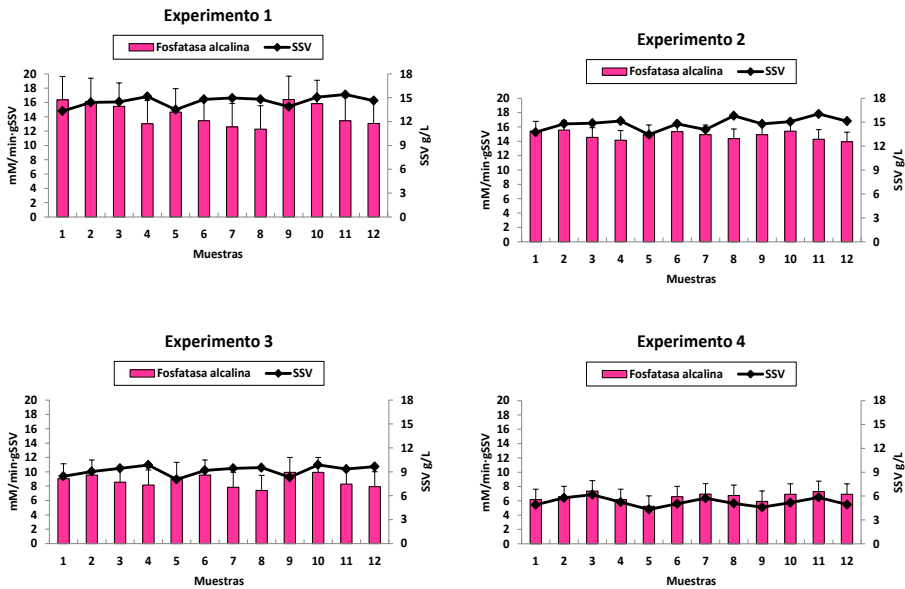


Figura III.9. Actividad enzimática fosfatasa alcalina y SSV en el SFBBR en los 4 experimentos. Experimento 1 (MDS=3,27), experimento 2 (MDS=1,35), experimento 3 (MDS=2,09) y experimento 4 (MDS=1,46).

Si observamos la figura III.10, donde se representan las medias de los cuatro experimentos podemos comprobar como la actividad fosfatasa alcalina es estable a bajas concentraciones salinas y sólo se ve afectada, disminuyendo, cuando la concentración de sal en el influente es elevada ( $\geq 24,1$  g/L de NaCl).

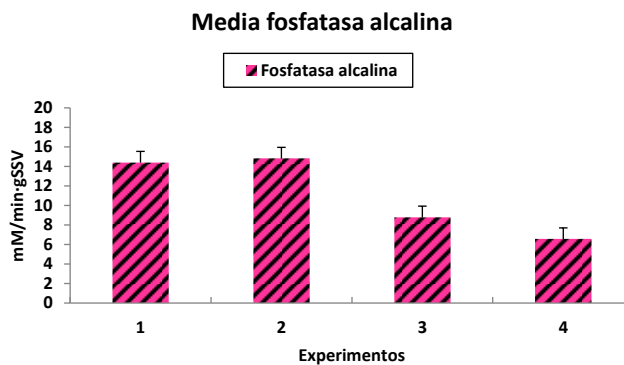


Figura III.10. Media de la actividad fosfatasa básica en cada uno de los 4 experimentos (MDS=1,15).



### III.3.3. Determinación de la actividad $\alpha$ -glucosidasa bajo el efecto de un influente salino

La evolución temporal de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa en los 4 experimentos se representan en la figura III.11.

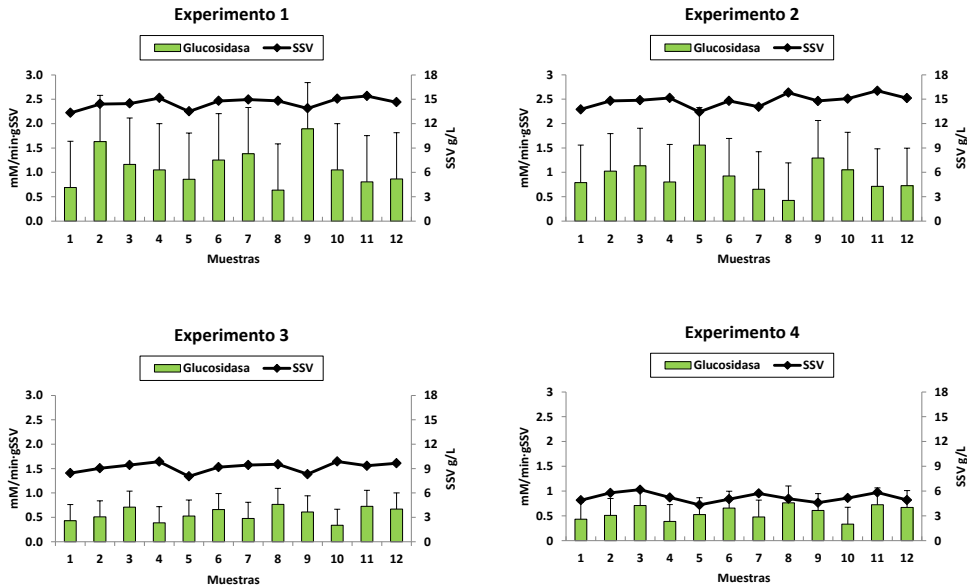
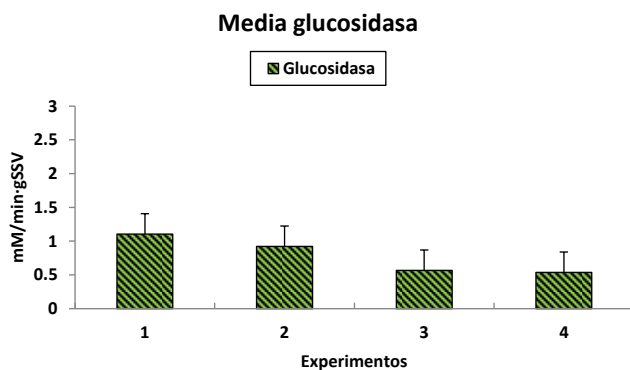


Figura III.11. Actividad enzimática  $\alpha$ -glucosidasa y SSV en el SFBBR en los 4 experimentos. Experimento 1 (MDS=0,95), experimento 2 (MDS=0,77), experimento 3 (MDS=0,33) y experimento 4 (MDS=0,34).

En dicha figura se puede observar que la actividad  $\alpha$ -glucosidasa decae en el experimento 2, siendo esta disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto a los valores obtenidos para dicha actividad en el experimento 1. Entre el experimento 2 y 3 la actividad  $\alpha$ -glucosidasa permaneció estable ( $p > 0,05$ ) pero a elevadas concentraciones de sal, es decir, en el experimento 4, se observó una pérdida de actividad  $\alpha$ -glucosidasa estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al experimento anterior. El valor máximo para la actividad  $\alpha$ -glucosidasa se observó en el primer muestreo del tercer ciclo del experimento inicial (experimento 1) con 1,8930 mM/min·gSSV y el valor mínimo para esta actividad enzimática se obtuvo en el segundo muestreo del tercer ciclo del último experimento donde la concentración salina en el influente fue de 44,1 g/L de NaCl, siendo de 0,333 mM/min·gSSV.

Del mismo modo que en las actividades enzimáticas anteriores, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ciclos dentro de cada tratamiento ( $p>0,05$ ).

En la figura III.12 se observa la media de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa en cada experimento.



**Figura III.12. Media de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa en cada uno de los 4 experimentos (MDS=0,30).**

#### III.3.4. Determinación de la actividad esterasa bajo el efecto de un influente salino

La actividad esterasa presentó un patrón de comportamiento similar al de la actividad fosfatasa básica. Se observó una disminución en la actividad enzimática esterasa estadísticamente significativa en los experimentos 3 y 4 respecto a los experimentos 1 y 2 ( $p<0,05$ ). Los datos obtenidos se muestran en la figura III.13. El valor máximo para esta actividad se obtuvo cuando el SFBBR se alimentó con agua procedente directamente del decantador primario de la EDAR, sin adición de NaCl. Dicho valor se obtuvo en el primer muestreo del tercer ciclo y fue de 14,8529 mM/min·gSSV.

Como en las anteriores actividades enzimáticas, la actividad esterasa no presenta diferencias estadísticamente significativas entre ciclos dentro de cada tratamiento ( $p>0,05$ ).

El valor mínimo, 2,3871 mM/min·gSSV se observó en el primer muestreo del tercer ciclo del experimento 4.

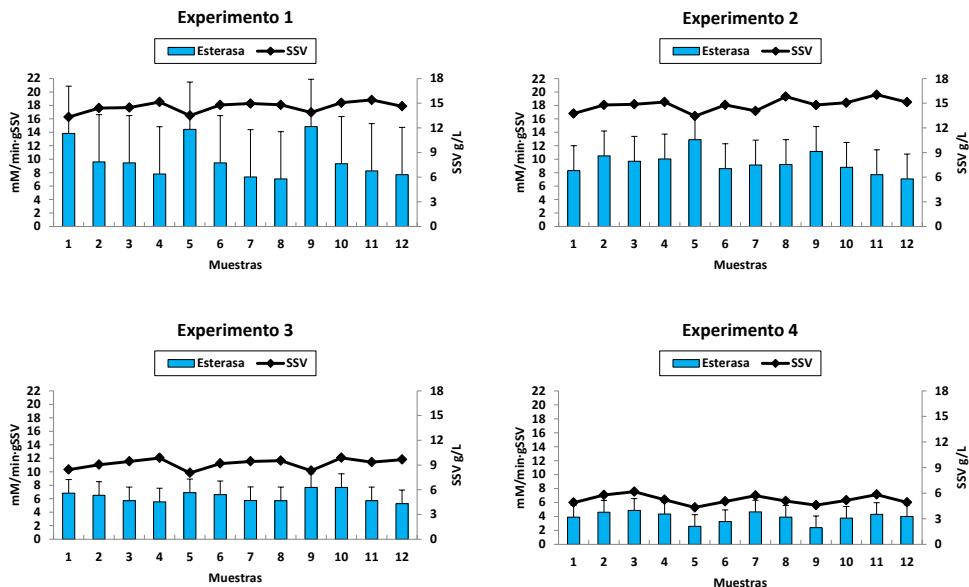


Figura III.13. Actividad enzimática esterasa y SSV en el SFBBR en los 4 experimentos. Experimento 1 (MDS=7,03), experimento 2 (MDS=3,70), experimento 3 (MDS=2,02) y experimento 4 (MDS=1,68).

En la figura III.14 podemos observar las medias en los 4 experimentos de la actividad esterasa, que muestran que la actividad esterasa es estable a bajas concentraciones de sal, disminuyendo en los 2 últimos experimentos.

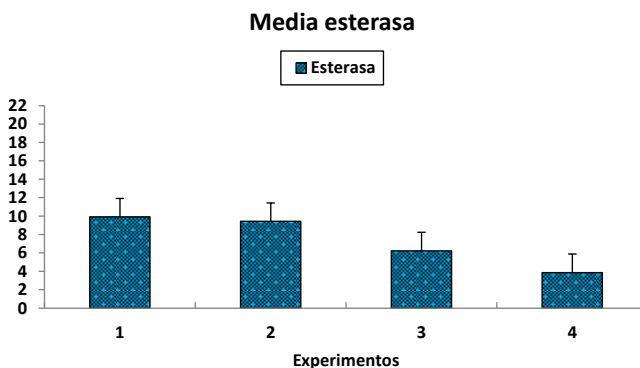


Figura III.14. Media de la actividad esterasa en cada uno de los 4 experimentos (MDS=1,99).

### III.3.5. Determinación de la actividad proteasa bajo el efecto de un influente salino

En la figura III.15 se observa la evolución de la actividad proteasa a lo largo de todo el periodo de muestreo realizado en los 4 experimentos.

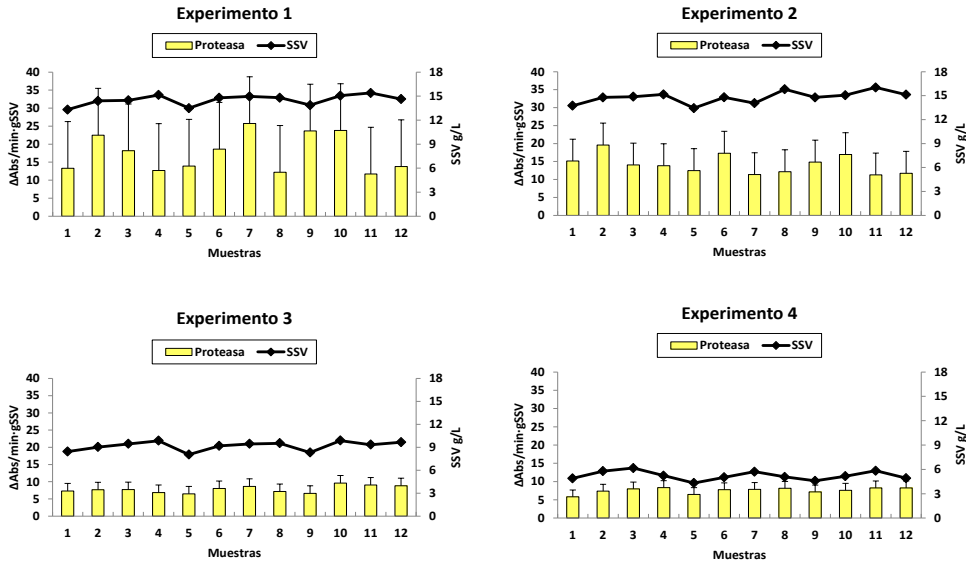
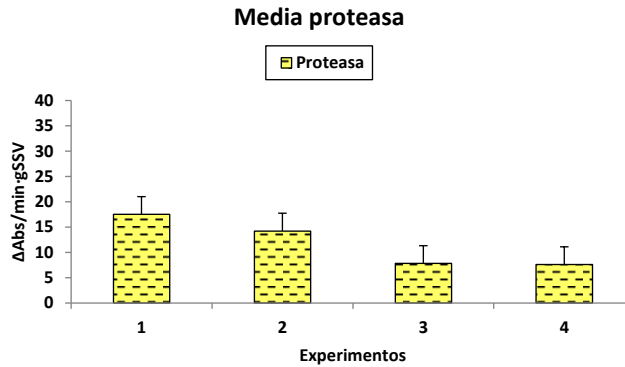


Figura III.15. Actividad enzimática proteasa y SSV en el SFBBR en los 4 experimentos. Experimento 1 (MDS=12,98), experimento 2 (MDS=6,10), experimento 3 (MDS=2,18) y experimento 4 (MDS=1,89).

En relación a los niveles de la actividad proteasa detectados a lo largo de los experimentos se observa, al igual que sucede en el caso de la actividad fosfatasa básica, que no se producen diferencias estadísticamente significativas entre el experimento 1 y 2 ( $p > 0,05$ ). Después se comprobó una tendencia de reducción en la actividad proteasa durante el experimento 3, estabilizándose dicha disminución de la actividad a lo largo de todo el periodo experimental 4. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los experimentos 3 y 4 ( $p > 0,05$ ).

El valor máximo se detectó en el primer experimento, en el tercer día de muestreo del segundo ciclo de actividad, con un valor de 25,7334  $\Delta\text{Abs}/\text{min}\cdot\text{gSSV}$  y el valor mínimo fue 5,8131  $\Delta\text{Abs}/\text{min}\cdot\text{gSSV}$  obtenido el primer muestreo del primer ciclo del ultimo experimento.



**Figura III.16. Media de la actividad proteasa en cada uno de los 4 experimentos (MDS=3,49).**

### III.3.6. Análisis estadístico multivariante

Para constatar que las actividades enzimáticas presentaban diferencias significativas en relación a los parámetros fisicoquímicos del influente, se realizó un análisis estadístico multivariante con el programa Canoco, versión 4,5 (ScientiaPro, Budapest, Hungría).

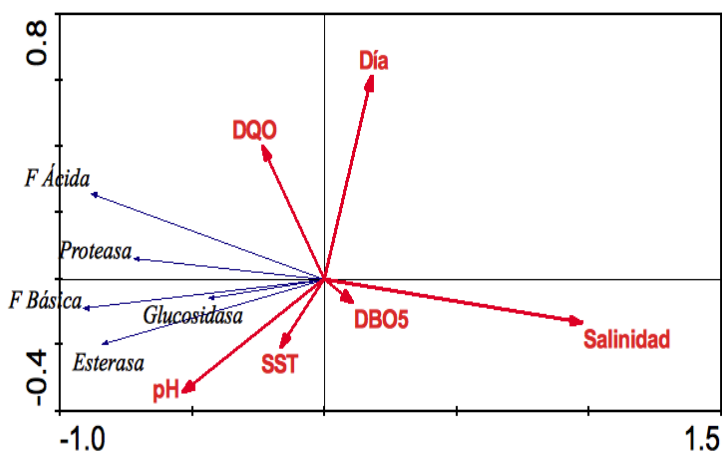
En el análisis se incluyó una tabla con los datos correspondientes a todas las actividades enzimáticas (fosfatasa básica y ácida,  $\alpha$ -glucosidasa, proteasa y esterasa); y una segunda tabla con los datos correspondientes a las variables del sistema: SSV, DBO<sub>5</sub>, DQO, pH y salinidad del agua de entrada al SFBBR.

Con el objeto de aplicar el análisis estadístico de ordenación más apropiado, previamente se realizó a partir de los datos de las actividades enzimáticas un análisis de correspondencias sin tendencias (DCA), para obtener la longitud del gradiente del análisis (LG). Mediante dicho análisis, se calculó que el gradiente de mayor longitud de los ejes de ordenación era 1,897 (menor o igual a 3), lo cual indica una distribución lineal antes que unimodal. Por tanto, el análisis estadístico de ordenación utilizado fue el análisis de redundancias (RDA), que es el más recomendado para gradientes de respuesta lineal (Lepš y Šmilauer, 2003).

Previamente, se realizó un análisis RDA preliminar con Canoco al objeto de determinar que variables del sistema tenían mayor repercusión sobre la variabilidad, y

para detectar aquellas variables que mostrasen una alta correlación lineal, pues éstas no deben incluirse simultáneamente en el análisis (Lepš y Šmilauer, 2003). De este modo, se excluyeron del análisis los SSV del influente, que mostraron una elevada correlación lineal con los SST ( $r>0,9$ ) pero mostraron menor influencia que éstos sobre la variabilidad, y los SSV de la biopelícula que también mostraron una correlación lineal elevada con la salinidad ( $r>0,9$ ).

Para el RDA se usaron las opciones por defecto y para la matriz de correlación, centrada por especies (actividades enzimáticas) y centrada y estandarizada por muestras. El resultado del análisis del RDA se representa mediante el siguiente diagrama *biplot* (figura III.17).



Variable	F1(horizontal)	F2(vertical)
Salinidad	0,98	-0,16
Día de muestreo	0,20	0,62
pH	-0,55	-0,36
DBO <sub>5</sub>	0,12	-0,12
DQO	-0,25	0,40
SST	-0,18	-0,22

**Figura III.17. Diagrama de ordenación *biplot* del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre las actividades enzimáticas en las muestras de biopelícula del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos del influente medidos durante la operación en los cuatro experimentos. Variables ambientales: sólidos en suspensión totales (SST), pH, demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO5), día del ciclo (Día), salinidad (Salinidad). Especies: actividades enzimáticas: fosfatasa básica (F Básica), fosfatasa ácida (F Ácida),  $\alpha$ -glucosidasa (Glucosidasa), proteasa (Proteasa), esterasa (Esterasa).**

El primer eje de ordenamiento canónico (COA) (horizontal) describe un 60,73% de la variabilidad de las actividades enzimáticas, y un 92,8% de la variabilidad de las actividades enzimáticas explicable mediante las variables ambientales consideradas en el análisis. La variable ambiental más determinante en este eje es la salinidad.

El segundo COA (vertical) describe un 2,5% de la variabilidad de las actividades enzimáticas, y un 4,2 % de la variabilidad de las actividades enzimáticas explicable mediante las variables ambientales consideradas en el análisis. La variable ambiental más determinante en este eje es el día del ciclo en el que se toma la muestra. De este modo, si consideramos los 2 primeros COAs podemos describir el 63,2% de la variabilidad de las actividades enzimáticas consideradas en el análisis y el 96,6% de la variabilidad de las actividades enzimáticas explicable mediante las variables ambientales consideradas en el análisis. La contribución de los ejes 3 y 4 a la varianza total fue insignificante (tabla III.5).

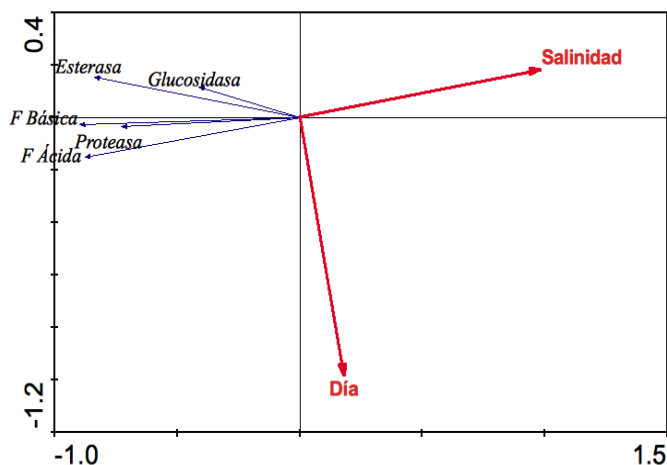
**Tabla III.5. Resultados del análisis de redundancia (RDA), realizado con los datos de las especies (actividades enzimáticas) y las variables ambientales del influente en el SFBBR (SST, DQO, DBO5, pH, salinidad y día de muestreo) en los cuatro experimentos.**

Ejes	1	2	3	4
Valores propios	0,607	0,024	0,014	0,006
Correlaciones entre especies y variables ambientales	0,921	0,582	0,316	0,426
Variación porcentual acumulada				
de datos sobre especies	60,7	63,2	64,5	65,1
de relación especies-ambiente	92,8	96,6	98,7	99,5
Suma de todos los valores propios				
Suma de todos los valores propios canónicos				1,000
				0,654

La salinidad junto con el día de muestreo, fueron señaladas por el Test de Monte Carlo como estadísticamente significativas con un intervalo de confianza ( $p < 0,05$ ) con respecto a el pH, DBO<sub>5</sub>, DQO, y los SST. Teniendo en cuenta esto, se realizó de nuevo el análisis multiestadístico teniendo en cuenta sólo dichas variables ambientales.

El análisis se realizó siguiendo las mismas pautas que en el estudio anterior, ya que en este caso, el análisis DCA también indicó que la longitud del gradiente era  $< 3$ . El resultado del análisis del RDA se representa mediante el siguiente diagrama *biplot* (figura III.18).

El Test de Monte Carlo indica que tanto la salinidad como el día influyen de manera estadísticamente significativa, con  $p < 0,05$ .



Variable	F1(horizontal)	F2(vertical)
Salinidad	1,04	0,38
Día de muestreo	0,19	-1,18

**Figura III.18.** Diagrama de ordenación *biplot* del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre las actividades enzimáticas en las muestras de biopelícula del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos del influente estadísticamente significativos (día del ciclo (Día), salinidad (Salinidad)) medidos durante la operación en los cuatro experimentos. Especies: actividades enzimáticas: fosfatasa básica (F Básica), fosfatasa ácida (F Ácida),  $\alpha$ -glucosidasa (Glucosidasa), proteasa (Proteasa), esterasa (Esterasa).

El primer COA (horizontal) describe el 59,9% de la variabilidad de las actividades enzimáticas consideradas en el análisis, y un 97,9% de la variabilidad de las actividades enzimáticas explicable mediante las variables ambientales consideradas en el análisis. El segundo COA (vertical) describe un 1,2% de la variabilidad de las actividades enzimáticas, y un 2,1% de la variabilidad de las actividades enzimáticas explicable mediante las variables ambientales consideradas en el análisis. Ambos COAs explican el 61,1% de los datos de las especies y el 100% de la relación de las especies y el medio ambiente, mientras que la contribución de los ejes 3 y 4 a la varianza total fue insignificante. El resumen estadístico del RDA se representa en la tabla III.6.



**Tabla III.6. Resultados del análisis de redundancia (RDA), realizado con los datos de las especies (actividades enzimáticas) y las variables ambientales del influente en el SFBBR (salinidad y día de muestreo) en los cuatro experimentos.**

Ejes	1	2	3	4	
Valores propios	0,599	0,013	0,188	0,094	
Correlaciones entre especies y variables ambientales	0,915	0,380	0,000	0,000	
Variación porcentual acumulada					
de datos sobre especies	59,9	61,1	79,4	89,2	
de relación especies-ambiente	97,9	100,0	0,0	0,0	
Suma de todos los valores propios					1,000
Suma de todos los valores propios canónicos					0,611

En los diagramas *biplot*, las actividades enzimáticas y las variables ambientales están representadas con flechas. Si las flechas están dispuestas en ángulo agudo, se hallan correlacionadas entre ellas positivamente, en tanto que aquéllas dispuestas en ángulos obtusos indican una correlación negativa. Así, se puede apreciar que las variables ambientales se correlacionan positivamente entre sí y negativamente con las actividades enzimáticas. La longitud de la flecha de las variables ambientales está relacionada con la correlación de la misma con los ejes de ordenación: así, cuanto más larga es la flecha, mayor es la influencia de dicha variable ambiental sobre las actividades enzimáticas.

En el diagrama (figura III.18) se observa que todas las actividades enzimáticas están más relacionadas con el primer eje, y además, tienen una correlación negativa con la salinidad.

### III.4. DISCUSIÓN

Los compuestos orgánicos complejos, como las proteínas, carbohidratos, lípidos y sus conjugados o derivados en las aguas residuales, son inicialmente hidrolizados por enzimas extracelulares producidas por las diferentes poblaciones microbianas. Por lo tanto, la comprensión de las enzimas hidrolíticas en el tratamiento de aguas residuales proporcionará información adicional sobre la biodegradación de los compuestos orgánicos y de este modo puede mejorar el rendimiento de los actuales procesos de tratamiento biológico de aguas residuales (Anupama *et al.*, 2008).

Las variaciones temporales de la actividad hidrolítica pueden responder a un mecanismo de regulación bacteriana ante los cambios en las condiciones ambientales,

como la cantidad de sustrato, el aceptor de electrones, el pH o la temperatura (Boczar *et al.*, 1992; Nybroe *et al.*, 1992).

En el curso de este estudio, se siguió la evolución temporal de 5 enzimas: fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina,  $\alpha$ -glucosidasa, esterasa y proteasa durante 4 experimentos para comprobar el efecto de la salinidad en dichas actividades. Gracias al análisis multivariante RDA, ha sido posible determinar la influencia de la variación simultánea de los parámetros del agua residual de entrada (concentración de SST, pH, DQO, DBO<sub>5</sub> y salinidad) sobre los valores medidos de las actividades estudiadas. El RDA demuestra que en todos los experimentos los niveles de las actividades enzimáticas están fundamentalmente influenciados por la salinidad y por el día de funcionamiento del biorreactor, existiendo una clara correlación negativa entre dicha concentración y los niveles de las actividades detectados en el curso del estudio (Figura III.17 y Figura III.18).

Tras los estudios realizados se ha podido observar la estabilidad de las actividades enzimáticas durante los periodos de cada experimento de la planta. Además la actividad fosfatasa alcalina y proteasa han resultado ser más estables frente a la salinidad.

Cunha *et al.* (2010) estudiaron la regulación ambiental de la actividad enzimática extracelular. Comprobaron en sedimentos, que cuando la salinidad era elevada se requería más energía para la producción de osmolitos y había una menor utilización de dicha energía para la liberación de enzimas extracelulares, detectándose una disminución en la actividad enzimática extracelular. Esta misma tendencia ha sido la observada de forma general en nuestro estudio, es decir, cuando la concentración de sal se incrementó en el SFBBR se detectó una reducción significativa en las actividades enzimáticas y biotransformación de la materia orgánica.

A pesar de que ciertos estudios previos (Anupama *et al.*, 2008) sugerían que condiciones tales como un aumento de la salinidad (NaCl) inducían la actividad fosfatasa en reactores anaeróbicos, nuestros resultados han puesto de manifiesto que en SFBBR, el valor de dicha actividad disminuye de forma significativa a elevadas concentraciones salinas. Una diferente respuesta de estrés debido al choque osmótico en nuestro sistema y la duración del mismo frente al considerado por Anupama *et al.* (2008) podría ser una explicación para estas diferencias. De hecho, estudios previos como los desarrollados por Thompson y MacLeod (1974) informaron de una disminución reversible y parcial de la actividad fosfatasa por *Pseudomonas marina* expuesta a 0,5 M NaCl.

Los cambios en la actividad de las enzimas puede también reflejar los cambios en la fisiología celular (es decir, las diferencias en la actividad enzimática o la producción en condiciones diferentes), así como cambios en el nivel de la comunidad (es decir, los cambios en las poblaciones microbianas responsables de la producción de enzimas). Jackson y Vallaire (2009) comprobaron una reducción en las actividades fosfatasa ácida y glucosidasa en sedimentos de humedales de Louisiana cuando se sometían a salinidad.

En un sistema de filtro sumergido como el nuestro, la matriz del EPS puede actuar como una red que sirve para confinar las hidrolasas extracelulares, es decir, actúan como un sumidero para inmovilizar enzimas (Ayol, 2005; Frølund *et al.*, 1995). De hecho, nuestros resultados ponen de manifiesto que al aumentar la biopelícula (grosor, peso seco, etc...) se produce un aumento de las actividades enzimáticas a lo largo de cada ciclo de funcionamiento del SFBBR de los diferentes experimentos. Por otro lado, cuando la biopelícula es muy densa podemos apreciar una reducción en las actividades enzimáticas. Así, un exceso de EPS puede dificultar la accesibilidad de los sustratos a las enzimas (Cadoret *et al.*, 2002).

Estudios realizados por Shang *et al.* (2005), demostraron que la naturaleza de la biomasa, como la cantidad y la composición del EPS, cambiaban con las diferentes concentraciones de SSV. Si consideramos que determinadas exoenzimas se encuentran localizadas en el EPS (Guellil *et al.*, 2001; Conrad *et al.*, 2000; Gessesse *et al.*, 2000; Frølund *et al.*, 1995), podemos sugerir que la actividad enzimática puede verse afectada al aumentar la concentración de SSV en la biopelícula. Resultados similares se han demostrado que se producen en este estudio, sugiriéndose que en nuestro SFBBR las actividades enzimáticas pueden verse afectadas por la concentración de SSV en el biofilm.

Otro factor importante para las actividades enzimáticas es la presencia de oxígeno disuelto en el agua. En sistemas de fango activo, la transferencia de oxígeno decrece cuando hay una alta concentración de SSV, porque aumenta la viscosidad del fango y cambia sus propiedades reológicas (Rosenberger *et al.*, 2002). La salinidad no sólo puede alterar la composición de la biopelícula/sustancias poliméricas extracelulares (EPS), sino que también puede afectar directamente a la solubilidad máxima de oxígeno y su velocidad de transferencia en la fase líquida (Bassin *et al.*, 2011). Estos dos efectos pueden ser la causa de las actividades enzimáticas reducidas cuando VSS alcanzan ciertas concentraciones en la biopelícula del SFBBR.

### III.5. BIBLIOGRAFÍA

**Adler-Nissen, J.**, 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27: 1256-1262.

**Anupama, V.N., Amrutha, P.N., Chitra, G.S., Krishnakumar, B.**, 2008. Phosphatase activity in anaerobic bioreactors for wastewater treatment. *Water Research* 42: 2796-2802.

**Awong, J., Bitton, G., Koopman, B.**, 1985. ATP, oxygen uptake rate and INT-dehydrogenase activity of actinomycete foams. *Water Research* 7: 917-921.

**Ayol, A.**, 2005. Enzymatic treatment effects on dewaterability of anaerobically digested biosolids-I: Performance evaluations. *Process Biochemistry* 40: 2427-2434.

**Bassin, J.P., Dezotti, M., Sant'Anna, G.L.Jr.**, 2011. Nitrification of industrial and domestic saline wastewaters in moving bed biofilm reactor and sequencing batch reactor. *Journal of Hazardous Materials* 185: 242-248.

**Boczar, B.A., Begley, W.M., Larson, R.J.**, 1992. Characterization of enzyme activity in activated sludge using rapid analyses for specific hydrolases. *Water Environment Research* 64: 792-797.

**Bozcar, B., Forney, L.J., Begley, W.M., Larson, R.J., Federle, T.W.**, 2001. Characterization and distribution of esterase activity in activated sludge. *Water Research* 35: 4208-4216.

**Burgess, J.E., Pletschke, B.I.**, 2008. Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment: A mini-review. *Water SA* Vol. 34: 343-349.

**Cadoret, A., Conrad, A., Block, J.C.**, 2002. Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludge. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 179-186.

**Calderón, K., González-Martínez, A., Montero-Puente, C., Reboleiro-Rivas, P., Poyatos, J.M., Juárez-Jiménez, B., Martínez-Toledo, M.V., Rodelas, B.**, 2012. Bacterial community structure and enzyme activities in a membrane bioreactor (MBR) using pure oxygen as an aeration source. *Bioresource Technology* 103: 87-94.

**Conrad, A., Cadoret, A., Block, J-C.**, 2000. Extracellular enzymatic activities in activated sludge flocs. In Proceedings of the International Specialist Conference: Extracellular Polymeric Substances: The Construction Material of Biofilms, Mülheim (D).

**Criquet, S., Ferre, E., Farnet, A.M., Le petit, J.**, 2004. Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter: influence of biotic and abiotic factors. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1111-1118.

**Cunha, A., Almeida, A., Coelho, F.J.R.C., Gomes, N.C.M., Oliveira, V., Santos, A.L., 2010.** Bacterial Extracellular Enzymatic Activity in Globally Changing Aquatic Ecosystems. En: "Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology." 1, Mendez-Vilas, A. (Ed.), p. 124-135. Formatex Microbiology Series, Badajoz, Spain.

**Egli T., 1995.** The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganisms with mixtures of substrates. In: Gwynfryn J, editor. *Advances in microbial ecology*, vol. 14. New York: Plenum Press, p. 305-386.

**Eliosov, B., Argaman, Y., 1995.** Hydrolysis of particulate organics in activated sludge systems. *Water Research* 29: 155-163.

**Felix, A.M., Toome, V., De Bernardo, S., Weigele, M., 1975.** Colorimetric Amino Acid Analysis Using Fluorescamine. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 168: 601-608.

**Flint, K.P., Hopton, J.W., 1977.** Substrate specificity and ion inhibition of bacterial and particle associated alkaline phosphatases of waters and sewage sludges. *European Journal of Applied Microbiology* 4: 195-204.

**Frølund, B., Griebe, T., Nielsen, P.H., 1995.** Enzymatic activity in the activated sludge floc matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 755-761.

**García Álvarez-Coque, M.C., Medina Hernández, M.J., Villanueva Camafla, R.M., Mongay Fernández, C., 1989.** Formation and instability of *o*-phthalaldehyde derivatives of amino acids. *Analytical Biochemistry* 178: 1-7.

**Gessesse, A., Petersen, S.B., Dueholm, T.E., Nielsen, P.H., 2000.** Lipase production in activated sludge may be dominated by few organisms. En: Proceedings of the International Specialist Conference: Extracellular polymeric substances: The construction material of biofilms, Mülheim (D).

**Gessesse, A., Dueholm, T., Petersen, S.B., Nielsen, P.H., 2003.** Lipase and protease extraction from activated sludge. *Water Research* 37: 3652-3657.

**Goel, R., Mino, T., Satoh, H., Matsuo, T., 1998.** Enzyme activities under anaerobic and aerobic conditions inactivated sludge sequencing batch reactor. *Water Research* 32: 2081-2088.

**Gómez-Villalba, B., 2003.** Estudio de la microbiota de sistemas de lechos inundados para la depuración de aguas residuales urbanas. Tesis doctoral, Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

**Gottschalk G., 1986.** Metabolic diversity of aerobic heterotrophs. In: Gottschalk G, editor. *Bacterial metabolism*. 2nd ed. New York: Springer, p. 104-140.

**Guellil, A., Boualam, M., Quiquampoix, H., Ginestet, P., Audic, J.M., Block, J.C., 2001.** Hydrolysis of wastewater colloidal organic matter by extracellular enzymes extracted from activated sludge flocs. *Water Science and Technology* 43: 33-40.

**Hollander, V.P., 1971.** Acid phosphates. In: third ed Boyer, P.D. (Ed.), *The Enzymes*, vol. 4. Academic Press Inc, New York, p. 449-498.

**Huang, J.Y.C., Cheng, M., Mueller, J.T., 1985.** Oxygen uptake rates for determining microbial activity and application. *Water Research* 19: 373-381.

**Huang, Q., Shindo, H., 2000.** Effects of copper on the activity and kinetics of free and immobilized acid phosphatase. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1885-1892.

**Jackson, C.R., Vallaire, S.C., 2009.** Effects of Salinity and Nutrients on microbial assemblages in Louisiana Wetland Sediments. *Wetlands* 29: 277-287.

**Jansson, M., Olsson, H., Pettersson, K., 1988.** Phosphatases; origin, characteristics and function in lakes. *Hydrobiologia* 170: 157-175.

**Kim, Y-K., Bae, J-H., Oh B-K., Lee, W.H., Choi, J-W., 2002.** Enhancement of proteolytic enzyme activity excreted from *Bacillus stearothermophilus* for a thermophilic aerobic digestion process. *Bioresource Technology* 82: 157-164.

**Lepš, J., Šmilauer, P., 2003.** Multivariate Analysis of Ecological Data Using Canoco. Cambridge University Press.

**Levine, A.D., Tchobanoglous, G., Asano, T., 1985.** Characterization of the size distribution of contaminants in wastewater: treatment and reuse implications. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 57: 805-816.

**Levisson, M., 2009.** Biochemical and structural analysis of thermostable esterases. PhD thesis, Wageningen University.

**Li, Y., Chróst, R.J., 2006.** Microbial enzymatic activities in aerobic activated sludge model reactors. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 568-572.

**Liwarska-Bizukojc, E., Ledakowicz, S., 2003.** Estimation of viable biomass in aerobic biodegradation processes of organic fraction of municipal solid waste (MSW). *Journal of Biotechnology* 101: 165-172.

**Macomber, J., Cicek, N., Suidan, M.T., Davel, J., Ginedtet, P., Audic, J.M., 2005.** Biological kinetic data evaluation of an activated sludge system coupled with an ultrafiltration membrane. *Journal of Environmental Engineering* 131: 579-586.

**Medina Hernández, M.J., Bonet Domingo, E., Villanueva Camaflas, R.M., García Álvarez-Coque M.C., 1991.** Use of *o*-Phthalaldehyde and N-Acetyl-L-Cysteine Reagent in the Evaluation of Milk Proteins. *Journal of Dairy Science* 74: 1779-1785.

**Molina-Muñoz, M., Poyatos, J.M., Rodelas, B., Pozo, C., Manzanera, M., Hontoria, E., González-López, J.,** 2010. Microbial enzymatic activities in a pilot-scale MBR experimental plant under different working conditions. *Bioresource Technology* 101: 696-704.

**Moore, S., Stein, W.H.,** 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *Journal of Biological Chemistry* 176: 367-388.

**Nabarlatz, D., Vondrysova, J., Jenicek, P., Stüber, F., Font, J., Fortuny, A., Fabregat, A., Bengoa, C.,** 2010. Hydrolytic enzymes in activated sludge: extraction of protease and lipase by stirring and ultrasonication. *Ultrasonics Sonochemistry* 7: 923-931.

**Nybroe, O., Jørgensen, P.E., Henze, M.,** 1992. Enzyme activities in wastewater and activated sludge. *Water Research* 26: 579-584.

**Olander, L.P., Vitousek, P.M.,** 2000. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry* 49: 175-190.

**Raunkjaer, K., Hvitved-Jacobsen, T., Nielsen, P.H.,** 1994. Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. *Water Research* 28: 251-262.

**Richards, S.R., Hastwell, C., Davis, M.,** 1984. The comparative examination of 14 activated-sludge plants using enzymatic techniques. *Water Pollution Control*. 83: 300-313.

**Rosenberger, S., Krüger, R., Manz, W., Szewzyk, U., Kraume, M.,** 2002. Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater. *Water Research* 36: 413-420.

**Roth, D., Lemmer, H.,** 1994. Biofilms in sewer systems-characterization of the bacterial biocenosis and its metabolic activity. *Water Science & Technology* 29: 385-388.

**Sangave, P.C., Pandit, A.B.,** 2006. Enhancement in biodegradability of distillery wastewater using enzymatic pretreatment. *Journal of Environmental Management*. 78: 77-85.

**Sarath, G., La Motte, S., Wagner, F.W.,** 1989. Protease assay methods. In: BEYNON RJ., BOND JS. Ed. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford: IRL: 25-55.

**Shang, C., Wong, H.M., Chen, G.,** 2005. Bacteriophage MS-2 removal by submerged membrane bioreactor. *Water Research* 39: 4211-4219.

**Snyder, S.L., Sobocinski, P.Z.,** 1975. An improved 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. *Analytical Biochemistry* 64: 284-288.

**Spanjers, H., Olsson, G.,** 1992. Modelling of the dissolved oxygen probe response in the improvement of the performance of a continuous respiration meter. *Water Research* 26: 945-954.

**Thompson, L.M.M., MacLeod, R.A.**, 1974. Biochemical localization of alkaline phosphatase in the cell wall of a marine Pseudomonad. *Journal of Bacteriology* 117: 819-825.

**Vílchez, R.**, 2005. Eliminación de metales pesados de aguas subterráneas mediante sistemas de lechos sumergidos: estudio microbiológico de las biopelículas. Tesis doctoral, Instituto del agua, Universidad de Granada.

**Watson, S.D., Pletschke, B.I.**, 2006. The effect of sulfide on  $\alpha$ -glucosidases: Implications for starch degradation in anaerobic bioreactors. *Chemosphere* 65: 159-164.

**Watson, S.D, Akhurst, T., Whiteley, C.G., Rose, P.D., Pletschke, B.I.**, 2004. Primary sludge floc degradation is accelerated under biosulphidogenic conditions: enzymological aspects. *Enzyme and Microbial Technology* 34: 595-602.

**Whitaker, J.R.**, 1994. Principles of Enzymology for the Food Sciences. Marcel Dekker. New York.

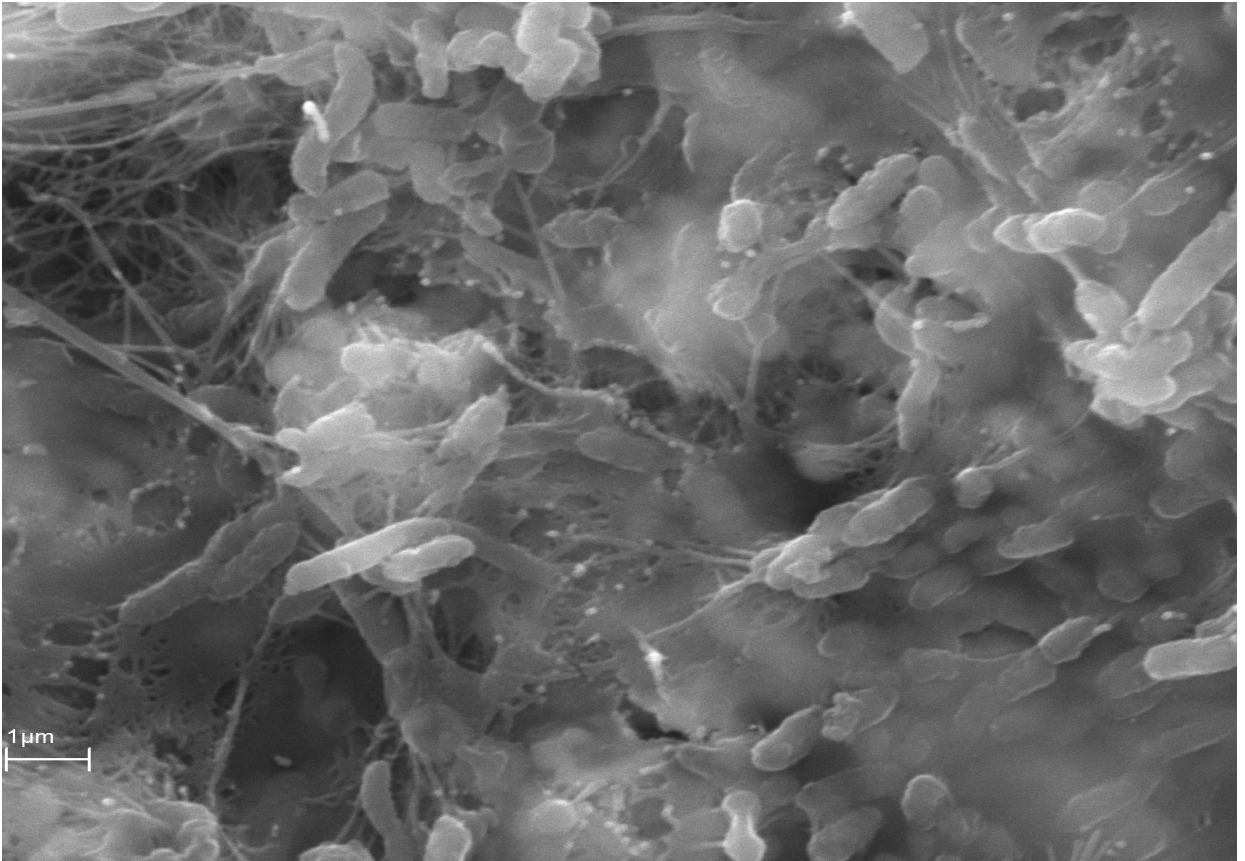
**Wong, W.K., Smith, D.W.**, 1992. Evaluation of an on-line specific oxygen uptake rate monitoring apparatus at the Gold Bar Wastewater Treatment Plant. *Environmental Technology* 13: 45-54.

**Xie, C., Lu, R., Huang, Y., Wang, Q., Xu, X.**, 2010. Effects of ions and phosphates on alkaline phosphatase activity in aerobic activated sludge system. *Bioresource Technology* 101: 3394-3399.



## Capítulo IV

# Evolución en la biodiversidad en la biopelícula en el tratamiento de un agua residual urbana con salinidad variable



#### IV.1. INTRODUCCIÓN

Las biopelículas son una comunidad compleja de bacterias, hongos, arqueas, protozoos, y otros meso y macro-invertebrados, constituidas mayoritariamente por bacterias y hongos (Lee Man Chu y Wong, 2006). La comunidad en las biopelículas es un factor importante para determinar la eficacia en los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Matsumoto *et al.*, 2007). La eficiencia del proceso depende en gran medida de la diversidad del biofilm (Fernández *et al.*, 2008).

Dependiendo de las condiciones ambientales, las biopelículas van a estar formadas por numerosas especies de microorganismos diferentes. La distribución de la biodiversidad a lo largo de gradientes ambientales como la salinidad ha sido de interés permanente para los científicos (Rosenzweig, 1995; Fisher, 1961). Una alta concentración de sal en aguas residuales orgánicas puede causar plasmólisis y muerte celular. Hay 2 estrategias fundamentales que explican la supervivencia de las células bajo condiciones de estrés osmótico (Vyrides y Stuckey, 2009):

1. Las células aumentan la concentración de iones intracelulares (principalmente potasio) con el fin de equilibrar la presión osmótica externa, y todas las enzimas intracelulares tienen que adaptarse a las nuevas condiciones (Müller *et al.*, 2005).
2. Muchos microorganismos acumulan solutos orgánicos llamados solutos compatibles. La alta presión osmótica externa se equilibra en el citoplasma por solutos orgánicos compatibles sin la necesidad de adaptación especial de las enzimas intracelulares.

La salinidad ha sido descrita como un factor importante que regula la diversidad bacteriana a través de muchos hábitat diferentes (Mohamed y Martiny, 2011; Lozupone y Knight, 2007; Bernhard *et al.*, 2005). La diversidad de las bacterias y hongos parecen variar a lo largo de gradientes de salinidad (Mohamed y Martiny, 2011).

La determinación de la identidad de los microorganismos responsables de los procesos específicos de biotransformación en entornos complejos siguen siendo uno de los

grandes retos de la microbiología ambiental e ingeniería ambiental (de los Reyes 3rd, 2010).

Inicialmente, la adquisición de conocimientos sobre la diversidad procariota estaba basada en técnicas microbiológicas tradicionales, las cuales consisten en la obtención de cultivos puros de los microorganismos en el laboratorio, en medios especialmente formulados para ello, y en la observación microscópica. Con el paso del tiempo, dichas técnicas se han mostrado insuficientes para la identificación y clasificación de los microorganismos.

Debido a las particularidades de los microorganismos, la clasificación en función de propiedades fisiológicas y bioquímicas es imposible, puesto que se estima que un 99% de la totalidad de los distintos microorganismos que existen en la naturaleza no han sido jamás aislados ni cultivados en condiciones de laboratorio (Muyzer, 1999). Esto se debe en gran parte a la falta de conocimientos sobre los requerimientos reales de los mismos en condiciones naturales, que nos impide emular estas condiciones en el laboratorio, así como discriminación, rango taxonómico al que son aplicables, reproducibilidad y asequibilidad para su interpretación y estandarización (Muyzer, 1999; Savelkoul *et al.*, 1999; Vaneechoutte, 1996).

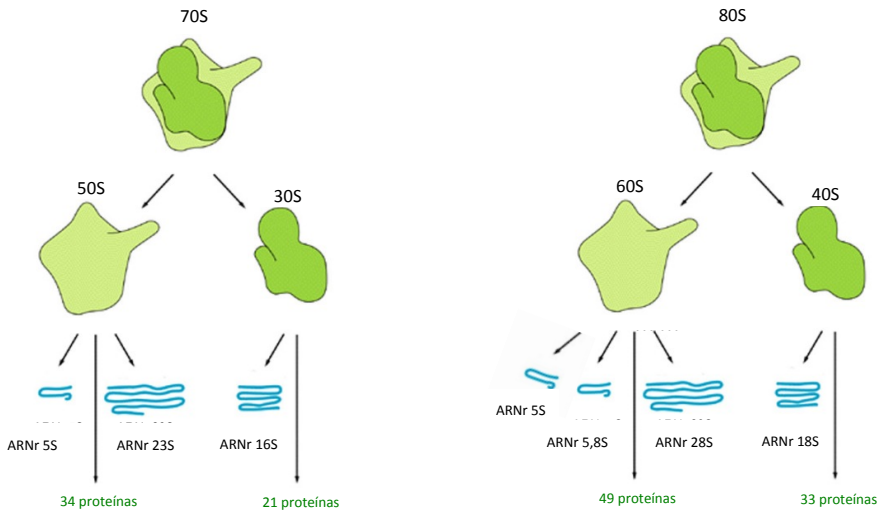
Un nuevo grupo de técnicas desarrolladas a partir de los años 80 y 90 ha revolucionado la ecología microbiana. La posibilidad de identificar poblaciones específicas de microorganismos en su hábitat natural, sin la necesidad de aislarlos, ha dado lugar a nuevas aplicaciones en numerosos campos de investigación (Sanz y Köchling, 2007).

### **IV.1.1. Aplicaciones de las técnicas de biología molecular al estudio de la diversidad microbiana en ecosistemas complejos**

La aplicación de técnicas de biología molecular ha representado un gran avance en el conocimiento de la diversidad microbiana, ya que se observó que era necesario proveer a los microorganismos, no sólo de características fenotípicas sino también genéticas.

Una de las aproximaciones más extendidas para explorar la diversidad a nivel genético se basa en la clonación y secuenciación de los genes que codifican el ARN ribosómico (figura IV.1), y en particular el gen que codifica el ARN 16S de la subunidad

pequeña del ribosoma bacteriano (ARNr16S) y el gen que codifica el ARN 18S de la subunidad pequeña del ribosoma eucariota (ARNr 18S).

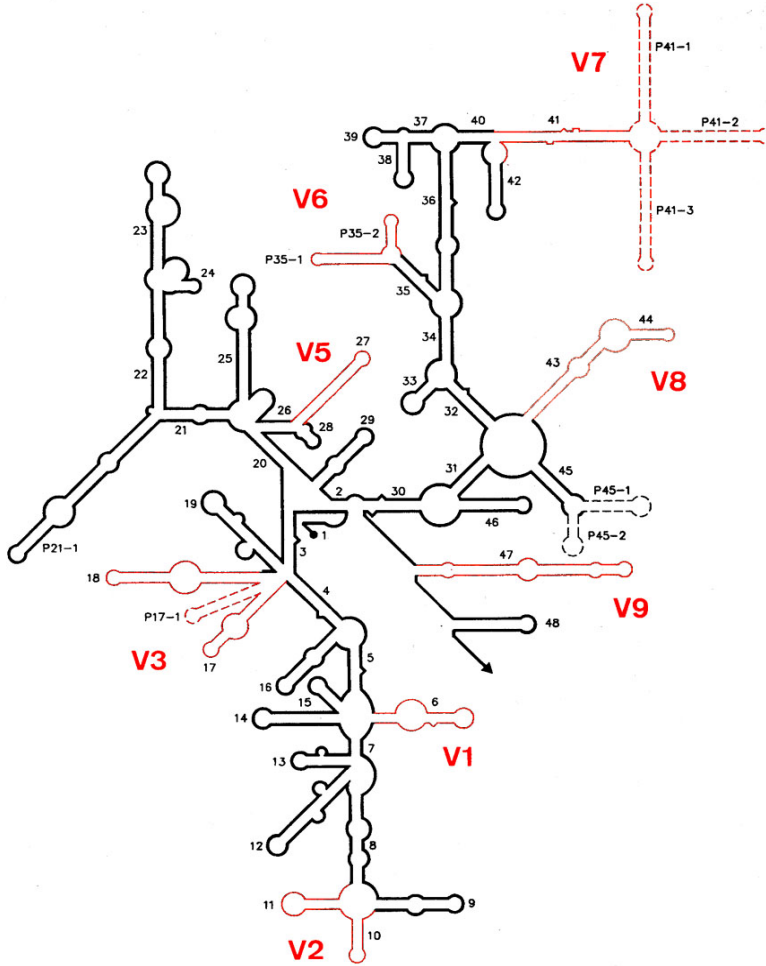


**Figura IV.1. Estructura y componentes del ribosoma procariota (70S) y eucariota (80S).**

Las secuencias del ARNr 16S y ARNr 18S tienen una estructura en mosaico, presentando una alternancia de regiones altamente conservadas y regiones hipervariables que sólo están conservadas entre los individuos evolutivamente muy próximos (figura IV.2). Esa estructura ha permitido el diseño de cebadores universales para la aplicación de estrategias de PCR (Weisburgh *et al.*, 1991), que posibilitan la clonación de fragmentos de los ARNr a partir de ADN total extraído de muestras naturales, y de este modo profundizar en el conocimiento de la diversidad de las comunidades en los ecosistemas naturales (Muyzer y Smalla, 1998).

En 1983, Fischer y Lerman (1983) introdujeron la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE). Posteriormente, Muyzer *et al.* (1993) describieron modificaciones de esta técnica para analizar poblaciones microbianas basadas en amplificaciones de fragmentos de genes ribosomales. Esta técnica, junto con su homóloga TGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente de Temperatura), fue inicialmente diseñada para

distinguir mutaciones genéticas, y permite la separación de fragmentos de ADN de igual tamaño pero de distinta secuencia de nucleótidos.



**Figura IV.2. Regiones hipervariables presentes en el ARN 16S procarionótico, denominadas V1 a V9 y resaltadas en rojo ( Neefs *et al.*,1990).**

El fundamento de la técnica se basa en la disminución de la velocidad electroforética que sufren las moléculas de ADN de doble cadena cuando se encuentran parcialmente desnaturalizadas, debido a cambios de la forma física de la molécula que afectan a su movilidad cuando migran en la matriz de un gel que contenga un gradiente

lineal de desnaturalizantes del ADN. El gradiente desnaturalizante se crea bien a partir de sustancias químicas (DGGE) o bien mediante un rango de temperaturas (TGGE) (Riesner *et al.*, 1989).

Cuando la electroforesis de una mezcla de fragmentos de ADN amplificados con cebadores universales a partir de ADN total extraído de una muestra ambiental se realiza en condiciones adecuadas en geles de poliacrilamida bajo un gradiente lineal de desnaturalizantes químicos o de temperaturas, las moléculas con distinta secuencia se desnaturalizan parcialmente a distintas alturas del gradiente, y por tanto se detienen en su migración electroforética en distintas posiciones en el gel (Muyzer, 1999; Muyzer y Smalla, 1998).

De esta forma, se obtienen perfiles de la composición de la comunidad en la muestra de partida. Una vez separadas, las bandas correspondientes a distintas secuencias de ADN pueden reamplificarse con los mismos cebadores universales y ser secuenciadas, permitiendo la comparación de las nuevas secuencias con las ya conocidas y depositadas en bases de datos, y de esta forma es posible establecer su afiliación taxonómica.

Las ventajas de esta técnica son múltiples: permite investigar la diversidad de una comunidad microbiana natural sin necesidad de aislar y estudiar individualmente sus componentes, posibilita la identificación de los microorganismos hasta nivel de especie, es apta para el análisis simultáneo de un elevado número de muestras, y permite comparar los perfiles de biodiversidad de la comunidad evaluando diferencias espaciales y temporales en un determinado nicho ecológico, así como el impacto producido por la introducción de agentes externos. Hoy día se considera una técnica de elección para la caracterización de comunidades naturales, en las que un porcentaje elevado de los microorganismos presentes pueden ser no cultivables (Muyzer, 1999).

Las técnicas de DGGE/TGGE son de una gran versatilidad y admiten numerosas variantes en su aplicación, siendo su principal limitación el tamaño máximo de los fragmentos a separar (<800 pb en DGGE).

DGGE y TGGE también tienen limitaciones intrínsecas a las técnicas moleculares, como la no correcta optimización del gradiente. Incluso en condiciones de gradiente optimizado, pueden aparecer bandas únicas que representen a varios organismos diferentes. Asimismo, existen microorganismos que generan más de una banda en el DGGE

y TGGE, debido a la existencia de copias diferentes de genes de ARNr en un mismo organismo (Head *et al.*, 1998). Por ejemplo *Bacillus subtilis* posee 10 operones de genes ARNr mientras que *Thermus thermophilus* posee 2 (Amann *et al.*, 1995), lo que condiciona los resultados cuantitativos. Por lo tanto, las fluctuaciones poblacionales deben analizarse de forma semicuantitativa (cantidades relativas dentro de una misma muestra).

## IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio de las comunidades microbianas presentes en la biopelícula mediante técnicas moleculares se escogieron 3 genes: el gen codificante del ARN ribosómico 16S, que permitió el estudio de las comunidades bacterianas totales y de las comunidades de arqueas, el gen codificante del ARN ribosómico 18S, con el fin de estudiar las comunidades de hongos presentes en el biofilm, y el gen *amoA* (gen estructural de la amonio-monooxigenasa, una de las enzimas funcionales para la fase I de la nitrificación), con el objetivo de estudiar específicamente las comunidades de las Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio. Para la obtención de los perfiles de biodiversidad en las distintas muestras de biopelícula procedentes del SFBBR en los 4 experimentos ensayados, se utilizó la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Las muestras de biofilm se obtuvieron los días 2, 5, 9 y 12 de cada ciclo de funcionamiento del SFBBR (figura IV.3).

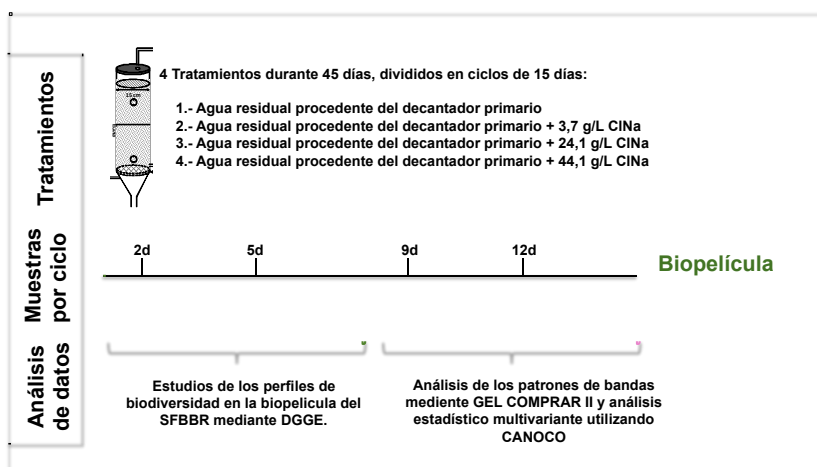


Figura IV.3. Esquema de los experimentos realizados en este estudio.

Para la realización de esta técnica fueron necesarios una serie de pasos, que consistieron en:

1. Extracción del ADN genómico total de las muestras de biopelícula.
2. Amplificación del gen codificante del ARNr 16S, del ARNr 18S y del gen estructural de la subunidad alfa de la enzima AmoA (*amoA*), mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
3. Separación de los fragmentos de distinta secuencia de ADN mediante DGGE.
4. Análisis de los patrones de bandas obtenidos mediante el programa Gel Compar II v.5.101 (Applied Maths, Bélgica) y análisis estadístico multivariante utilizando el programa Canoco v. 4.5 (ScientiaPro, Budapest, Hungría).

#### IV.2.1. Extracción de ADN total de la biopelícula del SFBBR

Para la obtención del ADN total (genómico) de las muestras de biopelícula procedentes del SFBBR se utilizó el kit comercial FastDNA Kit®, utilizando el instrumento FastPrep® (MP-BIO, Alemania) (figura IV.4). Previamente se realizó la extracción de la biopelícula del material de soporte según el protocolo descrito en el apartado III.2.1 del capítulo 3 de la memoria de esta tesis doctoral.



Figura IV.4. Instrumento FastPrep® para la extracción de ADN.

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

1. Se añadieron 200 mg de biopelícula a tubos de 2 mL, que contenían una matriz de lisis.



2. Se adicionaron 1 mL de una solución de lisis celular, tampón CLS-TC.
3. Se homogeneizó en el FastPrep® durante 40 segundos a una velocidad de 6.0. Este paso se repitió una vez para obtener un mayor rendimiento.
4. Se centrifugó a 14.000 g durante 10 minutos en una centrífuga Minispin plus Eppendorf®.
5. Se recuperaron 700 µL de sobrenadante en tubos limpios de 2 mL con un filtro SPIN™ y se adicionó la misma cantidad de la matriz de unión (binding matrix solution). A continuación se invirtieron los tubos durante 1 minuto para obtener una mezcla homogénea.
6. Se incubó en agitación suave durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Se centrifugó a 14.000 g durante 10 segundos en una centrífuga Minispin plus Eppendorf®, descartando el sobrenadante.
8. El sedimento se resuspendió en 500 µL de la solución de lavado SEWS-M con ayuda de una micropipeta.
9. Se centrifugó a 14.000 g durante 1 minuto en una centrífuga Minispin plus Eppendorf®, descartando el sobrenadante.
10. Se centrifugó a 14.000 g durante 1 minuto en una centrífuga Minispin plus Eppendorf® y se eliminó el líquido residual con ayuda de una micropipeta. El filtro SPIN™ se recuperó en un tubo limpio.
11. Con el fin de eluir el ADN unido a la membrana de filtración se añadieron 100 µL de DES. Se incubó durante 5 minutos a 55°C en un baño de agua.
12. Se centrifugó a 14.000 g durante 1 minuto en una centrífuga Minispin plus Eppendorf® y el ADN eluído se transfirió a un tubo limpio de 1,5 mL.

Tras este último paso, se comprobó el ADN extraído mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. Estos geles se prepararon en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, el cual también se empleó como tampón de electroforesis. La concentración de agarosa según el tamaño de los fragmento a separar fue del 0,8%. Las muestras de ADN se mezclaron con tampón de carga 6X, en una proporción 1/6 con el volumen de la muestra de ADN. En los tanques de electroforesis se empleó un voltaje de 90 V.

Los fragmentos de ADN separados en los geles de agarosa se observaron por

tinción de los geles mediante inmersión en una solución de bromuro de etidio ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) en tampón TBE durante 20-45 minutos y posterior visualización con luz ultravioleta, empleándose un equipo de análisis de imágenes Gel Doc 2000 (BioRad® Laboratorios, Hercules, California) equipado con el programa *Quantity One* version 4.0.3. (BioRad® Laboratorios, Hercules, California). El ADN genómico obtenido se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **TBE 10X**

108 g Tris base

55 g Ácido bórico

40 mL EDTA 0,5 M pH 8,0

Agua destilada c.s.p. 1 litro

#### **Tampón de carga 6X**

Azul de bromofenol 0,25%

TBE 6X

Glicerol 30%

### **IV.2.2. Determinación de la concentración de ADN**

Para determinar la concentración de ADN se empleó el espectrofotómetro UV-VIS NanoDrop 2000c (Thermo Scientific®). Se midió la absorbancia a 230, 260 y 280 nm de soluciones de ADN en DES (Solución de Elución de ADN, agua ultrapura), usando como blanco DES. Para determinar la pureza de la preparación (que no esté contaminada por proteínas, fenol, polisacáridos...) se calculó la relación  $A_{260}/A_{280}$  que debe ser mayor o igual que 1,8 y la relación  $A_{260}/A_{230}$  que debe ser mayor o igual que 2,2. La concentración se calcula respecto al valor estándar  $A_{260}=1$  para soluciones con  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  de ADN de cadena doble (Sambrook *et al.*, 1989).

### **IV.2.3. Amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para el estudio de la comunidad de Bacteria presentes en el SFBBR**

Para la amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S las muestras de ADN se sometieron a una reacción de PCR, donde se emplearon los cebadores universales 968GC y R1401, cuya secuencia se muestra en la tabla IV.1. Se amplificó una

región interna correspondiente a la región hipervariable V6-V8 (nucleótidos 968-1406, numeración de *Escherichia coli* (figura IV.5)), de un tamaño aproximado de 450 pb. La secuenciación del cebador 968GC está basada en una región conservada del gen a la que se añade una cola de cuarenta pares de bases ricas en GC, necesarias para la correcta separación mediante DGGE (Muyzer *et al.*, 1993).

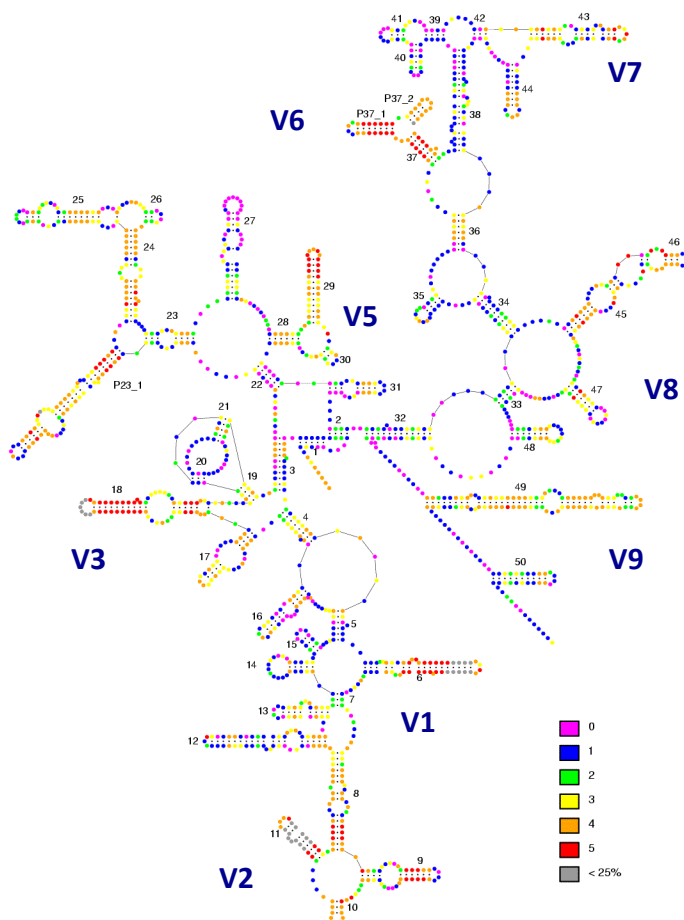


Figura IV.5. Estructura secundaria del ARNr 16S de *E. coli*. La escala de colores del 1 al 5 representa un grado creciente de variabilidad de la secuencia consenso para cada una de las bases, siendo representadas en color púrpura posiciones universalmente conservadas, y las bases representadas en color gris las menos conservadas. Se puede observar la abundancia de bases poco conservadas en las zonas correspondientes a las regiones hipervariables (Wuyts *et al.*, 2002).

**Tabla IV.1. Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR para la amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S.**

Cebador	Posición <sup>a</sup>	Secuencia (de 5' a 3')	Referencias
<b>968-GC*</b>	968-984	AACGCGAAGAACCTTAC	Lane, 1991; Yu y Morrison, 2004
<b>R1401</b>	1392-1406	CGGTGTGTACAAGACCC	Nubel <i>et al.</i> , 1996; Yu y Morrison, 2004

\*Cebador para DGGE con cola GC en el extremo 5'(CGCCCGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG).

<sup>a</sup> Posición de las bases en *E. coli*.

Para la mezcla de reacción se utilizaron los reactivos que se indican en la tabla IV.2. La reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 µL.

**Tabla IV.2. Reactivos empleados en la reacción de la PCR efectuada para amplificar fragmentos del gen codificante del ARNr 16S correspondientes a la regiones hipervariables V6-V8 en un volumen final de 50 µL.**

Reactivo	Volumen final (µL)
Tampón 5X Phire® F-524 (Finnzymes)	10
Mezcla de dNTPs (Promega)	1
Cebador 968GC	2,5
Cebador R1401	2,5
Phire®hot start II ADN polimerasa (Finnzymes)	1
ADN molde	1
Agua libre de nucleasas (Promega)	c.s.p. 50

Los cebadores empleados fueron sintetizados por Eurogentec (Bélgica).

Como ADN molde se utilizó el ADN genómico extraído en el apartado IV.2.1. Debido a la concentración del ADN obtenido fue necesario la dilución del mismo en una proporción 1:10 en agua libre de nucleasas (Promega).

Se empleó como ADN polimerasa la enzima Phire® Hot Start II DNA Polimerasa. Esta polimerasa incorpora un dominio de unión a ADN de doble cadena que permite

tiempos cortos de extensión (10-15 s/kb), mejora los rendimientos, y aumenta la fidelidad 2 veces en comparación con Taq DNA polimerasa. Utiliza la tecnología de inactivación Affibody<sup>®</sup>, que inactiva reversiblemente la ADN polimerasa a temperatura ambiente. A la temperatura de polimerización del ligando Affibody<sup>®</sup> se libera de la DNA polimerasa. Esto elimina completamente la necesidad de una etapa de reactivación de la ADN polimerasa en el protocolo, lo que acelera aún más la PCR.

El tampón 5X Phire<sup>®</sup> F-524 se caracteriza por llevar incorporado el MgCl<sub>2</sub>. Contiene 7,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, que incorpora 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> en las condiciones de la reacción final.

El programa de PCR se desarrollo empleando un termociclador G-storm GS1<sup>®</sup> (G-Storm & Kapa Biosystems) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 94°C durante 2 minutos.
2. 30 ciclos que constan de:
  - 2.1. Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos.
  - 2.2. Hibridación de los cebadores sobre el ADN molde desnaturalizado, annealing: 56°C durante 40 segundos.
  - 2.3. Extensión: 72°C durante 1 minuto.
3. Extensión final: 72°C durante 5 minutos.
4. Mantenimiento: 4°C.

Tras la reacción de PCR se tomaron alícuotas de 5 µL, se añadió 1 µL de tampón de carga 6X y se realizó electroforesis horizontal en geles de agarosa. Estos geles se prepararon en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X, el cual también se empleó como tampón de electroforesis (apartado IV.2.1). La concentración de agarosa según el tamaño de los fragmento a separar fue del 1%. Para la posterior visualización de los geles de agarosa, se añadió bromuro de etidio (1 µL/mL). El voltaje empleado fue normalmente de 85 V en tanques de electroforesis grandes. Las muestras de mezclaron con tampón de carga a la concentración 6X, utilizando una proporción 1/6 con el volumen del producto de PCR.

Los fragmentos del gen codificante del ARNr 16S amplificados y separados en los geles de agarosa se observaron con luz UV en un transiluminador. Las fotografías se realizaron con un equipo de análisis de imágenes Gel Doc 2000 (BioRad® Laboratorios, Hercules, California), equipado con el programa *Quantity one* versión 4.0.3 (BioRad® Laboratorios, Hercules, California).

#### IV.2.4. Amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 18S por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para el estudio de la comunidad de hongos presentes en el SFBBR

Para el análisis de la comunidad de hongos se amplificaron fragmentos de ARNr 18S (aproximadamente 320 pb), utilizando los cebadores NS1 y fung-GC (figura IV.6), sintetizados por Eurogentec (Bélgica). El cebador Fung-GC contiene una cola de 40 bases requerida para una óptima DGGE (May *et al.*, 2001).

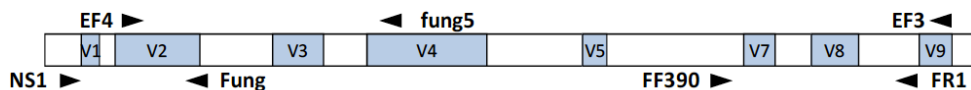


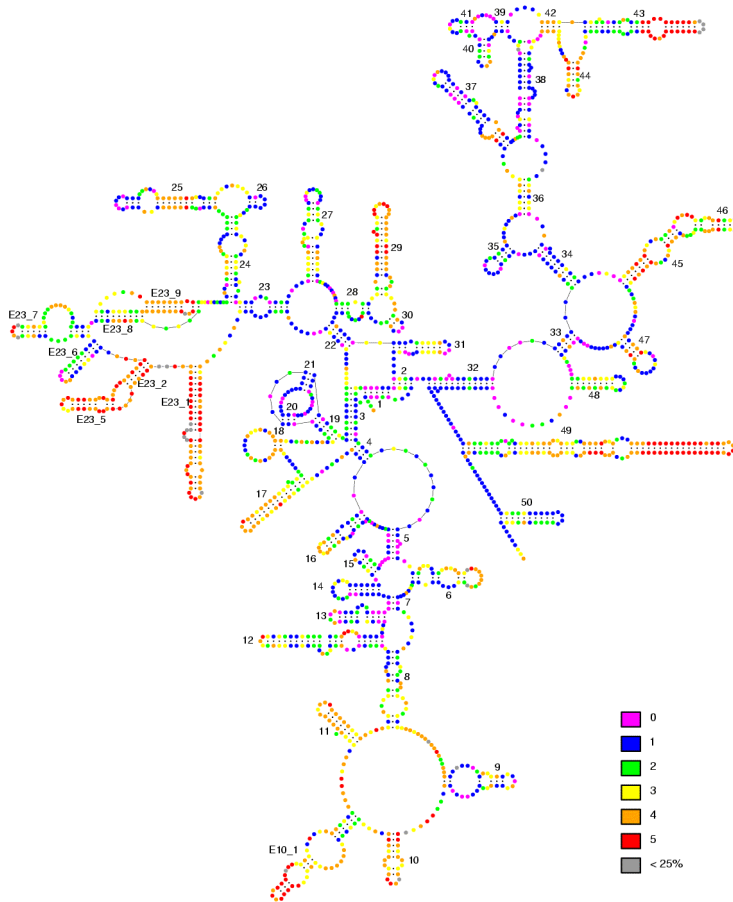
Figura IV.6. Posición de los cebadores utilizados en la reacción de PCR en las regiones hipervariables del ARNr 18S.

Tabla IV.3. Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR para la amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 18S.

Cebador	Posición <sup>a</sup>	Secuencia (de 5' a 3')	Referencias
Fung-GC*	20-38	ATCCCCGTTACCCGTTG	May <i>et al.</i> , 2001
NS1	351-368	GTAGTCATATGCTTGCTC	White <i>et al.</i> , 1990

\*Cebador para DGGE con cola GC en el extremo 5' (CGCCCGCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCGCCCGCCC).

<sup>a</sup> Posición de las bases en *S. cerevisiae*, N° de acceso en GenBank J01353.



**Figura IV.7.** Estructura secundaria del ARNr 18S de *S. cerevisiae*. La escala de colores del 1 al 5 representa un grado creciente de variabilidad de la secuencia consenso para cada una de las bases, siendo representadas en color púrpura posiciones universalmente conservadas, y las bases representadas en color gris las menos conservadas (Wuyts *et al.*, 2002).

Los componentes de la reacción de PCR se muestran en la tabla IV.4. La reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50  $\mu$ L.

**Tabla IV.4. Reactivos empleados en la reacción de la PCR efectuada para amplificar fragmentos del gen codificante del ARNr 18S.**

Reactivo	Volumen final (µL)
Tampón 5X Phire® F-524 (Finnzymes)	10
Mezcla de dNTPs (Promega)	1
Cebador Fung-GC	2,5
Cebador NS1	2,5
Phire®hot start II ADN polimerasa (Finnzymes)	1
ADN molde	1
Agua libre de nucleasas (Promega)	c.s.p. 50

Debido a la concentración de ADN genómico obtenido en el proceso de extracción (apartado IV.2.1), fue necesaria la dilución del mismo en una proporción 1:10 en agua libre de nucleasas (Promega) con la finalidad de optimizar los resultados de la PCR. Esta dilución de ADN genómico fue empleada como ADN molde en la PCR.

Con objeto de optimizar la temperatura de hibridación de los cebadores NS1 y fung-GC sobre el ADN molde desnaturalizado (temperatura de annealing) se realizó una PCR con gradiente de temperatura. La temperatura óptima de annealing determinada fue 55°C.

El programa de PCR consistió en los siguientes ciclos térmicos, empleando un termociclador G-storm GS1® (G-Storm & Kapa Biosystems):

1. Desnaturalización inicial: 98°C durante 1 minuto.
2. 30 ciclos que constan de:
  - 2.1. Desnaturalización: 98°C durante 5 segundos.
  - 2.2. Hibridación de los cebadores sobre el ADN molde desnaturalizado, annealing: 55°C durante 20 segundos.
  - 2.3. Extensión: 72°C durante 40 segundos.
3. Extensión final: 72°C durante 5 minutos.
4. Mantenimiento: 4°C.



Tras la reacción de PCR se tomaron alícuotas de 5 µL, se realizó electroforesis horizontal en geles de agarosa y se observaron con luz UV en un transiluminador, tal y como se indica en el apartado IV.2.3.

#### IV.2.5. Amplificación de fragmentos del codificante del ARNr 16S por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para el estudio de la comunidad de arqueas presentes en el SFBBR

Para amplificar una región interna del ARNr 16S correspondiente a las regiones hipervariables V6-V8, las muestras de ADN obtenidas según se detalla en el apartado IV.2.1, diluidas 1:10 en agua libre de nucleasas (Promega), se sometieron a una estrategia de PCR semianidada, donde se realizaron dos reacciones consecutivas de amplificación. Para la primera PCR se utilizaron los cebadores ARCH915 y UNI-b-rev, y para la segunda PCR se emplearon los cebadores ARCH915-GC y UNI-b-rev amplificándose 492 pares de bases (Yu *et al.*, 2008; Kleikemper *et al.*, 2005). Los cebadores empleados fueron sintetizados por Eurogentec (Bélgica).

**Tabla IV.5. Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR para la amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S.**

Cebador	Posición <sup>a</sup>	Secuencia (de 5' a 3')	Referencias
<b>ARCH915</b>	915-934	AGGAATTGGCGGGGAGCAC	Kleikemper <i>et al.</i> , 2005
<b>UNI-b-rev</b>	1390-1407	GACGGCGGTGTGTRCAA	Kleikemper <i>et al.</i> , 2005
<b>ARCH915-GC*</b>	915-934	AGGAATTGGCGGGGAGCAC	Kleikemper <i>et al.</i> , 2005

\*Cebador para DGGE con cola GC de 40 bases en 5'(CGCCCGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGG).

<sup>a</sup> Posición de las bases en *E. coli*.

En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos que se muestran en la tabla IV.6. La reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 µL.

**Tabla IV.6. Reactivos empleados en la reacción de la PCR efectuada para amplificar fragmentos del gen codificante del ARNr 16S correspondientes a la regiones hipervariables V6-V8 en un volumen final de 50  $\mu$ L.**

Reactivo	Volumen final ( $\mu$ L)
Tampón 5X Phire® F-524 (Finnzymes)	10
Mezcla de dNTPs (Promega)	1
Cebador ARCH915 ó ARCH915-GC	2,5
Cebador UNI-b-rev	2,5
Phire®hot start II ADN polimerasa (Finnzymes)	1
ADN molde	1
Agua libre de nucleasas (Promega)	c.s.p. 50

Las condiciones de la reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos para arqueas fueron:

1. Desnaturalización inicial: 98°C durante 1 minuto.
2. 20 ciclos que constan de:
  - 2.1. Desnaturalización: 98°C durante 5 segundos.
  - 2.2. Hibridación de los cebadores sobre el ADN molde desnaturalizado, annealing: 68°C durante 20 segundos.
  - 2.3. Extensión: 72°C durante 20 segundos.
3. Extensión final: 72°C durante 5 minutos.
4. Mantenimiento: 4°C.

El programa de PCR se desarrollo en un termociclador G-storm GS1® (G-Storm & Kapa Biosystems).

Tras la primera reacción, se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ L que se comprobaron en gel de agarosa al 1% mediante electroforesis horizontal, para detectar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado (475 bp), observando el gel de agarosa con luz UV en un

transiluminador (ver apartado IV.2.3). Una vez comprobadas dichas bandas, las muestras fueron sometidas a la segunda PCR en idénticas condiciones. La segunda reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50  $\mu$ L, con las mismas cantidades de todos los reactivos (tabla IV.6). Tras la reacción se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ L que se comprobaron nuevamente empleándose electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% (ver apartado IV.2.3) y se observaron en un transiluminador con luz UV.

### **IV.2.6. Amplificación de fragmentos del gen estructural de la subunidad $\alpha$ de la enzima amonio-monooxigenasa (*amoA*) mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para el estudio de la comunidad de bacterias oxidadoras de amonio (AOB) presentes en el SFBBR**

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

Las muestras de ADN, diluidas 1:10 en agua libre de nucleasas (Promega), se sometieron a una reacción de PCR utilizando la estrategia semianidada optimizada por Nicolaisen y Ramsing (2002) empleando cebadores exentos de degeneraciones en la secuencia oligonucleotídica, con lo que se consigue una mayor especificidad de la amplificación y mejor calidad de los perfiles de bandas.

Para la primera PCR se emplearon los cebadores *amoA*-1F y *amoA*-2R, y para la segunda PCR se emplearon los cebadores universales *amoA*-1F-GC y *amoA*-2R (Rotthauwe *et al.*, 1997). La secuencia de todos los cebadores empleados (Eurogentec, Bélgica) se muestra en la tabla IV.7.

La PCR amplificó una región específica del gen *amoA* de 491 pb.

**Tabla IV.7. Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR semianidada. En negrita se indica la cola rica en GC.**

Cebador	Posición <sup>a</sup>	Secuencia (de 5' a 3')	Referencias
<b>AmoA-1F</b>	332-349	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	Rotthauwe <i>et al.</i> ,1997
<b>AmoA-2R-TC</b>	802-822	CCC CTC TGC AAA GCC TTC TTC	Rotthauwe <i>et al.</i> ,1997
<b>AmoA-1F-GC*</b>	332- 349	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	Rotthauwe <i>et al.</i> ,1997

5' (CGCCCCCGCGCGCGCGGGCGGGGGCAGGGGGG) (Muyzer *et al.* 1993)

<sup>a</sup> Posición de las bases en el gen *amoA* de *Nitrosomonas europaea* (Rotthauwe *et al.*,1997)

La primera reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 µl. En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos que se indican en la tabla IV.8.

**Tabla IV.8. Reactivos empleados en la reacción de la PCR semianidada efectuada para amplificar fragmentos del gen estructural de la subunidad α de la enzima amonio-monooxigenasa (*amoA*) en un volumen final de 50 µL.**

Reactivo	Volumen final (µL)
Tampón 5X Phire® F-524 ( Finnzymes)	10
Mezcla de dNTPs (Promega)	1
Cebador AmoA-1F ó AmoA-1F-GC	2,5
Cebador AmoA-2R-TC	2,5
Phire®hot start II ADN polimerasa (Finnzymes)	1
ADN molde	1
Agua libre de nucleasas (Promega)	c.s.p. 50

El programa de PCR se desarrolló empleando un termociclador G-storm GS1® (G-Storm & Kapa Biosystems ) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 98°C durante 1 minutos.
2. 20 ciclos que constan de:
  - 2.1. Desnaturalización: 98°C durante 5 segundos.

- 2.2. Hibridación de los cebadores sobre el ADN molde desnaturalizado, annealing: 63°C durante 40 segundos.
- 2.3. Extensión: 72°C durante 40 segundos.
  
3. Extensión final: 72°C durante 5 minutos.
4. Mantenimiento: 4°C.

Tras la primera reacción, se tomaron alícuotas de 5 µL que se comprobaron en gel de agarosa al 1% mediante electroforesis horizontal, para detectar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado (475 bp), observando el gel de agarosa con luz UV en un transiluminador (ver apartado IV.2.3). Una vez comprobadas dichas bandas, las muestras fueron sometidas a la segunda PCR en idénticas condiciones. La segunda reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 µL, con las mismas cantidades de todos los reactivos (tabla IV.8). Tras la reacción se tomaron alícuotas de 5 µL que se comprobaron nuevamente empleándose electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% (ver apartado IV.2.3) y se observaron en un transiluminador con luz UV.

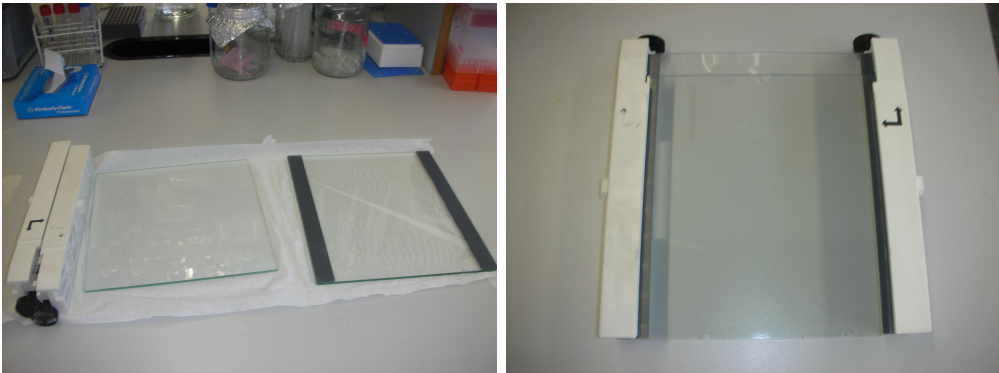
### **IV.2.7. Separación de las muestras mediante electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)**

La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) se realizó según el protocolo de Muyzer *et al.* (1993) utilizando el sistema DCode Universal Mutation Detection System® (BioRad® Laboratorios, Hercules, California) con las siguientes modificaciones. Los geles de poliacrilamida constaban de 0,5X Tris-acetato-EDTA (pH 8,0) y 8% (vol/vol) de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida, 37,5:1).

#### **IV.2.7.1. Preparación del gel de acrilamida**

Para la realización del gel desnaturalizante de acrilamida se preparó el “sándwich”. Se limpió cuidadosamente todo el material (cristales, espaciadores, peines, etc.) con un detergente no abrasivo, se secó cuidadosamente y posteriormente se limpió de nuevo con etanol al 96%. Es especialmente importante eliminar los restos de silicona de electroforesis anteriores.

Debido a la fragilidad del gel de acrilamida (gel de 0,2 mm de grosor) se colocó entre los cristales un film transparente flexible de poliéster (“Gelbond® PAG Film for Acrylamide gels”). Los monómeros de acrilamida se adhieren de forma covalente al film durante el proceso de polimerización del gel, permaneciendo unidos al film durante la electroforesis y el posterior proceso de tinción.



**Figura IV.8. Cristales, espaciadores y abrazaderas y ensamblamiento de los mismos para la realización del “sándwich”.**

La base del gel de poli(acrilamida) se preparó con la siguiente solución:

- 1,5 mL de solución desnaturalizante 0%
- 4,5  $\mu$ L de TEMED (tetrametiletilendiamina, (Sigma®))
- 15  $\mu$ L de APS (persulfato de amonio) al 10%

En el sándwich, entre los 2 cristales, se adicionó 1 mL de la solución y se dejó polimerizar al menos 30 minutos antes de preparar el gel de poli(acrilamida).

Para la elaboración del gel se emplearon 2 soluciones al 8% (p/v) de acrilamida con TAE 1X, una de las cuales con un 0% de contenido desnaturalizante y la otra con un 80% de contenido desnaturalizante. Se utilizaron las soluciones de acrilamida de 0% y 80% para crear el gradiente deseado. Como sustancias polimerizantes se emplearon una

solución de APS al 10% y TEMED. Los diferentes gradientes utilizados dependen del grupo microbiano analizado, y se muestran en la tabla IV.9.

### **Solución TAE 50X**

242 g TRIS-base

57,1 mL Ácido acético glacial

100 mL EDTA 0,5M pH 8,0

Agua bidestilada milliQ c.s.p 1000 mL

### **Solución desnaturalizante 0%: solución 8% de poliacrilamida con 0% agentes desnaturalizante\***

50 mL acrilamida (40% Acrilamida/Bisacrilamida 37.5:1 (BioRad))

2,5 mL TAE 50X

5 mL Glicerol

Agua bidestilada milliQ c.s.p 250 mL

### **Solución desnaturalizante 80%: solución 8% de poliacrilamida con 80% agentes desnaturalizantes\***

50 mL 40% Acrilamida/Bisacrilamida 37.5:1 (BioRad))

80 mL Formamida desionizada

2,5 mL TAE 50X

5 mL Glicerol

84,3 g Urea (grado de biología molecular)

Agua bidestilada milliQ c.s.p 250 mL

\*El 100% de agente desnaturalizante representa acrilamida al 8% p/v en TAE 1X con un 7M de urea y un 40% (p/v) de formamida desionizada. Un 0% de agente desnaturalizante representa acrilamida al 8%(p/v) en TAE 1X sin urea ni formamida. Las soluciones stock se conservaron a 4°C hasta su utilización.

Una vez preparado el gradiente desnaturalizante se empleó para elaborar el gel de poliacrilamida una bomba peristáltica y una cubeta generadora de gradientes lineales, tal y como se puede observar en la figura IV.9. El gradiente se formó, mediante agitación con muesca magnética de uno de los compartimentos de la cubeta, permitiendo la comunicación, tipo vasos comunicantes, entre los 2 compartimentos de la cubeta generadora de gradiente, y además simultáneamente, la bomba peristáltica transportaba el contenido final hacia los soportes verticales de cristal para formar el gel desnaturalizante

(figura IV.9). Se enrasó el volumen restante de gel con 9 ml adicionales de acrilamida 8% con un 0% de formamida-urea<sup>a</sup> según muestra la tabla IV.9. El gel de poliacrilamida se dejó polimerizar durante 1 hora a temperatura ambiente (25°C).

**Tabla IV.9. Gradientes de electroforesis para los diferentes grupos microbianos.**

Grupo	Gradiente	0% (mL)	80% (mL)	TEMED (μL)	APS(μL)
Bacteria	30%	8,1	4,9	13	50
	55%	4,1	8,9	13	50
Hongos	20%	9,8	3,3	13	50
	40%	6,5	6,5	13	50
Arqueas	30%	8,1	4,9	13	50
	60%	3,3	9,8	13	50
AOB( <i>amoA</i> )	30%	8,1	4,9	13	50
	55%	4,1	8,9	13	50

<sup>a</sup>Cada gel, una vez terminado el gradiente lleva 9 mL de la solución desnaturalizante 0% con TEMED y APS como gel apelmazante.

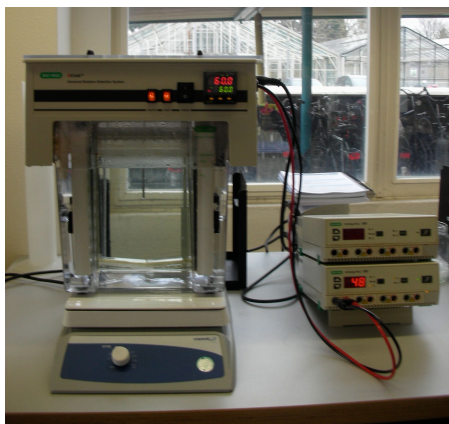


**Figura IV.9. Bomba peristáltica y cubeta generadora de gradientes (Econopump; BioRad Laboratorios, Hercules, California).**



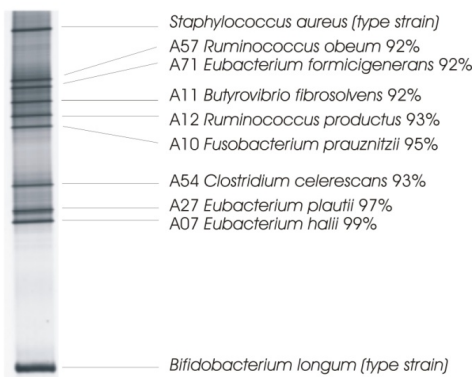
### IV.2.7.2. Separación de las muestras mediante DGGE

La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante se realizó empleando el sistema “DCode Universal Mutation Detection System® (BioRad) (figura IV.10). Se utilizó tampón TAE 0,5X a una temperatura de 60°C. Tras cargar las muestras en el gel de poliacrilamida se aplicó una corriente inicial de 200 V durante 5 minutos y posteriormente se sometió el gel a 85 V durante 16 horas para la separación electroforética.



**Figura IV.10. Sistema “DCode Universal Mutation Detection System® (BioRad® Laboratorios, Hercules, California) para la realización de DGGE.**

Como patrón de separación para los fragmentos de ADN se empleó un marcador (Wako Chemicals GmbH, Alemania) de 10 especies a partir de las cepas de colección que se muestran en la figura IV.11.



**Figura IV.11. Marcador utilizado en la DGGE, compuesto por una mezcla de ADN amplificado a partir de 10 cepas de bacterias de colección.**

### IV.2.7.3. Tinción y visualización de los DGGE

Tras la electroforesis, los geles de poliacrilamida se tiñeron con plata, siguiendo el protocolo descrito en bibliografía por Sanguinetta *et al.* (1994):

200 mL solución fijadora Cairn 1X durante 3 minutos

200 mL solución de tinción de plata durante 10 minutos

Agua bidestilada milliQ durante 2 minutos

200 mL solución de revelado hasta el color deseado

200 mL solución fijadora Cairn 1X durante 5 minutos

Agua bidestilada milliQ durante 2 minutos

200 mL solución de conservación durante 7 minutos

A continuación el gel se cubrió con celofán (“cellophane sheets”, Amersham Biosciences) y se secó a 60°C durante 24 horas en un horno.

---

#### **Solución de fijación Cairn 8X**

200 mL Etanol 96%

10 mL Ácido acético

Agua bidestilada milliQ c.s.p. 250 mL

#### **Solución de fijación Cairn 1X**

50 mL Solución de fijación Cairn 8X

Agua bidestilada milliQ c.s.p. 400 mL

#### **Solución de tinción de plata**

0,4 g Nitrato de plata

200 mL Solución de fijación Cairn 1X

#### **Solución de revelado**

250 mL Solución de NaOH 1,5%

750 µL Formaldehído

punta de espátula Borohidrato sódico (NaBH<sub>4</sub>)

#### **Solución de conservación**

250 mL Etanol 96%

100 mL Glicerol

Agua bidestilada milliQ c.s.p. 1000 mL

### IV.2.8. Análisis informático de los perfiles de DGGE

Los geles obtenidos se digitalizaron en un densitómetro modelo GS-800™ (BioRad® Laboratorios, Hercules, California) y cada imagen digitalizada se analizó mediante el programa *Quantity one* 4.5.0 (BioRad® Laboratorios, Hercules, California).

Los patrones de bandas obtenidos mediante DGGE se analizaron con el programa Gel Compar II v. 5.101 (Applied Maths BVBA, Bélgica). Se construyeron dendrogramas que relacionasen los distintos perfiles utilizando el coeficiente numérico de correlación de Pearson y el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*). El coeficiente de Pearson no depende de la asignación de bandas, sino que relaciona los distintos perfiles en función de la similitud de curvas densitométricas completas, teniendo en cuenta por tanto la intensidad relativa de las bandas. Este método se recomienda para una interpretación rápida y fiable de perfiles de comunidad generados mediante DGGE/TGGE (Van Verseveld y Röling, 2004).

Adicionalmente las bandas presentes en los geles se analizaron en función de su similitud, aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice. Este método establece la similitud entre los perfiles en función de las posiciones relativas de las bandas, pero sin tener en cuenta su densidad (intensidad), basándose únicamente en la presencia/ausencia de bandas.

Como método para evaluar la fiabilidad del dendrograma, se calcularon los coeficientes de correlación cofenética, que expresan la consistencia de un cluster calculando la correlación entre similitudes del dendrograma y la matriz de distancia por pares.

Para el análisis estadístico de los geles se empleó el programa Canoco v.4.5 software (ScientiaPro, Budapest, Hungría). La intensidad relativa de cada banda se calculó dividiendo el área de su superficie por la suma de todas las áreas de todas las bandas presentes en el carril, dando resultados entre 0 y 1. Esta normalización se realizó para corregir las diferencias entre intensidades absolutas de cada banda, causadas por distintas intensidades en la tinción de geles, así como la variación en la cantidad de producto cargado de cada muestra.

### IV.3. RESULTADOS

Con el fin de evaluar el impacto de los influentes salinos sobre la biodiversidad de la biopelícula en el SFBBR, se realizaron estudios basados en la técnica independiente de cultivo PCR-DGGE, que proporciona perfiles de comunidades en ecosistemas complejos. Dichos perfiles se realizaron estudiando el conjunto de la comunidad del dominio Bacteria, y se obtuvieron además perfiles específicos de otras comunidades representativas de los sistemas de tratamiento de aguas residuales, como arqueas, hongos y Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio.

Las muestras analizadas se tomaron periódicamente del SFBBR durante los 4 experimentos. Con objeto de observar en un mismo gel la evolución de la biodiversidad en los 4 experimentos, se decidió seleccionar las muestras correspondientes al tercer ciclo de cada experimento, el cual es representativo de la biodiversidad en los otros 2 ciclos restantes. los tiempos de muestreo fueron los días 2, 5, 9 y 12 de cada ciclo de funcionamiento. Las muestras del primer experimento se denominaron 1,1; 1,2; 1,3 y 1,4; las correspondientes al 2 segundo experimento 2,1; 2,2; 2,3 y 2,4; las del experimento 3, 3,1; 3,2; 3,3 y 3,4; y las correspondientes al experimento 4 se denominaron 4,1; 4,2; 4,3 y 4,4. Se llevo a cabo la extracción de ADN en todas las muestras de biopelícula estudiadas.

La técnica utilizada para el análisis de las comunidades (DGGE), sólo permite detectar las poblaciones que muestren una abundancia relativa superior al 1% (Muyzer y Smalla, 1998) por ello tan sólo se detectan las bandas correspondientes a poblaciones mayoritarias.

#### IV.3.1. Perfiles de biodiversidad de Bacteria en las muestras de biopelícula

Se amplificó una región hipervariable del gen codificante del ARNr 16S (V6-V8), empleando para la PCR cebadores específicos para Bacteria. Los fragmentos resultantes tuvieron un tamaño aproximado de 450 pb.

En la figura IV.12 se muestran los perfiles de biodiversidad de la comunidad de Bacteria correspondientes a las muestras de biopelícula procedentes del tercer ciclo de funcionamiento de SFBBR de los 4 experimentos. En éste y en los siguientes apartados, el

carril nombrado como M (marcador) en las figuras, corresponde a una mezcla de ADN amplificado a partir de varias cepas de especies bacterianas conocidas.

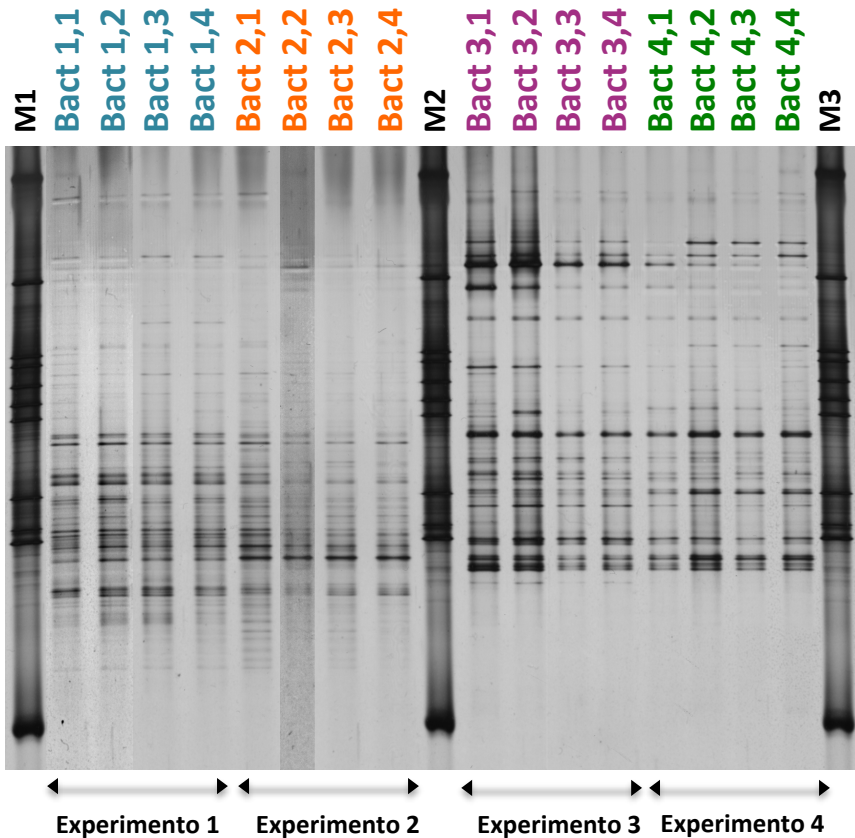


Figura IV.12. Análisis de la biodiversidad microbiana de la comunidad de Bacteria (basado en la región V6-V8 del gen codificante del ARNr 16S) en las muestras de biopelícula procedentes del SFBBR mediante la técnica de DGGE durante los experimentos 1, 2, 3 y 4. M= Marcador de 10 especies (ver apartado IV.2.7.2).

Al observar el gel, se aprecia que todos perfiles de bandas obtenidos en las distintas muestras de biopelícula están compuestos por un elevado número de bandas, y a simple vista se aprecian diferencias según la concentración salina del influente. En particular, se observaron claras diferencias entre los perfiles de biodiversidad correspondientes a las muestras de los experimentos 1 y 2, comparadas con los experimentos 3 y 4.

Para obtener una mayor información, los perfiles de bandas se normalizaron y se analizaron mediante el programa informático Gel Compar II v. 5.101 (Applied Maths BVBA, Bélgica), aplicando el coeficiente numérico de correlación de Pearson y el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*). El dendrograma resultante (figura IV.13) muestra una evidente segregación de las muestras según la concentración de sal en el influente. Las muestras se separan en dos grandes clusters, con un porcentaje de similitud del 33,6% entre ellos. El primer cluster agrupa todas las muestras de los experimentos 3 y 4, y a su vez se divide en dos subclusters (similitud 74,4%). En este primer cluster principal observamos en todas las muestras una banda con idéntico comportamiento electroforético (marcadas en la fotografía con un recuadro rojo), que sólo se detecta a concentraciones de sal elevadas en el influente ( $\geq 24,1$  g/L).

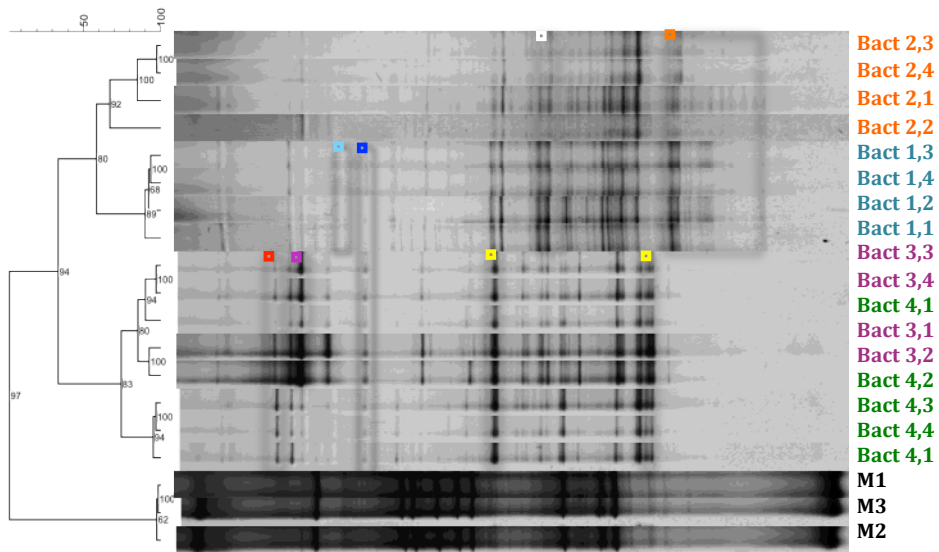


Figura IV.13. Dendrograma obtenido al analizar perfiles de bandas del DGGE de las comunidades de Bacteria presentes en las muestras de biopelícula del SFBBR, utilizando el programa Gel Compar II v. 5.101 (Applied Maths, Bélgica) aplicando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y el coeficiente de Pearson. La barra superior muestra la similitud entre los perfiles de bandas (%) y los números entre las ramas representan el coeficiente de correlación cofenética.

El segundo cluster principal también se segrega en 2 subclusters, con un porcentaje de similitud del 58,4%, cada uno de los cuales corresponde respectivamente a las muestras de los experimentos 1 y 2. Observamos en este caso en todas las muestras del cluster un grupo de bandas que migran a la misma altura y que sólo están presentes en las muestras correspondientes a estos experimentos (marcadas con un recuadro naranja).

En la figura IV.13 podemos observar una banda que sólo está presente durante los experimentos 1, 3 y 4 (marcada con un recuadro azul) y 1 banda que solamente está presente durante el experimento 1 (marcada con un recuadro turquesa).

Por otra parte, existen también diferencias significativas en la intensidad relativa de algunas bandas. Ejemplos de bandas que se detectan siempre a mayor intensidad en las muestras de biopelículas correspondientes a los experimentos 3 y 4 se muestran en la Figura IV.13 (marcadas con recuadros amarillos). También es significativo el aumento de intensidad de una banda durante el experimento 3 (marcada con un recuadro morado) y una banda que disminuyó de intensidad durante los experimentos 3 y 4 (marcada con un recuadro blanco).

Se realizó un análisis complementario utilizando el mismo programa informático (Gel Compar II) y el algoritmo UPGMA, pero aplicando en este caso el coeficiente de Dice, que relaciona los perfiles de bandas en función de su similitud, basándose únicamente en la presencia/ausencia de las bandas sin tener en cuenta la intensidad de las mismas. De manera análoga al análisis realizado con el coeficiente numérico de Pearson, el correspondiente dendrograma (figura IV.14) indica que el perfil de la comunidad de Bacteria se segregó también en dos clusters principales, con un porcentaje de similitud entre ellos del 73,3%, uno de los cuales agrupa las muestras de los experimentos 3 y 4, y el otro agrupa las muestras de los experimentos 1 y 2. Al observar el dendrograma, comprobamos que los perfiles de las muestras de biopelícula en cada cluster principal se separan en 2 subclusters.

En el dendrograma se reconocen un total de 78 clases de banda (figura IV.14B). Cabe destacar una clase de banda que sólo está presente durante los experimentos 1, 3 y 4 (marcada con un recuadro azul); otra clase de banda que sólo está presente en el experimento 4 (marcada con un recuadro verde); 1 clase de banda característica del

experimento 1 (marcada con un recuadro turquesa) y una clase de banda que sólo está presente durante los experimentos 3 y 4 (marcada con un recuadro rojo).

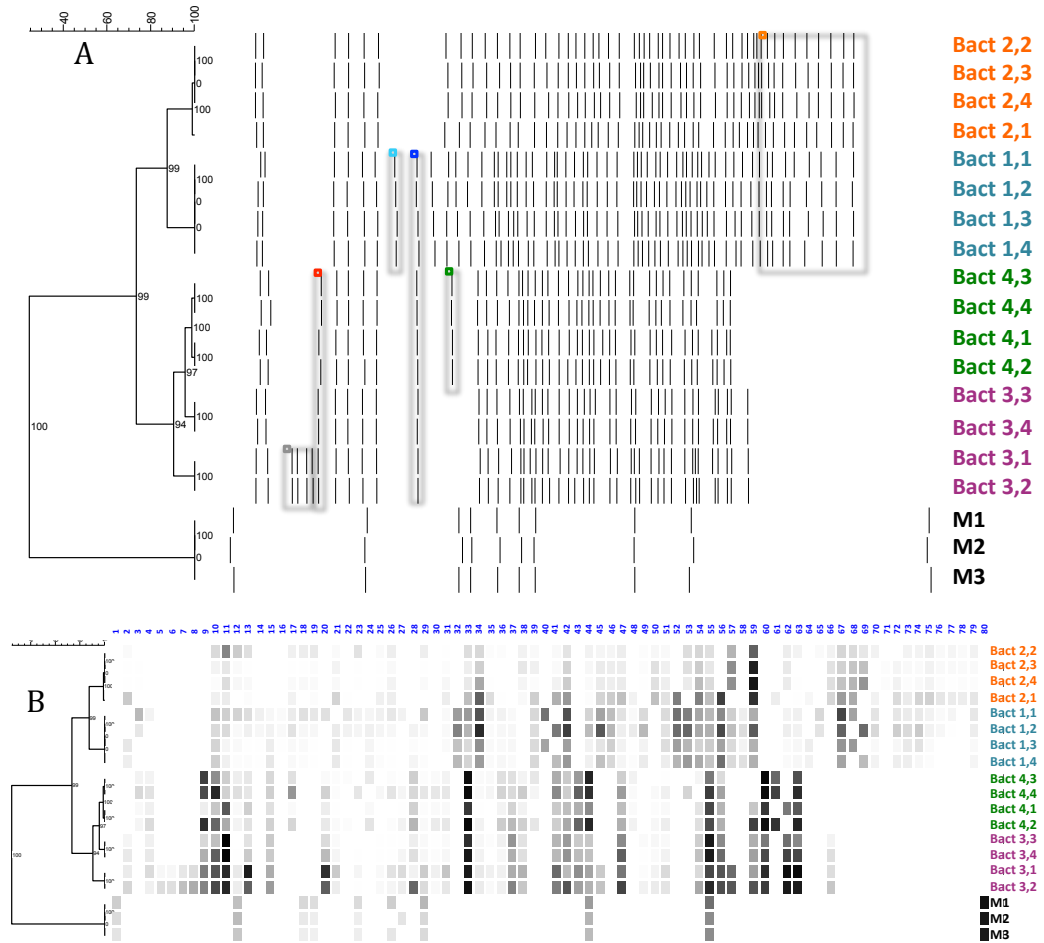


Figura IV.14. Dendrogramas obtenidos al analizarlos perfiles de bandas del DGGE de las comunidades de Bacteria presentes en las muestras de biopelícula del SFBBR, utilizando el programa Gel Compar II v. 5.101 (Applied Maths, Bélgica) aplicando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y el coeficiente de Dice (A). La barra superior muestra la similitud entre los perfiles de bandas y los números entre las ramas representan el coeficiente de correlación cofenética. En la figura B se muestra las intensidades relativas en escala de grises de las diferentes clases de banda presentes en los perfiles del DGGE.

Para estudiar las relaciones existentes entre la composición de la comunidad de Bacteria y las variables fisicoquímicas del influente en cada experimento, se utilizó un



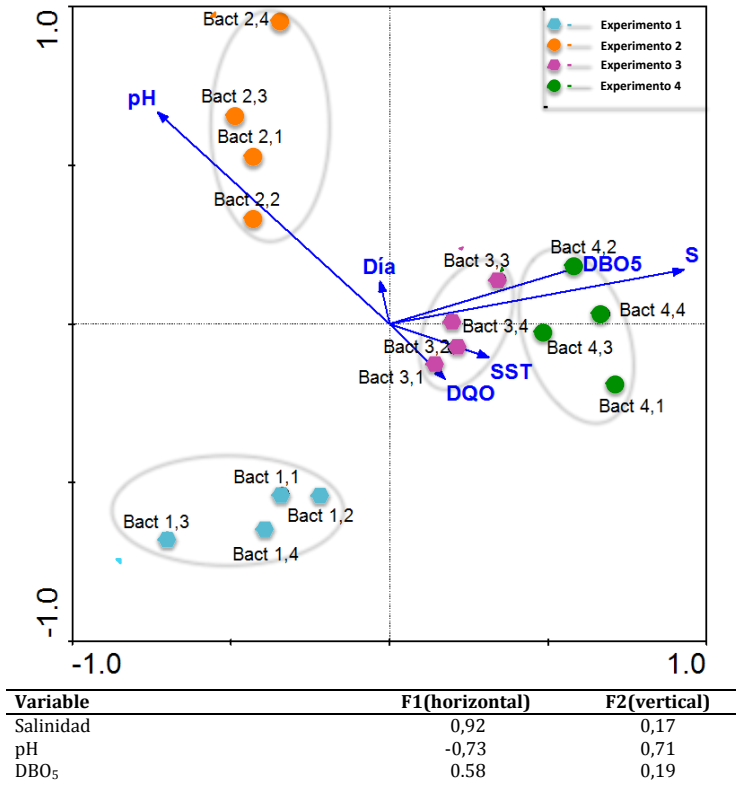
método de análisis estadístico multivariante, empleando el programa informático Canoco v.4.5 (ScientiaPro, Budapest, Hungría). El análisis multivariante es una técnica que nos permite la organización de las muestras analizadas en un espacio bidimensional, donde los ejes de ordenación atribuidos explican la variabilidad en la composición de su microbiota. Las muestras se organizan de manera que su proximidad en el diagrama indica el grado de similitud entre ellas (Lepš y Šmilauer, 2003).

El análisis se realizó con los datos de ausencia/presencia en las muestras de las diferentes clases de banda, representados respectivamente en una matriz binaria como 0/1, previo al análisis con Canoco. Para analizar la heterogeneidad entre los datos estudiados se utilizó el análisis de correspondencias sin tendencias (DCA), para obtener la longitud del gradiente del análisis (LG). El tamaño de gradiente de mayor longitud de los ejes de ordenación resultante fue menor de 3, por lo que los datos se consideraron homogéneos, indicando una distribución lineal de los mismos. Para grupos de datos homogéneos se utilizó el análisis de redundancias (RDA) (Lepš y Šmilauer, 2003; ter Braak y Šmilauer, 2002).

En el análisis se incluyó una tabla con la presencia/ausencia de cada una de las clases de banda detectadas en cada perfil (es decir, de cada muestra, excluyendo los marcadores); y una segunda tabla con los datos correspondientes a las variables del sistema: SST, DBO<sub>5</sub>, DQO, pH, día de muestreo y salinidad del agua de entrada al SFBBR. Se excluyeron del análisis los SSV del influente, que mostraron una elevada correlación lineal con los SST ( $r > 0,9$ ) y en un análisis preliminar mostraron menor influencia que éstos sobre la variabilidad.

Para el RDA se usaron las opciones por defecto y la matriz de correlación se calculó, centrada por especies (bandas). Para analizar el significado de la relación entre la composición de la comunidad de Bacteria y las variables ambientales se realizó el Test de Monte Carlo, con 499 permutaciones. La hipótesis nula considerada fue la independencia de la estructura de la comunidad de los datos ambientales, y las relaciones se consideraron estadísticamente significativas con un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ). El Test de Monte Carlo indicó que la salinidad, la DBO<sub>5</sub> y el pH influyen de manera estadísticamente significativa, con  $p < 0,05$ , siendo la salinidad el factor que ejerció un mayor efecto. El resultado del análisis del RDA, considerando la relación entre las muestras de cada

experimento y las variables ambientales, se representa mediante el siguiente diagrama *biplot* (figura IV.15), donde las distintas muestras se agrupan según los diferentes experimentos.



**Figura IV.15. Diagrama de ordenación *biplot* del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre la estructura de la comunidad de Bacteria en las muestras del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos medidos durante la operación en los cuatro experimentos. Las muestras se representan mediante colores (azul para el experimento 1, naranja para el experimento 2, verde para el experimento 3 y morado para el experimento 4), y los parámetros fisicoquímicos se representan con flechas: Sólidos en Suspensión Totales (SST), pH, Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Biológica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>), día del ciclo (Día), salinidad (S). El primer eje de ordenación es el horizontal, el segundo eje de ordenación es el vertical.**

El primer eje de ordenación canónica (COA) (horizontal) está principalmente determinado por la salinidad y el pH, describe un 64,2% de la variabilidad de la estructura de la comunidad de Bacteria (basada en la presencia/ausencia de las clases de banda detectadas mediante el análisis de clusters) explicable mediante las variables ambientales consideradas en el análisis, y un 45,9% de su variabilidad total. Si consideramos también el

eje vertical (segundo COA), podemos describir el 85,6% de la variabilidad de la estructura de la comunidad de bacteria explicable mediante las variables ambientales y el 61,2% de su variabilidad total (tabla IV.10).

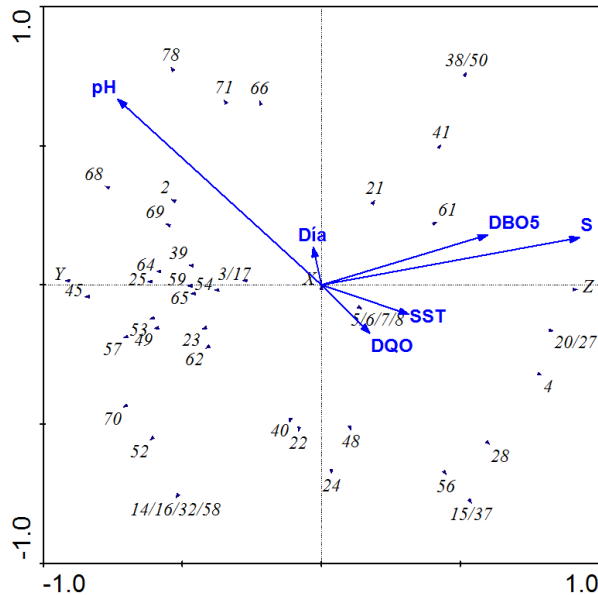
**Tabla IV.10. Resultados del análisis de redundancia (RDA), realizado con los datos de las especies (presencia/ausencia de las clases de banda de Bacterias del DGGE) y las variables ambientales del influente en el SFBBR (SST, DQO, DBO<sub>5</sub>, pH, salinidad y día de muestreo) en los cuatro experimentos.**

Ejes	1	2	3	4
Valores propios	0,459	0,153	0,058	0,027
Correlaciones entre especies y variables ambientales	0,944	0,946	0,685	0,922
Variación porcentual acumulada				
de datos sobre especies	45,9	61,2	67,0	69,7
de relación especies-ambiente	64,2	85,6	93,8	97,5
Suma de todos los valores propios				1,000
Suma de todos los valores propios canónicos				0,715

En la figura IV.15 podemos observar que la salinidad y la DBO<sub>5</sub> están correlacionadas positivamente con la muestras de los experimentos 3 y 4, debido a que el vector de la salinidad y el vector de la DBO<sub>5</sub> forman un ángulo agudo con dichas muestras, mientras que con las muestras correspondientes a los experimentos 1 y 2, dispuestas en ángulo obtuso con los vectores, presentan una correlación negativa. En el diagrama también podemos comprobar que todas las muestras de los experimentos 3 y 4 están más relacionadas con el primer eje. Por otro lado, el pH tiene una correlación positiva con las muestras correspondientes al experimento 2, mientras que con las muestras correspondientes al resto de los experimentos tiene una correlación negativa.

En la figura IV.16, podemos comprobar como determinadas clases de banda, todas aquellas que forman un ángulo agudo con el vector de la salinidad y de la DBO<sub>5</sub>, están presentes cuando la salinidad y la DBO<sub>5</sub> son elevadas, mientras que las que forman un ángulo obtuso con dichos vectores tienen una correlación negativa con la salinidad y la DBO<sub>5</sub> y sólo están presentes cuando la salinidad y la DBO<sub>5</sub> son bajas. Del mismo modo, aquellas clases de banda que forman un ángulo agudo con el vector del pH, están presentes cuando el pH es elevado, mientras que las que forman un ángulo obtuso tienen una correlación negativa con el pH y sólo están presentes cuando el pH es bajo. En el *biplot* se aprecian tres grupos de clases de banda, uno de los cuales está presente cuando la

concentración de NaCl y la DBO<sub>5</sub> son elevadas y el pH es bajo (grupo Z), otro correspondiente a las clases de banda presentes solamente a bajas concentraciones salinas y de DBO<sub>5</sub>, y a pH elevados (grupo Y) y un último grupo de clases de banda que no se ven afectadas por las variables ambientales consideradas en el análisis, por lo que dichas clases de banda están siempre presente y aparecen en el centro del *biplot* (grupo X).

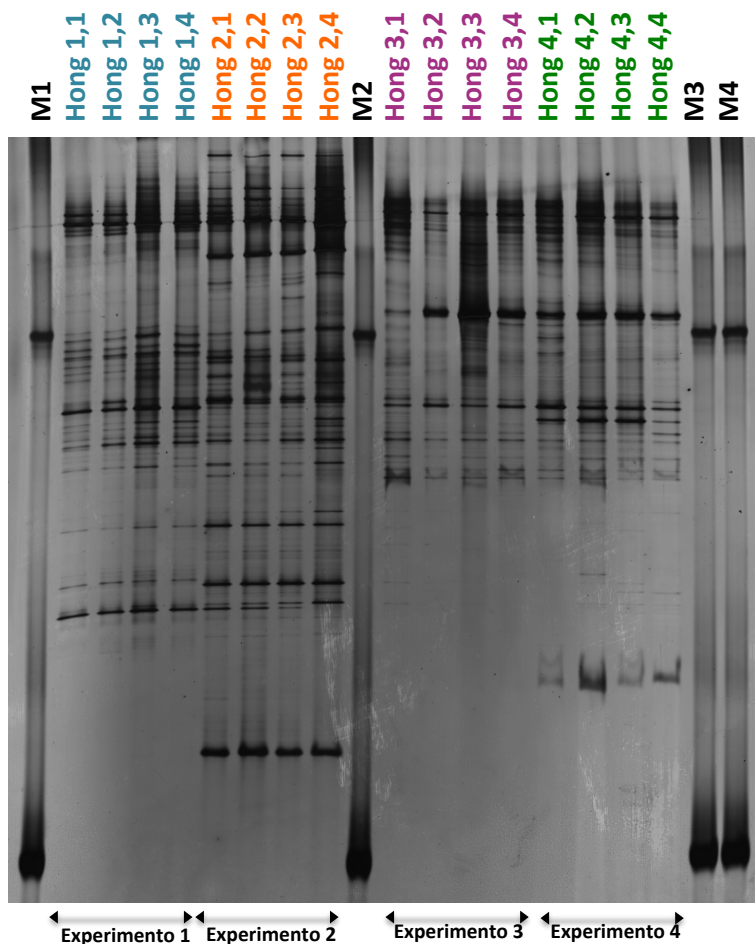


**Figura IV.16.** Diagrama de ordenación *biplot* del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre la distribución de las clases de banda de la comunidad de Bacteria en las muestras del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos medidos durante la operación en los cuatro experimentos. Las clases de banda se representan mediante triángulos azules junto al número de la clase de banda correspondiente, y los parámetros fisicoquímicos se representan con flechas: Sólidos en Suspensión Totales (SST), pH, Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Biológica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>), día del ciclo (Día), salinidad (S). El primer eje de ordenación es el horizontal, el segundo eje de ordenación es el vertical. X: posición de las clases de banda 10/11/12/13/26/29/31/33/34/35/36/42/44/47/51/55/63; Y: posición de las clases de banda 18/19/46/67/72/73/74/75/76/77/79; Z: posición de las clases de banda 9/30/43/60.

### IV.3.2. Perfiles de biodiversidad de hongos en las muestras de biopelícula

Para el estudio de la comunidad de hongos presentes en la biopelícula se amplificó una región hipervariable del gen codificante del ARNr 18S, de aproximadamente 320 pb, mediante una estrategia de PCR. En la figura IV.17 podemos ver los perfiles de bandas de la comunidad fúngica de los 4 experimentos llevados a cabo en el SFBBR, donde se aprecia a simple vista que la composición de la comunidad cambia con las diferentes concentraciones

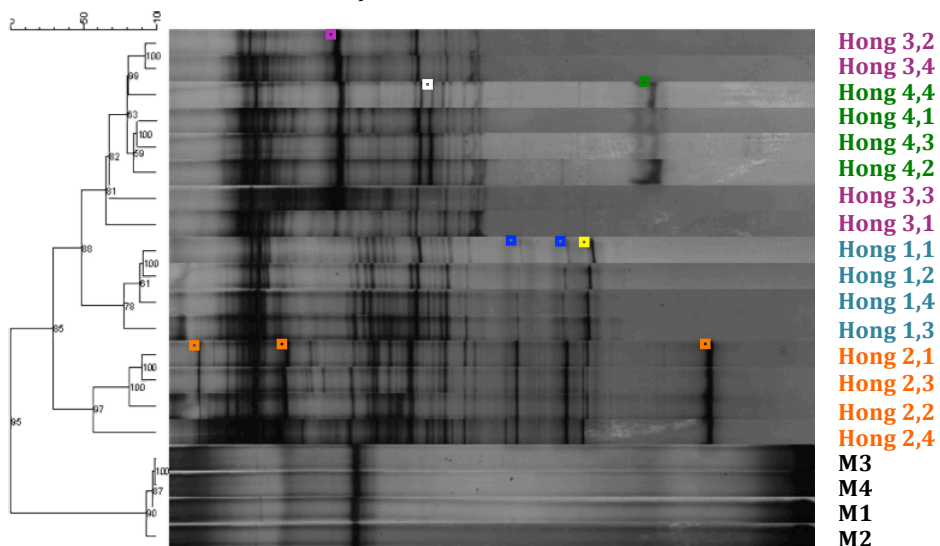
salinas presentes en el influente. A partir del tercer experimento, el número de bandas detectadas en los perfiles disminuye considerablemente, indicando una menor biodiversidad de estos microorganismos.



**Figura IV.17. Análisis de la biodiversidad fúngica (basado en una región del gen codificante del ARNr 18S) en las muestras de biopelícula procedentes del SFBBR mediante la técnica de DGGE durante los experimentos 1, 2, 3 y 4. M= Marcador de 10 especies (ver apartado IV.2.7.2).**

Los perfiles de bandas se normalizaron y se analizaron aplicando el coeficiente numérico de correlación de Pearson y el algoritmo UPGMA. En el dendrograma obtenido (figura IV.18) se observa como los perfiles correspondientes a las muestras de biopelícula del experimento 2 aparecen agrupadas en un mismo cluster, así como las muestras de los

experimentos 1, 3 y 4 aparecen agrupadas en un segundo cluster, presentado estos clusters un porcentaje de similitud del 29,2% entre ellos. En este análisis podemos comprobar como determinadas bandas evolucionan a medida que aumenta la concentración de sal del influente. Se observan una serie de bandas que están presentes sólo en los perfiles correspondientes a los experimentos 1 y 2 (marcadas con un recuadro amarillo y recuadros azules), así como otras poblaciones de hongos que se detectan sólo en el experimento 2, cuando el influente tiene una concentración de sal de 3,7 g/L (marcadas con recuadros naranjas), y en el experimento 4 (marcada con un recuadro verde). Por otra parte, existe también una diferencia significativa en la intensidad relativa de algunas bandas que representan las poblaciones detectadas mediante DGGE, especialmente de una banda que parece potenciarse a partir del experimento 3, es decir, cuando las concentraciones de sal son elevadas (marcada con un recuadro morado). También podemos observar 2 bandas que están presentes en todas las muestras del experimento 1 y que incrementan su intensidad en las muestras del experimento 2 (marcadas con recuadros azules), así como otra banda que aumenta su intensidad cuando la salinidad es elevada, durante el experimento 4 (marcada con un recuadro blanco).



**Figura IV.18.** Dendrograma obtenido al analizar perfiles de bandas del DGGE de las comunidades de hongos presentes en las muestras de biopelícula del SFBBR, utilizando el programa Gel Compar II v. 5.101 (Applied Maths, Bélgica) aplicando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y el coeficientes de Pearson. La barra superior muestra la similitud entre los perfiles de bandas (%) y los números entre las ramas representan el coeficiente de correlación cofenética.

Para completar el análisis, los perfiles de bandas del DGGE se analizaron utilizando el mismo programa informático (Gel Compar II), aplicando el coeficiente numérico de correlación de Dice y el algoritmo UPGMA, obteniéndose el dendrograma que aparece en la figura IV.19, donde las muestras se agrupan en 2 clusters principales en función de la presencia/ausencia de bandas.

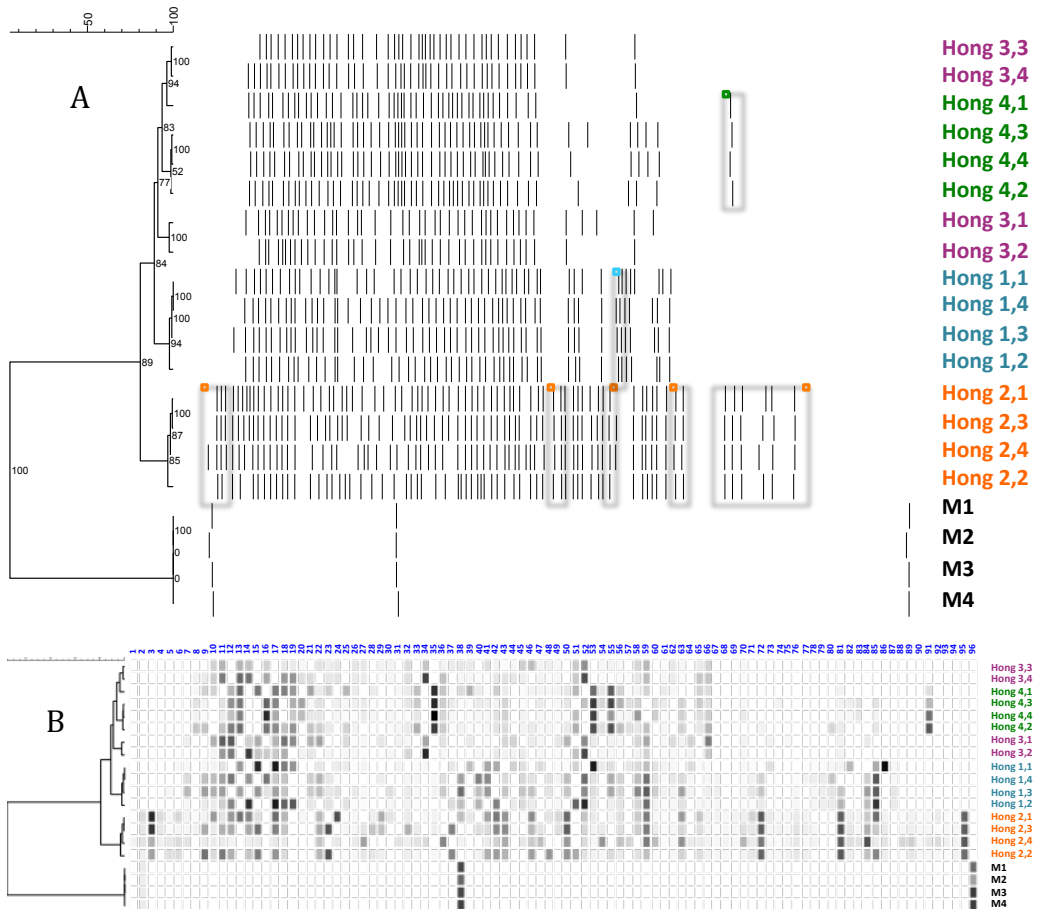


Figura IV.19. Dendrogramas obtenidos al analizar los perfiles de bandas del DGGE de las comunidades de hongos presentes en las muestras de biopelícula del SFBBR, utilizando el programa Gel Compar II v. 5.101 (Applied Maths, Bélgica) aplicando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y el coeficientes de Dice. La barra superior muestra la similitud entre los perfiles de bandas y los números entre las ramas representan el coeficiente de correlación cofenética. En la figura B se muestra las intensidades relativas en escala de grises de las diferentes clases de banda presentes en los perfiles del DGGE.

De manera análoga al análisis realizado con el coeficiente numérico de Pearson, en un primer cluster se segregan las muestras correspondientes al experimento 2 y en el segundo cluster, se agrupan las muestras correspondientes a los experimentos 1, 3 y 4, con un porcentaje de similitud entre ellos del 80,7%. A su vez, el segundo cluster se divide en 2 subclusters (porcentaje de similitud del 88,9%), uno de los cuales agrupa las muestras correspondientes al experimento 1, y el otro subcluster incluye las muestras correspondientes a los experimentos 3 y 4. En el dendrograma se reconocen un total de 94 clases de banda (figura IV.17B). En este dendrograma, cabe destacar, una clase de banda que sólo está presente en el experimento 4 (marcada en un recuadro verde), otra clase de banda que solamente está presente en el experimento 1 (marcada en un recuadro turquesa) y una serie de clases de banda que sólo están presentes en el experimento 2 (marcadas con recuadros naranjas).

Para estudiar las relaciones existentes entre la composición de la comunidad de hongos y las variables fisicoquímicas del influente en cada experimento se realizó un análisis multivariante utilizando el programa informático Canoco v. 4.5 (ScientiaPro, Budapest, Hungría). El análisis multivariante se llevó a cabo de forma análoga a la descrita en el apartado IV.3.1.

Los resultados del análisis de correspondencias sin tendencias (DCA) determinaron que el tamaño de gradiente de mayor longitud de los ejes de ordenación resultante fue menor de 3, por lo que los datos se consideraron homogéneos. Se empleó el análisis de redundancias (RDA). El resultado del análisis del RDA se representa mediante el siguiente diagrama *biplot* entre las muestras de biopelícula y las variables ambientales (figura IV. 20).

El Test de Monte Carlo indicó que la salinidad, el pH y la DBO<sub>5</sub> influyen significativamente en la estructura de las comunidades fúngicas presentes en la biopelícula ( $p < 0,05$ ), siendo el pH el factor ambiental que ejerció un mayor efecto. Como podemos observar en el *biplot* de la figura IV.20, las muestras se organizan según grado de similitud entre ellas, según los diferentes experimentos (Lepš y Šmilauer, 2003).



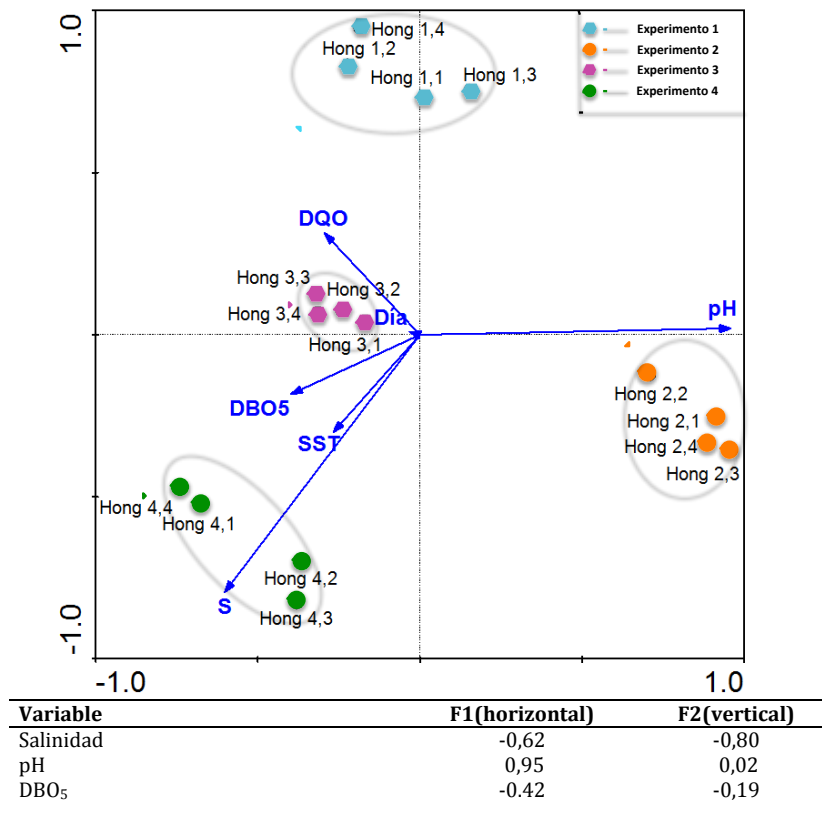


Figura IV.20. Diagrama de ordenación *biplot* del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre la estructura de la comunidad de hongos en las muestras del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos medidos durante la operación en los cuatro experimentos. Las muestras se representan mediante colores (azul para el experimento 1, naranja para el experimento 2, morado para el experimento 3 y verde para el experimento 4), y los parámetros fisicoquímicos se representan con flechas: Sólidos en Suspensión Totales (SST), pH, Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Biológica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>), día del ciclo (Día), salinidad (S). El primer eje de ordenación es el horizontal, el segundo eje de ordenación es el vertical.

El eje horizontal (primer eje de ordenamiento canónico (COA)) está principalmente determinado por el pH y describe un 48,6% de la variabilidad de la estructura de la comunidad de hongos (basada en la presencia/ausencia de las clases de banda detectadas mediante el análisis de clusters) explicable mediante las variables del influente consideradas en el análisis, y un 29,6% de su variabilidad total. Si consideramos también el eje vertical (segundo COA), que está principalmente determinado por la DBO<sub>5</sub>, podemos describir el 72,4% de la variabilidad de la estructura de la comunidad de hongos explicable

mediante las variables ambientales y el 44,2% de su variabilidad total (tabla IV.11).

En la figura IV.20 podemos observar que la salinidad y la DBO<sub>5</sub> están correlacionadas positivamente con la muestras de los experimentos 3 y 4, debido a que el vector de la salinidad forma un ángulo agudo con dichas muestras, mientras que con las muestras correspondientes a los experimentos 1 y 2, dispuestas en ángulo obtuso, presentan una correlación negativa. En el diagrama también podemos comprobar que todas las muestras de los experimentos 2 y 3 están más relacionadas con el primer eje. Además, las muestras de los experimentos 3 y 4 tienen una correlación positiva con la salinidad y la DBO<sub>5</sub>. Las muestras del experimento 1 tienen una correlación negativa con la salinidad y positiva con la DBO<sub>5</sub>. Por otro lado, el pH tiene una correlación positiva con las muestras correspondientes al experimento 2, mientras que con las muestras correspondientes al resto de los experimentos tiene una correlación negativa.

**Tabla IV.11. Resultados del análisis de redundancia (RDA), realizado con los datos de las especies (presencia/ausencia de las clases de banda de hongos del DGGE) y las variables ambientales del influente en el SFBBR (SST, DQO, DBO<sub>5</sub>, pH, salinidad y día de muestreo) en los cuatro experimentos.**

Ejes	1	2	3	4
Valores propios	0,296	0,145	0,082	0,048
Correlaciones entre especies y variables ambientales	0,968	0,965	0,876	0,910
Variación porcentual acumulada				
de datos sobre especies	29,6	44,2	52,3	57,2
de relación especies-ambiente	48,6	72,4	85,8	93,7
Suma de todos los valores propios				1,000
Suma de todos los valores propios canónicos				0,610

En la figura IV.21, se representa en un diagrama *biplot* el análisis RDA, sobre las variables ambientales y las diferentes clases de banda existentes en la figura IV.17, excluyendo las bandas correspondientes a los marcadores. En el *biplot* (figura IV.21) podemos comprobar como las bandas que forman un ángulo agudo con el vector de la salinidad están presentes cuando la salinidad es elevada, mientras que las bandas tienen una correlación negativa con la salinidad (ángulo obtuso) sólo están presentes en cuando la salinidad es baja. De igual forma ocurre con el vector del pH y de la DBO<sub>5</sub>.

En el *biplot* se aprecian dos grupos de clases de banda, representados por las letras X e Y. El grupo X, formado por las clases de banda 26 y 66, aparece en el centro del *biplot* y no se ve afectado por las variables ambientales consideradas en el análisis. Estas dos clases de banda están siempre presente en los 4 experimentos. El grupo Y corresponde a las clases de banda presentes solamente a bajas concentraciones salinas y de DBO<sub>5</sub>, y a pH elevado.

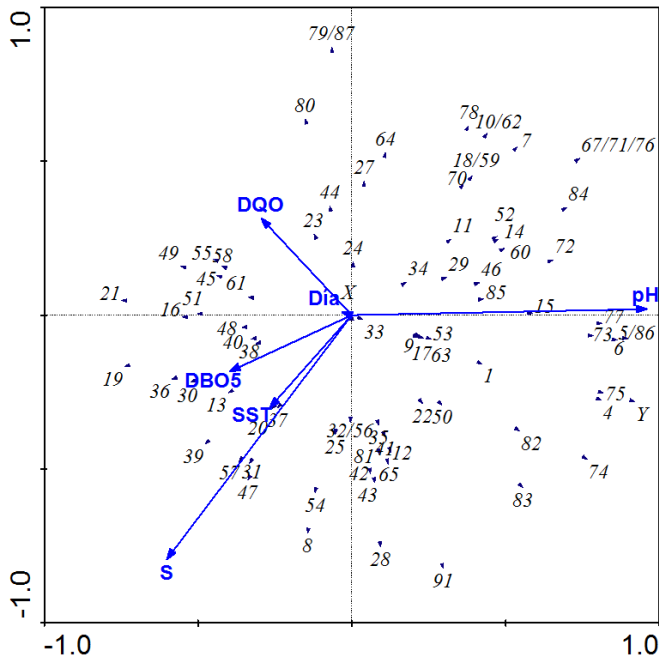
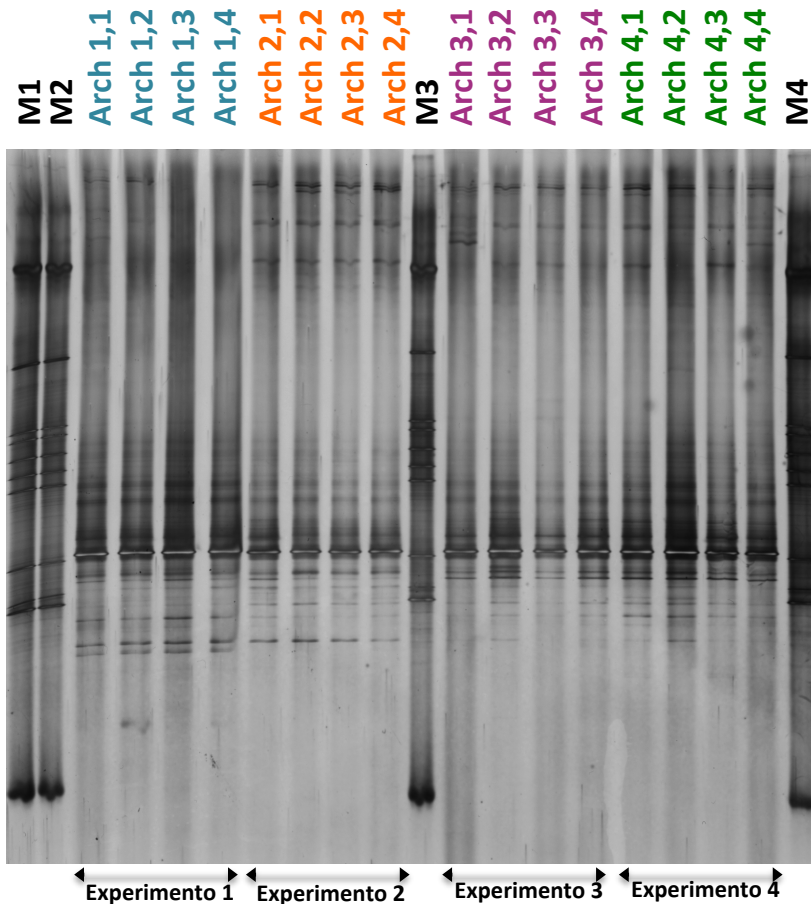


Figura IV.21. Diagrama de ordenación *biplot* del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre la distribución de las clases de banda de la comunidad de hongos en las muestras del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos medidos durante la operación en los cuatro experimentos. Las clases de banda se representan mediante triángulos azules junto al número de la clase de banda correspondiente, y los parámetros fisicoquímicos se representan con flechas: Sólidos en Suspensión Totales (SST), pH, Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Biológica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>), día del ciclo (Día), salinidad (S). El primer eje de ordenación es el horizontal, el segundo eje de ordenación es el vertical. X: posición de las clases de banda 26/66; Y: posición de las clases de banda 2/3/68/69/88/89/90/92/93/94/95.

### IV.3.3. Perfiles de biodiversidad de arqueas en las muestras de biopelícula

Para el estudio de la comunidad de arqueas presentes en las muestras de biopelícula se amplificó la región hipervariable V6-V8 del gen codificante del ARNr 16S, de aproximadamente 492 pb, mediante una estrategia de PCR semianidada.

Los perfiles de biodiversidad de las comunidades de arqueas obtenidos mediante DGGE se pueden observar en la figura IV.22. Tal y como se desprende del análisis visual del gel, la comunidad de arqueas presenta perfiles de biodiversidad muy similares en las distintas concentraciones salinas.

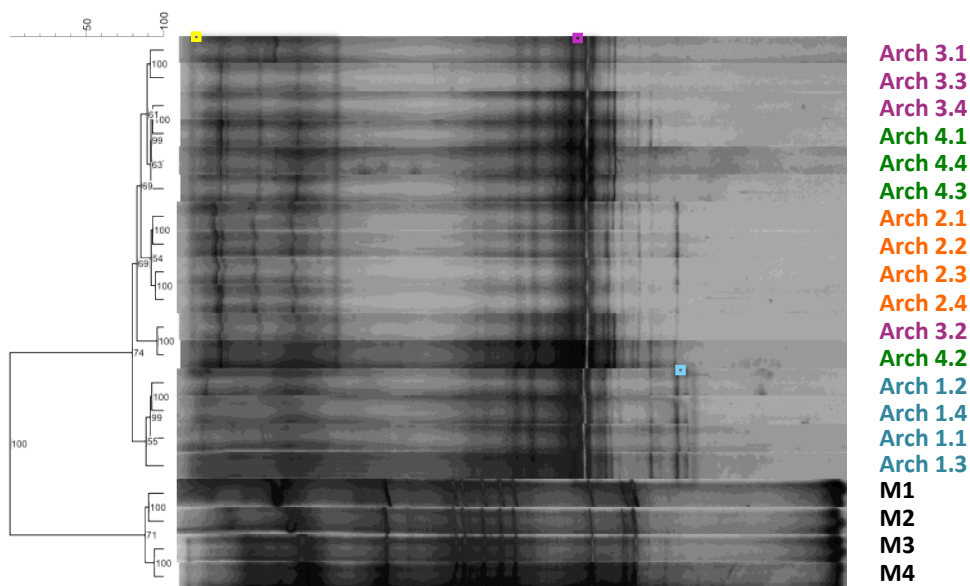


**Figura IV.22.** Análisis de la biodiversidad microbiana de arqueas (basado en la región V6-V8 del gen codificante del ARNr 16S) en las muestras de biopelícula procedentes del SFBBR mediante la técnica de DGGE durante los experimentos 1, 2, 3 y 4. M= Marcador de 10 especies (ver apartado IV.2.7.2).

Los perfiles de bandas se normalizaron y analizaron mediante el programa informático Gel Compar II v. 5.101 (Applied Maths BVBA, Bélgica), aplicando también en

este caso el coeficiente numérico de correlación de Pearson y el algoritmo UPGMA. El dendrograma generado (figura IV.23) muestra que los perfiles obtenidos en el DGGE se segregaron en dos clusters principales, con un porcentaje de similitud del 79,4. Las muestras correspondientes al experimento 1 (influyente sin NaCl) se agruparon juntas en un cluster, con un porcentaje de similitud del 88,9%. En dicho cluster podemos observar una banda de idéntico comportamiento electroforético en todas las muestras, exclusiva del experimento 1 (marcada con un recuadro turquesa). El segundo cluster principal se divide en dos subcluster (similitud 83,8%).

En la figura IV.23 se observa una banda mayoritaria (intensidad relativa) presente en todas las muestras (marcada con un recuadro morado). También hay un grupos de bandas que son características de los experimentos 2, 3 y 4 (marcadas con un recuadro amarillo).



**Figura IV.23.** Dendrograma obtenido al analizar los perfiles de bandas del DGGE de las comunidades de arqueas presentes en las muestras de biopelícula del SFBBR, utilizando el programa Gel Compar II v. 5.101 (Applied Maths, Bélgica) aplicando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y el coeficientes de Pearson. La barra superior muestra la similitud (%) entre los perfiles de bandas y los números entre las ramas representan el coeficiente de correlación cofenética.

Basándonos en la presencia/ausencia de clases de banda en los perfiles, se realizó un análisis complementario utilizando el mismo programa informático (Gel Compar II), aplicando en este caso el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA. En el dendrograma obtenido (figura IV.24) podemos observar que las muestras de los 4 experimentos se separan en dos grandes clusters principales, con un porcentaje de similitud entre ellos del 74,3%. En el primer cluster principal, se agrupan las muestras correspondientes los experimentos 1 y 2 (porcentaje de similitud 77%). En él podemos comprobar como hay una clase de banda que únicamente está presente en el experimento 1, y que esta población de arquea desaparece con la salinidad (marcada con un recuadro turquesa) y otra clase de banda característica del experimento 2 (marcada con un recuadro naranja). En el segundo cluster principal, con un porcentaje de similitud del 83,1%, se agruparon (en 2 diferentes subclusters) todas aquellas muestras correspondientes a los experimentos 3 y 4. Se segregaron en un subcluster, las muestras correspondientes al experimento 3, con un porcentaje de similitud del 91,3%, y en otro subcluster se agruparon las muestras correspondientes al experimento 4 (similitud 93,4%). En el experimento 4 aparecen dos clases de banda características (marcadas con recuadros verdes).

En el dendrograma aparecen poblaciones de arqueas que sólo están presentes en condiciones salinas (marcadas con un recuadro amarillo). Esto pone de manifiesto, que aunque la comunidad de arqueas presenta perfiles similares a lo largo de los 4 experimentos, hay poblaciones de arqueas influenciadas por la salinidad. También hay una banda que sólo esta presente durante los experimentos 1, 3 y 4 (marcada con un recuadro azul).

En la figura IV.24B podemos comprobar que hay una clase de banda (marcada con el número 41) presente en todos los experimento a una intensidad relativa elevada. Dicha clase de banda corresponde a la marcada en la figura IV.23 con un cuadrado morado

Los datos correspondientes a la presencia/ausencia de las bandas se normalizaron y se analizaron con el programa estadístico multivariante Canono v.4.5 (ScientiaPro, Budapest, Hungría), para estudiar la relaciones entre las comunidades de arqueas y las variables fisicoquímicas del influente del SFBBR en los diferentes experimentos.

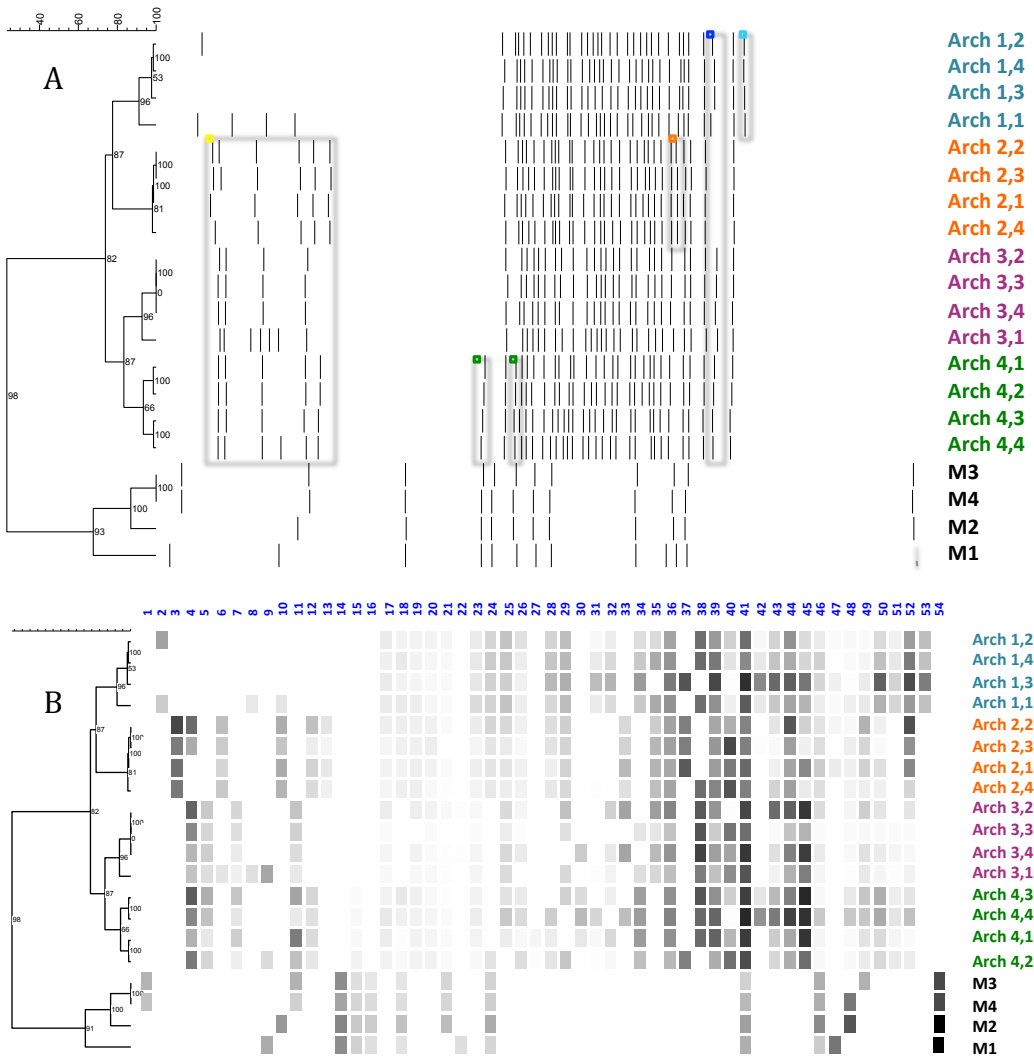


Figura IV.24. Dendrogramas obtenidos al analizar los perfiles de bandas del DGGE de las comunidades de arqueas presentes en las muestras de biopelícula del SFBBR, utilizando el programa Gel Compar II v. 5.101 (Applied Maths, Bélgica) aplicando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y el coeficientes Dice (A). La barra superior muestra la similitud entre los perfiles de bandas y los números entre las ramas representan el coeficiente de correlación cofenética. En la figura B se muestra las intensidades relativas en escala de grises de las diferentes clases de banda presentes en los perfiles del DGGE.

En el análisis se incluyeron los datos correspondientes a todas las clases de bandas y su presencia/ausencia (exceptuando las bandas correspondientes a los marcadores), y los

datos correspondientes a las variables del sistema: SST, DBO<sub>5</sub>, DQO, pH y salinidad del agua de entrada al SFBRR. Al igual que en los análisis anteriores, se excluyeron del análisis los SSV del influente, que mostraron una elevada correlación lineal con los SST ( $r > 0,9$ ) y en un análisis preliminar mostraron menor influencia que éstos sobre la variabilidad. El análisis multivariante se llevo a cabo de forma análoga a la descrita en el apartado IV.3.1.

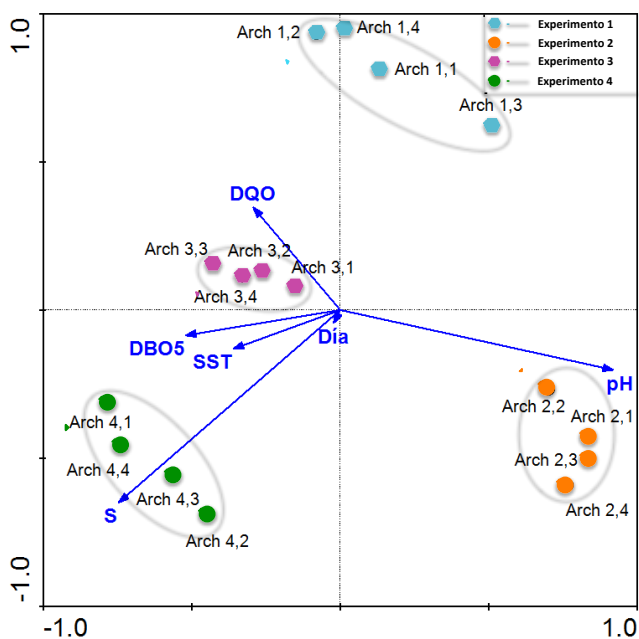
Previamente, se realizó el análisis de correspondencias sin tendencias (DCA) obteniéndose una longitud de gradiente menor de 3, por lo que los datos seguían una distribución lineal. Se utilizó el análisis de redundancias (RDA). El resultado del análisis del RDA se representa mediante el siguiente diagrama *biplot* (figura IV.25).

El Test de Monte Carlo indicó que la salinidad, el pH y la DBO<sub>5</sub> utilizados en el análisis que influye de manera estadísticamente significativa, con  $p < 0,05$ , en la variabilidad de la biodiversidad de las comunidades de arqueas.

En la figura IV.26 podemos ver un diagrama *biplot* de las distintas muestras de biopelícula y de las variables ambientales consideradas en el análisis. Las muestras se agrupan según los diferentes experimentos. En el *biplot*, el pH es la variable ambiental más determinante en el eje horizontal. El pH está correlacionado positivamente con las muestras del experimento 2, debido a que el vector del pH forma un ángulo agudo con dichas muestras, mientras que con las muestras correspondientes los experimentos 1, 3 y 4, dispuestas en ángulo obtuso, presentan una correlación negativa. Por otro lado, la salinidad y la DBO<sub>5</sub> tienen una correlación positiva con las muestras correspondientes a los experimentos 3 y 4, mientras que con las muestras correspondientes al resto de los experimentos tienen una correlación negativa.

Considerando el primer COA (horizontal) se describe un 54,6% de la variabilidad de la estructura de la comunidad de arqueas (basada en la presencia/ausencia de las clases de banda detectadas mediante el análisis de clusters) explicable mediante las variables ambientales consideradas en el análisis, y un 36,9% de su variabilidad total. La variable ambiental más determinante en este eje es la salinidad. Si además consideramos el segundo COA (vertical) se describe un 80,2% de la variabilidad de las bandas explicable mediante las variables ambientales consideradas en el análisis, y un 54,3% de la variabilidad total del sistema (tabla IV.12).





Variable	F1(horizontal)	F2(vertical)
Salinidad	-0,75	-0,63
pH	-0,91	-0,18
DBO <sub>5</sub>	-0,52	-0,10

Figura IV.25. Diagrama de ordenación *biplot* del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre la estructura de la comunidad de arqueas en las muestras del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos medidos durante la operación en los cuatro experimentos. Las muestras se representan mediante colores (azul para el experimento 1, naranja para el experimento 2, morado para el experimento 3 y verde para el experimento 4), y los parámetros fisicoquímicos se representan con flechas: Sólidos en Suspensión Totales (SST), pH, Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Biológica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>), día del ciclo (Día), salinidad (S). El primer eje de ordenación es el horizontal, el segundo eje de ordenación es el vertical.

Tabla IV.12. Resultados del análisis de redundancia (RDA), realizado con los datos de las especies (presencia/ausencia de las clases de banda de arqueas del DGGE) y las variables ambientales del influente en el SFBBR (SST, DQO, DBO<sub>5</sub>, pH, salinidad y día de muestreo) en los cuatro experimentos.

Ejes	1	2	3	4
Valores propios	0,369	0,173	0,088	0,020
Correlaciones entre especies y variables ambientales	0,942	0,969	0,775	0,631
Variación porcentual acumulada				
de datos sobre especies	36,9	54,3	63,0	65,1
de relación especies-ambiente	54,6	80,2	93,2	96,2
Suma de todos los valores propios				1,000
Suma de todos los valores propios canónicos				0,676

En la figura IV.26 podemos comprobar que hay clases de banda que forman un ángulo agudo con el vector salinidad y el vector DBO<sub>5</sub> y por tanto tienen una correlación positiva con ellos y una correlación negativa con el pH, ya que forman un ángulo obtuso con dicho vector. Dichas bandas sólo están presentes a elevadas concentraciones de sal y de DBO<sub>5</sub> y a pH bajo. Por el contrario, hay otras clases de banda que forman un ángulo obtuso con los vectores salinidad y DBO<sub>5</sub> presentando una correlación negativa, y un ángulo agudo con el vector del pH, presentando una correlación positiva con dicho vector. Estas bandas sólo aparecen cuando la concentración de sal y la DBO<sub>5</sub> son bajas y el pH elevado. También podemos observar que hay clases de banda (grupo X) que están presentes en los 4 experimentos y no se ven afectadas por las variables ambientales consideradas en el análisis.

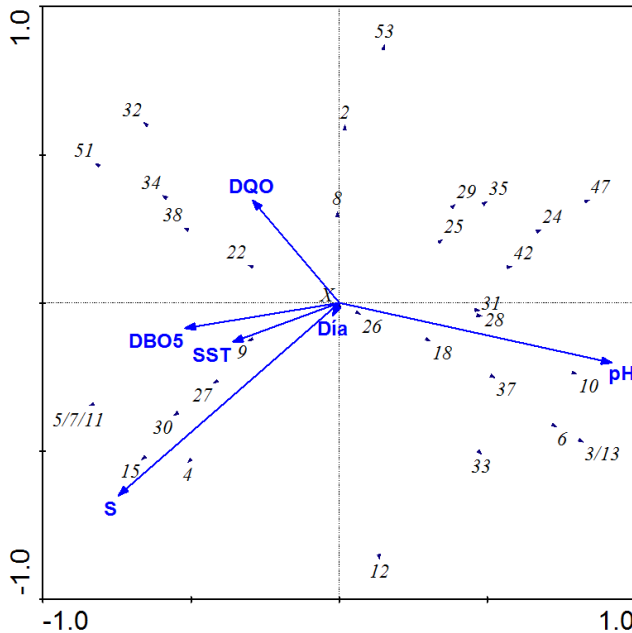


Figura IV.26. Diagrama de ordenación *biplot* del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre la distribución de las clases de banda de la comunidad de arqueas en las muestras del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos medidos durante la operación en los cuatro experimentos. Las clases de banda se representan mediante triángulos azules junto al número de la clase de banda correspondiente, y los parámetros fisicoquímicos se representan con flechas: Sólidos en Suspensión Totales (SST), pH, Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Biológica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>), día del ciclo (Día), salinidad (S). El primer eje de ordenación es el horizontal, el segundo eje de ordenación es el vertical. X: posición de las clases de banda 17/19/20/21/23/36/39/40/41/43/44/45/46/48/49/50/52.

#### IV.3.4. Perfiles de biodiversidad de bacterias oxidadoras de amonio (basado en la secuencia del gen *amoA*) en las muestras de biopelícula

Para el estudio específico de las comunidades de bacterias nitrificantes de fase I se amplificó parcialmente el gen *amoA*, codificante de la subunidad  $\alpha$  de la enzima amonio-monooxigenasa, propia de las Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio (AOB), utilizando cebadores específicos y mediante una estrategia de PCR semianidada. Los fragmentos resultantes de la 2ª PCR tuvieron un tamaño aproximado de 491 pb. Estos fragmentos de ADN correspondían con el tamaño esperado y se sometieron a una DGGE con el objeto de obtener los perfiles de la comunidad de Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio del biorreactor en todos los experimentos.

En la figura IV.27 se muestran los perfiles de biodiversidad de las comunidades de Beta-proteobacterias nitrificantes de fase I, correspondientes a las muestras de biopelículas procedentes de los 4 experimentos. A priori, al comprobar visualmente el gel se aprecia que durante los experimentos 3 y 4 los perfiles de biodiversidad de las comunidades nitrificantes de fase I también fueron más simples, lo que nos sugiere que estas comunidades se ven afectadas por altas concentraciones salinas.

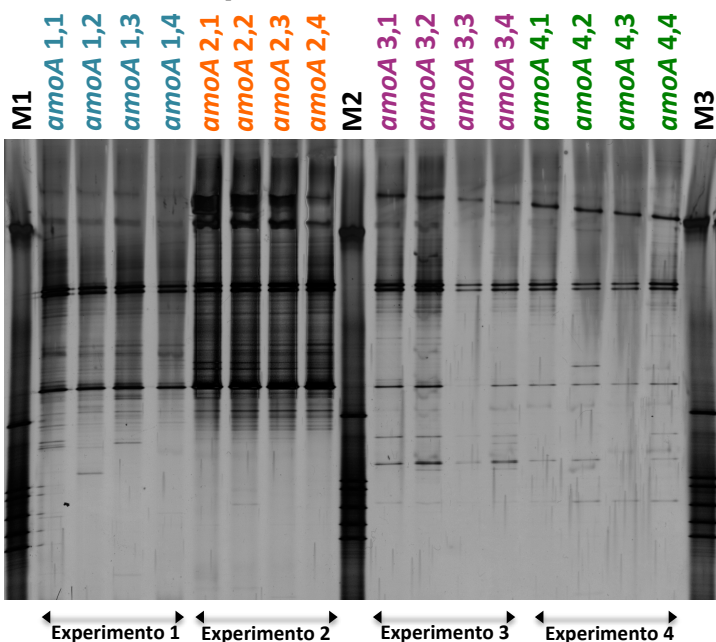
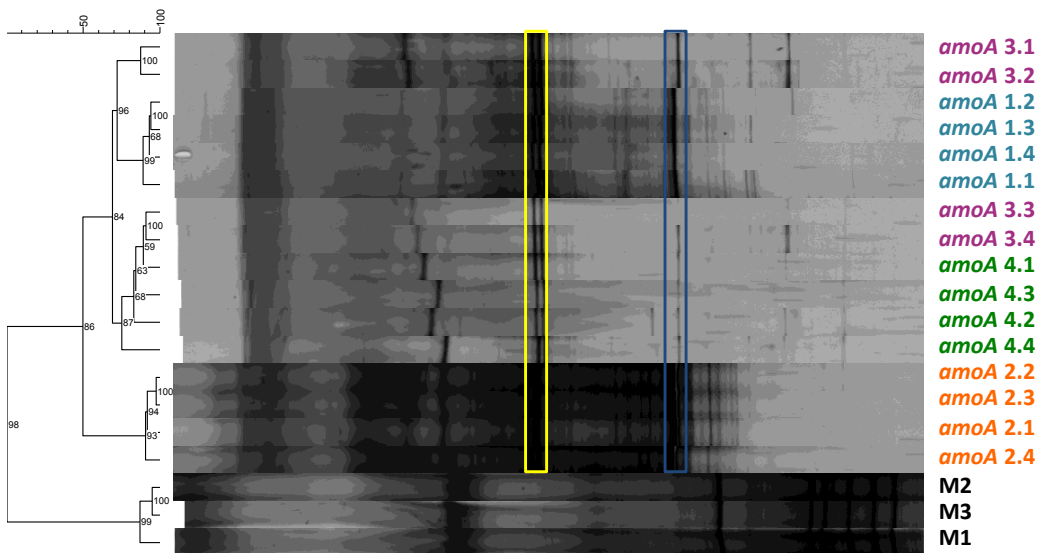


Figura IV.27. Análisis de la biodiversidad microbiana de Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio (*amoA*) (basado en la región V6-V8 del gen codificante del ARNr 16S) en las muestras de biopelícula procedentes del SFBBR mediante la técnica de DGGE durante los experimentos 1, 2, 3 y 4. M= Marcador de 10 especies (ver apartado IV.2.7.2).

Los perfiles de bandas obtenidos mediante DGGE se analizaron con el programa Gel Compar II v. 5.101 (Applied Maths, Bélgica) y se construyó un dendrograma que relacionó los distintos perfiles de bandas en función de su similitud, utilizándose el coeficiente de Pearson y el algoritmo UPGMA. El dendrograma muestra (figura IV.28) el perfil de la comunidad microbiana nitrificante de la biopelícula del SFBBR durante los 4 experimentos.

Los perfiles de bandas se segregan en 2 clusters principales, con una similitud del 49,8% entre ellos. Podemos observar dos bandas mayoritarias presentes durante los 4 experimentos (marcadas con un recuadro amarillo) y una banda cuya intensidad disminuye en el segundo cluster principal (marcada con un recuadro azul). En el primer cluster principal se segregan las muestras correspondientes al experimento 2 (similitud 90,5%), mientras que en el segundo cluster se agrupan las muestras correspondientes a los experimentos 1, 3 y 4, con un porcentaje de similitud entre ellos del 69%.



**Figura IV.28.** Dendrograma obtenido al analizar los perfiles de bandas del DGGE de las comunidades de bacterias nitrificantes de fase I presentes en las muestras de biopelícula del SFBBR, utilizando el programa Gel Compar II v. 5.101 (Applied Maths, Bélgica) aplicando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y el coeficiente de Pearson. La barra superior muestra la similitud entre los perfiles de bandas (%) y los números entre las ramas representan el coeficiente de correlación cofenética.

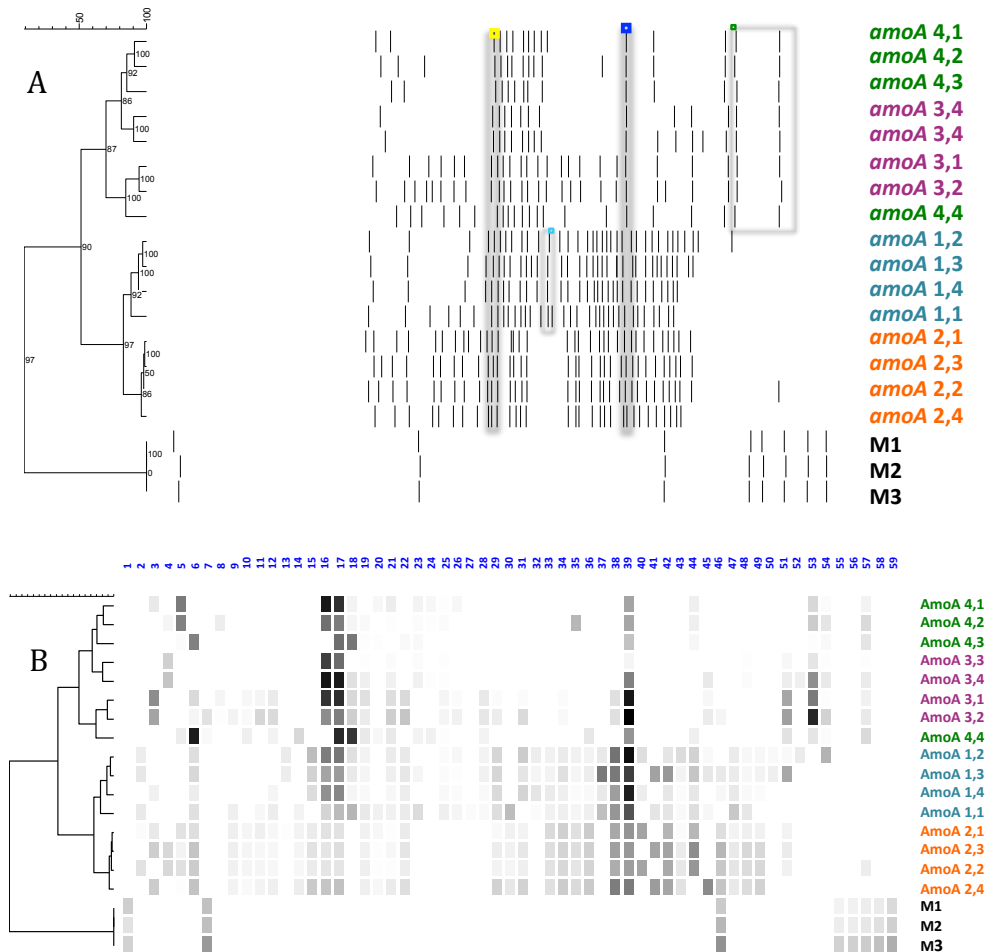
El dendrograma generado al analizar los perfiles bandas de la DGGE utilizando el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA (figura IV.29) releva que las muestras se separan en 2 clusters principales, con un porcentaje de similitud entre ellos de 51,3%. El primer cluster se segrega en 2 subclusters, cada uno de los cuales agrupa las muestras de los experimentos 1 y 2 respectivamente (similitud 82,8%). El segundo cluster principal también se divide en 2 subclusters, que incluyen los experimentos 3 y 4 (similitud 69,8%). Se obtuvieron 54 clases de bandas diferentes de Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio.

Al observar el dendrograma apreciamos una clase de banda característica del experimento 1 (marcada con un recuadro turquesa), y dos clases de banda que sólo están presentes durante los experimentos 3 y 4 (marcadas con un recuadro verde). También podemos observar dos clases de banda presentes en todos los experimentos, una de ellas marcada con un recuadro amarillo en el dendrograma A y que corresponde con la clase de banda número 17 del dendrograma B, y la otra, marcada con un cuadrado azul en el dendrograma A y que corresponde con la clase de banda número 39 del dendrograma B, en la figura IV.29.

Los datos correspondientes a la presencia/ausencia de clases de banda (excluyendo las clases de banda correspondientes a los marcadores), se normalizaron y se analizaron con el programa estadístico multivariante Canono v. 4.5 (ScientiaPro, Budapest, Hungría), para estudiar la relaciones entre las Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio y las variables fisicoquímicas del influente del SFBBR en los diferentes experimentos. El análisis multivariante se llevo a cabo de forma análoga a la descrita en el apartado IV.3.1.

Previamente, se realizó el análisis de correspondencias sin tendencias (DCA) obteniéndose una longitud de gradiente menor de 3, por lo que los datos seguían una distribución lineal. Se utilizó el análisis de redundancias (RDA). El resultado del análisis del RDA se representa mediante el siguiente diagrama *biplot* (figura IV.30).

De todas las variable del influente consideradas, el test de Monte Carlo pone de manifiesto que únicamente la salinidad y el pH influyen de manera estadísticamente significativa, con  $p < 0,05$ , en la variabilidad de la biodiversidad de las Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio.



**Figura IV.29.** Dendrogramas obtenidos al analizar los perfiles de bandas del DGGE de las comunidades de Beta-proteobacterias nitrificantes de fase I presentes en las muestras de biopelícula del SFBBR, utilizando el programa Gel Compar II v. 5.101 (Applied Maths, Bélgica) aplicando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y el coeficiente de Dice. La barra superior muestra la similitud entre los perfiles de bandas y los números entre las ramas representan el coeficiente de correlación cofenética. En la figura B se muestra las intensidades relativas en escala de grises de las diferentes clases de banda presentes en los perfiles del DGGE.

En la figura IV.30 podemos ver un diagrama *biplot* de las distintas muestras de biopelícula y de las variables ambientales consideradas en el análisis. Las muestras se agrupan según los diferentes experimentos. En el *biplot*, la salinidad es la variable ambiental más determinante en el eje horizontal. Las muestras correspondientes a los

experimentos 3 y 4 forman un ángulo agudo con el vector de la salinidad, presentando una correlación positiva, mientras que las muestras de los experimentos 1 y 2 presentan una correlación negativa con dicho vector (ángulo obtuso). Por otro lado, el vector del pH forma un ángulo obtuso con las muestras de los experimentos 1, 3 y 4, presentando una correlación negativa con dichas muestras y un ángulo agudo con las muestras del experimento 2, mostrando una correlación positiva.

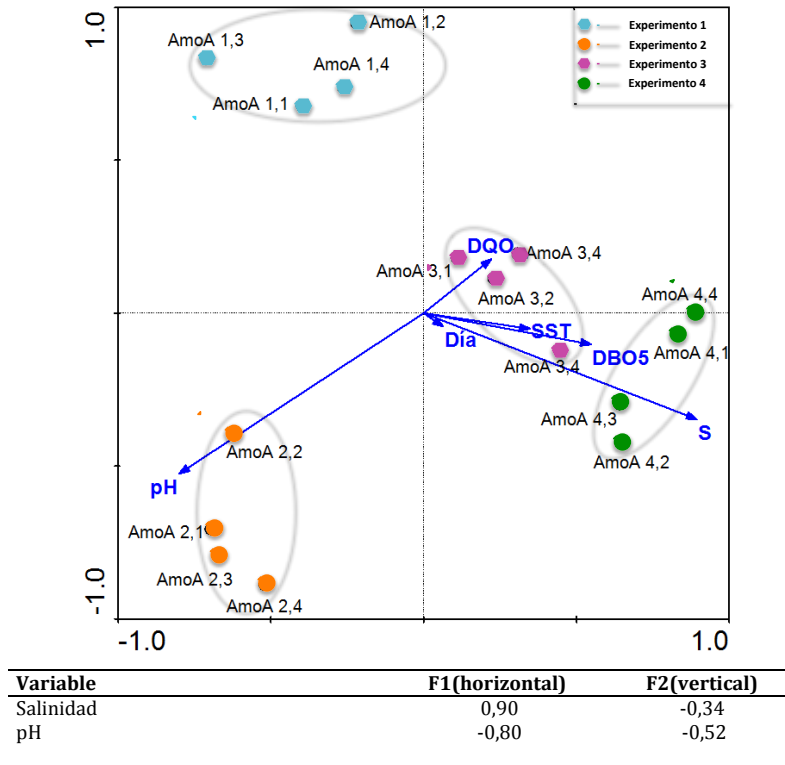


Figura IV.30. Diagrama de ordenación *biplot* del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre la estructura de la comunidad de Beta-proteobacteria oxidadoras de amonio en las muestras del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos medidos durante la operación en los cuatro experimentos. Las muestras se representan mediante colores (azul para el experimento 1, naranja para el experimento 2, morado para el experimento 3 y verde para el experimento 4), y los parámetros fisicoquímicos se representan con flechas: Sólidos en Suspensión Totales (SST), pH, Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Biológica de Oxígeno (DBO5), día del ciclo (Día), salinidad (S). El primer eje de ordenación es el horizontal, el segundo eje de ordenación es el vertical.

El 60,7% de la variabilidad de la estructura de la comunidad de Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio (basada en la presencia/ausencia de las clases de

banda detectadas mediante el análisis de clusters) explicable mediante las variables del influente consideradas, y el 39,4% de su variabilidad total, se describen considerando el primer eje de ordenamiento canónico (COA). Si además consideramos el segundo COA (vertical) se describe un 82,8% de la variabilidad de la estructura de la comunidad de Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio explicable mediante las variables ambientales consideradas en el análisis, y un 53,8% de su variabilidad total (tabla IV.13).

**Tabla IV.13. Resultados del análisis de redundancia (RDA), realizado con los datos de las especies (presencia/ausencia de las clases de banda de Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio del DGGE) y las variables ambientales del influente en el SFBBR (SST, DQO, DBO<sub>5</sub>, pH, salinidad y día de muestreo) en los cuatro experimentos.**

Ejes	1	2	3	4
Valores propios	0,394	0,144	0,041	0,028
Correlaciones entre especies y variables ambientales	0,959	0,961	0,754	0,862
Variación porcentual acumulada				
de datos sobre especies	39,4	53,8	57,9	60,6
de relación especies-ambiente	60,7	82,8	89,1	93,3
Suma de todos los valores propios				1,000
Suma de todos los valores propios canónicos				0,650

En la figura IV.31 podemos comprobar que hay clases de banda que forman un ángulo agudo con el vector salinidad y por tanto tiene una correlación positiva con el, y un ángulo obtuso con el vector del pH (correlación negativa). Dichas clases de banda sólo están presentes a elevadas concentraciones de sal y a pH bajo. Por el contrario, hay otras clases de banda que forman un ángulo obtuso con el vector de la salinidad, presentando una correlación negativa con la salinidad y un ángulo agudo con el vector del pH, presentando un correlación positiva. Estas clases de banda sólo aparecen cuando la concentración de sal es baja y el pH elevado.

Las clases de banda 17 y 39 no se ven afectadas por las variables ambientales del influente consideradas en el análisis, por lo que están presentes en todos los experimentos y aparecen en el *biplot* (representadas por X) en el centro del diagrama.



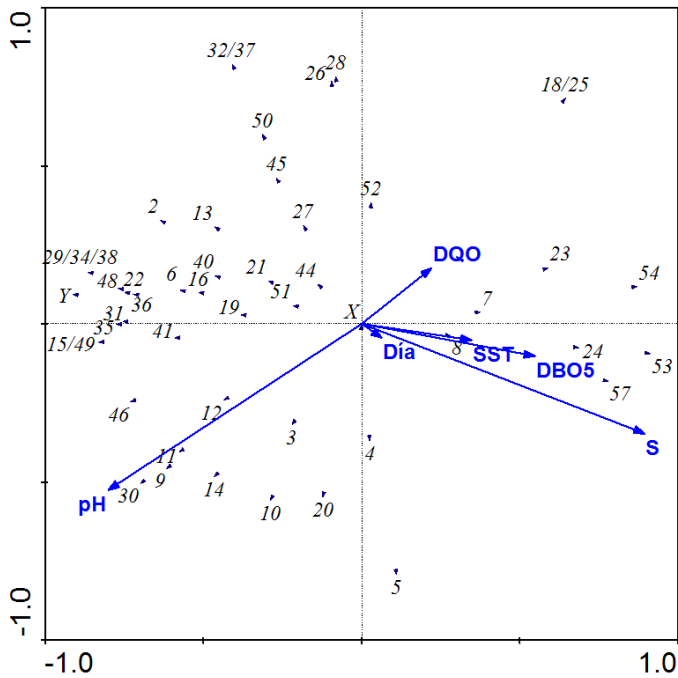


Figura IV.31. Diagrama de ordenación *biplot* del análisis de redundancias (RDA), mostrando la relación entre la distribución de las clases de banda de la comunidad de Beta-proteobacteria oxidadoras de amonio en las muestras del SFBBR y los parámetros fisicoquímicos medidos durante la operación en los cuatro experimentos. Las clases de banda se representan mediante triángulos azules junto al número de la clase de banda correspondiente, y los parámetros fisicoquímicos se representan con flechas: Sólidos en Suspensión Totales (SST), pH, Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Biológica de Oxígeno (DBO5), día del ciclo (Día), salinidad (S). El primer eje de ordenación es el horizontal, el segundo eje de ordenación es el vertical. X: posición de las clases de banda 17/39; Y: posición de las clases de banda 33/42/43/47.

#### IV.4. DISCUSIÓN

Durante la última década, la posibilidad de identificar específicamente poblaciones de microorganismos en su hábitat sin necesidad de aislarlos, ha revolucionado la ecología microbiana (Sanz y Köchling, 2007). Los métodos basados en técnicas moleculares se han utilizado para responder a la pregunta de qué organismos están presentes, y han revelado la gran diversidad de comunidades microbianas en los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales (de lo Reyes 3rd, 2010). Los avances moleculares han puesto de manifiesto el papel tan importante que estas comunidades juegan en diferentes procesos de tratamiento de aguas residuales, tales como la transformación del nitrógeno (Schmidt *et al.*,

2003). La actividad microbiana y la fisiología son fuertemente dependientes de la composición de la comunidad microbiana y las interacciones entre sus miembros (Brock, 1987).

La determinación de la estructura de la comunidad microbiana (es decir, los tipos y abundancia de las poblaciones de la comunidad) en biorreactores que realizan diferentes funciones o sometidos a perturbaciones, es suficiente para delimitar la función microbiana. Por ello, al inicio de este estudio se planteó como un objetivo fundamental el avanzar en el conocimiento de la biodiversidad de las biopelículas del sistema de filtros sumergidos para el tratamiento del agua residual urbana mediante la aproximación a nivel molecular.

Los perfiles obtenidos mediante DGGE proporcionan un método gráfico muy rápido para la comprobación de los cambios temporales de la biodiversidad, y por lo tanto es un método de elección para realizar el seguimiento de estos sistemas durante su puesta a punto y funcionamiento. Estudios previos han indicado la utilidad de las técnicas de DGGE/TGGE para el análisis de los cambios introducidos por diversos choques ambientales en la composición de comunidades de fangos activos para el tratamiento de aguas residuales industriales (Lapara *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 1999). Hacer seguimientos de este tipo es de especial importancia, así, autores como Wagner *et al.* (2002) indican la necesidad de entender la relación existente entre la diversidad de los distintos grupos bacterianos funcionalmente importantes y la estabilidad del proceso. Ya que sistemas con una baja diversidad en un determinado grupo de bacterias funcionales se muestran mucho más sensibles a fallos en el proceso que aquellos que presentan una diversidad mayor en el mismo grupo funcional de bacterias.

Así, la DGGE ha sido ampliamente utilizada para conocer la composición de la comunidad microbiana y seguir la sucesión de las poblaciones de bacterias en sistemas de tratamiento de aguas residuales salinas (Yan *et al.*, 2011).

De esta manera, con el objetivo de evaluar el impacto de la salinidad sobre la biodiversidad de la biopelícula del SFBRR, se realizaron mediante DGGE estudios de los perfiles de biodiversidad del conjunto de la comunidad de Bacteria, hongos, arqueas y, además, se obtuvieron perfiles específicos de Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio (Sanz y Köchling, 2007; Cortés-Lorenzo *et al.*, 2006; Gómez-Villalba *et al.*, 2006).

Un primer estudio sobre el perfil de biodiversidad de la comunidad de Bacteria puso de manifiesto un patrón complejo formado por un elevado número de bandas (figura IV.12). El perfil de DGGE indica una comunidad bacteriana enormemente diversa, con algunas bandas presentes en toda las fases experimentales, si bien con distinta intensidad. Observamos un incremento en la intensidad de las bandas cuando la salinidad es elevada (experimentos 3 y 4). Bassin *et al.* (2011) comprobaron que algunos microorganismos, como los pertenecientes al grupo *Denitromonas*, tienen una mayor afinidad por altas concentraciones de sal, ya que la intensidad de algunas bandas aumento cuando se incrementaron de los niveles de salinidad. Aunque el DGGE/TGGE no son técnicas cuantitativas debido a que están influenciadas por la reacción de PCR, como ya hemos comentado anteriormente, el hecho de variar la intensidad de una misma banda en las diferentes muestras está relacionado con un cambio en su abundancia relativa en la composición de la comunidad bacteriana (Stamper *et al.*, 2003; Brüggemann *et al.*, 2000).

El análisis de los dendrogramas generados a partir de este gel segregó las muestras en dos clusters principales (figura IV.13). En un primer cluster, se agruparon las muestras de biopelícula sometidas a un influente procedente directamente del decantador primario (experimento 1) y las muestras sometidas a un influente adicionado de 3,7 g/L de NaCl (experimento 2), y en el segundo cluster se agrupan las muestras correspondientes a los experimentos 3 y 4 ( $\geq 24,1$  g/L). Son observadas variaciones de la intensidad de las bandas, en especial cuando las muestras fueron sometidas a salinidad elevada. Se aprecian cambios en la composición de la comunidad microbiana al variar la salinidad en el influente del SFBBR, disminuyendo la biodiversidad a partir del experimento 3. Por todo ello, podemos sugerir que la presencia de sal en el influente induce variaciones significativas en los perfiles de biodiversidad.

En experiencias previas con sistemas análogos empleados para el tratamiento del agua residual urbana, Gómez-Villalba *et al.* (2006) obtuvieron perfiles de biodiversidad similares al obtenido en nuestro estudio durante el experimento 1, compuestos por un elevado número de bandas.

Los efectos de la salinidad sobre la biodiversidad microbiana en sistemas de tratamiento de aguas residuales son contradictorios. Yan *et al.* (2011) comprobaron en fangos activos, que la biodiversidad bacteriana fue mayor con aguas residuales salinas que

la detectada con aguas residuales convencionales. Sin embargo, Li *et al.* (2009) comprobaron que el número de especies bacterianas en fangos activos disminuía con la adición de aguas residuales hipersalinas en el influente.

Los hongos constituyen un grupo fisiológicamente y genéticamente diverso de organismos que son la clave para una variedad de funciones de los ecosistemas, incluyendo el ciclo de nutrientes, la actividad patógena, la degradación de materia orgánica recalcitrante, la facilitación del crecimiento de las plantas y la transformación de compuestos xenobióticos. Sin embargo, poco se sabe acerca de su dinámica de población, estructura de la comunidad y diversidad, detectada en el medio ambiente (Kowalchuk y Smit, 2004).

Para complementar los métodos basados en el cultivo de las comunidades fúngicas se han adoptado una serie de estrategias independientes de cultivo basadas en PCR, que han revolucionado la ecología microbiana eucariota. A pesar de que este campo está todavía muy poco desarrollado en comparación con el análisis molecular de comunidades bacterianas (Kowalchuk y Smit, 2004; Kowalchuk, 1999), diversas técnicas se han desarrollado para estudiar la estructura de las comunidades de hongos en ambientes diversos. La mayoría de éstas combinan la amplificación de fragmentos de genes codificantes de ARNr específicos de hongos con las estrategias de creación de perfiles de la comunidad, tales como DGGE o TGGE (Kowalchuk y Smit, 2004; Muyzer *et al.*, 1993).

En lo referente al estudio de las comunidades de hongos en las muestras analizadas, los perfiles de DGGE obtenidos, al igual que en el caso de Bacteria, mostraron un número elevado de bandas, presentando una mayor diversidad en las muestras de biopelícula del experimento 2, es decir, cuando la concentración de NaCl en el influente es de 3,7 g/L. En el caso de los hongos, los dendrogramas generados separan las muestras en 2 clusters, uno de los cuales incluye todas las muestras correspondientes al experimento 2 y en el otro cluster se agrupan las muestras de biopelículas de los experimentos 1, 3 y 4.

Mohamed y Martiny (2011) estudiaron la composición y diversidad de hongos a lo largo de gradientes de salinidad en estuarios. Comprobaron una mayor diversidad de hongos cuando la salinidad es intermedia. Sugirieron que cuando la salinidad es intermedia, se dan variaciones génicas que permiten que un mayor número de especies de hongos coexistan. Esta misma tendencia ha sido la observada de forma general en nuestro estudio,

aunque un análisis más específico de estas observaciones necesitaría de un estudio más detallado.

El análisis de los perfiles de biodiversidad obtenidos para la comunidad de arqueas puso de manifiesto la presencia de una clase de banda mayoritaria de gran intensidad presente en todos los tratamientos llevados a cabo en este estudio. A pesar de la presencia de una población prevalente en todos los tratamientos analizados, otras clases de banda caracterizan a cada uno de los tratamientos estudiados. Las comunidades en el experimento 1 muestran una mayor divergencia en comparación con las del resto de las muestras de los demás experimentos, debido a la influencia de las aguas residuales salinas. La composición de las aguas residuales es un factor determinante de la composición de la comunidad de arqueas en las EDARs (Stephanie *et al.*, 2008; Akarsubasi *et al.*, 2004; Gray *et al.*, 2002).

Independientemente de las características y condiciones de las muestras, diversos estudios han puesto de manifiesto que las arqueas metanogénicas (Methanosarcinales, Methanobacteriales y Methanomicrobiales) constituyen poblaciones dominantes de arqueas en sistemas de tratamiento de aguas residuales. Arqueas metanogénicas se presentan comúnmente en MBR y SFBBR bajo condiciones de funcionamiento aerobio (Gómez-Silván *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2002). Gómez-Silván *et al.* (2010) encontraron diferencias significativas en la incidencia y la intensidad relativa de las bandas al comparar la comunidad de arqueas en biopelículas aireadas y anóxicas, mostrando la influencia de la exposición al O<sub>2</sub> en la riqueza de especies y la abundancia de las mismas. Al ser el DGGE una técnica basada en PCR, detecta sólo a las poblaciones que representen al menos el 1% del total de la comunidad dirigida por los iniciadores (Muyzer, 1999), y por lo tanto las poblaciones metanogénicas se han señalado como numéricamente importantes en la comunidad de arqueas detectable por los métodos utilizados en dicho estudio.

La abundancia y la diversidad relativa de las poblaciones existentes de arqueas fue influenciada por el efecto de las características de cada tratamiento, lo que lleva al desarrollo de las estructuras comunitarias características.

Como colofón a los estudios del impacto de la salinidad sobre las comunidades microbianas en un SFBBR, se trató de investigar la biodiversidad de las Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio utilizando la técnica DGGE. La nitrificación es

susceptible a la inhibición por la sal, siendo considerado un factor de inestabilidad en muchas plantas de tratamiento de aguas residuales (Bassin *et al.*, 2011; Moussa *et al.* 2006). Además, la composición de la comunidad microbiana puede cambiar considerablemente en función de cómo se adapte a concentraciones crecientes de sal (ya sea gradual o por la administración de impulsos).

El estudio de las bacterias nitrificantes en ecosistemas naturales y en sistemas de depuración de aguas residuales se ha beneficiado enormemente con la introducción de las técnicas de biología molecular en el campo de la ecología microbiana, dado que este grupo de bacterias presenta algunas particularidades, como es el hecho de que muchos de sus integrantes son especialmente difíciles de cultivar bajo condiciones de laboratorio, y existen varios géneros o especies que aún son no cultivables. Por otro lado, la proximidad evolutiva del grupo de las bacterias nitrificantes de fase I (AOB) facilita el diseño de cebadores específicos de grupo para la amplificación de genes de interés como marcadores. De este modo, diversos autores han diseñado y empleado con éxito, cebadores para la amplificación específica de fragmentos del gen *amoA*, el cual es empleado cada vez con más frecuencia como marcador filogenético para las Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio en estudios publicados en la última década (Gómez-Villalba *et al.*, 2006; Layton *et al.*, 2005; Nicolaisen y Ramsig, 2002; Sakano *et al.*, 2002; Oved *et al.*, 2001; Horz *et al.*, 2000; Purkhold *et al.*, 2000), y por esta razón se escogió también como marcador para nuestros estudios. Inicialmente los experimentos 1 y 2 presentaron una comunidad muy similar, pero hubo una divergencia fuerte al aumentar la concentración de sal en el influente. El análisis del DGGE mostró que dos de las clases de banda principales (de gran intensidad) estuvieron presentes durante todos los experimentos, lo que sugiere que no se ven afectadas por la sal. Con la creciente concentración de sal en el SFBBR, algunas clases de bandas desaparecieron por completo. Sudarno *et al.* (2010) encontraron una evolución similar de las AOBs en un SFBBR en el tratamiento de aguas residuales salinas, a medida que aumentaba la concentración salina en el influente.

Investigaciones previas sobre la biodiversidad de las bacterias nitrificantes de fase I en fangos activos, demuestran que los microorganismos del género *Nitrosomonas* son los que llevan el peso de la oxidación de amonio en los sistemas de depuración del agua residual urbana, siendo los microorganismos afiliados a las especies *N. europaea*, *N. marina*

y *N. eutropha* los más abundantes (Siripong y Rittmann, 2007; Ottawa *et al.*, 2006; Wittebolle *et al.*, 2005; Mobarry *et al.*, 1996; Schramm *et al.*, 1996; Stephen *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1995). En contraste, *Nitrospira* spp. son encontradas como las oxidadoras de amonio dominantes en muy pocos casos (Wagner *et al.*, 2002; Purkhold *et al.*, 2000). La abundancia relativa de *Nitrosomonas* y *Nitrospira* se ha relacionado con diferencias fisiológicas asociadas con su tolerancia o sensibilidad a las concentraciones altas de amonio (Prosser, 2007). En aguas residuales salinas, Bassin *et al.* (2011) comprobaron que *Nitrosomonas* sp. parecía tener alta afinidad por la sal, mientras que *N. eutropha* y *N. europaea* parecían estar más afectados por la salinidad presente en aguas residuales.

En cuanto a estudios realizados sobre la biodiversidad de las bacterias nitrificantes en sistemas SFBBR, tratando agua residual urbana Gómez-Villalba *et al.* (2006) pusieron de manifiesto mediante TGGE que las poblaciones nitrificantes dominantes en dicho sistema pertenecía al género *Nitrosomonas*, observando la presencia de una amplia diversidad de especies de este género. La abundancia y la diversidad de bacterias oxidadoras de amonio en ambientes salinos es aun poco conocida (Herbert, 1999). En este sentido, futuros estudios de caracterización de las especies más importantes mediante técnicas de pirosecuenciación, se encuentran en marcha en nuestro grupo de investigación.

## IV.5. BIBLIOGRAFÍA

**Akarsubasi, A.T., Ince, O., Kirdar, B., Oz, N.A., Orhon, D., Curtis, T.P., Head, I.M., Ince, B.K.,** 2005. Effect of wastewater composition on archaeal population diversity. *Water Research* 39: 1576-1584.

**Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H.,** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59: 143-169.

**Bassin, J.P., Dezotti, M., Sant'Anna, G.L.Jr.,** 2011. Nitrification of industrial and domestic saline wastewaters in moving bed biofilm reactor and sequencing batch reactor. *Journal of Hazardous Materials* 185: 242-248.

**Bernhard, A.E., Donn, T., Giblin, A.E., Stahl, D.A.,** 2005. Loss of diversity of ammonia-oxidizing bacteria correlates with increasing salinity in an estuary system. *Environmental Microbiology* 7: 1289-1297.

**Brock, T.D.,** 1987. The study of microorganisms in situ: progress and problems. *A Symposium of the Society for General Microbiology* 41: 1-17.

**Brüggemann, J., Stephen, J.R., Chang, Y.J., Macnaughton, S.J., Kowalchuk, G.A., Kline, E., White, D.C.,** 2000. Competitive PCR-DGGE analysis of bacterial mixture: an internal standard and an appraisal of template enumeration accuracy. *Journal of Microbiology and Methods* 49: 111-123.

**Cortés-Lorenzo, C., Molina-Muñoz, M., Gómez-Villalba, B., Vilchez, R., Ramos, A., Rodelas B., Hontoria E., González-López, J.,** 2006. Analysis of community composition of biofilms in a submerged filter system for the removal of ammonia and phenol from industrial wastewater. *Biochemical Society Transactions* 34: 161-168.

**de los Reyes, F.L. 3rd,** 2010. Challenges in determining causation in structure-function studies using molecular biological techniques. *Water Research* 44: 4948-4957.

**Fernández, N., Díaz, E.E., Amils, R., Sanz, J.L.,** 2008. Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor. *Microbial ecology* 56: 121-132.

**Fisher, A.G.,** 1961. Latitudinal variations in organic diversity. *Evolution* 14: 64-81.

**Fischer, S.G., Lerman, L.S.,** 1983. DNA Fragments Differing by Single Base-Pair Substitutions are Separated in Denaturing Gradient Gels: Correspondence with Melting Theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80: 1579-1583.

**Gómez-Silván, C., Molina-Muñoz, M., Poyatos, J.M., Ramos, A., Hontoria, E., Rodelas, B., González-López, J.,** 2010. Structure of archaeal communities in membrane-bioreactor and submerged-biofilter wastewater treatment plants. *Bioresource Technology* 101: 2096-2105.



**Gómez-Villalba, B., Calvo, C., Vilchez, R., Gónzále-López, J., Rodelas, B.,** 2006. TGGE analysis of the diversity of ammonia-oxidizing and denitrifying bacteria in submerged filter biofilms for the treatment of urban wastewater. *Applied Microbiology and Technology* 72: 393-400.

**Gray, N.G., Miskin, I.P., Kornilova, O., Curtis, T.P., Head, I.M.,** 2002. Occurrence and activity of Archaea in aerated activated sludge wastewater treatment plants. *Environmental Microbiology* 4: 158-168.

**Head, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R.W.,** 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology* 35: 1-21.

**Herbert, R.A.,** 1999. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 23: 563-590.

**Horz, H., Rotthauwe, J, Lukow, T.,Liesack, W.,** 2000. Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of amo A PCR products. *Journal of Microbiological Methods* 39: 197-204.

**Kleikemper, J., Pombo, S.A., Schroth, M.H., Sigler, W.V., Pesaro, M., Zeyer, J.,** 2005. Activity and diversity of methanogens in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Applied Microbiology and Technology* 71: 149-158.

**Kowalchuk, G.A.,** 1999. New perspectives towards analyzing fungal communities in terrestrial ecosystems. *Current Opinions in Biotechnology* 10: 247-251.

**Kowalchuk, G., Smit, E.,** 2004. Fungal community analysis using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), En: *Molecular Microbial Ecology Manual* (2nd ed.), Kowalchuk G.A.; de Bruijn, F.J.; Head, I.M.; Akkermans, A.D.L. & van Elsas, J.D. (Eds.), p. 771-788, Kluwer academic publishers, Dordrecht, The Netherlands.

**Lane, D.J.,** 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, p. 115-175.

**Lapara, T.M., Nakatsu, C.H., Pantea, L.M., Alleman, J.E.,** 2001. Aerobic biological treatment of a pharmaceutical wastewater: effect of temperature on COD removal and bacterial community development. *Water Research* 35: 4417-4425.

**Layton, A.C., Dionisi, H., Kuo, H.W., Robinson K. G., Garret, V.M., Meyers, A., Sayler, G.S.,** 2005. Emergence of competitive dominant ammonia oxidizing bacterial populations in a full-scale industrial wastewater treatment plant. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1105-1108.

**Lee Man Chu, Wong P.K.,** 2006. *Microbes in Environmental Biotechnology. Municipal Wastewater Treatment. Microbial Biotechnology, principles and Applications*, 2 edn, Chapter 16: 644-650.

**Lepš, J., Šmilauer, P.,** 2003. Multivariate Analysis of Ecological Data Using Canoco. Cambridge University Press.

**Li, J., Jin, Z., Yu, B.,** 2009. Changes in the structure and diversity of bacterial communities during the process of adaptation to organic wastewater. *Canadian Journal of Microbiology* 56: 352-355.

**Lozupone, C.A., Knight, R.,** 2007. Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 11436-11440.

**Matsumoto, S., Terada, A., Aio, Y., Tsuneda, S., Alpkvist, E., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M.,** 2007. Experimental and simulation analysis of community structure of nitrifying bacteria in a membrane-aerated biofilm. *Water Science and Technology* 55: 283-290.

**May, L.A., Smiley, B., Schmidt, M.G.,** 2001. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 829-841.

**Mobarry, B.K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B.E., Stahl, D.A.,** 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2156-2162.

**Mohamed, D.J., Martiny, J.B.,** 2011. Patterns of fungal diversity and composition along a salinity gradient. *ISME Journal* 5: 379-88.

**Moussa, M.S., Sumanasekera, D.U., Irahim, S.H., Lubberding, H.J., Hooijmans, C.M., Gijzen, H.J., van Loosdrecht, M.C.M.,** 2006. Long term effects of salt on activity, population structure and floc characteristics in enriched bacterial cultures of nitrifiers. *Water Research* 40: 1377-1388.

**Müller, V., Spanheimer, R., Santos, H.,** 2005. Stress response by solute accumulation in archaea. *Current Opinion in Microbiology* 8: 729-736.

**Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G.,** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.

**Muyzer, G., Smalla, K.,** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.

**Muyzer, G.,** 1999. DGGE/TGGE, a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2: 317-322.

**Neefs, J.M., Van de Peer, Y., Hendriks, L., De Wachter, R.,** 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acid Research* 18: 2237-2242.

**Nicolaisen, M.H., Ramsing, N.B.,** 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 50: 189-203.

**Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H.,** 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 178: 5636-5643.

**Otawa, K., Asano, R., Ohba, Y., Sasaki, T., Kawamura, E., Koyama, F., Nakamura, S., Nakai, Y.,** 2006. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria community in intermittent aeration sequencing batch reactors used for animal wastewater treatment. *Environmental Microbiology* 8: 1985-1996.

**Oved, T., Shaviv, A., Goldrath, T., Mandelbaum, R., Minz, D.,** 2001. Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3426-3433.

**Prosser, J.I.,** 2007. The ecology of nitrifying bacteria. En: *Biology of the Nitrogen Cycle*, Bothe, H, Ferguson, S.J. and Newton, W.E. (Eds.), pp. 223-243. Elsevier, The Netherlands.

**Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M., Koops, H., Wagner, M.,** 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and AmoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5386-5382.

**Riesner, D., Steger, G., Zimmat, R., Owens, R.A., Wagenhofer, M., Hillen, W., Vollbach, S., Henco, K.,** 1989. Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids: analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein-nucleic acid interactions. *Electrophoresis* 10: 377-389.

**Rosenzweig, M.,** 1995. *Species Diversity in Space and Time*. Cambridge University Press: Cambridge, England.

**Rotthauwe, J.H., Witzely, K.P., Liesack, W.,** 1997. The ammonia monooxygenase structural genes amoA as functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4704-4712.

**Sakano, Y., Pickering, K., Strom, P., Kerkhof, L.,** 2002. Spatial distribution of total, ammonia-oxidizing, and denitrifying bacteria in biological wastewater treatment reactors for bioregenerative life support. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2285-2293.

**Sambrook, J., Fritschi, E.F., Maniatis, T.,** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. N.Y, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

**Sanguinetti, C.J., Dias Neto, E., Simpson, A.J.,** 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 915-919.

**Sanz, J.L., Köchling, T.,** 2007. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry* 42: 119-133.

**Savelkoul, P.H., Aarts, H.J., de Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J.L., Schouls, L., Lenstra, J.A.,** 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3083-3091.

**Schmidt, K., Atkinson, A., Stubing, D., McClelland, J.W., Montoya, J.P., Voss, M.,** 2003. Trophic relationships among Southern Ocean copepods and krill: Some uses and limitations of a stable isotope approach. *Limnology and Oceanography* 48: 277-289.

**Schramm, A., Larsen, L.H., Revsbech, N.P., Ramsing, N.B., Amann, R., Schleifer, K.H.,** 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4641-4647.

**Siripong, S., Rittmann, B.E.,** 2007. Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants. *Water Research* 41: 1120-1120.

**Stamper, D.M., Walch, M., Jacobs, R.N.,** 2003. Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 852-860.

**Stephanie, A.F., Sierra-Álvarez, R., Altinbas, M., Hollingsworth, J., Stams, A.J.M., Smidt, H.,** 2008. Molecular characterization of mesophilic and thermophilic sulfate reducing microbial communities in expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *Biodegradation* 19: 161-177.

**Stephen, J.R., McCaig, A.E., Smith, Z., Prosser, J.I., Embley, T.M.,** 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to  $\beta$ -subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4147-4154.

**Sudarno, U., Bathe, S., Winter, J., Gallert, C.,** 2010. Nitrification in fixed-bed reactors treating saline wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 2017-2030.

**ter Braak, C.J.F., Smilauer, P.,** 2002. CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca, New York, USA.

**Vanechoutte, M.,** 1996. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. *Molecular Biotechnology* 6: 115-142.

**Van Verseveld, H.W., Röhling, W.F.M.,** 2004. Cluster analysis and statistical comparison of molecular community profile data, p. 1-24. En Kowalchuk, G.A., De Bruijn, F.J., Head, J., H., Akkermans, A.D.L., y van Elsas, J.D. (eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual* 2nd Ed., vol. 1.7.4.

**Vyrides, I., Stuckey, D.C.**, 2009. Adaptation of anaerobic biomass to saline conditions: Role of compatible solutes and extracellular polysaccharides. *Enzyme and Microbial Technology* 44: 46-51.

**Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H-P., Schleifer K-H.**, 1995. In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 19: 251-264.

**Wagner, M., Loy, A., Nogerira, R., Purkhold, U., Lee, N., Daims, H.**, 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 665-680.

**Watanabe, K., Teramoto, M., Harayama, S.**, 1999. An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2813-2819.

**Weisburg, W.G., Barn, S.M., Pelletier, D.A., Lane. D.J.**, 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.

**White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.**, 1990. Amplification and direct sequencing of offungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications (M.A. Innis, D.A. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White). Academic Press, San Diego, CA, USA, p. 315-322.

**Wittebolle, L., Boon, N., Vanparys, B., Heylen, K., deVos, P., Verstraete, W.**, 2005. Failure of the ammonia oxidation process in two pharmaceutical wastewater treatment plants is linked to shifts in the bacterial communities. *Journal of Applied Microbiology* 99: 997-1006.

**Wuyts, J., Van de Peer, Y., Winkelmans, T., Watcher, R.D.**, 2002. The European Database on Small Subunit Ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 30: 183-185.

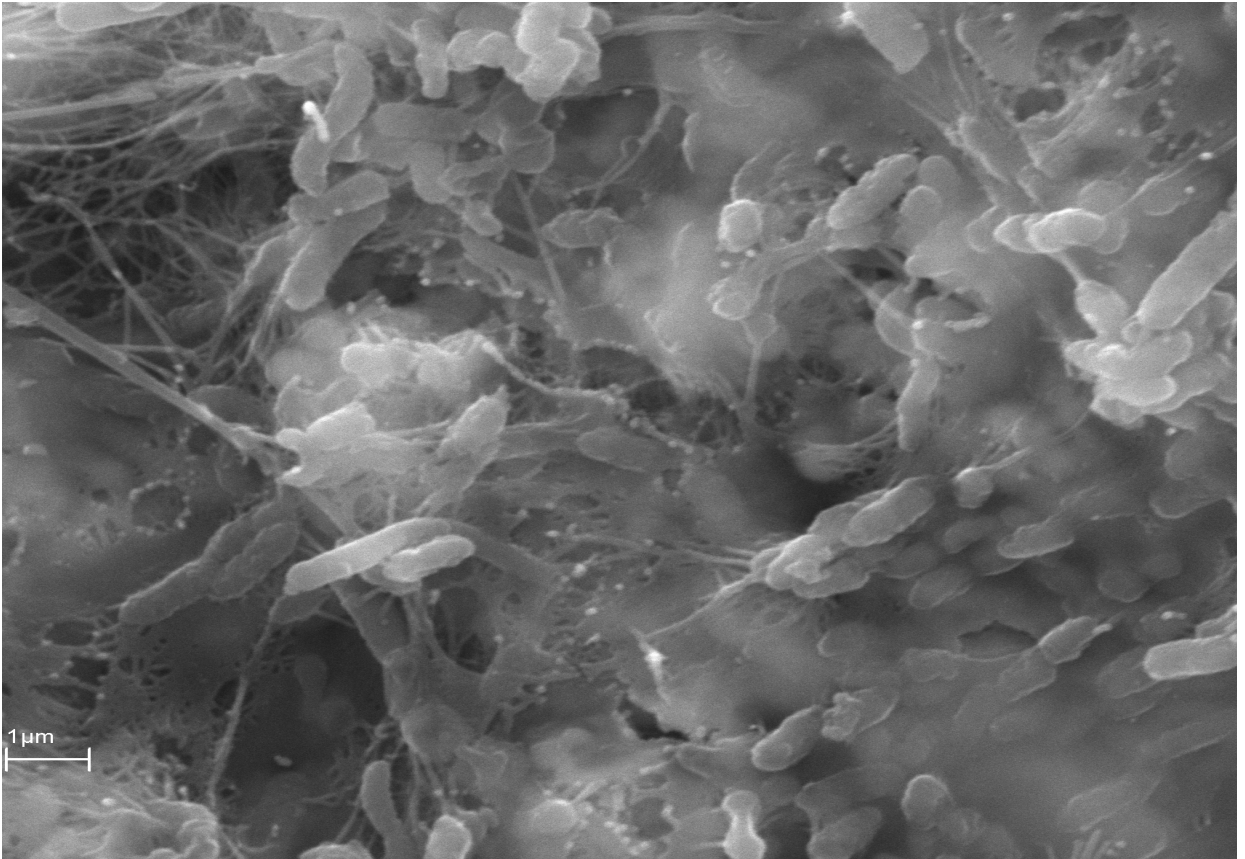
**Yan, Q.M., Zhang, X.X., Zhang, T., Fang, H.H.P.**, 2011. Seasonal microbial community shift in a saline sewage treatment plant. *Frontiers of Environmental Science and Engineering in china* 5: 40-47.

**Yu, Z., Morrison, M.**, 2004. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4800-4806.

**Yu, Z., García-González, R., Schanbacher, F.L., Morrison, M.**, 2008. Evaluation of different hypervariable regions of Archaeal 16S rRNA genes in profiling of methanogens by Archaea-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 889-893.

# Capítulo V

## English summary



## V.1. INTRODUCTION

Saline wastewaters are generated in many different areas of the world. As a matter of fact, several industries such as dairy, fish processing, petroleum and leather production companies generate highly saline wastewater. Urban wastewater may also be affected by these saline industrial wastewaters or other sources. Furthermore, many coastal cities, such as Hong Kong use seawater for toilet flushing to save freshwater (Aslan and Simsek, 2012; Sudarno *et al.*, 2011). Salt contamination also becomes part of the urban wastewater flow when common salt is used in the cities as means of thawing the snow and ice from the streets (Ludzack and Noran, 1965). All these wastewater sources are characterized by high salinity load.

Highly saline organic wastewaters are often poorly biodegraded in conventional wastewater treatment plants due to the toxic effect of their sodium content on biomass that has not been previously adapted to saline conditions. The high concentrations of salt can cause cell plasmolysis and cell death due to the dramatic increase in osmotic pressure and changes on microbial metabolism (Bassin *et al.*, 2011; Vyrides and Stuckey, 2009). There are two fundamental strategies for cells to survive under osmotic stress (Vyrides and Stuckey, 2009):

- a) Cells increase the intracellular ion concentration (mainly potassium) in order to balance the external osmotic pressure, and all intracellular enzymes have to adapt to new conditions (Müller *et al.*, 2005).
- b) Many microorganisms accumulate organic solutes called “compatible solutes”. The high external osmotic pressure is balanced within the cytoplasm by these organic compatible solutes without the need for special adaptation of the intracellular enzymes.

When the conventional activated sludge process is applied to treat the saline wastewater, high concentrations of inorganic salts can adversely affect carbonaceous oxidation, nitrification, denitrification and phosphorus removal, and even can cause the failure of wastewater treatment systems (Wu *et al.*, 2008; Sharrer *et al.*, 2007; Uygur and Kargi, 2004).

Major problems encountered in the biological treatment of saline wastewater can be summarized in four categories (Kargi and Dincer, 1996):

1. Limited extent of adaptation: Conventional biological systems cannot be effectively used to treat saline wastewater with salt concentrations greater than 3-5% NaCl. Salt adaptations of microbial biomass are easily lost when subjected to salt-free medium.
2. Sensitivity to changes in ionic strength: Shifts in salt concentration from 0.5-2% usually cause significant disruptions in system performance. Even with acclimated cultures, adequate performance requires constant ionic composition. Rapid change in salt concentrations causes more adverse effects than gradual change.
3. Reduced degradation kinetics: Biological degradation rates of organic compounds decreases with increasing salt concentration; therefore, saline wastewater should be treated at lower F/M ratios.
4. High effluent suspended solids concentration: Salt content in wastewater reduces the populations of protozoa and filamentous organisms, therefore resulting in low sedimentation efficiencies.

In this context, salinity has been implicated as a major factor regulating the bacterial composition and diversity across many different habitats (Mohamed and Martiny, 2011; Lozupone and Knight, 2007). Furthermore, a salinity gradient is likely to influence fungal diversity (Mohamed and Martiny, 2011).

One of the major advances in microbial ecology has been the introduction of the molecular biology techniques based on the *in situ* detection of nucleic acids. These methods provide important information about the microorganisms in their natural habitats, and have allowed for the discovery of a wide number of microbial species that were previously unknown, due to the difficulties for their culture and preservation under laboratory conditions. In this context, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) yields extensive information about the diversity of microorganisms in their habitats (Muyzer, 1999). These data make possible to monitor variations in the community profiles due to external factors. The DGGE technique has been often used in recent studies on the ecology of biological processes in wastewater treatment plants (WWTPs), providing interesting new data in this area (Cortés-Lorenzo *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2002).



Nitrogen plays an important role in eutrophication in the environmental water cycle. Nitrification is a key process in biological nitrogen removal. Commonly, it is considered as the rate-limiting step of the overall biological wastewater treatment process due to the low growth rate of the organisms involved. Nitrification is also susceptible of inhibition by salt, which has been considered an instability factor in many wastewater treatment plants (Aslan and Simsek, 2012). Salinity is known to affect the metabolic activity of nitrifying bacteria, reducing microbial growth and ammonium oxidation rates. Besides, the structure and settling properties of sludge flocks, as well as the maximum oxygen solubility and its transfer to the liquid phase are affected by salt (Bassin *et al.*, 2011; Moussa *et al.*, 2006). In Moussa *et al.* (2006), the effect of salt on the activity of nitrifiers in enriched culture was studied. At salinity levels of 10g Cl<sup>-</sup>/L (16.5 g NaCl/L) the ammonium oxidizers were more sensitive than the nitrite oxidizers. Almost complete inhibition of both bacterial groups occurred at 40 g Cl<sup>-</sup>/L (66 g NaCl/L).

The submerged fixed bed biofilm bioreactor (SFBBR) for wastewater treatment is an alternative to the suspended growth activated sludge process (Schlegel and Koeser, 2007). For the last 20 years, intensive research in the field of biological wastewater treatment and other applications tends to show that biofilms are often more efficient for water purification than suspended activated sludge (Weber *et al.*, 2007). Attached growth on surfaces of supporting materials has many advantages as compared to suspended growth in flocks or granules, for instance a long sludge retention time, prevention of washout of biomass and better process stability in terms of withstanding shock loadings or short-term disturbing effects (Sudarno *et al.*, 2011). Fixed bed biofilm reactors are one of the extensively used systems in the removal of organic pollutants from wastewater because of their simple mechanical configuration, endurance of high organic loading rate, low-energy requirements and low-operating costs (Guo *et al.*, 2010; Borghei *et al.*, 2008). Biofilms also protect microorganisms in hostile environments (Simões *et al.*, 2010), e.g. antimicrobial agents, UV light and other stressors (Lyon *et al.*, 2008).

Studies regarding the effect of salinity on the wastewater treatment systems are difficult to compare and often show contradictory results (Bassin *et al.*, 2011). At present, elevated salinity is likely to occur in many biological wastewater treatment systems and enzymatic activities are essential in the removal of macromolecules present in such wastewaters.

Domestic wastewater pollution contains complex organic matter consisting of lipids, proteins and polysaccharides (70-80%). A vast fraction of this organic matter is formed by particles larger than 0.1  $\mu\text{m}$  and for this reason microorganisms cannot assimilate it directly but through hydrolytic enzymes (Nabarlatz *et al.*, 2010). Enzymatic hydrolysis of organic compounds is the primary and often the rate-limiting step in wastewater treatment processes (Xie *et al.*, 2010). Acid phosphatase (EC 3.1.3.2), alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1), glucosidase (EC 3.2.1.20), protease (EC 3.4) and esterase (EC 3.1.1.3) are some of the most important enzymatic activities taking part in the biological wastewater treatment (Molina-Muñoz *et al.*, 2010; Cadoret *et al.*, 2002; Boczar *et al.*, 2001). Variations of the enzymatic activities are thus excellent indicators of the physiology of the mixed species sludge community.

## V.2. MATERIALS AND METHODS

### V.2.1. Description of the pilot-scale SFBBR experimental plant and operating conditions

The pilot-scale plant used for this experiment was based on a design already used successfully for wastewater treatment in previous studies (Ramos *et al.*, 2007; Cortés-Lorenzo *et al.*, 2006; Gómez-Villalba *et al.*, 2006). It consisted of one methacrylate cylindrical column with a bed size of 65 cm height and 15 cm diameter. A porous plastic carrier, Bioflow 9<sup>®</sup>, with a specific surface of 800  $\text{m}^2/\text{m}^3$  and a bulk density of 145  $\text{kg}/\text{m}^3$  was used as support material. Air was supplied by a diffuser placed on the bottom of the bioreactor, countercurrent operation. It was fed with influent wastewater (72 L/day) coming from the primary settling tank of the municipal WWTP “EDAR SUR” (EMASAGRA S.A., Granada, Spain). Cleaning cycles of the biofilter were carried out every 15 days in order to avoid filter clogging.

The influent wastewater was supplemented with salt (NaCl) concentrations ranging from 0, 3.7, 24.1 and 44.1 g/L. These four different working conditions (denominated as experiment 1, 2, 3 and 4) had a duration of 45 days, setting cycles of 15 days due to clogging of the biofilter. The experiments were chosen in such a way to allow a gradual adaptation to salt in SFBBR (four-step salt increase, 0, 3.7, 24.1 and 44.1 g/L). All experiments were carried out with the same inflow rate (50 mL/min), HRT (3,8 h) and Temperature (20°C).

The reactor was started up with no previous inoculations; thus the microorganisms in the biofilm came solely from the wastewater influent.

### **V.2.2. Biofilm recovery**

Recovery of biofilm was performed by removing it from the supporting material using methods previously described (Ramos *et al.*, 2007; Gómez-Villalba *et al.*, 2006). In short, 5-50 g of supporting material with adhered biofilm were collected in sterile conditions from different areas of the SFBBR and placed in flasks with 50 ml of sterile saline water. These suspensions were sonicated for one minute and then placed in an orbital shaker at 155 rpm for one hour according to Gómez-Villalba *et al.* (2006). The process was repeated twice.

The biofilm was obtained the days 2, 5, 9 and 12 of every working cycle to assess the evolution of its microbial enzymatic activities as well as the biodiversity within it. In every experiment performed under different salt concentrations, samples were taken during three consecutive cycles of operation. Samples from cycle 1 were named 1, 2, 3 and 4, samples from cycle 2 were named 5, 6, 7 and 8, and samples from cycle 3 were named 9, 10, 11 and 12.

### **V.2.3. Physic-chemical analysis**

Influent and effluent samples were obtained every 24 hours for analytical studies. Biological oxygen demand at 5 days (BOD<sub>5</sub>), chemical oxygen demand (COD), total suspended solids (TSS) and volatile suspended solids (VSS) were determined according to standard methods for the examination of waste and wastewater (APHA, 2005). The pH and conductivity were determined using a Crison pH 25 pH-meter and Crison EC-Meter GLP 31, respectively (Crison instruments S.A., Barcelona, Spain).

For ammonium, nitrate and nitrite analyses, water samples were filtered through 0.22 µm membrane filters (HAWP; Millipore Massachusetts, USA) and subsequently quantification of ammonia, nitrite and nitrate were determined by an ion chromatography (IC) system (Ramos *et al.*, 2007) using conductivity detection (Dionex® DX-300; Dionex Corporation, Sunnyvale, USA). Ammonium removal efficiency was calculated. Influent and effluent samples were collected four times in every cycle, the days 2, 5, 9 and 12.

### V.2.4. Evolution of microbial enzymatic activities

The analysis of enzymatic activities was done directly on biofilm samples. Phosphatase determination was performed by the method of Goel *et al.* (1998), using *p*-nitrophenyl phosphate (0.1%), which is converted by the enzyme to *p*-nitrophenol. Different buffers were used for measuring acid and alkaline phosphatases (acetate-acetic, pH 4.8, or carbonate-bicarbonate, pH 9.6, respectively). Glucosidases were measured by a colorimetric method (Goel *et al.*, 1998), with Tris-HCl buffers using 1% *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside as substrate for the reaction. For both phosphatases and glucosidases, standard curves were performed using known concentrations of *p*-nitrophenol. Total esterase activity was measured using the method described by Boczar *et al.* (2001). Substrates used in this assay were *p*-nitrophenyl esters of acetate, butyrate, caproate, caprilate, laurate and palmitate. The *p*-nitrophenol released in the phosphatases, glucosidase and esterase tests was determined colorimetrically at 410, 410 and 400 nm respectively, using a Hitachi U-2000 spectrophotometer (Tokyo, Japan), and compared with a standard. Protease activity was calculated by the colorimetric method described by Cadoret *et al.* (2002). Samples were placed in 100 ml Pyrex glass flasks and stirred at 150 rpm. The reaction was initiated by adding 25 ml of a 0.2% (w/v) substrate solution prepared by dissolving azocasein (Sigma A2765) in a phosphate buffer at pH 7.6 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.74 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12.4 g/L). Aliquots (0.5 mL) were sampled at regular time in polystyrene tubes. The reaction was stopped by adding 0.5 mL cold trichloroacetic acid 10% (w/v). Samples were incubated on ice for 10 min. After centrifugation at 2500 g for 5 min, the absorbances of the supernatants were read at 340 nm.

All chemicals required for the enzymatic activity analyses were provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Enzymatic activities measurements were conducted in triplicate.

Data were analyzed using the software package STATGRAPHICS v. 5.0 (STSC, Rockville, MD, USA) for calculation of analyses of variance (ANOVA). A significance level of 95% ( $p < 0.05$ ) was selected.

Redundancy analysis (RDA), an ordination method of direct gradient analysis (ter Braak and Prentice, 1988), was performed to search for patterns in the set of biological parameters (enzymatic activities) and to assess their relationship with environmental data

(operational parameters). The following nominal environmental variables were used: TSS concentration, VSS concentration, COD, BOD<sub>5</sub>, pH, sampling day and salinity of influent wastewater. Of these, VSS concentration had to be removed from the final analysis because of the strong linear correlation with TSS.

A preliminary performed detrended correspondence analysis (DCA) indicated the use of redundancy analysis (RDA) as constrained ordination method, as the enzymatic activities data exhibited a linear, rather than unimodal, response to the environmental variables (Lepš and Šmilauer, 2003). All the variables were transformed to  $\log(x+1)$  except pH. The Monte Carlo permutation test was used to assess the statistical significance of the canonical axes. All the multivariate statistics were computed using the Canoco v. 4.5 software (ScientiaPro, Budapest, Hungary).

#### **V.2.5. DNA extraction**

The DNA was extracted from the biofilm samples using the FastDNA kit and the FastPrep24 apparatus (MP-BIO, Germany). DNA concentration was measured using Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) and DNA isolated was diluted 1:10 in nuclease-free water.

#### **V.2.6. PCR amplification of partial bacterial 16S rRNA genes**

The previously isolated DNA was used as a template to amplify V6 to V8 regions of the 16S rRNA genes using primers 968-GC and 1401R (Yu and Morrison, 2004; Nubel *et al.*, 1996; Lane, 1991). PCRs were performed using a Phire hot start II DNA polymerase kit (Finnzymes). Each reaction mixture (final volume, 50  $\mu$ L) consisted of buffer 5X Phire F-524 at a concentration 1X, each deoxynucleoside triphosphate at a concentration of 0.2 mM (Promega), each primer at a concentration of 0.5  $\mu$ M (Eurogentec), 1  $\mu$ L of Phire hot start II DNA polymerase, and 1  $\mu$ L of appropriately diluted template of DNA. Samples were amplified with G-storm GS1 Thermo Cycler system (G-Storm & Kapa Biosystems, Somerset, UK) using the following program: pre-denaturation at 94°C for 2 min; 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 56°C for 40 s, extension at 72°C for 1 min; and a final extension at 72°C for 5 min. The correct size of the amplified fragments was checked visually after electrophoresis on a 1% agarose gel containing ethidium bromide.

### V.2.7. PCR amplification of partial fungal 18S rRNA genes

A partial sequence of the 18S rRNA gene (about 320 bp) was amplified using the primer pair NS1 (White *et al.*, 1990) and GCFung as described by May *et al.* (2001). Each PCR reaction contained 10 µL of buffer 5X Phire F-524 (Finnzymes), each deoxynucleoside triphosphate at a concentration of 0.2 mM (Promega), each primer at a concentration of 0.5 µM (Eurogentec), 1 µL of Phire hot start II DNA polymerase (Finnzymes), and 1 µL of appropriately diluted template of DNA, in a final volume of 50 µL.

The optimized PCR thermal cycles for the primer pair NS1 and GCFung was as follows: initial denaturation at 98°C for 1 min and 30 cycles of 98°C for 5 s, annealing at 55°C for 20 s and extension at 72°C for 40 s, then followed by a last extension at 72°C for 5 min. Amplification was performed with a model G-storm GS1 Thermo Cycler system (G-Storm & Kapa Biosystems, Somerset, UK).

### V.2.8. PCR amplification of partial archaeal 16S rRNA genes

A two-step approach was used for PCR amplification, as previously described by other authors for DGGE fingerprinting by other authors (Gray *et al.*, 2002). One microliter of DNA, extracted from the biofilm and diluted 1:10, was used as a template for the PCR, using the specific archaeal primers ARCH915C and UNI-b-rev to partially amplify the 16S rRNA gene (hypervariable regions V6-V8 (Yu *et al.*, 2008)). The first PCR reaction included buffer 5X Phire F-524 at a concentration 1X (Finnzymes), each deoxynucleoside triphosphate at a concentration of 0.2 mM (Promega), each primer at a concentration of 0.5 µM (Eurogentec), and 1 µL of Phire hot start II DNA polymerase, in a final volume of 50 µL. Subsequently, 1 µL of the first PCR product was used as a template for a second PCR reaction, changing the forward specific archaeal primer, GC-ARCH915 C (Yu *et al.*, 2008).

PCR was performed in a G-storm GS1 Thermo Cycler system (G-Storm & Kapa Biosystems, Somerset, UK) with the following conditions: pre-denaturation at 98°C for 1 min; 20 cycles of denaturation 98°C for 5 s, annealing at 68°C for 20 s, and extension at 72°C for 20 s; and a final extension at 72°C for 5 min. The correct size of the amplified fragments was checked visually after electrophoresis on a 1% agarose gel containing ethidium bromide.

### **V.2.9. PCR amplification of partial *amoA* gene**

In order to study the ammonia-oxidizing community in the bioreactor, fragments of the structural gene for ammonia monooxygenase (*amoA*) were amplified from biofilm community DNA by PCR. Primers for *amoA* amplification were those published previously (*amoA*-1F and *amoA*2R) by Nicolaisen and Ramsing (2002). A semi-nested approach was used for PCR amplification (Gómez-Villaba *et al.*, 2006).

Amplification was performed with a model G-storm GS1 Thermo Cycler system (G-Storm & Kapa Biosystems, Somerset, UK). The mixtures used for first PCR amplification of *amoA* sequences contained buffer 5X Phire F-524 at a concentration 1X (Finnzymes), each deoxynucleoside triphosphate at a concentration of 0.2 mM (Promega), each primer at a concentration of 0.5  $\mu$ M (Eurogentec), 1  $\mu$ L of Phire hot start II DNA polymerase (Finnzymes), 1  $\mu$ L of appropriately diluted template of DNA and nuclease free water to a final volume of 50  $\mu$ L. After, 1  $\mu$ L of the first PCR product was used as a template for a second PCR reaction, changing the forward specific archaeal primer, *AmoA*-1F-GC.

PCR amplification was carried out using the following program: predenaturation at 98°C for 1 min; 20 cycles of denaturation 98°C for 5 s, annealing at 63°C for 20 s, and extension at 72°C for 40 s; and final extension at 72°C for 5 min. The correct size of the amplified fragments was checked visually after electrophoresis on a 1% agarose gel containing ethidium bromide.

### **V.2.10. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)**

The amplicons were separated by DGGE based on the protocol of Muyzer *et al.* (1993) using the D-code system (BioRad Laboratories, Hercules, California) with the following modifications. The polyacrylamide gels consisted of 8% (vol/vol) polyacrylamide (ratio of acrylamide to bisacrylamide, 37.5:1) and 0.5X Tris-acetate-EDTA buffer (pH 8.0). Denaturing acrylamide of 80% was defined as 7 M urea and 32% formamide. The gel was poured from the top using a gradient maker and a pump (Econopump; BioRad Laboratories, Hercules, California), set at a rate of 4.5 mL/min. Prior to polymerization of the denaturing gel a 7.5 mL stacking gel without denaturing chemical was added, and the appropriate comb was subsequently inserted. Electrophoresis was performed first for 5 min at 200 V

and then for 16 h at 85 V in 0.5X Tris-acetate-EDTA buffer (pH 8.0) at a constant temperature of 60°C. The gel was stained with AgNO<sub>3</sub> and dried overnight at 60°C.

The polyacrylamide gels were prepared with a denaturing gradient ranging from 30% to 55% to separate the generated amplicons of the total bacterial, from 30% to 60% to separate the generated amplicons of archaea, from 20% to 40% to separate the generated amplicons of fungi, and 30% to 55% to separate the generated amplicons of the *amoA* gene.

### V.2.11. Cluster analysis of DGGE fingerprints

The DNA patterns generated by DGGE were compared and clustered using Gel Compar II v. 5.101 (Applied Maths, Belgium). For cluster analysis, the DGGE profiles were compared using a band assignment independent method (Pearson product-moment correlation coefficient), as well as a method based on bands presence/absence (Dice coefficient). In band assignment, a 1% band position tolerance (relative to the total length of the gel) was applied (Calderon *et al.*, 2012). Dendrograms relating band pattern similarities were automatically calculated with UPGMA algorithms (Unweighted pair group method with arithmetic mean). Significance of UPGMA clustering was estimated by calculating the cophenetic correlation coefficients.

The data from fingerprints were exported as a band-matching table and analyzed with Canoco package for Windows (Version 4.5). In the band-matching table, each band is assigned to classes of common bands within all the profiles, and each class of bands is described by the band position in the gel and its height.

## V.3. RESULTS and DISCUSSION

### V.3.1. Analysis of physic-chemical parameters and efficiency of the SFBBR for the removal of organic matter and nitrification

Table V.1 shows the average values of the physic-chemical parameters (COD, BOD<sub>5</sub>, TSS, VSS and pH) measured in the submerged bioreactor (influent and effluent at different wastewater salt concentrations 0 g/L, 3.7 g/L, 24.1 g/L and 44.1 g/L).



**Table V.1. Operational parameters of experiments conducted in the submerged fixed bed reactor during the experiments 1, 2, 3 and 4.**

Experiment	BOD <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /L) influent water	COD (mg O <sub>2</sub> /L) influent water	pH influent water	TSS (mg/L) influent water	VSS (mg/L) influent water
1	425 ± 97.83 <sup>a</sup>	980.26 ± 233.05 <sup>a</sup>	7.55 ± 0.21 <sup>c</sup>	622.43 ± 398.95 <sup>a</sup>	520.48 ± 153.24 <sup>a</sup>
2	418 ± 72.46 <sup>a</sup>	877.13 ± 129.82 <sup>a</sup>	8.20 ± 0.28 <sup>d</sup>	746.00 ± 207.54 <sup>a</sup>	640.71 ± 165.12 <sup>a</sup>
3	370 ± 78.04 <sup>a</sup>	971.17 ± 209.74 <sup>a</sup>	7.42 ± 0.18 <sup>b</sup>	467.00 ± 423.31 <sup>a</sup>	370.32 ± 83.65 <sup>a</sup>
4	416 ± 65.05 <sup>a</sup>	915.37 ± 160.25 <sup>a</sup>	7.23 ± 0.17 <sup>a</sup>	661.00 ± 298.43 <sup>a</sup>	541.65 ± 94.03 <sup>a</sup>
LSD	57.34	135.48	0.11	139.67	65.79
Experiment	BOD <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /L) effluent water	COD (mg O <sub>2</sub> /L) effluent water	pH effluent water	TSS (mg/L) effluent water	VSS (mg/L) effluent water
1	17 ± 6.51 <sup>a</sup>	78.47 ± 28.64 <sup>a</sup>	7.46 ± 0.26 <sup>a</sup>	19.48 ± 7.61 <sup>ab</sup>	13.10 ± 6.14 <sup>ab</sup>
2	163 ± 42.22 <sup>b</sup>	89.50 ± 19.59 <sup>a</sup>	7.78 ± 0.31 <sup>c</sup>	24.31 ± 8.62 <sup>c</sup>	14.62 ± 5.84 <sup>ab</sup>
3	247.33 ± 75.42 <sup>c</sup>	312.76 ± 34.21 <sup>b</sup>	7.39 ± 0.27 <sup>a</sup>	16.05 ± 4.83 <sup>a</sup>	10.91 ± 4.58 <sup>a</sup>
4	358.66 ± 65.26 <sup>d</sup>	553.14 ± 54.04 <sup>c</sup>	7.62 ± 0.11 <sup>b</sup>	22.54 ± 7.96 <sup>bc</sup>	16.53 ± 6.32 <sup>b</sup>
LSD	23.87	48.12	0.12	4.05	3.86

Salt concentration did not have significant effects on physic-chemical parameters analyzed in the influent (real urban wastewater). However, the data clearly showed that the biotransformation of organic matter expressed as COD and BOD<sub>5</sub> in the bioreactor was drastically reduced when the salinity was increased in the influent. Finally, the salinity did not affect TSS and VSS concentrations in the effluent.

Hamosa and Al-Attar (1995) studied the effects of high sodium chloride concentrations on activated sludge treatment, and showed that the presence of salt (NaCl) in wastewater did not inhibit biological activity and consequently the biotransformation of organic matter was not affected. On the contrary, the data obtained in our study suggest that in the SFBRR system an increase in the salinity of real urban wastewater negatively affects the biological activity of the biofilms. However, it is worth noting that Hamosa and Al-Attar (1995) studied the effect of the salinity on an activated sludge system using synthetic wastewater as influent. In this context, significant chemical differences between synthetic wastewater and real urban wastewater must be considered, for example, all the chemical components in the synthetic wastewater are soluble, while in the real wastewater there are many different macromolecules that must be hydrolyzed by extracellular enzymes as the first step in organic removal. Under our point of view, it could be suggested that the reduction of the biotransformation of organic matter detected in our study as a consequence of an increase in the salinity concentration could be associated with a decrease in the extracellular enzymatic activity of the microbiota present in the biofilm formed in the bioreactor.

High salt concentrations have negative effects on organic matter, nitrogen and phosphorous removal (Ramos *et al.*, 2007). However, several halo-tolerant nitrifying and denitrifying bacteria have been isolated and identified in hypersaline wastewaters (Ramos *et al.*, 2007; Catalan-Sakairi *et al.*, 1996). Chloride salts are often found in wastewaters, but their effect on nitrification seems to be more pronounced at high concentrations (1% m/v, NaCl), as reported by Uygur and Kargi (2004).

The low concentrations of salt didn't have a significant effect on the ammonia oxidation activity, particularly when considering the increase of salt from experiment 1 to experiment 2 in SFBBR. At higher NaCl concentrations, the specific ammonia-oxidizing activity significantly decreased (figures II.13, II.14 and II.15), though salinity did not induce nitrification inhibition to the bacterial community in the SFBBR for the range of NaCl concentration tested between experiment 1 and 2. Results obtained with experiments 3 and 4 showed that these large salt concentrations were able to induce a inhibition effect in the nitrifying microorganism population, as observed by Aslan and simsek (2012), Bassin *et al.* (2011) and Moussa *et al.* (2006).

**Table V.2. Ammonium, nitrate and nitrite concentration conducted in the submerged fixed bed reactor during the experiments 1, 2, 3 and 4.**

Experiment	Ammonium (mg/L) influent water	Nitrite (mg/L) influent water	Nitrate (mg/L) influent water
1	33.90 ± 9.97 <sup>a</sup>	1.74 ± 0.36 <sup>b</sup>	0.37 ± 0.52 <sup>a</sup>
2	58.45 ± 11.63 <sup>b</sup>	1.29 ± 0.24 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.37 <sup>a</sup>
3	47.74 ± 12.56 <sup>c</sup>	1.26 ± 0.25 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.36 <sup>a</sup>
4	51.00 ± 12.42 <sup>bc</sup>	1.29 ± 0.26 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.33 <sup>a</sup>
LSD	9.62	0.23	0.33
Experiment	Ammonium (mg/L) effluent water	Nitrite (mg/L) effluent water	Nitrate (mg/L) effluent water
1	0.80 ± 1.21 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.33 <sup>a</sup>	129.57 ± 41.62 <sup>d</sup>
2	7.73 ± 3.93 <sup>b</sup>	0.33 ± 0.13 <sup>a</sup>	100.74 ± 33.24 <sup>c</sup>
3	20.90 ± 5.93 <sup>c</sup>	8.99 ± 1.74 <sup>b</sup>	55.58 ± 25.44 <sup>b</sup>
4	29.94 ± 5.97 <sup>d</sup>	20.48 ± 2.65 <sup>c</sup>	19.20 ± 5.87 <sup>a</sup>
LSD	3.85	1.42	24.40

### V.3.2. Evolution of microbial enzymatic activities

Time course evolution of the activities acid phosphatase, alkaline phosphatase, glucosidase, protease and esterase in all experiments is shown in Figures. III.7-16. During the four different working conditions, the average concentrations of VSS (Volatile Suspended Solids) in the biofilm ranged between: 15.400 g/L and 13.322g/L in experiment

1; 16.033g/L and 13.7425g/L in experiment 2; 8.039g/L and 9.8756g/L in experiment 3 and 6.1673g/L and 4.3206g/L in experiment 4.

The overall values of the enzymatic activities measured during all the experiments showed no significant differences between the cycles within the same experiment ( $p > 0.05$ ). The overall values of the alkaline phosphatase and protease activities showed a similar trend, with a statistically significant decrease of the activities from experiments 1 and 2 to experiments 3 and 4. Acid phosphatase activity was strongly affected by salinity, decreasing significantly in all experiments. Esterase was not affected at low salt concentrations (experiment 2); however, this enzymatic activity decreased after increasing the salinity (experiment 3). Glucosidase activity measured during experiment 1 was significantly higher than those recorded during experiment 2. Between experiment 2 and 3 glucosidase activity showed no significant differences, but the activity decreased significantly in experiment 4.

The influence of the simultaneous variation of physic-chemical parameters (TSS, COD, BOD<sub>5</sub>, pH, salinity and sampling day) on the enzymatic activities measured in the four experiments was analyzed by RDA and the biplot diagram generated is displayed in Fig III.17. According to the results of the Monte Carlo permutation test, salinity and sampling day ( $p < 0.05$ ) were the major factors explaining variations of enzymatic activity levels under the experimental working conditions. The eigenvalues of the canonical ordination axes (COA) were 0.607 and 0.024 for the first and second COA, respectively. The first COA was mainly correlated to salinity and described a 92.8% of the total variability of the enzymatic activities and 60.73% of the total variability of the system. The second COA, which was strongly associated with the sampling day, described a 2.5% of the total variability (3.8% of observed variability). Both COAs explained 63.2% of species data and 96.6% of species–environment relation, respectively, whereas the contribution of axes 3 and 4 to total explained variance was negligible. All the enzymatic activities correlated negatively to the salinity and sampling day.

It has been reported (Boczar *et al.*, 1992; Nybroe *et al.*, 1992) that temporal variations of the hydrolytic activity may respond to a bacterial regulatory mechanism in response to changing environmental conditions e.g. the amount of substrate, the electron acceptor, the pH or temperature. In this context, Cunha *et al.* (2010) studied the environmental regulation of enzymatic activity in sediments and showed that when the

salinity was high more energy was required for the production of osmolytes, hence less energy was available for the release of extracellular enzymes, showing a decrease in enzymatic activity. This same trend has been generally observed in our study, i.e. when the salt concentration was increased in the SFBBR a significant reduction in the enzymatic activities and biotransformation of the organic matter was detected.

A previous study performed in anaerobic reactors by Anupama *et al.* (2008) has suggested that conditions such as increased salinity (NaCl) induced phosphatase activity. However, opposite results have been obtained in our study under aerobic conditions. Such different results could be explained by the biofilm being stressed due to osmotic shock and the fact that it was subjected for longer time to the stressing conditions (Anupama *et al.*, 2008). In fact, previous studies such as those developed by Thompson and MacLeod (1974) reported a reversible decrease and partial reduction in phosphatase activity of a marine *Pseudomonas* exposed to 0.5 M NaCl.

Changes in enzymatic activities may reflect changes in cellular physiology as well as changes at the community level (i.e., changes in microbial populations responsible for the production of enzymes). In this context, Jackson and Vallaire (2009) found a reduction in acid phosphatase and glucosidase activities in Louisiana wetland sediment when subjected to salinity.

In a submerged filter system, the exopolysaccharide (EPS) matrix can act as a network that serves to confine the extracellular hydrolases, i.e. act as a sink for immobilizing enzymes (Ayol, 2005; Frølund *et al.*, 1995). Probably this circumstance occurs under our experimental conditions. In fact, it was observed that when biofilm formation increased, the enzymatic activities also increased in the bioreactor. However, when the biofilm was very dense we saw a reduction in enzymatic activities. This effect may be explained because an excess of EPS may hamper the accessibility of substrates to their respective enzymes (Cadoret *et al.*, 2002).

Studies by Shang *et al.* (2005) showed that the nature of the biomass, and the amount and composition of EPS changed with the different concentrations of VSS. The exoenzymes are located in the EPS (Guellil *et al.*, 2001; Conrad *et al.*, 2000; Frølund *et al.*, 1995), hence the enzymatic activities may be affected by increasing the VSS concentration. Similar results have been shown to occur in this study suggesting that in our SFBBR the enzymatic activities may be affected by the concentration of VSS in the biofilm.

Another important factor affecting the enzymatic activities is the presence of dissolved oxygen in the water. In activated sludge, the oxygen transfer rate decreases with high concentrations of VSS (Rosenberger *et al.*, 2002). Salinity not only may alter the composition of the biofilm/extracellular polymeric substances (EPS), also may directly affect the maximum solubility of oxygen and its transfer rate in the liquid phase (Bassin *et al.*, 2011). These two effects may be the cause of the reduced enzymatic activities when VSS reach certain concentrations in the fixed bed biofilm.

### **V.3.3. Analysis of the biodiversity patterns along a salinity gradient by DGGE**

To evaluate changes in the composition of the community in the biofilms of SFBBR along a salinity gradient, the PCR-DGGE technique was employed, which generated profiles of the dominant populations in complex communities in the environment. This technique has been extensively applied in recent years to the study of a variety of different bacterial ecosystems, including biofilms from WWTPs (Cortés-Lorenzo *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2002). This approach demonstrated clear and significant differences of the community structure among the four experiments. Figure IV.12 shows the DGGE community profiles of Bacteria in the SFBBR system during the 4 experiments, which consisted of a high number of bands, and figures IV.13 and IV. 14 show the dendrograms generated by the UPGMA cluster analysis and comparison between the Pearson coefficient and Dice coefficients, of these DGGE banding patterns. Clustering of the DGGE profiles demonstrated that the community composition was significantly different in each experiment. The bacterial DGGE fingerprints of all the experiments clustered away in 2 groups showing 73.3% similarity.

Studies based on different cultivation-independent techniques (DGGE, FISH, T-RFLP, clone libraries, and others), both based on DNA and RNA approaches, confirmed the existence of very complex microbial communities responsible for the performance of biological wastewater treatments.

Although DGGE is not a quantitative method due to the bias introduced by the PCR reaction, some bands clearly changed their intensity through the experiments, which can be interpreted as a consequence of a change in their relative abundance in the community composition (Stamper *et al.*, 2003; Brüggemann *et al.*, 2000). We found that some bands increased in intensity when the salinity was high in the influent (Experiments 3 and 4).

Bassin *et al.* (2011), for example, found that some microorganisms, such as *Denitromonas*, have a greater affinity for high concentrations of salt, since the intensity of some bands increased with increased salinity levels.

RDA analysis (figures IV.15 and IV.16) gives complementary information of previous multivariate analyses, it allowed us to determine the effects of environmental parameters on bacterial community composition. Furthermore, Monte Carlo permutation tests indicated that the environmental data influenced community composition ( $P < 0.05$ ), and by observing the diagram, the environmental parameters most related to community differences are easily detected. Permutation tests indicated that the differences in community composition were mainly correlated with differences in salinity and pH between the four experiments ( $P < 0.05$ ). Salinity was the parameter with more influence in the community composition of bacteria.

The previous reports on the effects of salinity on bacterial biodiversity in wastewater treatment systems are contradictory. Yan *et al.* (2011) found that in activated sludge, bacterial biodiversity was higher in saline wastewater than detected in conventional wastewater. However, Li *et al.* (2009) found that the number of bacterial species decreased with the addition of hypersaline wastewater to the influent. A similar result was described by Cortés-Lorenzo *et al.* (2006) in a SFBBR treating saline wastewaters of industrial origin. Our study shows that bacterial biodiversity was lower during experiments 3 and 4, i.e., when the salt concentration in the wastewater was increased.

DGGE gel of fungal communities in SFBBR (Figure IV.17), as in the case of Bacteria, showed a high number of bands, presenting a greater diversity in the biofilm samples from experiment 2, i.e., when the NaCl concentration in the influent is 3.7 g/L. Mohamed and Martiny (2011) studied the composition and diversity of fungi along salinity gradients in estuaries. They found a greater diversity of fungi when salinity is intermediate, as in our study. The dendrograms showed (figures IV.18 and IV.19) that fungal communities obtained in each experiment were clustered away in two groups, with a similarity of 29.2%.

RDA analysis (figures IV.20 and IV.21) gives complementary information of previous multivariate analyses. Monte Carlo permutation test indicated that the differences in community composition were mainly correlated with differences in salinity and  $BOD_5$  between the four experiments ( $P < 0.05$ ).

DGGE was used to evaluate the occurrence of archaea in four experiments in SFBBR for saline wastewater treatment and to comparatively analyze their community structure. The composition of the wastewater is a key determinant of archaeal community composition in WWTPs (Stephanie *et al.*, 2008; Akarsubasi *et al.*, 2004; Gray *et al.*, 2002). Figure IV.22 reveals the effects of saline wastewater in archaeal community. The analysis of the biodiversity profiles obtained for the archaeal community revealed the presence of a major band of great intensity present in all the treatments analyzed in this study. Despite the presence of a high intensity band common to all treatments, each treatment displayed enriched bands at different heights. As expected, communities in experiment 1 showed a greater divergence compared from the other experiments, due to the influence of saline wastewater, with a similarity of 74.9% (figure IV.23).

RDA analysis (figures IV.25 and IV.26) gives complementary information of previous multivariate analyses. Monte Carlo permutation test indicated that the differences in community composition were mainly correlated with differences in pH, salinity and BOD<sub>5</sub> between the four experiments ( $P < 0.05$ )

Regardless of the characteristics and conditions of the samples, several studies have shown that methanogenic archaea (*Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* and *Methanomicrobiales*) are dominant populations in wastewater treatment systems. Methanogenic archaea are commonly present in MBR and SFBBR under aerobic performance (Gómez-Silvan *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2002). Gómez-Silvan *et al.* (2010) found significant differences in the incidence and relative intensity of the bands when comparing the community of archaea in aerated and anoxic biofilms, showing the influence of O<sub>2</sub> exposure in species richness and their abundance.

Studies of the nitrifying communities in natural habitats and in wastewater have increased significantly during the last decades thanks to the introduction of culture-independent approaches. Purkhold *et al.* (2000) investigated in detail the phylogeny of ammonia oxidizers based both in the sequence of the 16S rRNA gene and the sequence of the ammonia monooxygenase gene (*amoA*) and the *AmoA* protein.

Nitrification is susceptible to inhibition by salt, being considered a factor of instability in many plants of wastewater treatment (Aslan and Simsek, 2012; Bassin *et al.*, 2011, Moussa *et al.* 2006). In addition, the microbial community composition may change significantly depending on how concentrations of salt is increased (either gradual or by

pulses). To have an overview of the AOB community as salt concentration was increased, a functional gene (*amoA*) playing a key role in the ammonia-oxidizing process was used (Bassin *et al.*, 2011).

Figure IV.27 shows the DGGE profiles for ammonium oxidizing bacteria. Experiments 1 and 2 had a very similar community structure, but there was a strong divergence with increasing salt concentration in the influent. DGGE analysis showed that two major bands (high intensity) were present during all experiments, suggesting that these AOB populations were not affected by salt. With increasing salt concentrations in the SFBBR, some bands have completely disappeared. Sudarno *et al.* (2010) found a similar pattern of AOBs in saline wastewater treatment in FBRR.

RDA analysis (figures IV.30 and IV.31) gives complementary information of previous multivariate analyses. Monte Carlo permutation test indicated that the differences in community composition were mainly correlated with differences in salinity between the four experiments ( $P < 0.05$ ).

As for studies on the biodiversity of nitrifying bacteria in SFBBR systems, Gómez-Villalba *et al.* (2006) revealed by TGGE fingerprinting that the dominant nitrifying population in the system belonged to the genus *Nitrosomonas*, which contained a wide diversity of species in this genus. The abundance and diversity of ammonia oxidizing bacteria in saline environments is still poorly understood (Herbert, 1999).



#### V.4. REFERENCES

- Akarsubasi, A.T., Ince, O., Kirdar, B., Oz, N.A., Orhon, D., Curtis, T.P., Head, I.M., Ince, B.K.**, 2005. Effect of wastewater composition on archaeal population diversity. *Water Research* 39: 1576-1584.
- Anupama, V.N., Amrutha, P.N., Chitra, G.S., Krishnakumar, B.**, 2008. Phosphatase activity in anaerobic bioreactors for wastewater treatment. *Water Research* 42: 2796-2802.
- APHA**, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th edn. Edited by L.S. Clesceri, A.E. Greenberg & A.S. Eaton. Washington DC. American Public Health Association.
- Aslan, S., Simsek, E.**, 2012. Influence of salinity on partial nitrification in a submerged biofilter. *Bioresource Technology* 118: 24-29.
- Ayol, A.**, 2005. Enzymatic treatment effects on dewaterability of anaerobically digested biosolids-I: Performance evaluations. *Process Biochemistry* 40: 2427-2434.
- Bassin, J.P., Dezotti, M., Sant'Anna, G.L.Jr.**, 2011. Nitrification of industrial and domestic saline wastewaters in moving bed biofilm reactor and sequencing batch reactor. *Journal of Hazardous Materials* 185: 242-248.
- Boczar, B.A., Begley, W.M., Larson, R.J.**, 1992. Characterization of enzyme activity in activated sludge using rapid analyses for specific hydrolases. *Water Environment Research* 64: 792-797.
- Boczar, B., Forney, L.J., Begley, W.M., Larson, R.J., Federle, T.W.**, 2001. Characterization and distribution of esterase activity in activated sludge. *Water Research* 35: 4208-4216.
- Borghei, S.M., Sharbatmaleki, M., Pourrezaei, P., Borghei, G.**, 2008. Kinetics of organic removal in fixed-bed aerobic biological reactor. *Bioresource Technology* 99: 1118-1124.
- Brüggemann, J., Stephen, J.R., Chang, Y.J., Macnaughton, S.J., Kowalchuk, G.A., Kline, E., White, D.C.**, 2000. Competitive PCR-DGGE analysis of bacterial mixture: an internal standard and an appraisal of template enumeration accuracy. *Journal of Microbiology and Methods* 49: 111-123.
- Cadore, A., Conrad, A., Block, J.C.**, 2002. Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludge. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 179-186.
- Calderón, K., González-Martínez, A., Montero-Puente, C., Reboleiro-Rivas, P., Poyatos, J.M., Juárez-Jiménez, B., Martínez-Toledo, M.V., Rodelas, B.**, 2012. Bacterial community structure and enzyme activities in a membrane bioreactor (MBR) using pure oxygen as an aeration source. *Bioresource Technology* 103: 87-94.

**Catalan-Sakairi, M.A.B., Yasuda, K., Matsumura, M.,** 1996. Nitrogen removal in seawater using nitrifying and denitrifying bacteria immobilized in porous cellulose carrier. *Water Science and Technology* 34:267-274.

**Conrad, A. Cadoret, A., Block, J-C.,** 2000. Extracellular enzymatic activities in activated sludge flocs. In Proceedings of the International Specialist Conference: Extracellular Polymeric Substances: The Construction Material of Biofilms, Mülheim (D).

**Cortés-Lorenzo, C., Molina-Muñoz, M., Gómez-Villalba, B., Vílchez, R., Ramos, A., Rodelas B., Hontoria E., González-López., J.,** 2006. Analysis of community composition of biofilms in a submerged filter system for the removal of ammonia and phenol from industrial wastewater. *Biochemical Society Transactions* 34: 161-168.

**Cunha, A., Almeida, A., Coelho, F.J.R.C., Gomes, N.C.M., Oliveira, V., Santos, A.L.,** 2010. Bacterial Extracellular Enzymatic Activity in Globally Changing Aquatic Ecosystems. In: "Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology." 1, Mendez-Vilas, A. (Ed.), p. 124-135. Formatex Microbiology Series, Badajoz, Spain.

**Frølund, B., Griebel, T., Nielsen, P.H.,** 1995. Enzymatic activity in the activated sludge floc matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 755-761.

**Goel, R., Mino, T., Satoh, H., Matsuo, T.,** 1998. Enzyme activities under anaerobic and aerobic conditions inactivated sludge sequencing batch reactor. *Water Research* 32: 2081-2088.

**Gómez-Silván, C., Molina-Muñoz, M., Poyatos, J.M., Ramos, A., Hontoria, E., Rodelas, B., González-López, J.,** 2010. Structure of archaeal communities in membrane-bioreactor and submerged-biofilter wastewater treatment plants. *Bioresource Technology* 101: 2096-2105.

**Gómez-Villalba, B., Calvo, C., Vílchez, R., González-López, J., Rodelas, B.,** 2006. TGGE analysis of the diversity of ammonia-oxidizing and denitrifying bacteria in submerged filter biofilms for the treatment of urban wastewater. *Applied Microbiology and Technology* 72: 393-400.

**Gray, N.G., Miskin, I.P., Kornilova, O., Curtis, T.P., Head, I.M.,** 2002. Occurrence and activity of Archaea in aerated activated sludge wastewater treatment plants. *Environmental Microbiology* 4: 158-168.

**Guellil, A., Boualam, M., Quiquampoix, H., Ginestet, P., Audic, J.M., Block, J.C.,** 2001. Hydrolysis of wastewater colloidal organic matter by extracellular enzymes extracted from activated sludge flocs. *Water Science and Technology* 43: 33-40.

**Guo, W., Ngo, H.H., Dharmawan, F., Palmer, C.G.,** 2010. Roles of polyurethane foam in aerobic moving and fixed bed bioreactors. *Bioresource Technology* 101: 1435-1439.

**Hamoda, M.F., Al-Attar, I.M.S.,** 1995. Effects of high sodium chloride concentrations on activated sludge treatment. *Water Science and Technology* 31: 61-72.

**Herbert, R.A.**, 1999. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 23: 563-590.

**Jackson, C.R., Vallaire, S.C.**, 2009. Effects of Salinity and Nutrients on microbial assemblages in Louisiana Wetland Sediments. *Wetlands* 29: 277-287.

**Kargi, F., Uygur, A.**, 1996. Biological treatment of saline wastewater in a rotating biodisc contactor by using halophilic organisms. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 17: 81-85.

**Lane, D.J.**, 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, p. 115-175.

**Lepš, J., Šmilauer, P.**, 2003. Multivariate Analysis of Ecological Data Using Canoco. Cambridge University Press.

**Li, J., Jin, Z., Yu, B.**, 2009. Changes in the structure and diversity of bacterial communities during the process of adaptation to organic wastewater. *Canadian Journal of Microbiology* 56: 352-355.

**Lozupone, C.A., Knight, R.**, 2007. Global patterns in bacterial diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 11436-11440.

**Ludzack, f.J., Noran, D.K.**, 1965. Tolerance of high salinities by conventional wastewaters treatment processes. *Journal Water Pollution Control Federation* 37: 1404-1416.

**Lyon, Y.D., Brown, D., Sundstrom, R.E., Álvarez, J.J.P.**, 2008. Assessing the antibiofouling potential of a fullerene-coated surface. *International Biodeterioration and Biodegradation* 62: 475-478.

**May, L.A., Smiley, B., Schmidt, M.G.**, 2001. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 829-841.

**Mohamed, D.J., Martiny, J.B.**, 2011. Patterns of fungal diversity and composition along a salinity gradient. *ISME Journal* 5: 379-88.

**Molina-Muñoz, M., Poyatos, J.M., Rodelas, B., Pozo, C., Manzanera, M., Hontoria, E., Gonzalez-López, J.**, 2010. Microbial enzymatic activities in a pilot-scale MBR experimental plant under different working conditions. *Bioresource Technology* 101: 696-704.

**Moussa, M.S., Sumanasekera, D.U., Irahim, S.H., Lubberding, H.J., Hooijmans, C.M., Gijzen, H.J., van Loosdrecht, M.C.M.**, 2006. Long term effects of salt on activity, population structure and floc characteristics in enriched bacterial cultures of nitrifiers. *Water Research* 40: 1377-1388.

**Müller, V., Spanheimer, R., Santos, H.,** 2005. Stress response by solute accumulation in archaea. *Current Opinion in Microbiology* 8: 729-736.

**Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G.,** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.

**Muyzer, G.,** 1999. DGGE/TGGE, a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2: 317-322.

**Nabarlantz, D., Vondrysova, J., Jenicek, P., Stüber, F., Font, J., Fortuny, A., Fabregat, A., Bengoa, C.,** 2010. Hydrolytic enzymes in activated sludge: extraction of protease and lipase by stirring and ultrasonication. *Ultrasonics Sonochemistry* 7: 923-31.

**Nicolaisen, M.H., Ramsing, N.B.,** 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 50: 189-203.

**Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H.,** 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 178: 5636-5643.

**Nybroe, O., Jørgensen, P.E., Henze, M.,** 1992. Enzyme activities in wastewater and activated sludge. *Water Research* 26: 579-584.

**Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M., Koops, H., Wagner, M.,** 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and AmoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5386-5382.

**Ramos, A.F., Gómez, M.A., Hontoria, E., González-López, J.,** 2007. Biological nitrogen and phenol removal from saline industrial wastewater by submerged fixed-film reactor. *Journal of Hazardous Materials* 142: 175-183.

**Rosenberger, S., Krüger, R., Manz, W., Szewzyk, U., Kraume, M.,** 2002. Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater. *Water Research* 36: 413-420.

**Schlegel, S., Koeser, H.,** 2007. Wastewater treatment with submerged fixed bed biofilm reactor systems-design rules, operating experiences and ongoing developments. *Water Science and Technology* 55: 83-89.

**Shang, C., Wong, H.M., Chen, G.,** 2005. Bacteriophage MS-2 removal by submerged membrane bioreactor. *Water Research* 39: 4211-4219.

**Sharrer, M.J., Tal, Y., Ferrier, D., Hankins, J.A., Summerfelt, S.T., 2007.** Membrane biological reactor treatment of a saline backwash flow from a recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering* 36: 159–176.

**Simões, M., L.C. Simões, L.C., Vieira, M.J., 2010.** "A review of current and emergent biofilm control strategies." *LWT - Food Science and Technology* 43: 573-583.

**Stamper, D.M., Walch, M., Jacobs, R.N., 2003.** Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 852-860.

**Stephanie, A.F., Sierra-Alvarez, R., Altinbas, M., Hollingsworth, J., Stams, A.J.M., Smidt, H., 2008.** Molecular characterization of mesophilic and thermophilic sulfate reducing microbial communities in expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *Biodegradation* 19: 161-177.

**Sudarno, U., Bathe, S., Winter, J., Gallert, C., 2010.** Nitrification in fixed-bed reactors treating saline wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 2017–2030.

**Sudarno, U., Winter, J., Gallert, C., 2011.** Effect of varying salinity, temperature, ammonia and nitrous acid concentrations on nitrification of saline wastewater in fixed-bed reactors. *Bioresource Technology* 102: 5665–5673.

**ter Braak, C.J.F., Prentice, I.C., 1988.** A theory of gradient analysis. *Advances in Ecological Research* 18: 271-317.

**Thompson, L.M.M., MacLeod, R.A., 1974.** Biochemical localization of alkaline phosphatase in the cell wall of a marine Pseudomonad. *Journal of Bacteriology* 117: 819-825.

**Uygur, A., Kargi, F., 2004.** Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a sequencing batch reactor. *Enzyme and Microbial Technology* 34: 313-318.

**Vyrides, I., Stuckey, D.C., 2009.** Adaptation of anaerobic biomass to saline conditions: Role of compatible solutes and extracellular polysaccharides. *Enzyme and Microbial Technology* 44: 46-51.

**Wagner, M., Loy, A., Nogerira, R., Purkhold, U., Lee, N., Daims, H., 2002.** Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 665-680.

**Weber, S.D., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Fried, J., 2007.** Microbial Composition and Structure of Aerobic Granular Sewage Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6233-6240.

**White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications (M.A. Innis, D.A. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White). Academic Press, San Diego, CA, USA, p. 315-322.

**Wu, G., Guan, Y., Zhan, X.,** 2008. Effect of salinity on the activity, settling and microbial community of activated sludge in sequencing batch reactors treating synthetic saline wastewater. *Water Science and Technology* 58: 351-358.

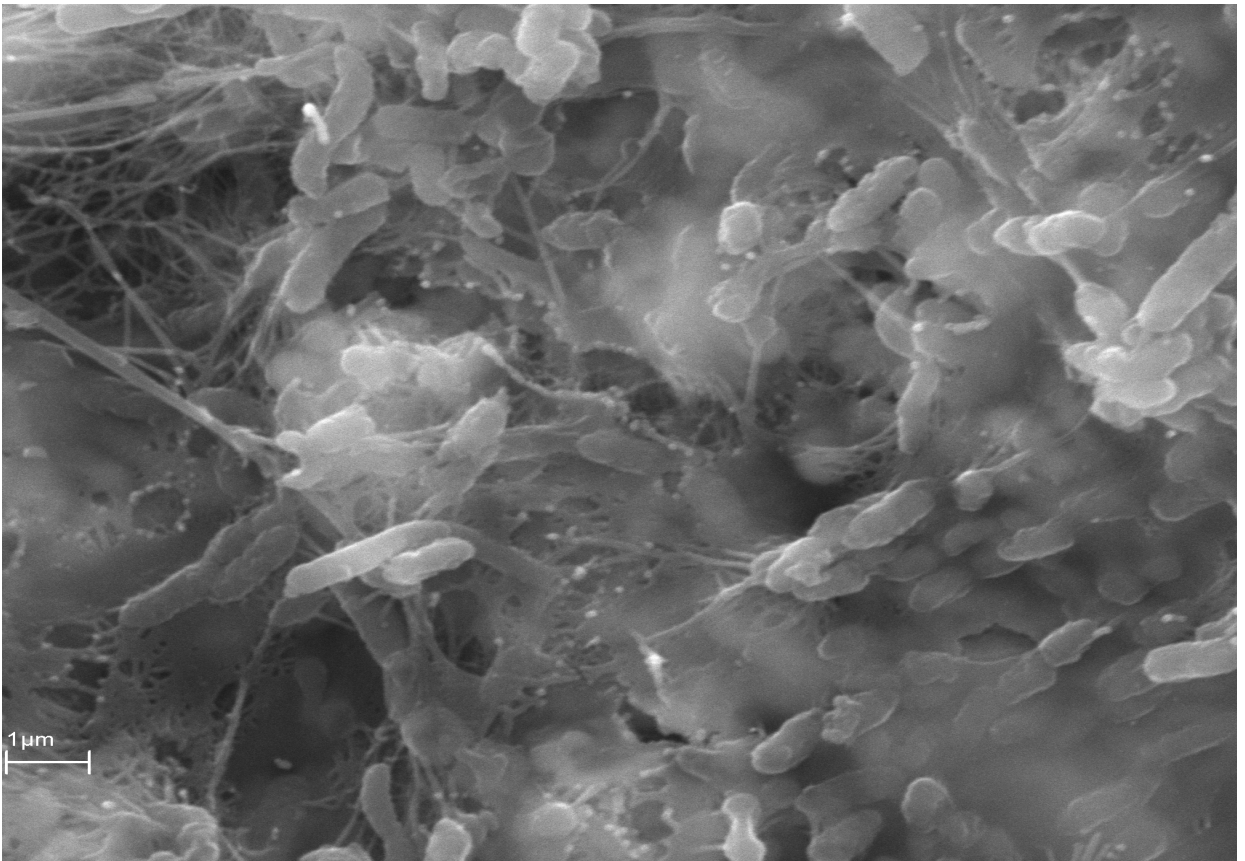
**Yan, Q.M., Zhang, X.X., Zhang, T., Fang, H.H.P.,** 2011. Seasonal microbial community shift in a saline sewage treatment plant. *Frontiers of Environmental Science & Engineerin in china* 5: 40-47.

**Yu, Z., Morrison, M.,** 2004. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Enviromental Microbiology* 70: 4800-4806.

**Yu, Z., García-González, R., Schanbacher, F.L., Morrison, M.,** 2008. Evaluation of different hypervariable regions of Archaeal 16S rRNA genes in profiling of methanogens by *Archaea*-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Enviromental Microbiology* 74: 889-893.

# Capítulo VI

## Discusión general



Como se ha descrito previamente en la introducción del **capítulo 2**, es frecuente la llegada a las estaciones depuradoras de aguas residuales salinas procedentes de diferentes orígenes, tanto industriales como urbanos. La importancia del conocimiento del efecto de la salinidad en el tratamiento biológico de dichas aguas residuales es crucial para definir un buen funcionamiento de los sistemas de tratamiento y garantizar que el agua tratada cumple con los requisitos de vertido. Sin embargo, hay un vacío en el conocimiento de los efectos de la salinidad en dichos sistemas biológicos debido, entre otras cosas, a que en ocasiones los resultados obtenidos en trabajos previos son contradictorios a causa de diferencias en la configuración de los sistemas y las condiciones de experimentación. El trabajo descrito en esta tesis informa sobre el efecto de diferentes concentraciones salinas en un sistema de filtro sumergido (SFBBR), utilizando un agua residual urbana real. Específicamente, se han evaluado las características operacionales y parámetros fisicoquímicos del SFBBR ante distintas concentraciones de NaCl, las actividades enzimáticas de la biomasa celular y la influencia que la salinidad variable ejerce sobre la estructura de las comunidades microbianas presentes en el sistema.

### **VI.1.1 Análisis del efecto de la salinidad en los parámetros fisicoquímicos característicos del agua residual**

En una primera aproximación, nuestro estudio puso de manifiesto que, en las condiciones de funcionamiento establecidas (caudal 50 mL/min, TRH 3,8 h y temperatura 20°C), el sistema de filtro sumergido (SFBBR) fue eficaz en el tratamiento de agua residual urbana, la cual tenía una conductividad de 1,5 mS, cumpliendo con los límites de vertido establecidos por la legislación actual, durante el primer periodo de experimentación. Este primer periodo se considero como el experimento control (experimento 1).

Una vez que el SFBBR fue sometido a un agua residual, con un contenido en NaCl de 3,7 g/L, se comprobó que la capacidad del sistema para eliminar materia orgánica biodegradable se redujo considerablemente (figura II.8), obteniéndose un efluente con un contenido en DBO<sub>5</sub> (demanda biológica de oxígeno) superior a 35 mg O<sub>2</sub>/L (límite establecido por la legislación). El resto de los parámetros considerados del agua residual: DQO (demanda química de oxígeno), SST (sólidos en suspensión totales) y SSV (sólidos en



suspensión volátiles) estuvieron presentes en el efluente en concentraciones adecuadas según la directiva 91/271/CEE.

Estudios previos han puesto de manifiesto que la salinidad tiene un efecto negativo sobre la actividad celular y que concentraciones de NaCl superiores al 1% originan plasmólisis celular (Aslan y Simsek, 2012; Vyrides y Stuckey, 2009; Burnett, 1974). Esta podría ser la causa de la disminución de la capacidad del sistema SFBBR para eliminar de forma eficaz la DBO<sub>5</sub>. Además como hemos comprobado en el **capítulo 3**, el agua residual salina disminuye significativamente las actividades enzimáticas hidrolíticas (fosfatasa, glucosidasa, esterasa y proteasa) en la biopelícula, responsables de la despolimerización de los compuestos orgánicos macromoleculares presentes en el agua residual. De acuerdo con numerosas investigaciones (Xie *et al.*, 2010; Anupama *et al.*, 2008; Sangave y Pandit, 2006; Eliosov y Argaman, 1995) la hidrólisis de dichos compuestos orgánicos es el primer paso y en ocasiones limitante en el tratamiento de aguas residuales, de manera que si las actividades enzimáticas disminuyen, los polímeros y heteropolímeros no pueden ser hidrolizados y por tanto no pueden ser utilizados por los microorganismos (Nabarlatz *et al.*, 2010).

Cuando el agua residual contiene una concentración de 24,1 g/L de NaCl, la biotransformación de la materia orgánica, expresada en DQO y DBO<sub>5</sub>, se redujo considerablemente (figura II.8 y figura II.9), no cumpliendo el sistema con los parámetros establecidos por la legislación vigente. Kargi y Uygun (1996) comprobaron un efecto similar de la salinidad en contactores biológicos rotativos (RBC), observando una reducción de la eliminación de la DQO a medida que aumentaba la sal en el influente.

En todas las etapas experimentales de este estudio, no se observó en el efluente variación significativa en los SST y SSV, por lo que la salinidad no afectó a estos parámetros en nuestro sistema.

### **VI.1.2. Análisis del efecto de la salinidad en el proceso de nitrificación**

Es conocido que la salinidad afecta la actividad metabólica de las bacterias nitrificantes y las tasas de oxidación de amonio (Moussa *et al.*, 2006). Nuestros resultados demuestran que en el sistema de filtro sumergido, el proceso de nitrificación no se vio afectado cuando la concentración de NaCl en el influente fue  $\leq 3,7$  g/L, apareciendo la

concentración de nitrato aumentada en el efluente debido a que no existen en el sistema condiciones idóneas para que se de la desnitrificación. Durante estos periodos experimentales, comprobamos (**capítulo 4**) que las comunidades de bacterias oxidadoras de amonio (AOB) se agruparon en un mismo cluster, con un porcentaje de similitud del 51,3% (Figura IV.29). De acuerdo con nuestros datos es posible distinguir dos fases bien diferenciadas sobre la influencia de la salinidad en el proceso de nitrificación. En nuestro caso, la presencia en el influente de una concentración  $\leq 3,7$  g de NaCl/L no afectó significativamente al proceso de nitrificación, sin embargo cuando la concentración de NaCl fue  $\geq 24,1$  g /L, la salinidad disminuyó la oxidación tanto de amonio como de nitrito, siendo esta disminución más pronunciada en el caso de la oxidación de nitrito. Como consecuencia la concentración de nitrito apareció aumentada en el efluente. Ha sido demostrado que en la nitrificación en agua de mar, el nitrito se acumulaba, incluso cuando géneros marinos adaptados a altas salinidades estuvieron presentes (Catalan *et al.*, 1997).

Este hecho sugiere que las bacterias oxidadoras de nitrito fueron aparentemente más sensibles a la salinidad que las bacterias oxidadoras de amonio. Diversos estudios realizados (Aslan y Simsek, 2012; Bassin *et al.*, 2011; Vendramel *et al.*, 2011; Sudarno *et al.*, 2010; Moussa *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2003) han puesto de manifiesto que las bacterias oxidadoras de nitritos son más sensibles a la salinidad.

Se obtuvieron 54 clases de bandas diferentes de Beta-proteobacterias oxidadoras de amonio, de las cuales solamente 2 de ellas (clase de banda 17 y 39) estuvieron siempre presentes en los diferentes experimentos, por lo que las variaciones de las variables ambientales del influente no ejercieron efecto en dichas clases de banda.

Como podemos comprobar en el dendrograma de la figura IV.29, el numero de bandas obtenidas cuando la concentración de sal fue  $\geq 24,1$  g /L es menor que el numero de bandas obtenidas cuando la concentración de sal en el influente fue  $\leq 3,7$  g NaCl/L. Además en el análisis estadístico multivariante (figura IV. 30), el test de Monte Carlo puso de manifiesto que de los parámetros del influente el único que tenía un efecto estadísticamente significativo en las comunidades de bacterias oxidadoras de amonio fue la salinidad. Chen *et al.* (2003) han puesto de manifiesto que factores tales como el pH, la temperatura y la salinidad afectan al crecimiento de las bacterias nitrificantes.

Sudarno *et al.* (2010) comprobó que el efecto de la salinidad en el proceso de nitrificación en un sistema de biopelícula fija está condicionado por la concentración de sal en el influente, siendo la salinidad la responsable del proceso de inhibición. Pudiéndose afirmar, que nuestros resultados en sistema SFBBR se enmarcan en estas mismas observaciones.

### **VI.1.3. Análisis del efecto de la salinidad en las actividades enzimáticas hidrolíticas**

Las actividades enzimáticas hidrolíticas son un excelente indicador de la fisiología de la mezcla de especies de la comunidad de la biopelícula y en consecuencia la variación de estas actividades enzimáticas responden a cambios de la biomasa activa y el cambio de las poblaciones dominantes en el reactor biológico, en respuesta a los componentes de las aguas residuales y de las condiciones del medio ambiente (Li y Chróst, 2006).

Un influente con salinidad variable indujo en la biopelícula del SFBBR un descenso en las actividades hidrolíticas extracelulares (fosfatasas, glucosidasa, esterasa y proteasa), siendo la fosfatasa alcalina, la glucosidasa y la proteasa las que presentaron una mayor estabilidad. De todos los parámetros del influente (DBO<sub>5</sub>, DQO, pH, SST y SSV), únicamente la salinidad y el día de muestreo influyeron de forma significativa ( $p < 0,05$ ) en la disminución de la actividad hidrolítica en el biorreactor. Esto nos sugiere que los cambios en las poblaciones dominantes de Bacteria, arqueas y hongos, observadas en los diferentes geles de DGGE en el capítulo 4, junto con la posible lisis celular causada por la no adaptación de las poblaciones microbianas a ambientes hipersalinos, podrían explicar el descenso en dichas actividades enzimáticas a medida que aumenta la salinidad en el influente. Además, este hecho puede reflejar la disminución de la eliminación de la DBO<sub>5</sub>, tal y como se comenta en el apartado VI.1.

### **VI.1.4. Análisis del efecto de la salinidad en la biodiversidad de las comunidades microbianas presentes en la biopelícula**

Dependiendo de las condiciones ambientales, las biopelículas van a estar formadas por numerosas especies de microorganismos diferentes. La distribución de la biodiversidad de Bacteria, hongos y arqueas, a lo largo de gradientes de salinidad fue estudiada mediante electroforesis en gradiente desnaturalizante (DGGE).

Los perfiles obtenidos en todos los casos mostraron, al igual que en el **capítulo 3** sobre las actividades enzimáticas, que la salinidad fue un factor que ejerció una influencia significativa sobre la variación de la biodiversidad, junto con el pH. La variación en la DBO<sub>5</sub> en el influente también influyó significativamente en la variación de la biodiversidad en las comunidades de Bacteria, arqueas y Hongos. En contraposición a nuestros resultados, Lefebvre *et al.* (2004) han demostrado que la diversidad de un ecosistema tolerante a la sal, de tratamiento de aguas residuales hipersalinas podría ser similar a la diversidad de otro no tolerante a la sal.

Los perfiles obtenidos en el estudio de la comunidad de Bacteria y arqueas se segregaron en dos clusters principales, agrupando en uno de ellos los perfiles de las muestras correspondientes a los experimentos 1 y 2 (0 g/L y 3,7 g/L de NaCl respectivamente), y en el otro cluster principal, los perfiles de los experimentos 3 y 4 (24,1 g/L y 44,1 g/L de NaCl respectivamente). Se obtuvieron 78 clases de bandas diferentes de Bacterias y 50 clases de bandas distintas de arqueas, de las cuales 17 estuvieron siempre presentes en todos los experimentos en ambos casos. Estas 17 clases de banda no se vieron afectadas por las variaciones en las variables ambientales del influente.

En el caso de los hongos, también los perfiles se segregaron en 2 clusters principales, aunque en este caso en uno de los cluster se agruparon los perfiles de las muestras correspondientes a un influente con una concentración de NaCl de 3,7 g/L, los cuales presentaron la máxima diversidad de hongos. El resto de los perfiles se agruparon en un segundo cluster principal. Se obtuvieron 95 clases de banda diferentes de hongos, de las cuales 2 (clase de banda 26 y 66) estuvieron siempre presentes y no se vieron afectadas por las variaciones en las variables ambientales del influente.

Mohamed y Martiny (2011) estudiaron la composición y diversidad de hongos a lo largo de gradientes de salinidad en estuarios, comprobando una mayor diversidad de hongos cuando la salinidad es intermedia, originándose variaciones génicas que permiten que un mayor número de especies de hongos coexistan. Estos resultados, aun considerando las diferencias del hábitat estudiado, podrían considerarse coincidentes con los obtenidos en nuestro estudio.

## VI.2. BIBLIOGRAFÍA

**Anupama, V.N., Amrutha, P.N., Chitra, G.S., Krishnakumar, B.,** 2008. Phosphatase activity in anaerobic bioreactors for wastewater treatment. *Water Research* 42: 2796-2802.

**Aslan, S., Simsek, E.,** 2012. Influence of salinity on partial nitrification in a submerged biofilter. *Bioresource Technology* 118: 24-29.

**Bassin, J.P., Dezotti, M., Sant'Anna, G.L.Jr.,** 2011. Nitrification of industrial and domestic saline wastewaters in moving bed biofilm reactor and sequencing batch reactor. *Journal of Hazardous Materials* 185: 242-248.

**Burnett, W.E.,** 1974. The effect of salinity variations on the activated sludge process. *Water and Sewage Works* 37-55.

**Catalan, M.A.B., Wang, P.C., Matsumura, M.,** 1997. Nitrification performance of marine nitrifiers immobilized in polyester and macroporous cellulose carriers. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84: 563-571.

**Chen, G.H., Wong, M.T., Okabe, S., Watanabe, Y.,** 2003. Dynamic response of nitrifying activated sludge batch culture to increased chloride concentration. *Water Research* 37: 3125-3135.

**Eliosov, B., Argaman, Y.,** 1995. Hydrolysis of particulate organics in activated sludge systems. *Water Research* 29: 155-163.

**Kargi, F., Uygur, A.,** 1996. Biological treatment of saline wastewater in a rotating biodisc contactor by using halophilic organisms. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 17: 81-85.

**Lefebvre, O., Habouzit, F., Bru, V., Delgenes, J.P., Godon, J.J., Moletta, R.,** 2004. Treatment of hypersaline industrial wastewater by a microbial consortium in a sequencing batch reactor. *Environmental Technology* 25:543-553.

**Li, Y., Chróst, R.J.,** 2006. Microbial enzymatic activities in aerobic activated sludge model reactors. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 568-572.

**Mohamed, D.J., Martiny, J.B.,** 2011. Patterns of fungal diversity and composition along a salinity gradient. *ISME Journal* 5: 379-88.

**Moussa, M.S., Sumanasekera, D.U., Irahim, S.H., Lubberding, H.J., Hooijmans, C.M., Gijzen, H.J., van Loosdrecht, M.C.M.,** 2006. Long term effects of salt on activity, population structure and floc characteristics in enriched bacterial cultures of nitrifiers. *Water Research* 40: 1377-1388.

**Nabarlantz, D., Vondrysova, J., Jenicek, P., Stüber, F., Font, J., Fortuny, A., Fabregat, A., Bengoa, C.,** 2010. Hydrolytic enzymes in activated sludge: extraction of protease and lipase by stirring and ultrasonication. *Ultrasonics Sonochemistry* 7: 923-931.

**Sangave, P.C., Pandit, A.B.,** 2006. Enhancement in biodegradability of distillery wastewater using enzymatic pretreatment. *Journal of Environmental Management*. 78: 77-85.

**Sudarno, U., Bathe, S., Winter, J., Gallert, C.,** 2010. Nitrification in fixed-bed reactors treating saline wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 2017-2030.

**Vendramel, S., Dezotti, M., Sant'Anna G.L.Jr.,** 2011. Nitrification of an industrial wastewater in a moving-bed biofilm reactor: effect of salt concentration. *Environmental Technology* 32: 837-846.

**Vyrides, I., Stuckey, D.C.,** 2009. Adaptation of anaerobic biomass to saline conditions: Role of compatible solutes and extracellular polysaccharides. *Enzyme and Microbial Technology* 44: 46-51.

**Xie, C., Lu, R., Huang, Y., Wang, Q., Xu, X.,** 2010. Effects of ions and phosphates on alkaline phosphatase activity in aerobic activated sludge system. *Bioresource Technology* 101: 3394-3399.



## CONCLUSIONES

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

1. La concentración de NaCl en las aguas residuales urbanas, no afecta de forma significativa a los parámetros fisicoquímicos del influente, tales como SST, SSV, DQO y DBO<sub>5</sub>. Sin embargo, cuando la salinidad se incrementa en el influente, la capacidad de biotransformación de la materia orgánica, expresada como DQO y DBO<sub>5</sub>, se reduce drásticamente, al ser tratadas en un biorreactor de lecho sumergido (SFBBR). No obstante, la salinidad no afectó a la eliminación de SST y SSV, obteniéndose rendimientos acordes con la legislación vigente.
2. El proceso de nitrificación en un biorreactor de lecho sumergido, no se ve afectado significativamente por concentraciones de NaCl  $\leq 3,7$ g/L. Sin embargo, a concentraciones de NaCl en el influente  $\geq 24,1$  g/L, se origina una considerable disminución en la eficiencia de oxidación de amonio.
3. Un incremento de la salinidad en el agua residual urbana reduce significativamente las actividades de las enzimas hidrolíticas (fosfatasas ácidas y alcalinas, glucosidasa, esterasa y proteasa) en la biopelícula generada en un sistema SFBBR. Por consiguiente, la concentración de sal en el influente afecta directamente la actividad biológica de las biopelículas, reduciendo su capacidad para la biotransformación de la materia orgánica a nivel de la despolimerización de las macromoléculas presentes en el agua residual.
4. Bajo las condiciones de este estudio, se puede concluir que la modificación de la concentración salina en un agua residual urbana, produce variaciones estadísticamente significativas en la estructura de las comunidades bacterianas



desarrolladas en un sistema SFBBR. Así, la comunidad Bacteria experimentó cambios poblacionales en respuesta al incremento de la concentración salina, de manera que al analizar su composición mediante fingerprinting se agrupan en dos clusters con una divergencia del 26,7% entre las comunidades expuestas a 1,5 mS (sin adición de NaCl en el influente) y 12 mS (3,5 g/L) y las expuestas a 24 mS (24,1 g/L) y 48 mS (44,1 g/L).

5. La modificación de la concentración de NaCl en las aguas residuales urbanas, determina cambios significativos en la estructura de la comunidad fúngica desarrollada en un sistema SFBBR. Se comprobó mediante fingerprinting que la comunidad fúngica se segrega en dos clusters, uno de los cuales agrupó los perfiles obtenidos cuando el sistema se alimentó con un influente que contenía 3,7 g/L, y el otro agrupó el resto de los perfiles. Además se observó una mayor diversidad fúngica cuando el agua residual contuvo 3,7 g/L.
6. Las comunidades de arqueas en el SFBBR, analizadas mediante fingerprinting, agrupó todos los perfiles correspondientes a las diferentes concentraciones de sal (3,7 g/L, 24,1 g/L y 44,1 g/L) en un mismo cluster, con una divergencia del 20,6% con los perfiles obtenidos cuando el sistema se alimentó con un influente sin adición de NaCl.
7. Las comunidades de Beta-proteobacterias nitrificantes de fase I desarrolladas en un sistema SFBBR se ven solamente afectadas por concentraciones de NaCl en el agua residual urbana  $\geq 24,1$  g/L. Así, podemos establecer que este grupo de microorganismos se adaptan eficientemente a concentraciones de sal inferiores a las mencionadas en estos sistemas de tratamiento de aguas residuales.

## CONCLUSIONS

Several conclusions can be drawn in view of the results obtained in this study and considering previous works published related to the field:

1. The NaCl concentration in an urban wastewater does not significantly affect other physic-chemical parameters of the influent, such as: TSS, VSS, COD and BOD<sub>5</sub>. Notwithstanding, when salinity was increased in the influent, the ability to biotransform organic matter, expressed as COD and BOD<sub>5</sub>, was drastically reduced when the influent was treated in a submerged fixed bed bioreactor (SFBBR). Nonetheless, the salinity levels did not affect the TSS and VSS concentrations, which were within the range set by the regulations.
2. The nitrification process in a submerged fixed bed bioreactor was not significantly affected by NaCl concentrations greater than 3.7 g/L. In this sense, concentrations of NaCl  $\geq$  24.1 g/L in the influent resulted in a remarkable decrease of the ammonium oxidation capacity of the system.
3. An increase in salinity of urban wastewater significantly reduced the hydrolytic enzymatic activities (acid and alkaline phosphatases, glucosidase, esterase and protease) in the biofilm formed in the SFBBR system. Thus, the NaCl concentration in the influent directly affect the biological activity of the biofilms, reducing their ability to biotransform organic matter at the level of the depolymerization of macromolecules present in urban wastewater.
4. Under the experimental conditions applied in this study, the variation of NaCl in an urban wastewater produces statistically significant changes in the structure of the bacterial communities developed in a SFBBR. Thus, a fingerprint analysis of the hypervariable region V3 (16S rDNA gene) of the bacterial communities developed within the biofilm showed changes in response to the increment of salt concentration. The biofilm populations grouped in two different clusters that

diverged 26.7% when comparing the biofilms exposed to 1.5 mS (no NaCl addition) or 12 mS (3.5 g/L) and those exposed to 24 mS (24.1 g/L) or 48 mS (44.1 g/L).

5. Changes in the concentration of NaCl in an urban wastewater determined significant modifications in the structure of the fungal community developed in a SFBBR. The fingerprinting profiles showed that the fungal communities clustered in two groups, one of which contained the profile obtained when the system was fed with an influent containing 3.7 g/L NaCl, and the other cluster contained the remaining profiles. Furthermore, a higher fungal diversity was observed when the wastewater contained 3.7 g/L NaCl.
6. The fingerprint analysis of the archaeal communities exposed to 12 mS (3.5 g/L), 24 mS (24.1 g/L) and 48 mS (44.1 g/L) showed them forming a single cluster that diverged 20.6% from the fingerprints of the archaeal communities developed when the influent was not added of NaCl.
7. Nitrifying bacteria (Phase I) communities belonging to the group of beta-proteobacteria, developed in the SFBBR system were only affected by the salinity when the concentrations of NaCl in the urban wastewater were greater than of 24.1 g/L. In this sense, it could be concluded that this group of microorganisms efficiently adapt to salt concentrations lower than previously indicated.