



Universitat Autònoma de Barcelona
Escuela de Ingeniería
Departamento de Ingeniería Química
Programa de Doctorado en Biotecnología

Tesis Doctoral

MONITORIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA EN BIOFILTROS PERCOLADORES MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN TAG-454 Y OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS PARA HIBRIDACIÓN CON FLUORESCENCIA *IN SITU* (FISH)

Dirigida por
Dr. David Gabriel Buguña

TÉRCIA DINIZ BEZERRA

Septiembre 2015

**MONITORIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA
EN BIOFILTROS PERCOLADORES MEDIANTE
PIROSECUENCIACIÓN TAG-454 Y OPTIMIZACIÓN
DE PROTOCOLOS PARA HIBRIDACIÓN CON
FLUORESCENCIA *IN SITU* (FISH)**

Tesis doctoral presentada por **Tércia Diniz Bezerra** para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona. Realizado en el Departamento de Ingeniería Química en la Escola d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona, dentro del programa de Biotecnología bajo la dirección del **Dr. David Gabriel Buguña**,

Bellaterra, 23 septiembre de 2015

Dr. David Gabriel Buguña

Director

Tércia Diniz Bezerra

Autor

DAVID GABRIEL BUGUÑA, profesor agregat del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA:

Que la llicenciada en Biología Tércia Diniz Bezerra ha realitzat sota meva direcció el treball titulat "MONITORIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA EN BIOFILTROS PERCOLADORES MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN TAG-454 Y OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS PARA HIBRIDACIÓN CON FLUORESCENCIA *in situ* (FISH)", el qual es presenta en aquesta memòria i que constitueix la seva Tesi per a optar al Grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè en prengueu coneixement i consti als efectes oportuns, presentem a l'Escola d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi, signant el present certificat a

Bellaterra, 23 septiembre de 2015

David Gabriel Buguña

Agradecimientos

Creo que “como me gusta mucho escribir en detalles” este iba a ser el Capítulo más largo de la tesis y por esto he elegido hacer lo en versión corta.

Me encantaría empezar por agradecer a mi director que me ha dedicado su atención, paciencia, confianza y amistad todos estos años. –David, jamás podré agradecer lo suficiente.

También no tengo palabras que permitan expresar la gratitud que tengo a mi familia: “Meus amores devo tudo a vocês. Foi uma etapa de nossa vida que ao mesmo tempo foi muito doce e amarga, verdade? Vivemos intensamente todos os momentos. Adorei cada segundo, cada passeio, cada momento de estudo ou diversão. Os amo de todo coração, vocês são a minha vida!” – *Aprigio, Natália, Lucas, Clarinha y Maria da Gloria, mi estimada* madre, ¡esta tesis fue escrita por vuestras manos! Manos que me han acogido, enseñado, que en muchos momentos señalaron los caminos. Vuestras contribuciones y apoyo fueron lo que permitió la realización de todo el trabajo.

A los amigos que he encontrado en tierras españolas, les doy las gracias, un abrazo y la certeza de que la amistad de vosotros es imprescindible en mi vida: Mabel & Luis, los tengo en mi corazón. Con vosotros he aprendido mucho, no solo de biofiltros pero de amistad, lealtad y felicidad en las pequeñas conquistas. ¡Ha sido maravilloso! A los colegas de grupo: Andrea Montebello, Roger Rovira, Enric, Joan y también Lorena gracias por vuestra colaboración y compañerismo. A Laura, Nelsy, Margot, Rebeca, Rosemary, Pedro, y TODOS los compañeros muchas gracias por el apoyo y alegría. No voy a nombrarlos porque puedo olvidar me alguien. Así que están todos incluidos. Un fuerte abrazo.

A Javier Lafuente y Mireia gracias por el apoyo y amistad. A María Eugenia gracias por acreditar en mi trabajo, echaré de menos las charlas sobre biología molecular. Aprovecho para agradecer a todos los compañeros de GENOCOV, estudiantes y profesores por la colaboración y por agradable convivencia. Al personal de la planta piloto ¡ánimo! Me ha gustado mucho la interacción, la colaboración y las risas. A los compañeros de la Universidad de Manresa, en particular a Toni Dorado, Xavier Gamisans, Montserrat, Xavier Guimerá, Lledó y todos los demás. Echaré mucho de

menos a nuestros encuentros. A los de Cádiz, principalmente a Fernando, Martín, Domingo y José Manuel, muchas gracias por la colaboración y por la gentileza de la acogida.

A todo el personal del Departamento de Ingeniería Química y del programa de Doctorado en Biotecnología: Dirección, profesorado, administrativo y técnicos que mucho me ayudaran en estos años de trabajo. También al personal del servicio de Microscopia electrónica de la UAB.

Al programa “Ciencias Sem Fronteiras- CAPES do Ministério de Educação do Brasil” por el soporte financeiro.

A todos que de algún modo contribuyeron para la realización de esto trabajo de tesis, mis sinceros agradecimientos.

Tércia Diniz Bezerra

Resumen

La biofiltración ha demostrado ser una tecnología exitosa para la eliminación del H_2S y del NH_3 de las corrientes de gases contaminadas. El tema asume relevancia pues se establece como tecnología limpia y sostenible. Debido a su organización los biofiltros son considerados ecosistemas artificiales complejos en donde las variables ambientales y la composición de la comunidad están estrictamente relacionadas y de ellas depende el éxito del proceso. La diversidad de bacterias y la dinámica de la comunidad son elementos importantes del componente biológico aunque su conocimiento es aún muy limitado. Para comprenderlo mejor se necesitan perfiles poblacionales elaborados mediante herramientas de biología molecular tales como la pirosecuenciación e hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH). Este fue el eje temático de la presente tesis: Estudiar la composición y la dinámica de comunidades de Eubacteria de biofiltros percoladores mediante pirosecuenciación 454-Roche (*tag-454*). También se procedió a optimización de protocolos FISH. Para ambas herramientas se evaluó la cobertura de la diversidad y su efectividad para el estudio y seguimiento del componente biológico. Se estudiaron dos sistemas de desulfuración de biogás, uno aerobio y otro anóxico, y un tercer sistema de tratamiento de corrientes ricas en NH_3 . Los resultados obtenidos demostraron que la comunidad fue capaz de sostenerse bajo las condiciones de operación probadas. En el biofiltro de desulfuración aerobia ocurrió un cambio drástico en la composición de la microbiota en función de la acidificación del medio (pH; 7-2.5), y que la pérdida de diversidad fue compensada por la eficacia de las poblaciones acidófilas. En el biofiltro anóxico los cambios poblacionales no afectaron, en general, en el rendimiento de la desulfuración del biogás, y la actividad de *Sedimenticola* fue determinante para el éxito del sistema. En el biofiltro percolador de NH_3 se comprobó los efectos combinados de tiempos de residencia con diferentes concentraciones de entrada del gas. Las alteraciones en dichos parámetros produjeron cambios significativos en la comunidad nitrificante. Las condiciones favorecieron el crecimiento de *Comamonas*, *Nitrosomonas* (AOB) y *Nitrobacter* (NOB). Fue interesante encontrar una presencia marcada de bacterias desnitrificantes, cosa que no perjudicó al rendimiento de la nitrificación. En los estudios con *tag-454* se encontró dificultad a la hora de asignar identidad a secuencias, lo que se justificó por la longitud insuficiente de los fragmentos y por la falta de cobertura de las bases de datos. De todos modos los resultados indicaron que la diversidad fue representada adecuadamente, permitiendo una cobertura muy buena de las distintas comunidades hecho que corrobora la efectividad de la aproximación. El trabajo de optimización de la FISH se enmarca en el conocimiento previo de la diversidad microbiológica a la hora de elegir sondas y se comprobó la influencia de la autofluorescencia del S_0 sobre el recuento de células. Los resultados mostraron que la elección de los fluorocromos fue fundamental para eliminar la autofluorescencia de las partículas de S_0 que originaban datos sobre-estimados de abundancia relativa..

Abstract

Biofiltration has proved to be a successful technology for the removal of H₂S and NH₃ from contaminated gases. The subject becomes significant because it is established as a clean and sustainable technology. Due to their complex organization, biofilters are considered artificial ecosystems, where environmental variables and community composition are strictly related. Consequently, process performance highly depends on both factors. The bacterial diversity and dynamics of the community are very important elements of the biological component, but their knowledge is still very limited. To better understand biofiltration mechanisms, development of microbial population profiles with comprehensive coverage is necessary. To this aim, molecular biology tools such as Pyrosequencing of genomic DNA and Fluorescence *in situ* hybridization ((FISH) are the most suitable tools. The goal of the thesis was to study the composition and dynamics of Eubacteria communities in biotrickling biofilters (BTF) using the 454-Roche (tag-454) and FISH. Three BTFs were used: one aerobic y other, anoxic, for desulfurization of H₂S, and a third system for the treatment of gas flows contaminated with NH₃. Results showed the ability of the community to sustain itself under the operational conditions proved in all cases. In the aerobic BTF a drastic change in the composition of the microbiota occurred in response to environmental acidification (pH 7-2.5). Biodiversity losses were compensated by the high efficiency of acidophilic populations (*Acidithiobacillus* and *Acidiphilium*). In the anoxic BTF, changes did not affect either the populations or the global performance of biogas desulfurization. The activity of *Sedimenticola* was crucial to the success of the anoxic desulfurization. In the NH₃ BTF, the combined effects of the gas residence time and different concentrations of gas inlet were assessed as well as their impact over microbial diversity. Significant changes in the nitrifying community were detected. The resulting conditions favored the growth of the *Comamonas*, *Nitrosomonas* (AOB) and *Nitrobacter* (NOB). Interestingly, a strong presence of denitrifying bacteria was found in the aerobic BTF, which did not affect the nitrification performance. Pyrosequencing through tag-454 revealed a large difficulty to find the identity to some sequences, which was justified by insufficient length of the fragments and limited coverage of databases. Also, results indicated that diversity was adequately represented and that, ultimately, a very good coverage of different communities was obtained. The relative abundance data allowed explaining the dynamics of these communities, a fact that confirms the effectiveness of the approach. The FISH protocol was optimized based on the knowledge of microbial diversity previously obtained to properly choose FISH probes. In addition, it was possible to verify the origin of the autofluorescence emitted by the samples, which was caused by elemental sulfur (biosulfur). Results showed that the choice of fluorochromes was fundamental to eliminate the interference due to elemental sulfur particles, which were responsible for originating overestimated data of the relative abundances.

Contenido

Agradecimientos	vii
Resumen	ix
Abstract	xi
PARTE I.....	1
1. Motivaciones de la investigación y estructura de la tesis	5
1.1. Motivaciones.....	5
1.2. Estructura de la tesis	6
2. Introducción general	11
2.1. Biotecnología de la Biofiltración.....	11
2.1.1. Sistemas de biofiltración	12
2.2. Contaminantes	16
2.3. Mecanismos de eliminación biológica de H ₂ S y NH ₃	17
2.4. Ecología de la biofiltración	19
2.4.1. Componente de proceso	20
2.4.2. Componente biológico.....	21
2.4.3. Integración de los componentes biológicos y de proceso	24
2.5. Pirosecuenciación <i>tag-454</i>	28
2.6. <i>Tag-454</i>	29
2.7. FISH: Principios fundamentales de la técnica	32
3. Objetivos.....	39
3.1. Objetivos Generales.....	39
4. Materiales y métodos.....	43
4.1. Biofiltros.....	43
4.2. Parámetros y variables	43
4.3. BTF-H ₂ S AER.....	47
4.3.1. Descripción de la planta	47

4.3.2	Características de las fases gas y líquida	49
4.3.3	Métodos analíticos	49
4.3.4	Recogida de biomasa	49
4.3.5	Microscopia electrónica de barrido (SEM)	50
4.4	BTF-H ₂ S ANOX	51
4.4.1	Descripción de la planta	52
4.4.2	Características de las fases gas y líquida	52
4.4.2.	Métodos analíticos	53
4.4.3.	Recogida de biomasa	53
4.5.	BTF-NH ₃	55
4.5.3.	Características de las fases gas y líquida	55
4.5.4.	Métodos analíticos	57
4.5.5.	Tomas de muestras de biomasa	57
4.6.	Pirosecuenciación 454 Roche	57
4.6.2.	Obtención del ADN genómico	57
4.6.3.	Preparación del ADN	59
4.7.	PCRe y secuenciación FLX ⁺ 454 Roche	60
4.7.1.	Check de calidad	61
4.7.2.	Clasificación de secuencias y calculo de abundancia relativa	61
4.7.3.	Análisis de diversidad	62
5.1.	Introducción	65
5.1.1.	Mecanismo básico de la biofiltración de H ₂ S	65
5.2.	Antecedentes	68
5.2.1.	Componente de proceso: el efecto del pH	68
5.2.2.	Componente biológico: composición de la comunidad	70
5.3.	Motivaciones y objetivos	72
5.4.	Materiales y métodos	73
5.4.1.	Maniobra de cambio de pH	73
5.5.	Resultados y discusión	74

5.5.2. <i>Estudio de comunidad</i>	78
6. Estudio de diversidad de Bacteria en biofiltro percolador anóxico para desulfuración de H ₂ S	91
6.1. Introducción	91
6.1.1. Mecanismo de la biofiltración anóxica de H ₂ S del biogás	91
6.2. Antecedentes.....	93
6.2.1. Ecología de la biofiltración anóxica.....	96
6.3. Motivaciones y objetivos	99
6.4. Materiales y métodos.....	100
6.4.1. Condiciones de operación	101
6.4.2. Estudio de comunidad	102
6.5. Resultados y discusión	104
6.5.1. Resumen de la operación del BTF-H ₂ S ANOX	104
6.5.2. Estudio de la ecología del BTF-H ₂ S ANOX.....	107
6.5.3. Estudio de la Comunidad del BTF-H ₂ S ANOX	111
6.6. Conclusiones generales del capítulo	133
7. Estudio de la diversidad de Bacteria en biofiltro percolador para eliminación de NH ₃	139
7.1. Introducción	139
7.1.1. Mecanismos de biofiltración para NH ₃	139
7.1.2. Ecología de la biofiltración de NH ₃	142
7.2. Antecedentes.....	145
7.3. Motivaciones y objetivos	149
7.4. Materiales y métodos.....	150
7.4.1. Parámetros de operación.....	150
7.4.2. Análisis de comunidad.....	153
7.5. Resultados y discusión	153
7.5.1. Resumen de la operación del BTF-H ₂ S AER	153
7.5.2. Composición de la comunidad del BTF-NH ₃	160
7.5.2.1. Procesamiento de las lecturas del <i>tag-454</i>	160

7.5.2.2.	Diversidad	160
7.6.	Dinámica de la comunidad Eubacteria ocasionados por las condiciones de operación.....	163
7.6.1.	Estudio de la distribución vertical de la comunidad en condiciones estacionarias a baja carga de NH ₃	170
PARTE II.....		177
8.	Introducción	181
8.1.	Factores que determinan el éxito de la aplicación.....	181
8.1.1.	Composición de la microbiota y aspecto de la muestra	181
8.1.2.	Metodología.....	182
8.1.3.	Calidad de las imágenes	184
8.2.	Antecedentes.....	185
8.3.	Justificativa y objetivos de la optimización	186
9.	Materiales y métodos de la FISH	191
9.1.	Preparación de las muestras y fijación.....	191
9.2.	Preparación de portaobjetos.....	192
9.3.	Hibridación y lavado	193
9.4.	Sondas	193
9.5.	Microscopia y cuantificación con Matlab	195
9.6.	Evaluación de la especificidad de las sondas	196
9.7.	Análisis de cobertura de las sondas	196
9.8.	Estudio de autofluorescencia del S ⁰	197
9.9.	Barrido espectral	198
9.10.	Análisis de los fluorocromos.....	198
9.11.	Comprobación por vía experimental.....	199
10.	Análisis de la cobertura de las sondas	203
10.1.	Especificidad.....	203
10.2.	Resultados y discusión.....	205
10.2.1.	Análisis de especificidad y de cobertura	205
10.3.	Análisis de la cobertura de las sondas para proteobacterias	208

10.3.1.	Actualización del conjunto de sondas	209
11.	Estudio de la autofluorescencia del S ⁰	215
11.1.	Principios básicos de la autofluorescencia	215
11.2.	Justificativa del estudio y objetivos	217
11.3.	Resultados y discusión.....	218
11.3.1.	Autofluorescencia del S ⁰	218
11.3.2.	Aspecto de la matriz	220
11.3.3.	Resultados preliminares de los ensayos con Cy3	224
11.3.4.	Barrido espectral de las muestras y del azufre elemental	225
11.3.5.	Elección de fluorocromo	229
11.3.6.	Hibridación con FAM-6	229
11.4.	Conclusión	231
11.5.	Efetividad del protocolo de optimización del FISH: limitaciones y prospectivas para aplicación en entornos de biofiltración	231
12.	Conclusiones y perspectivas de trabajos futuros	235
12.1.	Tag-454 para estudio de la comunidad en biofiltros percoladores	235
12.2.	Ecología: correlación entre datos de operación y diversidad	236
12.3.	Optimización de protocolo FISH:	236
12.4.	Perspectivas de trabajos futuros	237
13.	Referencias	241
	Anexos	261
	Anexo 1	263
	Anexo 2	265
	Anexo 3	267
	Anexo 4	269
	Anexo 5	271
	Anexo 6	273

Lista de abreviaturas

<i>AOB</i>	-bacterias oxidantes de amonio
BTF-H ₂ S AER	- biofiltro para desulfuración de la UAB
BTF-NH ₃	- biofiltro para tratamiento de amoníaco de la UAB
BTF-H ₂ S ANOX	-biofiltro para desulfuración de la UCA
EBTR	-tiempo de contacto del gas (Empty bed residence time)
EC	-capacidad de eliminación/ elimination capacity
FISH	-hibridación fluorescente in situ/ fluorescent in situ hybridization
HRT	-tiempo de residencia hidráulico/hydraulic residence time
L	-carga
<i>ND</i>	-denitrificación
NLR	-carga de nitrógeno a la entrada
<i>NOB</i>	-bacterias oxidantes de nitrito
ORP	-potencial de oxi reducción
R, RE	-removal efficiency/ eficacia de remoción
R1	-reacción de nitritación
R2	-reacción de nitratación
SEM	- microscopia eletronica de barrido
SND	-nitrificación y desnitrificación simultanea
<i>SOB</i>	-bacterias sulfooxidantes
<i>Tag454</i>	Pirosecuenciación 454 Roche
TLV	velocidad de percolación/trickling liquid velocity

PARTE I

Pirosecuenciación aplicada a biofiltración

CAPÍTULO 1

Motivaciones de la investigación y estructura de la tesis

1. Motivaciones de la investigación y estructura de la tesis

1.1. Motivaciones

Los sistemas de tratamiento biológico de corrientes de gases contaminadas son ecosistemas artificiales. De hecho, son diseñados para favorecer tanto los procesos de naturaleza físico-química como biológica. El objetivo es degradar los contaminantes del aire por medio de la actividad microbiológica. En biofiltración, el componente de proceso ha sido el tema principal de los estudios de optimización de los sistemas y gracias a ello, se ha avanzado mucho en el conocimiento de este componente. Sin embargo, los estudios del componente biológico siguen limitados por los métodos de identificación de especies y su recuento. En consecuencia, las bases de la ecología de biofiltros no se han establecido hasta la fecha. Si por un lado la aplicación de métodos clásicos de biología molecular ha limitado el acceso a la diversidad, por otro las aproximaciones bio-ómicas pueden contribuir a la ampliación del conocimiento de la comunidad. Como en otras áreas de la biotecnología el avance en el conocimiento de la comunidad depende del empleo de aproximaciones moleculares de alto rendimiento, como la secuenciación masiva de ADN ambiental conjuntamente con el análisis filogenético (Konopka 2009; Vallero 2010; Cabrol&Malhautier 2011; Lu, Chandran,&Stensel 2014). Además, el estudio del componente biológico mediante ecología molecular, aunque no exento de sesgos potenciales, puede proporcionar una imagen más representativa de la comunidad y de las relaciones ecológicas. En realidad, hasta la fecha sólo unos pocos estudios aplicaron plataformas de alto rendimiento como el *tag-454 de Roche* en el estudio de comunidades en el área de biofiltración de gases (Li et al. 2011; Montebello et al. 2013).

En este escenario, el grupo de investigación GENOCOV de la UAB en su línea de tratamiento y valorización biológica de compuestos gaseosos destaca por la aplicación de aproximaciones de metagenómica y metatranscriptómica en biofiltros (Bezerra et al. 2013). La aplicación de las plataformas de alto rendimiento puede ayudar a aumentar el conocimiento sobre la dinámica de estos sistemas, a medida en que encuentren respuestas sobre los cambios de diversidad microbiana, y sobre resistencia y resiliencia de las poblaciones. Este proyecto de investigación surgió de un deseo de profundizar en el conocimiento de las comunidades microbianas que operan en biofiltros percoladores. El trabajo es innovador en el campo de la biofiltración y pretende ser una gran herramienta de seguimiento del componente biológico del

proceso. Con respecto a técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés: fluorescent in situ hybridization) el trabajo surgió de la necesidad de optimizar protocolos destinados a muestras enriquecidas con azufre elemental (S^0) ya que la obtención de resultados coherentes es dependiente de la eliminación de la autofluorescencia y de la elección de un pool de sondas adecuadas al análisis de la biopelícula.

El trabajo que se presenta en esta memoria se ha realizado a partir de biomasa obtenida de tres biofiltros percoladores (BTF) experimentales operados durante un largo período de tiempo. Dos de los sistemas eran plantas a escala de laboratorio, ubicadas en la Universidad Autónoma de Barcelona, mientras que una tercera instalación fue un montaje a escala semi-piloto, ubicado en la EDAR de San Fernando, Cádiz. El estudio de la comunidad microbiana con *tag-454* de Roche en BTF para la desulfuración de biogás bajo condiciones aerobias (BTF- H_2S AER) y anóxicas (BTF- H_2S ANOX) ha sido subvencionada por el proyecto “Monitorización, modelización y control para la optimización de biofiltros percoladores de desulfuración anóxicos. y aerobios- MICROBIOFIN”, con referencia CTM2012-37927, financiado por el Ministerio de Economía (MINECO). La parte de la tesis de optimización de la técnica FISH fue financiada por el proyecto “BIODESULFURA-Desulfuración de gases ricos energéticamente mediante biofiltros percoladores: desarrollo y optimización del proceso en condiciones anóxicas y aerobias”, con referencia CTM2009-14338-C03, financiado por el Ministerio de Economía (MINECO)

1.2. Estructura de la tesis

La presente tesis tuvo como eje temático la aplicación de técnicas de secuenciación masiva para el estudio de diversidad en distintos biofiltros percoladores. Sin embargo también se realizó un extenso estudio de FISH que sirvió de bases para la optimización de protocolos. Así, para facilitar en el entendimiento de los dos temas la tesis fue organizada en dos partes, siendo la primera dedicada a técnica de pirosecuenciación *tag-454* y la segunda al FISH. El contenido se organizó en 14 capítulos.

-Capítulo 1: Motivaciones de la investigación y estructura de la tesis;

-Capítulo 2: Introducción general a la biotecnología de la biofiltración y las bases de estudios de ecología microbiana; proceso de pirosecuenciación;

-Capítulo 3: Objetivos;

-Capítulo 4: Materiales y métodos: descripción de las plantas y de los parámetros de operación empleados en los tres BTFs; toma de muestras y protocolo *tag-454*

Parte I: Estudios de diversidad mediante *tag-454*

-Capítulo 5: Resultados del estudio del efecto de la acidificación del BTF-H₂S AER sobre la comunidad de Eubacteria.

-Capítulo 6: Resultados del estudio de diversidad realizado en el BTF-H₂S ANOX

-Capítulo 7: Resultados del estudio de diversidad realizado en el BTF-NH₃

-Parte II: Proceso de optimización de los protocolos FISH

-Capítulo 8: Introducción al FISH

-Capítulo 9: Materiales y métodos de FISH

-Capítulo 10: Resultados del estudio optimización de las sondas

-Capítulo 11: Resultados del estudio de autofluorescencia del S⁰

-Capítulo 12: Conclusiones generales y perspectivas de trabajo futuro

CAPÍTULO 2

Introducción general

2. Introducción general

2.1. Biotecnología de la Biofiltración

La contaminación ambiental es uno de los problemas más graves con que se encontró la sociedad moderna desde la llegada de la era industrial. La mejoría de los sistemas de producción industrial, de la salud y del transporte genera por un lado una mejor calidad de vida, pero por otro, llevan a la explotación descontrolada de los recursos naturales y a la degradación ambiental. En este escenario se identifica la contaminación del aire. En las últimas décadas, el concepto de contaminación atmosférica ha sido ampliado; así, un contaminante puede ser un compuesto que implique molestias o riesgo para la salud de las personas o de los demás seres vivos, así como que pueda degradar distintos materiales, reducir la visibilidad o producir olores desagradables. Se ha realizado un gran esfuerzo para normalizar y controlar los niveles de las emisiones de los contaminantes en el aire desde los años 1970. Se discutió mucho en la convención de la Tierra en 1992 y a continuación durante la elaboración del protocolo de Kioto en 1997. Así que la Comunidad Europea mantiene el compromiso de disminuir las emisiones. Los detalles se pueden consultar en la ficha técnica 4.9.2 del parlamento europeo que trata del tema (http://www.europarl.europa.eu/factsheets/4_9_2_es.htm). Desde entonces, se han desarrollado procesos físicos, químicos y biológicos para tratar de los más diversos contaminantes siendo común la utilización de dos o más técnicas simultáneamente.

A día de hoy, el empleo de métodos físico-químicos en fase gas (ej. con ozono), fase líquida (ej. torres de absorción) o fase sólida (ej. adsorción con carbón activo, zeolita, alúmina) y de combustión es frecuente. Sin embargo, todas estas tecnologías son indicadas para corrientes específicas, debido a que son caras, desde su instalación hasta el mantenimiento en reactivos. Además de costes de regeneración de material, también presentan riesgo por utilizar compuestos con alta toxicidad, generación de efluentes líquidos con contenidos en metales, o por trabajo a alta presión y/o temperatura. Desde el punto de vista económico, las tecnologías biológicas requieren menor coste y, al contrario de las anteriores, permite utilizar condiciones suaves de presión, temperatura y pH; y el uso de reactivos se limita a nutrientes para medio de cultivo. Sin embargo, a pesar de las ventajas, el sector industrial aun prefiere invertir en los procesos de tratamiento físico-químicos. En general, eso se da en función de las características de las corrientes de gases que se necesita tratar, que hace la elección de la tecnología (Delhoméie & Heitz, 2005; Cabrol & Malhautier, 2011).

2.1.1. Sistemas de biofiltración

Las tecnologías para la eliminación biológica de contaminantes del aire son descritas ya desde la década de 1950. A día de hoy, se consolidó como una alternativa más sostenible, además de económicamente viable, y más sencilla que las técnicas físico-químicas. Varios estudios han demostrado que en comparación con otros métodos, los sistemas de depuración biológica de aire (biofiltros) son bastante atractivos, ya que son más amigables con el medio ambiente, y los costes tanto de inversión y mantenimiento pueden ser más bajos (Devinny et al. 1999; Gabriel & Deshusses, 2003).

La biofiltración se basa en la habilidad natural de los microorganismos de utilizar los más diversos compuestos en su metabolismo, principalmente como fuente de energía. Los biofiltros son bioreactores contruidos para favorecer dos procesos, uno de naturaleza química (de transferencia), y otro de naturaleza biológica (biodegradación). En resumen, el proceso se desarrolla en tres etapas: 1-) transferencia del contaminante de fase gas a fase líquida, 2-) absorción del compuesto por la biomasa, y 3-) la metabolización del compuesto diana (Cox & Deshusses 1998). Diversos tipos de biofiltros fueron diseñados a lo largo de los años, siendo los más comunes los biofiltros convencionales, los biolavadores y los de percolación (fig. 2.1), pero en los últimos años nuevas configuraciones fueron siendo introducidas o combinadas. Los nuevos tipos de biofiltros incluyen bioreactores sin soporte, es decir, con biomasa suspendida, con un tanque agitado; de membranas; fotoreactores; y de rotación (RBC). Estas nuevas configuraciones han ayudado a eliminar compuestos xenobióticos en mezclas complejas, y tienen como objetivo mejorar el contacto entre microbiota y contaminantes (Rene et al. 2013; Padhi & Gokhale 2014). En la mayoría de modelos, la fase gas se hace pasar por la fase líquida, en donde se absorbe el contaminante.

En la fig. 2.1 se aprecian esquemas de los principales tipos de biofiltros. El primer sistema (A) es un biofiltro convencional que demanda primero humidificación del gas, antes de hacerlo pasar por el lecho, que en general se empaca con material orgánico. Se ilustra también un biolavador (fig. 2.1B), donde el gas pasa por un sistema de lavado que absorbe el contaminante. El purgado de este compartimento se pasa al bioreactor para ser metabolizado. El tercero es un biofiltro percolador (fig. 2.1C). Se ilustran el sistema de control, la recirculación de líquido y el lecho empacado con material inerte. El hecho de ser un sistema cerrado permite recuperar la corriente tratada para uso posterior

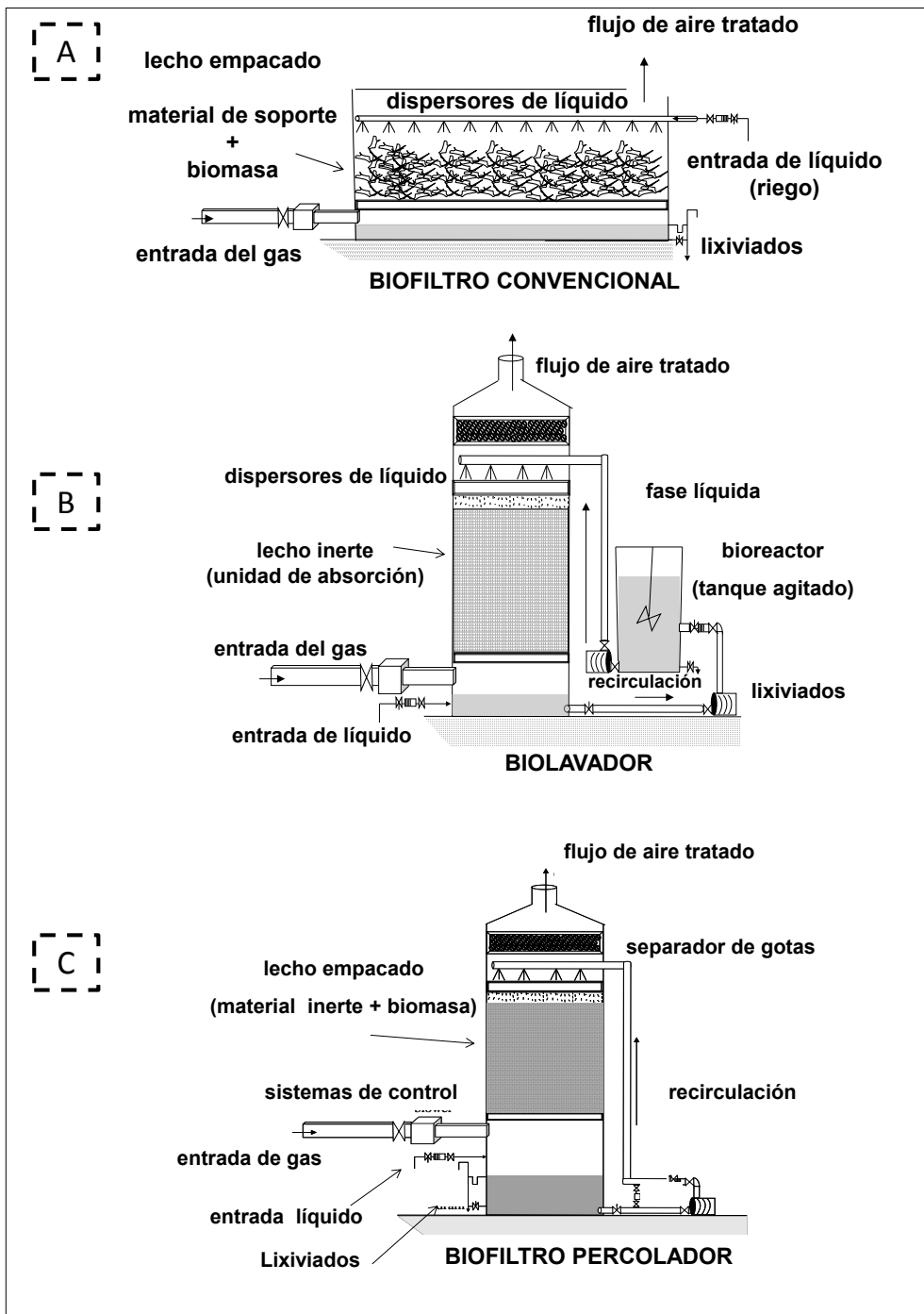


Figura 2.1. Esquemas de los principales sistemas de biofiltración: biofiltros convencional, biolavador y biofiltro percolador

Tras más de 6 décadas de desarrollo, los biofiltros convencionales siguen siendo utilizados en la industria gracias a su fácil manejo y bajo coste de manutención. Su eficacia para el tratamiento de mezclas complejas de gases, a bajas concentraciones, se ha comprobado a lo largo del tiempo (Jiang & Tay 2010; Ralebitso-Senior et al. 2012; Rene et al. 2013). Sin embargo, los biofiltros son inadecuados para corrientes

que contienen concentraciones elevadas de contaminantes como las paraqué han de ser tratadas para el enriquecimiento de gas natural y la utilización de biogás. En estos casos, se utilizan los biofiltros de tipo percolador (BTF, por sus siglas en inglés: *biotrickling filter*) o de tipo biolavador (proceso Thiopaq, patentado por Shell-Paques), que permiten eliminar de la corriente solamente compuestos indeseables, con alto rendimiento y control del proceso. En un biofiltro de gases de tipo percolador, el lecho empacado de la columna proporciona superficie para el crecimiento microbiano. Se hace percolar una solución de nutrientes por la columna, para llevar nutrientes hasta las células. A día de hoy se han probado variaciones en las tres configuraciones básicas, que han permitido optimizar su funcionamiento. Las principales características, las ventajas y desventajas de cada uno de los sistemas se resumen en la tabla 2.1.

Para que se elimine un contaminante de una corriente de gas, es necesario que el mismo sea biodegradable, que sea mínimamente soluble en el agua y no tóxico para los microorganismos. Las condiciones de operación deben ser ajustadas para obtener el máximo rendimiento. Muchos bioreactores funcionan bien a temperatura ambiente (óptima por lo general entre 20 y 35 °C para los microorganismos mesófilos) y pH alrededor de 7. La transferencia del contaminante de la fase gas hasta el líquido (absorción) puede ser un proceso limitante para la eficiencia del sistema, así que, a lo largo de los años se han desarrollado distintos sistemas con el objetivo de mejorar esta transferencia. El contenido de humedad en el lecho filtrante y la disponibilidad de nutrientes esenciales son factores críticos de la operación. Otro punto importante es la capacidad de crecimiento de la microbiota, que depende de la absorción de los nutrientes desde del medio de cultivo, del soporte de crecimiento, de la toxicidad del compuesto y de su concentración (Cox & Deshusses 1998).

Los biofiltros están básicamente empacados con material poroso de origen natural o sintético, como restos de madera, anillos de espuma de poliuretano o plástico, y su función es la de apoyar el crecimiento de una biopelícula especializada. El gas contaminado es forzado a pasar a través del lecho poroso, y la biopelícula lo utiliza como fuente de carbono o energía.

Tabla 2.2.1. Características de los biofiltros

COMPONENTE	BIOFILTRO CONVENCIONAL	BIOLAVADOR	BTF
BIOMASA	<ul style="list-style-type: none"> - inmovilizada/ biopelícula - autóctona (biopelícula se desarrolla des del material de soporte) 	<ul style="list-style-type: none"> - dispersa en la fase líquida - inoculada (cultivo puro o consorcio) 	<ul style="list-style-type: none"> - inmovilizada/ biopelícula - inoculada (cultivo puro o consorcio)
MATERIALES DE SOPORTES/ LECHO	<ul style="list-style-type: none"> - Soporte de naturaleza orgánica, o mezclas (uso de material estructurante) - degradación del contaminante 	<ul style="list-style-type: none"> - soporte inerte - dos unidades de operación: lecho empacado para absorción del contaminante y tanque para la degradación en fase líquida 	<ul style="list-style-type: none"> -soporte inerte -orgánico o inorgánico - degradación del contaminante
FASE LIQUIDA	<ul style="list-style-type: none"> - recirculación posible. - humidificación discontinua. - agua o solución de nutrientes 	<ul style="list-style-type: none"> - circula entre columna y tanque. - agitada en el tanque - solución de nutriente 	<ul style="list-style-type: none"> - con o sin recirculación - humidificación en continuo o discontinuo - solución de nutrientes
VENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> -muy eficiente para bajas cargas -menor inversión, -operación simple/ aerobia 	<ul style="list-style-type: none"> - eficiente para cargas elevadas y contaminantes con alta solubilidad- - operación anóxica o aerobia 	<ul style="list-style-type: none"> -alta eficiencia para altas cargas con tiempos de residencia menores - alto nivel de control de operación - operación anóxica o aerobia
INCONVENIENTES	<ul style="list-style-type: none"> -bajo control del proceso -descomposición rápida del soporte y colmatación del lecho - OD limitado -tiempos de residencia elevados. 	<ul style="list-style-type: none"> - alto coste de inversión -coste de mantenimiento con solución de nutrientes y energía - poco eficaz para compuestos menos solubles 	<ul style="list-style-type: none"> - exige sistema de control y - coste de mantenimiento con solución de nutrientes, control de pH y energía
FACTORES LIMITANTES	<ul style="list-style-type: none"> - humedad, pH, T, OD - disponibilidad de nutrientes - colmatación lecho/ desgaste del soporte 	<ul style="list-style-type: none"> - saturación del medio con sustrato y subproductos del metabolismo - pH y T 	<ul style="list-style-type: none"> - desgaste del soporte - colmatación del lecho, - OD

2.2. Contaminantes

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) y el amoníaco (NH_3), que son los compuestos tratados en los BTF utilizados en esta tesis, están entre los contaminantes del aire más importantes, y se emiten desde fuentes naturales y antropogénicas.

El H_2S se emite de forma natural por la actividad volcánica, y desde sedimentos y fondo oceánico por la actividad anaerobia. En la actividad humana se emiten desde la combustión de combustibles fósiles, la producción de biogás, y plantas de tratamiento de aguas residuales y de residuos urbanos y son motivo de frecuente quejas del vecindario (Hong & Park 2005; Pagans et al. 2005). El H_2S es tóxico y corrosivo, es peligroso para la salud y para el medio ambiente. En la atmósfera forma ácido y óxidos de azufre que pueden originar precipitaciones ácidas. Debido a esta forma de dispersión, estos contaminantes son muy agresivos con el medio ambiente y, por lo tanto, su eliminación es casi obligatoria. En cuanto a su producción durante la producción de biogás, su presencia en el biogás bruto puede superar las 20,000 ppm_v, siendo típicamente de entre 1,000 y 5,000 ppm_v (Rene et al. 2013). Se han desarrollado varios procesos para desulfurización, físicos, químicos y biológicos para su tratamiento en las dos últimas décadas (revisados en Syed et al. 2006; Cabrol & Malhautier 2011; Nanda et al. 2012; Rene et al. 2013).

El amoníaco gas (NH_3) se produce a partir de la degradación de materia orgánica, principalmente a partir del ion amonio (NH_4^+) que, por su parte, se genera de la degradación de proteínas, urea o ácido úrico. Las emisiones de origen antropogénicas son muy comunes, siendo la ganadería y el compostaje las actividades que más contribuyen (Taghipour et al. 2005). En operaciones industriales, son emitidas en la fabricación de fertilizantes; de papel y celulosa; petroquímica; industria de alimentos, y tejidos. La carga de contaminante generadas del compostaje suelen ser del orden de 18 a 150 $gNH_3\ mg^{-1}$ de residuo sólido (Clemens & Cuhls 2003) y superiores a 700 $mgNH_3\ m^{-3}$ para gases provenientes del lodo de compostaje (Haug, 1993). El nitrógeno amoniacal es el compuesto de nitrógeno más responsable de los efectos tóxicos en los peces y otros animales acuáticos debido a la eutrofización de las aguas. El amoníaco disuelto en agua existe como un equilibrio entre amoníaco molecular (NH_3) y amonio ionizado (NH_4^+), y su toxicidad es atribuible mayoritariamente a la forma no ionizada (NH_3). Las condiciones más importantes que controlan el equilibrio entre las dos formas, y por tanto el porcentaje de amonio libre, son el pH y la temperatura, aunque también puede ser significativo el efecto de la fuerza iónica.

El nitrato así como el nitrito constituyen un problema de salud pública, relacionado principalmente con la cianosis infantil y la carcinogénesis. La toxicidad del nitrato aparece después de su transformación en nitrito, un proceso que puede producirse en la saliva o en el estómago. El nitrito formado es capaz de oxidar el hierro de la hemoglobina de Fe^{2+} a Fe^{3+} , lo que afecta a su capacidad de transporte de oxígeno. La mayor parte de casos asociados al consumo de agua con nitrato ha aparecido para concentraciones mayores de 10 mg/l de N-NO_3^- . La carcinogénesis, cáncer de estómago en particular, ha sido asociada a la ingestión de compuestos con nitrógeno en forma de nitrito. Estos compuestos son formados al reaccionar el nitrito (proveniente del nitrato) con aminas y amidas para formar nitrosaminas y nitrosamidas. Las evidencias epidemiológicas sugieren que un consumo alto de nitrato puede ser un factor que contribuya al cáncer de estómago.

2.3. Mecanismos de eliminación biológica de H_2S y NH_3

Debido a la naturaleza de las reacciones químicas utilizadas en la depuración, es probable, que estos procesos se hayan desarrollado muy pronto en la historia de la vida en la tierra; quizás en el medio acuático, y que hayan evolucionado desde entonces (Atlas & Bartha 2002). La temprana implicación de los procariontes en la transformación de la materia (compuestos orgánicos e inorgánicos) mediante la biocatálisis, fue fundamental para su movilidad entre los distintos reservorios geológicos (tierra, agua y atmósfera). El desafío de obtener alimento a partir de la materia bruta les ha proporcionado las condiciones para la aparición de los sistemas multi-enzimáticos. Pero la evolución de dichos procesos solo fue posible gracias a la las moléculas de memoria metabólica (ARN y ADN). Desde un punto de vista evolutivo, los principales factores que favorecieron la dispersión de la vida y su organización en distintos ambientes fueron la versatilidad, es decir la capacidad de utilizar distintos compuestos como fuente de energía y materia; y la plasticidad genética, o sea la “interactividad” del código genético, imprescindible a la perpetuación de los sistemas enzimáticos, que son empleados en las distintas rutas, y su evolución.

La capacidad metabólica de los microorganismos los ha convertido en agentes del ciclo de la materia (Konopka 2009). A día de hoy se asume que durante la evolución, los mecanismos de dispersión de la información genética favorecieron la construcción de las rutas metabólicas. La investigación de las relaciones filogenéticas es decir de parentesco entre especies son a base de la clasificación de los microorganismos.

Los microorganismos son clasificados en dos grandes grupos en base al metabolismo de carbono: desde la autotrofia (que utilizan fuentes inorgánicas de C) hasta la heterotrofia total (que emplean sólo fuentes orgánicas de C). Los primeros pueden ser subdivididos en grupos más o menos especializados. Los quimiolitotótrofos obligados son bacterias que fijan el CO_2 por el ciclo de Calvin-Benson. Luego, están los facultativos que crecen en presencia de CO_2 teniendo otro compuesto inorgánico como fuente de energía (ej. compuestos de azufre reducidos). También hay los que crecen en una fuente orgánica de C mientras utiliza los compuestos inorgánicos como fuente de electrones. La nitrificación, la desnitrificación y la oxidación de azufre (HS^- , S^0) son ejemplos de procesos que ocurren mediante quimiolitotrofia. Algunos microorganismos quimiolitotótrofos son capaces de desarrollarse en fuentes orgánicas o inorgánicas de carbono (mixotrofia).

En un ciclo biogeoquímico los procesos permiten transferir materia y energía entre la litosfera y los seres vivos, y también al reverso. Posee etapas bióticas y abióticas en las cuales el elemento se transforma de una especie química a otra, mientras se desplaza en el ecosistema. Una parcela importante de las reacciones es de tipo oxidación-reducción. Los microorganismos son agentes importantes en los ciclos porque son responsables por el proceso de regeneración de distintas formas del elemento y luego, de su disponibilidad para posterior incorporación por la biomasa. Por ejemplo, el azufre del H_2S puede ser oxidado o reducido por distintos microorganismos autótrofos (foto o quimiolitótrofos) (Madigan et al. 2004).

Desde un punto de vista de proceso los sistemas de biofiltración se constituyen de circuitos semi-cerrados que dificulta cerrar los balances de materia y como consecuencia seguir las transformaciones biológicas es complicado. Esto ha dificultado la comprensión de muchos fenómenos bióticos y abióticos. La complejidad en seguir el ciclo del nitrógeno y las especies nitrogenadas es un problema reportado también en el área de tratamiento de aguas residuales. En algunos estudios con bioreactores experimentales de eliminación de N-NH_3 los balances de materia no se cumplieron o, no se pudieron comprobar el origen de las discrepancias entre medidas tomadas de las distintas especies del nitrógeno. Armeen, y colaboradores reportaron la importancia de seguir las concentraciones del nitrito y del nitrato, producidos, y su utilidad para evaluar el rendimiento de los biofiltros (Armeen et al. 2008)

2.4. Ecología de la biofiltración

Debido a sus características, un biofiltro percolador multiespecie puede ser considerado un modelo de ecosistema microbiano artificial y las características que lo determinan son tres: 1-) la organización de la comunidad, que establecen relaciones ecológicas complejas de competencia, sinergismo, colaboración, depredación; 2-) la formación de un ambiente propio: biopelícula en el lecho empacado en donde la comunidad interacciona con los parámetros ambientales y, 3-) la monitorización de los parámetros ambientales: control del proceso (Cabrol & Malhautier 2011).

El mecanismo básico de la biofiltración y algunos de los aspectos relevantes de la ecología del sistema se pueden apreciar en la figura 2.2. En el recuadro mayor se ilustra el recorrido de la fase gas, es decir el flujo del aire (contaminado → limpio); y de la fase líquida (agua + nutrientes + OD) que los distribuye por percolación (incluso el contaminante disuelto). También se representa la biopelícula, con las distintas capas (adherida al soporte y en dispersión), y la diversidad de la comunidad. En el recuadro de arriba, a la derecha, se resumen los 3 procesos mediante los cuales se puede eliminar los gases H_2S y NH_3 (aerobio o anóxico), y en el dibujo de abajo, también a la derecha, se ejemplifica algunos de los nichos ecológicos, el flujo de materia (flechas), y algunas de las relaciones ecológicas que se establecen en el bioreactor.

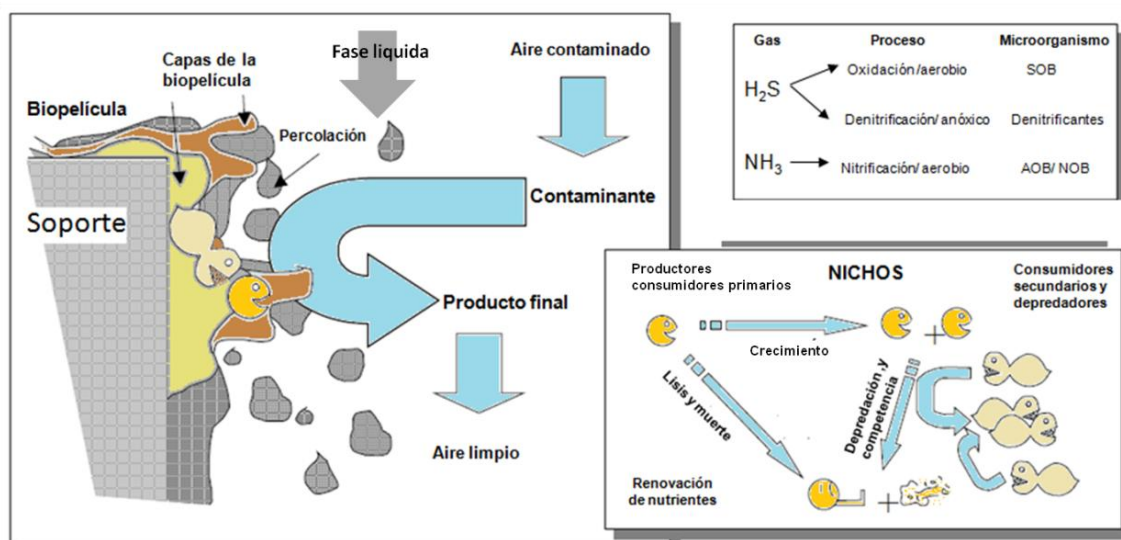


Figura 2.2. Mecanismo básico de la biofiltración: Ecología del sistema (adaptada de Cox & Deshusses 2001)

Teniendo en cuenta las bases conceptuales de la ecología, los componentes de proceso son los parámetros abióticos y se refieren al flujo de materia y energía a través del ecosistema. La materia se compone básicamente de carbono, oxígeno, nitrógeno y fósforo, además del agua, y micro elementos. Al igual que sucede en ecosistemas naturales, en un ecosistema artificial ambos flujos se dirigen de los productores que fijan el carbono (comunidad autotrófica), hacia los consumidores (heterótrofos), y microorganismos que se encargan de descomponer la materia compleja, permitiendo el reciclaje de nutrientes. En ecosistemas microbianos, ambos flujos dependen estrictamente del metabolismo de los microorganismos que son los verdaderos agentes de las transformaciones (McNevin & Barford 2000; Cabrol & Malhautier 2011). En sistemas de tratamiento de residuos, se aprovecha del potencial metabólico de los microorganismos para llevar a cabo la actividad de interés, es decir la degradación de contaminantes (Deshusses 1997).

2.4.1. Componente de proceso

Los biofiltros percoladores son ecosistemas saturados de humedad que necesitan de una fuente de nutrientes. Para ello, se utilizan medios de cultivo que pueden ser de tipo selectivo o de enriquecimiento, pero ambos cumplen el doble objetivo de sostener la comunidad y seleccionar poblaciones adecuadas. Con respecto a la dirección del flujo de gas, se puede alimentar en flujo ascendente o descendente. En el sistema que opera en flujo co-corriente o paralelo, las fases líquidas y gas van en la misma dirección (descendente), mientras en contracorriente opera con flujos en direcciones opuestas de líquido (descendente) y gas (ascendente).

De entre los elementos de proceso algunos son muy importantes ya que promocionan la actividad microbiológica. El papel de factores como temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, y de aceptores finales de electrones se han investigado a fondo. La mayoría de los biofiltros opera a condiciones mesófilas de temperatura tanto por la mejor performance en transferencia del gas tanto por el perfil fisiológico de las poblaciones de interés. En respecto al pH se puede decir lo mismo, sin embargo el empleo de especies extremófilas tipo termófilas o acidófilas ha sido investigado por su potencial para uso en el sector industrial.

Conceptualmente, un biofiltro es similar a otros sistemas de cultivo complejos, como los microcosmos. La diferencia está en que se puede operar a cualquier escala. De hecho, un biofiltro a escala laboratorio es un sistema particularmente robusto, y sus

características lo hace atractivo al área de la ecología de la biodegradación. Además, el fácil acceso a los microambientes que se forman en el soporte lo indican como herramienta de estudio a escala microscópica. En esta tesis, se optó por tratar solamente de caracterizar a la ecología de los biofiltros de tipo percolador (BTF) con cultivos mixtos pues son los que se reproducen posteriormente en reactores industriales.

Desde su implementación hace más de 50 años, se ha emprendido un enorme esfuerzo para entender el componente de proceso, lo que favoreció el establecimiento de la técnica. A lo largo del tiempo se investigaron diferentes estrategias de desulfuración y enriquecimiento de biogás en sistemas anóxicos (Kleerebezem & Mendez 2002; Soreanu, Béland, et al. 2008; Soreanu, Falletta et al. 2008; Soreanu et al. 2009; Fernández et al. 2014; Silva et al. 2014) y aerobios a escala laboratorio (Ramírez-Sáenz et al. 2009; Charnnok et al. 2012; Montebello et al. 2013; Montebello et al. 2014; López et al. 2015) y piloto-industrial (Rodríguez et al. 2013). Se probaron y caracterizaron distintos modelos de reactores y de materiales de soporte (Cohen 2001; Malhautier et al. 2003; Khammar et al 2005; Andres et al. 2009; Hort et al. 2009; Ramírez et al. 2009; Cabrol et al. 2010; Anet et al. 2013; Montebello et al. 2013). Se estudiaron el efecto de perturbaciones normales en la operación real, sobre la eficacia de eliminación (McNevin & Barford 2000; Burgess et al. 2001; Cohen 2001; Delhoménie & Heitz 2005; Syed et al. 2006; Cabrol & Malhautier 2011; Nanda et al. 2012; Padhi & Gokhale 2014). La eficacia de eliminación fue relacionada con la velocidad de renovación de líquido, tiempo de residencia del gas y del líquido (Fernández et al. 2014; Montebello et al. 2014; López et al. 2015) y concentración de OD (Munz et al. 2008; Roosta et al. 2011; Bassin et al. 2012; Estrada et al. 2012; Rodríguez et al. 2013). Se ha comprobado el efecto negativo del shock de cargas (Chung et al. 2005; Deng et al. 2009; Cabrol et al. 2012; Yang et al. 2014).

Los parámetros de operación relevantes en el ámbito de la tesis fueron el pH, la tasa de renovación de líquido, dirección del flujo de gas y concentración de entrada del contaminante. Se monitorizaron la carga aplicada del contaminante y la capacidad de eliminación (EC).para inferir al respecto del rendimiento del proceso de eliminación.

2.4.2. Componente biológico

Dentro del biofiltro habita una variedad de organismos que comprenden desde virus, bacterias, hongos, hasta protistas e invertebrados (Cox & Deshusses 1998). Lo común

es que la microbiota se organice en biopelículas que crecen sobre el material de relleno. La biomasa es un factor crítico en la biofiltración de gas. La distribución desigual y el exceso de acumulación dentro biofiltros de gas a menudo resultan en problemas operativos tales como obstrucción, pérdida de carga, y formación de canales preferenciales que conduce a una pérdida en el rendimiento (Delhoménie & Heitz 2005; Yang et al. 2010).

Debido a su importancia para esta tesis, el tema central del componente biológico es el dominio Bacteria. La biopelícula pueden ser de dos tipos: uní específica o en consorcio, que, tal como el nombre indica, está formada por una o más especies. La inoculación del sistema se puede hacer desde un cultivo puro, o de consorcios; aislados o naturales. La elección del inóculo depende básicamente del objetivo y de la tecnología, o mejor dicho, de la composición del gas a tratar y de las características de la planta de tratamiento. En la práctica se ha establecido como regla general la inoculación con lodo tomados de sistemas de tratamiento de aguas (de la recirculación externa, principalmente), o de medios de enriquecimiento de muestras de suelo, ya que proporcionan gran diversidad de microorganismos involucrados en el ciclo de diversos elementos, como S y N. La estrategia de inoculación con lodos reduce el tiempo de puesta en marcha y de aclimatación de la biomasa (Cox & Deshusses 2001; Sonil Nanda 2012).

El papel ecológico de una población se define por su fisiología, y su conocimiento permite optimizar los procesos. En biofiltros para tratamiento de corrientes gaseosas contaminadas, lo que se potencia es la actividad autotrófica de microorganismos que son naturalmente capaces de utilizar el contaminante como fuente de energía a su crecimiento (quimiolitautotrófia). Los compuestos reducidos de azufre y el amoníaco son ejemplos de contaminantes que se pueden tratar de forma efectiva según este principio ecológico. Las bacterias oxidantes de azufre (SOB, por sus siglas en inglés: *sulfur-oxidizing bacteria*) y del amonio (AOB, por sus siglas en inglés: *ammonium-oxidizing bacteria*) forman un grupo de particular interés biotecnológico por su capacidad de utilizar, de manera selectiva, las distintas especies del azufre y del nitrógeno.

Como en cualquier otro ecosistema microbiano, el crecimiento celular lleva al surgimiento de las poblaciones (donde cada genotipo define una población). Luego, las poblaciones metabólicamente relacionadas constituyen asociaciones (o gremios), mientras que los conjuntos de agrupaciones, que interaccionan, forman las comunidades. Lo peculiar de los biofiltros es que cada sistema tiene una composición

distinta, pero determinadas especies asumen papeles similares en la dinámica de cada ecosistema. El ecosistema engloba la comunidad, la matriz de exopolisacárido (EPS), y con ella, toda la gama de interacciones con el ambiente.

En la última década se utilizaron distintos montajes para estudiar a los dos componentes (Khammar et al. 2005; Yu et al. 2007; Andres et al. 2009; Cheng et al. 2010; Maestre et al. 2010; Lebrero et al. 2011; Li et al. 2011; Omri et al. 2011; Ramírez et al. 2011; Barcón et al. 2012; Cabrol et al. 2012; Li et al. 2012; Kennes & Veiga 2013; Montebello et al. 2013; Jaber et al. 2014; Zhang et al. 2014). Estas plantas fueron particularmente interesantes justamente por su alto nivel de control e independencia del medio exterior. En cualquier caso, los estudios han ayudado a aclarar aparentes discrepancias en el comportamiento del sistema que no se lograron entender teniendo en cuenta solo los componentes de proceso.

Algo interesante al respecto de la distribución espacial de la comunidad microbiana en biopelículas de biofiltros es que, a pesar de los mecanismos de dispersión y renovación (vía fase líquida) que podrían contribuir a la homogeneidad dentro de la columna, lo que suele ocurrir es la formación de microbiomas. Es frecuente, por ejemplo, encontrar regiones aerobias en la capa más externa de la biopelícula, y sitios anóxicos en su interior; lo que fuerza la distribución heterogénea de la diversidad. Algunos biofiltros producen una estratificación bien marcada en función del perfil de gradientes debido a su tamaño. Puede que su aspecto sea similar a escala macroscópica, pero a escala microbiológica pueden ser muy distintos. Así que para entender la ecología hay que considerar los factores ambientales y biológicos a micro-escala. A escala laboratorio se ha estudiado la eficiencia de distintos microorganismos en la eliminación de compuestos reducidos de azufre; destacando *Thiobacillus* y *Acidithiobacillus* (Chung et al. 1996; Sercu et al. 2006; Aroca et al. 2007; Ramírez et al. 2011), y nitrogenados, por bacterias amonio y nitrito oxidantes (AOB y NOB), principalmente *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrobacter* y *Comamonas* (Juhler et al. 2009; Ottosen et al. 2011).

A lo largo de los años se ha probado la eliminación de un amplio rango de contaminantes gaseosos por consorcios indefinidos. Pero, si por un lado se contempla el gran avance al que se refiere a la modelización de plantas y su mejoría, por el otro, poco fue establecida su microbiología, y menos aun, la ecología. Los principales estudios que se llevaron a cabo tenían un abordaje direccionado a la observación de cambios poblacionales ocurridos en el tiempo, y en el espacio mediante técnicas de biología molecular clásicas como el *fingerprinting* y el FISH. A día de hoy sólo unos

pocos estudios se llevaron a cabo en bases bio-ómicas (basados en la secuenciación masiva y expresión de genes), convirtiéndose en todo un campo de estudios a ser desarrollado.

Con respecto a la composición de la comunidad microbiana involucrada en biofiltración, el denominador común ha sido encontrar un fuerte predominio del filo Proteobacteria, que en general representa más del 80% de la abundancia total. Dentro de este filo el listado de poblaciones residentes en biofiltros se ha incrementado en función de la mejora de los métodos de clasificación y ampliación de las bases de datos. Al nivel de las poblaciones se han reportado una sorprendente diversidad de bacterias que se desarrollan en biofiltros inoculados con lodo de depuradora. En general se encontraron mezclas de poblaciones autótrofas especialistas, heterótrofas, nitrificantes (ej. *Nitrosomonas*), desnitrificantes (ej. *Rhodanobacter*) sulfooxidantes (*Thiobacillus* y *Acidithiobacillus*) con otras más generalistas como es *Xanthomonas* y *Dokdonella* (Friedrich et al. 2002; Cheng et al. 2010; Omri et al. 2011; Ralebitso-Senior et al. 2012; Bezerra).

2.4.3. Integración de los componentes biológicos y de proceso

Un BTF es un sistema en 4 fases: gas, líquida, sólida; y biopelícula en donde se intenta mimetizar un ambiente natural, saturado de humedad. El ciclo de la materia y la energía sigue la tendencia natural, determinada por los gradientes, tanto para la distribución de nutrientes y metabolitos, incluyéndose al contaminante y, cuando necesario al O₂. La influencia de los parámetros físico-químicos en la profundidad del lecho es comparable al que ocurre en sitios saturados de humedad; como un charco, o el sedimento de un lago. Esto es, porque se presenta estratificada, es decir, que se forman estratos, tanto verticales como horizontales. La estratificación también es resultado de la escala, o sea que depende del tamaño del biofiltro, lo que puede variar de milímetros o centímetros. En un biofiltro de laboratorio se puede observar el lecho, y a simple vista, no se encuentran diferencias muy marcadas en el aspecto macroscópico. Pero tanto los horizontes, cuanto las capas, se enmarcan en virtud de la distribución de los gradientes y de la acumulación de biomasa.

La estrategia de dividir la columna en capas fue utilizada para evaluar temas como resistencia a shock de carga (Cabrol et al. 2012), modelización de parámetros (Mora et al. 2014), y estudio de comunidad (Maestre et al. 2010). En un esquema elaborado por

Almengló (2014) se aprecia la importancia de la división de la biopelícula en capas horizontales y verticales en la elaboración de modelos matemáticos de simulación (fig. 2.3.). En el caso, se intentó simular un modelo para la actividad de biodegradación, pero como no se conocía la composición del consorcio microbiano, se asumió que la comunidad se constituyó exclusivamente de bacterias de perfil quimiolitotrófica.

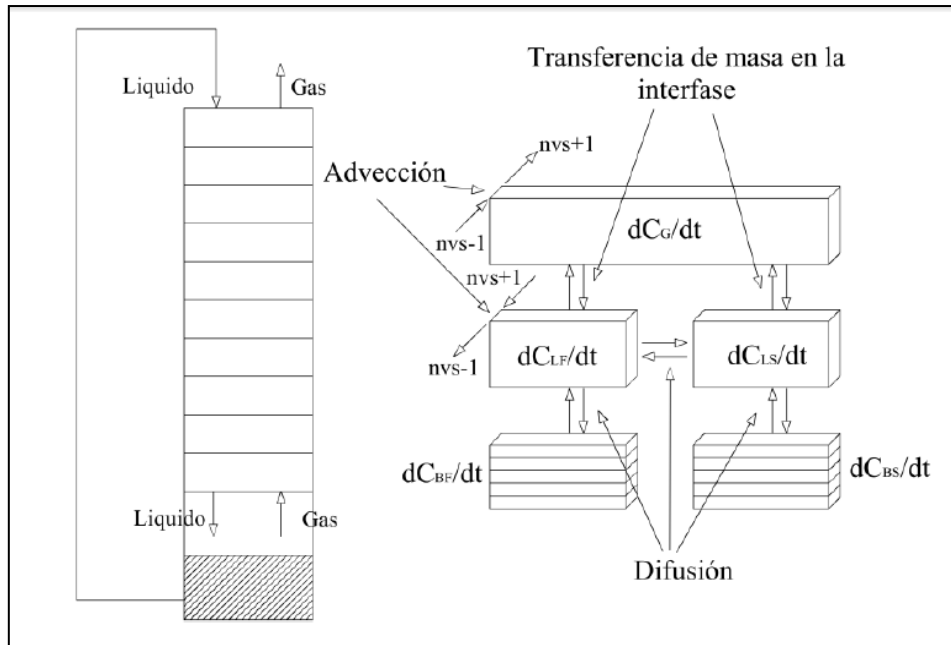


Figura 2.3. Esquema de discretización del BTF-H₂S ANOX para modelización de la actividad biológica en las capas de la biopelícula (reproducido de Almengló, 2014).

Sin embargo, hace falta conocer la capacidad de degradación del sistema para poder delimitar los horizontes de manera adecuada, representada por el perfil de degradación a lo largo columna. En el caso de un biofiltro aerobio de flujo ascendente, por ejemplo, se ha visto que la transferencia de materia depende de la carga, y que se forman gradientes en la extensión de la columna (Rodríguez et al. 2013). Tanto el OD cuanto el contaminante forman gradientes y la microbiota responde a los cambios ambientales (Cabrol & Malhautier 2011; Cabrol et al. 2009).

Experimentalmente se describen por lo menos dos regiones extremas, la entrada y salida de gas. El empleo de más capas permite estudiar los perfiles de distribución de los elementos. En la figura 2.4. se presenta un esquema elaborado en base informaciones de distribución de gas, de nutrientes y del oxígeno (Li & Moe 2004; Steele et al. 2005; Ivnitsky et al. 2007; Ding et al. 2008; Cabrol et al. 2010; Jiang & Tay

2010; Charnnok et al. 2013). El esquema representa un sistema percolador con 3 divisiones. A la izquierda se ilustra la delimitación teórica de los horizontes (líneas que delimitan capas) y las tres macro regiones que se forman en función de los horizontes. El horizonte 1 está situado donde empieza la entrada del líquido; dando inicio a la región rica en nutrientes y en OD. En esta región está localizada la salida del aire tratado, y es allí donde se ha observado el efecto de la renovación de la fase líquida mediante recirculación en contracorriente. Se ha reportado la presencia de bacterias extremófilas y heterótrofas en esta región (Friedrich et al. 2003). Es en este tercio donde se concentra la actividad de reciclado de materia orgánica proveniente del propio reactor (C de origen orgánico; O₂ biológico, N y S).

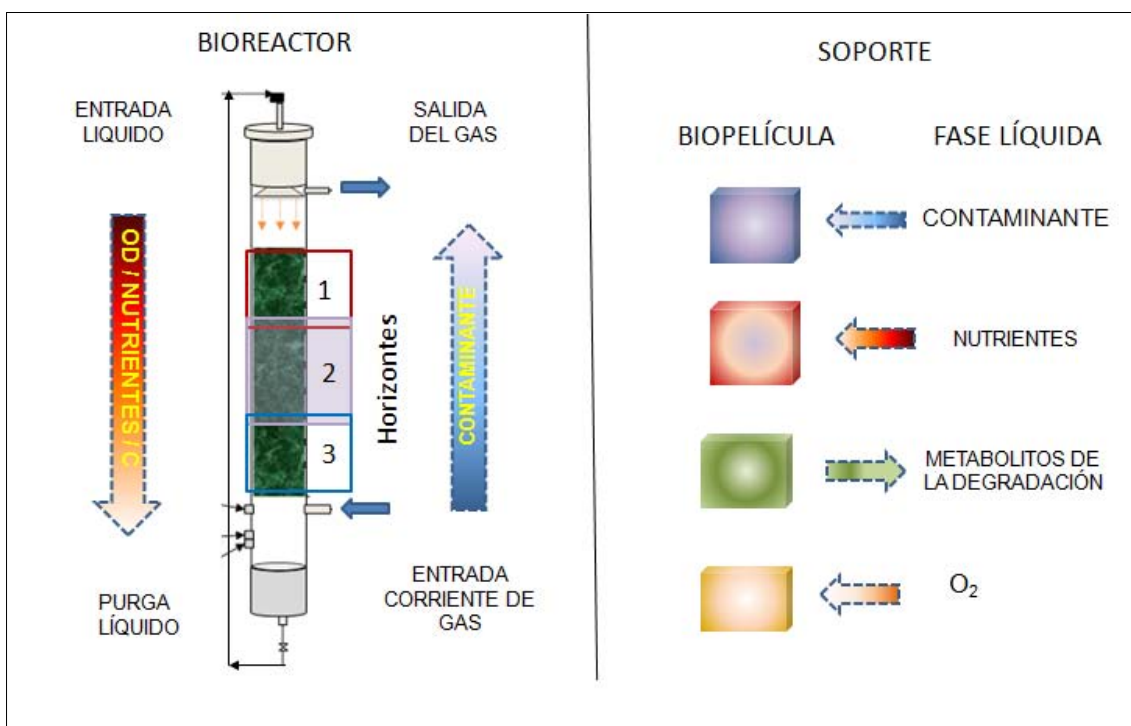


Figura 2.4. Distribución de gradientes en biofiltros percoladores de flujo ascendente y con disolución previa de oxígeno en la fase líquida, A izquierda gradientes a lo largo de la columna y a la derecha en los soportes

Los horizontes 2 y 3 delimitan la porción intermedia, que es la más estable, donde se encuentran gradientes más homogéneos. Los aceptores de electrones y el contaminante están disponibles, pero en concentraciones que limitan el crecimiento microbiano. En esta capa se ha encontrado una mayor diversidad de especies, en virtud del efecto de bordas, es decir, que poblaciones que en otras capas sufren la competencia se mezclan en la porción intermedia (Ding et al. 2008; Ralebitso-Senior et

al. 2012). Este fenómeno es muy interesante para la ecología porque promueve el intercambio genético y favorece el mantenimiento del potencial metabólico dentro de la comunidad del biofiltro, a medida en que distribuyen genes relacionados a tareas clave para la degradación, lo que refuerza la memoria metabólica. La importancia práctica es que la mezcla de poblaciones fortalece la capacidad de respuesta en episodios de perturbación, y ayuda a que el sistema sea capaz de recuperarse tras un episodio de estrés (Lenk 2006; Konopka 2009; Cabrol & Malhautier 2011). En la región inferior, de entrada del gas, ocurre gran parte de la transferencia, y el contaminante se disuelve en la fase líquida, para luego ser absorbido por la biopelícula, y ser degradado. La región de entrada del gas es interesante debido a la alta concentración de sustratos y la limitación en aceptores finales de electrones. Curiosamente, las condiciones son extremas, cosa que debería favorecer el desarrollo de especies autótrofas (quimiolitoautótrofos) especialistas. El horizonte 4 enmarca el límite entre el lecho y el depósito de purga. Debido a los flujos en contracorriente, los gradientes de metabolitos intermediarios son elevados en esta región, en cuanto que la concentración de nutrientes del medio de cultivo es baja. Así, al hacerse recircular parte del líquido se promueve una redistribución de subproductos y del resto del contaminante entre las demás regiones, incrementando la degradación. La capacidad de eliminación del reactor se examina mediante un balance de materia que envuelve a las concentraciones de sustratos y productos en líquido de entrada y salida, y del gas de entrada y salida.

En la parte derecha de la figura .2.4 se ilustran los gradientes a escala microbiológica, en un soporte inerte. Lo curioso es que, al adentrarse en la biopelícula, los gradientes atienden a un perfil distinto del descrito para la longitud del reactor. Si se toma como sitio de la actividad la biopelícula adherida al soporte, se obtiene una distribución radial en tres dimensiones. En distintas biopelículas se ha visto que los nutrientes, el contaminante disuelto y el OD tienden a concentrarse en la periferia de la biopelícula, mientras los metabolitos se distribuyen en flujo inverso (Jang et al. 2003; Terada et al. 2003; Gieseke et al. 2005; Lee et al. 2008; Ni et al. 2012). En sistemas verticales hay que agregar el efecto de advección en la fase líquida, es decir, del arrastre de contaminante y demás componentes hacia la parte inferior que se produce por la acción de la fuerza de la gravedad, que genera una corriente percoladora. De hecho, se ha visto que la dispersión de la fase líquida, y luego de los gradientes (alimento y residuos metabólicos) en biofiltros verticales sigue una dinámica de fluidos muy compleja en donde factores como acumulación de biomasa interfiere junto a la distribución del líquido (Yang et al. 2010). El resultado a escala micro, es que se

forman micro-hábitats, que permiten el desarrollo de poblaciones más o menos especialistas. Esta distribución puede interesar a la ecología del proceso, pues permite explicar mejor la cinética de la degradación. Las informaciones de diversidad se pueden obtener por FISH en esta escala, y la lectura de los parámetros abióticos se puede hacer *in situ* mediante microsensores. La heterogeneidad del componente abiótico se diluye a medida en que se cambia de escala, es decir que el efecto se mezcla y minimiza las diferencias a macro-escala, y la composición de la comunidad se puede abordar en cada caso (Lydmark et al. 2006).

Finalmente, de lo que se revisó en la literatura para biofiltros percoladores; se encontró que la competencia entre las especies menos comunes (con abundancia entre el 1 y el 2%) contribuye para equilibrar la comunidad, funcionando como un mecanismo de autocontrol de la fracción no especialista. Igualmente, se pudo averiguar que especies antes no reportadas mediante técnicas clásicas de biología molecular, fueron encontradas y, que representaron un potencial fisiológico auxiliar, que se podría explorar en la actividad de la degradación. Este fenómeno fue relacionado a lo que en ecología se denomina redundancia de la función principal. Este hecho resultó altamente interesante ya que representó el potencial de reacción y supervivencia del sistema frente a perturbaciones extremas, que tienden a eliminar a las poblaciones prevalentes (Cabrol & Malhautier 2011; Montebello et al. 2013).

Debido a que los biofiltros son ingenierizados, es decir que, en lo general, son ingenieros los que hacen el diseño y el manejo, la parte de los parámetros físico-químicos es mucho más estudiada que su ecología. De hecho, la biología, o mejor dicho, la ecología ha sido considerada “la caja negra” del proceso.

2.5. Pirosecuenciación *tag-454*

La *tag-454* es una tecnología de síntesis, es decir, que emplea el principio de la polimerización del ADN, combinada con detección de fluorescencia. Durante la reacción de secuenciación se genera de modo controlado, en modo paralelo, las cadenas complementarias de miles de amplicones de ADN de cadena simples amplificados previamente en una PCR en emulsión (PCRe). Durante el proceso de síntesis, a cada ronda se añade un tipo diferente de nucleótido. La reacción tiene lugar en una placa óptica y mientras se extiende la cadena el nucleótido incorporado emite luz de la liberación de los pirofosfatos unidos a ellos. La fluorescencia se localiza y se

elabora un cromatograma para cada molécula que informa el orden de incorporación. De esta forma se obtiene las lecturas de secuencias.

2.6. *Tag-454*

El proceso de pirosecuenciación 454 Roche se describe en base a Margulies y *colaboradores* (2005).

El proceso ocurre en 3 etapas entre preparación de ADN y reacción de síntesis. En la primera etapa el ADN se extrae de la muestra de biomasa, por métodos convencionales, se cuantifica la concentración, con ayuda de espectrometría (ej. en Nanodrop) y se comprueba su calidad, teniendo el cuidado de eliminar posibles inhibidores de PCR, como ácido húmico y EPS. La calidad del ADN es un factor clave para el suceso y su control se hace en distintos pasos del proceso. A continuación se fragmenta el ADN (fragmentos de entre 300 y 600 pb) se desnaturaliza y se construyen los cebadores de ligación. Esto se hace en una PCR convencional en donde se incorporan tres elementos: identificadores de origen siendo un mismo *tag* para cada muestra, secuencias de adaptadores, biotinizados y, cebadores para amplificación selectiva de las secuencias. En muchos casos los cebadores son para regiones del gen 16S que pueden ser universales para dominio o filo. La elección depende del objetivo del estudio. El último procedimiento de la etapa 1 es el análisis de calidad, que se hace en gel seguido de titulación para preparación de protocolo de la PCR_e y para la reacción de secuenciación.

La segunda etapa es la PCR_e para formación de la biblioteca de amplicones (fig. 2.5). Esta PCR_e ocurre en una mezcla de agua y aceite que permite aislar las moléculas de modo que la amplificación ocurre en cada fragmento de ADN, por separado. Los fragmentos son previamente inmovilizados en una perla biotinizada y capturado en una burbuja de la solución de emulsión. Cada una de las burbujas es un microreactor que contiene un único fragmento de ADN y todos los reactivos necesarios para una PCR. Al final se obtiene la amplificación de cada molécula, individualmente, y sus clones permanecen inmovilizados en la perla donde se originaron.

La etapa 3 es la reacción de secuenciación (fig. 2.5C). Al final de la PCR_e se liberan las perlas, con sus respectivos clones, que luego se depositan en los pocillos de una placa de fibra óptica. En cada pocillo se depositan, además de una perla, las enzimas polimerasas para extensión de la molécula, y la luciferasa que cataliza una reacción

luminosa que permite al sistema identificar la extensión en la molécula molde. Básicamente, un pirofosfato (*PPi*) liberado durante la incorporación de un nucleótido (dNTP) es convertido en ATP. Esta reacción genera una señal luminosa (de la oxidación de luciferina en oxiluciferina) que permite identificar en que pocillo fueran adicionados los nucleótidos, así como permite cuantificarlos. El sistema contiene un dispositivo capaz de detectar y registrar la luz generada durante el proceso de síntesis de ADN. (Margulies et al. 2005).

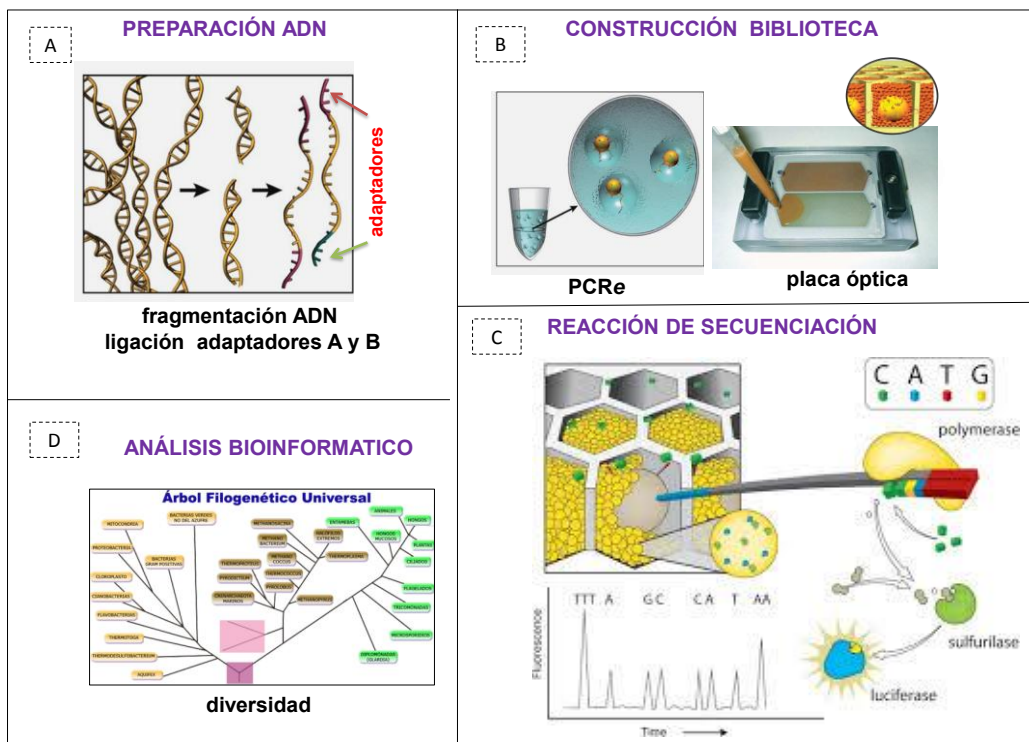


Figura 2.5. Proceso *tag-454*. Etapas de pirosecuenciación y análisis bioinformático.

Debido a la amplificación por PCR, la lectura de un fragmento de ADN es efectuada en millares de copias (clones), al mismo tiempo, lo que permite mejorar la adquisición de datos. Cada ronda de secuenciación genera un gráfico para cada fragmento y las lecturas de las secuencias obtenidas pasan por una etapa de análisis de calidad y de seguido, los datos brutos son tratados y contrastados con las bases de datos, en busca de su identidad, utilizando para ello herramientas de bioinformática. Al final se realiza la cuantificación por niveles taxonómicos y se hace el análisis estadístico de los datos. (Droege & Hill, 2008). Debido a la amplia cobertura de la secuenciación, es posible contabilizar las especies y utilizar valores de abundancia relativa para estudiar la diversidad de la muestra. Entretanto, este tipo de trabajo es un desafío porque las

bases de datos de secuencias cubren apenas una pequeña fracción de la diversidad real de las bacterias.

Hasta el presente, poco ha sido publicado sobre la aplicación de plataformas de alto rendimiento, como 454 de Roche, para estudios de diversidad de bacterias en biofiltros. Li y colaboradores (2011) utilizaron la región del 16S comprendida entre V4-V5 amplificadas con los cebadores 515F y 907R para estudiar la estructura y diversidad de la comunidad en dos BTFs para la eliminación de H₂S. Además de este trabajo, el grupo GENOCOV de la UAB concluyó el primer estudio de *metagenoma* y *metatranscriptoma* de un biofiltro percolador (Bezerra et al. 2013; Montebello et al. 2013).

Debido a dificultad en comparar la comunidad de distintos sistemas se han aplicado testes estadísticos no paramétricos que permiten hacer inferencias también cuando las bibliotecas tienen tamaño distinto. La diversidad (α) se reporta para muestras de un mismo ecosistema bajo condiciones ambientales distintas. Estos parámetros permiten establecer comparativas entre muestras tomadas de distintos puntos o fechas, sin conocer los detalles de los recuento de especies. El índice *Chao1* permite estimar el número de filótipos, definidos como unidades taxonómicas operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés: *operational taxonomic units*) encontradas en la comunidad, en función de la distancia filogenética o, dicho de otra manera, en los distintos niveles taxonómicos. Este índice se utiliza como parámetro de riqueza en ecología microbiana de comunidades naturales porque lleva en consideración a las OTUs que contribuyen con muy pocas secuencias (hasta el 1% de lecturas). De hecho pueden ser bastante útiles también en sistemas especializados como lo son los biofiltros. En estos sistemas la fracción de especies raras, puede albergar a grupos que podrían ser importantes en situaciones de estrés. Estas especies pueden contribuir con la redundancia funcional y reforzar la capacidad depuradora del biofiltro. En situaciones normales ayudan a mantener la estabilidad ecológica mediante las relaciones inter-específicas (entre microorganismos y micro fauna) que se establecen, como la cooperación, competencia o depredación.

El índice de *Shannon* (H') permite comparar muestras en base a riqueza. Conforme los valores de H' , las muestras se acercan más o menos en cuanto a distribución de especies. El índice H' se acerca a cero cuando hay fuerte predominio. Cuantas más especies fueron representadas por el mismo número de individuos mayor es H' . El valor máximo suele estar cerca de 5, pero en sistemas microbianos la riqueza puede superar con frecuencia este valor. El índice " E " asociado a *Shannon* indica la

uniformidad en la distribución de las especies en el medio ambiente. Un valor de “*E*” igual o cercano a 0 debe ser interpretado como heterogeneidad (no uniformidad), mientras que 1 indica que todas las especies estarían igualmente representadas (Magurran 1989).

Para no perder la confianza la pirosecuenciación 454 de Roche limita la longitud de los fragmentos de ADN de entre 600 a 800 pb dependiendo del alcance del modelo, que puede limitar la precisión a la hora de asignar identidad a las secuencias. Sin embargo los resultados obtenidos en diversas áreas han sido muy buenos, teniendo en cuenta la limitación de los bancos de datos de secuencias (Tamaki et al. 2011; Gobet et al. 2012; Ibarbalz et al. 2013).

La pirosecuenciación del gen 16S ARNr ha revolucionado los estudios en ecología microbiana. Si bien la selección del cebador y la longitud de lectura corta podrían afectar el rendimiento en relación a cantidad de lecturas recuperadas. De hecho la eliminación de secuencias en la verificación de calidad no afecta el análisis de diversidad debido al gran número de secuencias que se recupera en el proceso (Tamaki et al. 2011).

2.7. FISH: Principios fundamentales de la técnica

La técnica de FISH se basa en el principio de la complementariedad de los ácidos nucleicos. La señal fluorescente se emite cuando se excita el reportero (fluorocromo) al espectro de luz adecuado. Los análisis se hacen a partir de imágenes digitales obtenidas por sistemas de microscopía óptica como el de epifluorescencia o el confocal. La cuantificación de las células se lleva a cabo mediante herramientas bioinformáticas.

La hibridación se realiza normalmente con sondas que son oligonucleótidos de entre 15 y 20 bases de longitud que son complementares a zonas específicas del ARN o del ADN celular. Un protocolo tradicional de FISH tiene 4 etapas (ilustradas en la fig. 2.6). Se inicia con la aplicación de fijadores químicos adecuados para preservar la estructura de las células en la muestra y el tratamiento para mejorar la permeabilidad a la sonda. La siguiente etapa es la de hibridación, en la cual se produce el alineamiento y la unión de la sonda deseada en la secuencia diana, por el principio de la complementariedad. En la última etapa se hace un lavado cuidadoso para eliminar las sondas que no han hibridado y las sales residuales. La preparación de los porta-

objetos puede ser laboriosa y lenta, pero cuando está bien realizada es reproducible y bastante fiable (Amann et al. 2001).

Debido a su importancia para la microbiología ambiental se crearon bases de datos de ARNr como herramientas de apoyo que son útiles a la hora de elaborar una aplicación FISH. Es posible por ejemplo, realizar el diseño de una sonda, evaluarla y elaborar el protocolo básico para su implementación, en vía seca. Las aplicaciones son capaces de predecir los problemas que puedan ocurrir en la cobertura y también en la hibridación. Algunas herramientas se pueden utilizar en línea des de las páginas del Ribosomal Database Project (RDP) <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp> y del ProbeBase (<http://www.probeBase.net>).

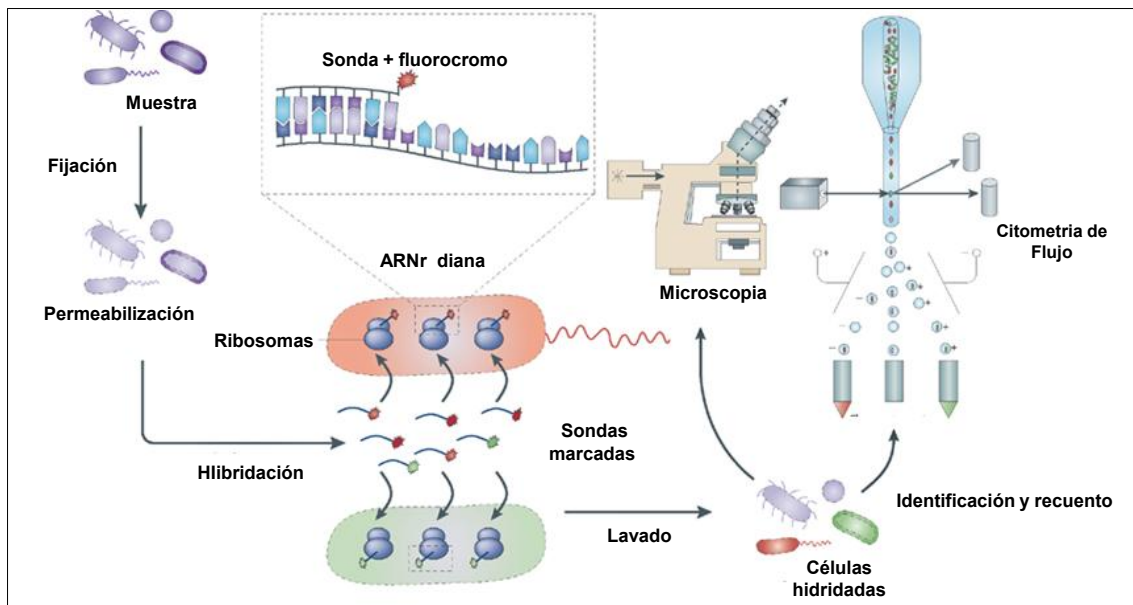


Figura 2.6. Esquema de la FISH adaptado de Amann & Fuch, (2008).

A lo largo del tiempo se desarrollaron distintos tipos de sondas y de marcadores fluorescentes pero los más empleados son de ADN mimético. En este caso, la hibridación da origen a una molécula híbrida (ADN-ARN) de doble cadena, bastante estable, que puede ser identificada por el marcador fluorescente. Además, el pequeño tamaño de los oligonucleótidos facilita el acceso al espacio intracelular, hecho que permite utilizar células enteras, vivas y, *in situ* (Amann & Fuch, 2008). La mayoría de las sondas disponibles comercialmente tienen entre 15 y 30 pares de bases de longitud y son diseñadas en base a tres principios: la especificidad, la sensibilidad y la capacidad de penetración en el espacio intracelular. Se dice que una sonda tiene

buena especificidad si sólo hibrida en un determinado grupo filogenético, es decir, funciona como una firma para el grupo diana. La sensibilidad es, en cierto modo, la garantía de que la sonda se hibrida en la diana. Con respecto a la capacidad de penetración de la sonda en el espacio intracelular este depende de las características de las células, directamente de la estructura de la pared celular (Moter & Göbel 2000).

Los marcadores más comunes son los fluorocromos que son incorporados en el extremo de la secuencia de la sonda. Este tipo de marcaje es, sin lugar a dudas, una vía directa, rápida, simple y económica de identificar poblaciones de células. El fluorocromo sólo debe emitir fluorescencia cuando es excitado en un determinado rango del espectro de luz y ésta es la característica que determina la confianza. Además, la hibridación debe ocurrir en el sitio correcto en la molécula diana (Moter & Göbel 2000).

En 30 años la FISH ha evolucionado desde ser una técnica de “tinción filogenética” (Amann 1995; Giovannoni 1988; DeLong 1989;) a ser una exitosa herramienta de biología molecular para identificación directa y cuantificación *in situ* de células individuales y/o genes. (Amann et al. 2001). Se hizo popular debido a la incorporación de avances obtenidos en microscopia y genómica, de modo que la precisión en los análisis se tornó su punto fuerte (Zwirgmaier 2005; Stoecker et al. 2010).

Su amplia difusión también se debe a sus protocolos flexibles y al hecho que se puede combinar con otras técnicas (Amann & Fuchs 2008). A día de hoy, la técnica se utiliza a menudo tanto para la investigación de la composición de las comunidades microbianas y de su dinámica como para la localización de células. También se ha aplicado en ecofisiología para la identificación *in situ* de actividad fisiológica característica de un tipo celular en particular, como por ejemplo la eliminación del NH_3 en plantas de tratamiento de aguas residuales (Daims, Nielsen, et al. 2001) También se buscó identificar una actividad fisiológica específica. Para medir los perfiles metabólicos se logró marcar los substratos, técnica conocida como MAR-FISH, (Kristiansen, Lindholm, et al. 2011).

En los últimos años, el esfuerzo de secuenciación de material genómico originario de muestras ambientales ha impulsado la ampliación de los bancos de datos de secuencias del ARN ribosomal y por supuesto del banco de datos de sondas de oligonucleótidos. De cara a la biorremediación, este avance se extendió especialmente en el área de tratamiento de aguas residuales donde han permitido avanzar en el conocimiento de la ecofisiología de la eliminación de compuestos industriales (van Kessel et al. 2010). En el campo de la biofiltración la falta de información de

biodiversidad inherente a este ecosistema es todavía uno de los pasos limitantes. En biofiltros, las sondas más utilizadas fueron aquellas dirigidas hacia los grupos de SOB, AOB y NOB. En general se emplearon sondas para los dominios Eubacteria y Archaea; y para los filos Actinobacteria y Proteobacteria, especialmente para las clases Alpha, Beta, Gamma y Épsilon.

A lo largo de los años la FISH se aplicó para confirmación de presencia microbiana (Daims & Wagner 2007; Amann & Fuchs 2008; Nielsen 2009; Wagner & Haider 2012), en análisis comparativos y en seguimiento de la microbiota bajo influencia de distintas condiciones medio ambientales y/o en el tiempo (Friedrich et al. 2003; K. L. Ho et al. 2008; Kristiansen, Pedersen, et al. 2011) . Pero, la precisión en muestras ambientales se mostrado depende del acceso a las células y de la representatividad de de las muestras (Wagner et al. 2003). En biopelículas el FISH se estableció como técnica rutinaria tanto para estudio de composición cuanto para observar la distribución espacial a lo largo de la extensión del tapete microbiano (Amann & Fuchs 2008). En sistemas de tratamiento de aguas residuales se ha aplicado para estudiar la heterogeneidad de la biopelícula, en bioreactores, y sus variaciones espacial y temporal, así como para estudiar la influencia de gradientes tanto físicos como químicos en la distribución de la diversidad (Nielsen et al. 2009).

La técnica FISH ha permitido la identificación de poblaciones diana con muy buena precisión, si se compara con técnicas de cultivo. Pese a ello, la evolución de la técnica ha estado marcada por la superación de problemas principalmente relacionados a errores de diseño experimental, a falta de permeabilidad de la célula a la sonda; a la hibridación inespecífica, baja cobertura, pérdida de señal o baja calidad de la imagen. En este sentido la optimización de alguno que otro punto del protocolo es una constante entre los especialistas que trabajan con FISH y el hecho de que sea flexible facilita el avance de la técnica. En esto como en otros trabajos fue necesario eliminar los principales problemas con que encontró durante la adaptación de los protocolos a las muestras.

CAPÍTULO 3

Objetivos

3. Objetivos

3.1. Objetivos Generales

El principal objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de la plataforma de pirosecuenciación 454-Roche para generar información de diversidad microbiana y al mismo tiempo evaluar su potencial uso para seguir la dinámica de la comunidad a lo largo de la operación. Al final, se buscó relacionar la estructura de las comunidades con las condiciones de operación de biofiltros percoladores. El otro objetivo fue el de actualizar los protocolos FISH por medio de la optimización de las consignas de trabajo en muestras enriquecidas con S⁰.

3.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de cada estudio se presentan en los capítulos de resultados pero en resumen se buscó:

- ✓ Organizar un protocolo para utilización de pirosecuenciación 454 de Roche a ser aplicado en muestras de BTFs;
- ✓ sistematizar el uso de herramientas de bioinformática para el análisis de lecturas de secuencias y de los datos ecológicos.
- ✓ Desarrollar perfiles de distribución espacial y temporal de poblaciones.
- ✓ Correlacionar la diversidad de la comunidad con las condiciones de operación
- ✓ Demostrar la capacidad de recuperación de la microbiota tras episodios de estrés.

CAPÍTULO 4

Materiales y Métodos Generales

4 Materiales y métodos

4.1 Biofiltros

En el presente estudio se utilizaron tres biofiltros percoladores experimentales. El primero fue un BTF a escala laboratorio que pasa a ser nombrado de BTF-H₂S AER ya que se trata de un sistema escala laboratorio que fue empleado para la eliminación de altas cargas de H₂S, disuelto en mezcla mimética de biogás, en condiciones aeróbicas. El segundo biofiltro fue un piloto a escala semi-industrial operado en condiciones anóxicas utilizado en desulfuración de biogás real (BTF-H₂S ANOX). El tercero biofiltro fue un sistema escala laboratorio proyectado para investigar la eliminación de NH₃.

En este capítulo se presentan los materiales y métodos generales que se aplicarán a los 3 sistemas de biofiltración; las configuraciones de cada sistema y parámetros de operación. Los detalles de los sistemas de medición y control y, los datos obtenidos de la operación de los BTF-H₂S fueron tratados por Montebello (2013) para AER y Almengló (2013) para el ANOX. Más detalles se pueden consultar en las publicaciones (ver tabla 4.1.). A continuación se presenta un breve resumen de los montajes experimentales, de las condiciones de operación y de los métodos de análisis aplicados a cada sistema.

4.2 Parámetros y variables

Los parámetros utilizados para el control de la planta fueron:

- Carga del contaminante: en $gX \cdot m^{-3} \cdot h^{-1}$ (**L**, por su sigla en inglés: *load*);
- Eficiencia de eliminación: calculado también como el porcentaje de remoción (**R**, por su sigla en inglés: *removal efficiency*) en respecto a fase gas y líquida, y, entrada y salida.

Que se calcularon como:

-Carga de alimentación de H₂S o NH₃/en forma de azufre o nitrógeno (L)

$$L(gX \cdot m^{-3} \cdot h^{-1}) = \frac{C_i (gX \cdot m^{-3})}{EBTR (h)}$$

Donde:

C_i : concentración de entrada de H_2S y NH_3 que se calculó a través de la expresión:

$$C_i(gX m^{-3}) = \frac{C_i(ml m^{-3}) PM(g mol^{-1}) V (m^3)P(atm) L}{0.082 (atm L mol^{-1} K^{-1})(273 + T)(K) 10^3 ml}$$

Donde:

PM: peso molecular del azufre o del nitrógeno

P: presión atmosférica (1 atm)

T: temperatura en °C

-Porcentual de eliminación (R.)

$$R = \frac{C_i - C_f}{C_i} 100$$

Donde C_i es la concentración de X que se midió a la entrada y C_f a la salida.

-Capacidad de eliminación (EC)

$$EC = L \frac{R}{100}$$

Además se utilizó la información de los tiempos de residencia del gas en el biofiltro (EBTR) y del líquido (HRT).

-Tiempo de residencia del gas en lecho vacío (EBTR) en segundos

$$EBTR(s) = \frac{V(L)}{Q(Ls^{-1})}$$

Donde:

V: volumen útil del biofiltro

Q: Caudal de gas

*X = equivale al contaminante N (nitrógeno) o S (azufre)

En la tabla 4.1 se detallan los parámetros y condiciones de operación, para cada biofiltro. También se describen los materiales básicos utilizados en la construcción de las plantas, material de soporte, particularidades de los bioreactores, las concentraciones tratadas de los contaminantes, caudales de referencia de gas y líquido, y composición de las fases gas y líquida.

Tabla 4. Características de los BTFs

	Parámetro	BTF-H ₂ S AER	BTF-H ₂ S ANOX	BTF- NH ₃ AER
Fase Gas	Gas tratado	H ₂ S (Carburos Metálicos, España)	H ₂ S (natural)	NH ₃ (Técnico, AXIOS-200 kg cm ⁻²)
	Composición del gas (mezcla)	gas sintético / aire de rede; H ₂ S ; N ₂ (Carburos Metálicos, España)	biogás producido en EDAR	biogas sintético/ NH ₃ ; aire de rede
	Concentraciones de entrada	2000 ppm _v de H ₂ S* (0-10000 ppm _v) (2.6 g S m ⁻³)	4593 ppm _v de H ₂ S (promedio) (3214 ppm _v -5788) (6.14 g S m ⁻³)	682 ppm _v de NH ₃ (promedio) (0, 1410 ppm _v) (6-59.1 g N m ⁻³)
	Caudal de entrada*	H ₂ S= 1.59 mL·min ⁻¹	H ₂ S = 1- 5.2 m ⁻³ h ⁻¹	NH ₃ = 5.64 mL min ⁻¹ *
Características de los reactores	Material de soporte	anillos pall de acero	espuma poliuretano	espuma poliuretano
	Tuberías y conexiones	polifluoruro de vinilideno (PVDF) y polietileno, caucho de silicona y, válvulas de plástico o PVDF		
	Material de las Columnas	PVC (reactor principal; aireación; mezcla y humidificación)	PVC reforzado en fibra de vidrio (reactor)	PVC (reactor)
	Longitud total	0.855 m	2.1 m	1.2 m
	Longitud del lecho empacado	0.53 m	0.85 m	0.5 m
	Diámetro interno	0.071 m	0.5 m	0.089 m
	Volumen utilizado	2.4 L	167 L	3.1 L
Condiciones de operación	Régimen de recirculación (caudal)	contracorriente (3 m ⁻³ h ⁻¹)	contra corriente y paralelo (3 m ⁻³ h ⁻¹)*	contracorriente (3 m ⁻³ h ⁻¹)
	Temperatura	ambiente/ (25-30 °C)	ambiente (15-33 °C)	ambiente/ aclimatada a 25 °C
	pH	2.5- 7.5 *(controlé automatizado)	7.4 * (controlé automatizado)	7.1* (controlé automatizado)
	L*	51.5 g S m ⁻³ h ⁻¹ *	6.14 g S ² m ⁻³ (promedio)	62.26 g N/m ⁻³ h ⁻¹ *
	TLV*	3.6 m h ⁻¹ *	0.01-10 m h ⁻¹	8 m h ⁻¹
	HRT *	31 ± 1 h*	7.6 h*	9*-10 h
	EBTR*	130 s	180*	46 s *

Tabla 4.1. Características de los BTFs (continuación)

Parámetro	BTF-H ₂ S AER	BTF-H ₂ S ANOX	BTF-NH ₃ AER	
Fase líquida	Alimento Medio mineral (g L ⁻¹): NH ₄ Cl, 1; KH ₂ PO ₄ , 0.12; K ₂ HPO ₄ , 0.15; CaCl ₂ , 0.02; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.2. 1 ml L ⁻¹ de solución de elementos traza: 1 mL preparada como en Pfenning et al. (1981).	S1: Solución de nitrato. (g L ⁻¹) NaNO ₃ , 500; KH ₂ PO ₄ , 10; NH ₄ Cl, 5; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 4; además de 10 mL L ⁻¹ de la solución de FeSO ₄ ·7H ₂ O 2 de H ₂ SO ₄ 0.1N; y 5 mL L ⁻¹ de solución de elementos traza ATCC1255: SL4 (g L ⁻¹): EDTA, 0.5; FeSO ₄ ·7H ₂ O, 0.2; SL-6 (g L ⁻¹): ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0.10; MnCl ₂ ·4H ₂ O, 0.03; H ₃ BO ₃ , 0.3; CoCl ₂ ·6H ₂ O, 0.2; CuCl ₂ ·2H ₂ O, 0.01; NiCl ₂ ·6H ₂ O, 0.02; Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O, 0.03; H₂O_d . pH 3.4.	Medio mineral (g L ⁻¹): K ₂ HPO ₄ , 0.037; KH ₂ PO ₄ , 0.015; MgSO ₄ , 0.044; CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0.070; KCl, 0.019; 2.6 ml de la solución de elementos traza (g L ⁻¹): FeCl ₃ ·6H ₂ O, 1.5; KI, 0.18; H ₃ BO ₃ , 0.15; MnCl ₂ ·4H ₂ O, 0.12; CoCl ₂ ·6H ₂ O, 0.15; ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0.12; CuSO ₄ ·5H ₂ O, 0.03; NaMoO ₄ ·2H ₂ O, 0.06; EDTA·Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O, 10; H₂O_d .	
	Caudal de entrada	2.8 mL min ⁻¹	3 mL min ⁻¹	2 mL min ⁻¹
	HCl	1 M	0.5 M	0.5 M
	NaOH	1 M	0.5 M	0.5 M
	Fuente de carbono	NaHCO ₃ , 3 gC L ⁻¹	NaHCO ₃ , 3 gC L ⁻¹	NaHCO ₃ , 2.5 gC L ⁻¹
	Parámetros monitorizados	pH, ORP y OD	pH, ORP, OD y T	pH y T
Toma de muestra de biomasa / técnica microbiológico	días 245 y 586/ <i>tag-454</i> , FISH, SEM	días 343, 415,438/ <i>tag-454</i>	días 66,160 y 275/ <i>tag-454</i>	
Tiempo total de operación	990 días	438 días	275 días	
Trabajos publicados	Montebello <i>et al.</i> 2011, Montebello <i>et al.</i> 2012, Bezerra <i>et al.</i> 2013, Montebello <i>et al.</i> 2013, Montebello <i>et al.</i> 2014.	Almengló <i>et al.</i> 2011; Almengló <i>et al.</i> 2013a y 2013b	Enrique <i>et al.</i> 2015	

*valores de referencia

También se describe los valores de referencia de los parámetros más importantes: temperatura (T), pH, carga (L), velocidad de percolación del líquido (TLV- por sus siglas en inglés: *trickling liquid velocity*), tiempo de retención hidráulico (HRT- por sus siglas en inglés: *hydraulic residence time*) y tiempo de contacto del gas (EBTR- por sus siglas en inglés: *empty bed residence time*). Al final de la tabla se muestran los tiempos de operación y el día de toma de muestras de biomasa con un resumen de los métodos empleados en cada sistema. Más detalles se encuentran en los capítulos de resultados.

4.3 BTF-H₂S AER

4.3.1 Descripción de la planta

El biofiltro operó en modo continuo en régimen contra-corriente durante 990 días. En resumen, el reactor principal consistió en una columna de 0.07 m de diámetro interno y 0.53 m de longitud dividido en 3 secciones longitudinales de dimensiones equivalentes. Esta subdivisión fue diseñada con el propósito de facilitar el acceso a la biomasa, de modo independiente, en diferentes puntos del cuerpo del reactor y así minimizar daños por desplazamiento de biopelícula durante las tomas de muestras. El volumen de trabajo del reactor fue de 2.5 L y el lecho fue empacado, desordenadamente, con anillos pall de acero inoxidable de 1/2". Una imagen del set experimental, del material de soporte y un esquema detallado del montaje se aprecian en la figura 4.1.

La puesta en marcha fue ejecutada con inóculo de composición indefinida. Para ello se preparó una disolución 1:3 de lodo fresco de EDAR en medio mineral que se hizo recircular por 24h. El biofiltro operó continuamente en condiciones estacionarias a pH 6.5, durante 440 días, a temperatura de 25 °C. El día 440 se realizó el cambio gradual de pH hasta atingir 2.5. El sistema operó bajo condiciones ácidas hasta el final del período experimental (día 990). A modo resumen el sistema operó a un EBRT promedio de 130 s, un TRL de 51 ± 6 h, concentración de H₂S de 2,000 ppm_v a la entrada ($L = 55.6 \text{ g H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) y un VRL de 3.6 m h^{-1} . Conforme se puede apreciar en la fig.3-3 el BTF-H₂S AER cuenta con un sistema de control independiente y muy elaborado de todos los parámetros y por esta razón se mostró especialmente atractivo para estudio de ecología de biofiltros.

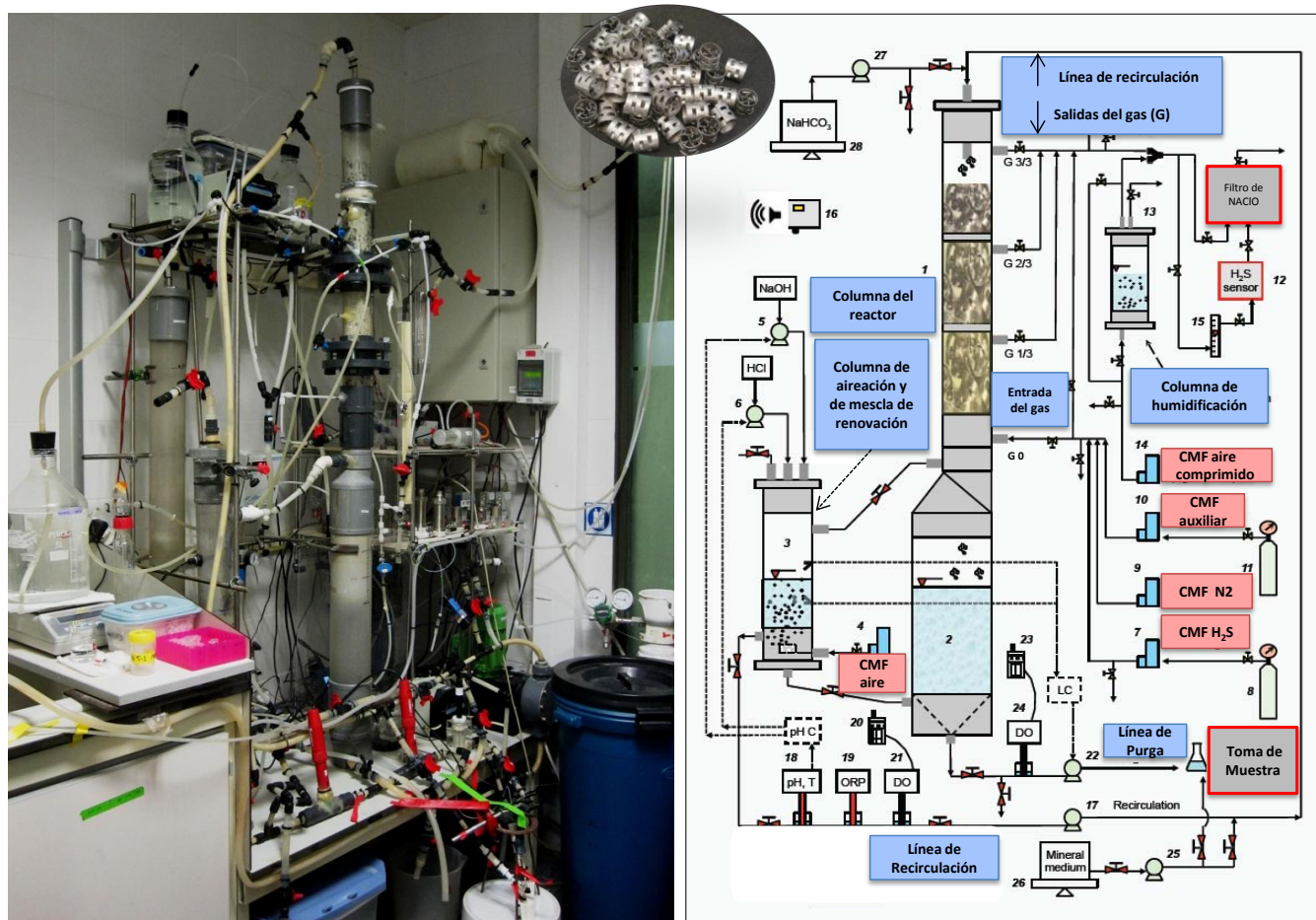


Figura 4.1. Descripción de la planta BTf-H₂S AER. Foto del montaje, detalle del material de relleno y esquema de la planta. En 1, reactor principal; 2, depósito de precipitados; 3, unidad aireación; 4 y 14, controladores másicos de flujo (CMF) de entrada de aire (4; salida); 5, bomba de suministro de base; 6, bomba de suministro de ácido; 7, CMF H₂S; 8, reservorio H₂S; 9, CMF N₂; 10, CMF auxiliar; 11, puntos de suministro de gas adicional; 12, sensor H₂S; 13, columna de humidificación del aire; 15, rotámetro; 16, alarma de seguridad para H₂S; 17, bomba para recirculación; 18, sistema de control de pH; 19, sonda ORP; 20; 21; 23 y 24, sistemas de medición de OD; 22, bomba de purga; 25, bomba de suministro de MM; 26, depósito de MM; 27, bomba de suministro de bicarbonato; 28, depósito de bicarbonato sódico. CI cromatografía iónica (adaptado de Montebello; 2013)

4.3.2 Características de las fases gas y líquida

La fase gas se formó con una mezcla de H₂S en N₂ (Carbueros Metálicos, España) y aire puro que se alimentó en sentido ascendente. La concentración de H₂S de referencia fue 2,000 ppm_v (ajustadas de acuerdo con los ensayos programados de entre 0-10,000 ppm_v en experimentos de carga). El aporte de gases se controló por medio de caudalímetros másicos de flujo (CMF- fig. 4.1.)

La fase líquida fue elaborada a partir de medio mineral, como alimento (MM), que se preparó de acuerdo con la composición descrita en la tabla 4.1.; ácido y base (para control de pH) y NaHCO₃ (como fuente de C, 3 g L⁻¹) que se añadían al reactor por la parte superior. La aeración de la fase líquida ocurrió en una columna auxiliar en donde se hacía burbujear aire a fin de incrementar la disponibilidad de O₂ en el líquido (fig. 4.1. columna de aireación). El pH se monitorizó en línea (sonda PH28, Crison Instruments, España) y la dinámica de recirculación se controlaron en modo automático. También se monitorizó la ORP (sonda Crison Instruments, España), y oxígeno disuelto en la fase líquida (OD) (sonda oxi340i, WTW, Alemania).

4.3.3 Métodos analíticos

Las concentraciones de H₂S fueron medidas a la entrada y a la salida de la columna principal utilizando un sensor electroquímico de H₂S (SureCell; EuroGas Management, Reino Unido). El seguimiento de los productos de la oxidación se realizó en la fase líquida en muestras diluidas 20x en agua ultra pura. Para ello se utilizó un equipo ICS-2000 equipada con una columna IonPac AS9-HC (Dionex Corporation-Thermo Scientific, EE.UU.) de 250 mm. Las condiciones de análisis fueron: T de la columna, 30 °C; eluyente, KOH (gradiente: 18-50 mM de 0-10 min; 50-18 mM de 10-15 min), volumen de inyección de 0.25 µL y tiempo de análisis de 25 min. El azufre elemental en la biopelícula fue cuantificado durante el análisis elemental con rayos X de los sólidos: (EDS-EDX, por sus siglas en inglés: *energy dispersive X-ray spectroscopy*) en microscopio electrónico de barrido.

4.3.4 Recogida de biomasa

Las muestras de biomasa se tomaron a los días 245 (período neutro) y 586 (período ácido) de operación y fueron recogidas a tres alturas de la longitud del reactor (fig. 4.1); en la región superior (45- 50 cm); en la zona intermedia del reactor (30- 35 cm) y

en la región inferior (5-10 cm). Las muestras de biopelícula de cada región se tomaron de los anillos y de la pared. La biomasa se desplazó del soporte mediante agitación mecánica después de añadir tampón fosfato (PBS, 30 M). A continuación fueron tomadas sub-muestras, que fueron centrifugadas a 8,000 g. El exceso de líquido fue descartado y cada alícuota de material se trató según los protocolos de FISH, *tag*-454 y SEM. Además se preservaron a -20°C hasta el momento de proceder al protocolo de extracción de ADN para pirosecuenciación. El procedimiento de toma de muestra y el protocolo para preparación de la biomasa se ilustra en la fig. 4.2.

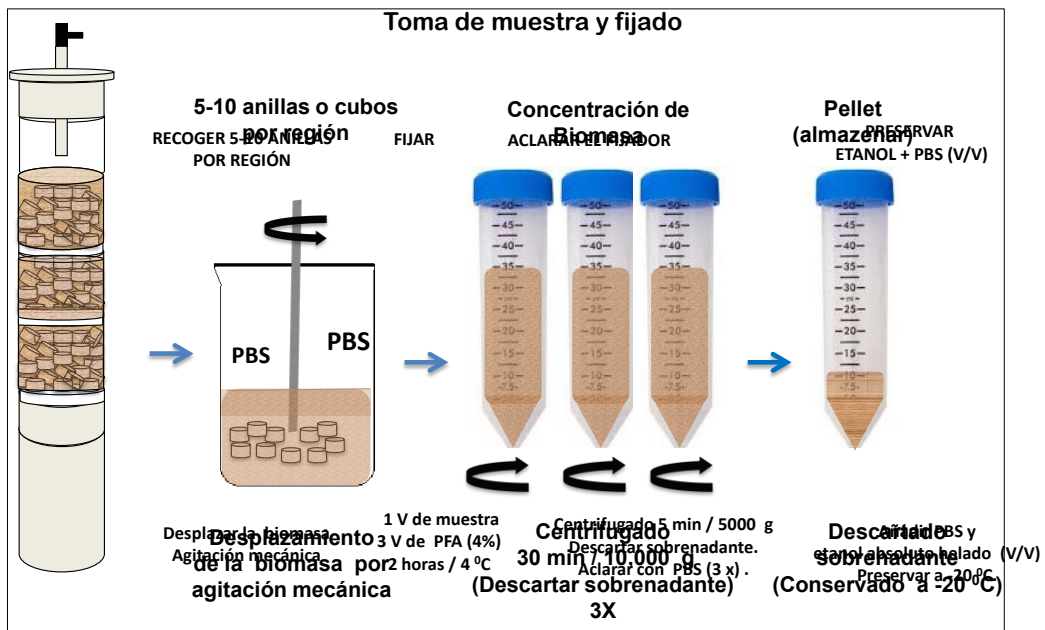


Figura .4.2. Toma de muestra y tratamiento inicial de la biomasa BTF- H_2S AER.

4.3.5 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La estructura de la biopelícula y la presencia de S^0 en las muestras se evaluaron en microscopio electrónico de barrido. Las observaciones y los análisis EDX se llevaron a cabo en microscopio EVO 10 (Zeiss, Japón) a 20 kV y 10^{-6} Pa, conforme protocolo ilustrado en la figura 4.3. Para ello, se tomaron fragmentos de aproximadamente 0.25 cm de longitud por 0.5 cm de largo que fueron cortados del soporte, con ayuda de tijeras estériles, manteniendo la biopelícula adherida. Luego las piezas fueron totalmente inmersas y fijadas en glutaraldehído (Grado ME, Merck; Alemania) al 2.5% en tampón PB (Sigma-Aldrich; Alemania), 0.1 M, pH 7.4 por 2 h. De seguido fueron lavadas 4 veces en tampón PB y pos-fijadas en tetróxido de osmio (TAAB

Laboratorios, España) al 1 % por 2 h a 4 °C. A continuación se lavó por 10 min (4x) con H₂O ultra pura (Milli-Q water- 18 MΩ·cm⁻¹) y se deshidrató en serie de etanol (50, 70, 90 y 100%). Las muestras se secaron al punto crítico con CO₂ para proteger la estructura. Cada pieza fue montada en los soportes metálicos con ayuda de adhesivos de carbono. Las muestras se metalizaron con oro en equipo K550X Sputter/coater (Emitech, Reino Unido) por 4 min. Para análisis de sólidos secos se dejó secar al aire 0.5 mg de muestra en pellet que se metalizó con carbono y se pegó a los soportes para análisis.

Las observaciones y el análisis elemental fueron realizados en microscopio EVO 10 (Zeiss, Japón) a 20 kV y 10⁻⁶ Pa bajo distintos aumentos.

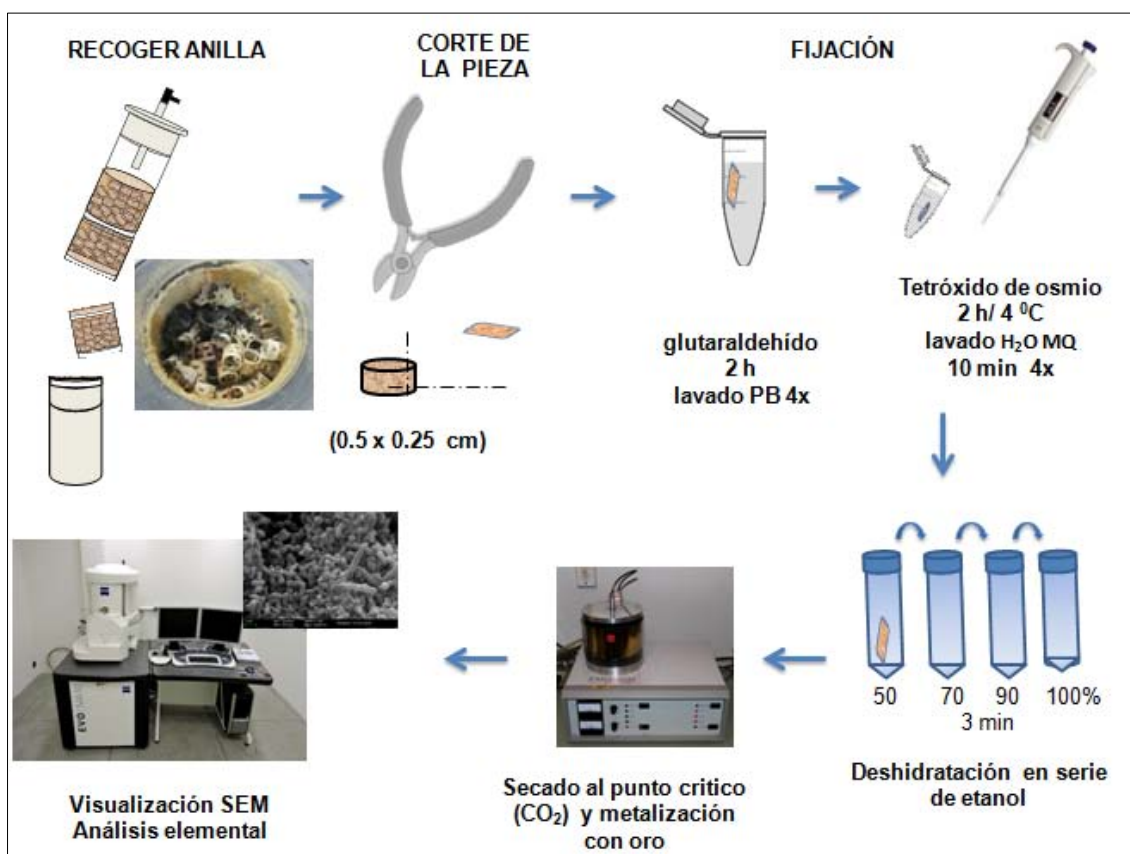


Figura 4.3. Preparación de muestra para SEM

4.4 BTF-H₂S ANOX

La planta fue monitorizada por grupo de Reactores Biológicos y Enzimáticos del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Cádiz. La biomasa del reactor fue cedida por cortesía y los materiales y métodos se

encuentran disponibles en los artículos publicados (ver tabla 4.1) o en Almengló (2013). El periodo de interés para la tesis fue del día 297 hasta el final de período operacional (día 438).

4.4.1 Descripción de la planta

El biofiltro BTF-H₂S ANOX es un bioreactor a escala semi-industrial que fue instalado en la planta de tratamiento de aguas residuales de Bahía Gáditana, ubicada en San Fernando, España. Una foto del biofiltro y un dibujo del sistema se presentan en la fig. 4.4. El biogás tratado fue generado en la propia EDAR. El reactor tiene 2.1 m de altura y 0.5 m de diámetro interno. El lecho, de 0.85 m de longitud, fue empacado con espuma de poliuretano de poro abierto y el volumen útil de trabajo fue 167 L. Antes de la inoculación con lodos de la propia EDAR, el oxígeno fue purgado y solo entonces se empezó a alimentar el biogás. El biofiltro fue alimentado con agua industrial enriquecida con una solución de nitrato, conforme descrito en la *tabla 4.1*. El sistema operó en régimen contracorriente y en paralelo. Los parámetros y condiciones de operación se pueden consultar en la misma tabla. En resumen el sistema operó por 438 días a un EBRT de 180s, un TRL de 9 h y un VRL de 15.2 m h⁻¹ y L= 50 g H₂S m⁻³ h⁻¹.

4.4.2 Características de las fases gas y líquida

En este sistema se trató biogás real formado en digestores anaerobios de la propia EDAR. Las contribuciones de los gases principales en el biogás se monitorizaron conforme a lo descrito en los métodos analíticos. El caudal de biogás sufrió variaciones originarias de la planta y fue ajustado, a los valores de consigna, utilizando un compresor (N 0150 ST.9E, KNF, Alemania). El valor promedio de concentración para H₂S, a la entrada, fue de 4,593 ppm_v y caudal de referencia de 1.7 m³ h⁻¹.

La fase líquida se alimentó en modo continuo o discontinuo. La solución de alimento fue formada por la mezcla de agua industrial, obtenida en las mismas instalaciones, enriquecida con una solución de nitrato (S1) a cual se añadió 10 mL L⁻¹ de una solución de FeSO₄ y H₂SO₄ y de la solución de elementos traza formada de una mezcla de SL-4 y SL-6 de ATCC1255 (el protocolo se pueden consultar en (<http://www.atcc.org/~media/0F393A2FE0284C63BD5DDE551C5B2D1C.ashx>).

La carga de H₂S varió entre 32 y 147 gS m⁻³ h⁻¹ y el consumo de NO₃⁻ de entre 6.5-8.5 gN h⁻¹. El consumo de nitrato fue calculado a partir del contenido en nitrato y nitrito a la

entrada y salida del reactor, para el cual se utilizaron las mediciones tomadas de la fase líquida. En modo continuo, la fase líquida se renovó purgando parte de los lixiviados y reponiendo automáticamente las soluciones frescas a 1/10 del volumen descargado en cada purga (bombas MP.P031, Plastomec, Italia). La alimentación se controló por retroalimentación en donde se utilizó valores del ORP como punto de consigna. El incremento en la concentración de sulfuro medida en la purga fue indicativo del agotamiento del nitrato (monitorizado por la caída del ORP). Así el nitrato se dosificó en modo automatizado. En promedio, el caudal de recirculación fue de $3 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ para VRL 15.2 m h^{-1} pero, en la fase de alimentación en discontinua, fue ajustado a $1.7 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ para VRL de 8.6 m h^{-1} . La temperatura, el pH y el ORP se midieron mediante sensores Multimeter 44 (Crison Instruments, España). Debido a su ubicación (al aire libre) la temperatura fue controlada teniendo como referencia la lectura a la entrada y a la salida de la línea del gas y de recirculación de líquido con un Pt100 (Jumo, Alemania).

4.4.2. Métodos analíticos

El sensor GA2000Plus (Fonotest S.L. Instruments, España) se empleó para la medición de H_2S (500-5000 ppm_v), CH_4 , CO_2 , O_2 y CO . Las concentraciones superiores a 500 ppm_v de H_2S se midió utilizando un cromatógrafo de gases con detector de conductividad eléctrica (GC/TCD; 450, BRUKER, Alemania) equipado con PoraPlot Q plot FS y columna de 25 m x 0.53 mm. La temperatura del horno fue de 33 °C (2 min), 33 -80 °C ($10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$), mientras que la temperatura del inyector y del detector fueron establecidas a 150 °C.

4.4.3. Recogida de biomasa

La biomasa se recogió en tres momentos de la operación. 2 muestras se tomaron en el día 343, durante la operación en paralelo, al puerto del medio de la columna (PM) e inferior (PI). Las dos muestras del régimen contracorriente fueron tomadas al puerto PM conforme figura 4.4. La biomasa fue liberada por fuerza mecánica en el propio medio de cultivo y luego fue concentrada por centrifugación a 8,000 g, 10 min. El sobrenadante se descartó para la formación de pellets y el material fue almacenado a -20 °C.

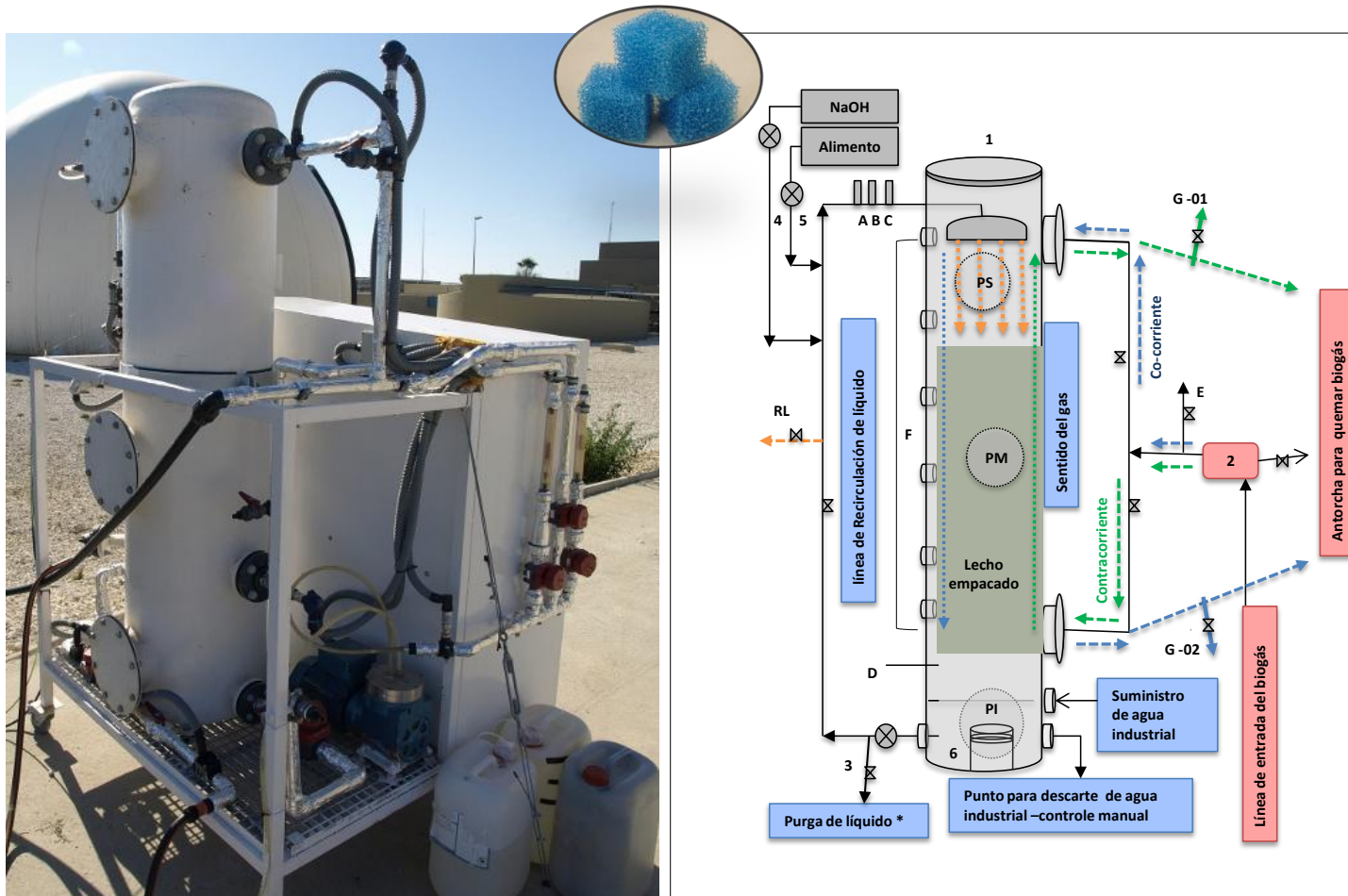


Figura 4.4. Descripción de la planta BTF H₂S ANOX: Foto del montaje, detalle del material de relleno y esquema de la planta. En 1, columna principal; 2, compresor del biogás en la línea de entrada; 3, bomba de recirculación; 4 bomba de adición de base; 6, bomba de adición de alimento 9, sistema de ajuste de temperatura. En A, sensor de temperatura; B, sensor de pH, C, Sensor ORP; D, control de nivel de líquido, E, toma de muestra del gas a la entrada; F, indicadores de presión; G toma de muestra a la salida del gas (G-01 en operación contracorriente y G-02 en operación co-corriente); H, P, Puerto para el muestreo de biomasa (PS: superior; PM: del medio; PI: puerta inferior); RL, toma de muestra de la recirculación de líquido; * control automatizado

4.5. BTF-NH₃

4.5.2. Descripción de la planta

BTF-NH₃ AER está ubicado en el Laboratorio de Tratamiento de Gases del Departamento de Ingeniería Química de la UAB. Una imagen de la instalación, del material de soporte, y el esquema de la planta se presentan en la figura 4-5. Es un montaje a escala laboratorio que fue construido especialmente para estudiar el efecto inhibitorio del incremento de carga y sus efectos en la microbiota. El BTF operó casi 400 días a pH neutro en régimen contracorriente, aunque el estudio de la microbiota se terminó el día 275 de operación. El reactor consistió en una columna de 120 cm de longitud por 0.5 cm de diámetro interno; 89 cm de altura de lecho y volumen de trabajo de 3.1 L. El peculiar de este montaje fue la utilización de 10 puertos de toma de muestra, distribuidos a lo largo de la longitud del lecho (fig. 4.5.). Con este sistema se pudo seguir el perfil de distribución del gas a lo largo de la columna. El biofiltro de amoníaco fue empacado con cubos de espuma de poliuretano (M+W Zander, Alemania) de cerca de 8 cm³ distribuidos aleatoriamente en una única sección. El sistema fue inoculado de manera similar al BTF-H₂S AER. Esta planta operó a temperatura ambiente, a pH controlado entre 6.5-7.5. El EBRT de referencia fue 46 s, y TRL de 8 ± 2 h, con VRL de 3.6 m h⁻¹. Estos parámetros fueron ajustados durante los ensayos de carga, y de optimización de tiempos de residencia.

4.5.3. Características de las fases gas y líquida

Se monitorizó las concentraciones de NH₃ en el gas y NH₄⁺, NO₂⁻ y NO₃⁻ en el líquido.

El gas sintético se formó como mezcla artificial preparada por dilución de NH₃ puro con aire de red, justo al suministrar los dos componentes a la línea de entrada en la porción inferior de la columna. El caudal de entrada de NH₃ se controló con un CFM (Bronkhorst, Holanda) y el de aire se ajustó con un rotámetro (Tecfluid, España). Se probaron concentraciones de NH₃ de entrada de entre 125-1,410 ppm_v (12-117 gN m³ h⁻¹). La fase líquida, elaborada conforme como descrito en la *tabla 4.1*) con NaHCO₃ (3 g L⁻¹) fue alimentada en continuo. La renovación se hacía de forma continua para reemplazar el mismo volumen de lixiviados recogido en la porción inferior de la columna a 2 mL min⁻¹ (bombas Primus 208-18, Alldos Grundfos, Alemania).

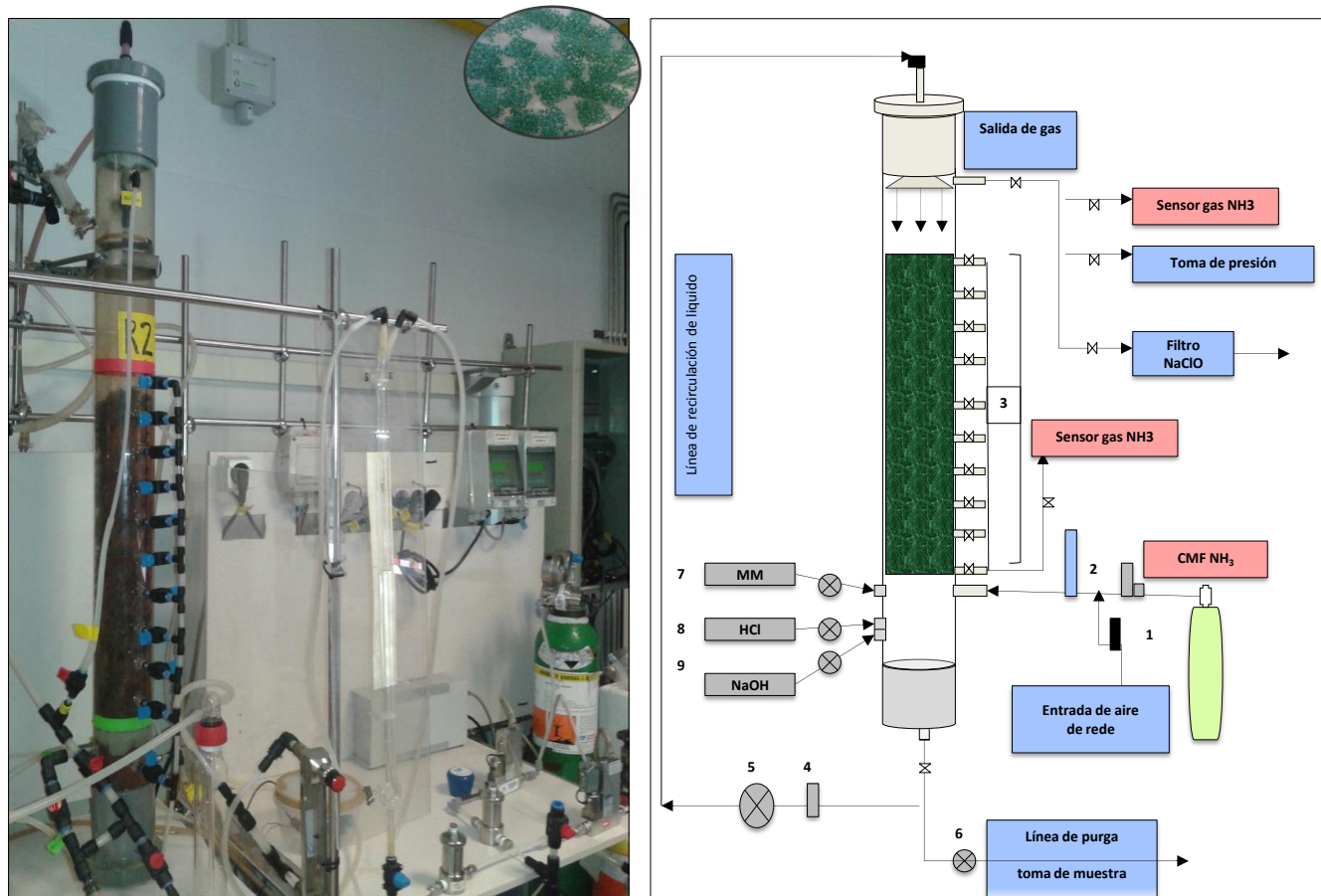


Figura 4.5. Descripción de la planta BTF-NH₃. Foto del montaje, detalle del material de relleno y esquema de la planta. En 1, control de presión de aire de entrada; 2, Rotámetro; 3, Puertos para toma de muestra de gas, 4, Sensor de pH, 5, bomba de recirculación, 6, bomba de purga; 7, bomba de adicción de MM; 8, bomba de adicción de ácido; 9, bomba de adicción de base. CMF, controlador másico de flujo.

El control de pH se realizó automáticamente de acuerdo con la lectura captada en línea con sensor pH28 (Crison Instruments, España) al bombear NaOH o HCl (0.5M)

4.5.4. Métodos analíticos

La concentración de NH_3 en el gas se midió utilizando un sensor multi-gas portátil MX6 iBrid (Industrial Scientific Corporation, EE.UU.), según las especificaciones del fabricante. Las medidas de nitrito y nitrato se tomaron mediante cromatografía iónica con detección de conductividad DIONEX ICS-2000, siguiendo mismo método utilizado en el BTF- H_2S AER (detalles en Montebello, 2013). Las medidas de NH_4 en el líquido fueron tomadas con un analizador AMTAX SC (Hach, España), según especificaciones del fabricante.

4.5.5. Tomas de muestras de biomasa

Del BTF- NH_3 se analizaron muestras integradas de biomasa tomadas a lo largo del cuerpo del reactor y de la pared. En dos ocasiones se tomaron muestras de biomasa a 3 alturas, para análisis espacial de la diversidad, a cada tercio: en la sección superior (45-50 cm); intermedia (30-35 cm) e inferior (5-10 cm). La biopelícula adherida a los cubos fue extraída mecánicamente en tampón fosfato (PBS) 30 M. Los 10 cubos recogidos de cada región fueron destruidos para permitir el acceso al interior. El material fue centrifugado a 8,000 g durante 30 min. Las muestras fueron divididas y centrifugadas otra vez, para formación de pellet. El líquido se desechó y el material se preservó a -20°C .

4.6. Pirosecuenciación 454 Roche

4.6.2. Obtención del ADN genómico

Las 6 etapas del protocolo se presentan en la fig. 4.6 de la preparación de la muestra de biomasa (pesaje) hasta el envío a RTL. Se probaron cuatro kits comerciales (MO-BIO Laboratorios Carlsbad, EE.UU.) para extracción del ADN de las muestras de biomasa: PowerMax Soil DNA Isolation Kit, PowerSoil DNA Isolation Kit, UltraClean Soil DNA Isolation Kit y PowerBiofilm DNA Isolation kit. En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

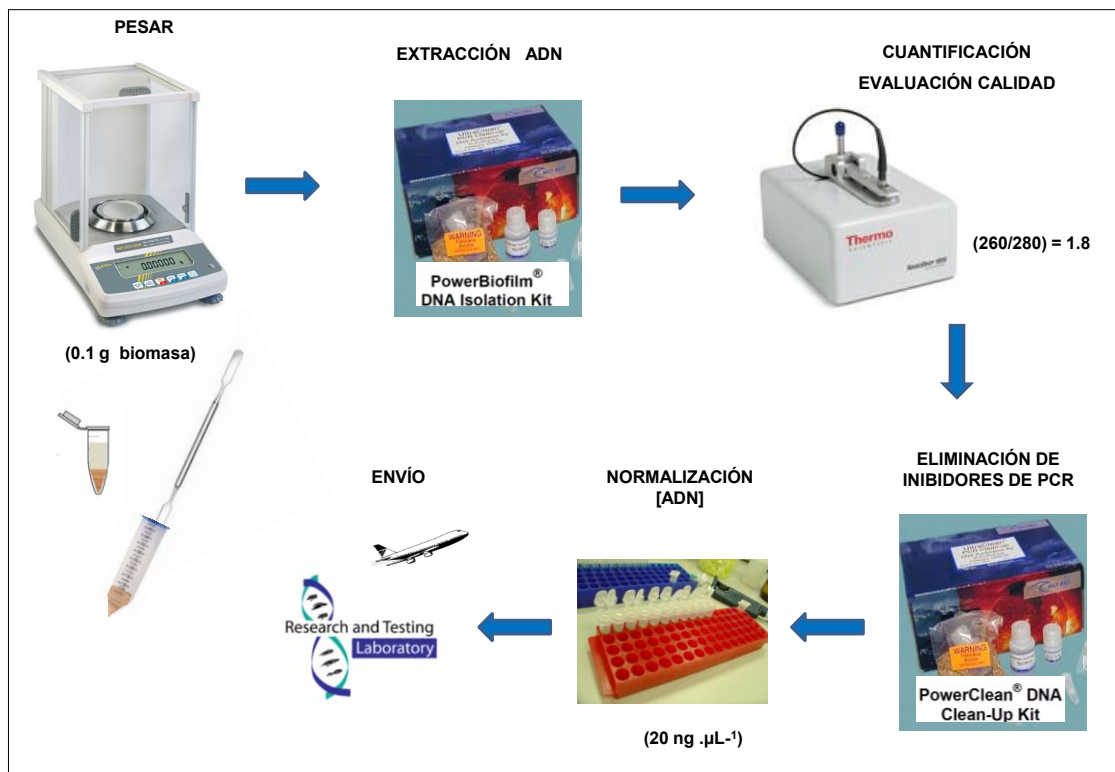


Figura 4.6.4 Preparación del ADN

.La cantidad de muestra de biomasa utilizada como punto de partida varió de acuerdo con el rango determinado por el fabricante. No obstante, la presencia de EPS y S⁰ en la matriz del biofilm, obligó a utilizar el mínimo de biomasa de partida a fin de mejorar la calidad del ADN extraído. Para cada kit, se evaluó el rendimiento: concentración de ADN extraído (valor determinado por espectrofotometría UV al 260 nm) y calidad necesaria para el procedimiento de secuenciación mediante tomadas por espectrofotometría en un equipo Nanodrop DN-1000 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). La calidad se midió por la ratio 260/ 280 nm. Las muestras que no alcanzaron el valor 1.8 (entre el 1.80 y 1.89) fueron sometidas a un pos tratamiento con PowerClean DNA Clean-Up Kit (MO-BIO) para eliminación de residuos y potenciales inhibidores de la PCR.

Al final, debido a la superioridad en el rendimiento se enviaron para secuenciación muestras extraídas con PowerSoil DNA Isolation Kit (BTF-H₂S AER) y con PowerBiofilm DNA Isolation kit (BTF-H₂S ANOX y BTF-NH₃).

Después del check de calidad, las concentraciones de DNA de las muestras se normalizaron a 20 ng µL⁻¹ (±1) y se enviaron al servicio de secuenciación del Research and Testing Laboratory (EE.UU.) siguiendo las instrucciones de la guía de envío de

muestras (disponible en <http://www.researchandtesting.com/resources.html>). El servicio cumplió los 4 pasos, preparación del ADN, PCR, secuenciación y análisis de lecturas de secuencias. El protocolo se resume en la fig. 4.7.

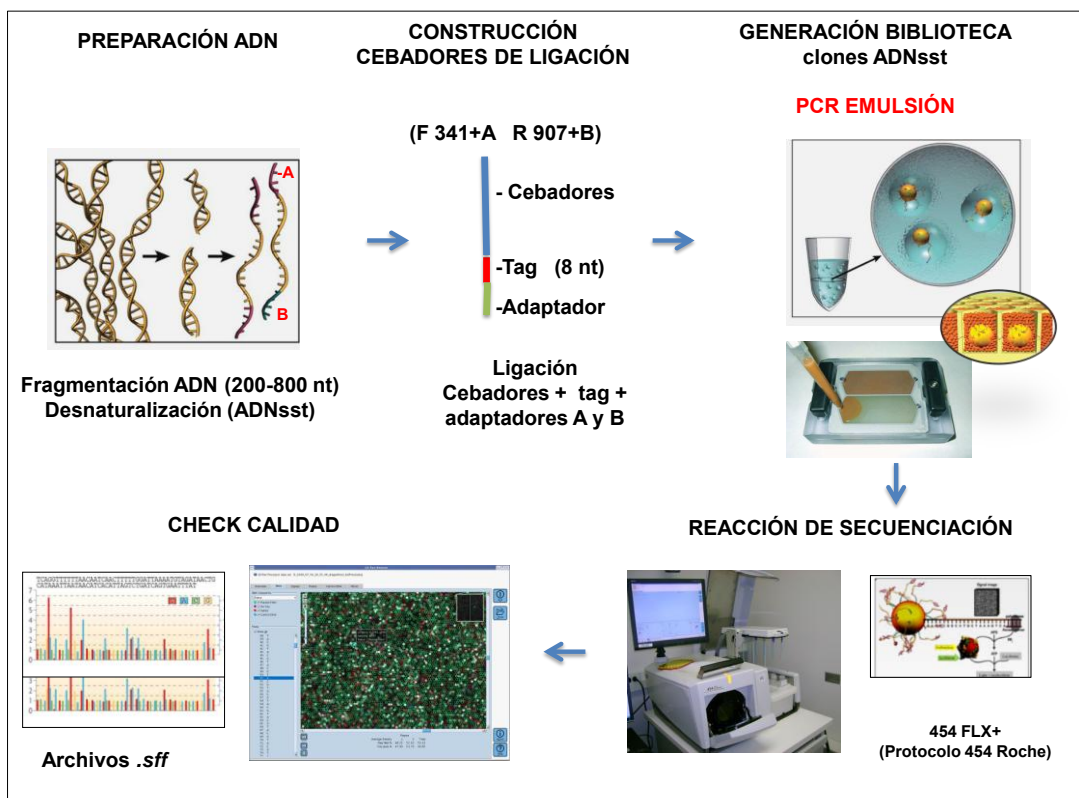


Figura 4.7. Protocolo tag-454

4.6.3. Preparación del ADN

Esta etapa se cumplió en RTL. Inicialmente se construyeron los cebadores de fusión. En este estudio se utilizó una pareja de cebadores para el dominio Bacteria para una región comprendida en V3-V6, del gen 16S ribosomal, de 560 nucleótidos: cebador hacia adelante 341F (*primer forward*): 5'CCTACGGGAGGCAGCAG3' y cebador hacia atrás: 907R (*primer reverse*): 5'CCGTC AATTCMTTGGAGTTT3'.

Cada cebador fue construido con el adaptador Roche A (5'-3') linker (CCATCTCAT CCCTGCGTGTCTCCGACTCAG) ligado al primer 341F y al tag de 8-10 nucleótidos. Los tags utilizados en cada muestra se enseñan en la tabla 4.2. El primer de fusión reverso fue construido con una molécula de biotina más el adaptador Roche B (5'-3') linker (CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG) en el extremo 5', más el primer 907R. Las secuencias amplificadas con los adaptadores "B", biotinizados, se utilizaron

en la etapa de secuenciación y los del tipo A en protocolos de preparación: evaluación de calidad, en gel, de las muestras, y titulación para cálculos de concentración y preparación de reactivos para la etapa de secuenciación.

Tabla 4.2. *Tags utilizadas en la secuenciación, en las muestra*

Biofiltro	Muestra	Tag
BTF-H₂S ANOX	Ca-A	CAGGAGGA
	Ca-B	CAGGATTA
	Ca-C	AATTCTTA
	Ca-D	AATTCGGA
BTF-H₂S AER	245d	AAAAAAAC
	586d	AAAAAAAT
BTF-NH₃	N-A	CAGCTGTA
	N-B	CAGGACCA
	N-C	CAGGCCAA
	N-A ₁	CAGGCTGA
	N-A ₂	CAGGTAGA
	N-A ₃	ACAACACA

4.7. PCR_e y secuenciación FLX⁺ 454 Roche

Los productos de la PCR de fusión se visualizaron con eGels (Life Technologies, EE.UU.) y luego se reunieron los grupos equimolares. Cada conjunto fue tratado con Diffinity RapidTip (Diffinity Genomics, EE.UU.), y se realizó una selección por tamaño utilizando Agencourt AMPure XP (BeckmanCoulter, EE.UU.) siguiendo los protocolos de la plataforma 454 Roche (454 Life Sciences, EE.UU.). Los conjuntos seleccionados se cuantificaron y 150 ng de ADN fue hibridado con las perlas Dynabeads M-270 (Life Technologies- EE.UU.) para la amplificación. El kit Qiagen HotStar Taq master mix (Qiagen Inc, EE. UU.). Se utilizó para la reacción de 25 µL; 1 µL de cada primer (1µM) y 1 µL de ADN (20 ng µL⁻¹) y se condujo en termociclador ABI Veriti thermocyclers (Applied Biosystems, EE.UU.). Las condiciones de reacción fueron: 95 °C por 5 min, luego 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 54 °C por 40 s, 72 °C por 1 min, seguido por un ciclo de 72 °C por 10 min y entonces resfriado a 4 °C.

La biblioteca generada de la PCR_e fue secuenciada en plataforma FLX⁺ 454 Roche siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (454 Life Sciences). Las lecturas de secuencias fueron almacenadas en formato .sff (proprio del proceso) para luego seguir el tratamiento bioinformático.

4.7.1. Check de calidad

Se realizaron recuentos por taxones y se computaron los datos de abundancia relativa (%) en los distintos niveles: filios, clases, familias, géneros y especies. Los detalles del método utilizado por se pueden consultar en <http://www.researchandtesting.com/index.html>. que se reproducen en el anexo 1. En resumen, la herramienta USEARCH fue utilizado en el check de calidad (Edgar 2010). Los datos fueron de-reduplicados y agrupados (al 1% divergencia). Luego fueron eliminadas las secuencias de tamaño inferior a 250 pb y aquellas con más de 600 pb de longitud. A continuación, se regeneraron las secuencias *consenso* y se eliminaron las lecturas de baja calidad. La detección y remoción de quimeras fue llevada a cabo UCHIIME (Edgar et al. 2011) en modo de nuevo, en los clústeres. El siguiente paso fue la conversión del archivo al formato FASTA reemplazando, a la vez, los *tags* originales por otros artificiales que se utilizaron para la identificación taxonómica de las lecturas. La identidad de las OTUS fue asignada en cada archivo FASTA, sembrado en la bases de datos de secuencias del NCBI (National Center for Biotechnology Information- EE.UU.) utilizando el programa BLASTN⁺.

4.7.2. Clasificación de secuencias y calculo de abundancia relativa

El criterio padrón del RTL para resolución y clasificación de las lecturas en los distintos niveles taxonómicos se resume en la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Parámetros para clasificación general de las lecturas de secuencias

Grado de Identidad	Resolución
≥ 97%	especie
De 95 - 97%	género
De 90 - 95%	familia
De 85 - 90%	orden
De 80 - 85%	clase
77 - 80%	filo

Del set de datos preparado por el RTL fueron seleccionados los archivos tipo Bacteria *traceback*, porque no se aplicaron criterios de agrupación al “pariente más cercano”.

En los casos en donde no se pudo resolver la identidad de la lectura se aplicaron la designación no clasificados *uncl.* (del inglés unclassified) y se utilizó la identidad del último nivel taxonómico para el cual se encontró hit. La clasificación siguió el criterio definido en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Parámetros para identificación aplicado a los archivos “*Bacteria traceback*”

Grado de identidad	Destino en el archivo <i>traceback</i>
$I > 97\%$	-
$97\% \geq I > 95\%$	(<i>unk species</i>)/ (uncl. especie)
$95\% \geq I > 90\%$	(<i>unk genus</i>)/ (uncl. genero)
$90\% \geq I > 85\%$	(<i>unk family</i>)/ (uncl. familia)
$85\% \geq I > 80\%$	(<i>unk order</i>)/ (uncl. orden)
$80\% \geq I > 77\%$	(<i>unk class</i>)/ (uncl. clase)

I, identidad

Tras asignar la identidad se llevaron a cabo los recuentos de lecturas y se calculó la abundancia relativa, como el número de lecturas de secuencias, para cada nivel taxonómico, por muestra.

4.7.3. Análisis de diversidad

Se aplicaron métodos de estadística no paramétrica en el análisis de diversidad. Las comparativas entre bibliotecas fueron realizadas en base a los índices de diversidad de *Chao1* y de Shannon *H'* y curvas de rarefacción que se elaboraron según el protocolo de RDP (disponible en <https://rdp.cme.msu.edu/>). El trabajo fue ejecutado en tres pasos. Primero los archivos de secuencias, ya tratados, fueron alineados en INFERNAL en la página de RDPpipeline (en formato *FASTA (.fas)*). Los mismos archivos fueron agrupados con la herramienta de clúster jerárquico que luego sirvieron de entrada para los cálculos de los índices de diversidad. Las curvas de rarefacción se elaboraron al 100, 97 y 95% de similitud.

CAPÍTULO 5

Cambios en la diversidad microbiana en un biofiltro percolador aerobio de desulfuración de H₂S por pirosecuenciación tag-454

Partes de los resultados se publicaron en:

Bezerra T, Rovira R, Montebello A, Lagostera M, Lafuente J, Campoy S, Gabriel D, (2013). Metagenomics and metatranscriptomics of a H₂S desulfurizing biotrickling filter, in: Proceedings of the 2013 on 5th IWA Odour and Air Emissions Conference Jointly Held with 10th Conference on Biofiltration for Air Pollution Control, on CD-ROM.

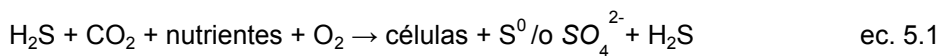
Montebello A, Bezerra T, Rovira R, Rago L, Lafuente J, Gamisans X, Campoy S, Baeza M, Gabriel D (2013). Operational aspects, pH transition and microbial shifts of a H₂S desulfurizing biotrickling filter with random packing material. *Chemosphere*, 93(11), 2675-2682.

Montebello A, Mora M, López L, Bezerra T, Gamisans X, Lafuente J, Gabriel D (2014). Aerobic desulfurization of biogas by acidic biotrickling filtration in a randomly packed reactor. *Journal of hazardous materials*, 280, 200-208.

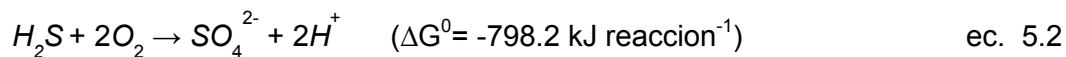
5.1. Introducción

5.1.1. Mecanismo básico de la biofiltración de H₂S

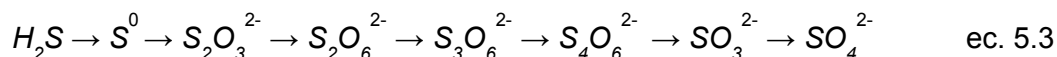
La eliminación biológica de H₂S de corrientes gaseosas ocurre principalmente por vía aeróbica. Para ello se utiliza la habilidad natural de las SOB para utilizar el S como fuente de energía. La reacción biológica que explica el metabolismo aeróbico simplificado del sulfuro de hidrógeno en bacterias quimiolitótrofas se detalla en la ecuación 5.1. (Syed et al. 2006).



La oxidación del sulfuro de hidrógeno se explica por la reacción de óxido-reducción global ec.5-2:



En esta reacción el producto principal de la oxidación del H₂S es SO₄²⁻, pero la oxidación es un proceso multienzimático y, como tal, se producen compuestos intermediarios que también pueden ser utilizados como fuentes alternativas de energía. Las transformaciones consecutivas se pueden apreciar en la ecuación 5.3. El primer intermediario es el azufre elemental, que es una forma bastante estable e importante en el ciclo biológico del S. Las formas de azufre reducidas intermediarias son el tiosulfato (S₂O₃²⁻) y el tetrationato (S₄O₆²⁻), que son formas menos estables, y rápidamente transformadas (Duan et al. 2005). Algunas SOB pueden regenerar el S⁰ a partir del tiosulfato, lo que confiere versatilidad en la obtención de energía (Ghosh & Dam 2009).

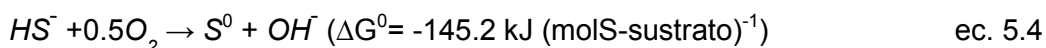


Los procesos biológicos de oxidación son más eficientes que los procesos químicos, con los cuales compiten exitosamente en el medio ambiente. Sin embargo, la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo oxidativo hacen que los procesos

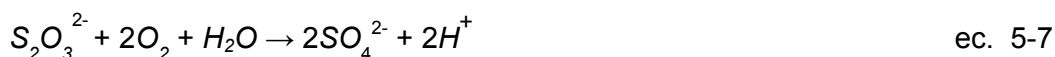
biológicos tengan velocidades de 100 a 1000 veces mayores que los de naturaleza química (Lens y Kuenen, 2001).

Así como los demás ciclos de elementos, el ciclo del azufre tiende a un equilibrio natural entre las especies químicas en los ecosistemas (Robertson & Kuenen; 1992), y un desequilibrio puede conducir a la acumulación de compuestos intermedios. La versatilidad de las bacterias en utilizar los aceptores de electrones es muy importante para el reciclado del azufre en el medio ambiente. A lo largo de la evolución, los taxones se diversificaron en muchos nichos en respuesta a la presencia de los compuestos. A día de hoy se considera que los procesos metabólicos con distintos aceptores de electrones se construyeron por convergencia evolutiva (Kelly et al. 1997; Ghosh & Dam 2009).

El mecanismo simplificado de la oxidación de H₂S en bacterias quimiolitótrofas se enseña en las ecuaciones 5.4 y 5.5 (Kelly 1999), donde se obtiene S⁰ o SO₄²⁻ como productos finales de la oxidación.



Los pasos intermedios para conversión de S⁰ y tiosulfato se enseñan en ec.5.6 y 5.7:



Los estados de oxidación del H₂S incluyen, en primer lugar, la oxidación del sulfuro a azufre elemental; que se convierte en seguida a sulfato (Robertson & Kuenen, 2006). Tal como se puede comprobar en las ecuaciones, la conversión del sulfuro a sulfato es más eficaz desde el punto de vista energético, y para un reactor tipo biofiltro la producción de sulfato puede ser mejor para el sistema ya que se puede percolar y se elimina en la purga más fácilmente que el azufre elemental (Rodríguez et al. 2013). El azufre elemental que se produce asume una forma insoluble y granulosa que queda atrapada en la matriz de EPS, es decir, en la biopelícula. Su eliminación se puede lograr

limitando la alimentación de H₂S. La falta del mismo como fuente de S induce el consumo de S elemental por parte del cultivo de SOB (Montebello et al. 2013).

Las bacterias SO que se cultivan en un biofiltro utilizan el oxígeno molecular como aceptor final de electrones y fijan el C por medio del ciclo de Calvin. La fuente de C utilizada en biofiltros aeróbicos experimentales suele ser el HCO₃⁻, el que puede ayudar a controlar el pH (Delhoménie & Heitz 2005).

Muchas de las bacterias secretan el azufre elemental, como es caso de *Thiobacillus* sp., *T. denitrificans*, *T. thioparus* o *Halothiobacillus neapolitanus*, aunque hay bacterias que son capaces de mantener depósitos dentro de cuerpos de inclusión; como por ejemplo especies de los géneros *Beggiatoa* y *Thiothrix*. En estos últimos, los gránulos depositados funcionan como reservas de energía. (Lens & Kuenen 2001).

El proceso de eliminación biológica de H₂S presente en corrientes gaseosas depende de la eficiencia en transferir el compuesto al medio líquido, y este fenómeno es influenciado directamente por el pH. En solución acuosa, el H₂S es un ácido que puede existir en ambas formas iónica y no iónica. Las reacciones de disociación del H₂S no son biológicas, y, hasta pH 5, la forma prevalente que se encuentra disuelta es H₂S. Mientras se elevan los valores del pH, se encuentran proporciones cada vez menores de aquel, y mayores de HS⁻. A pH 9, la forma H₂S desaparece y solo se encuentra la HS⁻. Cuando el pH se acerca de 12, se encuentran proporciones muy parecidas de las especies HS⁻ y S²⁻, y por encima de este valor sólo S²⁻ (Gostelow et al. 2001). Este proceso se resume en las ecuaciones ec.5.8 y ec.5.9, donde también se enseñan las constantes de disociación (pKa⁻).



En condiciones naturales la oxidación biológica de H₂S conduce a la acidificación del ambiente (ver ecuaciones 5.5 a 5.7), que evidentemente, eleva la presión selectiva sobre las poblaciones, conduciendo a la especialización. En trabajos a escala de laboratorio la eliminación de H₂S a pH neutro fue aplicada en numerosos estudios. Así, el pH pasa a constituirse en un factor de selección para la actividad microbiana, y por lo tanto la composición de la comunidad microbiana depende directamente de él.

5.2. Antecedentes

La biofiltración para eliminación biológica de H₂S ha sido bastante estudiada, y la investigación de los procesos de naturaleza abiótica en plantas experimentales ha avanzado a pasos largos. En biofiltros percoladores aeróbicos, los principales temas de investigación han sido, primero, el diseño de las plantas, y luego, la optimización de parámetros de operación y de estrategias de control de proceso. Los efectos de la dirección de flujo de gas, de transferencia de materia, disponibilidad del oxígeno, tiempos de residencia del gas y del líquido, y velocidad superficial del líquido, entre otros, han sido extensivamente probados, y distintos materiales de relleno han sido evaluados (Gostelow et al. 2001; Gabriel & Deshusses 2003; Kim & Deshusses 2005; Mas & Maestre 2008; Fortuny et al. 2008; Zhang et al. 2008; Soreanu et al. 2009; Díaz et al. 2011; Omri et al. 2011; Díaz et al. 2011; Ramachandran 2014; López et al. 2015).

Des del punto de vista microbiológico, se comprobaron la importancia de factores de crecimiento, como el contenido de humedad en el lecho filtrante, la disponibilidad de nutrientes esenciales (Aizpuru et al. 2003) y la capacidad de crecimiento de la microbiota frente a absorción de los nutrientes desde del medio líquido.

Se ha investigado también la tolerancia de consorcios y cultivos puros a altas concentraciones del contaminante (Cox & Deshusses 1998; Lebrero et al. 2010; Serco et al. 2005; Montebello et al. 2013). La estructura de la biopelícula ha sido observada mediante técnicas microscópicas y análisis de los ácidos grasos de la membrana (Webster et al. 1997).

5.2.1. Componente de proceso: el efecto del pH

A día de hoy, el tratamiento de bajas concentraciones de H₂S es de uso común en plantas para el tratamiento de residuos sólidos y aguas residuales tanto en el sector ganadero como en el sector industrial. Las SOB eliminan fácilmente bajas concentraciones de H₂S por la oxidación biológica a sulfato en presencia de exceso de oxígeno. Debido a la producción de H⁺ como producto de oxidación, se ha descrito la disminución de la eficacia debida a la disminución del pH a niveles tóxicos para la biomasa. (Smet & Van Langenhove 1998; Gabriel & Deshusses 2003; Taylor et al. 2012; Jaber et al. 2014). El control del pH es un punto crítico, pero de fácil solución una vez que el sistema esté automatizado. El funcionamiento de un biofiltro se controla también por las mediciones del potencial redox, del oxígeno disuelto y de la ratio

O₂/H₂S alimentados. Esta tasa indica qué especie de azufre se produce durante la oxidación biológica. Así se cumple el objetivo de los bioreactores, que es favorecer dos procesos, uno de naturaleza química, que es la transferencia del contaminante desde la fase gas a la biopelícula, y otro de naturaleza biológica, que es la eliminación del contaminante por los microorganismos (Cox & Deshusses 1998).

La biodesulfuración en BTFs a pH ácido fue tema de interesantes estudios, tanto a escala experimental como piloto. El proceso de desulfuración aeróbica produce una acidificación natural del medio (ec. 4.4 a 4.6) de forma que conducir la operación bajo condiciones acidófilas puede ser más ventajoso. Sin embargo, cuando el pH es muy bajo, de entre 3 y 1, las condiciones medio ambientales conducen a la eliminación de poblaciones, lo que puede comprometer la resistencia a lo largo del tiempo. Ejemplos de especies que pueden favorecerse de este proceso selectivo son *Acidithiobacillus* y *Acidiphilium*, ambas proteobacterias especializadas en la degradación de especies azufradas. La capacidad de estas especies en degradar H₂S se debe a su capacidad de utilizar parcialmente la vía SOX. Así, estas poblaciones pueden tanto variar el sustrato entre sulfuro y azufre, como acumular productos intermedios. En base a esto, operar a pH ácido puede ser más económico, pero presenta el inconveniente de la oxidación parcial, o sea, la formación de S⁰ en lugar de sulfato.

En el caso de la formación de S⁰, la acumulación de azufre elemental (material granular) en el interior del lecho empacado del reactor, y de difícil liberación, es uno de los principales cuellos de botella de esta tecnología. Este inconveniente fue reportado en dos estudios de BTFs, donde se encontró interferencia en la actividad de la biopelícula, lo que produjo una reducción en la eficacia de la eliminación (Rodríguez et al. 2013; Montebello et al. 2014). En aquellos estudios también se probaron distintas estrategias para evitar este problema. Una fue la suspensión de la alimentación del gas sulfuroso (periodo de “starvation”), para estimular el consumo del material acumulado, y la otra fue incrementar la disponibilidad del oxígeno a fin de promocionar la etapa 2 (ec. 4-5), favoreciendo la conversión a SO₄²⁻ (Rodríguez et al. 2013).

El alto poder selectivo del pH fue reportado por Webster et al. (1997), que a un pH muy bajo los microorganismos son sometidos a altos niveles de estrés, mientras que esto no se observó para los microorganismos en los reactores con pH > 4. Los mismos autores observaron también que un pH bajo indujo a un aumento de los ácidos grasos, que fueron asociados con especies de *Thiobacillus* acidófilas. Los valores decrecientes de pH no causaron una disminución significativa de eficiencias de remoción de H₂S. Además, se observaron las mayores densidades microbianas, al

final del experimento, a pH más bajos. Aquel estudio demostró que las comunidades microbianas podrían adaptarse a condiciones de estrés, ya sea a través de aclimatación de especies individuales, o mediante el cambio de dominio de especies tolerantes a condiciones acidófilas.

En biofiltros orgánicos los materiales empleados presentan una baja capacidad de tamponamiento del pH. Lo mismo vale para materiales de relleno como el compost y astillas de madera. Las turbas son naturalmente ácidas (pH entre 3 y 4), con baja capacidad de amortiguación. Para mantener el pH constante algunos autores añadieron materiales al lecho como el carbonato de calcio, la dolomita y hasta conchas de ostras. A día de hoy, en biofiltros tipo percolador, se consolidó la estrategia de riego con soluciones nutritivas tamponadas mediante NaHPO_4 y el HCO_3 (revisados en Delhoménie & Heitz 2005). Para mejorar el comportamiento y disminuir los costes de explotación han sido desarrolladas distintas estrategias de control de pH, esencialmente basadas en el aporte de agua de renovación o en el aporte de NaOH en la línea de recirculación.

5.2.2. Componente biológico: composición de la comunidad

Las poblaciones residentes en los biofiltros se organizan en biopelículas bastante complejas. A diferencia de lo que ocurre en otros reactores de lecho empacado, en biofiltros percoladores la concentración de células por área puede ser elevada (hasta 100 g SSV L^{-1}). Esto es debido a que la percolación se hace a bajas velocidades ($1\text{-}10 \text{ m h}^{-1}$), lo que impide el lavado del material en soporte. Si por un lado la densidad de células favorece el acceso a la microbiota, por otro, la fuerte adhesión y la estructura de la matriz lo dificultan. Métodos de microbiología clásicos como el cultivo o recuento de células fueron utilizados como herramientas para estudiar la biopelícula (Acuna et al. 1999; Aizpuru et al. 2003; Khammar et al. 2005; Ivnitsky et al. 2007; Chaiprapat et al. 2011; Xue et al. 2013). En aquellos casos la diversidad no fue contemplada, por dificultad en promover crecimiento *in vitro*, o por limitaciones en la recuperación de las células de la matriz. En el presente estudio fueron realizados ensayos con material de tres biofiltros para comprobar la eficacia de las estrategias de recuperación de ADN y el rendimiento fue dependiente de la estrategia de extracción, específicamente del proceso de ruptura de la matriz. Este estudio se presentará más adelante en este capítulo.

A día de hoy, muchos de los microorganismos sulfooxidantes neutrófilos ya han sido identificados mediante técnicas de biología molecular. Los más frecuentes en biofiltros percoladores fueron *Thiobacillus thioparus*, *T. sp.*, *Thiomonas*, *Thiothrix sp.*, *Halothiobacillus neapolitanus* y *Sulfurimonas denitrificans* (Méndez 2002; Takai 2006; Sercu et al. 2006; Mas & Maestre 2008; Jiang & Tay 2010; Maestre et al. 2010; Ramirez et al. 2011; Montebello et al. 2013). Entre los alcalófilos sulfooxidantes se destacaron *Thioalkalispira microaerophila*, *Thioalkalivibrio sulfidiphilus*, *T. cyclum* y *T. jannaschii*, (Sorokin 2002; Syed et al. 2006; Sorokin et al. 2012). Entre acidófilos fueron referenciados *Acidithiobacillus sp. Ac. thiooxidans* y *Ac. caldus* y *Acidiphilium sp.* (Kelly & Wood 2000; Johnson et al. 2006; Ramirez et al. 2009; Ramírez et al. 2011; Bezerra et al. 2013; Montebello et al. 2013). *Acidithiobacillus* ha despertado el interés por el poder de metabolización de H₂S bajo condiciones de pH ácido (Lee et al. 2005; Lee et al. 2006; Aroca et al. 2007; Chaiprapat et al. 2011; Ramírez et al. 2011; Charnnok et al. 2013; Lin et al. 2013).

Estudios de carácter comparativo fueron poco frecuentes. Un ejemplo interesante fue la investigación se llevó a cabo con biofiltros inoculados, simultáneamente, uno con *Thiobacillus thioparus*, otro con *Ac. thiooxidans* (Arouca et al. 2007). Los autores lograron mejor performance en el BTF de *Ac. thiooxidans*, llegando a ser 30 veces más eficaz a concentraciones elevadas. Otro estudio reportó el éxito de la desulfuración para una cepa altamente resistente al sulfato del mismo género, *Acidithiobacillus* (Lee et al. 2006).

La complejidad de la comunidad microbiana en BTFs fue reportada como “una caja negra”. En cualquiera de los casos se reportó la importancia de los miembros de la clase β de Proteobacteria, géneros *Thiobacillus* y *Thiomonas* y de miembros de γ -proteobacteria (ej. *Thiothrix*, *Halothiobacillus* y *Acidithiobacillus*), en la desulfuración.

Para aclarar tanto la identidad de los cultivos como para caracterizar comunidades, se han aplicado técnicas de biología molecular clásicas. La técnica microscópica de hibridación con fluorescencia in situ (FISH) fue la aplicada en estudios de poblaciones *in situ* (Jiang et al. 2009; Gallardo et al. 2010; Maestre et al. 2010; Li et al. 2012). Para la caracterización de las poblaciones, se utilizó principalmente herramientas de análisis basadas en el ARN ribosomal, a partir de material genético recuperado de biomasa, y amplificación por PCR. (Muyzer et al. 1993). Las técnicas más utilizadas fueron la electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) (Chung, 2007; Hong et al. 2007, Ramírez et al. 2011), análisis del espaciador ribosomal intergénico (RISA) (Steele et al. 2005), análisis de los polimorfismos (Omri et al. 2011), clonaje y

secuenciación (Maestre, 2009; Kristiansen et al. 2011); y secuenciación de los genes del ARN ribosomal (Maestre et al. 2010). Gracias a estas herramientas la compleja microbiota ha sido estudiada. Sin embargo, el conocimiento de este componente del proceso mediante las herramientas clásicas de estudio de comunidades se ve limitado por la baja cobertura de los bancos de datos y por los protocolos laboriosos y caros (Cabrol & Malhautier 2011). Para superar los problemas es indispensable girar hacia aproximaciones metagenómicas, para ello el empleo de plataformas de secuenciación masivas como pirosecuenciación es una alternativa. Sin embargo, las limitaciones derivadas de la novedad y la falta de protocolos establecidos hacen la propuesta menos atractiva. La robustez de la técnica *tag-454* para el seguimiento de comunidades en BTFs fue comprobada con anterioridad en un estudio empleando BTFs a escala piloto para bajas cargas de H₂S (Li et al. 2012). En aquel estudio se logró relacionar la composición con parámetros de diseño y operación como la naturaleza del soporte o la presencia de perturbaciones de pH. En el presente capítulo se presentan, los resultados de los estudios de diversidad realizados en la comunidad de Eubacteria del BTF-H₂S AER a través de plataforma de secuenciación masiva 454 Roche.

5.3. Motivaciones y objetivos

La planta a escala laboratorio utilizada en este trabajo fue diseñada por el Dr. Fortuny (Fortuny et al. 2008; Fortuny et al. 2010; Fortuny et al. 2011) y se utilizó para estudios de la eliminación de H₂S bajo distintas condiciones a lo largo de los años. Tal como se explicó en el marco de la tesis, la configuración BTF-H₂S AER fue el objeto de estudio de la Dra. Andrea Montebello, que investigó temas relacionados con la disponibilidad de oxígeno, optimización de tiempos de residencia de gas (EBTR, por sus siglas en inglés: empty bed residence time), tanto a pH neutro como ácido (Montebello et al. 2010; Montebello et al. 2012; Montebello et al. 2013). El Dr. Maestre aplicó el clonaje y secuenciaron de 100 clones con el objetivo de estudiar la diversidad después de la secuenciación de las muestras y evolución de las poblaciones mediante FISH (Maestre 2008; Maestre et al. 2010). El Dr. Roger Rovira describió el comportamiento de las SOB durante la puesta en marcha y en momentos de la operación y emprendió un estudio de transcriptómica en un intento de mapear la actividad preponderante en el reactor en tres secciones de la columna. El trabajo fue pionero y sirvió para ilustrar la complejidad de la red metabólica que se puede encontrar en este tipo de ecosistemas. En aquel estudio se desveló el papel preponderante de la comunidad

localizada en la región media de la columna (Maestre et al. 2010; Rovira 2012). (Maestre et al. 2010) A pesar de la importancia de estos estudios para la comprensión del componente biológico de biofiltros percoladores se encontraron diversos problemas en ambos casos. Uno fue la baja cobertura de la diversidad que se obtuvo del set de sondas FISH, y luego, la falta de informaciones detalladas de la diversidad, lo que limitó la aplicación de la metatranscriptómica, ya que no se pudo relacionar los genes identificados con los miembros de la comunidad del biofiltro ni con su funcionalidad en el sistema.

La presente tesis fue planteada con el objetivo de probar la robustez de una herramienta de secuenciación masiva para generar información detallada de diversidad. Para ello, fue aplicada una aproximación metagenómica basada en datos de secuenciación masiva de ADN ambiental. La plataforma de pirosecuenciación elegida fue la 454 de Roche, que luego se aplicó para identificar los cambios de la composición de bacterias de un biofiltro tratando altas cargas de H₂S, operando en condiciones neutrófilas así como acidófilas. El trabajo que ahora se presenta tuvo el objetivo de estudiar la ecología del BTF-H₂S AER mediante análisis de diversidad por *tag-454*.

Los objetivos específicos planteados para el estudio fueron:

- ✓ Sistematizar una rutina para toma de muestras de biomasa de la biopelícula y de ADN genómico.
- ✓ Comprobar la efectividad de las estrategias de pirosecuenciación.
- ✓ Elegir el método de análisis de diversidad de especies,
- ✓ Estudiar la diversidad de Eubacteria en ambas condiciones de operación
- ✓ Identificar cambios poblacionales ocurridos tras la acidificación del BTF-H₂S AER.
- ✓ Relacionar los cambios ocurridos en la fracción de SOB con la actividad desulfurizadora del sistema, en pH neutro y ácido.

5.4. Materiales y métodos

5.4.1. Maniobra de cambio de pH

La puesta en marcha del biofiltro percolador se realizó en febrero de 2010, utilizando como inóculo lodo de EDAR. El biofiltro operó continuamente en condiciones estacionarias durante 440 días a pH 6-6.5 y temperatura ambiente. El día 440 se inició

el cambio gradual del pH hasta 2.5 y se dejó el biofiltro percolador en estas condiciones hasta el final de la operación. La maniobra de cambio de pH fue realizada conforme estrategia descrita en la tabla 5.1., con los valores de consigna controlados en modo automático.

Tabla 5.1. Valores de control de pH aplicados al BTF-H₂S AER.

Días de operación	Rango de pH
0 - 440	6 - 6.5
440 - 442	5.0 - 5.5
442 - 446	4.0 - 4.5
446 - 600	2.5 - 2.75

5.5. Resultados y discusión

5.5.1. Resumen de la operación

El período total de operación del biofiltro fue de 990 días, de estos, 440 a pH neutro. El estudio de ecología que ahora se presenta fue realizado en dos etapas: la primera en donde se empleó el análisis de diversidad *tag-454*, que se inició el día 220 de operación de la planta y siguió hasta el día 586; y otra hasta el final del período ácido. En este último período, además del análisis de diversidad se emplearon otras técnicas como el SEM-EDX y FISH. Detalles al respecto del periodo de puesta en marcha hasta y de los primeros meses de operación se encuentran en Montebello et al. (2013).

A modo de resumen, el biofiltro fue inoculado con lodos activos procedentes de la EDAR de Manresa. El sistema alcanzó valores de RE superiores al 95% ya en la primera semana de operación. Luego, el sistema alcanzó la condición de estado estacionario, que sólo fue alterada durante los períodos de realización de experimentos puntuales.

Durante la operación de la planta a pH 6 (6.5), el sistema demostró una tendencia a acidificar aunque el sistema de control de pH mantuvo el reactor al pH deseado durante todo el período. En la figura 5.1 se ilustra el período anterior al cambio. Se observa la estabilidad del pH y las variaciones normales de OD y ORP. Es interesante comentar que, después del cambio de la consigna de pH en el día 440 de operación la

actuación del sistema de control de pH fue menos frecuente, una vez la acidificación también ocurrió influenciado por la actividad sulfuro-oxidante. El perfil de OD indicó que este parámetro se mantuvo durante toda la operación en un rango comprendido entre 2 y 5 mg OD L⁻¹. Estos valores indicaron la disponibilidad de oxígeno en la corriente líquida recirculada en el reactor en todo momento. Normalmente, la disponibilidad de oxígeno en relación a la carga de H₂S alimentada se expresa como la relación O₂/H₂S (V/V); en donde valores próximos a 30 fueron considerados suficientes para garantizar la oxidación completa a sulfato (Fortuny, 2007; Montebello, 2010). Este fue un parámetro importante de control de la operación del BTF-H₂S AER.

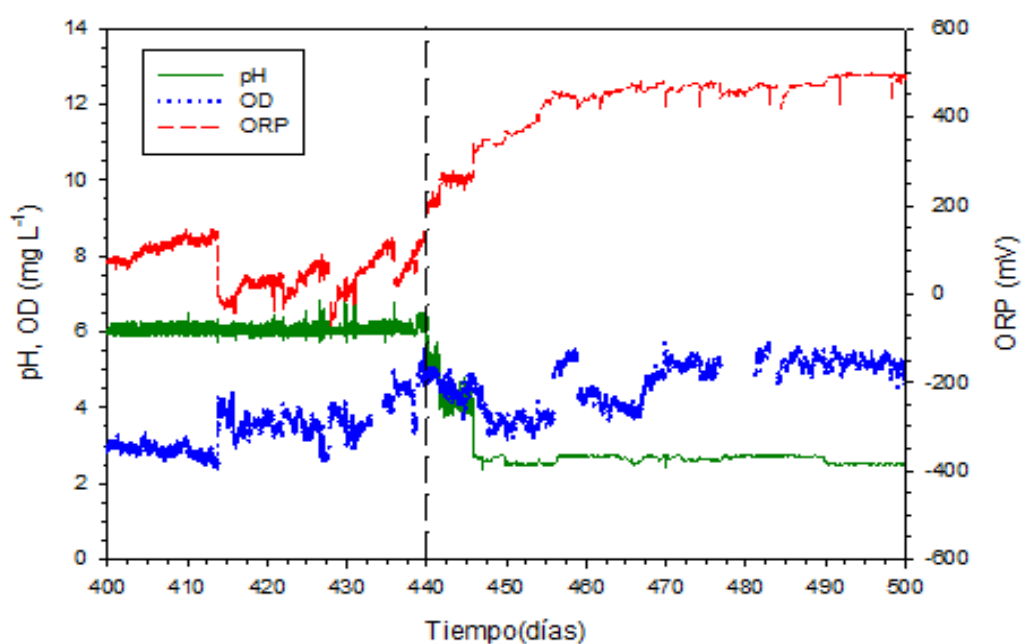


Figura 5.1: Perfiles de pH, oxígeno disuelto (DO) y potencial de óxido-reducción (ORP) antes y tras la maniobra de acidificación. La línea vertical indica el inicio de la transición a pH ácido

Desde el día 209 hasta 240 de operación se aprecia un aumento en el valor disponible de OD, el que ocurrió en virtud de una batería de ensayos. En este caso, se relacionó el incremento en OD con el estrés de la biomasa, y con la disminución en la oxidación biológica. Ya con respecto al valor de ORP, se observa que, hasta el día 440 de operación, su valor se mantuvo entre el 0 y 200 mV, que indicó la no acumulación de sulfuro en la fase líquida (Fortuny, 2009). Una vez efectuada la transición a pH ácido, este comportamiento se altera, y se observa un incremento de ORP hasta equilibrarse en un rango más elevado. No solo la estabilización de la ORP, pero también de OD, indicó el avance a la nueva condición estacionaria a menos de 20 días del cambio.

La realización de un balance de azufre por sustracción permitió calcular la cantidad producida de azufre elemental (S^0), y de esta manera, conocer el rendimiento de la actividad biológica. En la figura 5.2 se aprecia el balance de materia del azufre que fue elaborado por la Dra. Montebello (Montebello et al. 2014) para el acumulado en 600 días. Se indican la cantidad de H_2S (g) eliminada, y las cantidades producidas de sulfato y azufre elemental. La maniobra de cambio de pH se enmarca en la línea vertical rayada. Las graficas indican que, en general, el reactor siguió con una marcada tendencia de producción de sulfato en los dos periodos.

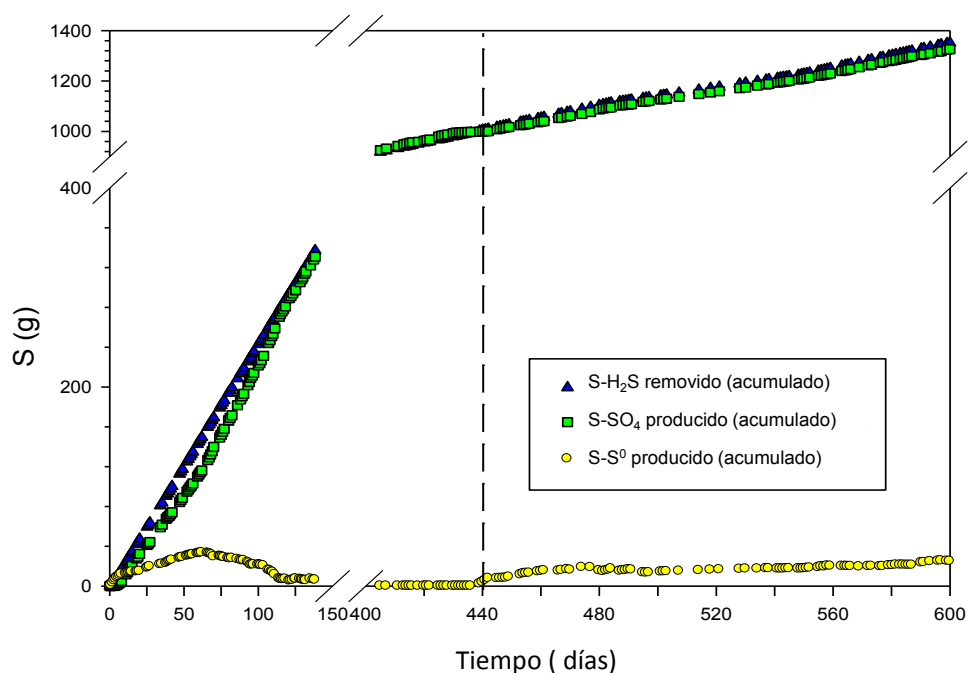


Figura 5.2. Balance de azufre durante 600 días de operación del reactor. Línea vertical indica la ocurrencia de alteraciones operacionales relacionadas al cambio de pH (Imagen cedida por Montebello, 2012).

En general, la maniobra de transición de pH no afectó el rendimiento del proceso de desulfuración (RE próxima al 100%) para las 2,000 ppmv de H_2S tratado. Sin embargo, destacar que se acumuló una cantidad significativa de S^0 durante los seis primeros días de la transición (6.67 g $S-S^0$), que representaría el 42% del total de sulfuro oxidado durante este período. De igual modo, la tasa de producción de azufre biológico fue $23.1 \text{ g } S-S^0 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, o sea, inferior a la tasa más alta encontrada durante la operación a pH neutro ($40.5 \text{ g } S-S^0 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, el día 4). Curiosamente, en este corto periodo de 6 días, la producción biológica de azufre fue persistente (fig.5.2), pero luego, la tasa se redujo significativamente a $3.3 \text{ g } S-S^0 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Más adelante, entre los días 249 y 533, la producción de S^0 sufrió variaciones, en respuesta a las condiciones

impuestas en los ensayos de reducción de tiempos de residencia del gas (des de 130 hasta 33 s) y de incremento de concentración de entrada del H₂S (de 2,000 hasta 10,000 ppm_v). En este periodo, el azufre elemental que se acumuló no se logró eliminar en la misma proporción en que fue producido.

En condiciones de pH neutro, se alcanzaron selectividades a sulfato de 100% a cargas de referencia de 51.1 g S-H₂S m⁻³ h⁻¹, mientras que a pH ácido, la selectividad media SO₄ varió desde 84 hasta 55% en largo plazo. El efecto al final del periodo de operación ácida fue acumulativo, de tal modo que el S⁰, junto probablemente, con otras especies del S, se quedaron atrapadas en la biopelícula. Estos datos sugieren que, a pesar de las condiciones extremas y del estrés impuesto durante los ensayos puntuales, el consorcio microbiano evolucionó a una comunidad capaz de subsistir por largo tiempo, a las condiciones de pH ácido. La producción biológica de S⁰ fue estimada entre un 8 y un 10% superior en comparación con resultados del período neutro. La presencia de sales metálicas de azufre fue observada en muestras tomadas de dos fechas: 3 meses después del cambio, y al final de la operación el día 990. En las muestras del día 990 se visualizaron, bajo SEM, glóbulos de azufre extracelulares adheridos a las células, lo que indicó una situación de oxidación de sulfuro parcial. Los microanálisis realizados con EDX corroboraron la presencia de los metales de azufre y de hierro. La metabolización incompleta del S fue relacionada la presencia de poblaciones que utilizan parcialmente la vía SOX, en pH ácido (Ghosh & Dam 2009). La presencia de de hierro en la muestra se relacionó al fenómeno de biolixiviación, del soporte metálico, ya que las especies *Acidithiobacillus* y *Acidiphilium*, tienen habilidad de hacerlo.

El estado de degradación del material observado en el día 586 fue menos grave que el encontrado 3 meses después en que se encontró desgaste de algunas piezas del material de soporte que estaba localizado en la porción de entrada del gas (Montebello, 2013). Se sometieron muestras de las tres regiones del reactor a EDX-SEM. Como conclusión, se tomó que el material metálico no es adecuado a condiciones de pH ácido.

5.5.2. *Estudio de comunidad*

5.5.2.1. **Evaluación de los métodos de clasificación**

En el momento de la ejecución del presente estudio (año 2012-2013), los métodos de análisis bioinformático de RTL habían sido aplicados para investigar la microbiota de diferentes ambientes como la flora fecal, depósitos de agua potable y ambientes marinos (Hollister et al. 2010; Douterelo et al. 2013; Finegold et al. 2010; Gontcharova et al. 2010). Sin embargo, la inexperiencia en bioreactores generó dudas en cuanto a la coherencia de las clasificaciones y cobertura de los bancos de datos utilizados por ellos para los recuentos.

Tras el análisis detallado de la documentación de protocolos de análisis de diversidad microbiana (Research and Testing Laboratory 2012), se optó por no utilizar los datos de recuentos obtenidos por el método de acercamiento al pariente más cercano. De todo el set de datos de clasificación y recuentos originados en el RTL, se aprovecharon solamente los archivos originales de secuencias (.sff), para generar los índices de diversidad, y aquellos nombrados *traceback*. Esta decisión fue tomada debido a que en estos archivos la estrategia de agrupación de las OTUs permitió revelar tanto las especies reportadas en las bases de datos públicas, cuanto aquellas jamás referenciadas (*unclassified*), sin aproximaciones. De hecho, el método de agregar las secuencias propuesto inicialmente por RTL, bajando la confianza en los alineamientos o forzando a hits de parientes cercanos, se mostró inadecuada para la comunidad del biofiltro percolador. El inconveniente fue comprobado en la anotación de varias secuencias a especies improbables para ecosistema del biofiltro. Un ejemplo fue la anotación de casi un 18% de secuencias de la biblioteca 586d, a 4 especies del género *Dyella*, que está descrito para pH neutro. Los IDs de las secuencias fueron seguidos en los demás archivos de clasificación, y seapuró que en el archivo *traceback* aparecían en otro *clúster* del mismo género, pero no clasificado (*unclassified*). La baja similitud de las secuencias (< 85%) con *Dyella*, fue un fuerte indicativo de la incoherencia del método de agrupación propuesto originalmente. Se detectaron más problemas gracias a información detallada del perfil metabólico que se encontró en la literatura. Tal como se puede imaginar, si el error se repitiera para poblaciones predominantes, podría comprometer la comprensión de fisiológica del biofiltro. La mala interpretación del perfil de la comunidad podría dificultar la comprensión de las respuestas a perturbaciones y a procedimientos de optimización (Cabrol & Malhautier 2011). El análisis complementario de algunas secuencias mediante alineamiento demostró que el inconveniente no se repitió en el set de datos

traceback. En base a esto, se asumió que los archivos *traceback* eran adecuados al objetivo de investigar la diversidad de la comunidad del BTF-H₂S AER.

Con respecto a la distribución de los datos de frecuencia, *fig. 5.3* el perfil siguió un patrón en forma de una “larga cola” (“*long tail*”), de formato asimétrico alargado hacia la derecha. Esto ocurrió debido a la gran cobertura que se logró obtener por *tag-454* es decir, que la diversidad se distribuyó por un gran número de secuencias únicas o dobles (*singleton* o *doubleton*). En general, esta distribución se aprecia en las graficas de abundancia basadas en recuento de secuencias de género y especie. (Amend et al. 2010) y concuerda con el descrito en muchos estudios (Quince et al. 2009; Amend et al. 2010; Haas et al. 2011). En el presente estudio, se tomó en cuenta el someter el set de lecturas a la verificación de calidad previo, que eliminó las OTUs identificadas como quiméricas. El perfil de distribución fue mantenido en concordancia con el esperado, conforme se observa en la figura 5.3. Las especies poco frecuentes correspondieron a un 16.4% y 3.2% en la biblioteca 245d y 586d, respectivamente.

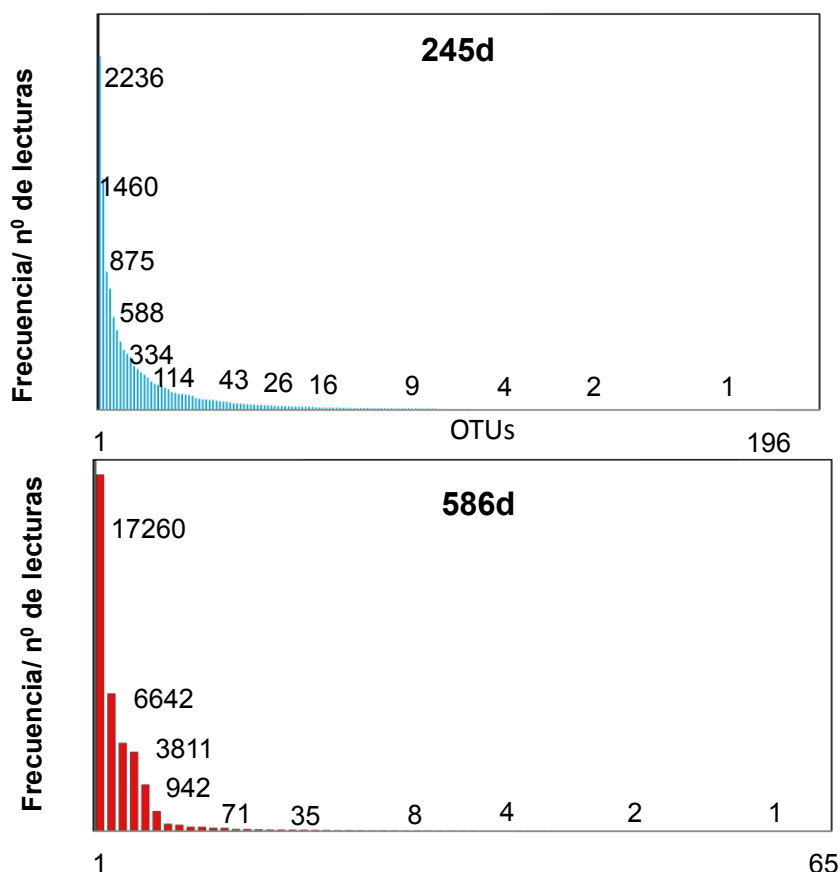


Figura 5.3. Perfil de distribución de frecuencia de las OTUs, agrupadas al 97% de similitud. Observar las diferencias de escala. En el eje de la X, 245d con 196 OTUs y 586d, con 66 OTUs.

5.5.2.2. Estudio del efecto del pH en la diversidad

En el presente trabajo, el análisis de la comunidad del BTF-H₂S AER se centró en OTUs con recuentos superiores a 10 lecturas. La diversidad que se presenta a continuación tomó como base el porcentaje mínimo de secuencias de cada clúster. Los límites establecidos fueron el 0.1% de frecuencia en la muestra del día 245, y el 0.03% en la muestra del día 586 (10 lecturas por OTUs). En las dos bibliotecas se recuperaron 67994 lecturas de secuencias de 473 nt de longitud promedio. Tras el check de calidad, se aprovecharon 38039 lecturas para el análisis de diversidad (9880 para la 245d y 28159 para la 586d). En todos los niveles, se encontró una simplificación de la diversidad microbiana con el cambio de pH. Las curvas de rarefacción de OTUs al 100, 97 y 95% de similitud se aprecian en la figura 5.4. Se observa claramente que la diversidad fue bien descrita y que los datos fueron suficientes para explicar la comunidad.

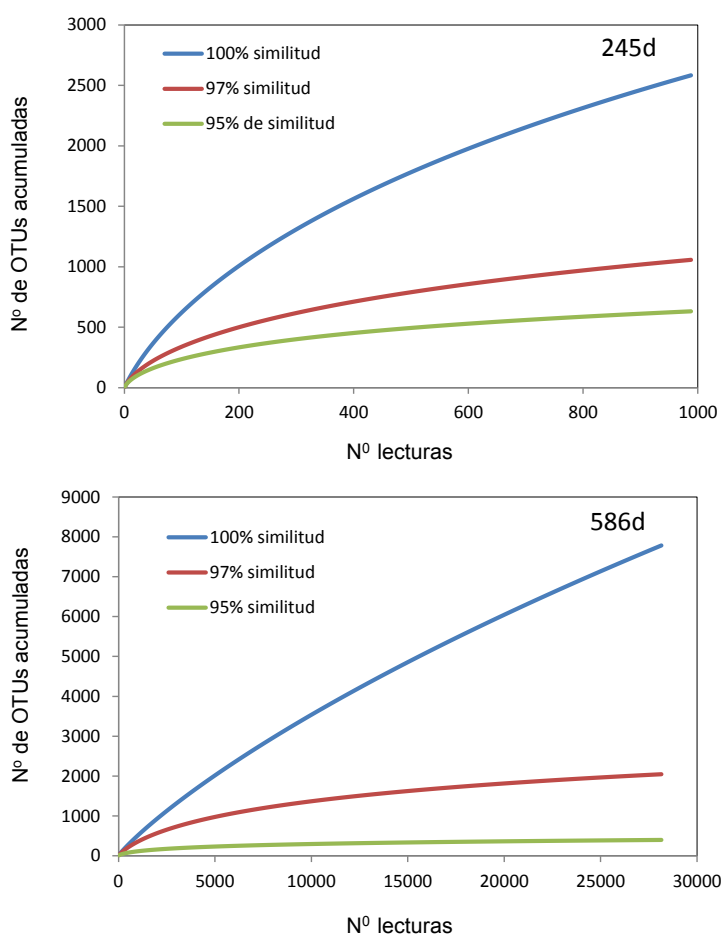


Figura 5.4. Curvas de rarefacción de OTUs para 245d y 586d. Observe diferencia de escala.

Los índices de diversidad, resumidos en la tabla 5.2, muestran la riqueza y la diversidad de muestras integradas de ADN formadas por una mezcla igual de submuestras tomadas de tres regiones del reactor. Por esta razón, los datos muestran los perfiles integrales del sistema en ambas condiciones de operación.

Tabla 5.2. índices *Chao1* y Shannon (*H'*) con equidad (*E*); bibliotecas: 245d y 586d

Library	<i>Chao1</i>	Shannon (<i>H'</i>)	<i>E</i>
245d	1589	5.45	0.78
586d	533	3.19	0.53

Un total de 1589 y 533 OTUs fueron estimadas con *Chao1*, en las muestras 245d y 586d, respectivamente. Al final, tras la agrupación de las OTUs de misma identidad, fueron anotados 129 clústeres repartidos en 11 filos, 19 clases, 44 órdenes y 73 géneros, además de 265 especies en taxones. Los tres indicadores concordaron en que la comunidad sufrió una fuerte presión selectiva, impuesta por el cambio a pH ácido. En la muestra tomada en esta condición, muestra 586b, se observa una reducción de *Chao1* muy marcada mientras *H'* y *E* enseñan una distribución más uniforme de las secuencias que en la muestra 245d. De acuerdo con la información de distribución de frecuencia como abundancia relativa de la figura 5.5 se concluye que la comunidad se caracterizó por una distribución más equilibrada de las secuencias en los taxones superiores, y también por la participación de muchas especies oportunistas, formando una extensa lista de OTUs con menos de 10 hits.

A continuación, se describen los principales cambios en el perfil de la comunidad que se produjeron en respuesta al cambio de pH. Los datos de abundancia relativa para filos (A), clases y géneros (B), se aprecian en la figura 5.5. En el recuadro interior de la figura 5.5 A se aprecian los datos de las clases prevalentes. No clasificadas y contribuciones inferiores al límite fueron agregados en otros.

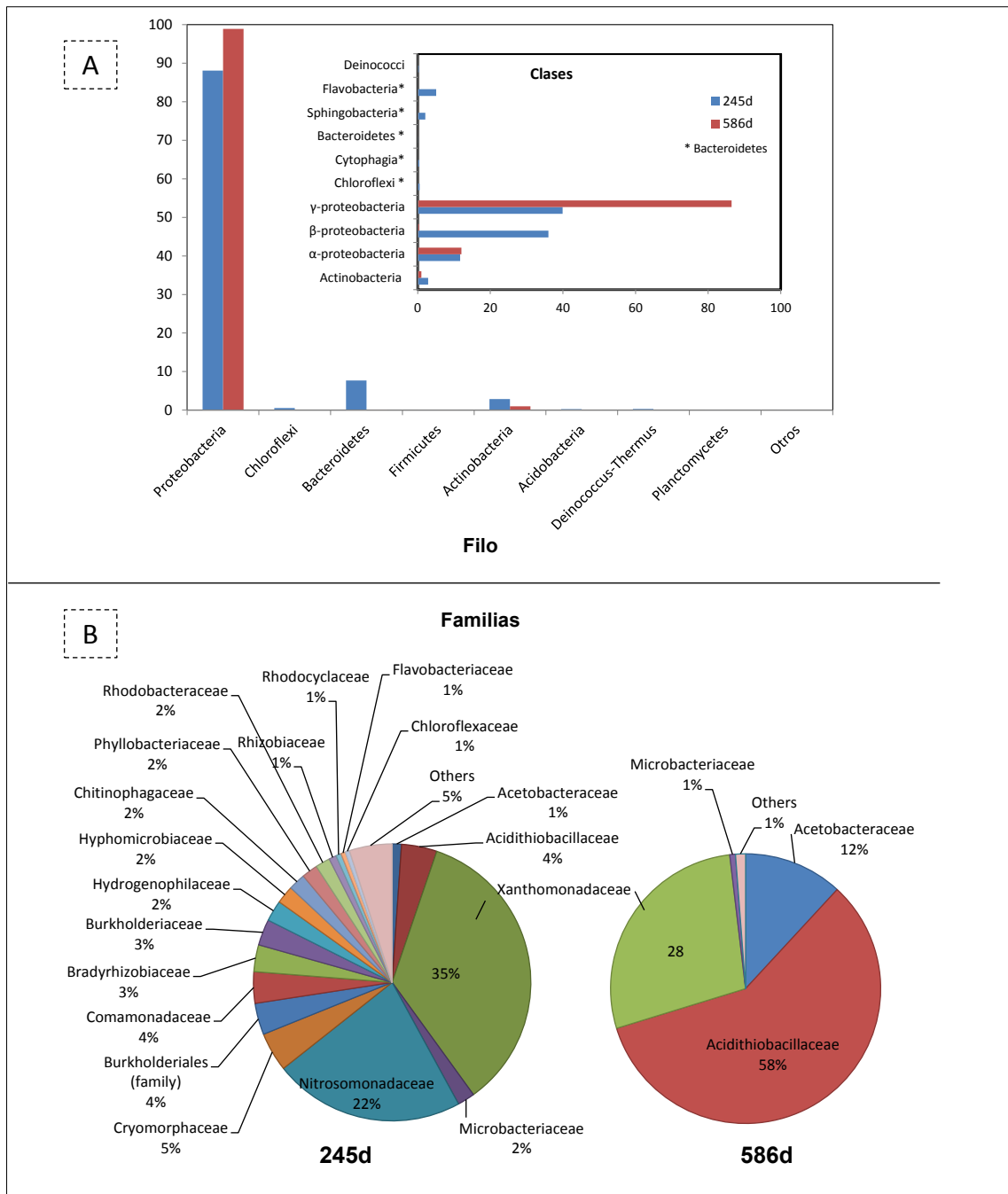


Figura 5.5. Valores aproximados de abundancia relativa para Eubacteria en 245d y 586d, para taxones que contribuyeron con al menos 1% de presencia.

A simple vista, se observa la predominancia del filo proteobacteria en ambas bibliotecas (89 y 99%). También se comprueba la eliminación casi completa de Bacteroidetes tras la acidificación, que llegó a contribuir con hasta un 8% en la muestra 245d. Ya a nivel de clase, fueron observados fuertes cambios. En la muestra 245d la distribución de lecturas fue similar entre *Beta* (β) y *Gamma* (γ) *Proteobacteria*, con aproximadamente un 40% de abundancia de cada una. A pH ácido, la clase β -

proteobacteria casi fue eliminada, mientras *α-proteobacteria* mantuvo el 12%. Destacar el incremento de *γ-Proteobacteria* que incrementó hasta un 82% su abundancia.

La abundancia relativa de lecturas en la biblioteca 245d indicó la prevalencia de los géneros *Xanthomonadaceae* (35%) y *Nitrosomonadaceae* (22%). Otra característica de la población a pH neutro, que se puede apreciar bien en la figura 5-5, que es la mayor distribución de lecturas entre géneros que contribuyeron con un 1 a 5% de lecturas. Además, casi el 73% del total de géneros presentaron menos del 1% de abundancia.

De acuerdo con los resultados de la identificación taxonómica de la biblioteca 245d, los géneros más comunes fueron *Nitrosomonas* (18.4%), *Dokdonella* (11.3%) y *Rhodanobacter* (7%). Estos géneros, a pesar de no estar relacionados con la actividad sulfooxidante, se han encontrado comúnmente en bioreactores para el tratamiento de H₂S (Maestre et al. 2010; Li et al. 2011; Lebrero et al. 2012). Vale la pena mencionar la participación de *Thiomonas*, *Comamonas* y *Thiobacillus* (3% cada una). Juntos, estas poblaciones formaron una interesante fracción de la comunidad compuesta por heterótrofos y nitrificantes comunes, que pueden prevalecer a pH neutro debido a la muerte y lisis de biomasa y a los procesos de amonificación e hidrólisis, entre otros, hechos que apuntan a una potencial competencia por el OD entre bacterias nitrificantes heterótrofas y sulfooxidantes. En el caso del biofiltro actual se procuró optimizar las tasas de OD, a fin de evitar limitación en la actividad biológica. Para ello, se trabajó para mantener un caudal de aire en exceso, para hacer frente a todas las necesidades de oxígeno y así evitar obstaculizar la oxidación de sulfuro a sulfato. Pese a ello, cargas de H₂S elevadas y la presencia de un material de relleno metálico contribuyeron a la formación de azufre elemental.

Curiosamente, ningún otro género importante de BSO-H₂S fue anotado en la muestra 245d. Los datos revelaron una distribución generalizada de la capacidad desulfurizante, sobre todo entre las clases *β* i *γ-proteobacteria* a pH neutro (Tabla 5.3). Otro punto curioso de la distribución fue la participación de *Acidithiobacillus*, que ya alcanzaba el 4.1% de lecturas en pH neutro, el que ilustra el potencial de la comunidad para resistir al cambios. Esta bacteria posee capacidad de sobrevivir en condiciones alejadas de la condición de crecimiento ideal (Ghosh & Dam 2009). Por otra parte, la presencia significativa de bacterias acidófilas es un fuerte indicativo de la presencia de gradientes de pH en las capas internas de la biopelícula y, consecuentemente, de una estratificación de la diversidad microbiana en el espesor de la biopelícula.

Tabla 5.3. Abundancia relativa de especies con más de 1% de las secuencias de lecturas de las bibliotecas 245d y 586d.

Clases	Identidad Géneros	Especies	(%)	
			245d	586d
α -proteobacteria	Acetobacteraceae	<i>Acidiphilium</i> sp⁵	*	11.4
	Bradyrhizobiaceae	<i>Nitrobacter</i> sp ¹	1.9	-
	Hyphomicrobiaceae	<i>Devosia</i> sp ¹	1.1	-
	Phyllobacteriaceae	<i>Mesorhizobium</i> sp	1.7	-
	Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus</i> sp ^{2,4}	1.4	-
β -proteobacteria	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i> (uncl. especies) ²	1.7	*
		<i>Thiomonas</i> sp ^{2,4}	2.9	*
		<i>Thiomonas</i> (uncl. especies) ^{2,4}	1.8	*
	Comamonadaceae	<i>Comamonas</i> sp ²	2.4	-
	Hydrogenophilaceae	<i>T. plumbophilus</i> ^{2,4}	1.6	-
	Nitrosomonadaceae	<i>Nitrosospora</i> sp ^{1,4}	3.4	-
		<i>Nitrosomonas</i> sp ^{1,4}	15.2	-
		<i>N.</i> (uncl. especies) ^{1,4}	1.8	-
		<i>N. eutropha</i> ^{1,4}	1.3	*
γ -proteobacteria	Acidithiobacillaceae	<i>Acidithiobacillus</i> sp^{2,4}	*	9.0
		<i>At. thiooxidans</i>^{2,4}	3.3	45.7
		<i>At.</i> (uncl. especies)²	*	2.7
	Xanthomonadaceae	<i>Dokdonella</i> (uncl. especies) ³	9.8	*
		<i>Frateuria</i> sp ^{1,3}	5.8	-
		<i>Xanthomonadaceae</i> (uncl.)	8.9	27.7
		<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i>	1.0	-
		<i>Rhodanobacter</i> sp ¹	2.6	-
		<i>R. lindaniclasticu</i> ¹	1.3	-
		<i>R.</i> (uncl. especies) ^{1,2}	1.0	-
		<i>Thermomonas</i> sp ²	1.2	-
		<i>Leifsonia</i> sp	1.3	*
		Flavobacteria	Cryomorphaceae	<i>Crocinitomix</i>
<i>C.</i> (uncl. especies)	2.0			-
TOTAL			78.9	96.4

Subrayado, SOB; **Negrita**, especie acidófila; * entre 0 y 1%; - ausencia o especie única; (uncl.) no identificadas. ¹relacionadas con metabolismo de N; ²relacionadas con metabolismo del S; ³heterótrofo; ⁴autótrofo; ⁵mixótrofo.

Otras bacterias relacionadas con el metabolismo de las SOB fueron identificadas en la muestra 245d de entre ellas destacan especies desnitrificantes, anaerobias obligadas o heterótrofas entre las que destacan miembros de los géneros *Azoarcus*, *Hyphomicrobium*, *Sphingomonas* *Rhodanobacter*. En la biblioteca 586d, los datos de abundancia mostraron la prevalencia de apenas 3 géneros: *Acidithiobacillaceae*, con aproximadamente un 58% de abundancia; seguida por *Xanthomonadaceae* (28%); y

Acetobacteraceae (12%). Ninguna bacteria de perfil nitrificante o heterótrofo fue encontrada tras el cambio de pH. En la clase α -*proteobacteria*, fueron anotadas secuencias para *Acidiphilium* sp, una SOB de crecimiento mixótrofo (3.3%). Estos datos ilustran la presión selectiva de la acidificación del microambiente. En esta biblioteca ya se esperaba el favorecimiento de *Acidithiobacillus* como la especie prevalente que garantizó el mantenimiento de la capacidad desulfurante del biofiltro. Conforme los datos de las tablas 5.4 y 5.5 (Anexo 2), la supremacía del género permitió el desarrollo de distintas especies del mismo género en función de nichos distribuidos a micro escala. 4 especies de *Acidithiobacillus* fueron identificadas: *At. thiooxidans*, (46%), *At. sp* (9%), *At. caldus* (0.5), *At. ferroxidans* (0.5). Debido a limitaciones en la clasificación, atribuidas al tamaño reducido de las secuencias, un 3% de lecturas anotadas para este género no tuvieron la identidad confirmada a nivel de especie, y permanecieron agrupadas en *Acidithiobacillus* (*At. uncl.* especie). Tal resultado se ajusta bien al rendimiento robusto del reactor durante la transición de pH, sin que hubiera necesidad de re-inocular el reactor.

El género *Acidithiobacillus*, que es quimiolitotrofo, fue dominante con un 60% de abundancia, hecho que concuerda con datos obtenidos de otros BTFs operados en condiciones de pH neutro (Maestre et al. 2010; Li et al. 2011; Soupramanien et al. 2011). La eficacia de *Acidithiobacillus thiooxidans* en la desulfuración de H₂S fue reportada en estudios con una cepa, AZ11, que demostró buen potencial para tratar concentraciones de H₂S de hasta 2,200 ppm_v, así como para consumir S⁰ en ausencia de sulfuro (Lee et al. 2006). Conforme a la literatura, la utilización de condiciones ácidas para la eliminación de altas concentraciones de H₂S es interesante, en virtud de que las poblaciones acidófilas son más tolerantes a presencia del sulfato, que es producto final de la oxidación. De hecho, para una SOB neutrófila como *Thiobacillus thioparus* se ha referenciado su inhibición por sulfato y sensibilidad a la caída de pH ocasionada por la propia actividad de biodesulfuración (Chung et al. 1996; Aroca et al. 2007; Ramírez et al. 2009). De hecho, en un estudio comparativo entre *Thiobacillus thioparus* y *Acidithiobacillus thiooxidans* se encontraron limitaciones en la reacción biológica, lo que comprometió el mantenimiento del rendimiento en el biofiltro inoculado con *T. thioparus* en altas concentraciones y sin control de pH. De igual modo, se reportó la robustez y constancia del biofiltro de *Acidithiobacillus thiooxidans* (Aroca et al. 2007). El marcado predominio de *At. thiooxidans* en el BTF-H₂S AER se explicó por la afinidad que tiene por el sustrato, favorecida por pH ácido. La supremacía de la especie en la región superior (informada por FISH) fue relacionada a la disponibilidad de aceptor y donador de electrones que favoreció el primer paso de

la oxidación, es decir de la producción de S^0 , mientras en la región inferior se encontró una distribución más equilibrada de las poblaciones así como se observó más células en respecto a sólidos acumulados. Además, los datos del análisis SEM indicaron una acumulación importante de sales en la región intermedia.

Curiosamente, la especie *Acidithiobacillus ferrooxidans* también fue identificada pero con valores de abundancia relativa muy bajos (0.1%). Probablemente esta especie; que es aerobia obligada, no pudo competir con *At. thiooxidans* por su afinidad al sulfuro, y más por requerir altos niveles de OD para oxidar el hierro comparada con *Acidiphilium sp* y *At. thiooxidans*, que pueden hacerlo en condiciones de anaerobiosis. De acuerdo con estudios de FISH, descritos en la parte II del documento las α -*proteobacterias* fueron más frecuentes en la región inferior del reactor, en donde el OD estuvo limitado. En base a estos datos, se asumieron que en aquella región la población de *Acidiphilium* fue responsable de la conversión de S^0 a SO_4^{2-} . La presencia de *Acidiphilium sp.* se explicó por adecuación al nicho ecológico, ya que puede crecer mixotrofamente con S^{2-} en presencia de O_2 y S^0 en su ausencia (Ghosh y Dam 2009, Norlund et al 2009).

Al comparar los resultados alcanzados en el presente estudio con aquellos reportados por Li y colaboradores (2011) para BTFs- H_2S se observan coincidencias como por ejemplo la importancia del tipo de soporte a la hora de seleccionar los miembros de la comunidad, la tendencia de predominio de los miembros extremófilos (destacando el género *Acidithiobacillus*) y la robustez del sistema para eliminar H_2S en condiciones de pH ácido. A diferencia del estudio de Li y colaboradores (2011), en el BTF- H_2S AER se controló el pH y se logró eliminar altas cargas de H_2S (de 2,000 hasta 8,000 ppm_v) con alta eficacia de eliminación. Como resultado se favoreció la estabilización de la fracción acidófila de la comunidad en distintas regiones del biofiltro, en función de gradiente de OD y de la disponibilidad de especies de S. También, la estabilidad de la operación permitió la aclimatación del cultivo, lo cual resultó ser importante para el desarrollo de especies acidófilas en el BTF- H_2S AER.

Finalmente, se buscó relacionar los principales problemas encontrados al operar el BTF H_2S AER a pH ácido, como la acumulación del S^0 en la biopelícula y el deterioro del material de relleno, con el perfil de la comunidad. El deterioro fue inicialmente atribuido a la formación de ácido sulfúrico, pero hay un componente biológico que probablemente contribuyó al deterioro. En este caso, la explicación es la probable asociación simbiótica entre *Acidithiobacillus thiooxidans* con *Acidiphilium sp*, que son conocidos por llevar a cabo la biolixiviación de sulfuro metálico, con hierro (Norlund et

al. 2009). Esta habilidad llevó a suponer que el crecimiento de la biopelícula en la superficie metálica de los *pall rings* fue responsable por lixiviar parte de los metales de su composición.

5.6. Conclusiones del Capítulo

Con respecto al empleo de la *tag-454* como metodología de estudio de la comunidad del BTF-H₂S AER los resultados reportados en este capítulo demostraron que a pesar de las discrepancias en el tamaño de las bibliotecas los datos de abundancia relativa fueron adecuados para describir el componente biológico.

Con respecto al efecto del pH sobre la comunidad se pudo concluir que:

- ✓ no se afectaron las capacidad de eliminación de H₂S en el BTF al pasar de pH 6.5 a 2
- ✓ a pH neutro se encontró mayor diversidad inclusive especies heterótrofas y nitrificantes además de las SOB el que comportó cierta competencia por el DO.
- ✓ la diversidad a pH neutro fue mucho mayor que a pH ácido debido a la presión selectiva del medio ambiente.
- ✓ la presencia de especies acidófilas durante la operación a pH neutro apunta a un fuerte gradiente de pH en el interior de la biopelícula del BTF
- ✓ no fue necesaria la re inoculación del BTF cuando se modifica de forma progresiva el pH de operación entre condiciones neutrófilas y acidófilas

En relación a los cambios en la estructura de la comunidad se pudo concluir que:

- ✓ en la biblioteca 254d las poblaciones SOB no fueron las más abundantes, pero compartirán recuentos aproximados de lecturas de secuencias, A nivel de las especie (similitud $\geq 97\%$) destaque para *Nitrosomonas* (17%), seguida por *Frateuria sp* (5%), luego *Rhodanobacter*, *Nitrosospira sp.*, *Acidithiobacillus sp.*, *Thiomonas sp*, *Comamonas sp.* que participaron con entre 1.5 y 4% de lecturas
- ✓ En la biblioteca 586d las SOB fueron protagonistas alcanzando valores de abundancia muy superiores a lo que obtuvieron en el periodo anterior. Destaque para *Acidithiobacillus sp.*, 9%; *At. thiooxidans*, 46%; *Acidiphilium sp.* 9%.

CAPÍTULO 6

***Estudio de diversidad de Bacteria en biofiltro
percolador anóxico para desulfuración de***

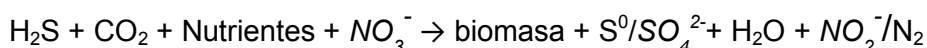
H₂S

6. Estudio de diversidad de Bacteria en biofiltro percolador anóxico para desulfuración de H₂S

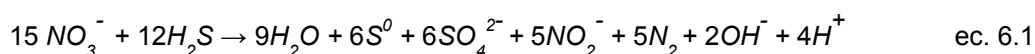
6.1. Introducción

6.1.1. Mecanismo de la biofiltración anóxica de H₂S del biogás

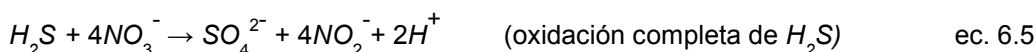
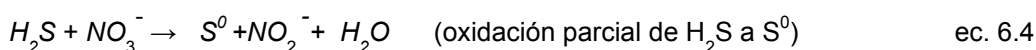
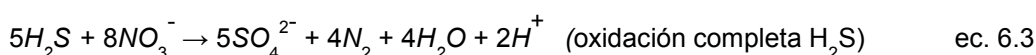
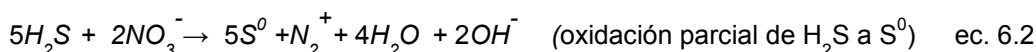
El proceso microbiológico de la desnitrificación permite llevar a cabo la desulfuración de biogás en condiciones anóxicas. En biofiltros anóxicos este proceso de reducción del nitrato (NR-SO) se suele explicar por medio de la reacción biológica descrita por (Soreanu, Béland, et al. 2008), cuando al final del proceso se obtiene la oxidación del compuesto de azufre reducido (H₂S) a azufre elemental y/o sulfato, mediante la reducción del nitrato a nitrito o nitrógeno gas, de acuerdo al siguiente mecanismo:

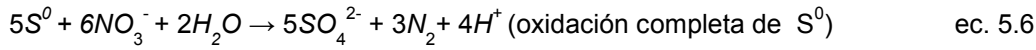


Los detalles de las transformaciones biológicas del H₂S y del NO₃⁻ se describieron por primera vez en Cardoso y colaboradores (2006), mediante una ecuación de óxido-reducción global, que se reproduce en ec. 5.1.



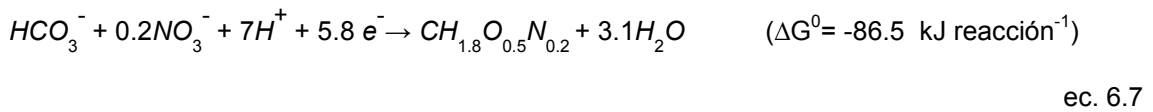
En dicha ecuación se aprecian los dos productos azufrados y nitrogenados resultantes de la oxidación completa, que en los dos casos, se forman en proporciones muy similares (6S y 5N). Una característica de la ruta, que se denomina ruta de reducción del nitrato, es que la reducción es de tipo disimilatoria, es decir que los productos no son utilizados en el catabolismo microbiano. Las conversiones de los donadores de electrones, H₂S (ec. 5-2 a 5-5) y S⁰ (ec. 5-6), con NO₃⁻ como aceptor de electrones, para la desnitrificación completa y parcial se presentan en las ecuaciones 5.2 a 5.6:



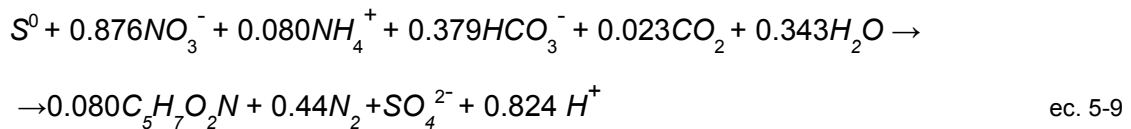
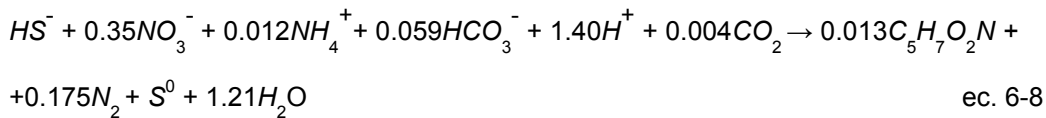


Las ecuaciones anteriores indican que la conversión a azufre en la desnitrificación completa consume hasta cuatro veces menos nitrato en comparación con la oxidación completa a sulfato. Además, la comparación muestra un mayor consumo de nitrato en las reacciones que implican desnitrificación incompleta a nitrito.

El crecimiento microbiano fue estudiado en *T. denitrificans* con el HCO_3^- como fuente de carbono. El mecanismo desnitrificante se enseña en la ec.5.7 (Kleerebezem & Mendez 2002).



Respecto al comportamiento de la biomasa desnitrificante, en un estudio reciente, fue reportado que el acoplamiento de los procesos dependió más de la composición de la microbiota (cultivo puro o consorcio), que de la concentración de sustrato (Mora et al. 2014). En el mismo trabajo se describieron las ecuaciones parciales para la desnitrificación completa, en dos pasos, con H_2S de donador de electrones (ecs. 5.8 y 5.9).



De acuerdo con estas ecuaciones cuando no hubo limitación de nitrato se produjo la oxidación de H_2S hasta SO_4 con formación de N_2 , además de crecimiento celular. El referido estudio sirvió para la elaboración del modelo matemático que describió el comportamiento del BTF- H_2S ANOX, el que en la práctica ayudó a mejorar la performance y incrementó el control sobre la planta (Almengló, 2014).

6.2. Antecedentes

La eliminación biológica del H_2S del biogás en condiciones anóxicas es una tecnología muy reciente (Soreanu, Béland, et al. 2008 Fernández et al. 2013) que aún necesita una investigación a fondo. Un biofiltro percolador anóxico es similar a uno de tipo aerobio en lo que se refiere al diseño, material de relleno y condiciones de operación. De la misma manera, el gas se puede inyectar tanto en flujo ascendente (contracorriente respecto a la fase líquida) como descendente (en paralelo al flujo de líquido), y la circulación de líquidos se puede hacer de modo continuo o discontinuo. Lo peculiar de este proceso es que debido a la naturaleza de las reacciones biológicas (desnitrificación), se necesita de una fuente externa de nitrato además de carbono, hecho que permite acoplar la eliminación del $S-H_2S$ con la degradación del $N-NO_3$ proveniente de aguas de EDAR (Soreanu, Falletta, et al. 2008; Almenglo et al. 2013).

En comparación con biofiltros orgánicos los BTFs anóxicos presentan mejores rendimientos de desulfuración, no obstante los resultados han sido similares a aquellos descritos para los BTF aerobios (Montebello et al. 2012).

Para algunas corrientes gaseosas de especial interés industrial, como es el biogás, la tecnología anóxica presenta la ventaja de no necesitar diluir el metano en aire. Esto es muy interesante debido a que ayuda a prevenir problemas relacionados a la pérdida del valor energético del biogás y al aumento en el riesgo de explosividad (Syed et al. 2006). Otros inconvenientes que sufre la tecnología son la dependencia de una fuente externa de nitrato, y el estricto control del pH. Además, debido a las características del ambiente (condiciones mesófilas de T y pH neutro), se favorece el desarrollo de poblaciones relacionadas al N pero que no tienen capacidad SO , más que compiten por el nitrato. Pese a ellos, la desulfuración anóxica de biogás por vía de la desnitrificación reúne los requisitos de las biotecnologías de altas prestaciones, ya que permite tratar al mismo tiempo, a los contaminantes de los distintos residuos, a menor coste, además de agregar valor monetario a los productos finales (Syed et al. 2006). No obstante, a lo largo de los años, se anotaron los principales inconvenientes: fuente de nitrato, operación a pH neutro y por tanto desarrollo de especies competidoras por el nitrato

El primer montaje experimental de un BTF anóxico se construyó en 2006 (Anon 2007), y desde entonces mucho ha sido investigado. Su sustentabilidad y la buena eficacia del proceso se comprobaron pronto. La elevada eficacia de eliminación (99%); que se alcanzó a pocos días después de la inoculación fue uno de los primeros aspectos

explotados (Soreanu et al. 2008). La rápida formación de la biopelícula, su aspecto microscópico y la acumulación o colmatación de S^0 en la matriz del biofilm fueron los temas microbiológicos reportado con más frecuencia (Soreanu, Falletta, et al. 2008; Soreanu et al. 2009; Montebello et al. 2012; Almenglo et al. 2013; Fernández et al. 2014). En aquellos estudios se confirmaron la dependencia entre la eficacia de eliminación y la disponibilidad de $S-H_2S$ y $N-NO_3$, con la tendencia a colmatación del lecho por acumulación de biomasa o azufre cuando los factores ambientales no han sido optimizados. Estudios en aguas desnitrificantes reportaron con anterioridad que el desplazamiento del rendimiento hacia un producto (S^0), u otro (SO_4^{2-}), se induce mediante la optimización de la concentración inicial de NO_3^- (Krishnakumar & Manilal 1999).

Los estudios llevados a cabo por Soreanu y colaboradores (2008) concordaron en que la eliminación de sulfuro depende de las concentraciones de aceptores y donadores, (la relación entre los componentes se referenció como ratio S/N), y que, a depender de la ratio de S/N, los desnitrificantes pueden cambiar de ruta metabólica (Soreanu, Falletta, et al. 2008).

Los procesos de desulfurización del biogás vía desnitrificación han sido investigados también en biolavadores, en donde se comprobó que la carga de contaminante es un parámetro clave para la eficiencia del proceso (Baspinar et al. 2011). Los mismos autores reportaron la tendencia del proceso para desnitrificar parcialmente con producción de nitrito y azufre elemental.

En la tabla del Anexo 3 se resumen algunas de las características de los sistemas para biofiltración anóxica de biogás que se revisaron para este trabajo. Los datos recompilados demuestran que los estudios fueron muy semejantes, siempre centrados en la caracterización de los distintos materiales de relleno (orgánico o inorgánico) y de los parámetros abióticos, prioritariamente: la temperatura, el pH, el efecto de la carga y del caudal de biogás, la velocidad de percolación y los tiempos de residencia hidráulico de la fase líquida y del tiempo de residencia del gas. De igual modo se buscó relacionar la degradación biológica del sulfuro con la demanda de nitrato. En especial, se comprobó el papel preponderante de la carga de sulfuro sobre la eficacia de eliminación. y se investigó el efecto de las concentraciones de entrada de H_2S y de la ratio S/N (Soreanu, Falletta, et al. 2008; Soreanu, Béland, et al. 2008; Soreanu et al. 2009). Desafortunadamente no se encontraron informaciones de composición de la comunidad microbiana ni, tampoco de ecología del biofilm.

En los reactores anóxicos, igual a lo que ocurrió en los estudios con reactores aeróbicos, en general se utilizó inoculo aclimatado proveniente de EDAR, cuya composición no fue definida. Soreanu y colaboradores (2009) utilizaron efluente tomados de tanques SBR, como inoculo y como fuente de nitrato. Otros investigadores emplearon lodo desnitrificante para generar la biopelícula y agua de la propia EDAR como base para la elaboración de la solución de nitrato (Montebello 2013; Fernández et al. 2013). Para ahondar en su estudio, Mora y colaboradores (2014) utilizaron como fuente de biomasa material del BTF-H₂S ANOX recogido en el estadio estacionario para poner en marcha el respirómetro montado para averiguar los perfiles de conversión del nitrato y del tiosulfato. Los resultados demostraron que el nitrito fue el producto principal de la degradación, aunque los productos finales de la reacción biológica estuvieron influenciados por la aclimatación a nitrito y por la ratio S/N. Las tasas de oxidación no fueron afectadas por las concentraciones aplicadas. Lo más interesante para aquellos investigadores fue encontrar que la tasa de absorción específica del nitrito dependió en primer grado, de la composición de la biomasa, siendo superior en el cultivo mixto (indeterminado) cuando se comparó con un cultivo de referencia de *T. denitrificans*. Para esta tesis, los datos reportados por Mora y colaboradores (2014) fueron importantes porque remarcaron el potencial desnitrificante de la comunidad del BTF-H₂S ANOX. Por otro lado la información de composición del consorcio del respirómetro, que no fue investigada, habría ayudado en la comprensión de los mecanismos de la desnitrificación que ya se sabe, dependen de la ruta que el microorganismo utiliza, y del potencial genético de cada población (Ghosh & Dam 2009; Cabrol & Malhautier 2011; Lu et al. 2014).

Las especulaciones al respecto de los mecanismos de la biofiltración con NR-SO se basaron, hasta poco tiempo, en los modelos matemáticos de degradación y metabolismo que fueron obtenidos de estudios con cultivos puros de las especies desnitrificantes *Thiobacillus denitrificans* y *Sulfurimonas denitrificans*. En el caso de aplicarse cultivos puros en la biofiltración, el conocimiento acumulado de ambas especies puede contribuir a la hora de optimizar los parámetros de proceso. Pero, como la tendencia es utilizar consorcios de composición indefinida, ni las descripciones ni tampoco los modelos cinéticos de biomasa homogénea son los ideales a la hora de hacer los ajustes finos para operación.

Con respecto a la actividad microbiana se pudieron encontrar algunas contribuciones al respecto de la cinética microbiana (Fernández et al. 2013; Fernández et al. 2014; Mora et al. 2014), pero como se ha comentado, ninguna información detallada de composición de los consorcios se forneció. En un estudio complementario, Mora (2014)

reportó la sorprendente complejidad de la comunidad del respirómetro, que se vio representada por muchas bandas en gel de DGGE y también la baja abundancia de *Thiobacillus denitrificans*.

6.2.1. Ecología de la biofiltración anóxica

6.2.1.1. Componente de proceso

En entornos denitrificantes los factores medio-ambientales claves suelen ser la disponibilidad de oxígeno, la temperatura, el pH, disponibilidad de aceptores y donadores de electrones y la fuente de carbono (Lu et al. 2014). El oxígeno, es el parámetro clave que determina la condición fisiológica, y como tal, tiene un papel clave en la actividad de las reductasas NR. En ambientes micro-aerófilos, la supervivencia de bacterias denitrificantes se determina por la concentración de OD. Para sistemas acuáticos, se ha visto que el límite de saturación de OD es bajo, cercano a 0.2% y, arriba el cual ocurre la inhibición de las reductasas (Lu et al. 2014). El pH y la temperatura ideales para la desnitrificación están entre el 7-9 y 20-30 °C, en respectivo. Para valores alejados del óptimo se han reportado la reducción y paralización de la actividad, con acumulación de N₂O o NO₂ (Saleh-Lakha et al. 2009). El pH que se debe aplicar para operación de un BTF anóxico debe ser el compromiso entre los óptimos para los dos componentes: aceptores y donadores de electrones (Fernández et al. 2014). De acuerdo con la literatura, pH neutro es el ideal para la actividad de las reductasas, siendo que valores por debajo de 6, producen la inhibición de la enzima óxido nitroso reductasa; el que promueve la acumulación de óxido nitroso. En cultivo, el proceso de la desnitrificación fue inhibido en su totalidad a pH 5 (Ahn 2006).

Los aceptores de electrones son nitrato, nitrito y óxido nitroso, que a la vez son los reguladores sobre las reductasas. Como aceptor preferencial, el nitrato es capaz tanto de inducir a todas las 4 enzimas, cuanto su ausencia es capaz de inhibir el sistema, mismo bajo condiciones de anaerobiosis. Ya la inhibición por nitrito, es más compleja una vez que puede estar asociada a la presencia del ácido nitroso no disociado (HNO₂). La dependencia de la capacidad de disociación del sistema hace que la influencia de los factores ambientales como pH y T, además de la fuente de carbono, sea crucial para la desnitrificación completa. El óxido nítrico, a su vez, es un fuerte inhibidor de las N reductasas mientras el óxido nitroso no es capaz de regular negativamente la expresión, pero sí es capaz de estimular la síntesis de la óxido

nitroso reductasa (Lu et al. 2014). En base a esto se puede concluir que, en sistemas de tratamiento biológico con NR-SO, el ajuste de concentración de los aceptores frente a los donadores es un paso clave para alcanzar mejores rendimientos.

La microbiota en los BTFs crece en función de la compleja hidrodinámica y, claro, de la disponibilidad de S y N. Ambos parámetros son clave para la redistribución de los productos del metabolismo. Almengló (2013) reportó la influencia de la maniobra de recirculación y la importancia de la velocidad superficial del líquido (TLV) sobre la EC. Al incrementar el caudal de líquido (de 1 a 3 m³ h⁻¹) y la carga hasta 130 gS m⁻³ h⁻¹ se logró mejorar en un 10% la eficacia (pasó del 84 al 95%). En sistemas aeróbicos se ha visto que la recirculación parcial de líquido purgado tiene influencia directa en la diversidad; en efecto, la estrategia de recirculación tiene como objetivo, promocionar una pseudo-estabilidad, tanto a lo largo del tiempo cuanto en la longitud de la columna (Maestre et al. 2010).

6.2.1.2. Componente biológico: comunidad microbiana

Como ya se comentó con anterioridad, debido a la novedad que representa la tecnología de biofiltración desnitrificante, muy poca información de diversidad microbiana se encontró en la literatura.

En sistemas de tratamiento de aguas, se encontró que los grupos NR prevalentes son en general de la clase de Betaproteobacteria, principalmente miembros de la familia Rhodocyclaceae (géneros *Thaurea* y *Azoarcus*); familia Comamonadaceae (género *Acidovorax*); y, a la clase Alphaproteobacteria; familia Rhodobacteraceae (género *Paracoccus*); familia Hyphomicrobiaceae (género *Hyphomicrobium*) (Lu et al. 2014). En realidad, estos datos sirven como un indicativo de que la eliminación se investigó sobre la vía heterótrofa, que refleja el interés en la eliminación conjunta de materia orgánica. Para sistemas basados en desnitrificación autotrófica, la competencia entre poblaciones heterótrofas y autótrofas resulta perjudicial, ya que los dos grupos competen, además del nitrato, también por otras fuentes de nutrientes (Madigan et al. 2010). En base a este conocimiento se puede suponer que en la desulfuración anóxica de biogás, la presencia de los NR heterótrofos pueden comprometer la eficacia de remoción de S-H₂S.

Poblaciones quimiolitioautotróficas, relacionadas a NR-SO, que fueran reportadas para el fondo oceánico y lodo desnitrificante son de interés para la biofiltración anóxica de

biogas. Este proceso involucra miembros de los géneros, *Sulfurimonas*, *Thioalkalivibrio*, *Sedimenticola* y *Dechloromarinus*, (Narasingarao & Häggblom 2006; Xiao et al. 2010). y *Thiopfundum* (Mori et al. 2011). Muchas de estas bacterias mantuvieron, al largo de la evolución, el potencial para desnitrificar sobre sulfuro y/o azufre elemental, con nitrato y/o nitrito hecho que las tornan atractivas para explotación para desulfuración biológica.

Pese al creciente interés por los procesos basados en la actividad desnitrificante autótrofa, más especies de perfil quimiolitautotróficas han sido descubiertas y caracterizadas. Sin embargo, a pesar de todos los argumentos a favor de la inclusión de análisis ecológicos en el abanico de herramientas de monitorización de bioprocesos, su adopción aun no se ha concretado debido a limitaciones en el acceso a la diversidad y a la expresión de genes. En los pocos estudios llevados a cabo con biomasa nitrato-reductora sulfooxidante (NR-SO), tomada de BTFs (Soreanu et al. 2008; Fernández et al. 2013; Mora 2014), la falta de conocimiento en ecología microbiana llevó a una forzada simplificación de las estrategias de investigación y representación inadecuada de la composición de las comunidades.

Las nuevas plataformas de secuenciación han permitido re-describir y re-organizar la taxonomía de especies denitrificantes relacionadas a *Thiobacillus* y *Sulfurimonas*, que son explotadas por su habilidad en crecer tanto en condiciones aerobias como anóxicas (Kelly & Wood 2000; Gevertz et al. 2000) También se estudiaron algunas especies de denitrificantes facultativas como *Thiobacillus versatus* y *Paracoccus denitrificans* por la incapacidad de oxidar sulfuro en condiciones anaerobias (Madigan et al. 2010). Todos estos estudios se hicieron para ampliar su aplicación en procesos biotecnológicos, el que abre muy buenas perspectivas para el desarrollo de sistemas de biofiltración de corrientes de gases de características especiales.

De todo lo expuesto, se observa que a pesar de los recientes avances en la caracterización de los componentes del proceso anóxico, tanto a escala de laboratorio como piloto (Syed et al. 2006; Soreanu, Béland, et al. 2008; Soreanu, Falletta, et al. 2008; Soreanu et al. 2009), la dinámica de las comunidades no se ha aclarado. Para Cabrol & Malhautier (2011), la comprensión de la dependencia que existe entre los dos componentes: biológico y de proceso, debería ser el incentivo que falta al desarrollo de nuevas metodologías de seguimiento de los biofiltros. Este tipo de abordaje se debe llevar a cabo por personal calificado en ecología microbiana o microbiología una vez que involucra métodos de búsqueda filogenética. Los buenos resultados recién alcanzados en el área de tratamiento de aguas sirven para reforzar la importancia de

planificar investigaciones interdisciplinarias que involucren aspectos de la ingeniería de biofiltros y de microecología.

6.3. Motivaciones y objetivos

La biofiltración anóxica de H₂S es el objeto de estudio del grupo de investigación de la Universidad de Cádiz. El esfuerzo dedicado por este grupo para poner a punto a punto la tecnología se ve reflejado en el volumen de trabajos que han publicado hasta la fecha. En la tabla de artículos publicados en el anexo 3 se puede apreciar que tanto la implementación de la tecnología cuanto el desarrollo de la operación han avanzado a pasos largos. Hasta la fecha, el trabajo envolvió tanto biofiltros a escala laboratorio, como a escala piloto. Se probaron distintos materiales de relleno y condiciones de operación destacando los resultados del aprovechamiento del agua residual de la propia EDAR como fuente de nitrato (Montebello et al. 2012; Almenglo et al. 2013, Fernández et al. 2014). Además de los temas de operación, se estudió la cinética de la desulfurización-desnitrificación en dos pasos, elaborado con datos obtenidos por métodos respirométricos (Mora et al. 2014).

En el caso concreto del biofiltro BTF-H₂S ANOX, un intento de obtener información de composición de la comunidad se realizó con anterioridad. En aquel trabajo se aplicó la técnica de DGGE, pero la identificación de las bandas no fue concluida por limitaciones del personal involucrado en el estudio. En aquel momento la dificultad en entender la dinámica microbiológica sirvió como un catalizador a idea de utilizar aproximaciones basadas en análisis genómico para tener el acceso a composición de las comunidades. Puesto esto, la propuesta de investigar a fondo la diversidad utilizando el abordaje *tag-454* fue planteada para ser ejecutada en la presente tesis. Al mismo tiempo, los buenos resultados alcanzados en el estudio de la influencia del pH sobre la diversidad que se realizaron en el BTF-H₂S AER de la UAB sirvieron como argumento de apoyo. La propuesta también fue atractiva ya que representaba una oportunidad para poner a punto los procedimientos específicos que se aplicarían en estudios de comparativa de comunidad. Y más, representaba la oportunidad de corroborar la fiabilidad de la técnica de pirosecuenciación 454 Roche y de agregar más información al respecto de la accesibilidad a las herramientas de análisis del *Ribosomal Database Project* (RDP).

Los dos objetivos principales que se plantearon para el BTF-H₂S ANOX fueron: primero probar las herramientas de análisis de comunidades, disponibles en el RDP; y

segundo, describir el comportamiento de la comunidad de bacterias en tres momentos de la operación. Los objetivos específicos se presentan a continuación.

A lo largo del trabajo, se buscó:

- ✓ Comprobar la acurácia de la bases de datos del RDP. En concreto evaluar la eficiencia del protocolo RDP para clasificar secuencias tomadas de muestras del biofiltro anóxico.
- ✓ Aplicar la herramienta de comparativa de bibliotecas *RDP Library Compare en el seguimiento de* la dinámica de la comunidad.
- ✓ Estudiar la estratificación de la microbiota del biofiltro, en modo paralelo, a fin de verificar la contribución de las especies desnitrificantes en las regiones de entrada y salida del gas.
- ✓ Estudiar, mediante comparativa, el efecto de las siguientes condiciones de operación sobre diversidad de bacterias; con método *tag454*:
 - régimen de alimentación de gas: en paralelo frente a contracorriente.
 - alimentación de la fase líquida en continuo, (régimen de operación sin recirculación); en régimen contracorriente.
 - operación sin control de pH o de temperatura.

6.4. Materiales y métodos

En el biofiltro anóxico (BTF-H₂S ANOX), se estudiaron los cambios en la comunidad microbiana promovidos por algunas condiciones de operación, La descripción del montaje, las condiciones de operación y los métodos analíticos generales se pueden consultar en el apartado de materiales y métodos de la parte 1. En aquel apartado, se aprecia una imagen real tomada del set de operación, del material de relleno, y se presenta el esquema que ilustra el mecanismo de funcionamiento de la planta. En el presente capítulo se adjuntan los detalles de los cambios implementados sobre las condiciones investigadas. La metodología *tag-454*, y el análisis de diversidad siguieron el protocolo detallado en el Capítulo 3 Materiales y Métodos, de modo que en el presente capítulo solamente se complementa la información relacionada a los ensayos.

6.4.1. Condiciones de operación

El biofiltro operó durante un total de 438 días, tanto en régimen contracorriente (flujo de líquido en sentido descendente y del gas en sentido inverso), como en régimen paralelo, con ambas fases alimentadas desde la parte superior de la columna. La operación se dividió en 5 fases, que se ilustran en la tabla 6.1 y que se explican a continuación.

Tabla 6.1. Fases de operación y características de las muestras de biomasa

Fase – operación	(días)	Muestra biomasa		Estudios tag-454
		Nombre	Día	
1- Contracorriente	297	-	-	-
2- Paralelo	63	Ca-A (entrada)	343	Comparativa de diversidad
		Ca-B (salida)		
3- Período sin biogás	7	-	-	-
4- Contracorriente	34	-	-	-
5- Contracorriente (sin recirculación de líquido)	14	Ca-C (entrada)	415	Efecto de la operación sin recirculación
6- Contracorriente (sin control de pH)	23	Ca-D (entrada)	438	Efecto del pH

-Fase 1: Durante 297 días la operación fue conducida en régimen contracorriente. Se llevaron a cabo la gran mayoría de los estudios pero no se hizo el seguimiento de la comunidad microbiana. Un estudio respirométrico, con biomasa tomada del BTF-H2S ANOX fue ejecutado por otro miembro del grupo de investigación. Además, al final del período se tomaron fotos de la biomasa adherida al soporte por microscopía electrónica (SEM). El período fue dedicado a pruebas y establecimiento de las condiciones de operación padrones. Se estudiaron, por ejemplo, la relación entre la concentración de sulfuro disuelto y de nitrato así como se ensayaron distintos caudales de biogás. Mientras tanto, se mantuvieron constantes las condiciones de pH y T además del régimen de alimentación de gas y líquido: en sentido contracorriente.

-Fase 2: Para esta etapa el sistema fue cambiado a régimen paralelo y se hicieron estudios similares a aquellos de la fase 1. Esta segunda etapa perduró 63 días, y fue cuando se iniciaron los estudios de diversidad que son parte de la presente tesis. Fueron tomadas dos muestras de biomasa al día 343 de operación: una arriba (Ca-A) y otra en la región de abajo del reactor (Ca-B).

Completado el período en régimen paralelo el biofiltro volvió a operar en contracorriente, para realización de estudios complementarios.

-Fase 3: El período duró solamente 7 días y no se alimentó el biogás a fin de lavar el lecho del S⁰ que se acumuló a lo largo del tiempo.

-Fase 4: Tras el corto período de “starvation” se restableció la alimentación de biogás. El sistema se mantuvo 34 días bajo las condiciones establecidas como referencia para el tratamiento de biogas y el objetivo fue el de volver otra vez un estado estacionario comparable al de las fases 1 y 2. Esta maniobra fue muy eficaz y la capacidad de desulfuración volvió a los valores normales ($\pm 95\%$).

-Fase 5: En esto período se eliminó la maniobra de recirculación, es decir, que todo liquido percolado se desechó, en cada ciclo de operación y el agua nueva, enriquecida, se alimentó en continuo. Este estudio tardó 14 días y al final se tomó 1 muestra (Ca-C) de biomasa (día 415 de operación) con el objetivo de identificar cambios en la diversidad. Este estudio se llevó a cabo en una muestra tomada de la región de entrada del gas, localizada en la porción inferior del reactor. Tras este ensayo se retornó a la operación normal es decir, con recirculación del medio liquido.

-Fase 6: Ya al final de la operación se eliminó el control de pH y de temperatura. Al 438 se tomó una muestra de biomasa, de la región inferior del biofiltro- entrada del gas (Ca-D) que se utilizó para estudiar la capacidad de recuperación del sistema a través de la comparativa de las poblaciones.

6.4.2. Estudio de comunidad

Los análisis de comunidad microbiana se realizaron en 4 muestras puntuales que se tomaron en tres fechas: Conforme se enseña en la tabla 5-1 dos muestras de ADN se tomaron al día 46 de la operación en co-corriente (fase 2) una arriba (Ca-A) y otra abajo (Ca-B). La tercera muestra (Ca-C) se tomó de la región de abajo del biofiltro, al día 14 de la operación en contracorriente, ya en la fase 5: período de alimentación de agua industrial pero sin recirculación. La última muestra (Ca-D) se tomo al día 23 de la fase 6, sin control de pH o temperatura.

En el RTL se hicieron los recuentos de los taxones identificados y se computaron los datos de abundancia relativa en los distintos niveles: filos, clases, familias, géneros y especies. En los datos del biofiltro anóxico fue necesario investigar otros medios de

clasificación a fin de mejorar el rendimiento de la aplicación *tag-454*. Para ello se utilizaron las herramientas de clasificación comparativa de bibliotecas del *RDP* disponibles en la página del *RDPpipeline* <https://rdp.cme.msu.edu/>. Los dos procedimientos fueron comparados para elección de la mejor herramienta. La estrategia de evaluación se describe a continuación.

6.4.2.1. Evaluación del protocolo bioinformático del RTL

La identidad asignada a las secuencias, que se enviaron desde el servicio externo del RTL, fueron sometidas a un test de fiabilidad a fin de comprobar la adecuación de los parámetros analíticos a los objetivos del presente trabajo de investigación. Para ello se tomaron los datos crudos de la muestra Ca-A en formato binario (.sff) y se ejecutaron todos los pasos del protocolo bioinformático en RDP. El estudio incluyó el efecto de la tolerancia con las coincidencias (*hits-del inglés*) obtenidas con bajo nivel de similitud, durante el proceso de anotación de identidad. En los casos de discrepancias en la anotación de identidad se procedió a un alineamiento Blastn en el NCBI, directamente en el clúster. De la tabla generada de alineamientos se seleccionaron los mejores resultados mediante el compromiso: mejor similitud con mayor E *value*.

Para algunos sets de secuencias se estudió la identidad por vía del alineamiento múltiple. Este trabajo fue ejecutado con el programa CLUSTALW del Instituto de Bioinformática del Laboratorio de Biología Molecular Europeo (EMBL-EBI) (McWilliam et al. 2013) en línea. En otros casos el alineamiento fue ejecutado por el programa MEGA5 (Tamura et al. 2013). Los resultados se compararon y las distancias filogenéticas se utilizaron para construcción de los árboles filogenéticos de parentesco.

6.4.2.2. Cálculos de abundancia relativa y comparativa de diversidad entre muestras

Tras los análisis preliminares se decidió seguir la investigación en base a los resultados de los clasificadores de secuencia del *RDPpipeline* (Wang et al. 2007). Los índices de diversidad fueron calculados a partir de los archivos *clúster*. La acumulación de las OTUs generadas del proceso de agrupación del proceso anterior fue graficada en función del número de secuencias acumuladas, para similitud de valores 100, 97 y 95%. Los índices de diversidad de *Shannon (H')*, asociado a Equitatividad (*E*) y de *Chao1* se calcularon en base a los clústeres formados al 97% de similitud. Estos índices fornecieron una medida del grado de complejidad de la comunidad.

6.5. Resultados y discusión

Dentro del marco de esta tesis, los dos objetivos principales que se plantearon para el estudio de ecología del BTF-H₂S ANOX fueron: primero, probar las herramientas de análisis de comunidades, disponibles en el RDP, con el fin de evaluar su utilidad como herramienta de rutina para identificar cambios de diversidad y luego, para informar al respecto del comportamiento de la comunidad de bacterias desnitrificantes cuando sometidas a alteraciones de parámetros de operación de larga duración. Antes de presentar los resultados del estudio de diversidad, se describirán aspectos de la operación y los análisis preliminares realizados en el conjunto de datos enviados des del servicio externo de secuenciación de RTL.

6.5.1. Resumen de la operación del BTF-H₂S ANOX

A lo largo del periodo de operación se realizaron estudios que permitieron ampliar los conocimientos acerca de la biofiltración anóxica basada en desnitrificación autotrófica. Se ensayó con las cargas de nitrato y sulfuro de hidrógeno, se compararon los modos de operación en contracorriente y paralelo y se estudio la operación sin control de pH y temperatura. Se estudió también el uso de efluente secundario de una EDAR como sistema de alimentación y se probó operar sin recirculación.. Los resultados que se utilizaran para el estudio de ecología del BTF-H₂S ANOX se resumen en la tabla 6.2 (datos tratados y cedidos por cortesía del Dr. Almengló de la UCA). En la referida tabla se pueden apreciar los valores de pH, la capacidad máxima de eliminación (EC) y la eficacia de eliminación (R%), la carga de S-H₂S (L), y el consumo de nitrato (W), en promedios, tomados en los períodos de muestreo de biomasa.

Tabla 6.2. Datos de la operación del BTF-H₂S ANOX utilizados para estudio de la comunidad en régimen en paralelo y contracorriente

Muestra (etapa)	pH	EC (gS m ⁻³ h ⁻¹)	R (%)	L _{H₂S} (gS m ⁻³ h ⁻¹)	W _{NO₃} (gN h ⁻¹)*
Ca-A y Ca-B (2)	7.4	118 ** 33 ***	80 99	32 - 147	6.5 - 8.5
Ca-C (5)	7.4	88.4 ** 31.9 ***	76 99	41.7 - 115.4	0.9 - 19.3
Ca-D (6)	6.1	71.4	55	130.2	-

*Consumo de nitrato, ** Capacidad máxima de eliminación, ***Capacidad de eliminación crítica

A continuación se describen los resultados más relevantes alcanzados en las fase del periodo operacional que fueron objeto de esta tesis conforme Almengló (2014).

-Fase 2: El sistema operó por 63 días en esta condición, y, al día 343 (tras 45 días en paralelo), se tomaron muestras de biomasa para comparativa de diversidad en las regiones superior e inferior (Ca-A y Ca-B) del reactor. Tras 60 días de operar en paralelo el rendimiento del biofiltro se vio incrementado. pero esta información se tiene que tomar con cuidado ya que, debido a limitaciones impuestas por el sistema, la carga máxima ensayada fue más baja que en la anterior fase.

El sistema alcanzo una capacidad de eliminación superior a 95%., cuando la carga aplicada no superó a $66 \text{ gSm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (a la entrada). El consumo de nitrato relativo a la fase 2 fue $38.9\text{-}50.8 \text{ gN-NO}_3^- \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, en promedio y la baja concentración de nitrato en la descarga indicó su eliminación. Para ensayos de choques de carga se utilizaron los valores de L presentado en la tabla 6.2 siempre con la EC dependiente de la carga de LH_2S . Se observó pérdida de la capacidad de eliminación acompañada de episodio de acumulación de S^0 e el lecho (comprobado por medio de SEM- datos disponibles en Almengló 2014).

Otros resultados y conclusiones del estudio comparativo de los dos modos de operar en contracorriente y paralelo, que fueran reportados por Almengló (2014), se resumen a continuación:

Primero que no hubo limitación en la transferencia de materia en ningunas de las condiciones ensayadas. Cuanto a la capacidad de eliminar el H_2S ambos modos fueran similares con una ligera superioridad del rendimiento en paralelo, el que fue relacionado a mejor distribución de la biomasa en el soporte bajo esta condición y menor concentración de sulfuro en el liquido. Conforme los datos de capacidad de eliminación de la tabla 6.3., en contracorriente se alcanzó mejores valores de EC para cargas más elevadas: ej.: Para una carga de $100 \text{ gS m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ en el modo de operación en contracorriente, se obtuvo un porcentaje de eliminación del 93% y para el modo de operación en flujo paralelo, se obtuvo un porcentaje de eliminación de 90% el día 60. A una carga de entrada de $147 \text{ gS m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, la diferencia entre ambos modos de operación fue mayor: 86% en el modo de operación en contracorriente y 80% en el modo de operación en flujo paralelo (día 60). Las diferencias de EC se relacionaran a la distribución no homogénea de la biomasa en el lecho. En contracorriente, la densidad de la biomasa inmovilizada y la acumulación de azufre elemental sobre el soporte, fue superior en la porción de abajo del lecho, el que se relacionó a la mayor concentración de sulfuro de hidrógeno en ella. Al final de la operación en flujo paralelo, se observó un crecimiento de la biomasa y la deposición de azufre en la parte superior del lecho

hechos que se relacionaron con la disminución en el sulfuro disuelto. La mejora en el porcentaje de eliminación, pudieron ser debidos a una nueva distribución de la biomasa a lo largo del lecho. Los ensayos realizados en ambas fases fueron importantes para comprobar la resistencia del sistema a choques de carga y cambios en las condiciones de operar de la planta. El mejor rendimiento de la operación en paralelo fue reportada en otro estudio (Sakuma et al. 2008). Otros datos reportados por el Dr. Almengló ayudaron a soportar esta hipótesis. Ejemplos fueron unas concentraciones de sulfuro disuelto en el líquido bastante más bajas al final del período en paralelo. El autor reportó también la comprobación de la limpieza de la matriz con respecto a la presencia de S^0 acumulado en la porción inferior del BTF cuando comparó muestras de las etapas 1 y 2, tanto visual cuanto por SEM. Pero, esta información se debe tomar con cuidado debido a que el período experimental en paralelo fue muy corto (2 meses) y que se siguió a un período sin alimentación.

-Fase 5: En esta etapa se probó eliminar la recirculación de la fase líquida. En este caso el flujo del agua de EDAR se hizo de modo continuo des de la región superior cuando entonces se añadió y se mezcló la solución de nitrato. Conforme los datos de la tabla 6.2, los valores de la R% fueron similares a los logrados en la etapa 2 cuando la carga de nitrato fue incrementada. De hecho se logró obtener concentraciones en el líquido de entrada de 13.1 y 41.2 mgN- NO_3^- /L, mientras el consumo varió entre 0.9 y 6.6 gN- NO_3^- h⁻¹ para 21.8 gN- NO_3^- h⁻¹ y, de 14.34 a 19.37 gN- NO_3^- h⁻¹, para 69.8 gN- NO_3^- h⁻¹. La capacidad del sistema fue probada cuando se aplicaron L_{H_2S} de entre 41.7-115.4 gSm⁻³ h⁻¹. La EC_{max} fue entonces de 88.4 con %R de 76%. En este período el consumo de NO_3^- varió de entre 0.9 hasta 19.3 (gN h⁻¹). La capacidad de eliminación crítica de este periodo fue ligeramente inferior al medido en la operación en paralelo (31.9 y 33, respectivamente).

El parámetro más sensible fue la velocidad superficial del líquido que fue modificada debido a limitaciones en el suministro de agua procedente de la EDAR. En las condiciones ensayadas la transferencia de materia fue muy dependiente de la velocidad superficial del líquido (la TLV experimental fue reducida de 15.2 para 8.6 m h⁻¹). Como consecuencia de este modo de operar se observó una queda en el rendimiento del sistema cuando comparada al modo en contra corriente de la fase 1.

-Fase 6: En la última etapa se volvió a operar bajo condiciones padrones pero se abandonó el control de pH y de temperatura, para estudiar su efecto sobre la comunidad. Tras eliminar el control automatizado se observó una pequeña variación del pH des del 7.5 hasta 6.1, en 23 días. Almengló relacionó tal efecto con la dinámica

de dilución de los subproductos generados por la actividad biológica y su redistribución por el lecho, en especial por restablecer la maniobra de recirculación. Mismo sin control de pH el biofiltro fue capaz de mantenerse por encima de los valores de pH limitantes para la actividad desnitrificante. A corto plazo los resultados de la operación enseñaron el cambio de comportamiento de la planta con fuerte reducción tanto de la capacidad cuanto de la eficacia de eliminación ($EC=71.4 \text{ gS m}^{-3}\text{h}^{-1}$; $R= 55\%$). Cuando se aplicó la carga máxima de H_2S ($130.2 \text{ gS m}^{-3}\text{h}^{-1}$) la pérdida de eficacia fue contundente ($R= 55\%$). Estos datos indicaron que la bajada de pH tuvo un efecto negativo, confirmando que el control de pH es una condición indispensable para el buen funcionamiento del BTF anóxico.

Finalmente, indicar que el BTF- H_2S ANOX fue más o menos efectivo en la eliminación de H_2S en función del modo de operación. Sorprendió el hecho de que el modo paralelo el biofiltro demostró mejor rendimiento.

6.5.2. Estudio de la ecología del BTF- H_2S ANOX

6.5.2.1. Evaluación de los protocolos de clasificación

El análisis se llevó a cabo para verificar si el protocolo bioinformático fue el adecuado para la identificación de las secuencias y luego para recuento de poblaciones. Para ello se evaluaron los conjuntos de parámetros y los rendimientos en los puntos clave del protocolo. Se comparó el procesado ejecutado por el Servicio del RTL con el otro ejecutado con el protocolo patrón de clasificación del *RDP*, que se llevó a cabo en el set de datos originales generados por plataforma 454 Roche, (*.sff*).

En el diagrama comparativo de la fig. 6.1 se ilustran los pasos del protocolo y los puntos de evaluación mientras los rendimientos se resumen en la tabla 6.4. En la columna *.sff* se enseñan los montantes de secuencias originadas por *tag-454*, sin tratamiento, luego los montantes tras eliminar las quimeras y de reduplicar y en las dos columnas de la derecha el número de coincidencias (*hits* en género) que se obtuvo a este nivel taxonómico, para cada muestra.

En la figura 6.1 el color rojo se utilizó para mostrar los pasos del proceso, el azul el protocolo RTL y el verde el protocolo RDP-UAB. En amarillo se presentan las peculiaridades de cada protocolo además de sus ventajas e inconvenientes. Durante el procesado se detectaron varios puntos de discordancia siendo los principales: *Chimera check*, alineamiento y formación de clústeres. Debido al carácter encadenado

del estudio se supuso que el error producido a cada paso se fue acumulando, hecho que generó grandes desviaciones en la clasificación final. Además, el protocolo de RTL fue incompleto porque no presentaba los índices de diversidad.

Tabla 6.3. Comparativa entre los resultados del tratamiento de las lecturas de secuencias RTL y RDP-UAB

	N° de lecturas				
	.sff	Sin quimeras		hit en género	
		RTL	RDP	RTL	RDP
Ca-A	12073	9710	5013	7737	3207
Ca-B	13574	8320	5855	6560	3326
Ca-C	26299	21880	14648	8940	3472
Ca-D	12112	10212	7132	5464	2188

La discrepancia entre los dos sets de datos (RTL x RDP) impresiona cuando se lleva en cuenta que ambos protocolos utilizaron la misma base de datos para la clasificación. A día de hoy se toma como consenso que el banco de datos de secuencias del ARN16S del RDP, es el más completo y fiable.

El primer punto que se discute es el *Check Chimera*. El tratamiento para quitar las secuencias de baja calidad fue más exigente cuando ejecutado vía RDP (ver tabla 5-4). Conforme el protocolo RTL las quimeras se buscaron por región de la placa óptica utilizando un banco de datos generado por el propio Laboratorio. Sin embargo, este banco de datos pareció inadecuado a las muestras del BTF-H₂S ANOX.

También en el paso de agrupación por distancia filogenética (*Clustal*) se observó que el cambio de parámetros produjo resultados distintos. En el RTL se hizo la agrupación con divergencia de 4% mientras que en el RDP-UAB se aplicó el 3%, que es el habitualmente utilizado en estudios de diversidad por especie y luego el 5% para género. Conforme literatura el más coherente es establecer el 3% ya que permite agrupar las lecturas, con seguridad, al nivel de especie (Amend et al. 2010). En el caso del protocolo RTL al pasar al grado de divergencia del 4% se perdió el rigor en la resolución de secuencias de parentesco muy cercano. El procedimiento implicó la inclusión de secuencias inadecuadas en los *clústeres*. La discrepancia se puede comprobar en la tabla 6.4 en la columna de hits en género (95% de similitud). En la muestra C-A por ejemplo se encontró hit para 7.737 sec. por el método RTL mientras con RDP sólo se pudo asignar identidad a 3.207 lecturas. Este punto del método fue el más crítico para los recuentos y cálculos de abundancia relativa, y la prueba está en que se asignaron secuencias a varias especies de bacterias que no podrían

desarrollarse en el BTF, por sus perfiles fisiológicos. Ejemplos fueron la identificación de *Sedimenticola selenatireducens* (que respira selenato) y que de acuerdo con el RTL contribuyó con cerca de un 60% en Ca-B, o *Dechloromarinus chlorophilus* (que también es una especie reportada por respirar perclorato) y *Hoeflea alexandrii* (aeróbica). El error de identificación podría comprometer el estudio visto que el recuento de estas especies representaba más de 70% de las secuencias en Ca-A. También podría comprometer la precisión del recuento, lo que dificultaría establecer la ecología del biorreactor. No obstante, hay que tener en cuenta que las desviaciones de protocolo son el resultado del proceso natural de mejora de las herramientas de bioinformática y su detección contribuye para el ajuste de los parámetros y mejora de la confianza.

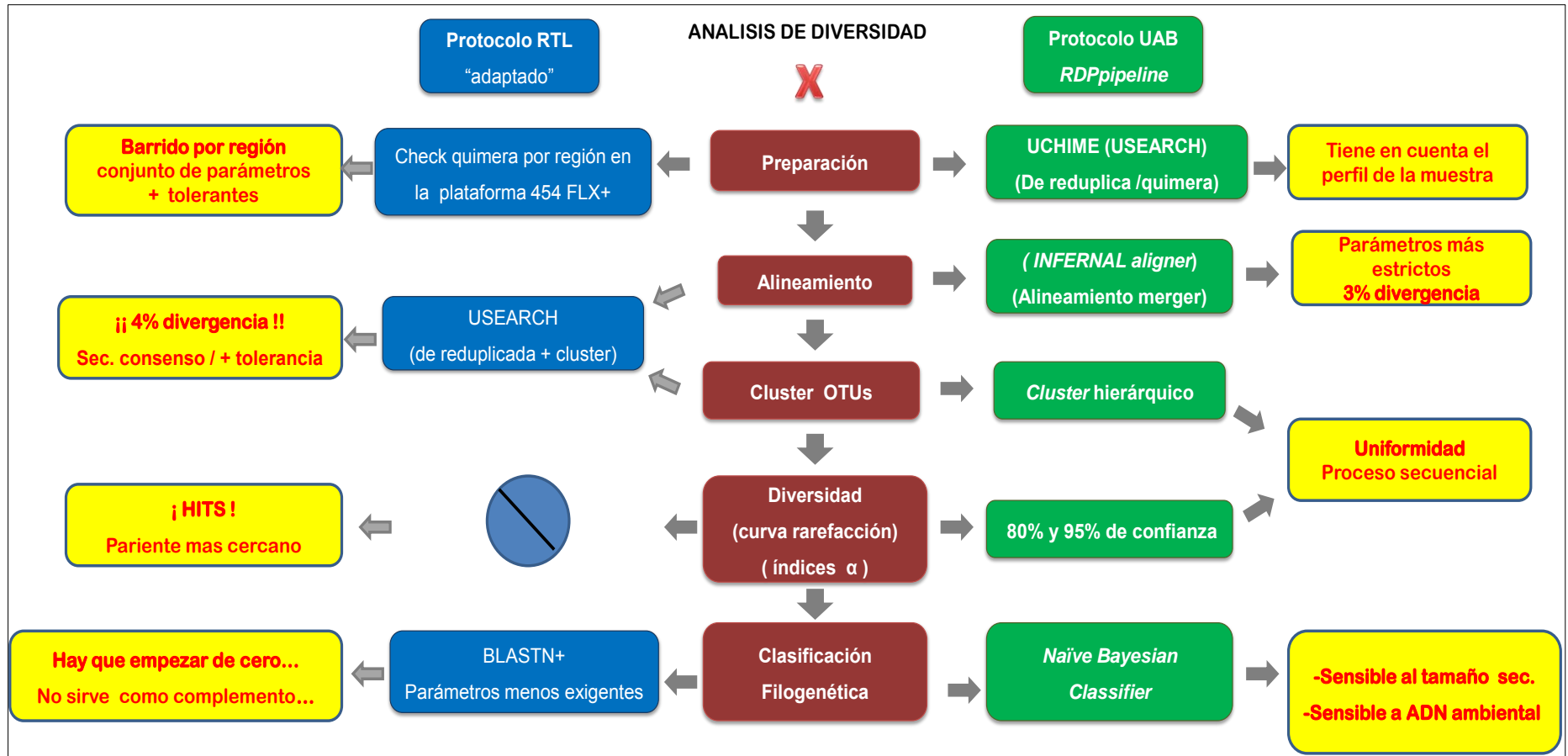


Figura 6.2. Comparativa entre protocolo de análisis de diversidad vía RTL frente al RDP-UAB. En rojo se enseñan las etapas del protocolo, a la derecha los detalles del protocolo UAB (RDPpipeline) siendo en Verde las características y en amarillo las ventajas o inconvenientes. A la izquierda se explica el protocolo RTL; en azul se enseña los detalles y en amarillo las ventajas o, inconvenientes.

Con respecto a la clasificación *RDP* esta fue extremadamente sensible el tamaño de los amplicones. De hecho, este fue el punto débil de esta plataforma. Al final, la falta de *hits* a nivel de especies influyo en los recuentos, lo que resultó en un gran número de lecturas sin asignar. En cada muestra de entre 35% (Ca-A) hasta un 70% (Ca-C) no pudieron ser asignadas a una especie de referencia, en la base de datos. Esta dificultad fue reportada para estudios de diversidad de muchos ambientes (Eisen, 2007; Huse et al. 2007; Roesch et al. 2007; Acosta-Martínez et al. 2008; Petrosino et al. 2009; Amend et al. 2010; Li et al. 2012; Montebello et al. 2012; Isanta et al. 2015). El problema para asignar identidad filogenética se puede comprobar en el set de datos de la columna “hits para géneros” de la tabla 5-4 en que se observa que a mayor diversidad mayor la dificultad para encontrar la identidad, aunque en ningún caso comprometió la caracterización de la comunidad. La robustez del clasificador RDP, para género, fue comprobada en el estudio de Huse y colaboradores.(2008) así como se comprobó que la limitación tiene relación con la cobertura de los bancos de datos. Para muestras ambientales las limitaciones fueron mayores comparadas con las limitaciones cuando se trata de muestras humanas, debido a falta de *hit* en las bases. La buena cobertura y la coherencia de la clasificación de bacterias utilizando RDP con *primers* para regiones hipervariables (V3 y V6) fue anteriormente reportada en el mismo estudio cuando se pudo comprobar la validez de los parámetros de *bootstrap* (>80%) y adecuación del grado de divergencia al 3% para especie y 5% para género. Las consecuencias de la falta de *hit* en el set de datos del BTF-H₂S ANOX, se discute más a fondo en los resultados de abundancia relativa de cada muestra.

Pese a la sensibilidad de los parámetros aplicados vía RDP y a los inconvenientes presentados por el protocolo del RTL a la hora de clasificar las secuencias del BTF-H₂S-ANOX, los recuentos hechos en base al protocolo RDP, al nivel de género, fueron elegidos para la descripción de la comunidad de bacterias, por su coherencia con la fisiología del biofiltro.

6.5.3. Estudio de la Comunidad del BTF-H₂S ANOX

6.5.3.1. Procesamiento de las lecturas del *tag-454*

Un total de 53,258 lecturas fueron recuperadas del proceso de pirosecuenciación. Tras eliminar las lecturas de mala calidad, las quimeras y de reduplicar quedaron de entre 41 y 59% de las lecturas de cada muestra. Los resultados detallados se enseñan en la tabla 6.4.

Tabla 6.4: Resultados de los tratamientos aplicados a las secuencias del BTF-H₂S ANOX

Etapa del tratamiento	N° de lecturas de sec.			
	Ca-A	Ca-B	Ca-C	Ca-D
454 Roche "sff"	12073	13574	26299	12112
Cheque calidad 454 Roche	8834	8154	22759	10424
Check <i>Chimera</i> y de-reduplicación	5013	5855	14,648	7132
% sec. aprovechado	41.5	43.1	55.7	58.9

A simple vista, los números transmiten la sensación de que gran parte de las lecturas se desecharon. Así mismo, el porcentaje de secuencias excluidas por protocolos de "limpieza" de datos para Ca-C y Ca-D concuerda con lo reportado por otros autores, (Roesch 2007; Acosta-Martínez 2010; Ye & Zhang 2013; Xu et al. 2012; Isanta et al. 2015). Sin embargo, el desprecio de muchas más secuencias en las muestras Ca-A y Ca-B fue evaluado. La principal hipótesis que se investigó fue la baja eficiencia de la PCR y la principal razón para esta sospecha fue que se encontró que los amplicones de las dos bibliotecas se hayan generado en una ronda distinta, Otra evidencia serían los rendimientos de las parejas de muestras, que fueron bastante similares para A y B; y, también para C y D. Es probable que a los ciclos finales se hayan formado más quimeras, en las muestras Ca-A y Ca-B. Los problemas de PCR son muy conocidos y la identificación del origen permite tomar la decisión de repetir la ronda o eliminar los amplicones con problemas. En el caso del presente estudio los test de calidades realizadas por el propio servicio de secuenciación del RTL indicaron que no ocurrieron problemas en la amplificación y que la distribución de frecuencia de los datos fue normal. En el presente estudio se hicieron todos los tratamientos recomendados para limpieza de las bibliotecas y los números presentados en la tabla demuestran que esta estrategia fue un paso clave en el procesamiento de los resultados de la *tag*-454.

Para certificar que las secuencias recuperadas eran suficientes para explicar la diversidad se construyeron las curvas de rarefacción de OTUs. En la fig. 6.3 se presentan las curvas que se construyeron con grados de similitud de 100, 97 y 95%.

Los perfiles de todas las curvas indican que la diversidad fue contemplada y que las OTUs acumuladas fueron suficientes para explicar la comunidad. Este análisis permitió validar el set de datos. El hecho de que, ya al nivel de género, las OTUs acumuladas hayan alcanzado valores distintos en la muestra Ca-A sirvió como indicativo de la especialización que paso durante el periodo de operación en paralelo. Del conjunto de

datos se concluyó que la diversidad se pudo explicar tanto al nivel género (95% de similitud, en respectivo) para todas las muestras

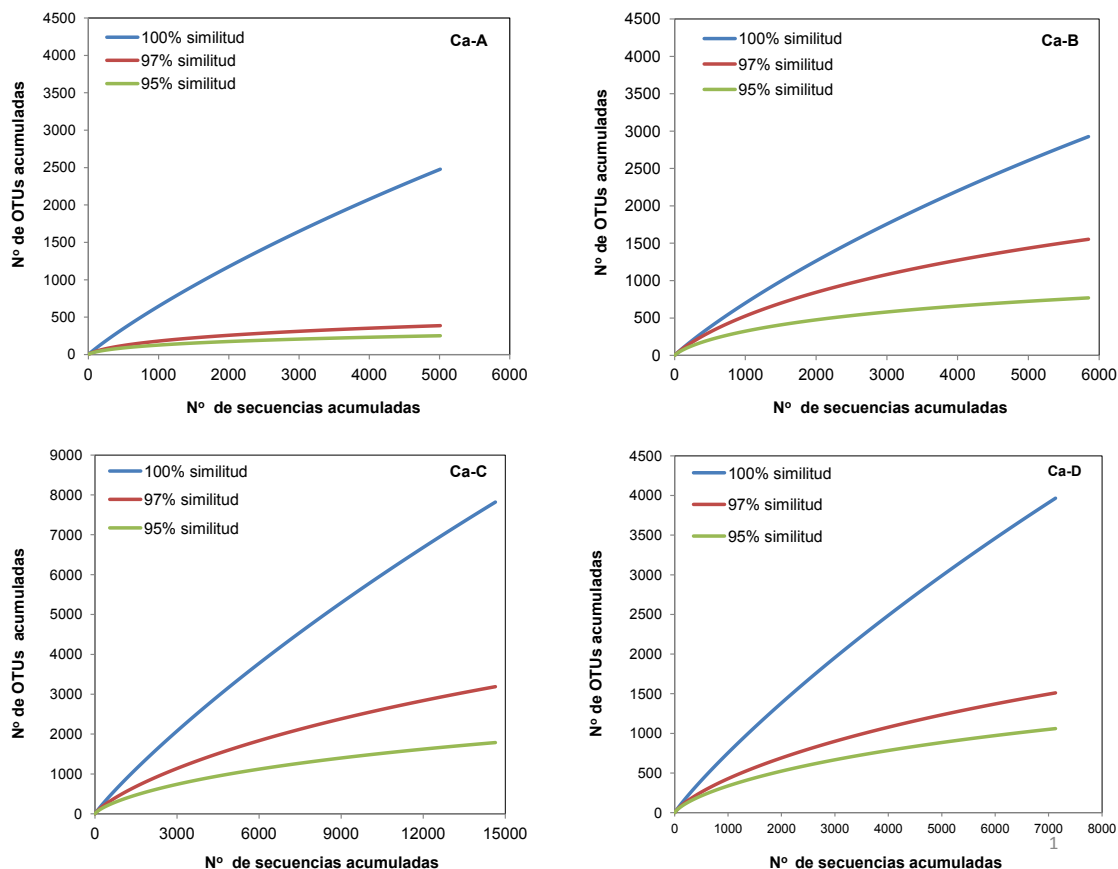


Figura 6.3. Curvas de rarefacción de OTUs

6.5.3.2. DIVERSIDAD

Los resultados de la clasificación fueron generados de la herramienta de comparativa de bibliotecas RDP (Wang et al. 2007) se pueden consultar en el anexo 4 (archivo digital). Además de la abundancia relativa se enseñan también los resultados del test estadístico nombrado significancia, que estima la probabilidad de ocurrir ambigüedad a la hora de asignar identidad. Representa el grado de coincidencias (*hits*) con secuencias ya depositadas, que pueden variar de 0 a 100%. La completa coincidencia de todos los nucleótido de las dos secuencias se expresa como con el grado de significancia del 100% y se representa con el valor "1" mientras el 0% de coincidencia se representa por "NA." El análisis global de los datos de la significancia indicó un marcado grado de incertidumbre en todos los ensayos ejecutados, con la significancia en muchos *hits* inferior al 50%. Estos datos reflejan la limitación de la herramienta que,

por su parte, depende de la cobertura de los bancos de secuencias. Al que respecta a las especies involucradas en la desnitrificación, Lu et al. (2014) reportó la limitación de los bancos de datos de secuencias del 16S, para muestras ambientales.

Los índices de la diversidad (D) se aprecian en la tabla 6.5. Se enseñan los valores estimados por *Chao1* y *Shannon*, que se calcularon de acuerdo en RDP.

Tabla 6.5. Índices de diversidad en el BTF-H₂S ANOX

D	Ca-A	Ca-B	Ca-C	Ca-D
N° sec.	5,013	5,855	14,648	7,132
Chao1	573.5	1,043	2,872.9	1,378.2
H'	3,50	5,15	5,45	5,02
Var H	1.1E-03	6.4E-04	3.4E-04	5.4E-04
E	0.59	0.77	0.73	0.74

Las muestras Ca-A y Ca-B se tomaron después de un largo período experimental donde se aplicaron distintas condiciones y varias concentraciones de H₂S y NO₃. En esto estudio se asumió que el tiempo fue suficiente para alcanzar el estadio estacionario, tras el cambio. Ya las muestras Ca-C y Ca-D se tomaron después de otro cambio de sentido (contracorriente), tras alcanzar el estado estacionario.

En el BTF-H₂S ANOX el número estimado de OTUs al 97% de similitud (para especies), que se muestra en la tabla, sirvió para corroborar la diferencia entre la muestra Ca-A frente a las demás. También indicaron que en esta muestra, algo distinto afectó a la comunidad, con respecto a las demás. Conforme indican los índices de diversidad, la muestra Ca-A se distingue de las demás por una menor diversidad. La comparativa con las muestras tomadas de la región inferior indicó que se debería investigar el efecto de la concentración de sulfuro de hidrógeno y disponibilidad de nitrato en la longitud del reactor. Conforme datos del Dr. Almengló cuando el nitrato no fue limitante la eliminación de H₂S fue dependiente de la velocidad superficial del liquido (TLV), de la altura de la columna y de la reacción biológica. A baja y media carga de sulfuro la EC dependió de la TLV optimizada. La eliminación ocurrió en hasta 55% de la altura del lecho, es decir en la región inferior del reactor. Para elevadas concentraciones de sulfuro de hidrógeno se necesitó optimizar la entrada de nitrato, mediante TLV y en esto caso en concreto la EC de 95% sólo fue alcanzada al final del

lecho, hecho que indicó limitación biológica (Almengló 2014). Con estos datos se pudo concluir que en la región en donde se tomó la muestra Ca-A la combinación de elevada concentración de sulfuro combinada con la disponibilidad del nitrato fue el factor determinante de selección de poblaciones autotróficas. En las demás muestras el gradiente en contracorriente de aceptores y donadores de electrones sufrió una estratificación que permitió el desarrollo de más nichos, que se comprobó por la mayor diversidad y menor prevalencia. Tal como se explicó con anterioridad un ecosistema con mayor diversidad tiende a ser más equilibrado y genera mejor resistencia a cambios ambientales drásticos.

En los datos enseñados en la tabla 6.5 se observa que en Ca-A el valor de $E=0,59$ indicó una fuerte predominancia de unas pocas especies. Con respecto a las tres muestras de la región inferior los números de " E " superiores a 0,7 indicaron una distribución más igualitaria de la diversidad. En el caso de las tres muestras, el valor sufrió el peso de un listado muy largo de especies poco frecuentes, lo que es el normal en la naturaleza (Wertz et al. 2007; Pessi et al. 2012). Finalmente, comentar que los índices no informan la sustitución de un filótipo por otro y esto es el primordial para entender de sucesión o estratificación de poblaciones en el ambiente.

6.5.3.3. Estudio en régimen paralelo

Del total de secuencias extraídas de la secuenciación, después de tratadas vía RDP, se obtuvieron 5,013 para Ca-A y 5,855 para Ca-B. De estas cantidades, 3,207 de las secuencias Ca-A se pudieron asignar identidad hasta el nivel de género (grado de similitud de 95%) mientras en Ca-B se asignaron 3,326. Estos rendimientos (en torno a los 60%) son considerados normales para muestras de ambientes complejos. Se encontraron un total de 8 filos, 14 clases, 44 familias y 57 géneros fueron encontrados en las dos muestras.

Los datos de abundancia relativa, en porcentaje, para los filos, clases y familias se presentan en la figura 6.4 En el rectángulo superior (set A) se aprecian los datos de la distribución para los filos, de bacterias, siendo representados en barras en rojo la abundancia atribuida a Ca-A, y en azul para Ca-B. Para mejor visualización de las contribuciones, en el recuadro pequeño se muestra una ampliación de los datos de filos que no superaron el 1.5%.

La gráfica de los filos indica que la comunidad de bacterias en ambas regiones del reactor estuvo formada mayoritariamente por proteobacterias (Ca-A 93%, Ca-B 97%),

Bacteroidetes (2.1 y 0.8 %) y Firmicutes (1.6 y 0.1). Las semejanzas se observaron también a nivel de clase, donde predominaron las γ -proteobacterias con 72% de las secuencias en ambas regiones, seguida de las α -proteobacteria con 20% en Ca-A y 26% en Ca-B. Juntas las dos clases fueron responsables por más de 90% de todas las secuencias asignadas.

Al nivel de familia, la distribución de las secuencias relacionadas a los grupos predominantes también fue bastante similar. En las dos graficas de barras, del set b, se verifica la distribución uniforme de la abundancia entre unas pocas familias de α i γ proteobacterias. Las familias más importantes fueron la *Incertae Sedis- γ* con cerca de 72% en ambas regiones, Rhodobacteraceae- α (\pm 7% en ambas regiones) y Phyllobacteriaceae- α (11 y 12%) el que fue interesante ya que en ambas familias están reunidos varios géneros relacionados a los ciclos de azufre y del nitrógeno.

Dentro de la familia Phyllobacteriaceae- α , cerca del 8% de las secuencias se relacionaron al género *Hoeflea*, 1% a *Nitratireductor*, mientras que aproximadamente 2,5% no se pudieron clasificar (*uncl. genus*), en cada muestras. Las secuencias asignadas a *Hoeflea* se investigaron porque este género acomoda especies aerobias. Mediante MegaBlast (NCBI) se pudo demostrar la estrecha relación filogenética de las secuencias con especies bacterianas que fijan nitrógeno mediante quimioheterotrofia como por ejemplo *Rhodobacter sphaeroides*, que puede respirar en condiciones anaerobias. Así, debido al elevado grado de similitud que fue observado tanto para *Hoeflea* como para *Rhodobacter* se podría suponer dos cosas: primero que, si las secuencias representaron bacterias del género *Hoeflea* entonces habría que ser una nueva especie con perfil metabólico distinto del reportado hasta la fecha. La otra suposición sería la de que, si las secuencias son de *Rhodobacter* entonces deberían pertenecer a alguna cepa denitrificante o, cuanto menos anaerobia. De todos modos, en ninguno de los caso, se lograría determinar su exacta identidad, y por lo tanto el nicho ecológico de esta fracción de la diversidad no se pudo determinar.

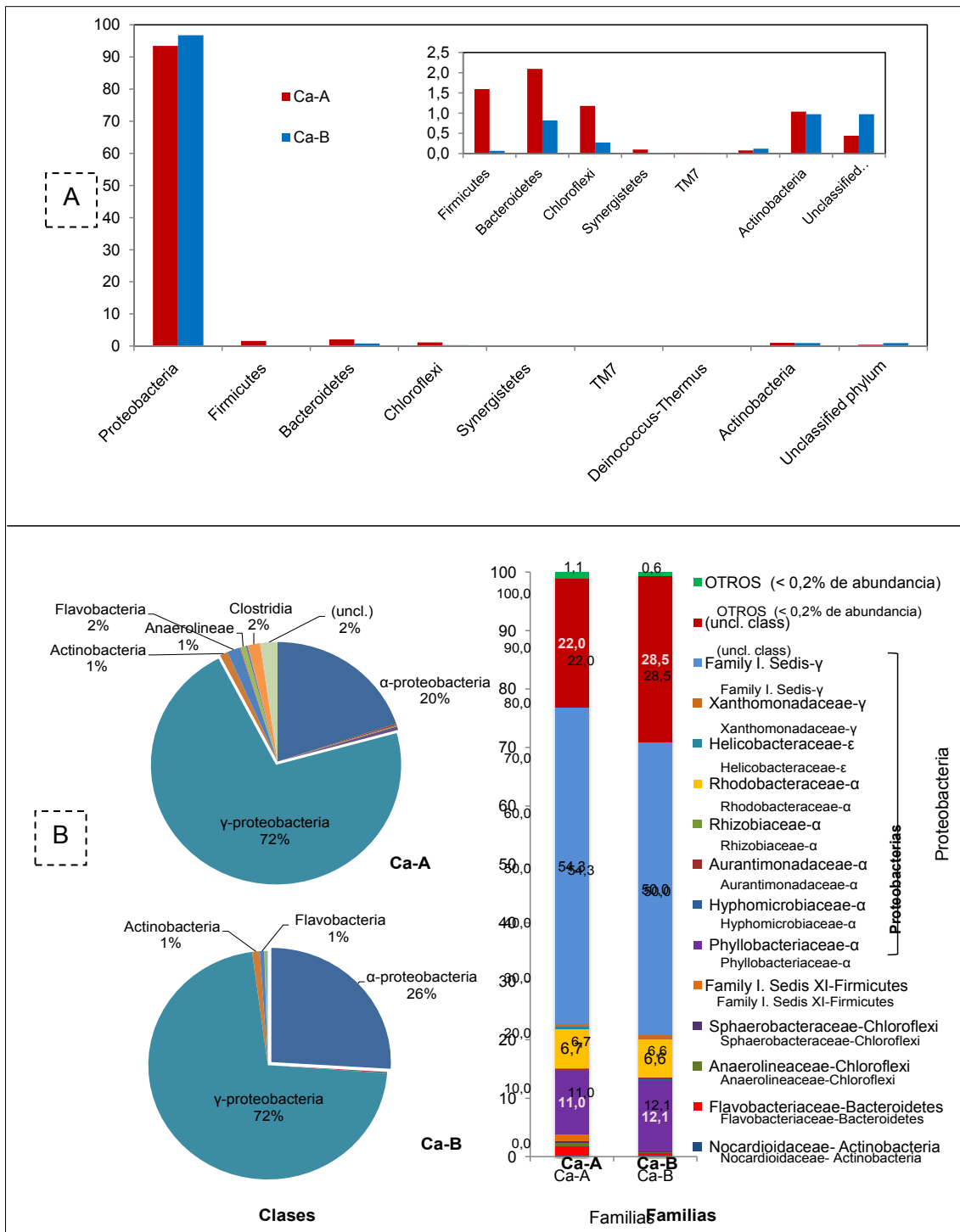


Figura 6.4. Abundancia relativa (%) en Ca-A y Ca-B. En A, filo y B clases (graficas circulares) y familia (barras).

En la familia Rhodobacteraceae (α), \pm 1,5% de las secuencias se relacionaron a *Paracoccus*, y menos del 1.0% se relacionó a *Roseovarius* (0.8 y 0.2). El montante de secuencias no clasificadas dentro de esta familia fue de cerca de 4%. En esto caso, fue interesante averiguar que distintas secuencias asignadas al género *Paracoccus* se relacionaron a *P. denitrificans*, a *Paracoccus sp* o al *P. versatus* (en cualquier caso, con valores inferiores a 97% de similitud). La incertidumbre en determinar la identidad de este género se pudo revelar debido a la habilidad de desnitrificar, tanto autotrófica cuanto heterotróficamente, lo que explica su presencia. Con respecto a las secuencias asignadas al género *Roseovarius*, estas se relacionaron a especies heterótrofas. La versatilidad típica de *Paracoccus* y la fisiología de *Roseovarius* hace suponer que el probable papel de la familia Rhodobacteraceae en el ecosistema fue la desnitrificación heterótrofa. Para corroborar esta suposición, haría falta comentar el *blast* de las secuencias no clasificadas de α -proteobacteria (*uncl. familia*). Los resultados indicaron el parentesco con *Paracoccus denitrificans* (92%) con *Nitrobacter winogradskyi* (70%); ambas especies quimiolitautotróficas, del ciclo del nitrógeno que presentan perfiles fisiológicos curiosos. En común tienen que pueden utilizar nitrito como aceptor final y el diferente es que, la *P. denitrificans* respira también nitrato (Lu et al. 2014). Con esta información se puede suponer que, en general, las α -proteobacterias crecieron mediante desnitrificación heterotrófica y que por lo tanto competieron por nitrato y nitrito pero sin contribuir con la desulfuración de H₂S.

Las secuencias asignadas a γ -proteobacteria (*uncl.*) se pudieron relacionaron a las familias *Incertae Sedis*, que prevalecieron en ambas bibliotecas con más de 50% de lecturas de secuencias asignadas, y *Xanthomonadaceae* (Ca-A=0.2 y Ca-B=0.5%). En *unclassified* se sumaron 22 y 29% de las secuencias.

En esto momento, hace falta aclarar el significado de la denominación *Incertae Sedis*. De acuerdo con el Manual Bergey's el término se utiliza en taxonomía para informar que aquel taxón (familia o género) no tiene la taxonomía completamente aclarada hasta la fecha (Kuever & Widdel 2006).

En la muestra Ca-A la participación de los *Incertae Sedis* no fue limitante para el entendimiento de la comunidad porque fue posible comprobar la identidad de los clústeres mediante herramientas de alineamiento de las secuencias clásicas, como el *blast* de NCBI y Clustal W de EMBL-EBI (McWilliam et al. 2013). De hecho, los resultados de la clasificación RDP fueron en parte aclarados, incluso para secuencias con grados de similitud inferiores a 95%. Un ejemplo se presenta en el árbol filogenético (Neighbor joining) de la figura 6.5, construido a partir del alineamiento en el programa MEGA5. En la figura los brazos indican las distancias evolutivas

calculadas para cepas del mismo género, depositadas en el NCBI. Se ilustran los grados de parentesco, para secuencias del gen del 16S ARNr, de *Sedimenticola* (denominadas Sp01Ca) y para el grupo *Incertae Sedis Gammaproteobacteria Ca-A*. Se adjuntó *S. selenatireducens* como cepa de referencia y *Thiobacillus denitrificans* como *outgroup*. La relación filogenética entre las secuencias diana con las cepas reportadas permite suponer que los clústeres tienen identidad distinta pero que pertenecen al mismo género. El alineamiento informó que los dos clústeres tienen misma identidad. La formación de más de un *clúster* con secuencias de misma identidad fue un inconveniente en el presente estudio y la razón está en los tamaños de fragmentos obtenidos.

La capacidad de llevar a cabo la desulfuración de H₂S, por desnitrificación, fue comprobada en una cepa de *Sedimenticola sp.* aislada de un reactor de tecnología Anammox. No obstante la misma habilidad no fue observada para *S. selenatireducens* quizás por el elevado grado de especialización que fue necesario desarrollar para respirar selenato. La distribución de los genes relacionados a la fisiología de la desnitrificación en *Sedimenticola* fue investigada en una cepa autotrófica (Russ et al. 2014).

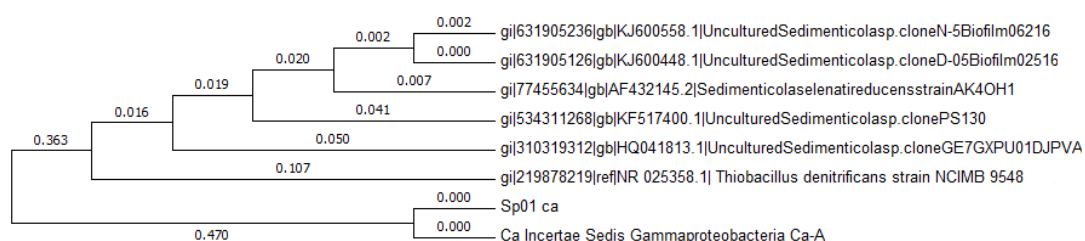


Figura 6.5. Árbol Neighbour-joining con base en secuencias del gen 16S ARNr: enseña las relaciones filogenéticas entre el bloque de secuencias asignado a *Sedimenticola* (Sp01) y al clúster *Incertae Sedis-γ* de la muestra Ca-A. Elaborado en MEGA5.

En función de las informaciones reunidas sobre el género *Sedimenticola*, se pudo atribuir el papel protagonista de la desulfuración-desnitrificación en el BTF-H₂S ANOX a esta bacteria, tanto en la muestra Ca-A cuanto en Ca-B. También se asumió que *Sedimenticola* fue el género que se ocupó de la conversión del sulfuro a azufre elemental y del nitrato a nitrito durante la operación en paralelo.

El alineamiento múltiple de secuencias fue utilizado en un intento de complementar la descripción de la comunidad. Debido a la morosidad de esto tipo de investigación, se

buscó la identidad solamente para los 3 clústeres más abundantes. Se obtuvo las secuencias representativas de los *clústeres*, al 97% de similitud que se nombraron como CaSp01, CaSp02 y CaSp03. En las barras se indican la escala de divergencia evolutiva. Uno de los árboles filogenéticos que se generó en los estudios se reproduce en la fig.6.6.

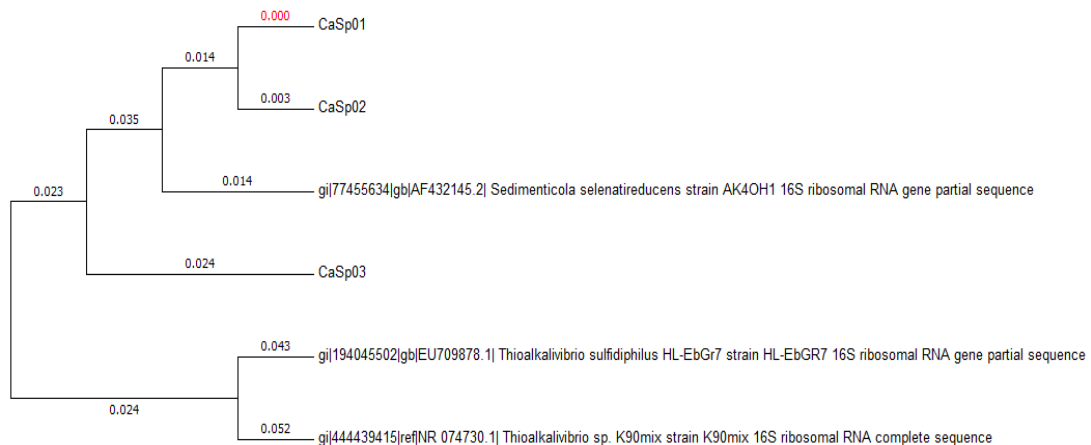


Figura 6.6. Árbol filogenético (Neighbor joining) de 16S ARNr generado en MEGA5 para el parentesco entre CaSp01, CaSp02 y CaSp03. La divergencia evolutiva se enseña en los brazos.

De cara se observa, que las secuencias CaSp01 y CaSp02 presentaron un grado de parentesco muy cercano, y que, incluso, podría tratar se de la misma especie. Ya, el parentesco con *Sedimenticola Selenatireducens* indicó *outgroup* Cuanto al *clúster* CaSp03, la distancia evolutiva indicó que podría tratarse de otro especie, o quizás género distinto. Las cepas de *Thioalkalivibrio* fueron incluidas en la representación porque se encontró fuerte relación de parentesco.

El resultado de la busca de identidad de los 3 clústeres en MegaBlast (vía NCBI), se resume a continuación. Los arboles *Neighbor joining* para los mejores hits (mejor relación *Evalue* y grado de similitud) se reproducen en las figuras de 6.7 a 6.8.. En los tres casos se excluyó de los resultados *Sedimenticola Selenatireducens*.

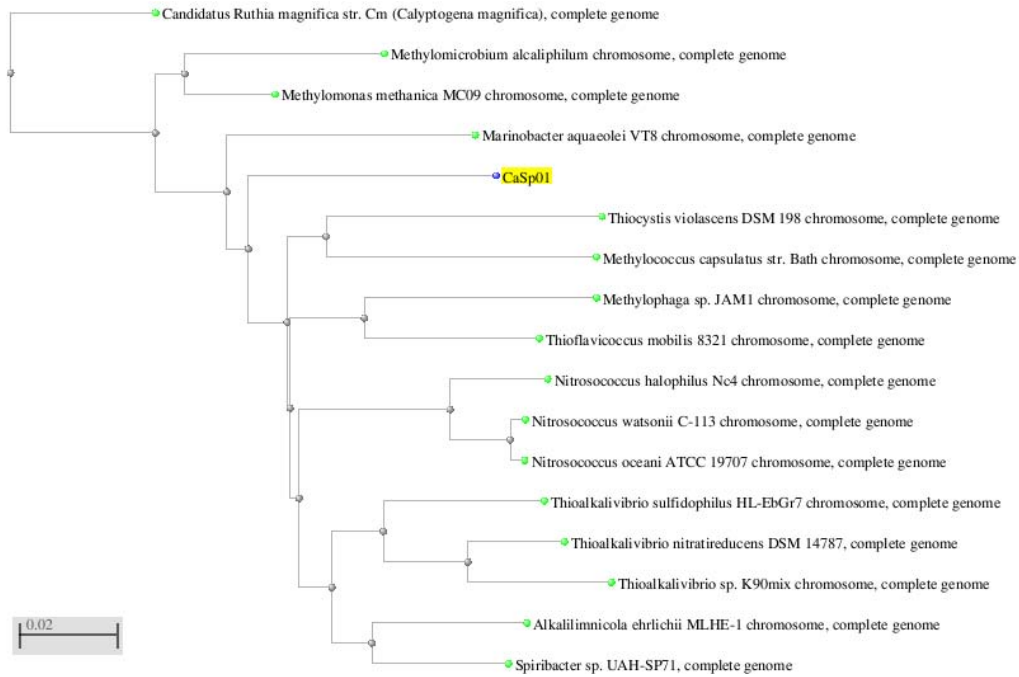


Figura 6.7: Árbol Neighbour-joining con base en secuencias del gen 16S ARNr enseña las relaciones de parentesco para el clúster CaSp01. Generado del BlastN. Barra indica la escala de divergencia evolutiva

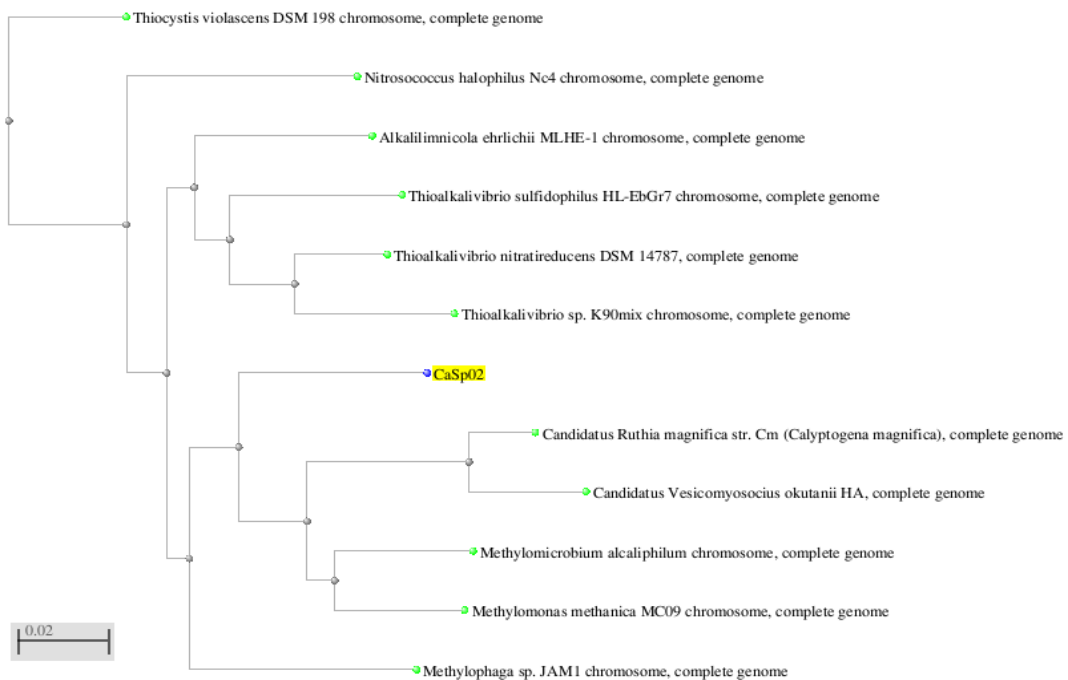


Figura 6.8: Árbol Neighbour-joining con base en secuencias del gen 16S ARNr enseña las relaciones filogenéticas para el clúster CaSp02. Generado en BlastN. Barra indica la escala de divergencia evolutiva

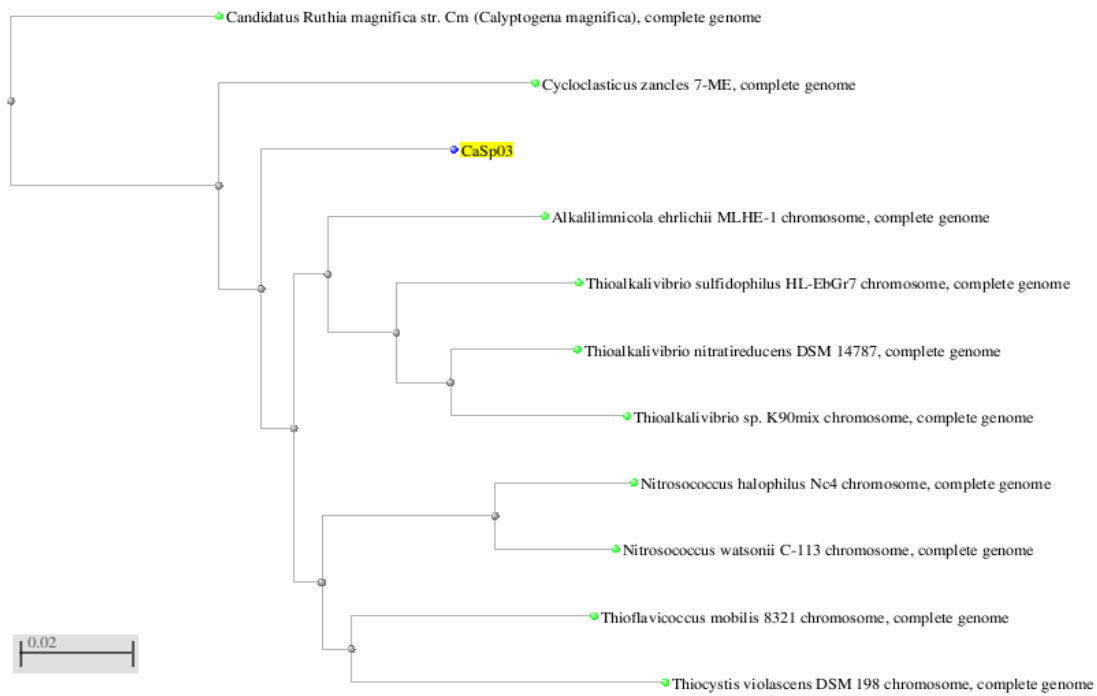


Figura 6.9. Árbol Neighbour-joining con base en secuencias del gen 16S ARNr enseña las relaciones de parentesco para el clúster CaSp03, Generado por BlastN. Barra indica la escala de divergencia evolutiva.

En los tres alineamientos encontró una estrecha relación filogenética con bacterias conocidas de los ciclos biológicos del azufre y del nitrógeno. Las 3 secuencias se podrían explicar por la familia Ectothiorhodospiraceae que agrega distintas especies NR-SO. Ejemplo son *Thioalkalivibrio* o *Alkalilimnicola* que fueron descritas como capaces de producir azufre elemental y depositar en el espacio extracelular (Ghosh & Dam 2009). Se encontró relación cercana con *Nitrosococcus* y *Methylococcus*, que pueden vivir en anaerobiosis. Sin embargo, como son bacterias especializadas y con nicho conocido, el estudio se focalizó en las otras alternativas. Con respecto al parentesco con la cepa *Candidatus Ruthia magnifica*, a pesar de tratar se una especie quimiolitautótrofa (Meyer et al. 2007), se podría descartar por el hecho de que se trata de una bacteria endosimbionte (Roeselers et al. 2010).

A pesar de los esfuerzos en explicar esta fracción de la comunidad, los ensayos complementarios demostraron que los valores de similitud fueron inferiores al determinado para inclusión en la clasificación inicial, de modo que estas OTUs no se pudieron añadir al clúster, que tendría la misma identidad. De todos modos, esta limitación no impidió indicar la probable actividad de este gremio, ya que se pudo rescatar la información, para los generos y familia, desde la literatura.

En la tabla 6.6 se aprecian los resultados obtenidos al nivel de género. Se resumen los recuentos de abundancia relativa para aquellos clústeres que acercaron el 1% (≥ 0.5) de frecuencia. En subrayado se enseñan los géneros que agregan especies desnitrificantes, y en negritas clústeres investigados por blast.

Tabla 6.6. Abundancia relativa de los géneros en Ca-A y Ca-B ($\leq 0,5\%$ de presencia)

CLASE	CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA		ABUNDANCIA			
	FAMILIA	IDENTIDAD	Ca-A		Ca-B	
			Nº	(%)	Nº	(%)
α - proteobacteria	Phyllobacteriaceae	<u>Nitratireductor</u>	41	0.8	35	0.6
		<i>Hoeflea</i>	406	8.1	487	8.3
	Rhodobacteraceae	Phyllobacteriaceae (<i>uncl. genus</i>)	99	2	176	3
		Rhizobiales (<i>uncl. family</i>)	45	0.9	118	2
		<u>Paracoccus</u>	73	1.5	83	1.4
		<u>Roseovarius</u>	40	0.8	13	0.2
		Rhodobacteraceae (<i>uncl. genus</i>)	197	3.9	266	4.5
		α - Proteobacteria (<i>uncl. family</i>)	29	0.6	173	3
		γ - proteobacteria	Incertae Sedis	<u>Sedimenticola</u>	2480	49.5
		Incertae Sedis (<i>uncl. genus</i>)	241	4.8	341	5.8
	Xanthomonadaceae	Xanthomonadaceae (<i>uncl. genus</i>)	12	0.2	35	0.6
		γ - Proteobacteria (<i>uncl. family</i>)	844	16.8	958	16
		Proteobacteria (<i>uncl. class</i>)	53	1.1	283	4.8
Actinobacteria		Actinomycetales (<i>uncl. family</i>)	34	0.7	28	0.5
Flavobacteria	Flavobacteriaceae	Flavobacteriaceae (<i>uncl. genus</i>)	81	1.6	30	0.5
Anaerolineae	Anaerolineaceae	Anaerolineaceae (<i>uncl. genus</i>)	32	0.6	6	0.1
Clostridia	Incertae Sedis XI	<u>Tissierella</u>	31	0.6	0	0
		Clostridiales-I.sedis XI (<i>uncl. family</i>)	27	0.5	0	0
		Bacteria (<i>uncl. phylum</i>)	22	0.4	57	1
OTROS			226	4.6	177	3.1
TOTAL			5013	100	5855	100

uncl., no clasificado; subrayado, para desnitrificantes; **Negrito**, representados en árbol de parentesco

El primero es remarcar la prevalencia de los géneros Sedimenticola, con un 50% de frecuencia en Ca-A y uno 42% en Ca-B. La comparativa entre las muestras de las dos regiones del BTF-H2S ANOX fue interesante porque mostró la uniformidad en la distribución de la fracción prevalente a lo largo de la columna en la operación en paralelo. No obstante, los índices de diversidad de Chao1 calculados para Ca-A (573.5) para Ca-B (1,043.7) informaron que la diversidad en la muestra de la región de salida del gas (Ca-B), fue marcadamente mayor, el que se atribuyó a la presencia de géneros con hasta 10 lecturas en cada muestra. En trabajos de secuenciación masiva con muestras ambientales la participación de numerosos géneros muestra la riqueza

de la comunidad o el potencial genético de la comunidad mientras la baja participación indica que aquellos taxones no están relacionados con la actividad predominante en el ecosistema (Cabrol & Malhautier 2011).

Por fin, es interesante comentar que al final del período paralelo fue observada la des acumulación de azufre elemental. El cambio en la estructura de la biopelícula se observó bajo microscopia electrónica (imágenes disponibles en Almengló, 2014). Se observaron más células y EPS por unidad de área, do que en muestras obtenidas en contracorriente, de la misma región. Esto indicó la actividad complementar de degradación y eliminación de S^0 que se desarrollo en la región de abajo.

6.5.3.4. Estudio sin recirculación (régimen contracorriente)

Los resultados del protocolo de clasificación de Ca-A (5,013 lecturas de secuencias) fueron detallados en el apartado anterior. 14,648 secuencias pre-tratadas vía RDP se emplearon en los análisis de Ca-C. En la muestra Ca-C las secuencias fueron clasificadas en 16 filis, 28 clases, 94 familias y 158 géneros mientras que en Ca-A fueron encontrados 8 filis, 14 clases, 33 familias y 42 géneros. Del conjunto de datos que se sometieron al clasificador RDP, a nivel de filo se lograron clasificar el 99% de las secuencias de Ca-A y el 97% de Ca-C, mientras que a nivel de clase se hizo el recuento de 98 y 91% de las lecturas, respectivamente. A nivel de familias sólo se pudieron clasificar aproximadamente el 70% de las secuencias de la muestra C. La limitación en asignar identidad fue muy marcada a nivel de género donde sólo se pudieron asignar identidad a cerca de la mitad de las secuencias de Ca-A y una cuarta parte de las secuencias de Ca-C. Esta limitación fue justificada por la longitud de los amplicones, de apenas 440 nt en media, y, falta de información de identidad en las bases de datos.

Ya, el éxito la clasificación de más secuencias en Ca-A se debe observar con cuidado pues el mejor rendimiento fue debido a la prevalencia de *Sedimenticola* (Familia *Incertae Sedis*). El inverso ocurrió en la muestra Ca-C en donde el esclarecimiento de la clasificación se justificó por la distribución en muchos filótipos. El grado de incertidumbre se puede comprobar en los valores de significancia medida en los recuentos.

La distribución de las secuencias en los distintos niveles taxonómicos se aprecia en la figura 5-9. En el rectángulo superior (*gráfica "a"*) se resumen los datos de la

distribución para los filos de bacterias: en las barras rojas los valores atribuidos a Ca-A y en verde para Ca-C. Para una mejor visualización de los datos relativos a especies no prevalentes en el recuadro pequeño se presenta una ampliación de los filos que no superaron el 1.5% de presencia.

En la gráfica “a” se observan algunos de los cambios. El principal fue la disminución de las γ -proteobacterias, de un 94% a un 64%, acompañado del incremento en la participación de Bacteroidetes, que pasaron de un 2% al 17%; seguido de Chloroflexi que subió de un 1% al 7%. El incremento en Firmicutes fue del 1% pero, representó el doble de participación. Al nivel de las clases se observaron cambios importantes relacionados a presencia de Proteobacterias de la clase β , que incrementó su participación al 5%, mientras la clase γ disminuyó de 72 al 33%. La clase α se mantuvo a valores cercanos a los observados en Ca-A, con un ligero incremento (de 20 a 24%).

Conforme datos de la grafica “b” la distribución al nivel de familias, fue marcado principalmente por 3 cambios: primero por la reducción dramática de la participación de las secuencias relacionadas a *Incertae Sedis- γ* (de 54% en Ca-A al 8% en Ca-C), y luego por el incremento en la presencia de Flavobacteriaceae-Bacteroidetes (de 2 al 12%), y Anaerolineaceae (de 1 al 4%). El tercer cambio trata de la distribución de las familias Flavobacteriaceae (12%), Phyllobacteriaceae- α ($\pm 10\%$) y, Rhodobacteraceae- α ($\pm 7\%$), que pudieron incrementar sus contribuciones. En estas dos familias se incluyen diversas bacterias del ciclo biológico del azufre y del nitrógeno. Para mejor entender el efecto de la nueva distribución en el biofiltro se necesitan de los datos de abundancia detallados hasta el nivel de género (tabla 5-8).

Los datos de la tabla enseñan la distribución de las secuencias en 9 categorías principales en donde las agrupaciones de secuencias más numerosas fueron atribuidas a familias que no tuvieron la taxonomía confirmada a nivel de género. Los casos más importantes fueron γ -proteobacterias (*uncl. family*), que mantuvo los 20% en ambas muestra, y Flavobacteriaceae - Bacteroidetes (*uncl. genus*) que aumentó su participación de ± 2 a cerca de 12%. Luego se observan varios grupos con valores de abundancia muy cercanos: *Hoeflea*, que disminuyó de 8 a 4%; Phyllobacteriaceae (*uncl. genus*), que aumentó de 2 a 5% Rhodobacteraceae (*uncl. genus*), que mantuvo los 4%, *Incertae Sedis- γ* (*uncl. genus*), que mantuvo 5% y Anaerolineaceae-Chloroflexi (*uncl. genus*), que pasó al 4%. El cambio más marcado fue atribuido a Sedimenticola, que bajo del 50 a 4%. Con estos datos se logró clasificar el 67% de las secuencias.

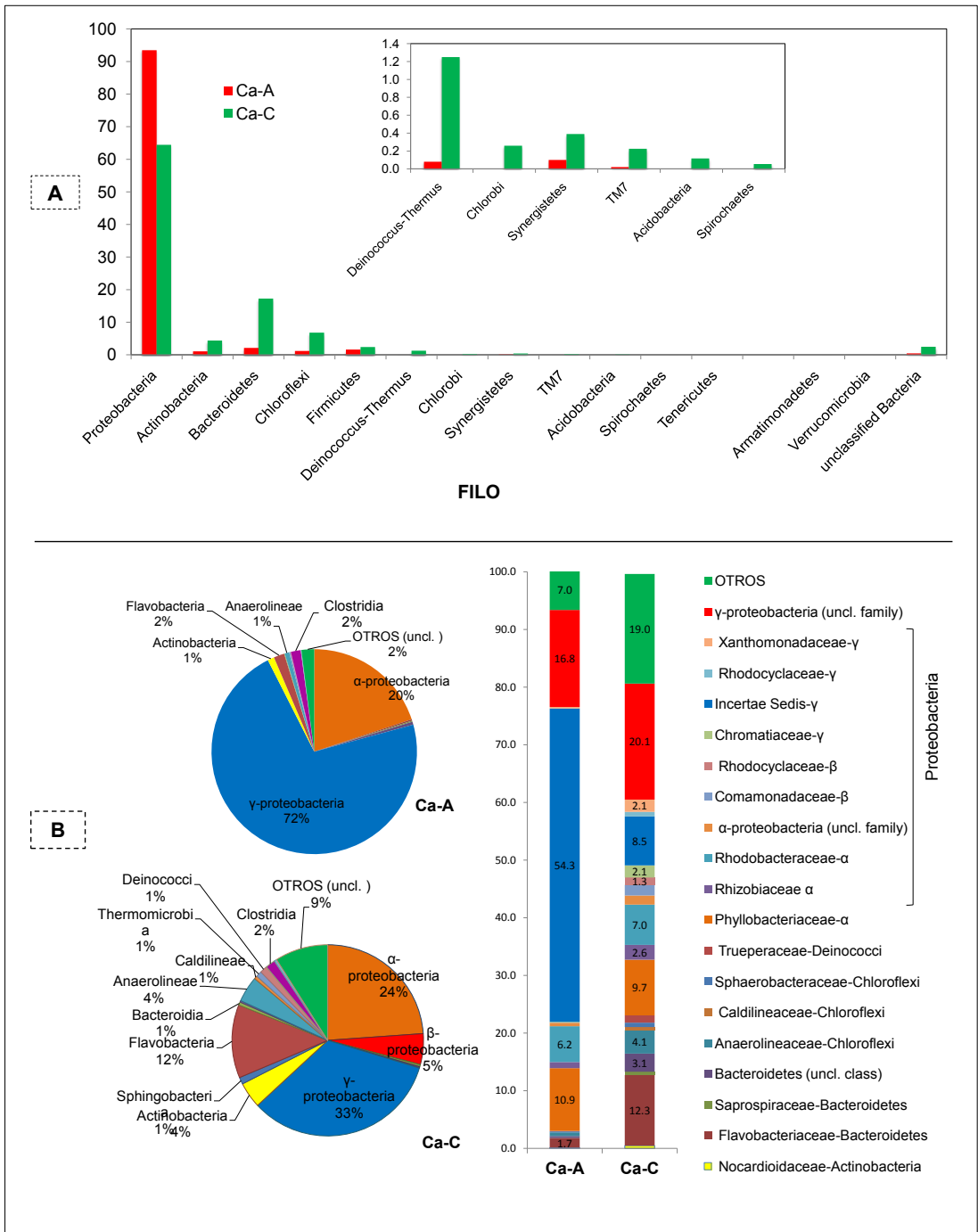


Figura 6.10. Abundancia relativa (%) en Ca-A y Ca-C. En A se enseñan los datos al nivel de filo y B para clases (graficas circulares) y familia (barras).

Tabla 6.7. Abundancia relativa de los géneros ($\geq 0.5\%$) en las muestras Ca-A y Ca-C

Clasificación Filogenética			Abundancia			
Clase	Familia	Identidad asignada	Ca-A		Ca-C	
			Nº	(%)	Nº	(%)
α -proteobacteria	Phyllobacteriaceae	<i>Hoeflea</i>	406	8.1	520	3.5
		<i>Nitratireductor</i>	41	0.8	161	1.1
		Phyllobacteriaceae (<i>uncl. genus</i>)	99	2.0	733	5.0
	Rhizobiaceae	Rhizobiaceae (<i>uncl. genus</i>)	8	0.2	28	0.2
		Rhizobiales (<i>uncl. family</i>)	45	0.9	349	2.4
	Rhodobacteraceae	<i>Rhodobacter</i>	2	0.0	83	0.6
		<i>Paracoccus</i>	73	1.5	291	2.0
		<i>Roseovarius</i>	40	0.8	88	0.6
		Rhodobacteraceae (<i>uncl. genus</i>)	197	3.9	561	3.8
		α -proteobacteria (<i>uncl. family</i>)	29	0.6	233	1.6
β -proteobacteria	Comamonadaceae	Comamonadaceae (<i>uncl. genus</i>)	1	0.0	272	1.9
	Rhodocyclaceae	Rhodocyclaceae (<i>uncl. genus</i>)	0	0.0	185	1.3
γ -proteobacteria	Chromatiaceae	Chromatiaceae (<i>uncl. genus</i>)	7	0.1	307	2.1
		<i>Sedimenticola</i>	2480	49.5	533	3.6
		<i>Incertae Sedis</i> (<i>uncl. genus</i>)	241	4.8	639	4.4
		<i>Marinicella</i>	3	0.1	74	0.5
	Rhodocyclaceae	<i>Thauera</i>	2	0.0	116	0.8
	Xanthomonadaceae	Xanthomonadaceae (<i>uncl. genus</i>)	12	0.2	310	2.1
		γ -proteobacteria (<i>uncl. family</i>)	844	16.8	2948	20.1
		Proteobacteria (<i>uncl. class</i>)	53	1.1	170	1.2
Actinobacteria		Actinomycetales (<i>uncl. family</i>)	34	0.7	321	2.2
	Nocardioideae	<i>Nocardioides</i>	7	0.1	69	0.5
		Actinobacteria (<i>uncl. class</i>)	0	0.0	28	0.2
Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Flavobacteriaceae (<i>uncl. genus</i>)	81	1.6	1718	11.7
		Flavobacteriales (<i>uncl. family</i>)	3	0.1	79	0.5
	Saprospiraceae	Saprospiraceae (<i>uncl. genus</i>)	0	0.0	83	0.6
		Bacteroidetes (<i>uncl. class</i>)	16	0.3	458	3.1
Chloroflexi	Anaerolineaceae	Anaerolineaceae (<i>uncl. genus</i>)	32	0.6	596	4.1
	Caldilineaceae	<i>Caldilinea</i>	0	0.0	80	0.5
	Sphaerobacteraceae	<i>Sphaerobacter</i>	9	0.2	114	0.8
		Chloroflexi (<i>uncl. Class</i>)	14	0.3	134	0.9
Firmicutes		Firmicutes (<i>uncl. class</i>)	1	0.0	91	0.6
Deinococci	Trueperaceae	<i>Truepera</i>	4	0.1	182	1.2
		Bacteria (<i>uncl. phylum</i>)	22	0.4	359	2.5
OTROS			207	4.1	1735	11.8
TOTAL			5013	100	14648	100

(*uncl.*), no clasificado; Subrayado: para desnitrificantes; **Negrito**, representados en árbol de parentesco

Las secuencias afiliadas a Bacteroidetes se pudieron relacionar a bacterias del sedimento oceánico y de sistemas de tratamiento de aguas. Algunos ejemplos del parentesco de las secuencias se enseñan en el árbol construido con los resultados del BlastN (vía MEGA5) (fig.6.11). El clúster Ca-Flavobacteriaceae se pudo relacionar, (al 99% de similitud) con algunas especies quimiorganotróficas reportadas en estudio de reciclado de nutrientes, en el fondo marino (Qin et al. 2010; Oh et al. 2011). Se incluyó en el árbol la especie *Flavobacterium denitrificans*, que fue la principal referencia para desnitrificación para Flavobacteriaceae de Bacteroidetes.

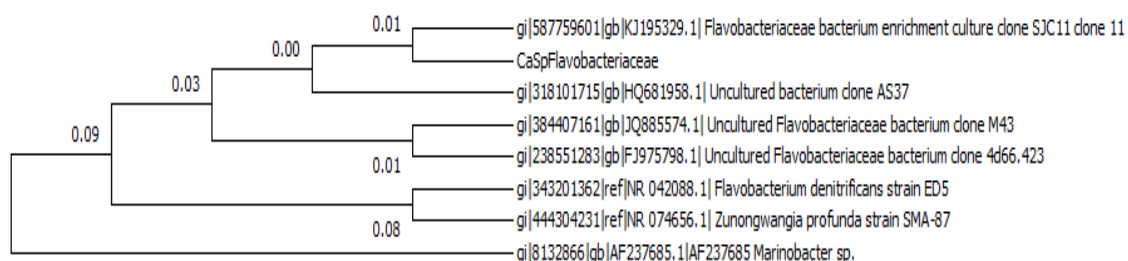


Figura 6.11. Árbol filogenético (Neighbor joining) de 16S ARNr generado en MEGA5 para el parentesco entre Flavobacteriaceae. La divergencia evolutiva se enseña en los brazos

Dentro del grupo Bacteroidetes (*uncl. class*) se encontró relación con especies quimiorganotróficas relacionadas al metabolismo de proteínas.

Las secuencias asignadas a Rhodobacteraceae (*uncl. genus*) fueron alineadas y el resultado indicó que los clústeres asignados a *Paracoccus se acercaron filogenéticamente a Paracoccus sp a P. versatus* el que fue muy interesante visto que, indicó, la utilización de la reducción heterótrofa hasta nitrito como ruta metabólica del nitrato. También se encontró secuencias relacionadas a otros grupos de bacteria desnitrificantes como *Rhodobacter* (Hartsock & Shapleigh 2010). Las informaciones extraídas de los análisis indicaron que los miembros de la familia de α - proteobacteria podrían competir por el nitrato y por el nitrito con las especies autótrofas.

Para las secuencias clasificadas en β -proteobacteria, familia Rhodocyclaceae (*uncl. genus*), se encontró relación (al 70% de similitud), con especies del género *Azoarcus*. que alberga cepas que desnitrifican sobre H_2S (Lee et al. 2014).

En la muestra Ca-C las γ -proteobacterias más importantes fueron *Sedimenticola*, mismo tras reducir su participación con respecto a la muestra Ca-A (de 50 a 4%), y *Incertae Sedis* (que mantuvo el 5%). En la muestra Ca-C otro género de *I. Sedis*

apareció entre las especies con más de 1% de frecuencia. Se trata de *Marinicella* que fue reportada por desnitrificar sobre H₂S, en aguas residuales (Shoji et al. 2014). Además, se puede añadir la participación de los miembros del género *Thaurea* en la actividad principal del biofiltro. Juntos, todos los miembros de la clase γ -proteobacteria constituyeron un gremio que se ocupó de la desnitrificación autotrófica. Faltaría señalar que se en Ca-A esta fracción de comunidad alcanzó un 70% de las secuencias, en Ca-C su contribución fue solo del 33%.

El último cambio a comentar fue el relativo a Chloroflexi que incrementó su presencia del 1 al 7%. Fue en la familia Anaerolineaceae que se agruparon la mayoría de las secuencias. La clasificación indicó relación con el género *Bellilinea que reúne* bacterias del sedimento capaces de reducir nitrato a cuevas de metano (Liao et al. 2014; Nelson et al. 2012; Lebrero et al. 2012).

Los valores de abundancia para Ca-C informan que la pérdida de la parcela de la comunidad quimiolitautotrófica, especialmente de *Sedimenticola*, parece haber comprometido la eficiencia y la resistencia del sistema en el período sin recirculación.

Finalmente, en condiciones de operación en paralelo (Ca-A) *Sedimenticola* fue el género dominante en ambas regiones del biofiltro. Debido a sus características fisiológicas, esta bacteria pudo llevar a cabo gran parte de la actividad desnitrificante por vía autotrófica. En la región de entrada se observó una marcada especialización de la comunidad compuesta por *Sedimenticola* y también *Paracoccus* sp., mientras que en la parte de abajo se observó una mayor diversidad en bacterias NR-SO pero sin marcado predominio. En base a esto se pudo concluir que la operación en paralelo fue una alternativa muy buena para la eliminación de H₂S del biogás. Ya en régimen contracorriente la actividad desnitrificante fue distribuida por distintos taxones. La ocurrencia de poblaciones de distintos perfiles NR ilustró el desarrollo de otros nichos complementarios de metabolismo del azufre (como la reducción de sulfato), del nitrato y del nitrito, pero principalmente por heterotrofia. Bajo esta condición de operación, los resultados indican que la actividad NR-SO fue marcada por la conversión del H₂S a S⁰ y de NO₃ a NO₂. Este efecto se verificó por el incremento de la producción de azufre elemental, que coincidió con la pérdida gradual de la capacidad del sistema de tratar H₂S.

6.5.3.5. Estudio de la operación sin control de T y pH

En la etapa 6 de la operación, el sistema volvió a las condiciones normales en contracorriente pero se anuló el control de pH y de T con el objetivo de estudiar sus efectos. Pero, el periodo 6 fue marcado por una serie de problemas producidos por fallos en diversos puntos de la planta, y que se relacionaran al desgaste natural tras más de 400 días en marcha. Así mismo fue posible estudiar el efecto del pH en una muestra puntual de biomasa (Ca-D).

-Temperatura

Conforme informaciones de la planta el experimento se llevó a cabo en verano y durante el período la T fue muy estable sufriendo pocas variaciones extremas (de 19 a 37 °C) con un promedio del período de entre 30-33 °C. Estudios de otros autores informaron que la temperatura ideal para desnitrificación en aguas residuales gira entre 25 °C con una queda en la actividad por encima de los 30 °C (Peng & Zhu 2006; Lu et al. 2014). La gran mayoría de los microorganismos empleados en la desulfuración biológica son mesófilos, por ejemplo, los miembros de los géneros *Acidithiobacillus* y *Thiobacillus* incluyendo también los desnitrificantes miembros de *Paracoccus* y *Sulfurimonas*. Esto probablemente tiene que ver con el hecho de que la temperatura afecta a la solubilidad de los compuestos y a la transferencia de materia, y, por consecuencia, su *disponibilidad hacia la biomasa*. El pH y temperatura óptimos para la desulfuración anóxica fue establecido con anterioridad en un BTF similar al utilizado en este estudio: 7.4 y 30 °C respectivamente (Fernández et al. 2014). Este mismo autor encontró que el aumento de la temperatura a 36 °C, produjo una disminución en el porcentaje de eliminación del 100% al 88% y la disminución de la temperatura desde el valor óptimo de 30 °C hasta 15 °C, produjo una disminución lineal de la eficacia hasta un 65%. Sin embargo, en el caso del presente estudio, el hecho de probar con los dos parámetros en un mismo período puede haber enmascarado la influencia de uno y otro. Así mismo, en virtud a la estabilidad de la temperatura observada en el periodo estudiado su efecto se desprecia en la presente discusión, pasando la discusión en torno al cambio de pH.

-pH

En la tabla 5.9 se presenta el resumen de la comparativa de abundancia entre la muestra de contracorriente Ca-C y muestra sin control de pH, Ca-D. Tal como se ha comentado brevemente, no se contemplaron grandes cambios en la fracción predominante, y por esto no se presentan las figuras para filo y clase. La familia

Phyllobacteriaceae- α fue la más frecuente, con participaciones muy parecidas (8 y 10% aproximadamente) y con los mismos géneros asignados. No se encontró ningún cambio significativo para las demás familias de esta clase. La actividad desnitrificante fue atribuida a géneros heterótrofos SO, representados por *Paracoccus* y *Rhodobacter*. Además la presencia de *Roseovarius* corroboró esta información.

Dentro de la clase β se clasificaron, en cada muestra, cerca de 1.5% de las lecturas para Comamonadaceae mientras para Rhodocyclaceae se asignaron 4% en Ca-A y 6% en Ca-D. En esta última familia se agregan diversos géneros desnitrificantes, reportados para aguas residuales con destaque para *Thaurea*. Una porción de las secuencias *unclassified* se pudieron relacionar a este género, pero con valores de similitud de secuencia inferiores a 70% (ver en el anexo 4). Las reductoras de sulfato, afiliadas a las clases Delta, Épsilon y Gamma, de Proteobacteria, se mantuvieron en valores cercanos a aquellos reportados en Ca-C, con destaque para la familia Desulfobulbaceae que incrementó su participación hasta 1.5%. La presencia de otras bacterias del azufre como *Sulfurovum* también fue ligeramente incrementada (de 0.2 a 1.5). La diversidad de bacterias relacionadas al ciclo del azufre y nitrógeno en ambas muestras se investigó en el set de datos. De hecho la riqueza de especies representadas por géneros relacionados a *Thiobacillus*, *Thiothrix*, *Sulfurovum*, *Desulfocapsa*, *Thiorhodococcus*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfomicrobium*, *Thiocapsa*, *Nitratireductor*, *Azoarcus*, *Desulfuromonas*, por ejemplo, indicó fuerte redundancia funcional. También indicó la formación de microhabitats que favorecieron la distribución de ellos en función de los nichos (ver resultados en el anexo 4). El desarrollo de esta fracción de la comunidad en Ca-D se pudo explicar por la reaclimatación a S⁰.

En la clase γ -proteobacteria, una gran cantidad de secuencias no se pudieron clasificar a géneros (± 20 solo se asignaron identidad a nivel de familia). Para complementar la búsqueda se hizo alineamiento blast. Con esta herramienta se obtuvo que la gran mayoría de las secuencias *unclassified* se relacionaron a los géneros *Sedimenticola* y *Marinicella*, ambas desnitrificantes. Los cambios en las γ -proteobacteria fueron interesantes porque reportaron la tendencia a recuperación del género *Sedimenticola* (que pasó de 4 a 8%), que quizás, a largo plazo, podría haber contribuido para incrementar la actividad desnitrificante autotrófica, otra vez. La disminución de la participación de la familia Flavobacteriaceae, también fue bastante marcada.

Tabla 6.8. Abundancia relativa de los géneros ($\geq 0.5\%$ en presencia) en las muestras Ca-C y Ca-D

Clasificación Filogenética			Abundancia			
Clase	Familia	Identidad asignada	Ca-C		Ca-D	
			Nº	(%)	Nº	(%)
α -proteobacteria	Phyllobacteriaceae	<i>Hoeflea</i>	520	3.5	174	2.4
		<u><i>Nitratireductor</i></u>	161	1.1	106	1.5
		Phyllobacteriaceae (uncl. genus)	733	5.0	472	6.6
	Rhizobiaceae	Rhizobiales (uncl. family)	349	2.4	212	3.0
	Rhodobacteraceae	<u><i>Paracoccus</i></u>	291	2.0	120	1.7
		<u><i>Roseovarius</i></u>	88	0.6	22	0.3
		<u><i>Rhodobacter</i></u>	83	0.6	33	0.5
		Rhodobacteraceae (uncl. genus)	561	3.8	216	3.0
	Rhodobiaceae	<i>Tepidamorphus</i>	73	0.5	40	0.6
		α -proteobacteria (uncl. family)	233	1.6	85	1.2
β -proteobacteria	Hydrogenophilaceae	<u><i>Thiobacillus</i></u>	0	0.0	76	1.1
	Comamonadaceae	<i>Simplicispira</i>	8	0.1	35	0.5
		Comamonadaceae (uncl. genus)	272	1.9	40	0.6
	Rhodocyclaceae	Rhodocyclaceae (uncl. genus)	185	1.3	294	4.1
		<u><i>Thauera</i></u>	116	0.8	118	1.7
		Burkholderiales (uncl. family)	25	0.2	9	0.1
	β -proteobacteria (uncl. family)	61	0.4	33	0.5	
δ -proteobacteria	Desulfobulbaceae	Desulfobulbaceae (uncl. genus)	27	0.2	48	0.7
ϵ -proteobacteria	Helicobacteraceae	<u><i>Sulfurovum</i></u> ²	25	0.2	105	1.5
γ -proteobacteria	Chromatiaceae	Chromatiaceae (uncl. genus)	307	2.1	134	1.9
		Chromatiales (uncl. family)	35	0.2	45	0.6
	<i>Incertae Sedis</i>	<u><i>Sedimenticola</i></u>	533	3.6	585	8.2
		<u><i>Incertae Sedis</i></u> (uncl. genus)	639	4.4	224	3.1
		<u><i>Marinicella</i></u>	74	0.5	6	0.1
	Xanthomonadaceae	Xanthomonadaceae (uncl. genus)	310	2.1	161	2.3
		γ -proteobacteria (uncl. family)	2948	20.1	1314	18.4
		Proteobacteria (uncl. class)	170	1.2	93	1.3
Actinobacteria		Actinomycetales (uncl. family)	321	2.2	125	1.8
Flavobacteria	Flavobacteriaceae	Flavobacteriaceae (uncl. genus)	1718	11.7	261	3.7
		Flavobacteriales (uncl. family)	79	0.5	5	0.1
Sphingobacteria	Saprospiraceae	Saprospiraceae (uncl. genus)	83	0.6	4	0.1
		Bacteroidetes (uncl. phylum)	458	3.1	198	2.8
Anaerolineae	Anaerolineaceae	<i>Bellilinea</i>	14	0.1	33	0.5
		Anaerolineaceae (uncl. genus)	597	4.1	527	7.4
Caldilineae	Caldilineaceae	<i>Caldilinea</i>	80	0.5	30	0.4
Ignavibacteria	Ignavibacteriaceae	<i>Ignavibacterium</i>	38	0.3	46	0.6
Thermomicrobia	Sphaerobacteraceae	<i>Sphaerobacter</i>	114	0.8	42	0.6
		Chloroflexi (uncl. class)	134	0.9	66	0.9
Deinococci	Trueperaceae	<u><i>Truepera</i></u>	182	1.2	95	1.3
Clostridia		Clostridiales (uncl. family)	34	0.2	43	0.6
		Firmicutes (uncl. class)	93	0.6	46	0.6
		Bacteria (uncl. phylum)	357	2.4	121	1.7
Otros			1450	9.9	645	9.0
TOTAL			14648	100	7132	100

(uncl). no clasificado; Subrayado: para desnitrificantes

Tal como se presentó con antecedencia en el texto, la distribución de las poblaciones, en Ca-C, se pudo explicar, más en base a la posición en el lecho do que en función de la dirección del flujo de S-H₂S. En el presente estudio, el mismo fue encontrado al

comparar la diversidad entre las muestras de la operación en paralelo (Ca-A y B) con la muestra en contracorriente Ca-D. Los índices de diversidad encontrados en las tres muestras tomadas de la porción inferior (incluyendo se Ca-B, C y D) fueron muy semejantes el que indicó un ecosistema equilibrado y resistente a cambios ambientales.

El aporte de diversidad des del agua de la EDAR fue interesante porque a pesar de permitir la incorporación de nuevas poblaciones, en lo general, no influenció en la composición de la fracción prevalente. Un ejemplo fue el incremento en la presencia de bacterias sulfato reductoras de la clase δ -proteobacteira (0.4% presencia en Ca-C). Otro ejemplo curioso fue el desarrollo de poblaciones relacionadas al S^0 . Bacterias como *Sulfurovum* que utilizan S^0 como donador de electrones y nitrato como aceptor final. Los datos indicaron relaciones de competencia entre distintos grupos NR, que podían utilizar tanto nitrato como nitrito, por vía autótrofa o heterótrofa. Además, se pudo, comprobar una ligera tendencia de re-organización de la fracción de sulfato-reductoras y denitrificantes heterótrofos en la comunidad.

Con respecto a la producción de azufre elemental, en todas las muestras del presente estudio se encontraron solamente especies que lo depositan en el espacio extracelular, el que favoreció su reciclado y eliminación de la matriz del biofilm, principalmente en paralelo y en los períodos de starvation. Esta característica de la biomasa del BTF- H_2S ANOX fue similar al reportado por Syed et al. (2006).

En este período de la operación se pudo comprobar la robustez del ecosistema cuando se sometió a perturbaciones ocasionados por la falta de control de pH. La versatilidad metabólica de las poblaciones NR-SO favoreció la manutención del pH a niveles no inhibitorios: efecto que caracterizó la resistencia del biofiltro. En base a estas informaciones, se asumió que el ligero cambio de pH no fue suficiente para influenciar un cambio significativo en la comunidad. El principal cambio fue la recuperación de los miembros del género *Sedimenticola*, en Ca-D, el que proporcionó una mejora en la actividad autótrófica.

6.6. Conclusiones generales del capítulo

Una vez más, el análisis de comunidades microbianas a partir de la biblioteca de amplicones obtenidos por *tag-454* fue exitoso. Conforme los datos presentados por el secuenciamiento, la cobertura de la biblioteca de secuencias fue adecuada para las 4

muestras así como fue suficiente para el cálculo de la diversidad. El hecho de que no se pudo describir la comunidad en base a recuentos de especies no comprometió a la comprensión de la diversidad.

La herramienta de clasificación de bibliotecas del RDP se pudo aplicar de modo satisfactorio para explicar la composición de la comunidad de bacterias del biofiltro anóxico, pero en algunos casos fue necesario apoyar la información de identidad en resultados del blast. De ese modo se pudo acercarse a la identidad de los clústeres que parecían jugar un papel importante en el sistema. Los problemas encontrados para clasificar a las secuencias fueron, por un lado, el tamaño insuficiente de las secuencias, y por el otro, el desconocimiento de las poblaciones, o la falta de secuencias similares para confrontar en las bases de datos. Ambos factores se reflejaron en la gran parcela de secuencias “*unclassified*”. Esta limitación estuvo de acuerdo con otros estudios reportados en literatura para sistemas NR-SO.

En el estudio de ecología microbiana llevado a cabo en BTF-H₂S ANOX se logró describir el componente biótico en tres momentos de la operación mediante la aproximación metagenómica *tag-454* para ADNr 16S y además se pudo relacionar estos datos con los parámetros de operación elegidos: dirección del flujo de gas, modo de renovación de la fase líquida y T y pH con la eficacia de eliminación.

La actividad desnitrificante del reactor se pudo atribuir a dos comunidades distintas: autotrófica y heterotrófica que se desarrollaron en función de las condiciones de operación del BTF-H₂S ANOX. En las dos muestras del período en paralelo la comunidad fue determinada por el sentido unidireccional del flujo de NO₃ y H₂S. En la muestra Ca-A se observó una marcada especialización de la comunidad, mientras que en Ca-B la diversidad siguió un perfil de dispersión más amplio.

En la región de abajo del reactor, la operación en contracorriente favoreció la competencia entre desnitrificantes heterótrofos. De la comparativa de diversidad entre el modo paralelo y contracorriente (Ca-A frente a Ca-C) se pudo concluir que operar en paralelo se estimuló a la actividad autótrofa, principalmente representada por la población *Sedimenticola* mientras al modo contracorriente se estimuló también la actividad heterótrofa y la competencia entre distintas poblaciones de NR-SO. De hecho se observó un mejor performance del sistema durante el período paralelo comprobado por la mejor distribución del biofilm y menor acumulación de S⁰.

Finalmente, en el período de operación en paralelo se obtuvo una mayor diversidad para la muestra de la parte inferior del reactor, a la salida del gas (Ca-B). Al mismo

tiempo se verificó la prevalencia de los quimiolitautótrofos en la muestra tomada de la región de entrada, localizada en la posición superior del reactor (Ca-A). Los distintos perfiles de diversidad se pudieron relacionar con la diversificación de nichos que por su parte fue debida a la presencia de los diversos aceptores y donadores de electrones en la fase líquida en las dos regiones del reactor. Conforme los datos presentados, el aporte de nitrato y sulfuro desde una misma región parece haber favorecido la especialización de la comunidad desnitrificante, autotrófica que, incluso, fue capaz de consumir el S^0 acumulado en lecho. En virtud de la especialización, en el modo de operación en paralelo el biofiltro mejoró su comportamiento. Al alimentar NO_3 y H_2S desde regiones opuestas se favoreció el desarrollo de poblaciones de distintos perfiles metabólicos, en general que se desarrollan en condiciones medioambientales más amenas. Estas especies son más versátiles con respecto a aceptores y donadores de electrones.

La operación sin recirculación no interfirió en la reorganización del biofilm, en la porción inferior del reactor. En aquel período se pudo identificar la fuerte presencia de bacterias heterotróficas que competieron por el nitrato. Los pequeños cambios de diversidad observados al operar en continuo fueron ocasionados también por el efecto secundario de la re-inoculación recurrente del biofiltro, con bacterias provenientes del agua.

Con respecto a la operación sin control de pH (estudiado en la muestra Ca-D) no fue posible comprobar su afecto sobre la diversidad. El único cambio significativo observado fue una tendencia en la recuperación de *Sedimenticola* sp., que, como se ha visto en la muestra de paralelo soporta mejor el estrés y se favorece de la presencia de S^0 , en la matriz.

En este estudio la comunidad demostró un gran potencial metabólico, hecho que fue decisivo al operar sin recircular el líquido o a pH sin control. A nivel metabólico la capacidad de explotación de los distintos aceptores y donadores de electrones fue un factor preponderante. En este caso la dinámica ecológica fue dependiente de un equilibrio entre las distintas reacciones biológicas que permitieron contrarrestar el efecto de acidificación. Desde el punto de vista ecológico, la gran diversidad de poblaciones capaces de desnitrificar tanto sobre azufre y sulfuro con nitrato o nitrito fue lo que produjo la resistencia del biofiltro.

A pesar de las limitaciones metodológicas, se pudo identificar a los factores que afectaron en primer grado a la distribución de las especies y la eficiencia de la desulfuración. De hecho se pudo suponer que la dirección del flujo del gas fue

importante, pero el factor crucial para la microbiota fue la circulación del líquido. Para llegar a esta conclusión fue necesario comparar los datos de diversidad de todas las muestras.

Des del punto de vista de la ecología de procesos esta capacidad de resistir es algo que debe ser preservado en un ecosistema de tratamiento biológico de residuos. Estas informaciones están en acuerdo con el reportado en otros estudios en donde se relacionó el predominio de especies quimiolitotróficas con las condiciones más selectivas ocasionadas por el aporte de gas.

CAPÍTULO 7

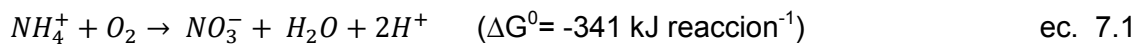
Estudio de la diversidad de Bacteria en biofiltro percolador para eliminación de NH₃

7. Estudio de la diversidad de Bacteria en biofiltro percolador para eliminación de NH₃

7.1. Introducción

7.1.1. Mecanismos de biofiltración para NH₃

La eliminación de NH₃ presente en corrientes de gases sigue en general, la vía de la nitrificación según la reacción global ec. 7.1, teniendo en cuenta que, en la transferencia del gas al líquido, el amoníaco pasa a forma de nitrógeno amoniacal NH₄⁺ (Madigan 2010).



La reacción global de la nitrificación que incluye el crecimiento celular se reproduce en la ec. 7.2, en donde C₅H₇NO₂ representa biomasa.



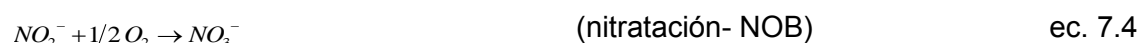
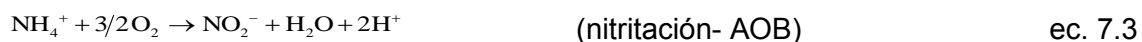
De la ecuación 7.2 se deriva que la conversión completa modifica el pH del medio por la liberación de H⁺ y que se consume una cantidad significativa de oxígeno para producir poca biomasa (C₅H₇NO₂) por cada mol de amonio (NH₄⁺) oxidado.

La nitrificación es un paso importante del ciclo del nitrógeno. En condiciones naturales este proceso ocurre en dos etapas, con la peculiaridad de que cada una la realiza una población distinta de Bacteria o Archaea. Esto implica que las especies que convierten amonio a nitrito (nitrificación) no sean capaces de llevar a cabo la transformación de este a nitrato (nitratación). Las poblaciones que realizan la conversión NH₄⁺ → NO₂⁻ son reunidas en un grupo denominado AOB (del inglés, *ammonium-oxidizing bacteria*), mientras las que se ocupan de la etapa 2 (NO₂⁻ → NO₃⁻) se denominan NOB (del inglés, *nitrite-oxidizing bacteria*) (Koops & Pommerening-Röser 2001).

Los principales géneros de AOBs son *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* y *Nitrosococcus* mientras NOB es representado por *Nitrobacter* y *Nitrospira*. La etapa 1 corresponde

con la etapa limitante del proceso de nitrificación debido a que el nitrito producido es rápidamente oxidado a nitrato (Ahn 2006). Ambos grupos (AOB y NOB) están clasificados como microorganismos quimiolitotótrofos, porque derivan la energía para crecimiento de la oxidación del nitrógeno inorgánico y a que usan carbono inorgánico (CO₂) para la síntesis en vez de carbono orgánico (Madigan 2010).

En base al metabolismo de estas poblaciones, la estequiometría en dos pasos puede ser expresada en las siguientes reacciones:



La oxidación del NH₄⁺ ocurre formando hidroxilamina (NH₂OH) como producto intermedio por mediación de la enzima amonio monooxigenasa (AMO), mientras la conversión de esta a nitrito ocurre por acción de la enzima hidroxilamina oxidoreductasa (HAO). La enzima que cataliza la conversión de nitrito a nitrato es la nitrito oxidoreductasa (Nxr).

A día de hoy, el amoníaco se elimina de corrientes de aire provenientes de EDARs, de compostaje, de ganadería y del sector industrial. Tal como se ha comentado en otros momentos, a pesar de ser más ventajosa que las tecnologías físico-químicas, la biofiltración presenta inconvenientes. El principal inconveniente en el tratamiento de altas cargas de NH₃ es la generación de NO₂ y NO₃. De ser así, los lixiviados van enriquecidos y por consecuencia habrá necesidad de completar la mineralización en un paso de eliminación posterior (Moussavi et al. 2011). Cuando la biofiltración de amoníaco gas se hace en una planta de tratamiento de residuos, que incluye el tratamiento de las aguas residuales, el nitrato se puede añadir al reactor de desnitrificación para ser eliminado definitivamente. Sin embargo, si la corriente de gas se trata en otro sitio, el destino del líquido de purga se convierte en un inconveniente. Otra solución bastante atractiva sería utilizar el proceso de nitrificación/desnitrificación simultánea en un solo biofiltro. Esta tecnología se conoce como SND (del inglés, *simultaneous nitrification-denitrification*), y el producto final es N₂ (Peng & Zhu 2006a).

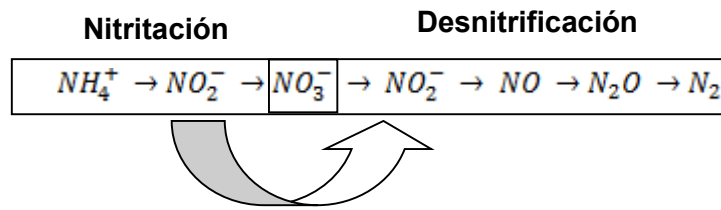


Figura 7-1: Secuencia de conversiones de las especies de N en proceso SND.

Sistemas SND se aprovechan de la actividad de poblaciones AOB y ND, que pueden ejecutar juntas las dos tareas de modo casi simultáneo. La secuencia de conversiones biológicas del proceso SND se ilustra en el diagrama de la fig. 7.1. La flecha indica el desvío de ruta a partir del nitrito generado por las AOB directamente para la ruta desnitrificante. El recuadro más pequeño indica el punto de cambio de proceso en que el nitrito pasa a sustrato de la desnitrificación (Peng & Zhu 2006a).

De la ecuación 7.5 se toma que el producto final de la SND es N_2 . A diferencia de otros procesos, no hay necesidad de fases alternadas (nitritación \rightarrow desnitrificación) o de reactores en secuencia, ya que el SND utiliza los dos procesos simultáneamente. Esta biotecnología utiliza biopelículas o biomasa suspensa en el mismo reactor, en donde las poblaciones están ubicadas en distintas capas, en diferentes profundidades, y actúan la segunda en función de los metabolitos de la primera. Estudios recientes demostraron que la SND puede resultar en una buena alternativa al tratamiento de corrientes de aire con altas concentraciones de NH_3 . En un estudio experimental Moussavi y colaboradores (2011) lograron R máxima del 98%. En el estudio se utilizaron $NaCOH_3$ o metanol como fuente de carbono para autótrofos y heterótrofos. Interesante del trabajo fue la importante contribución que se logró obtener de los nitrificantes-heterótrofos en el rendimiento de R1. Con respecto a parada de la nitrificación en R1 y cambio de ruta hacia desnitrificación, esto se logró al mantener FA en niveles inhibitorios para los sospechosos responsables por R2 (*Nitrobacters*), y DO limitada.

En el estudio de Moussavi se probó el efecto negativo del incremento gradual en la concentración de entrada de NH_3 (100 \rightarrow 600 ppm) sobre la EC, el que se reflejó en la R (74%), con EBTR de 60s. A pesar de no haber identificado a las poblaciones involucradas, estos autores utilizaron técnicas clásicas de crecimiento y enumeración en placa de cultivo para estudiar el perfil metabólico de autótrofos y heterótrofos. En base a sus resultados los autores intentaron entender el mecanismo del proceso SND- NH_3 (gas) que se conjeturó como sigue: primero, el amoníaco se disolvió en el

líquido de reciclaje y se transfirió a la capa externa de la biopelícula, constituida de poblaciones aeróbica, AOB y heterótrofas que promovieron R1. Luego, una fracción de NO_2^- fue desnitrificada (heterótrofas aeróbicas). El nitrito restante, junto a los compuestos orgánicos, fueron entonces difundidos en la capa más profunda de la biopelícula (biofilm anóxico) y desnitrificados por vía anóxica. De esto modo se logró enriquecer la población desnitrificante sobre nitrito dentro de la biopelícula así como las micro regiones anóxicas del lecho.

Al final, los metabolitos de la desnitrificación se difundieron hacia la fase líquida en movimiento, así como se pasaron al aire (N_2) a través del lecho.

7.1.2. Ecología de la biofiltración de NH_3

Desde un punto de vista ecológico, la nitrificación depende de una relación simbiótica entre poblaciones. De igual modo, dado que las reacciones son secuenciales, los procesos de biofiltración deben diseñarse para ofrecer un ambiente adecuado para las AOB y NOB. En general, en biofiltros percoladores el amonio que se disuelve en la fase líquida y es convertido a nitrato tras ser absorbido por la biopelícula. Sin embargo, la existencia de gradientes de nutrientes, oxígeno y aceptores de electrones hace que el micro ambiente sea distinto. De ser así, se debe considerar que pueden ocurrir otros procesos simultáneamente como por ejemplo la desnitrificación.

7.1.2.1. Componentes de proceso

Los factores que más importancia cobran en la nitrificación son la temperatura; el pH; y las concentraciones del NH_4^+ , NO_2^- , y N_2O ; además de la disponibilidad de oxígeno. La temperatura, porque interfiere directamente en la actividad de las bacterias nitrificantes. Se ha comprobado importante incremento en la velocidad de nitrificación con incremento de la temperatura, con inicio de la actividad en cerca de 5°C . De igual modo, se comprobó que entre 25 y 30°C es en donde se alcanzan mejores rendimientos. Se ha verificado una relación exponencial entre la tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes en función del incremento de la temperatura dentro del rango de 8°C a 30°C (Kim 2006; Zhang 2013; Zhang 2014). En función de estas informaciones se optó por operar el BTF- NH_3 a temperatura ambiente, lo que significó operar entre el 25 y 35°C

Con respecto al pH, este debe estar próximo de la neutralidad, ya que la acidificación favorece la formación de ácido nitroso libre (HNO_2), que es un potencial inhibidor de la nitrificación. Durante el proceso de nitrificación se pierde alcalinidad, que se consume como fuente de carbono y también por la producción de iones hidrógeno (H^+) y nitritos. Además, al producirse H^+ durante la oxidación del amonio, también se produce ácido nitroso (HNO_2), el que contribuye aún más para la acidificación (Gerardi, 2002). Para evitar los problemas derivados de los cambios ocasionados por el pH, se necesita aplicar maniobras de control que lo mantenga sobre el rango neutro (Yang et al. 2014).

El OD es un factor limitante de la nitrificación aerobia, y la velocidad de crecimiento de las poblaciones autótrofas depende directamente de ella (González *et al*, 2010). La baja difusión del oxígeno a través de la estructura de biopelículas y la competencia entre especies influyen en la velocidad de nitrificación (Gerardi, 2002). La difusión del O_2 debe ser favorecida a fin de superar el límite inferior de 2 mg L^{-1} . Así, para oxidar 1 mg de amonio se necesitan 4,6 mg de O_2 (Bitton, 1994). En biomasa flocular, por ejemplo, la distribución de la biomasa nitrificante (AOB y NOB) fue dependiente de los gradientes de OD. En biomasa de este tipo, la capa más externa fue poblada de AOB, que formaron colonias bastante numerosas en respuesta a la mayor disponibilidad de O_2 . Ya las NOB se distribuyeron en la capa interior, y debido a las limitaciones impuestas por los gradientes, fueron de crecimiento más lento (Zhang et al. 2014).

La gran mayoría de los BTF para eliminación de NH_3 es quimiótrofo, ya que no existe una carga orgánica a degradar. En biofiltros convencionales, la operación se lleva a cabo bajo condiciones estándar, que se han establecido a lo largo del tiempo, que incluye pH neutro, temperatura cercana a los $30 \text{ }^\circ\text{C}$, con utilización de NaHCO_3 como fuente de carbono (Ahn 2006). El régimen de alimentación de ambas fases (gas y líquido), puede ser en continuo o discontinuo, y la dirección del flujo del gas puede hacerse en sentido ascendente o descendiente.

7.1.2.2. Componente biológico

Todo indica que la nitrificación fue ampliamente distribuida en la naturaleza, sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado un microorganismo capaz de llevar a cabo la oxidación completa del amoníaco a nitrato (Koops & Pommerening-Röser 2001). Las bacterias nitrificantes son miembros del filo Proteobacteria, clases α y β , aunque 2 especies de *Nitrosococcus* están afiliadas a γ -proteobacteria. Las AOB se distribuyen

en 4 géneros: *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* y *Nitrosolobus*. El género *Nitrosomonas* se encuentra ampliamente difundido en sistemas de tratamiento de agua residual y también fue reportado con frecuencia en biofiltros debido a su papel vital en el ciclo del N; *Nitrosomonas europaea* y *N. eutropha* han demostrado un buen rendimiento en BTFs. (Maestre 2010; Xue 2010; Moussavi 2011). Los pertenecientes al género *Nitrospira* presentan una estrecha relación filogenética, pero son muy poco frecuentes en EDAR, (Schramm et al. 1998). Este género es muy sensible a las concentraciones de amonio libre (FA), con lo cual se inhibe fuertemente.

Las NOB son filogenéticamente más diversas que las AOB, y sus miembros pertenecen a cuatro géneros: *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* y *Nitrospina*. El grupo se distribuye ampliamente en la naturaleza dentro de α , γ i δ de Proteobacteria. Aunque los géneros de NOB- α *Nitrobacter* y *Nitrospira* sean todos organismos quimiolitautótrofos, estos pertenecen a grupos filogenéticos distintos, que representan una diversidad eco-fisiológica interesante para aplicaciones biotecnológicas. El género *Nitrobacter* contiene especies de ecosistemas acuáticos, terrestres, y sedimentos (Nielsen, 2010 Sorokin et al. 1998). Ya las especies *Nitrosococcus mobilis* (γ)- y *Nitrospina gracilis* (δ), fueron anteriormente descritas para ecosistemas marinos. *Nitrospira* sólo contiene dos especies descritas: *N. marina* (Watson et al. 1986) y *N. moscoviensis* (Ehrich et al. 1995); aunque se han encontrado gran diversidad de secuencias del gen del 16S tanto en muestras ambientales como en bioreactores (Daims, Purkhold, et al. 2001). Estudios más recientes relataron presencia la importancia de *Nitrosococcus mobilis* en tratamiento de lodos (Juretschko 1998).

Un proceso alternativo al tratamiento de corrientes de aire con altas concentraciones de NH_3 es la SND. En su estudio experimental Moussavi y colaboradores (2011) lograron R máxima del 98% así como probaron el efecto negativo del incremento gradual en la concentración de entrada (100 \rightarrow 600 ppm) sobre la EC, el que se reflejó en la R (74%). El EBTR ensayado fue de 60s. Los autores no identificaron a las poblaciones involucradas, apenas utilizaron técnicas clásicas de crecimiento y enumeración en placa de cultivo para estudiar el perfil metabólico. Los resultados indicaron que el consorcio fue formado por una combinación de heterótrofos (desnitrificación) y autótrofos (nitrificación). De acuerdo con los autores, la ecología del proceso SND se basa en las siguientes etapas. Primero, el amoníaco se disolvió en el líquido de recirculación y se transfirió a la capa externa de la biopelícula, constituida de poblaciones aeróbicas, autótrofas y heterótrofas que promovieron la etapa de nitrificación. Luego, una fracción del nitrito fue simultáneamente desnitrificada (bacterias

heterótrofas aeróbicas). El nitrito restante, junto con algunos compuestos orgánicos, fueron entonces difundidos en la capa más profunda de la biopelícula (biofilm anóxico); y llevaron a cabo la desnitrificación bajo condiciones anóxicas (debido a la limitación de la difusión DO). Al final, los metabolitos de la descomposición orgánica y de la desnitrificación se difundieron hacia la fase líquida en movimiento, así como se pasaron al aire a través del lecho. Esta difusión se refiere al N_2 producido de la desnitrificación. En aquel trabajo no se identificaron a las poblaciones residentes, el que limitó la mejor comprensión de la tecnología.

7.2. Antecedentes

El NH_3 es uno de los compuestos odoríferos de mayor interés para la biofiltración y su eliminación se estudia desde la segunda mitad del siglo XX. Las bases de la biofiltración de amoníaco se han establecido rápidamente visto que sigue la bioquímica de los procesos de tratamientos de aguas ricas en amonio. A día de hoy se han reportado gran eficiencia de eliminación tanto en biofiltros orgánicos como en biofiltros percoladores para bajas concentraciones, de hasta 50 ppm_v a la entrada.

En la naturaleza, el amoníaco gas se produce a partir de la degradación de la materia orgánica, principalmente a partir del ion amonio (NH_4^+) que, por su parte, se genera de la degradación de proteínas, urea o ácido úrico. Las emisiones de origen antropogénicas son muy comunes. Las actividades que más contribuyen son, la ganadería (aves de corral, y cerdos) de producción intensiva, en donde se emiten principalmente de los desechos. y las operaciones industriales, tales como la fabricación de fertilizantes; de papel y celulosa; petroquímica; industria de alimentos, y tejidos (Taghipour 2005; Sonil Nanda 2012; Kennes & Veiga 2013). El NH_3 que se emite en diversos puntos de las plantas de tratamiento de residuos urbanos es motivo de frecuente quejas del vecindario (Pagans et al. 2005). Las emisiones generadas del compostaje suelen ser del orden de 18 a 150 $gNH_3\ mg^{-1}$ de residuo sólido (Clemens & Cuhls 2003) y superiores a 700 $mgNH_3\ m^{-3}$ para gases provenientes del lodo de compostaje (Haug 1993). Además de los problemas relativos al gas amoníaco, el nitrógeno orgánico que no se degrada completamente en el compostaje puede contribuir para la formación de NO_x , que al ser emitido contribuye para la precipitación ácida (Buijsman et al. 1987).

El límite de detección humana del amoníaco es de cerca de 4 ppm_v, y tiene un umbral de olor moderado (5-20 ppm_v) (Ranau et al. 2005). Las emisiones están reguladas

tanto debido a molestias por malos olores cuanto por los problemas de contaminación del aire. El NH_3 en el ambiente, se transfiere por los distintos repositorios, y llega, tanto al agua superficial, como subterránea, donde produce acidificación y contaminación por distintas especies nitrogenadas que se van formando de la degradación natural (van der Eerden et al. 1998, Pagans 2005; Dorado 2013).

Debido a la facilidad con que son absorbidos, difunden y son convertidos, los compuestos nitrogenados orgánicos e inorgánicos pueden ser fácilmente eliminados de las corrientes de aire contaminadas por métodos químicos, aunque los costos de los productos para el lavado pueden ser elevados y a que genera grandes cantidades de sulfato de amonio, que luego tiene que ser tratado (Sakuma 2008; Lars D.M. Ottosen 2011; Dumont 2014; Ramachandran 2014; Yang 2014). Por estos inconvenientes la eliminación biológica mediante biofiltración puede ser una buena alternativa, tanto por el menor coste como por ser más sostenible. Sin embargo en la mayoría de las plantas, el N-NH_3 se convierte a NO_3^- que se debe purgar del sistema para luego someter a un proceso complementario de depuración (Sakuma et al. 2008). Para corrientes de baja carga los biofiltros convencionales han sido una buena alternativa, tanto para tratamiento de gases del ganado (Kristiansen, Pedersen, et al. 2011; Nanda et al. 2012), como de lodo de compostaje (Pagans 2005; Dorado Castaño 2013). Sin embargo se han mostrado especialmente sensibles a las fluctuaciones de pH y concentraciones de NH_4^+ y NO_2^- .

Los principales inconvenientes en tratar corrientes industriales son la acumulación de inhibidores: FA; NO_2 y HNO_2 , NO_3 y HNO_3 , generados de las conversiones de altas concentraciones del N, en el medio líquido y también su gestión como productos y subproductos de la nitrificación (Ottosen et al. 2011). Para el tratamiento de altas cargas los biofiltros tipo biotrickling son los indicados puesto que la presencia de una fase líquida que se renueva continuamente permite reducir las concentraciones de inhibidores en la biopelícula (Cabrol 2012; Maia 2012; Ramachandran 2014).

A lo largo de las últimas dos décadas, se estudiaron distintas condiciones de operación para la biofiltración de NH_3 , hecho que ha favorecido la optimización de las plantas de tratamiento. Se han estudiado los efectos de los tiempos de residencia de gas y líquido (Pagans 2005; Taghipour 2005; Hort 2009). Se lograron eliminar cargas de hasta $270 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ con de 11 s (Ramírez et al. 2009a) La capacidad crítica en general quedó en torno de los $60 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ para R% de 99% (Kanagawa 2004). Se han utilizados distintas fuentes de biomasa, principalmente lodo de EDAR (Pagans

2005; Xue 2011; Wu 2011; Dorado Castaño 2013) y cultivo de enriquecimiento para nitrificantes (Ramírez 2009).

Debido a sus características, la SND es un proceso prometedor para el tratamiento de corrientes de gases ricas en NH_3 ya que permite la eliminación simultánea de amonio con nitrito o amonio con nitrato con producción de N_2 . Sin embargo, la composición bacteriana y las condiciones ambientales, así como la presencia de inhibidores y la acumulación de ciertos sustratos debe ser controlada para evitar la emisión a la atmósfera de intermediarios gaseosos del proceso de desnitrificación, como son el óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O). A día de hoy, a escala global, los microorganismos desnitrificantes se encuentran implicados en la problemática del calentamiento global debido a las emisiones de N_2O , el cual tiene un impacto en el calentamiento global centenares de veces mayor que el CO_2 (Kampschreur, 2010). En base a estas informaciones se puede sugerir que el incremento de rendimiento va a depender no solo de mejoras en el diseño y ajuste fino de los parámetros de operación pero también de un estudio a fondo de la comunidad microbiana.

Finalmente, de la literatura se concluye que las condiciones de operación de los BTFs deberán ser ajustadas para mantener el ambiente estable, así como el balance de nitrógeno deber estar equilibrado, con disponibilidad de N-total de entre 1 y 4 gN L^{-1} . También se debe prevenir la acumulación de compuestos nitrogenados que son potencialmente inhibitorios para los microorganismos, principalmente NH_4^+ y NO_2^- . También, la formación de los sub productos se debe monitorizar, para impedir cambios de pH. Para el buen funcionamiento de un biofiltro percolador la fase líquida debe recircular, maniobra que previene la acumulación de compuestos nitrogenados tóxicos para los microorganismos.

A día de hoy, se han propuesto nuevas configuraciones con la finalidad de llevar a cabo la conversión del N-NH_3 a N-N_2 el que permite el retorno a la forma natural de depósito del nitrógeno (Sakuma, Jinsiriwanit, Hattori, & Deshusses, 2008).

A pesar de su potencial, la eficiencia de los biofiltros disminuye cuando se aplican tasas de carga de entrada de NH_3 (NLR) por encima de 10-20 $\text{gN m}^{-3} \text{h}^{-1}$ de NH_3 . Dicha limitación aparece debido a la sensibilidad de las bacterias nitrificantes al FA y el ácido libre nitroso (FNA).

A lo largo de los años la identificación de las poblaciones y su relación con la actividad de los biofiltros para eliminación de NH_3 se pudo averiguar empleándose técnicas de biología molecular. La DGGE se utilizó para identificación y para hacer el seguimiento

de comunidad nitrificante (Jun & Wenfeng 2009; Cheng 2010; Xue 2011), la FISH se empleó para comprobación de la identidad de poblaciones de AOB y NOB (Sato 2003) y su seguimiento a lo largo del tiempo y de la longitud de la columna (Kristiansen 2011). En este trabajo la secuenciación del gen 16S ARNr se realizó para comprobar identidad de las poblaciones. Los genes involucrados en la nitrificación fueron estudiados en *Nitrosomonas europea*, (Sayavedra-Soto & Hommes 2002) visto su gran potencial para aplicaciones a escala industrial.

Hasta la fecha, no fue reportado en la literatura el empleo de aproximaciones metagenómicas o de ecología de secuenciación masiva de biomasa de biofiltros para eliminación de amoníaco, de modo que no hay parámetros para su comparativa. Ya en el área de tratamiento de aguas residuales ricas en N se encontraron trabajos en los cuales se logró identificar y seguir a la dinámica de comunidades nitrificantes mediante aproximaciones bio-ómicas (Hu et al. 2012; Teeling & Glöckner 2012; Ye & Zhang 2013). De igual modo se empleó la aproximación *tag-454* para caracterizar biomasa granular formada a partir de lodo de depuradora (Guo & Zhang 2012).

La composición y la estructura de la comunidad de BTFs-N se documentaron principalmente por PCR-DDGE y clonaje, ambas con secuenciación del ADN recuperado de las bandas y clones. En biofiltros nitrificantes bandas de ADN fueron frecuentemente relacionadas a especies de *Nitrosospira multiformis*, *N. eutropha* y a otras como denitrificantes tipo reductora de perclorato (Jun & Wenfeng 2009); a través del FISH se reportaron la presencia de también a *Nitrobacter* y *Nitrosococcus mobilis* (Juhler et al. 2009). En biofiltros con amoníaco en mezcla con otros gases se reportó *Nitrosospira sp* además de *Nitrosococcus mobilis* (AOB) en co existencia con (Xue et al. 2011). En sistemas de tratamiento de mezclas (NH_3 + compuestos orgánicos volátiles) predominaron poblaciones distintas autores reportaron una sorprendente diversidad de bacterias incluyendo desnitrificantes, heterótrofos y sulfooxidantes formando una comunidad muy compleja (Kristiansen 2011; Park 2011; Veillette 2011; Feng 2012; Ralebitso-Senior 2012)

Pese el esfuerzo que se ha dedicado al estudio de cambios en la estructura o en la composición de la comunidad poco se ha avanzado en la identificación de la comunidad microbiana. La falta de información detallada de diversidad en biofiltración de amoníaco fue un estímulo a la inclusión del BTF- NH_3 en el trabajo de investigación que se reporta en la presente tesis.

7.3. Motivaciones y objetivos

La biofiltración del aire contaminado con nitrógeno se ha practicado desde las primeras décadas del siglo pasado. De ser así el grupo de investigación en biofiltración de gases de la UAB se propuso trabajar con este contaminante a fin de contribuir para optimización de las condiciones de operación en biofiltros percoladores. A lo largo de los años se construyeron distintos montajes experimentales de tipo biofiltro convencional y se estudiaron temas relacionados principalmente a limitaciones y inhibiciones que ayudaron en la elaboración de un modelo matemático a ser empleado en el diseño de los parámetros de operación (Baquerizo 2005; Baquerizo 2009). El estudio se interrumpió para luego ser retomado el 2011 cuando empezó la operación que fue objeto de la presente tesis. El principal objetivo fue profundizar en el conocimiento de los procesos biológicos que ocurren en el lecho correlacionando diversidad con eficacia de eliminación en bioreactor tipo biofiltro percolador. Se pretendió estudiar los efectos de la carga y de tiempos de residencia del gas y líquido en la composición de la comunidad de Eubacteria de un montaje a escala laboratorio. Para ello se buscó:

- ✓ estudiar la capacidad de eliminación del amoníaco a distintas condiciones de operación variando se el EBTR, HRT y concentraciones de entrada de NH_3 ;
- ✓ estudiar el efecto de las perturbaciones producidas, por los referidos cambios sobre las dos etapas de la nitrificación (nitritación y nitratación);
- ✓ trazar el perfil de distribución vertical de los principales miembros de la comunidad de Eubacteria a partir de tres muestras tomadas a distintas altura, en el periodo pseudo estacionario, con 125 ppm_v de NH_3 a la entrada.
- ✓ estudiar la diversidad en tres muestras integradas que representaron el crecimiento microbiano del período investigado;
- ✓ estudiar la dinámica de la comunidad AOB y NOB, y establecer correlaciones entre los cambios de poblaciones en un dado momento con las condiciones de operación impuestas en el período.

7.4. Materiales y métodos

En este trabajo, el diseño experimental y el mantenimiento del reactor fueron ejecutados en colaboración con otros miembros del grupo GENOCOV a fin de cumplir el doble objetivo de describir el comportamiento de la planta y estudiar la ecología del sistema. De los componentes del proceso solamente fueron discutidos aquellos datos necesarios para explicar la dinámica de la comunidad, a lo largo del tiempo y del cuerpo del reactor, en periodos determinados de la operación. De la ecología se estudió la dinámica de la comunidad microbiana en 3 muestras integradas, y se investigó la estratificación de la comunidad a lo largo del cuerpo del reactor a dos concentraciones de NH₃ de entrada (125 y 1410 ppm_v).

Así como en los estudios presentados con anterioridad, la descripción del montaje, las condiciones de operación padrones así como los métodos analíticos se describieron el apartado de materiales y métodos de la parte 1 del documento de tesis. En aquel apartado, se aprecia una imagen real tomada del set de operación, del material de relleno, y se presenta el esquema que ilustra el mecanismo de funcionamiento de la planta. En el presente capítulo se adjuntan los detalles de los cambios implementados sobre las condiciones investigadas. La metodología *tag-454*, y el análisis de diversidad siguieron el protocolo detallado en el Capítulo 3 Materiales y Métodos.

7.4.1. Parámetros de operación

El biofiltro se operó por casi 2 años pese a que el período de interés para esta tesis fue hasta el día 272 de operación. Se evaluó el comportamiento del BTF-NH₃ a diferentes concentraciones de NH₃ de entrada entre 100 y 1410 ppm_v y EBTR entre 2 y 46 s. Se probaron cambios en la carga de nitrógeno (N-NH₄⁺) a la entrada (de hasta 150 gN m⁻³ h⁻¹). También se investigó el perfil de eliminación de NH₃ a lo largo de la columna para 125 y 1410 ppm_v, y se relacionó este perfil con la composición de la comunidad para tres alturas del lecho. Además, se evaluó la carga de nitrógeno a la entrada-NLR, (del inglés, NH₃ *Loading Rates*) y el rendimiento de las dos reacciones biológicas R1 (referente a nitrificación) y R2 (referente a nitratación). Los detalles de métodos y cálculos se pueden consultar en Blázquez (2015).

$$R1 = \frac{(C_{in,NH_4^+} - C_{out,NH_4^+}) * Q}{V} + EC \quad \text{ec. 7.5}$$

$$R_2 = \frac{(C_{out,NO_3^-} - C_{in,NO_3^-}) * Q}{V} \quad \text{ec. 7.6}$$

La EC fue calculada de acuerdo con la ec. 2-3; R1 como velocidad de nitrificación ($\text{gN m}^{-3} \text{h}^{-1}$) y R2 como velocidad de nitratación ($\text{gN m}^{-3} \text{h}^{-1}$), C_{in,NH_4^+} en $\text{gN-NH}_4^+ \text{m}^{-3}$, que se midió en el medio mineral, C_{out,NH_4^+} en $\text{gN-NH}_4^+ \text{m}^{-3}$ que se midió en el líquido purgado; Q como caudal de gas de entrada ($\text{m}^3 \text{h}^{-1}$), V volumen del lecho (m^3), C_{out,NO_3^-} en $\text{gN-NO}_3^- \text{m}^{-3}$ que se midió en el líquido purgado y C_{in,NO_3^-} en $\text{gN-NO}_3^- \text{m}^{-3}$, que se midió en el medio mineral.

El sistema operó en régimen contracorriente y la operación se dividió en 7 fases, en función de los objetivos trazados para los ensayos. El diseño experimental para el referido período se resume en la tabla 7.1 en que se remarcan los datos relativos a los períodos de toma de muestra de biomasa.

Tabla 7.1. Etapas de la operación del BTF-NH₃

ETAPA	Período (d)	HRT (h)	EBRT (s)	NH ₃ entrada (ppm _v)	L (gN m ⁻³ h ⁻¹)	MUESTRA BIOMASA Fecha/ nombre/objetivo del estudio
I	30	8.8	(16- 11.2)	100	15.6	-
	56	8.8	11.2	125	23	Día 67 N-A/ estructura de la comunidad N-A₁; N-A₂; N-A₃ / distribución espacial
	32	(7.6 -3.6)	8	125	32	-
II	32	9.4	4.1	125	62.1	-
	2	8.6	2.1	150	149	-
III	50	9.2 (3.9-1.9)	2.2	125	117.3	Día 160 N-B: estructura de la comunidad
IV	15	9	4.4	140	69.6	-
	7	9	18.7	572	63.1	-
V	7	9	45.7	1,410	63.5	-
	7	9	2.2	125	117.3	-
	10	9	18.7	572	63.1	-
	10	9	45.7	1,410	63.6	-
VI	4	9	45.7	0	0	-
	10	9	4.4	125	58.65	Día 272 N-C: estructura de la comunidad

Las principales características de cada fase fueron:

-Fase I: Etapa de puesta en marcha y ajustes para condición estacionaria (86 días). La concentración de entrada de NH_3 se incrementó gradualmente hasta las 125 ppm_v, se ajustó la L hasta 32 gN m⁻³ h⁻¹; EBRT de 11.2 a 8 s. Cada cambio fue implementado después de la estabilización del biofiltro a las nuevas condiciones. Se tomaron 4 muestras de biomasa el día 67 a fin de obtener un perfil de la comunidad en condiciones de estado pseudo-estacionario. N-A fue la primera muestra integrada utilizada para estudiar la composición de la comunidad a lo largo del tiempo. N-A₁; N-A₂; N-A₃ fueron las muestras tomadas en las regiones inferior, mediana y superior de la columna, respectivamente, y que se utilizaron para elaborar un perfil de distribución espacial.

-Fase II: Se ensayó la dinámica de NLR promocionada por cambios en la HRT de 3.5 a 9.4 y 8.6 h y del EBTR, que varió de 8.8 a 4.1 y a 2.2 s. En los dos primeros ensayos se mantuvieron 125 ppm_v de NH_3 a la entrada. Al final se incrementó a 150 ppm_v. Con estas maniobras la L fue incrementada de 32 a 62 y después a 149 gN m⁻³ h⁻¹. El último ensayo fue abortado para preservar el sistema del efecto drástico del choque de carga.

-Fase III: Período de estudio del efecto del HRT. Se estudió disminuyendo los tiempos desde 9.2 h hasta 3.9 h y por último a 1.9 h. Se mantuvo EBTR a 2.2 s y concentración de NH_3 de entrada de 125 ppm_v. Con esta maniobra se alcanzó una L de 117.3 gN m⁻³ h⁻¹. El día 160 se tomó otra muestra de biomasa integrada (N-B) para hacer el seguimiento de la comunidad.

-Fase IV: Se estudió el efecto de variar la velocidad del flujo de gas y la concentración de entrada, manteniendo una L similar. El incremento de cerca de 10 veces en la concentración, a 1,410 ppm_v, fue compensado por el incremento de cerca de 10 veces en el EBTR (45.7s). En este período se midió la concentración de NH_3 a distintas alturas del lecho, a través de los 10 puertos de toma de muestra. Con estos datos se elaboraron perfiles de eliminación vertical. Se estudió la eliminación del amoníaco gas a 125 y 1,410 ppm_v, manteniendo L en los 63 gN m⁻³ h⁻¹.

-Fase V: En este período el biofiltro fue utilizado para experimentos complementarios modificando la concentración de NH_3 y tiempos de residencia. Primero se ajustó el EBTR a 2.2 s con 125 ppm_v para tener una L de 117.3 gN m⁻³ h⁻¹. Luego se probó subir

la concentración de 125 a 572 ppmv con EBTR de 18.1 s, alcanzando una L de 63 gN m⁻³ h⁻¹. Tras ello se forzó la resistencia incrementando la concentración de entrada hasta 1,410 ppmv, e incremento del EBTR 45.7 s.

-Fase VI: Al final del período experimental se restableció la configuración de referencia de 125 ppmv, EBTR 4.4s y HRT 9 h para una L de 59 gN m⁻³ h⁻¹. La muestra de biomasa N-C se tomó bajo estas condiciones. Esta muestra se comparó con las anteriores a fin de verificar la pérdida de diversidad y la evolución de las poblaciones producida por a la fuerte presión selectiva impuesta por el incremento de carga.

7.4.2. Análisis de comunidad

Las muestras de biomasa se nombraron N-A, N-B, N-C (muestras integradas) conforme detallado en la tabla 7.1. Las tres muestras tomadas al día 67 se nombraron N-A₁ (de la región inferior,- entrada del gas), N-A₂ (región intermedia de la columna), y N-A₃ (región superior- salida del gas). Se comparó la diversidad de Eubacteria en las tres muestras integradas y se elaboró el perfil de la comunidad a partir de muestras tomadas a tres alturas del reactor obtenidas durante la fase III. Se utilizó el set de datos generados en RTL (archivos bacteria traceback).

7.5. Resultados y discusión

7.5.1. Resumen de la operación del BTF-H₂S AER

El comportamiento del sistema a lo largo de los 272 días se presenta en la fig. 7.2 en donde se puede seguir a los efectos de las consignas aplicadas, en cada una de las fases. En la fig. 7.2A fueron representadas, carga (L), capacidad de eliminación (EC) y de la eficacia (R). En la fig. 7.1B los tiempos de residencia de gas y líquido. En la fig. 7.2C se muestran los resultados de las mediciones de concentración de NH₃, NO₂ y NO₃, tomadas en el líquido de salida a lo largo del tiempo.

En la fase I el BTF-NH₃ se hizo funcionar a bajas cargas para conducir adecuadamente el reactor hasta condiciones estacionarias. Desde la puesta en marcha el BTF presentó buena capacidad para eliminar NH₃. A comienzo de la operación se aplicaron cargas que favorecieron el rápido desarrollo de la biomasa para formación de la biopelícula. El día 25 se observa una subida importante en la R (95%)

que permitió ajustar nuevas consignas con vistas a la optimización del rendimiento nitrificante. La R promedio de la fase I fue de 78% (± 4). A continuación las consignas fueron ajustadas a los valores establecidos como referencia para esta fase. La estabilidad de la operación se alcanzó en torno al día 50 de modo que variaciones en la R (fig. 7.2A) fueron relacionadas a adaptaciones del sistema. Las reducciones graduales en el tiempo de contacto del gas (fig. 7.2B) no afectaron globalmente el comportamiento. La reducción del HRT al final de la fase I de 7.6 a 3.5 h simplemente redujo las concentraciones de las especies debido a una mayor dilución sin afectar al comportamiento del reactor.

Destacar el episodio ocurrido entre los días 35 y 37 en donde se observó un nítido cambio de comportamiento de la actividad de las AOB que resultó en acumulación de NH_4^+ y NO_2^- en el líquido. La R de 95% bajó entonces a 88. Al día 41 la concentración de NH_4^+ subió hasta los 412 mgN L^{-1} ($R=88\%$), pero volvió rápidamente a niveles de 60 mgN L^{-1} (92%) ya al día 48. Al día 50 ya con $R \geq 96\%$ se iniciaron los preparativos para la realización de los ensayos de la fase II. El accidente fue ocasionado por un fallo en las bombas que perjudicó la circulación de la fase líquida. Si por un lado el episodio sirvió para demostrar la sensibilidad de las AOB al incremento en la concentración del NH_4^+ en el líquido por otro enseñó su capacidad de recuperación, al retornar a la condición de operación normal. Con respecto al incremento puntual en la concentración NH_4^+ (fig.7.2C) que se observa sobre el día 67, fue resultado del procedimiento invasivo de toma de muestra de biomasa. Interesante anotar que el sistema pronto recuperó la R.

En la fase II, entre los días 121 y 155 se probó bajar el EBTR a 4.4 s con 125 ppm_v . A continuación se incrementó a 150 ppm_v y se probó bajar los tiempos de residencia; HRT a 8.6 y EBTR a 2.2 s (fig.7.2B). Con estas maniobras se subió la carga desde 62 a $149 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. En la fig.7.2A se aprecian los efectos sobre la R. Se observa una pérdida hasta niveles de 88% al día 126. Este efecto se vio acompañado de un incremento en las concentraciones de amonio y nitrito en el líquido de purga (fig.7.2C). El nitrógeno amoniacal que el día 121 fue 0 subió a 859 mgN L^{-1} el día 127. El nitrito siguió la tendencia de acumulación incrementando a 403 mgN L^{-1} el día 126, bajando a valores normales el día 133. La producción de nitrato volvió a normalidad el día 137 con una R de 92%. La EC máxima el período fue de $124.3 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ a una L de $149 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Tras suspender el ensayo el sistema fue capaz de consumir el nitrógeno acumulado, bajando la concentración de amonio a 565 mgN L^{-1} , el día 135 y volviendo a niveles de 143 mgN L^{-1} el día 135. El sistema volvió a eliminar 97% al día 142 el que

indicó re-aclimatación de la biomasa con el término de la perturbación. Esta habilidad de los BTFs de recuperarse rápidamente tras choques de carga fue reportada con anterioridad (Cabrol et al. 2009; Cabrol, Malhautier, Poly, Roux, et al. 2012) con que se relacionó a la estabilidad de la operación y transformación de los compuestos tóxicos.

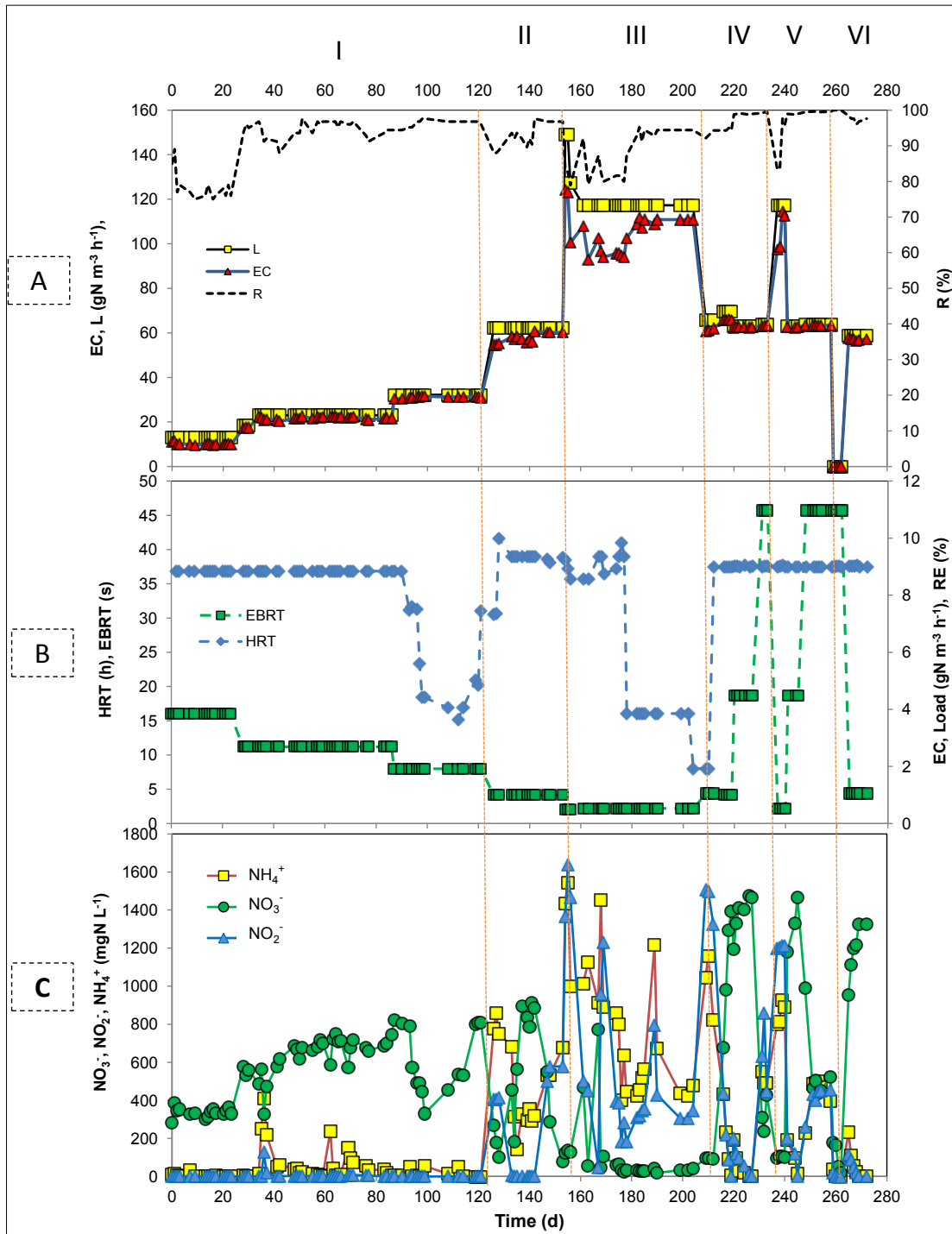


Figura 7.2: Performance de la operación del BTF-NH3. En A carga (L), capacidad de eliminación (EC) y Eficacia de remoción (R%), en B tiempos de residencia de gas (EBTR), y del liquido (HRT). En C concentraciones de especies N en el liquido de salida.

La importancia del HRT y del EBTR sobre la composición de la fase líquida y su influencia sobre la transferencia del gas hacia la fase líquida fue comprobada en la fase III. Se observaron alteraciones en la dinámica de eliminación originados por cambios en el HRT. Los cambios aplicados (ver tabla 7.1) produjeron los efectos que se pueden seguir en la fig. 7.2B. En la grafica A se observa que el primer cambio de EBTR a 8.5 s llevó a desestabilización del proceso de nitrificación con disminución de R hasta 79% ($EC = 100 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$). En aquel momento, ambos amonio y nitrito se acumularon en la fase líquida, alcanzando concentraciones de hasta $1,545 \text{ mgN L}^{-1}$ y $1,639 \text{ mgN L}^{-1}$, respectivamente, el día 156. El efecto fue acompañado por la disminución de nitrato en el líquido de salida, que bajó hasta valores cercanos a los 100 mgN L^{-1} . Los datos muestran que las dos reacciones biológicas sufrieron inhibiciones. Para eliminar las inhibiciones se probó disminuir la HRT hasta 1.9 h. El efecto de la maniobra se observa en la gráfica 7.3. A el día 182, por la recuperación de la capacidad de eliminación y de la R (96%) promocionada por la reducción del HRT hasta 3.8 h. Tal como se esperaba el incremento en la velocidad de renovación, por disminución del tiempo de residencia del líquido, fue más que benéfico para la biomasa. La mejora de la EC se explicó por el aumento del gradiente de concentración entre las fases gas y líquida al bajar la HRT, lo que favoreció la absorción del NH_3 en la fase de agua. Los ensayos comprobaron la importancia de la HRT al conducir la operación con altas cargas de N. Tras un período de aclimatación, a un tiempo de residencia de 9 h y EBTR de 2.2 s., se logro eliminar hasta 96% de la carga de $117 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

En las fases siguientes (IV y V) se incrementó la concentración de entrada del gas de las 125 hasta $1,410 \text{ ppm}_v$. Para ello se mantuvo constante el HRT y la carga. Los resultados del primer cambio a 140 ppm_v indicaron que el sistema recuperó la actividad de nitrificación y nitratación. Además el cambio intermedio a 572 ppm_v no interfirió en la nitrificación, se lograron R de 99%, conforme se aprecia sobre el día 220. Interesante fue el resultado alcanzado ya en la fase V. La elevada concentración de NH_3 a la entrada ($1,410 \text{ ppm}_v$) llevó a un nuevo episodio de inhibición. Por otro lado, el incremento del EBTR a 45.7 s produjo el efecto esperado, es decir que mejoró la transferencia del gas a la fase líquida. En aquel momento se lograron elevados valores de NLR, cercanos a los $63 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ con oscilaciones en la R% entre 83 y 98%. Estos resultados indicaron que la actividad biológica se vio afectada por la concentración de entrada. Conforme los resultados de las réplicas de los ensayos a 572 y 1,410 (fig. 7.3) el comportamiento observado con anterioridad se confirmó. En esta etapa también se estudiaron los perfiles de eliminación del amoniaco gas de la

corriente tomados a distintas alturas en la columna. Estos datos ayudaron a explicar la distribución de las poblaciones. Los datos del ensayo se reproducen en la fig. 7.3. en donde se aprecian los perfiles de eliminación en la longitud del lecho. Se aplicaron concentraciones de entrada de 140 ppm_v para un EBTR 4.4 s y C_{in} de 1,410 ppm_v y EBTR de 45.7 s. En resumen, los resultados indicaron que la transferencia se vio fuertemente afectada por el tiempo de contacto del gas. Al aplicar EBTR de 4.4 s el gas fue detectado a lo largo de todo el lecho, es decir que el tiempo de contacto fue insuficiente para promocionar la transferencia de todo el N del gas al líquido. Con 1,410 ppm_v y EBTR de 46 s se logró eliminar el amoníaco a mitad del lecho. Las velocidades lineares del gas en cada caso fueron de 844 m h⁻¹ y 38.4 m h⁻¹. Lo que se pudo concluir de estos ensayos fue que la mejora esperada en la transferencia de materia gas-líquido debida a una velocidad elevada del gas (a 4.4 s) se vio superada por un menor gradiente de concentración gas-líquido y una mayor actividad biológica al distribuirse de forma diferente los gradientes de concentración de las especies NH₄⁺ y NO₂⁻ a lo largo del reactor. Los resultados apuntan a que la inhibición generada en todo el volumen del reactor en las condiciones de 4s de EBTR fue mayor que la que ocurrió a 46s.

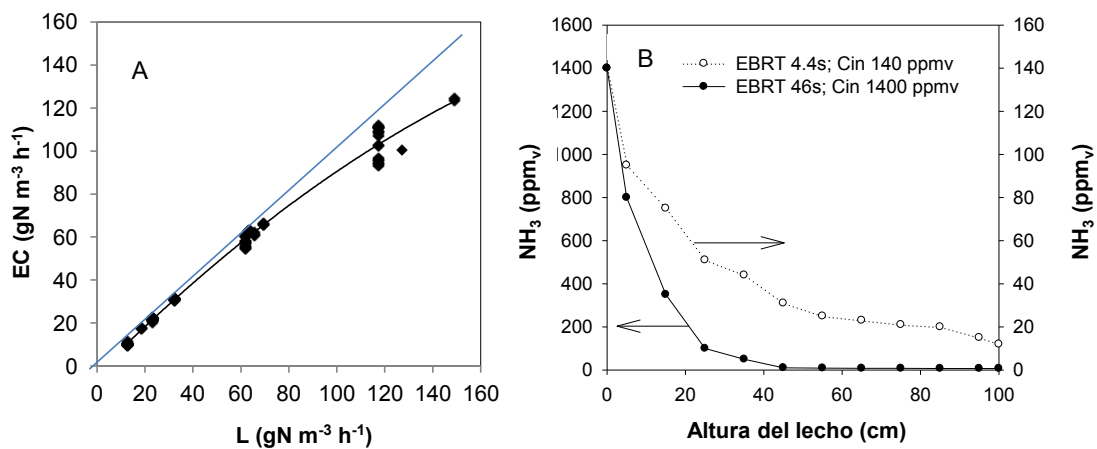


Fig. 7.3: En A estudio de la EC para determinación de la EC máxima y EC crítica. En B para perfiles de amoníaco a lo largo de la altura del lecho en carga (L) similar, con diferentes valores de EBTR y concentración de entrada de NH₃.

En la fase VI se volvió a operar con 125 ppm_v de NH₃ a la entrada, manteniendo la L a 59 gN m⁻³ h⁻¹, y HRT = 9 s, pero disminuyendo el EBTR a 4.4 s. El hecho de trabajar por debajo de la capacidad crítica favoreció el sistema ya que no se acumularon intermediarios. Así el biofiltro pudo recuperar la capacidad nitrificante en 3 días, con incremento de la R para 97% (fig. 7.2). Al día 272 el sistema se había estabilizado, el

que fue adecuado para realización de nuevo estudio de diversidad. En esto caso, se buscó identificar a los cambios en la composición de la comunidad.

Como conclusión de estos estudios se tomó que la biomasa no perdió la capacidad de llevar a cabo la nitrificación pese a estar expuesta a repetidas situaciones de estrés. Al final del estudio se comprobó que el tiempo requerido por el biofiltro para superar las pérdidas de eficiencia (EC) producidas por las perturbaciones impuestas por las condiciones experimentales fue de aproximadamente 5 días. En general, los datos de la R% y EC indicaron que el sistema suportó todos los cambios probados ya que no se observó EC inferiores a 75%. Este dato indicó que la comunidad nitrificante fue capaz de soportar las condiciones experimentales probadas. Las excepciones fueron cuando, el día 154, la L se incrementó a $149 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ en la cual se alcanzó EC de $124 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (este fue el valor de EC_{max}), y cuando la concentración de entrada se incrementó a $1,410 \text{ ppm}_V$, con L de $117 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. En esto caso la EC varió alrededor de $63.5 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (fase IV y V) y $58.1 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (fase VI) Bajo ambas consignas el biofiltro acumuló amonio y nitrito en el líquido indicando que las R1 y R2 sufrieron inhibiciones. El experimento de $149 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ fue abortado y no se volvió a aplicar cargas superiores a los $117 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

En base a los datos de EC y L se trazó la curva que permitió predecir la capacidad crítica (EC_c) del BTF. Conforme la fig. 7.2.A el valor estimado estuvo entre $50\text{-}65 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, el que coincidió con el reportado en otro estudio (Xue et al. 2010). Con respecto a la EC_{max} , el valor cercano a los $124 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ fue considerado elevado cuando comparado al de otros autores.

Finalmente, se estudió el rendimiento de cada una de las etapas de la conversión del amoníaco hasta nitrato, a partir de las medidas tomadas de amonio, nitrito y nitrato en el líquido de salida y del balance de materia. La influencia negativa de amonio libre (FA) y nitrito, como inhibidores de las reacciones R1 y R2 fue estudiada en los períodos de estrés. En el principio los datos indicaron que para alcanzar buenas tasas de nitrificación el BTF- NH_3 pasó por un proceso de aclimatación del inóculo en donde se logró tasas de nitrificación total elevadas, tanto para la NLR como para R1 y R2. Esto quiere decir que en la etapa 1 prácticamente toda la carga de NH_3 fue transferida en forma de NH_4^+ y oxidada hasta nitrato (fig.7.4).

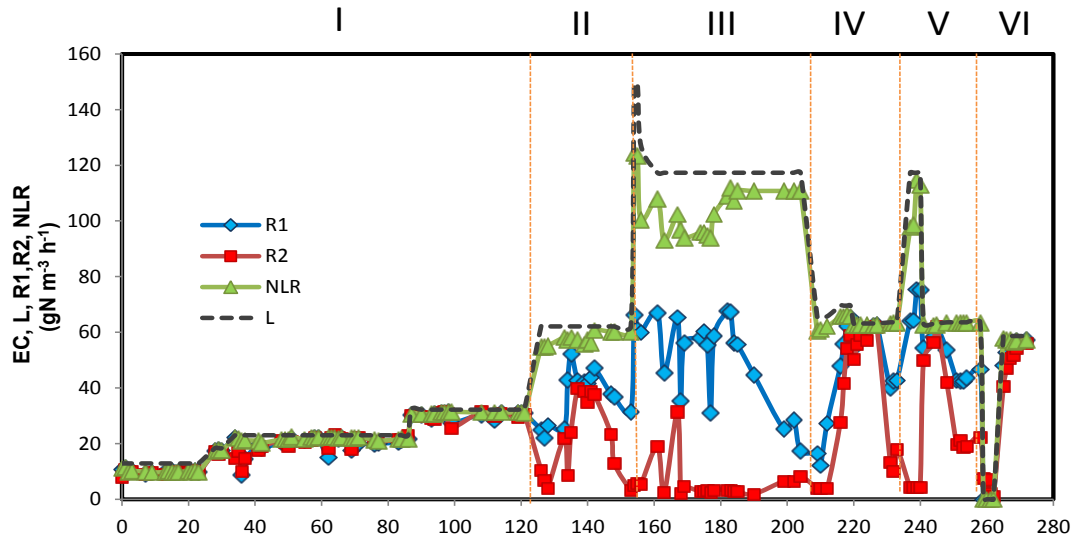


Fig. 7.4: Perfiles de L, NLR, R1 y R2 a lo largo del periodo de operación

El efecto inhibitorio de FA se observó en los ensayos de subidad de carga, en la fase III. Los valores superiores a $60 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, afectaron a la distribución de los inhibidores en toda la biopelícula. Las tasas de nitrificación y nitratación fueron significativamente menores que en el periodo I. En general, R1 fue inferior a EC así como la NLR, lo que fue relacionado con la acumulación de amonio. Cuando R2 fue inferior a R1 se observó acumulación también de nitrito. De la figura 7.4 se obtiene la interesante información de que al aplicar una L superior a $50 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ se perjudicó las tres etapas; el que fue frecuente en muchos de los ensayos (L de 63 hasta $149 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$).

En la etapa III, la NLR elevada de $103 (\pm 7) \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ fue seguida de una tasa de nitrificación promedio de apenas $47 \pm 20 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, seguida por tasa de nitratación mucho más baja, promedio de $6 \pm 7 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Esta fuerte represión de R2 en comparación con R1 fue relacionada a inhibiciones por sustrato y competitivas. Ambas formas de inhibiciones fueron observadas con frecuencia en cultivo en suspensión (Buday 1999; Park & Bae 2009) en aguas de EDAR (Han 2003; Lars D M Ottosen 2011; Yang 2014), y también en BF y BTFs (Gabriel 2007; Sakuma 2008; Kawase 2014) debido tanto a acumulación de FA como de FNA.

En el presente estudio se observó coherencia entre experimentos similares de las fases III IV y V. Los puntos fuera de la tendencia fueron resultado de las variaciones normales típicas de un bioreactor. En la mayoría de los casos las discrepancias con el perfil general se atribuyeron a perturbaciones que perduraron muy poco en el tiempo. Además hay que tener en cuenta que cada biofiltro es único ya que posee una historia

de sucesión ecológica que se construye sobre la marcha. Las relaciones se establecen en respuesta a las interacciones de los componentes biológicos y del proceso. La buena capacidad de recuperarse tras las perturbaciones, demostró ser BTF-NH₃ un sistema bastante robusto y adecuado a estudios de comunidades microbianas en biofiltración.

7.5.2. Composición de la comunidad del BTF-NH₃

7.5.2.1. Procesamiento de las lecturas del *tag-454*

Para este estudio se utilizaron los datos de la clasificación realizada por el servicio de RTL, aplicando los siguientes ajustes de parámetros: confianza a 80% y similitud por encima de 97% para especie.

Un total de 110,480 lecturas fueron recuperadas del proceso de pirosecuenciación. Tras eliminar las lecturas de mala calidad, las quimeras y de reduplicar quedaron de entre 59.6 y 83.8%. Los resultados logrados en el check de calidad del BTF-NH₃ (tabla 7.2) fueron coherentes con aquellos encontrados en los estudios con BTF-H₂S AER y ANOX el que indica ser el rango normal en biofiltros.

Tabla 7.2. Resultados de los tratamientos aplicados a las secuencias del BTF-NH₃

Muestras	Nº sec. 454 roche (.sff)	Sec. Aprovechadas (después del check de calidad)	
		Nº	(%)
N-A	15,100	9,000	59.6
N-B	27,253	22,514	82.6
N-C	19,933	14,111	70.8
N-A ₁	17,464	11,838	67.8
N-A ₂	10,952	9,181	83.8
N-A ₃	19,778	15,757	79.7
Total	110,480	82,401	-

7.5.2.2. Diversidad

Fueron identificados 13 filos, 26 clases, 80 familias y 127 géneros. Del conjunto total de lecturas de secuencias se logró clasificar el 100% de las secuencias al nivel de filos

mientras que a nivel de clase y familias se hizo el recuento de entre 97 y 99% de las lecturas. En la muestra N-A quedaron 25% lecturas sin identificación de especie, en N-B esto fue de tan solo 12% y en N-C de 17%. Al final fueron identificados 13 filos, 26 clases, 80 familias y 127 géneros en las tres muestras. El éxito en la clasificación de las secuencias se explicó por el amplio conocimiento que se acumula de las bacterias nitrificantes de muestras ambientales de suelos y aguas que se reflejan también en las bases de datos de secuencias en comparativa con las bacterias SOB. A nivel de género y especie hubo limitación de cobertura en N-A por cuenta de la longitud de los amplicones lo que dificultó encontrar *hits* en las bases de datos con el grado de similitud exigido en este estudio. No obstante, en N-A se encontró más diversidad, con 265 especies incluyendo los *unclassified*, mientras en N-B y N-C se encontraron 251 y 199, respectivamente. En los archivos *traceback* quedaron muy pocas secuencias únicas con un 0.8% en N-A y 0.3% en N-B y N-C el que contribuyó para el buen aprovechamiento de las secuencias en la clasificación.

En la figura 7.5 se aprecian las curvas de rarefacción en donde se obtiene el patrón de la curva. Las graficas informan que se logro representar a la diversidad en todas las muestras. De cara se comprueba la amplia cobertura, tanto a nivel de género (95% de similitud) como de especie (97%). En la tabla 7.3 se indican los índices de diversidad de *Chao1* y Shannon estimados para todas las muestras en base a la frecuencia de los clústeres.

Tabla 7.3: Índices de diversidad en *BTF-H₂S ANOX*. Los clústeres se formaron a una distancia filogenética de 0.03, que corresponde al nivel de las especies.

	N°		<i>Chao1</i>	H'	Var H'	E
	sec.	clústeres				
N-A	9,000	514	607.4	4.42	3.80E-04	0.71
N-B	22,514	2532	3,305.4	6.12	1.50E-04	0.78
N-C	14,347	1496	2,013.3	5.71	2.60E-04	0.78
N-A ₁	11,838	1910	2,751.4	6.01	3.00E-04	0.80
N-A ₂	9,181	984	1,296.5	5.26	4.90E-04	0.76
N-A ₃	14,111	2796	4,511.3	6.28	2.90E-04	0.79

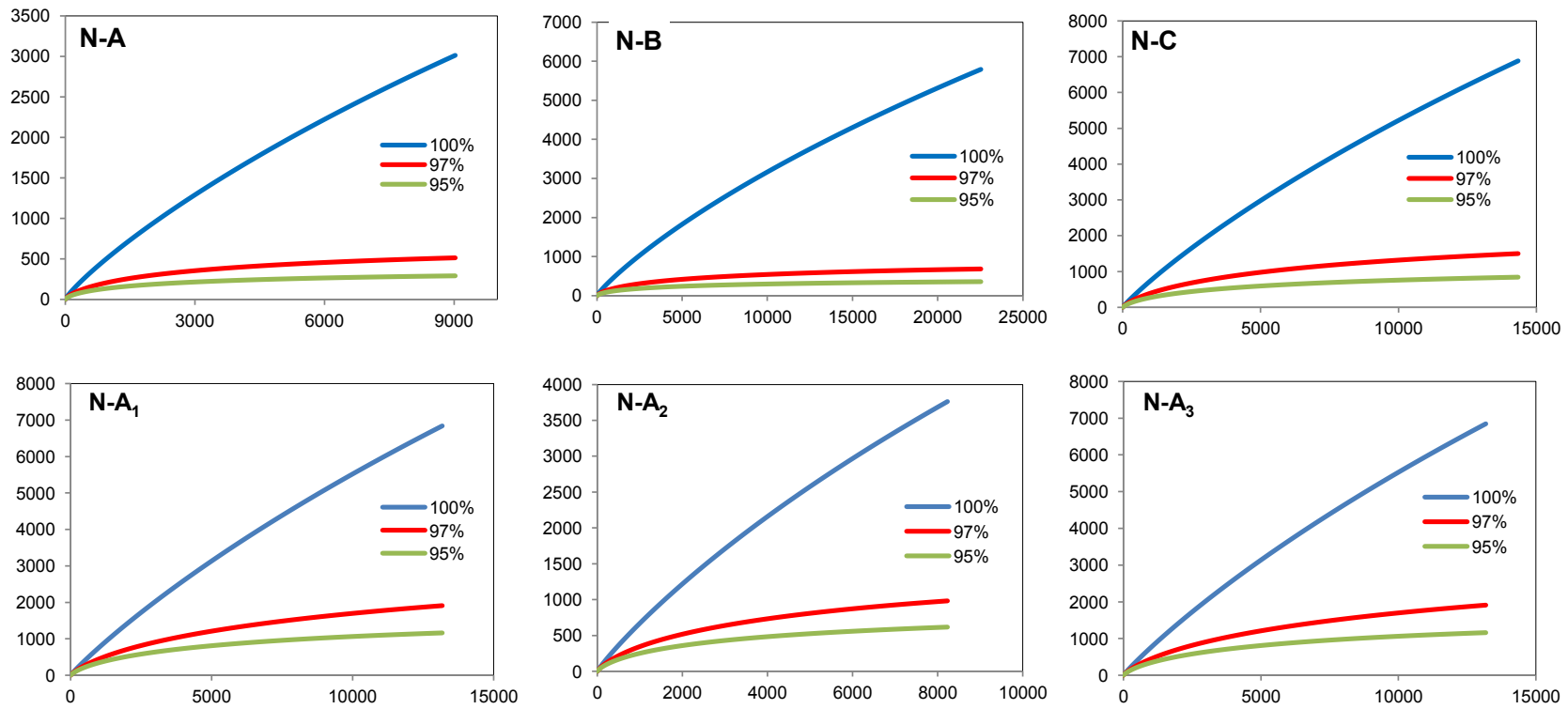


Figura 7.5. Curvas de rarefacción

Los dos índices indican que las muestras con mayor diversidad fueron N-A₃ ($Chao1=4,511$; $H', 6.28 (2.9E-04)$) seguida por N-B ($Chao1 = 3,305.4$; $H', 6.12 (1.5E-04)$) y N-A₁ ($Chao1 =2,751.4$; $H', 6.01 (3.0E-04)$). Con respecto a uniformidad, "E", se observó que la muestra N-A fue más homogénea al que se refiere a distribución de las secuencias en las OTUs. En las otras muestras integradas se obtuvo un valor de E similar.

Para las muestras tomadas de las tres regiones del biofiltro se obtuvo valores de E muy cercanos: 0.76; 0.79 y 0.80, con una pequeña diferencia en N-A₂ que se interpretó como desviación normal del índice. Las estimativas de los índices en las muestras por región fueron interesantes porque reflejan distintas contribuciones para la diversidad en la muestra integrada. La diferencia es más evidente al comparar número de clones frente el índice de Shannon. En las muestras N-A₁ y N-A₃ se observó que con doblar el número de clústeres no se produjo un incremento tan marcado en H' . Esto ocurrió probablemente en función de la cantidad de clústeres que compartieron misma identidad filogenética.

7.6. Dinámica de la comunidad Eubacteria ocasionados por las condiciones de operación

A continuación se presentan los resultados del estudio de los recuentos de Eubacteria obtenidos de las tres muestras integradas del BTF-NH₃, en donde N-A representó la comunidad en el período estacionario a baja carga de NH₃ ($L = 23 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$); N-B representó la comunidad en condición de estrés y N-C representó la comunidad tras un período de $L= 59 \text{ gN m}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

Para ello 45,625 secuencias fueron empleadas. Los resultados de los recuentos en valores de abundancia relativa porcentual para los filos, clases y familias se presentan en la figura 9-6. Las gráficas indican que a pesar de todos los experimentos y del hecho de haber pasado cerca de 270 días, entre la primera y la última, las muestras fueron en general muy similares en cuanto a distribución de los filos. En este caso, el más frecuente fue Proteobacteria (N-A 83%, N-B: 95% Y N-C: 94%) seguido de Bacteroidetes (des de 1.5 hasta 12% en N-A:) y Actinobacteria (des de 3.2 hasta 4.5%) que contribuyeron más en la muestra N-A del periodo de baja carga. El fuerte predominio de las Proteobacteria fue compatible con el reportado para en los otros

biofiltros investigados en la presente tesis, así como fue concordante con el de otros autores, obtenidos con distintas herramientas de biología molecular (Maestre 2010; Lebrero 2012; Lebrero 2013; Li 2012).

En la distribución de las familias (fig. 7.6B), llamó la atención la mayor diversidad en N-A y la adaptación que ocurrió entre N-B y N-C. La dinámica de algunas familias de α -proteobacteria fue interesante a lo largo del tiempo, destacando Bradyrhizobiaceae que del 13% en la primera muestra bajó a menos de 1% en N-B para volver a subir al 7% en N-C. También Rhizobiales, que en N-B sobrepasó el 20%, no logró superar el 1% en las otras muestras. Entre las β -proteobacteria Nitrosomonadaceae, en N-A alcanzó a los 20%, para luego bajar al 1% en N-B y volver a recuperar se en N-C (32%). Comamonadaceae incrementó su presencia del 20 al 30%. De entre las γ -proteobacterias las familias que más se destacaron fueron Xanthomonadaceae (24, 28 y 20% en las muestras N-A, B y C) y Legionellaceae, que del 7% pasó al 18% y después a 2%. Ambas familias agregan especies de nichos ecológicos muy diversos.

En general los datos de familia indicaron la predominancia de dos grupos distintos filogenéticamente que incluyeron miembros nitrificantes y desnitrificantes. Además reflejó la fuerte presión ejercida por los cambios aplicados sobre el biofiltro, principalmente sobre Nitrosomonadaceae y Bradyrhizobiaceae, que fueron observados en la muestra N-B. Con respecto a Comamonadaceae y Xanthomonadaceae, su presencia pareció un indicativo de haber importante actividad denitrificante. Curioso, también fue la identificación de Legionellaceae, Brucellaceae, Microbacteriaceae, Neisseriaceae y Clostridiaceae porque sugiere presencia de patógenos de humanos y animales, así como de simbióticos de plantas, principalmente de bacterias asociadas a rizosfera. Estas contribuciones se justificaron por el origen del inoculo (lodo de depuradora) sumada a condiciones adecuadas para su cultivo en el biofiltro. En Bradyrhizobiaceae se identificaron miembros bastante diversos y su presencia se justificó ya que son especies normales en sedimentos y lodos.

La distribución de las especies que superaron el 0.5% de frecuencia se aprecia en los datos de la tabla 7.4. La diversidad fisiológica que se encontró en el biofiltro se muestra en sub-índices. A partir de la información de abundancia relativa se elaboró el perfil de la comunidad.

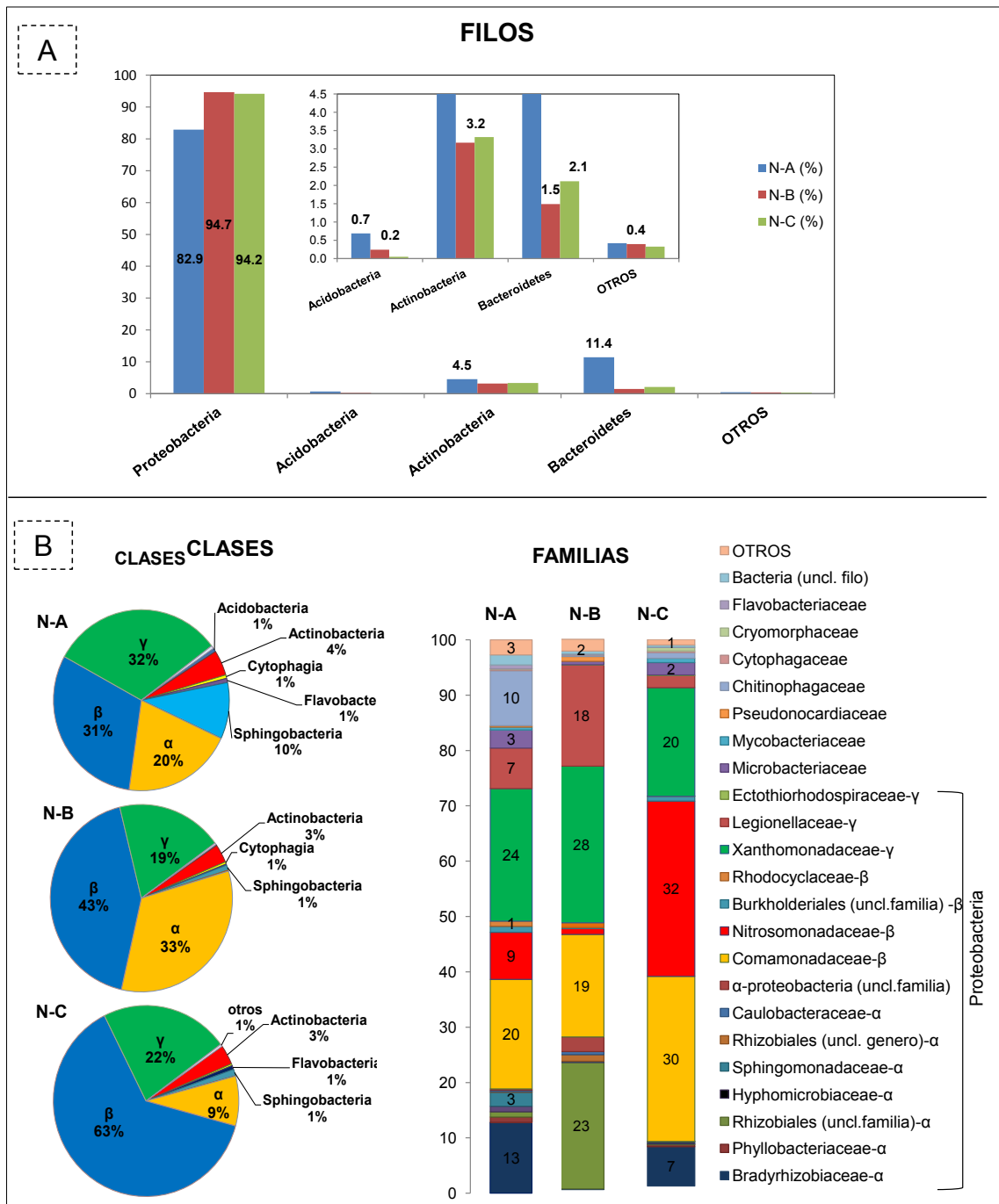


Fig. 7.6. Abundancia relativa a niveles de filo clase y familias (%) para las muestras del BTF-NH3. (N-A para muestra día 67, N-B para muestra día 126, N-C para la muestra día 272)

Los datos de abundancia de N-A, informaron que la especie más abundante fue *Comamonas sp.* (17%) seguida por *R. lindaniclasticus* (16%). En la tabla 7.4 se observó que en el periodo III las AOB fueron representadas por 3 especies de *Nitrosomonas-β* y 2 especies de *Nitrosospira-β*, totalizando 8.5%, con destaque para *Nitrosomonas eutropha*, 4% y *Nitrosospira sp.*, 3.2%. En NOB se identificaron

secuencias de 4 especies de *Nitrobacter* totalizando 8% de abundancia: *Nitrobacter* sp., *N. alkalicus*, *N. hamburgensis*, *N. vulgaris* con 4, 2.9, 1.8% en respectivo. La fracción *uncl.* También fue numerosa en esta muestra, cerca de 25% de las lecturas, pero la suma de las *uncl. Nitrosomonas* y *Nitrosospira* no alcanzó el 1%, lo mismo ocurrió para *Nitrobacter* y *Comamonas uncl.* Las secuencias más frecuentes de *uncl.* fueron relacionadas al género Chitinophaga (3%).

En el periodo III no se llevaron a cabo experimentos que pudiesen estresar la biomasa, pero se aplicaron ajustes de configuración para mejorar la capacidad de nitrificación. En base a esto se asumió que muestra N-A ilustra el perfil de la comunidad desarrollada bajo condiciones amenas y de cierto modo, estables en el tiempo. En respuesta a estas condiciones tanto AOB como NOB se equipararon en valores de abundancia. Sí por un lado se comprobó el equilibrio entre las dos fracciones AOB y NOB, por lo otro la presencia tan marcada de los desnitrificantes fue sorprendente ya que podrían haber consumido nitrito y/o nitrato generados de la nitrificación. Sin embargo los datos de la operación indicaron buen rendimiento de la nitrificación.

De seguido fue investigada la posible influencia de las poblaciones desnitrificantes aerobias sobre el potencial de nitrificación del reactor. La supremacía de estas podría haber resultado en problemas en la utilización del oxígeno, pero esto no parece haber afectado al bioreactor, ya que los datos de la operación indicaron nitrificación total. La convivencia harmónica entre nitrificantes y desnitrificantes ha sido reportada en sistemas de tratamiento de aguas residuales, por pirosecuenciación 454 Roche (Ye et al. 2011).

En la literatura se encontró que *Comamonas sp.* tiene comprobada habilidad para desnitrificar parcialmente, sobre nitrito en presencia de oxígeno. (Patureau et al. 1996; Lu et al. 2014). Su potencial uso en proceso SND fue comprobada en biopelículas de composición compleja.

En la muestra N-B, tomada después de un periodo de operación a altas carga, se observó un nuevo cambio en la composición (tabla 7.4). Se observó un incremento importante en la presencia de NOB que subió al 23%, principalmente con *Nitrobacter* sp. (21%).

Tabla 7.4: Abundancia relativa de Eubacteria en N-A₁, A₂ y A₃.

Clasificación filogenética			Abundancia						
Clase	Familia	Identidad	N-A		N-B		N-C		
			Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	
α -proteobacteria	Bradyrhizobiaceae	<i>Nitrobacter sp.</i> ²	356	4.0	4746	21.1	21	0.2	
		<i>N. alkalicus</i> ²	257	2.9	192	0.9	25	0.3	
		<i>N. hamburgensis</i> ²	0	0	0	0	177	2.1	
		<i>N. vulgaris</i> ²	158	1.8	206	0.9	17	0.2	
		<i>Bradyrhizobium sp.</i> ^{4,5,7}	84	0.9	212	0.9	86	1.0	
		<i>Bradyrhizobium elkanii</i> ^{4,7}	70	0.8	754	3.3	232	2.7	
	Phyllobacteriaceae	<i>Mesorhizobium sp.</i> ⁷	45	0.5	182	0.8	27	0.3	
		(uncl. familia)	82	0.9	274	1.2	15	0.2	
		Sphingomonadaceae	<i>Novosphingobium resinovorum</i> ⁶	91	1.0	8	0.0	0	0
	β -proteobacteria	Comamonadaceae	<i>Aquabacterium sp.</i> ^{4,8}	89	1.0	107	0.5	71	0.8
<i>Comamonas sp.</i> ^{7,9}			1571	17.5	4861	21.6	2332	27.4	
<i>C. badia</i> ⁷			9	0.1	36	0.2	91	1.1	
<i>Comamonas (uncl. especie)</i> ^{7,9}			14	0.2	76	0.3	80	0.9	
<i>Schlegelella sp.</i>			122	1.4	1	0.0	0	0	
Nitrosomonadaceae		<i>Nitrosomonas sp.</i> ¹	69	0.8	121	0.5	39	0.5	
		<i>N. eutropha</i> ¹	359	4.0	1058	4.7	2571	30.2	
		<i>Nitrosomonas (uncl. especie)</i> ¹	26	0.3	40	0.2	44	0.5	
		<i>Nitrospira sp.</i> ¹	292	3.2	2656	11.8	22	0.3	
		<i>Nit. Multiformis</i> ¹	2	0.0	188	0.8	5	0.1	
	(uncl. género)	11	0.1	21	0.1	46	0.5		
	Rhodocyclaceae	<i>Propionivibrio sp.</i>	63	0.7	3	0.0	1	0.0	
γ -proteobacteria	Legionellaceae	<i>Legionella sp.</i> ³	0	0	13	0.1	167	2.0	
		<i>L. longbeachae</i> ³	50	0.6	9	0.0	0	0	
		<i>Legionella (uncl. especie)</i> ³	60	0.7	3	0.0	16	0.2	
		(uncl. género)	546	6.1	13	0.1	4	0.0	
	Xanthomonadaceae	<i>Dokdonella (uncl. especie)</i> ^{3,10}	2	0.0	389	1.7	32	0.4	
		<i>Luteibacter (uncl. especie)</i> ³	1	0.0	334	1.5	582	6.8	
		<i>Rhodanobacter sp.</i> ^{4,6,7}	302	3.4	36	0.2	19	0.2	
		<i>R. lindaniclasticus</i> ^{4,6,7}	1446	16.1	2931	13	653	7.7	
		<i>Rhodanobacter (uncl. especie)</i> ⁷	14	0.2	46	0.2	42	0.5	
		<i>Xanthomonas axonopodis</i> ¹	242	2.7	38	0.2	0	0	
	(uncl. género)	38	0.4	175	0.8	264	3.1		
Acidobacteria	(uncl. familia)		58	0.6	20	0.1	0	0	
	Microbacteriaceae	<i>Agreia sp.</i>	1	0.0	238	1.1	10	0.1	
	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium sp.</i> ^{4,6,7}	16	0.2	22	0.1	60	0.7	
Bacteroidetes	Chitinophagaceae	<i>Chitinophaga (uncl. especie)</i> ¹	263	2.9	99	0.4	59	0.7	
		(uncl. género)	585	6.5	88	0.4	7	0.1	
	Cryomorphaceae	<i>Cryobacterium sp.</i> ¹	220	2.4	198	0.9	134	1.6	
OTROS			1386	15.1	2122	9.4	568	6.6	
TOTAL			9000	100	22516	100	8519	100	

¹ AOB, ² NOB, ³ de aguas residuales, ⁴ presente en lodo depuradores, ⁵ relacionada a solo y rizosfera. ⁶ degrada recalcitrantes orgánicos como combustibles fósiles y pesticidas, ⁷ denitrificante sobre nitrato y nitrito, ⁸ denitrificante sobre nitrito, ⁹ SND, ¹⁰ heterótrofos,

Las AOB siguieron la tendencia de incremento con *Nitrosospira* que alcanzó el 13%, pasando a asumir papel importante en la nitrificación. *Nitrosomonas sp.* y *N. eutropha* permanecieron al mismo nivel de la anterior. Juntas las AOB llegaron a un 19%, equiparando se con NOB. Además, *Comamonas sp.* incrementó hasta 22% de abundancia, seguida de *R. lindaniclasticus* con 13%. Con respecto a *Rhodanobacter sp.* su presencia se limitó a un 0.2%. En esta muestra la fracción *uncl.* también fue reducida (12%). En general, muchas poblaciones oportunistas fueron afectadas por las condiciones extremas impuestas en los ensayos de la fase VI y por esto, fueron casi eliminadas del biofiltro, entre ellas *Novosphingobium resinovorum*, *Propionivibrio sp.*, *Legionella*, *Xanthomonas axonopodis* (AOB) *Chitinophaga*, *Cryobacterium sp* y *Schlegelella sp.* Otras especies cobraron más importancia, como fue el caso de *Luteibacter* que incrementó al 1.5%, *Dokdonella* con 1.7% y *Bradyrhizobium elkanii* que incrementó al 3.3%.

La muestra N-C enseñó otro cambio significativo en las contribuciones de las poblaciones de AOB y NOB. Entre las primeras se observó un cambio drástico en *Nitrosomonas* que volvió a ocupar una posición destacada (32%) y en *Nitrosospira*, que bajó a menos del 1%. En base a estos datos se asumió que *Nitrosomonas eutropha* fue la especie AOB que llevó a cabo la nitrificación en esta etapa de la operación. La presencia y habilidad de miembros del género *Nitrosomonas* de crecer en biofiltros percoladores fue documentada con anterioridad (Ramírez 2009; Maestre 2010; Moussavi 2011). Con respecto a *Nitrosospira sp.* su desaparición se podría relacionar al efecto de dos factores: primero por la inhibición debida a FA, promocionada por el incremento en la transferencia de materia, y segundo, por la competencia por el oxígeno. En este periodo, cuando *Nitrosospira* sobresalió la carga fue casi la mitad. En la fig. 9-3-C se observó que en el período VI las concentraciones de amonio y nitrito a la salida del reactor fueron bastante bajas ya que la tasa de nitrificación volvió a incrementar. En este caso, la pérdida de nitrificantes no afectó a la velocidad de nitrificación R1, probablemente debido a la redundancia funcional.

De acuerdo con literatura, *Nitrosomonas eutropha* posee la habilidad para tratar cargas elevadas de amonio sin inhibiciones por sustrato ni producto (Jun & Wenfeng 2009; Kristiansen, Pedersen, et al. 2011; Ahn 2006; Ottosen et al. 2011; Ralebitso-Senior et al. 2012) lo que explica el destacado incremento en N-C. Con respecto a la dinámica de NOB, el incremento en la transferencia de amonio puede haber producido un efecto localizado, relativo al consumo de oxígeno que afectó a este conjunto. De hecho *Nitrobacter*, que fue la NOB prevalente hasta entonces, sufrió con el incremento de la carga ya que bajó su participación del 21 al 0.2% de abundancia. La única

Nitrobacter que parece haber mejorado su participación fue *N. hamburgensis* que incrementó de 0 al 2.1%. No obstante, la identificación de las especies del género *Nitrobacter* puede haber sido influenciado por limitaciones a la hora de asignar la identidad ya que mantienen relación filogenética muy cercana. Así mismo, teniendo en cuenta la actividad de género, se observó un gran cambio en la composición de NOB. De otros estudios se tomó que este género en general coloniza regiones más internas de las biopelículas nitrificantes, sea en vertical como en aglomerados, debido a su dependencia de la formación previa del nitrito (Schramm et al. 2000; Gieseke et al. 2003; Beristain-Cardoso et al. 2010; Cydzik-Kwiatkowska 2015). En base a esta información se asumió que *Nitrobacter* fue afectada por el incremento en la demanda de oxígeno por las AOB localizadas en la capa externa de la biopelícula. En N-C *Legionella* (2%) y *Rhodanobacter* siguieron perdiendo importancia, y al final *R. lindanoclasticus* quedó con la mitad de abundancia que acumuló en N-A. Otro dato que llamó la atención fue la participación de *uncl.* Familia Xanthomonadaceae-γ con un 3.1% de lecturas de secuencia sin confirmación de identidad. Esta familia alberga una diversidad muy grande de bacterias con habilidades interesantes para biorremediación de nitrógeno y xenobióticos pero, aun necesita de esclarecimientos a cerca de la filogenia.

El éxito de *Luteibacter* quedó sin aclarar justo por la falta de hit en especie. Finalmente, es curiosa la presencia de especies de suelos y de rizosfera que fueron frecuentes en toda la operación. La estrecha relación entre bacterias identificadas en lodos y sedimentos con aquellas descritas para fijación de nitrógeno dificultó la resolución en la clasificación filogenética. Sumado a esta limitación se añade que en muchos casos no hubo confirmación para el *hit* a nivel de especie. En el dominio Bacteria las pequeñas variaciones en el genoma de bacterias es el normal y para confirmación de su identidad se hace necesario el aislamiento y caracterización tanto por métodos fisiológicos cuanto genómicos.

En base a la fisiología de las poblaciones predominantes se pudo explicar los cambios en la estructura de la comunidad observados a lo largo del tiempo comenzando por *Nitrosomonas eutropha* y *Comamonas sp.* que se aprovecharon de la queda en la competencia para asumir protagonismo. Ambas especie han sido exploradas por sus habilidades especiales de nitrificar y, en el caso de *Comamonas*, para desnitrificar en presencia de O₂.

Otros aspectos ecológicos ayudaron a revelar las razones de los cambios en la composición de la comunidad nitrificante del BTF-NH₃. En base a las hipótesis de

estrategias de supervivencia: oportunistas versus estrategistas (r/k) se asumió que *Nitrobacter* y *Nitrosospira* (estrategistas-r), que son bacterias copiotróficas, fueron capaces de explorar mejor a los nichos y así lograron crecer más rápidamente que *Nitrospira* o *Nitrosospira*, especies oligotróficas (estrategistas-k). El éxito de *Nitrobacter* se relacionó con su habilidad para sobrevivir cuando hubo alta concentración de nitrito. Autores reportaron la co-existencia de *Nitrobacter* y *Nitrospira* en reactores para nitrificación, tipo SBR, cuando la concentración de nitrito varió significativamente durante los ciclos de operación. Ellos sugirieron que *Nitrobacter* obtuvo ventaja de la elevación temporal de la concentración de nitrito y, por esto la competición con *Nitrospira* fue exitosa (Daims 2001). Otros estudios sugirieron que *Nitrobacter* es capaz de inhibir el crecimiento de *Nitrospira*. En el presente estudio *Nitrospira*, no superó 0.02%.

De *las Rhodanobacter* lo que se pudo inferir al respecto de su éxito fue que en el BTF-NH₃, desarrolló papel de oportunista y que se favoreció de las regiones anóxicas de la biopelícula para crecer, principalmente en condiciones de baja carga. La competencia intra e inter específicas, favoreció el control poblacional de los miembros de este gremio.

7.6.1. Estudio de la distribución vertical de la comunidad en condiciones estacionarias a baja carga de NH₃

El estudio se realizó en base a géneros y especies. Se utilizaron las muestras N-A₁, N-A₂ y N-A₃ tomadas de las regiones inferior (a la entrada del gas), intermedia y superior (a la salida), respectivamente. Los datos de abundancia relativa de los géneros se aprecian en la figura 7.7. En el BTF-NH₃ el oxígeno se aportó directamente desde la zona inferior junto con el amoníaco. En este caso la mezcla se formó justo a la entrada. Se asumió que los efectos de los gradientes de oxígeno, nitrito, nitrato y carbono a lo largo de la columna fueron distintos del reportado para el BTF-H₂S AER. Para entender un poco de la distribución de Eubacteria en función de la localización se investigaron 3 muestras tomadas a distintas alturas.

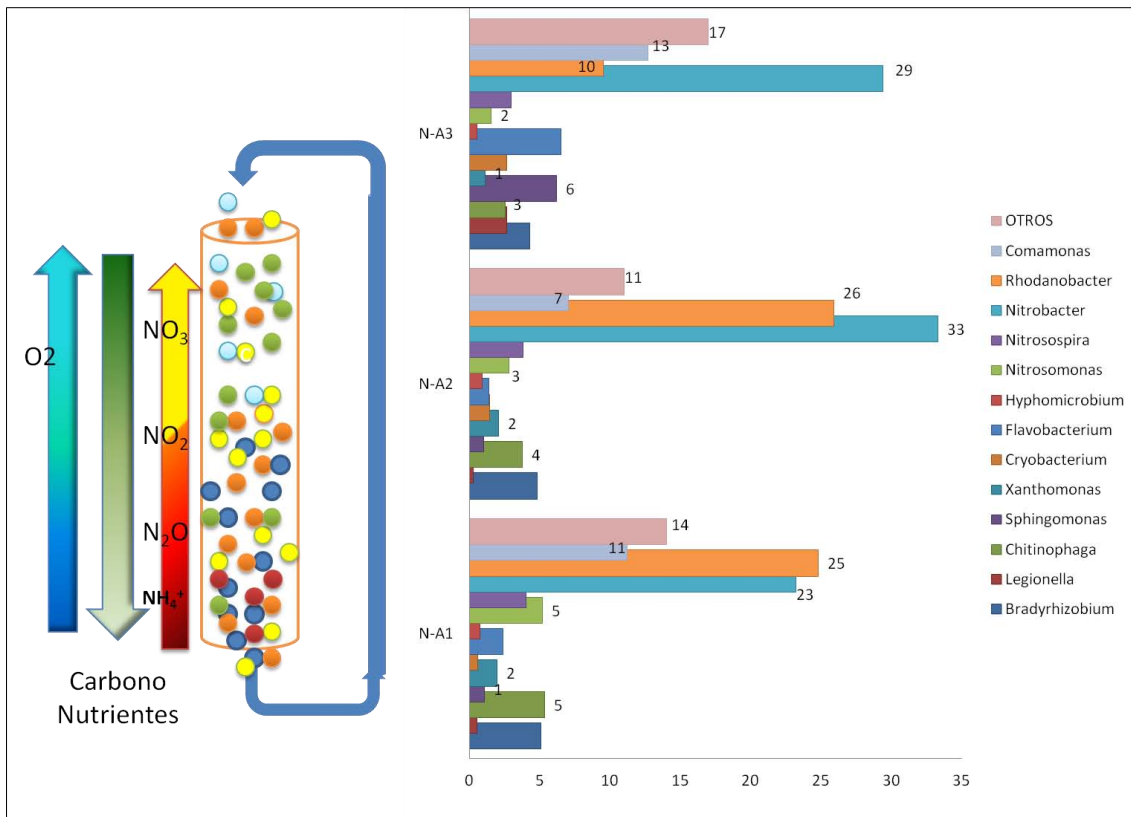


Figura 7.7. Flujo de nutrientes, carbono y especies del N a la izquierda y abundancia de Eubacteria al nivel de género a la derecha

Los datos de abundancia relativa indicaron prevalencia de los géneros *Rhodanobacter*, *Nitrobacter* y *Comamonas* en las tres regiones con distintas contribuciones. En la región de entrada (N-A₁) prevaleció *Rhodanobacter* (25%) mientras en los otros 2/3 dominó el género *Nitrobacter* (33 y 30%). Con respecto a AOB la contribución de *Nitrosomonas* fue de 5% (N-A₁), 3% (N-A₂) y 2% (N-A₃) y de *Nitrosospira* fue de 4% (N-A₁ y A₂) y 3% en N-A₃.

De la puesta en marcha hasta la fecha de la primera toma de muestra las condiciones de operación fueron optimizadas de tal forma que favorecieron la actividad nitrificante y a no provocar inhibiciones por carga de N. En base a los resultados se asumió que las condiciones de operación promocionaron el buen crecimiento tanto de AOB como NOB.

Con respecto a la co-existencia de *Nitrosomonas* y *Nitrosospira*, la explicación más probable es la de que *Nitrosomonas* se viera favorecida por la mayor disponibilidad de sustrato y oxígeno en regiones cercanas a la entrada del gas, mientras *Nitrosospira* se mantuvo ya que puede desarrollarse en regiones más internas de la biopelícula, o sea

más alejadas del punto de entrada en donde el sustrato estuvo más limitado. Esta argumentación se soporta en el modelo de supervivencia K o teoría de la selección r/k de las especies (Pianka 1970). Según esta teoría las estrategias de supervivencia que los organismos adoptan en función de la disponibilidad de nutrientes promueve la selección en el ambiente. Así, las poblaciones pueden ser oportunistas o estrategistas, a depender de cómo adquiere alimento y de la plasticidad metabólica que les permite sobrevivir. De entre las estrategistas, las poblaciones microbianas se denominan copiotróficas, que presentan crecimiento rápido, baja afinidad por el sustrato y oxígeno es decir cuando hay abundancia de cierto nutriente se desarrolla en su máxima velocidad de crecimiento, pero en su falta la población disminuye muy rápidamente. Las especies que poseen este perfil son estrategistas-r. Así fueron descritas los miembros de los géneros *Nitrosomonas* (Terada et al. 2013) y *Nitrobacter* (Kim & Kim 2006). Ya las poblaciones oligotróficas, o estrategistas de la K presentan baja velocidad de crecimiento, mayor afinidad por sustrato, capaces de sobrevivir en donde la concentración del compuesto es limitada y son buenas competidoras. En esto perfil se clasificaron *Nitrosospira* (Terada et al. 2013) y *Nitrospira* (Kim & Kim 2006). Además se logró relacionar la estrategia con la ubicación de estas bacterias en biofilmes y también en biomasa flocular. Las primeras fueron relatadas en capas externas mientras las dos últimas en regiones justa-puestas.

No obstante, la distribución de AOB no fue para nada similar a la de NOB, hecho que es un fuerte indicio de que las primeras sufrieron regulación por competencia enteroespecífica. De hecho la identificación de varias especies del mismo género identifica la sobreposición de nicho y regulación por competencia de miembros de este mismo gremio. *Comamonas* sp. fue responsable en gran parte de la oxidación de NH_4^+ lo que hace suponer que hubo fuerte competencia por entre bacterias oxidantes de amonio. A continuación se explica la diversidad a nivel de especie para las tres regiones. En la tabla se aprecian los datos para los 30 mejores resultados de la clasificación a nivel de especies, incluyendo uncl.

La clasificación en la región superior fue marcada por la fuerte presencia de NOB con predominio de 5 especies de *Nitrobacter* (25.3%). Otro dato que llamó la atención en el archivo completo de la clasificación fue el número de singletons de N A₃: 97 frente a 61 en N-A₁ y sólo 36 en N-A₂.

Tabla 7.5. Abundancia relativa para los 30 filotipos más frecuentes en N-A₁, N-A₂ N-A₃.

Identidad filogenética	Abundancia relativa (%)		
	N-A ₁	N-A ₂	N-A ₃
Acidobacteriales (uncl. familias)	0.1	0.2	1.4
<i>Aminobacter aminovorans</i>	0.4	0.5	0.9
<i>Aminobacter</i> sp.	0.2	0.3	0.6
<i>Aquabacterium</i> sp.	0.5	0.3	0.5
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	2.2	1.6	1.4
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	0.5	0.9	0.7
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1.6	1.6	1.1
Chitinophaga (uncl. especies)	4.8	3.5	2.2
Chitinophagaceae (uncl. géneros)	0.4	0.6	0.9
<i>Comamonas</i> sp.	10.0	6.2	10.8
<i>Cryobacterium</i> sp.	0.5	1.3	2.3
<i>Flavobacterium</i> (uncl. especies)	2.0	1.3	5.3
<i>Legionella</i> (uncl. especies)	0.3	0.2	1.7
Legionellaceae (uncl. géneros)	1.1	0.7	6.5
<u><i>Nitrobacter alkalicus</i></u>	9.5	13.1	15.8
<u><i>Nitrobacter</i> sp.</u>	5.1	9.1	1.6
<u><i>Nitrobacter vulgaris</i></u>	6.5	8.6	7.8
<u><i>Nitrosomonas eutropha</i></u>	4.4	2.2	0.7
<u><i>Nitrosomonas</i> sp.</u>	0.3	0.4	0.5
<u><i>Nitrospira</i> sp.</u>	3.4	3.4	2.4
<i>Novosphingobium pentaromativorans</i>	0.1	0.1	1.0
<i>Propionivibrio</i> sp.	1.2	1.7	0.5
Rhizobiales (uncl. géneros)	0.5	0.8	0.6
<i>Rhodanobacter lindaniclasticus</i>	22.2	23.7	8.1
<i>Rhodopseudomonas faecalis</i>	0.7	0.9	0.1
<i>Rhodopseudomonas</i> sp.	0.4	0.5	1.4
<i>Sphingomonas adhaesiva</i>	0.2	0.5	2.7
<i>Sphingomonas</i> sp.	0.7	0.4	2.2
OTROS	20.1	15.4	18.1

La región de entrada del gas (N-A₁) fue poblada principalmente por *Rhodanobacter lindaniclasticus* (22.2%), *Comamonas* sp. (10%), *Nitrobacter alkalicus*, *Nt. vulgaris* y *Nitrobacter* sp con 9.5, 6.5 y 5.1% de frecuencia, en respectivo. La suma de la fracción NOB fue de 21%. Las AOB fueron representadas por *Nitrosomonas eutropha* (4.4%) y *Nitrospira* sp. (3.4%). En la porción intermediaria de la columna se observó el predominio de *Rhodanobacter lindaniclasticus* con 23.7%; *Nitrobacter alkalicus*, 13.1%; *Nitrobacter* sp., 9.1%; *Nt. vulgaris*, 8.6%; *Comamonas* sp., 6.2%; *Nitrospira* sp. 3.4% y *Nitrosomonas eutropha*, 2.2%. Las especies más abundantes en la región

superior (N-A₃) fueron *Nitrobacter alkalicus*, 15.8%; *Comamonas sp.*; 10.8%; *Rhodanobacter lindaniclasticus*, 8.1%; *Nitrobacter vulgaris*, 8% .De seguida se destacaron *Sphingomonas adhaesiva*, 2.7%; *Nitrosospira sp.*, 2.4%. Como se comentó en el ítem anterior un grupo grande de filótipos compartió valores de abundancia próximos, (de entre 0.5% a 1.5%) en la región superior. En este grupo se destacaron *Nitrobacter sp.* 1.6%; *Bradyrhizobium canariense*, 1.4%; *Bradyrhizobium sp.*, 1.1%; *Aminobacter aminovorans*, 0.9%, *Nitrosomonas eutropha*, 0.7%.

La participación de AOB, *Nitrosomonas* y *Nitrosospira*, y de *Comamonas* sp. (oxidante de amonio), fue muy marcada en la porción inferior mientras *Nitrosospira* contribuyó para la nitrificación de modo similar en las tres regiones. La presencia contundente de NOB en las tres secciones fue interesante porque demuestra el potencial de la microbiota en concluir la tarea de degradación del NH₃.

La baja frecuencia de *Rhodanobacter* en NA₃ (10%) en la muestra de arriba fue en parte justificada por competencia, ya que la alimentación de medio fresco y fuente de carbono se hizo desde la parte superior. Lo mismo sirvió para explicar la frecuencia de *Shingomonas* y *Flavobacteria* (quimioheterótrofas y aerobias estrictas) que en la región superior fueron más abundantes con 5 y 6.5% de frecuencia. Otros géneros oportunistas que presentaron valores cercanos a 1%, con perfiles de abundancia muy similares en las tres regiones fueron *Bradyrhizobium*, *Xanthomonas*, *Rhodopseudomonas* y *Afiplia*. En cuanto a *Rhodanobacter* el hecho de ser desnitrificante le favoreció en las demás regiones debido al incremento en la disponibilidad de nitrito o nitrato que siguió el flujo de recirculación y del consumo de OD.

7.7. Conclusiones del Capítulo

Del estudio de la operación del BTF-NH₃ se concluyó que:

- ✓ el sistema fue capaz de eliminar con mayor o menor eficacia las cargas inferiores a 60 gN m⁻³h⁻¹;
- ✓ La Capacidad de eliminación crítica fue de 55 (±5 gN m⁻³h⁻¹)
- ✓ Las concentraciones de entrada de 120 y 1,410 ppm_v, ambas con L > 60 gN m⁻³h⁻¹; indujeron inhibición.

- ✓ Los tiempos de residencia de líquido y gas son parámetros muy útiles e importantes, a la vez, para la eliminación del amoníaco gas.
- ✓ En el estudio de diversidad se encontró que el éxito en la clasificación fue alcanzada por el amplio conocimiento que se acumula de las bacterias nitrificantes que se reflejan también en las bases de datos de secuencias en comparativa con otros grupos como por ejemplo las bacterias SOB. Al nivel de género y especie hubo una limitación de cobertura por cuenta de la longitud de los amplicones (~400 nt) agravado por los problemas de falta de *hits* en las bases de datos.
- ✓ Baja diversidad en la muestra N-A pero buena participación entre poblaciones AOB y NOB, junto a otras desnitrificantes mientras en N-B y N-C mayor diversidad pero menor participación de las AOB.
- ✓ La actividad de desnitrificación no fue comprobada con datos experimentales pero la presencia fuertemente marcada de poblaciones desnitrificantes indicó su co-existencia en el biofiltro. Esta actividad no comprometió la capacidad de eliminación de NH₃.
- ✓ Las poblaciones más frecuentes fueron identificadas como *Nitrosospira eutropha*, *Nitrosospira sp.*, *Nitrobacter sp.*, *Nitrosomonas sp.*, *Comamonas sp.* y *Rhodanobacter lindaniclasticus*.

Por fin, es interesante añadir que la presencia tan marcada de la fracción desnitrificante que se observó durante toda la operación, sugere que el ecosistema podría se aprovechar de los productos de la nitrificación para completar el metabolismo del N, hacia N₂. Para ello se necesitaria optimizar las condiciones (microaerófilas o anoxicas, del interior de la biopelícula) para incrementar la actividad desnitrificante. Esto podría tornar la biofiltración-nitrificación aun más atractiva visto que a día de hoy, el buen rendimiento de las plantas de alta carga pasa por el redireccionamiento de los productos finales del proceso. El ideal en bioremediación es que los procesos metabólicos promocionen la conversion total del contaminante en formas no tóxicas o no agresivos al ambiente: entonces: O₂ y H₂O. Pese a que se está trabajando en nuevas configuraciones que incluyen la desnitrificación, en el presente estudio no se investigó tal mecanismo y el objeto final de la bioconversión fue el

nitrate. Notwithstanding, according to the diversity results obtained it can be predicted that the biofiltration of ammonia in view of the total mineralization ($N_2 + CO_2$) via SND could be executed in a similar system.

PARTE II

Hibridación fluorescente in situ (FISH) aplicada a biofiltración de H₂S: optimización de protocolo

Capítulo 8

Introducción de la parte II

8. Introducción

8.1. Factores que determinan el éxito de la aplicación

Los factores que afectan a la eficiencia del FISH se pueden agrupar en tres grandes bloques en función de su origen: 1-) composición y aspecto de la muestra, 2-) metodología, 3-) adquisición de imágenes y recuento. Muchas de las limitaciones o, inconvenientes son derivados del manejo inadecuado de los protocolos, o del desconocimiento del material (matriz) de estudio. En cualquier caso lo más probable es que se puedan solucionar dado que esta es una técnica bastante flexible.

8.1.1. Composición de la microbiota y aspecto de la muestra

A la hora de preparar una aplicación hay que conocer la composición de la comunidad microbiana y del material de origen de la muestra o sea que se debe tener en cuenta la identidad de las células: su forma y tamaño, así como la naturaleza del material inerte que compone la muestra, como por ejemplo de los medios de cultivo, de los detritos, de los metabolitos, EPS y de todo lo que pueda afectar o interactuar con reactivos de los protocolos. (Nielsen et al. 2009).

A día de hoy, los potentes microscopios y el procesamiento digital de imágenes permiten el análisis de células sin limitaciones de tamaño o de forma. En concreto, la extensión de las células es muy variable y por eso hay que cuidar a la hora de elaborar los protocolos de recuento, visto que este se basa en tamaños de referencia en la imagen. Hasta la fecha no se reportaron inconvenientes en relación a poblaciones que presentan tamaño de células muy diferentes.

Con respecto a la influencia del material se ha reportado la interferencia de sustancias como el EPS que dificultan la cuantificación de las células individuales dentro de biopelículas (Nielsen et al. 2009). Estudios de falsos positivos no son muy frecuentes pero, la interferencia de autofluorescencia de algunos constituyentes principalmente clorofila (Gregor & Marlek, 2005) y flavoproteínas (Reinert et al. 2007) ha sido reportada en literatura.

El avance en el FISH también ha sido acreditado al desarrollo de la bioinformática (Loy et al. 2007) que contribuyó en la ampliación de las bases de datos de secuencias y por consecuencia para el incremento de la colección de sondas disponibles.

8.1.2. Metodología

A continuación se detallan los factores relativos a la metodología de preparación de muestras. En general, los procesos de fijación y permeabilización se hacen en uno solo paso. El fijado preserva las estructuras del citoesqueleto celular y también sirve para estabilizar macromoléculas previniendo su descomposición por ataque enzimático, principalmente ARN y ADN. La permeabilización de las células permite el acceso de la sonda al sitio objetivo. El compuesto depende del objetivo del estudio y de la muestra. Algunas veces se utilizan agentes precipitantes como el etanol o metanol o agentes que forman entrecruzamientos entre ciertos elementos de la pared celular como paraformaldehído (PFA), formaldehído y glutaraldeído (Bouvier & P. Del Giorgio 2003).

Las condiciones de fijación y permeabilización se deben optimizar en base al tipo de microorganismo investigado y al tipo de muestra. El PFA es el fijador de primera elección debido a que posee la capacidad de modificar la pared celular. En muestras complejas, se debe conocer la proporción de bacterias tipo Gram positivas y Gram negativas porque se fijan en compuestos distintos. Las Gram- se fijan bien en PFA o formaldehído, mientras que las Gram+ se fijan mejor en etanol, etanol-formalina, por tratamiento con calor o mediante lisozima. Es recomendable la combinación de los compuestos. La permeabilización se puede realizar directamente en el tubo de muestra o en portaobjetos.

De cualquier modo hay que tener cuidado para que una vez las células estén en el porta queden bien adheridas a la superficie de vidrio. Es común encontrar problemas de despegamiento en el paso de lavado al final del trabajo. Para prevenirlo se utilizan sustancias gelatinosas como la Poly-L lisina o hidruro de silicio como agentes auxiliares de acoplamiento. La pérdida de muestra durante el lavado conlleva horas de trabajo perdidas además de los reactivos (Amann & Fuchs 2008). El control del tiempo también es crucial. Cuando una muestra permanece demasiado tiempo en la solución de PFA las células pueden tornarse impermeables a la sonda. Este ocurre porque se modifica la pared de manera inapropiada. En casos de impermeabilización o cuando la pared tiene una estructura singular se puede aplicar un tratamiento con enzimas de

digestión como lisozima, proteinasa K, achromopeptidasa, o utilizar métodos de incubación ácida; ej. HCl 0,1 M (Amann & Fuchs 2008).

El proceso de fijación también depende del contacto del agente fijador con la célula. En una biopelícula la complejidad de la estructura puede limitar el acceso, así que para hacer recuentos es recomendable liberar las células antes de suspenderlas en la solución fijadora para que el agente pueda envolver y actuar a lo largo de la pared de todas las células. Puede ser necesario emplear desde métodos físicos como centrifugación, ultrasonidos o morteros especiales hasta procesos enzimáticos. El inconveniente del procedimiento de liberación es que inviabiliza el estudio de localización. Nosyk y colaboradores (2008) revisaron metodologías y estructuraron una sugerencia para protocolo de muestras de biopelículas. En cuanto al tiempo y las condiciones de preservación de una muestra fijada y permeabilizada (de -20 °C a -80 °C) este es limitado debido a las modificaciones en la pared celular. Procesar una muestra antigua puede producir perfiles fluorescentes anormales y recuentos falsos (Bouvier & P. Del Giorgio 2003).

Todo el procedimiento de preparación se orienta hacia a la obtención de una hibridación “perfecta”. Después de lograr la entrada de la sonda, el objetivo es obtener un correcto apareamiento de la sonda marcada con la secuencia diana. El proceso depende de la desnaturalización parcial y temporal del ARNr que ocurre a determinada temperatura. La hibridación se lleva a cabo a aproximadamente 5 °C menos que la temperatura de fusión (T_m , por sus siglas en inglés: *melting temperature*-) el que depende directamente del contenido de oligonucleótidos y, específicamente, de la proporción C-G. Cuando las condiciones para hibridación se ajustan con base en la astringencia es posible incrementar las posibilidades de obtener un alineamiento óptimo. El agente astringente es en regla la formamida por la propiedad que tiene de disminuir T_m por el debilitamiento de los enlaces de hidrógeno (C-G, U-A). Para ello el portaobjetos se debe mantener bajo rigurosas condiciones de temperatura para evitar hibridaciones inespecíficas.

Los problemas en la hibridación son frecuentes y no son fáciles de solucionar. Los más frecuentes son la hibridación inespecífica, que es grave una vez que genera señal de falso positivo y la no hibridación, la cual ocurre generalmente debido al empleo de condiciones inadecuadas o a la insuficiente penetración de la sonda en la célula. El resultado en ambos casos es la falta de señal para aquella sonda (Moter & Göbel 2000). La efectividad de la hibridación sólo se comprueba bajo el microscopio y la falta

de señal puede ser mal interpretada, principalmente si no hay información previa al respecto de la identidad de las células (Bouvier & P. A. Del Giorgio 2003).

El siguiente problema relacionado es la cantidad de ARNr. La eficacia de los recuentos de células depende directamente de la cantidad de ribosomas, En realidad, la relación no es tan sencilla porque interviene el fenómeno de memoria metabólica, es decir que las células pueden mantener su patrimonio en ribosomas o ARN bajo condiciones adversas, mismo en modo inactivo (Amann & Fuchs 2008). Cuando el contenido de ARNr es bajo se pueden emplear métodos que permitan incrementar la señal. Ejemplos son la estimulación fisiológica previa de la célula que tiene como objetivo la multiplicación de los ribosomas o el empleo de “ayudantes” que se acoplan a una misma molécula de ARNr, en distintos puntos, amplificando la señal. Se han empleado para este fin las sondas de poliribonucleótidos (DeLong et al. 1999) pero el más común es emplear fluorocromos de alta sensibilidad como es la Cy3 (Behrens et al. 2003).

El lavado de las sondas no hibridadas está indicado para eliminar ruidos de fluorescencia. La concentración de cloruro de sodio en el tampón de lavado es importante para inmovilizar las moléculas hibridadas. El resultado de la hibridación es influenciado también por el estado de preservación de la muestra y de la sonda, manutención del potencial fluorescente del marcador, y de la concentración o disponibilidad de sonda en el tampón (Bouvier & P. Del Giorgio 2003). Las sondas marcadas se pueden preservar por muchos meses, en la oscuridad para evitar el fotoblanqueamiento, de preferencia en pequeñas alícuotas de un solo uso.

8.1.3. Calidad de las imágenes

Debido a la fragilidad de las moléculas de fluorocromos al exponerse a la luz el proceso de captura de imagen se lleva a cabo preferencialmente de modo automático. Hace falta que las condiciones de captura sean optimizadas previamente y que los campos de observación estén bien preparados. En general se aplican filtros para aislar los diversos espectros y para seleccionar los rangos elegidos tanto para la excitación como para la captura de señal. En el ámbito de esta tesis el microscopio láser confocal (CLSM por sus siglas en inglés: *confocal laser scanning microscopy*) fue el utilizado y por ello este apartado se centra en este sistema.

En primer lugar, el resultado del FISH depende del proceso de generación de imagen y su documentación digital (Bouvier & P. Del Giorgio 2003). Los problemas más comunes en la obtención de imagen son lógicamente la falta de señal y el falso positivo. La ausencia de señal se produce por falta de hibridación, pero también se puede producir por desvanecimiento del fluorocromo o fotoblanqueamiento. A este nivel, el falso positivo es más importante pues se atribuye, en muchos casos, a autofluorescencia. Hace falta aclarar que hay dos tipos de falso positivo: de la autofluorescencia y el originado de ruido de fondo. El ruido de fondo surge cuando no se filtra bien la señal y se emite desde la región del espectro de luz donde los picos de excitación y de emisión de señal se solapan (Moter & Göbel 2000). Para resolverlo se aplican filtros o herramientas de ajuste de imagen. En lo general, cuando hay autofluorescencia lo que se hace es medir las señales emitidas desde muestras hibridadas así como del control negativo, preparado de la misma muestra, y al final se resta del recuento la autofluorescencia captada del banco (Jubany et al. 2009). A día de hoy, la cuantificación se hace con Dime (Taslim et al. 2011) o Matlab (Daims & Wagner 2007b; Jubany 2009). Debido a que la autofluorescencia es uno de los objetos de estudio de la tesis, el tema se explora en detalle en el Capítulo 10.

8.2. Antecedentes

A lo largo del tiempo se reportaron problemas con aplicaciones de FISH que se relacionaron con una elevada concentración de partículas o metabolitos y a la fuerte adhesión de las células a las partículas. La agregación de células de tipo filamentosas con el material particulado también ha sido reportada (Nielsen 2009). Además se describieron problemas de falsa señal negativa (baja permeabilidad); tema que fue objeto de extensas revisiones (Moter & Göbel 2000; Bouvier & P. a Del Giorgio 2003; Wagner & Haider 2012), y problemas con resultados falsos positivos derivados de la autofluorescencia (Moter & Göbel 2000; Amann & Fuchs 2008; Suárez-Ojeda 2011). Por lo general, el aspecto de la matriz ha jugado un papel importante en el proceso de preparación de muestras tomadas de biofiltros debido a complejidad de la biopelícula (Levsky & Singer 2003; Nielsen 2009; Almeida 2011). En un estudio reciente, llevado a cabo en nuestro grupo de investigación, nos hemos encontrado con problemas de este orden. En este caso las dificultades surgieron a la hora de preparar las células para la aplicación del protocolo de hibridación en porta-objetos. Distintos autores reportaron el inconveniente del EPS. Especialistas coinciden en la necesidad de aplicar agentes

para liberación de las células (Nielsen et al. 2009). Ya la estructuras de biopelículas y gránulos ha sido explorada a través de cortes micrométricos.

En los últimos años se han desarrollado métodos novedosos de seguimiento de expresión de genes basados en FISH. Estos métodos se revisaron en Wagner & Haider (2012). En biofiltración estas aplicaciones podrían ser útiles a la hora de investigar los procesos de inhibiciones metabólicas sobre todo en aquellas poblaciones responsables por la actividad de depuración del gas. Podría ser interesante por ejemplo, hacer el seguimiento simultáneo de las especies SOB por sonda específica y de la actividad de degradación vía marcación del ARNm. Incluso se podría aplicar rutinariamente para acompañar aquellos casos de inhibiciones provocadas por altas concentraciones de sulfuro de hidrogeno o sulfato (Malhautier et al. 2003) o en el fenómeno de acumulación de azufre elemental (S^0) o SO_4^{2-} . Estos fenómenos son importantes de seguir una vez que influyen en la evolución del ecosistema a lo largo del tiempo y a que puede afectar positiva o negativamente la performance del sistema.

Los estudios llevados a cabo en biofiltros de desulfuración se resumen en el anexo 5.. Tal como se puede apreciar, el objetivo más común fue el censo de la microbiota y el seguimiento de su dinámica. Para la obtención previa de la información de identidad filogenética el clonaje seguido del secuenciamiento de la biblioteca de clones fue el método elegido con mayor frecuencia. Las sondas más utilizadas fueron las EUB (I, II, III) para Eubacteria y ALF968, Bet42a y Gam42a, para los grupos Alpha, Beta y Gamma de Proteobacteria. También se emplearon algunas sondas dirigidas hacia grupos de BSO como por ejemplo para *Thiobacillus*, *Thiothrix*, *Halothiobacillus*, *Acidithiobacillus*, de entre otros. Los fluorocromos más utilizados fueron los derivados de la cianina (Cy3, Cy5), fluoresceína isotiocianato (FITC) y carboxifluoresceína (FAM-6) porque emiten en rangos alejados del espectro y se pueden utilizar en conjunto. El interesante fue la falta de información al respecto del fenómeno de autofluorescencia del S^0 .

8.3. Justificativa y objetivos de la optimización

En el grupo de tratamiento de gases de la UAB la FISH fue implementada como técnica de seguimiento de poblaciones desde el 2008. El primer estudio fue ejecutado por el Dr. Maestre que lo pasó al Dr. Rovira. Tras ello, el biofiltro se reformó y se volvió a inocular. Esta planta se denominó BTF- H_2S AER siendo utilizada por el Dr. Rovira

durante 240 días. En aquel período se aplicó la técnica de FISH para seguir las poblaciones SOB a partir de sondas elegidas en base a la información de la biblioteca de clones generada por el trabajo de Maestre (Maestre et al. 2010). El estudio que se presenta en este documento empezó el día 245 de operación, y tuvo como objetivo dar seguimiento al trabajo de Rovira. Los datos se utilizarían para describir la evolución de las poblaciones diana. También se planteó utilizar los recuentos para describir a los cambios ocasionados por la maniobra de cambio de pH (conforme datos del Capítulo 5). Sin embargo, la inconsistencia de los datos de las cuantificaciones obtenidas al final de 600 días llegó a tal punto que de inmediato se abandonó el trabajo. Los problemas motivaron a los estudios al respecto de la adecuación del set de sondas, en base al análisis de cobertura y, también, para eliminar el efecto de la autofluorescencia. El presente trabajo surgió de la necesidad de revisar meticulosamente los problemas de cobertura observados con el método en muestras que se tomaron para al final proponer mejoras en las rutinas. Este tipo de investigación no se ha descrito en literatura para muestras de biofiltros con S^0 acumulado

Los objetivos generales fueron:

- ✓ comprobar la especificidad de las sondas,
- ✓ comprobar la cobertura
- ✓ confirmar el origen de la autofluorescencia: S^0
- ✓ Optimizar el protocolo para incrementar la cobertura, elección del set de sondas, y eliminar la interferencia de los falsos positivos

CAPÍTULO 9

Materiales y métodos

9. Materiales y métodos de la FISH

La optimización de FISH fue aplicada al protocolo elaborado por Jubany (2007) y adaptado por Maestre (2009). Las muestras utilizadas en el presente estudio se recogieron el día 245 de operación del reactor bajo condiciones de pH neutro, y en los días 468 y 586 a pH ácido y se nombraron F245 y F586.

9.1. Preparación de las muestras y fijación

Se utilizaron muestras de biomasa semejantes a las que se tomaron para *tag-454* y se aplicaron los protocolos de preparación específicos para la técnica de FISH. El procesado de la biomasa y la fijación de las muestras se ilustran en la figura 9.1. Tras su liberación del material de soporte el volumen de líquido fue completado hasta 250 mL con tampón PBS y luego homogeneizado. De la mezcla se tomó un volumen de 0.5 mL para formar cada una de las submuestras (3 réplicas) que fueron fijadas en 1,5 mL de solución de formaldehído al 4% por 2 horas a 4 °C. Pasado el tiempo de fijación se centrifugó y se descartó el fijador en el sobrenadante. El fijador residual se lavó con PBS (3 veces), centrifugando a 4,000 x g por 5 min y descartando el sobrenadante. A continuación, cada muestra fue pos-fijada en etanol a -20 °C y PBS (V.V). Las muestras se preservaron a -80 °C.

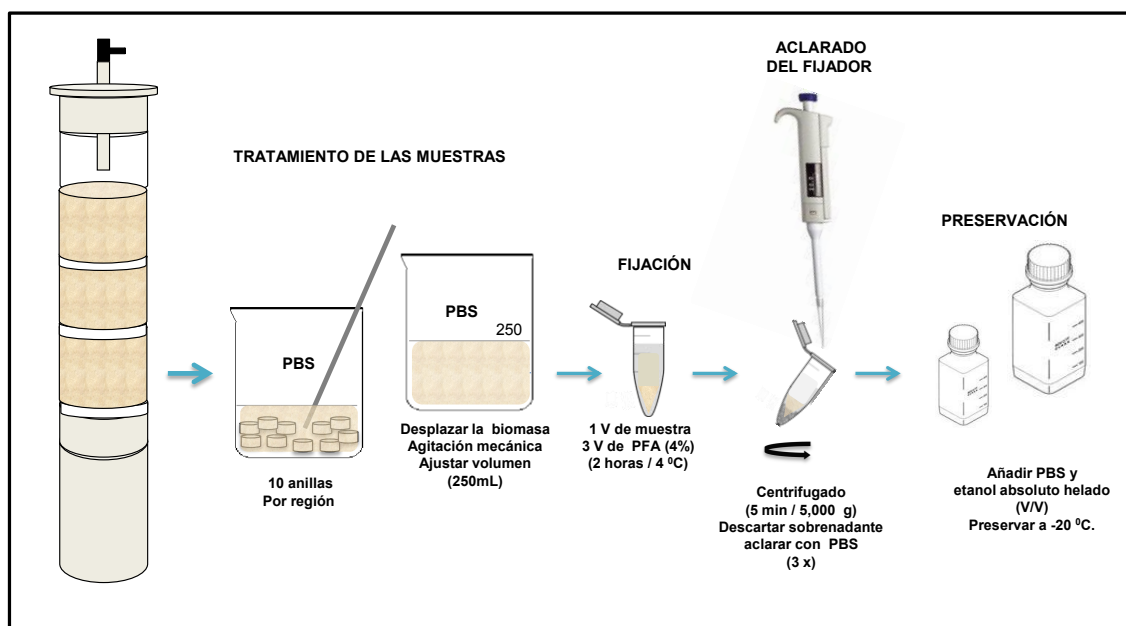


Figura 9.1. Protocolo de FISH aplicado a las muestras del BTF-H₂S AER. Las flechas en naranja indican el proceso de deshidratación; en verde los pasos de hibridación y en rojo el de lavado. La flecha negra indica el procedimiento de conservación.

9.2. Preparación de portaobjetos

El conjunto de portaobjetos se trató previamente con 3-aminopropiltrietoxisilano (Sigma-Aldrin-Alemania) y acetona, para fluorescencia, al 2% por 5 min, para mejorar la adhesión de la biomasa a la superficie del cristal

Los procedimientos se ilustran en la figura 9.2. Para cada muestra y sonda se preparó un portaobjeto con ocho pocillos utilizando 10 μL de muestra fijada. El pocillo 1 siempre se utilizó como control de la hibridación, siendo preparado como los demás, pero sin la adición de sondas. Las muestras en los pocillos se secaron en estufa a 46 $^{\circ}\text{C}$ por 15-20 min, luego fueron deshidratadas en serie de etanol al 50%; 80%; y 98% por 3 min y a continuación se secaron al aire ambiente. La secuencia de procedimientos de secado y deshidratación de las muestras en los portaobjetos se indican mediante flechas de color naranja y verde, en respectivo, en la fig. 9.2.

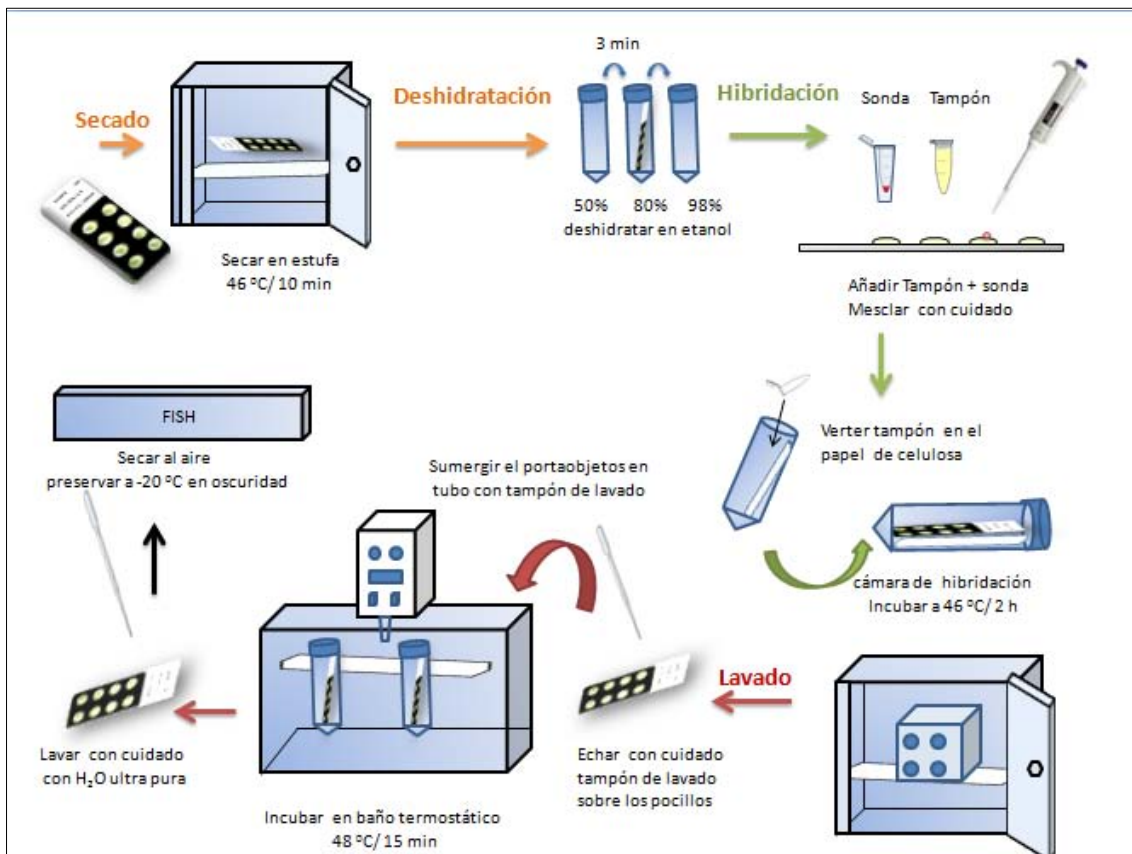


Figura 9.2. Protocolo de FISH aplicado a las muestras del BTF-H₂S AER. Las flechas en naranja indican el proceso de deshidratación; en verde los pasos de hibridación y en rojo el de lavado. La flecha negra indica el procedimiento de conservación.

9.3. Hibridación y lavado

Los procedimientos de hibridación se ilustran en la fig. 9.2 en verde y el lavado en rojo. En resumen, se prepararon 2 mL del tampón hibridación y 50 mL del tampón lavado, para cada portaobjetos. Las concentraciones de la y del cloruro de sodio para se encuentran en la tabla 9.1.

En cada pocillo se añadieron: 8 μ L de tampón de hibridación, 1 μ L de solución de EUB338mix y 1 μ L de la solución de sonda específica, que se mezclaron gentilmente. La cámara de hibridación se preparó previamente en tubo de centrifuga (50 mL) forrando una área longitudinal de la pared lateral con de papel de celulosa en donde se hecho el volumen restante del tampón hibridación sobre el papel, Luego se deslizó el portaobjetos arriba del papel humedecido y se cerró el tubo. Los tubos se incubaron a, 46 °C, 2 h, en la oscuridad. Pasado el tiempo de hibridación, se lavaron los portaobjetos echando gentilmente pequeños volúmenes de tampón de lavado, con pipeta. De seguido se sumergieron los portaobjetos en el tubo conteniendo el tampón que se incubaron a 48 °C, 15 min. Una vez hecho, se lavó el portaobjetos con agua ultra pura y luego se secaron al aire, en oscuridad. Al final, los portaobjetos se cubrieron con medio de montaje Fluoprep (BioMérieux SA, Francia) y cubreobjetos.

9.4. Sondas

La solución madre de cada sondas fueron preparadas a partir de los liofilizados (Thermo Fisher Scientific Alemania) con tampón TE (10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA, pH a 500 ng μ L⁻¹. Las alícuotas de trabajo se prepararon a 50 ng μ L⁻¹. Las informaciones de sondas elegidas y los datos de especificidad se detallan en la tabla 9.1. La sonda para Eubacteria se utilizaron en una mezcla equimimolar, denominada EUBmix (EUB 338, EUB 338 II, EUB 338 III), marcada con fluorocromo cianina 5 (Cy5), mientras que las sondas específicas se marcaron con cianina 3 (Cy3) o 6-*carbocisteina* (FAM-6). Detalles sobre las sondas se encuentran en la tabla 9.1: identificación (nombre corto y número de acceso en el RDP); especificidad; secuencias (en dirección 5'→3'); y el competidor, cuando es el caso. También se enseña tipo de ARN y posición de hibridación en la molécula; porcentual de formamida indicado para la permeabilización (FO); la concentración de NaCl (mM) para el tampón de lavado y el fluorocromo empleado (F), además de la referencia bibliográfica de descripción de la sonda.

Tabla 9.1. Detalles de las sondas utilizadas en la aplicación FISH (basada en ProbeBase)

Sonda/ n° ProbeBase	Especificidad	Secuencia (5→3') (competidora)	ARNr (Posición)	FO (%)	NaCl (mM)	F	Referencia
ALF968/ pB-00021	α - proteobacteria	GGT AAG GTT CTG CGC GTT	16S (968-985)	20	215	Cy3 FAM-6	(Loy et al. 2007)
BET42a/ pB-00034	β - proteobacteria	GCC TTC CCA CTT CGT TT (GAM42a)	23S(1027-1043)	35	70	Cy3 FAM-6	(Manz et al. 1992)
GAM42a/ pB-00174	γ - proteobacteria	GCC TTC CCA CAT CGT TT (BET42a)	23S(1027-1043)	35	70	Cy3 FAM-6	(Manz et al. 1992)
EUB 338/ pB-00159	Dominio Eubacteria	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	16S (338-355)	20-35*	215/ 70*	Cy5	(Amann et al. 1990)
EUB 338 II/ pB-00160	Planctomycetales	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	16S (338-355)	20-35*	215/ 70*	Cy5	(Daims et al. 1999)
EUB 338 III/ pB-00161	Verrucomicrobiales	GCT GCC ACC CGT AGG TGT'	16S (338-355)	20- 35*	215/ 70*	Cy5	(Daims et al. 1999)

* dependiente de la combinación de sondas FO- Formamida, F- Fluorocromos

9.5. Microscopia y cuantificación con Matlab

Cada porta-objetos se examinó en microscopio confocal FLUOVIEW FV1000 (Olympus, Tokio, Japón) equipado con láseres de Diodo, Helio-Neón y Argón. Los análisis se hicieron en el Servicio de Microscopia de la UAB. El sistema permitió documentar las señales emitidas en dos canales independientes de modo simultáneo o secuencial. El canal 1 se utilizó para documentar las señales emitidas por la sonda específica marcada con Cy3 o FAM-6 mientras, el canal 2 se utilizó para documentar Cy5. Las imágenes para la cuantificación se tomaron bajo lente de inmersión (aumento 60), que luego se exportaron en formato “.tif” de 8 bits, blanco y negro.

La excitación de los fluorocromos se hizo con los parámetros descritos en la tabla 9.2. Previamente a la toma de fotos, la potencia de los láseres fue ajustada de 11 hasta 25 mV y las condiciones de la visualización se ajustaron con FV10-ASW 1.7 Viewer. Se utilizó aplicaron siempre los mismos sets de parámetros en todos los campos de visualización. Las tomas de fotos se hicieron en modo simultáneo para XY con resolución 1,024 x 1,024 píxeles. Las 5 imágenes obtenidas de los pocillos de numero 1 se utilizaron para calcular el ruido de fondo y de los demás pocillos se obtuvieron 40 fotos al azar que se utilizó para calcular los valores de abundancia relativa; como el porcentaje de la sonda específica respecto al total de Eubacteria. Para ello se utilizó el analizador de imágenes desarrollado en *Matlab Image Processing Toolbox*. Los detalles se pueden consultar en Jubany (2009). El error experimental fue calculado para cada muestra y por sonda en base a los promedios de los valores de intensidad en las 40 fotos.

Tabla 9.2. Características de los fluorocromos y parámetros de visualización

Fluorocromo (denominación original)	Longitud de onda (nm)		Coeficiente de extinción molar (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Láser / nm (Color de emisión)
	Máximo de Absorción	Máximo de Emisión		
Cy3* (Sulfoindiocyanine)	550	570	150,000	He-Ne/ 543 (amarillo)
Cy5** (Sulfoindiocyanine)	649	670	250,000	He -Ne/ 633 (rojo)
FAM-6* (6-Carboxy- Fluorescein)	494	518	83,000	Ar/ 488 (verde)

*marcador en las sondas específicas: ALF968; Beta42a; GAM42a; **marcador en las sondas EUB338 (I, II, III)

9.6. Evaluación de la especificidad de las sondas

Los datos de especificidad de cada sonda se buscaron en la base datos del ProbeBase (Loy et al. 2007). Des de la página se anotaron las informaciones referentes a cada sonda. Tambien se buscó informaciones de especificidad, en la literatura.

9.7. Análisis de cobertura de las sondas

Para la comprobación de cobertura se utilizaron tres herramientas de bioinformática de acceso público que fueron el ProbeCheck, el TestProbe y el ProbeMatch. En la tabla 9.3 se pueden consultar informaciones de las bases de datos que albergan las herramientas, como por ejemplo los tipos de ARN que sirven a la base de datos y el montante de secuencias disponibles para comparativa,

Tabla 9.3. Herramientas empleadas para el análisis de cobertura

Herramienta (Base de Datos)		Secuencias		Ref.
		ARNr	Nº	
ProbeCheck (ProbeBase)	SILVA_SSU*	16S/18S	739,633	(Pruesse 2007)
	SILVA_LSU**	23S / 28S	29,306	
http://www.microbial-ecology.net/probecheck				
TestProbe (Silva)		16S/18S	3,808,884	(Pruesse 2007)
		23S / 28S	61,874	
http://www.arb-silva.de/search/testprobe/				
ProbeMatch (RDP)		16S	2,658,609	(Cole 2014)
http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp				

*referente a la subunidad menor del Ribosoma; **referente a la subunidad mayor del Ribosoma

El estudio de la cobertura FISH fue realizado al comparar los datos generados de tag-454. Se investigaron las poblaciones que presentaron abundancia superior el 1% en el recuento tag-454, ya que esto fue el límite de confianza de la FISH. El trabajo cumplió 2 etapas:

-Etapa 1: La investigación empezó en la página del ProbeBase en donde se obtuvo el acceso directo a las secuencias de las sondas depositadas y a las herramientas de bioinformática elegidas para la comprobación de cobertura. Un ejemplo de la hoja de consulta en Silva se puede presentar en la fig. 9.3.

#	Job Name	Status	Matched Accessions	Matched Regions	Status Message	Elapsed Time	Queue
1		Finished	1265	1836		00:00:27	0
4	ALF968	Finished	1	1		00:00:24	0
5		Finished	5114	7640		00:00:26	0
6	Gam42a	Finished	5114	7640		00:00:24	0

Figura 9.3. Ejemplo de hoja de consulta en Silva

Etapa 2: Cada una de las búsquedas generó un listado de secuencias que poseían afinidad con aquella sonda. Se utilizaron los parámetros sugeridos por la herramienta con “*mismatches*” en 0 (cero) y los resultados se exportaron para almacenamiento (*txt* o Excel); para consultas posteriores. Las hojas de resultados fueron generadas automáticamente por ProbeCheck, TestProbe y ProbeMatch. Los resultados más relevantes se seleccionaron y se exportaron para consultas posteriores mientras las hojas completas se pueden consultar en el anexo 6,

9.8. Estudio de autofluorescencia del S⁰

El estudio de la autofluorescencia se llevó a cabo en las muestras F245, F468 y F586. Se hizo el análisis del espectro de emisión de azufre elemental biológico (S⁰) extraído de una muestra de un BTf que fue cedida por cortesía por el grupo de investigación en eliminación de gases de la Universidad Politécnica de Manresa (grado de pureza

de 95%). Los análisis de autofluorescencia de las muestras de biomasa se hicieron mediante barrido espectral en microscopio confocal y la estructura de la biopelícula se investigó por SEM. A continuación se describe la metodología empleada para el barrido espectral y para la elección de fluorocromo.

9.9. Barrido espectral

Para cada barrido espectral, se prepararon dos pocillos de un portaobjetos (un portaobjetos por muestra) utilizando alícuotas de 10 μ L. A continuación se secaron y se deshidrataron con etanol, pero, no se aplicaron los pasos de hibridación y lavado. Los portaobjetos se montaron con Fluoprep y se llevaron a cabo el barrido en CLSM en 4 rangos del λ . La excitación láser incluyó: láser diodo, azul al 405 nm, láser de gas Argón verde al 488 nm, láser de diodo amarillo al 559 nm y el láser de color rojo al 635 nm. Las condiciones de los barridos se detallan en la tabla 9.4.

En todos los barridos se utilizaron las mismas condiciones de operación del microscopio. Las cuantificaciones de señal se realizaron en un área delimitada del campo de visualización (ROI) por duplicado. La intensidad de fluorescencia se reportó en unidades arbitrarias. Los análisis se hicieron dentro de un rango específico del espectro, de modo que permitiera eliminar los ruidos derivados de background (excitación-emisión). Las gráficas de los espectros se elaboraron con base en los promedios de las dos réplicas.

Tabla 9.4. Condiciones de los barridos espectrales

Longitud de onda excitación (nm)/ láser	Rango de análisis	Máximo de Emisión λ (nm)
405/ azul	420-770	450
488/ verde	500-770	520
559/ amarillo	560-770	570
635/ rojo	640-770	645

9.10. Análisis de los fluorocromos

Los resultados de los barridos espectrales se utilizaron para el análisis de la eficacia de los marcadores Cy3 y Cy5, y para la comprobación del rango de longitud de onda

más adecuado para la elección de nuevos fluorocromos. Se utilizaron los datos de las simulaciones de emisiones de los fluorocromos que se realizó en línea a través de la página: <http://www.lifetechnologies.com/es/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>. Las nuevas sondas fueron sintetizadas con el fluorocromo FAM-6.

9.11. Comprobación por vía experimental

La comprobación de hibridación fue ejecutada tanto para Cy3 cuanto para FAM-6 a fin de comparar la adecuación de los valores de abundancia para las clases α , β i γ de Proteobacteria. Los datos sirvieron para comprobar las discrepancias entre recuentos con ambos fluorocromos así como para evaluar se el procedimiento de optimización generaba resultados fiables, cuando comparado con *tag-454*. Para ello se elaboró una muestra integrada formada por partes iguales de las tres submuestras, tomadas por región.

CAPÍTULO 10

Análisis de la cobertura de las sondas

10. Análisis de la cobertura de las sondas

La FISH no provee la identidad de las células que se estudia de modo que se aconseja llevar a cabo un estudio previo de la composición para poder elegir sondas que representen las poblaciones. A día de hoy, la información publicada corresponde habitualmente a una diversidad simplificada ya que se refieren a taxones superiores como filos y clases. El inconveniente de este método es que al elegir una sonda tan general se limitan las posibilidades de conocer las poblaciones protagonistas del ecosistema de estudio en concreto. Ejemplos concretos se pueden apreciar en los trabajos que prescindieron de la búsqueda previa de identidad en el propio sistema (K. L. Ho 2008; Pérez 2012).

A lo largo del tiempo, la información de identidad filogenética fue recogida principalmente por PCR-DGGE (Araya 2003, Xia 2010; Deines 2010), y el clonaje (Schramm 2002; Kindaichi 2004; Daims & Wagner 2007; Maestre 2010) por secuenciación del ADN. A pesar de que estas metodologías son fiables es cierto que la cobertura se limita por el protocolo y por la cantidad de material que se envía a secuenciar. En muestras de un entorno complejo es probable que ninguna de estas aproximaciones sea suficiente para cubrir la diversidad. En cualquier caso la ampliación de la cobertura en aplicaciones ecológicas del FISH prescinde de la información genética que sólo se puede tener acceso por medio de la aplicación de plataformas de secuenciación masiva (Amann & Fuchs 2008).

10.1. Especificidad

La especificidad de una sonda mide la coherencia de la hibridación, o sea, que predice con que grupos filogenéticos hibridan y si se hibridan fuera del grupo diana. Tanto el ARN 16S como el 23S pueden ser utilizados como dianas. La molécula 16S sirve como diana para todos los niveles filogenéticos mientras que la del 23S es útil para aclarar la filogenia a nivel de género o especie (Bouvier & P. Del Giorgio 2003). La búsqueda o el diseño además de los análisis de especificidad de las sondas se deben llevar a cabo en plataforma bioinformática. En la bases de datos ProbeBase (Loy et al. 2007), Silva (Quast et al. 2013), y en proyecto ARB (Pruesse et al. 2007) se puede encontrar distintas herramientas de libre acceso. A día de hoy es sabido que hay regiones del ARNr que no permiten un buen acceso de la sonda sea por su estructura secundaria o terciaria. El efecto posicional es más evidente al nivel

secundario de la molécula (ej. por la formación de horquillas o complejos RNA-proteínas) y puede dificultar el alineamiento. Para prevenir el problema es posible ejecutar pruebas de la hibridación *in silico* y luego hacer una predicción de los resultados de la fluorescencia emitida a partir de la hibridación en determinadas regiones. Para ello se utilizan modelos termodinámicos y herramientas diseñadas para este fin disponibles desde el proyecto ARB en la página WEB (Kumar et al. 2005).

A lo largo de los años, el FISH se ha aplicado con el principal objetivo de identificar y seguir a grupos específicos de bacterias. En general, la selección de sondas estuvo basada en trabajos llevados a cabo en el área de tratamiento de aguas (K. L. Ho 2008; Chiemchaisri 2013). En muchos de estos estudios se describieron problemas de falta de coincidencia entre los datos obtenidos con las sondas de clase frente a las sondas para especies, pero pocas veces se intentó comprobar las razones. El problema de inespecificidad de la sonda GAM42a, que no hibrida en el grupo *Xanthomonas* fue reportado (Okabe et al. 2007).

De acuerdo con lo revisado en la literatura, la diversidad en biofiltros puede ser más o menos compleja y hace falta previamente. En el estudio de clones y FISH llevado a cabo por Maestre (2010) la comunidad microbiana fue simplificada a SOB. No se reportaron problemas derivados del fenómeno de autofluorescencia. En cualquier caso, en las muestras con acumulación de azufre se encontraron recuentos de abundancia más elevados que el esperado. Algunos valores llegaron a 50% para una especie y, 70 o 90% para un set de sondas, bastante reducido. Las discrepancias entre los recuentos de los clones y del FISH fueron atribuidas a errores experimentales. Así mismo, la técnica fue lo suficiente sensible como para observar la dinámica, aunque los resultados parecen indicar que la acumulación de S^0 en la biomasa pudo haber enmascarado los recuentos. Para la optimización fue necesario comprobar en las bases de datos las informaciones de especificidad y de cobertura de las todas las sondas elegidas para el estudio. A seguir se actualizó el banco de datos del grupo de investigación y las informaciones de sondas adecuadas a aplicaciones en BTFs para desulfuración.

10.2. Resultados y discusión

10.2.1. Análisis de especificidad y de cobertura

El trabajo de comprobación se hizo para cada una de las sondas. En la fig. 10.1 se observa una hoja de resultados en donde se enseñan los datos de especificidad anotados para la sonda GAM42a desde la página de ProbeBase.

GAM42a		Tested for in situ hybridization.
Accession no.	pB-00174	
Name (Alm et al., 1995)*	L-C-gProt-1027-a-A-17	
Specificity	Gammaproteobacteria	←
Probe category	► eukaryotes	
Target molecule	23S rRNA	
Position*	1027 - 1043	
Sequence*	5' - GCC TTC CCA CAI CGT TT -3'	←
Competitor	5' - GCC TTC CCA CTT CGT TT -3'	
Length [nt]	17	
MW [g/mol]	5071	
G+C content [%]	52.9	
Tm [°C]*	47	
delta Gs [kcal/mol]*	ΔG ₁ : -20.95; ΔG ₂ : 1.49; ΔG ₁₂ : -20.9	
Formamide [%]*	35	
Reference	Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M. and Schleifer K.-H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. Syst. Appl. Microbiol.15: 593 - 600.	

Figura 10.1. Hoja de resultados: especificidad para la sonda GAM42

La comprobación de especificidad no se pudo realizar por el confronto directo de las secuencias anotadas por *tag-454* frente a secuencias de las sondas.

Tabla 10.1. Comprobación de especificidad y cobertura de las sondas des del ProbeBase

ALF968	Específica para Alphaproteobacteria, a excepción de Rickettsiales Cobertura: hits dentro de la clase Alphaproteobacteria: 79%/ 9750. Hits fuera del grupo: 1876 Principales hits fuera del grupo: Filos, Deinococcus-Thermus (38/364); Proteobacteria, principalmente clase Delta (1151/4256); Fibrobacteres (48/53)
BET42a	Específica para Betaproteobacteria (no se reporta el porcentual de hits) Principales hits fuera del grupo: No se reportaron los hits fuera del grupo pero, en los resultados de los análisis de cobertura realizados en Probecheck, se confirmó que hibrida en <i>Acidithiobacillus</i> (γ- proteobacteria)*
GAM42a	Específica para <i>Gammaproteobacteria</i> (no se reporta el porcentual de hits) Principales hits fuera del grupo: No se reportaron los hits fuera del grupo pero, en los resultados de los análisis de cobertura realizados des del Probecheck, se confirmó que no hibrida en el grupo <i>Xanthomonas</i> (γ- proteobacteria)*.
EUB338	"Mayoría de las bacterias" Cobertura: hits dentro del dominio Bacteria: 90%/ 169.389 Principales hits fuera del grupo: No se reportaron los hits fuera del grupo, de modo que, se debe buscar para cada especie de interés.
EUB338 II	Específica para Planctomycetales Cobertura: hits dentro de la orden Planctomycetales: 69% / 1214 Principales hits fuera del grupo: 83
EUB338 III	Específica para Verrucomicrobiales Cobertura: hits dentro de la orden Verrucomicrobiales: 93% / 943 Hits fuera del grupo: 913 Principales hits fuera del grupo: Chloroflexi (463/1078)
S-S-H.neap-635-a-A-19	Específica para <i>Halothiobacillus neapolitanus</i>/ Hits: 14 Principales hits fuera del grupo: Se encontró 2 hits para <i>Thiobacillus</i> .
TBD1419	Específica para <i>Thiobacillus denitrificans</i>/ Hits:219 Principales hits fuera del grupo : Se encontró 4 hits para otras β .
TBD121	Específica para <i>Thiobacillus denitrificans</i> y <i>Thiobacillus thioparus</i>/ Hits: 393 * Principales hits fuera del grupo: Se encontró 13 hits fuera del grupo.
S-S-T.int-0442-a-A-18	Específica para <i>Thiomonas intermedia</i>/ Hits: 219 Principales hits fuera del grupo: Se encontró 4 hits fuera del grupo
TM2G0138	Específica para "Group 2 <i>Thiomonas</i>" /Hits: 236 Principales hits fuera del grupo: Se encontró 7 hits fuera del grupo

El caso de la sonda ALF968, 16S, no se pudo aplicar una comparativa directa porque el sitio de hibridación de la sonda se localiza fuera de la región secuenciada, ya para BET42a y GAM42 no fue posible porque las sondas se hibridan en el 23S ARNr y las secuencias anotadas por pirosecuenciación son del 16S ARNr. La confrontación directa habría sido la mejor manera de comprobar la especificidad sin embargo se

logró hacerlo en base a secuencias de referencia que presentaron alto grado de similitud (dato recogido des de la hoja generada del procedimiento descrito en la etapa 2 de los materiales y métodos).En la tabla 10.1 se resumen las informaciones relevantes recogidas de la investigación con todas las sondad del set utilizado en el BTF-H₂S AER.

A continuación se discuten los resultados para aquellas sondas cuya diana se comprobó por *tag-454*, hecho que excluye la especie *Thiothrix*. Luego se discuten las peculiaridades del conjunto de datos, especificidad y cobertura, que se observaron desde ProbeCheck, TestProbe y ProbeMatch. El resumen de los resultados se presenta en la tabla 10.2 donde se explica la especificidad, la cobertura y las coincidencias (hits) y los problemas de inespecificidad. En comentarios se presentan informaciones adicionales que son relevantes para el presente estudio. De acuerdo con los datos todas las sondas presentaban alguno que otro inconveniente, hecho que puede contribuir para incrementar el error experimental. Para α -proteobacteria, por ejemplo, los hits fuera de grupo no resultan importantes ya que los grupos donde podría ocurrir hibridación inespecífica no se reportaran en muestras del BTF-H₂S AER. Con respecto a la sonda BET42a, el inconveniente es importante pues predice hibridación inespecífica con *Acidithiobacillus*, hecho que podría ser bastante grave teniendo en cuenta el resultado de abundancia *tag-454* en F586, donde los *Acidithiobacillus* son la extensa mayoría. No obstante, en la práctica este problema se pudo evitar aplicando la sonda GAM42a (sin fluorocromo) como competente de BET42a. De este modo las secuencias para *Acidithiobacillus* se alinean e hibridan, por afinidad, primero con la sonda gama disminuyendo la chance de ocurrir el alineamiento con la sonda BETA.

El caso más importante que envuelve la cobertura se observó en los datos para GAM42a que no hibrida en *Xanthomonas*. En la hoja de informaciones (reproducida en la fig. 10.1) no se hace mención de la incompatibilidad con el grupo *Xanthomonas*, sin embargo, esta limitación fue reportada (Buchholz-Cleven 1997; Yeates 2003; Siyambalapitiya & Blackall 2005). Además, en el archivo de cobertura de la propia base de datos no se reportó mach. El problema de baja especificidad para GAM42a se debe a una pequeña diferencia que ocurre en la composición de la secuencia de la sonda, en la posición 1038, donde está la base Citosina. El cambio (de Timina a Citosina) ha sido suficiente para impedir el alineamiento. En el contexto de la tesis, la información de incompatibilidad de la sonda Gama42A fue importante porque el estudio de diversidad reveló un elevado porcentaje de secuencias para Xanthomonadaceae, que podría estar relacionado a *Xanthomonas*. En la práctica, se

esta fracción de la comunidad no hibrida, los datos de abundancia quedan supra estimados. La probable solución podría ser el empleo de sus variantes, que tienen afinidad comprobada con *Xanthomonas* (ver tabla 10.3) (Siyambalapatiya & Blackall 2005). Con sondas dirigidas hacia especies la posibilidad de ocurrir el *hit* fuera de grupo es baja.

Tabla 10.3. Variantes de la Sondas GAM42a.

	Sonda	Seq. / 5'-3' / 23S ARNr Posición 1027 – 1043	Especificidad	Ref.
1	GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	<i>Gammaproteobacterial</i> (excepto <i>xanthomonas</i>)	(Giovannoni et al. 1988)
2	GAM42a_T1038	GCCTT <u>I</u> CCACATCGTTT	<i>Xanthomonas</i>	(Siyambalapatiya & Blackall 2005)
3	GAM42a_T1038_G10 31	GCCTT <u>I</u> CCACAT <u>G</u> GTTT	<i>Xanthomonas</i>	(Siyambalapatiya & Blackall 2005)
4	GAM42a_A1041_A10 40	GC <u>AA</u> TCCCACATCGTTT	<i>Xanthomonas</i> y <i>B.diminuta</i> (α)	(Siyambalapatiya & Blackall 2005)

10.3. Análisis de la cobertura de las sondas para proteobacterias

Se confrontó la información de identidad obtenida con *tag-454* con la cobertura de las sondas a fin de comprobar la utilidad del lote de sondas que se había elegido, con antelación. De cara, la comparativa de cobertura reveló que, en los ensayos llevados a cabo con Cy3, los valores calculados de abundancia para EP402-423 (Epsilonproteobacteria) G123T (*Thiothrix*), y TMD131 (*Sulfurimonas*) eran todos falsos. De acuerdo con el inventario *tag-454*, ninguna de aquellas proteobacterias se hallaba en el BTF-H₂S AER durante los episodios de muestreo. Más importante, revelaron también que las sondas destinadas a las demás especies sólo explicaron un porcentaje muy bajo de la composición microbiana. Del set inicial de sondas apenas las sondas: ALF968, BET42a y, GAM42a, además de las sondas específicas S-S-H.neap-635-a-A-19, TBD1419, TBD121 y, TM2G0138 estarían indicadas para las muestras. La discrepancia en la cobertura de FISH en biofiltros para desulfuración fue reportado por Ralebitso-Senior (2012) sin embargo otros estudios no lo tomaron en cuenta (K. L. Ho 2008; Pérez 2012),

En el caso del presente estudio, la cobertura no se vio limitada por la metodología, pero los resultados surgieron algunas limitaciones.

La cobertura de la diversidad del biofiltro pudo, en parte, ser explicada por las sondas de clase, pero el ideal haría sido proceder a una búsqueda a nivel de especies. Entonces, la diversidad pasa a ser el factor limitante. En la muestra 245, por ejemplo, se necesitaría un set de sondas muy extenso, lo que elevaría los costes e incrementaría demasiado el tiempo de análisis. Además, teniendo en cuenta la complejidad del ecosistema, se recomendaría la utilización, como sondas complementarias, algunas dirigidas hacia *Nitrobacter*, *Comamonas*, *Nitrosomonas*, *Nitrospira* y *Rhodanobacter* para, de este modo, poder explicar mejor la distribución de la abundancia dentro de las clases. Se debería también encontrar una manera de acomodar los representantes más numerosos de la familia Xanthomonadaceae, como por ejemplo *Dokdonella* y *Frateuria*, que formaron una parte considerable de los heterótrofos en biofiltros (Maestre 2010; Lebrero 2012). Se debería añadir también sondas para bacterias de otros filos como Actinobacteria, y Flavobacteria. Quizás, debido a la gran diversidad, fuera muy laborioso ejecutar la aplicación FISH sugerida pero, al menos se lograría entender parte del ecosistema en general. Desde un punto de vista ecológico, el estudio de los cambios poblacionales es muy importante para el éxito de la biotecnología, el que justificaría la investigación.

Debido a que los ensayos de comprobación experimental de la cobertura se desarrollaron después del estudio de la autofluorescencia y del cambio de fluorocromo, los resultados del ensayo de comprobación se presentan en el Capítulo 11. En cualquier caso, se puede adelantar que los resultados fueron adecuados y coincidieron con lo esperado. Se pudo comprobar la prevalencia de las proteobacterias de las clases γ i β en la muestra F245 (con 44 y 43 % de abundancia relativa), sobre las Alphaproteobacteria (15%). Los datos en la muestra F586 concordaron con los datos de recuento para el grupo de las α -proteobacterias así como reportó la ausencia de β y supremacía de γ . Las pequeñas discordancias entre los valores de abundancia relativa se pudieron explicar en base a inespecificidad de GAM42A limitación de Beta42a para *Acidithiobacillus*.

10.3.1. Actualización del conjunto de sondas

En base a todo lo expuesto se actualizó el conjunto de sondas recomendado para BTFs de desulfuración del laboratorio de gases. En la tabla 10.4 se presenta el resumen de las principales características de estas sondas. El listado amplía la cobertura de la diversidad en BTF-AER H₂S. No obstante, esta propuesta presentó

como principal limitación el montante de sondas, hecho que conllevaría demasiadas horas de trabajo de hibridación y microscopía además el incremento significativo de los costes, relacionados a sondas. Y también horas de microscopía. Es evidente que la efectividad de la aplicación de FISH como herramienta de seguimiento rutinaria de poblaciones se ve afectada por el número de sondas. En muestras con altos índices de diversidad (más de 20 especies), Pese a ello, algunos autores ya comprobaron mejora con en FISH multicolor (Gieseke 2003; Pernthaler 2004) y el FISH-PNA (*Peptide Nucleic Acid*) (Malic 2009; Pavlekovic 2009; Valm 2011). En el presente estudio, el problema de cobertura de diversidad se podría solucionar adaptando el protocolo para FISH-multicolor pero, había que investigar el rango del espectro sobre el cual se podría trabajar.

Tabla 10.4. Sondas indicadas para recuentos de bacterias mediante FISH en muestras de BTF-H₂S AER

Nombre corto	Nº acceso (ProbeBase)	Especificidad	Secuencia (5'→-3') 16S*/ 23S**
ALF968	pB-00021	α –proteobacteria	GGTAAGGTTCTGCGCGTT*
BET42a	pB-00034	β – proteobacteria	GCCTTCCCACTTCGTTT**
GAM42a	pB-00174	γ – proteobacteria	GCCTTCCCACATCGTTT**
S-S-H.neap-635-a-A-19	pB-01563	<i>Halothiobacillus neapolitanus</i>	TAGAATCCCAGTATCCAAT
TBD121	pB-01349	<i>T.denitrificans</i> , <i>T.thioparus</i>	CTCGGTACGTTCCGACGC
TM2G0138	pB-01208	Grupo 2 <i>Thiomonas</i>	GTAGTTATCCCCATCACA
ATT0223	pB-01213	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	AGACGTAGGCTCCTCTTC
Acdp821	pB-00014	<i>Acidiphilium</i>	AGCACCCCAACATCCAGCACACAT
EUB338	pB-00159	Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT
EUB338-II	pB-00160	Planctomycetales	GCAGCCACCCGTAGGTGT
EUB338-III	pB-00161	Verrucomicrobiales	GCTGCCACCCGTAGGTGT
NonEUB338	pB-00243	non-Bact338	ACTCCTACGGGAGGCAGC
NIT3	pB-00241	<i>Nitrobacter</i> spp.	CCTGTGCTCCATGCTCCG
XAN818	pB-00329	Xanthomonas	CAACATCCAGTTCGCATC
NSO190	pB-00249	AOB- β - proteobacteria	CGATCCCCTGCTTTTCTCC
HGC69a	pB-00182	Actinobacteria	TATAGTTACCACCGCCGT**
CFX1238	pB-01019	Chloroflexus sp	CGCATTGTCGTGGCCATT*

El resultado de la confrontación entre los datos de diversidad obtenida con las dos técnicas *tag-454* y FISH, fue crucial para entender que la complejidad del sistema no se podría explicar en base a un set de sondas elegidas en base a otros entornos. El

conjunto de sondas utilizado por (Maestre et al. 2010) no se mostró apropiado a las muestras F254 y F586 y como conclusión del estudio de cobertura se tomó que la simplificación de la diversidad puede afectar en la comprensión de la dinámica del biofiltro. En este estudio las sondas ALF986, BET42a y GAM42a no fueron suficientes para explicar los cambios en las poblaciones de SOB

CAPÍTULO 11

Estudio de la autofluorescencia del S⁰

Resultados obtenidos con SEM y análisis elemental del S⁰ se publicaron en

Montebello A, Mora M, López L, Bezerra T, Gamisans X, Lafuente J, Gabriel D (2014). Aerobic desulfurization of biogas by acidic biotrickling filtration in a randomly packed reactor. *Journal of hazardous materials*, 280, 200-208.

11. Estudio de la autofluorescencia del S⁰

11.1. Principios básicos de la autofluorescencia

El recuento de señal fluorescente se basa en el principio de que una unidad fluorescente (un fotón) es emitida desde una molécula reportera. En FISH esta capacidad se utiliza para reportar la hibridación. El microscopio ideal para el FISH es el confocal de barrido láser (CSLM-) que utiliza láseres como fuente de energía. Los fotones se captan en puntos y se obtiene la lectura de intensidad de fluorescencia; que se expresa en unidades arbitrarias (Kumar & Zucker 2013). El proceso se aprecia en la figura 11.1. La secuencia de eventos son generación de energía (1), selección del λ de excitación adecuado por un sistema de filtros (2), emisión de la energía para excitación del fluorocromo (3-E1) y de emisión de la fluorescencia (3-E2);. La detección, el tratamiento y el registro de las imágenes por vía computacional se ilustran en paso 4.

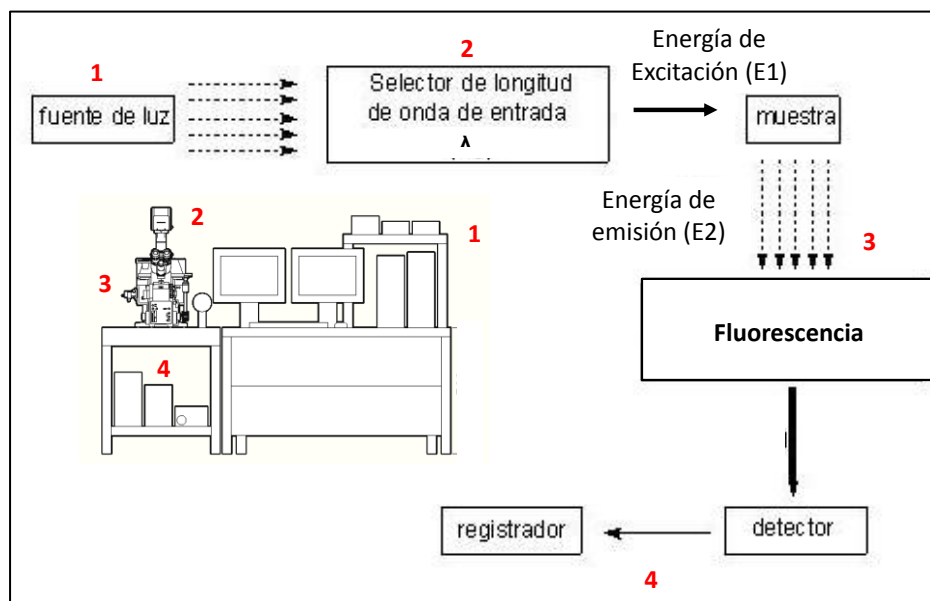


Figura 11.1. Mecanismo básico de la técnica de microscopía de barrido láser confocal (CSLM). 1, generación de energía luminosa (láser); 2, sistema de filtros y selector de longitud de onda para la entrada de la luz; 3, emisión de fluorescencia y 4, detección y registro de la imagen.

Las familias de fluorocromos, más utilizadas en ecología microbiana son Cianina, Cy3 y, Cy5 (ver estructura en fig.11.2, a izquierda.) y Fluoresceína (FAM-6). Ambas familias poseen altos coeficientes de extinción molar, lo que retarda el fenómeno natural de desestructuración que es irreversible (fotoblanqueamiento) La FISH con múltiples sondas debe ser llevada a cabo con un conjunto de fluorocromos que se

excitan y que emiten fluorescencia en puntos alejados del espectro para evitar interferencias (ruidos o *background*). Ruidos de fondo son producidos cuando se solapan los picos de emisión y excitación de dos fluorocromos vecinos (Nielsen et al. 2009) pero pueden ser aislados por filtros adecuados.

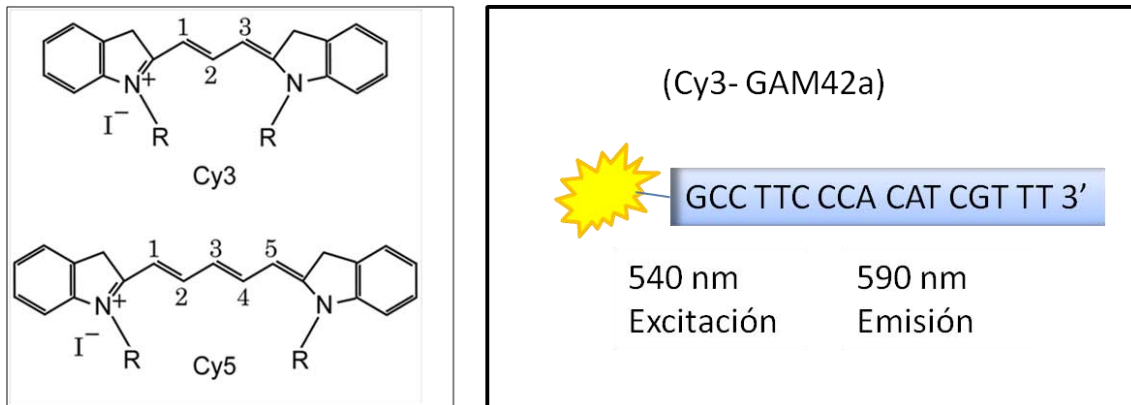


Figura 11.2. Fluorocromo y, marcaje de una sonda (GAM42a) con cianina. A la izquierda; estructura básica de las Cianinas (Cy3, arriba y Cy5 abajo); a la derecha marcaje de la sonda GAM42s con Cy3 y, sus espectros de excitación y de emisión de fluorescencia.

Los problemas relacionados a la generación de imágenes son principalmente señales de fondo, que ocurren debido a equivocaciones en el paso de hibridación o de lavado, cuando no se cumplen las condiciones de temperatura o de tiempo de hibridación, o cuando las condiciones en la cámara de hibridación no son las ideales, lo que produce un marcaje fuera de la región diana (Bouvier & P. Del Giorgio 2003). Falsos positivos también pueden originarse por autofluorescencia que al final se puede interferir en los recuentos. Los falsos negativos son, en general, derivados de problemas de penetración de la sonda, pero también pueden ser ocasionados por pérdida de muestra en el paso de lavado. Ya (Amann & Fuchs 2008) .

La autofluorescencia se podría definir como la propiedad de algunas células y/o partículas de emitir fluorescencia de modo natural, es decir: sin incorporación de fluorocromos, cuando excitadas en determinado rango del λ . Este fenómeno debe ser investigado en cada material y, para ello se utilizan muestras sin marcaje. En general, el perfil espectral se obtiene por excitación al rojo, azul y verde, del λ . Para prevenir equivocaciones en la elección del marcador se debe investigar previamente los perfiles naturales de emisiones en el longitudes de onda desde 350 hasta 750 nm (Kumar & Zucker 2013). Con esta información se busca el fluorocromo adecuado. En términos prácticos, cuando el resultado es positivo para un determinado rango, se debe evitar

utilizar fluorocromos que coincidan en este mismo rango. A día de hoy, hay muchas opciones. Las distorsiones en la señal inherente a células se pueden minimizar mediante el uso de marcadores que se excitan en rangos superiores a 500 nm.

La manera más sencilla de eliminar la señal de autofluorescencia es el ajuste de los parámetros del barrido como por ejemplo disminuir la potencia del láser, cambiar de foco o de región, ajustar la apertura del fotomultiplicador (*pinhole*), el brillo o el contraste; o quizás, cambiar el medio de montaje. El buen ajuste permite generar datos comparables y reproducibles. Los microscopios de barrido láser permiten excitar de manera muy selectiva sobre los rangos deseados, y disponen de un buen conjunto de filtros (Ology 2013). La autofluorescencia también es propia de algunos microorganismos. Fue reportada para distintos grupos como *Pseudomonas*, *Legionella*, *Rhodospirillum* y *Cyanobacteria* (revisados en Moter & Göbel 2000), también para *Salmonella* (Manz et al. 2000) y bacterias metanógenas (Fernández 2008). Entre bacterias del azufre fue reportada en cultivo de *Thiobacillus* (Haaijer et al. 2006), *Thioplota* y *Beggiatoa* (Pasteris, 2001) y en *Thiothrix* (Nielsen et al. 2000).

En muestras ambientales, la autofluorescencia fue documentada en aguas de desecho, de distintos orígenes (Vesey et al. 1997), lodo (Nielsen et al. 2009), suelos (Kepner & Pratt 1994) y ambientes marinos (Eickhorst & Tippkötter 2008; Lew 2010). Fenómenos de esta naturaleza se relacionaron con la presencia de moléculas de clorofila (Maclsaac & Stockner 1993), flavoproteínas (Benson et al. 1979) y paranitrofenol (Suárez-Ojeda et al. 2011). En pocos casos se ha reportado para partículas de azufre elemental (Okabe 2005). En un estudio al respecto del azufre intracelular se utilizaron CLSM en conjunto con la espectrometría Raman para caracterizar el azufre elemental en SOB filamentosas (Pasteris 2001).

11.2. Justificativa del estudio y objetivos

La autofluorescencia en las muestras recogidas del período ácido (BTF-H₂S AER) produjo un incremento de muy marcado en la emisión de señal de modo que fue necesario comprobar su origen. El efecto se observó ya durante los primeros recuentos llevados a cabo después del cambio de pH; al día 468. En aquel análisis las cuantificaciones se llevaban a cabo con las sondas generales dirigidas a Eubacteria, marcadas con Cy5 frente a las específicas para α , β , i γ proteobacteria, marcadas con Cy3. Lo que se vio en las imágenes de microscopia fue un perfil de emisión muy distinto del observado en las muestras de la operación a pH neutro. Además el

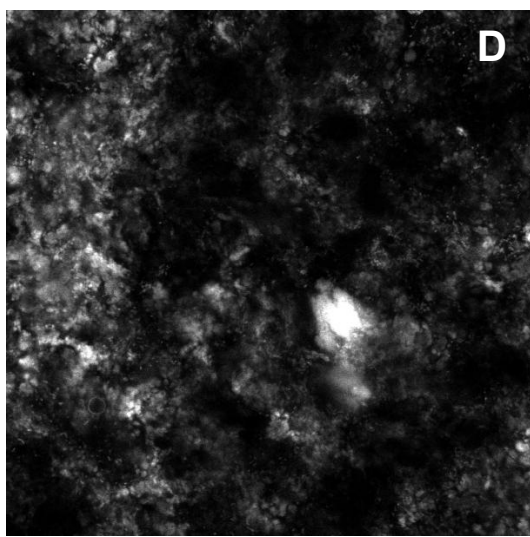
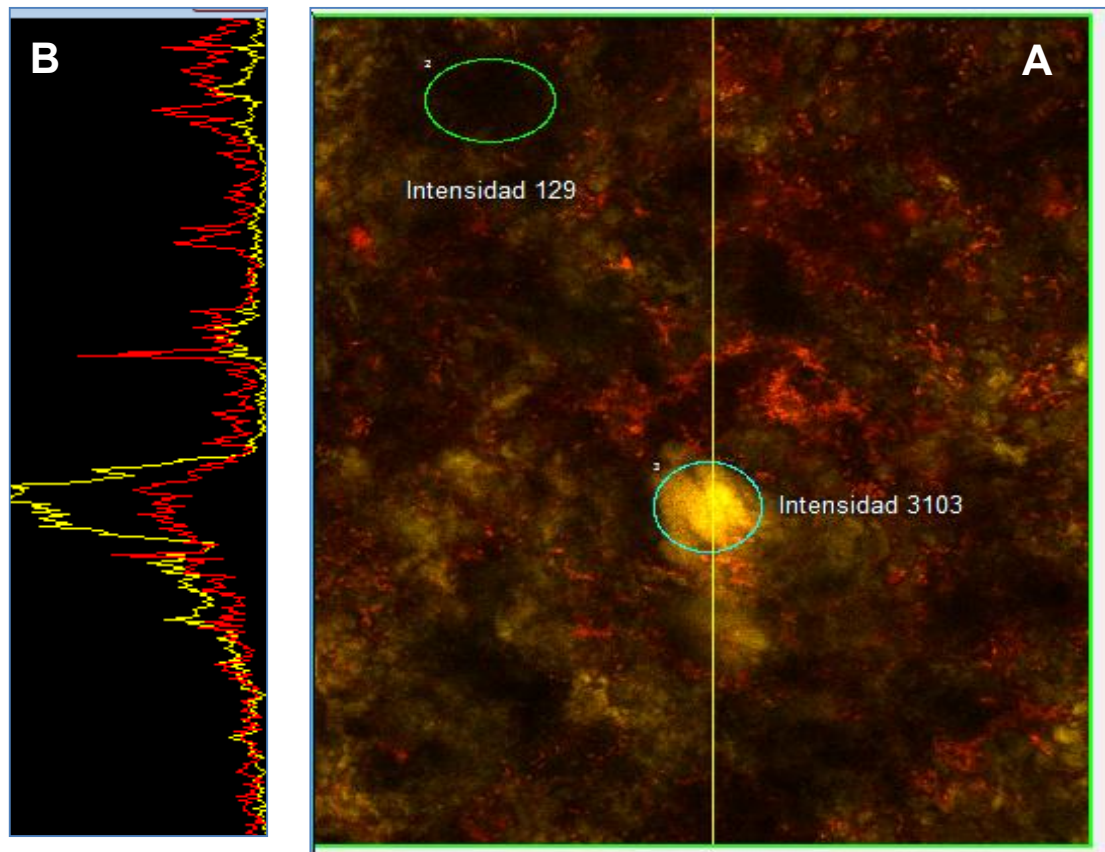
fenómeno se intensificó dramáticamente en las muestras del día 586 (F586). El objetivo general del presente estudio fue investigar el origen la autofluorescencia para luego eliminar el problema. Para llevar a cabo la propuesta fue preciso:

- ✓ comprobar el origen de la autofluorescencia, identificando los rangos de emisión de fluorescencia de las muestras y comparar con el perfil del S^0 (puro) para comprobar se coinciden sobre λ .
- ✓ investigar la relación entre emisión de fluorescencia y fluorocromo.
- ✓ Optimizar los protocolos para eliminar la autofluorescencia
- ✓ Llevar a cabo una prueba experimental para averiguar la adecuación del la optimización

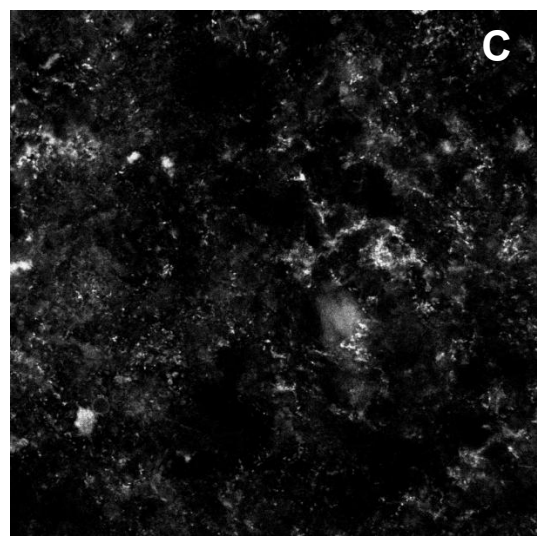
11.3. Resultados y discusión

11.3.1. Autofluorescencia del S^0

El fenómeno de autofluorescencia se aprecia en la fig. 11.3. Las imágenes fueron generadas de un mismo campo de visualización, donde se aplicaron la sondas EUB338mix-Cy5 y BET42a-Cy3 en una muestra F586. En la foto principal se aprecia una imagen generada por la superposición de señal de Cy5 (en rojo) y de Cy3 (en amarillo), el color naranja indica las regiones de coincidencia de señal. El perfil de intensidad de fluorescencia captada a lo largo de la línea amarilla se enseña en la gráfica a la izquierda (B), las áreas delimitadas con círculos (ROI) corresponden a las regiones de más alta y más baja intensidad de fluorescencia del campo. En las imágenes "C" y "D" se aprecian las fotos exportadas en blanco y negro que se utilizaron para la cuantificación de los píxeles en Matlab. Todos los puntos iluminados reportan señal positiva para fluorescencia. Al observar la imagen principal (A), lo primero que destaca es la fuerte fluorescencia amarilla, que parece indicar hibridación positiva para Cy3. También llama la atención la distribución de la fluorescencia amarilla, que se observó donde había y donde no había coincidencia con al fluorescencia roja (Cy5).



(Cy3/ amarillo)



(Cy5/ rojo)

Figura 11.3. Imágenes de un campo de visualización de un portaobjeto con muestra de F586 tratadas con EUB338mix-CY5, BET42a-CY3. (a) Imagen tomada durante el barrido; (b) perfil de intensidad de fluorescencia tomado a lo largo de la línea amarilla; (c) imagen exportada en blanco y negro relativa del canal de detección de BET42a-CY3; (d) imagen del canal de detección de la EUB338mix-CY5.

El efecto también se distingue bien en las imágenes en blanco y negro. Teniendo en cuenta que todas las bacterias deberían emitir fluorescencia roja y que no había β -proteobacteria para generar señal amarilla, el resultado del FISH no fue coherente. Lo correcto sería que no hubiera señal amarilla a parte de algún ruido de fondo. A lo largo de la línea del perfil de intensidad se observaron zonas de alta intensidad de fluorescencia para Cy5 (rojo) que no coinciden con la señal para Cy3. El material brillante amarillo no se constituía en Eubacteria. En cuanto al aspecto general de la muestra, este se examinó también al microscopio óptico de luz; siempre al final del trabajo para evitar el desvanecimiento de la fluorescencia. En F468, se visualizaron cristales de S^0 en la muestra, principalmente en las muestras de la región entrada del gas; pero siempre en pequeña proporción comparado con el volumen de biomasa. En cambio, en las muestras F586, la presencia de S^0 fue muy marcada, tanto en forma de gránulos como de cristales (de longitudes variada). En algunas muestras de la región superior del reactor incluso se invirtió la relación. Después de los centrifugados, se veía que el S^0 depositado superaba el 80% del volumen de sólidos. Desafortunadamente, no se logró separar el azufre de la biomasa, sin dañar las células.. El efecto de la autofluorescencia fue estudiado en muestras de biomasa recogidas del BTF- H_2S AER y el fenómeno afectó el recuento de las poblaciones. En el presente estudio, el incremento en la señal generada por las sondas marcadas con Cy3 se vio representado en los valores de abundancia supra estimados.

11.3.2. Aspecto de la matriz

Debido a la heterogeneidad de las partículas de material inorgánico, se decidió investigar su composición bajo microscopía electrónica de barrido (SEM) y con EDX. Visualmente, el material en grande parte estuvo formado de una mezcla de piedras de azufre, cristales translucidos, gránulos, además de un polvo fino, Para el análisis, se prepararon muestras frescas, y de los sólidos de muestra fijadas para FISH. La matriz fue observada bajo distintos aumentos (1 k- 20 k). El aspecto de la biopelícula se aprecia en las fotos A y B de la fig. 11.3. En "A" se aprecia el grosor de la matriz que recubrió el soporte y los distintos tipos de células inmersos en la matriz; mientras en "B" se observó la capa de EPS recubriendo la superficie de la anilla. Las estructuras señaladas probablemente son puntos de anclaje de la matriz. Los pequeños puntos que se enmarcaron en el círculo son microesferas de S^0 . En la superficie de muchas células se aprecian estas estructuras.

La confirmaron de presencia del S^0 se logró por distintos métodos de análisis, que se llevaron a cabo en sólidos presentes en las muestras (ver en Montebello 2014), pero en este documento de tesis se enseñan solamente los resultados de los microanálisis EDX en SEM.

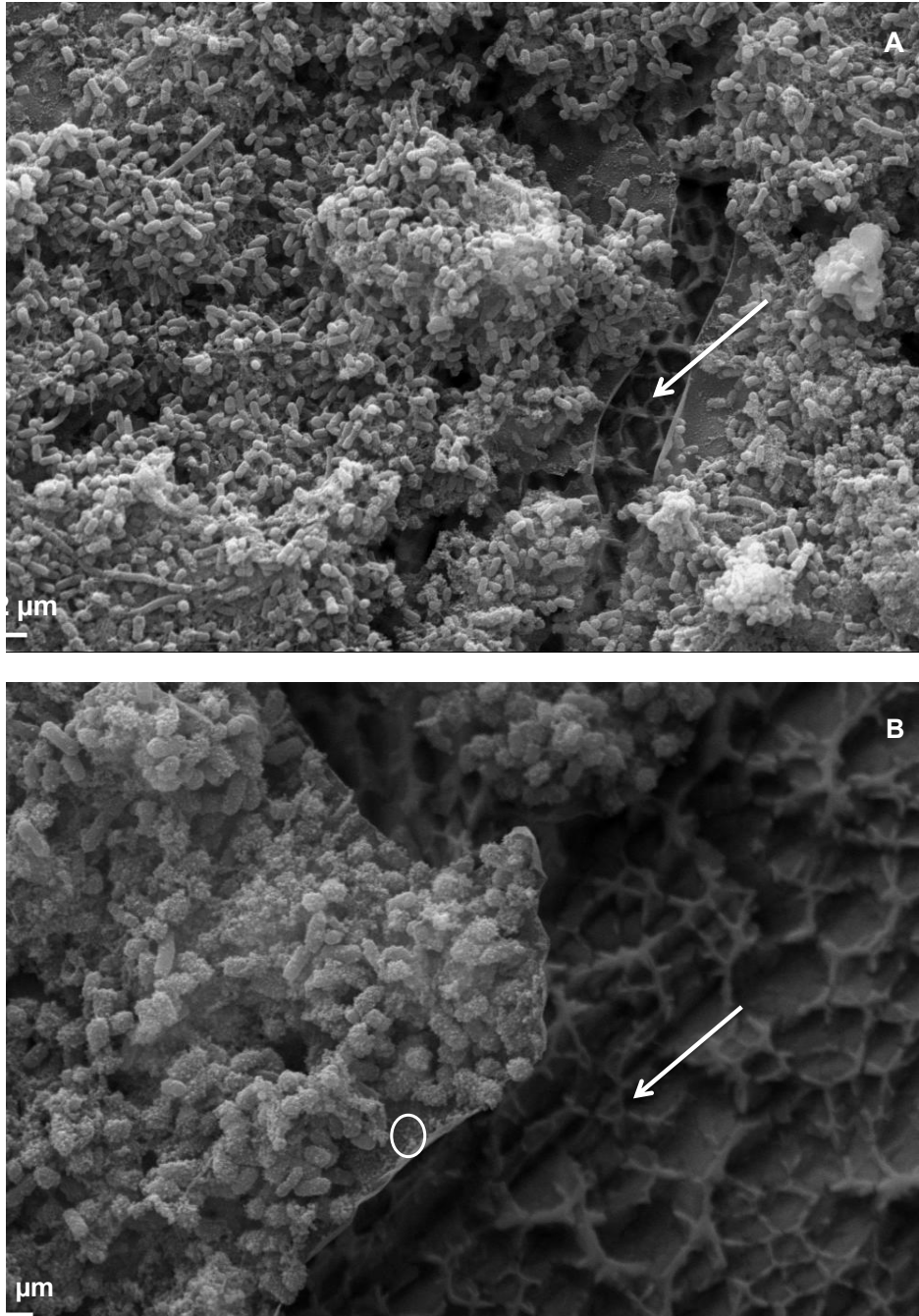


Figura 11.4. Imágenes de la matriz sobre el soporte de acero. Región de entrada del H_2S . En “A” se aprecia el grosor de la biopelícula y los morfotipos que representan la diversidad de células; y en “B” se observan los puntos de anclaje de la capa interna. Los puntos sobre la superficie celular son micro-esperas de S^0 . El azufre depositado sobre la capa se enseña en el círculo y las flechas indican puntos d anclaje de la capa interna en el soporte

La acumulación de sólidos en la matriz se puede visualizar en la figura 11.4. También se enseña una imagen de una muestra deshidratada, no fijada. En aquellas muestras no se detectaron los cristales de azufre. Una de las hipótesis para explicar este hecho es la de que las células no convierten el S^0 en cristales, esta hipótesis se soporta en el trabajo de Pasteris (2001), que siguieron el proceso de cristalización del S^0 en BSO utilizando espectrometría tipo Raman. Estos autores lograron comprobar que los microgránulos de S^0 pasan a la forma cristalina cuando son sometidos a procesos de calentamiento típicos del FISH, como por ejemplo el paso de hibridación, y que incluso la energía del láser puede inducir a re-cristalización. En su trabajo concluyeron que la fusión de micro esferas de S^0 produjo la cristalización. Es probable que lo mismo haya ocurrido en las muestras de FISH utilizadas en el presente estudio.

Los resultados confirmaron la presencia mayoritaria de elementos como el C y el O (del material orgánico); y luego K, Ca, P, Fe, Cr, Cu y Ni, además del S. La participación del S varió de acuerdo con la región del biofiltro, desde el 1,8% (en la región de salida), hasta el 25% (en la región de entrada). La presencia de los metales Fe, Cu, Ni y Cr se explica porque el material de soporte (anillos pall de acero) experimentó un proceso de oxidación gradual desde el cambio de pH, y este material se acumuló junto a la biomasa. A modo de ejemplo, se enseña una imagen de un campo de análisis (fig. 11.5A) donde se observaron los sólidos deshidratados, y una muestra idéntica pero fijada para observación SEM (fig.11.5C). La grafica de EDX del solido seco se enseña en la fig. 11.5B.

El fenómeno de cristalización fue un inconveniente en los análisis de muestras ricas en S^0 . A la hora de preparar las muestras para FISH, la cantidad de azufre en la muestra parece haber facilitado la fusión de las microesferas y luego su restructuración en forma de cristales. En trabajos futuros se debería investigar también si la cristalización daña las células en la muestra. Si fuera así, la aplicación del FISH dependería de la cantidad de S^0 en las muestras. En casos donde los cristales se formen en el interior de las células o, en el material adherido a la superficie, podría producirse una ruptura de la célula que claramente compromete la aplicación.

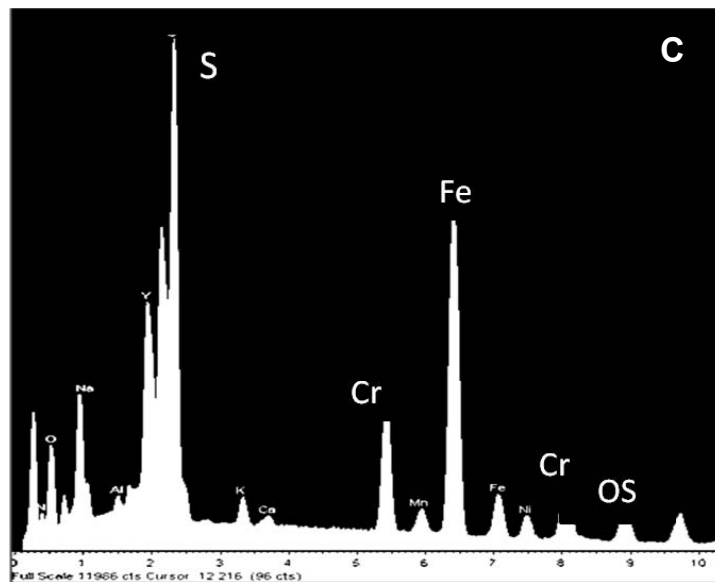
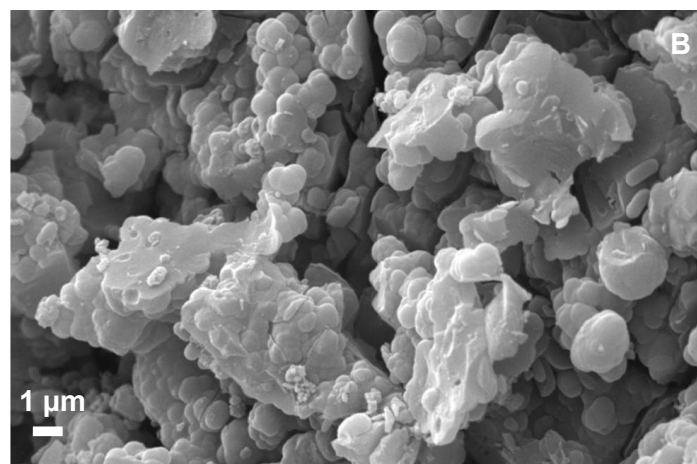
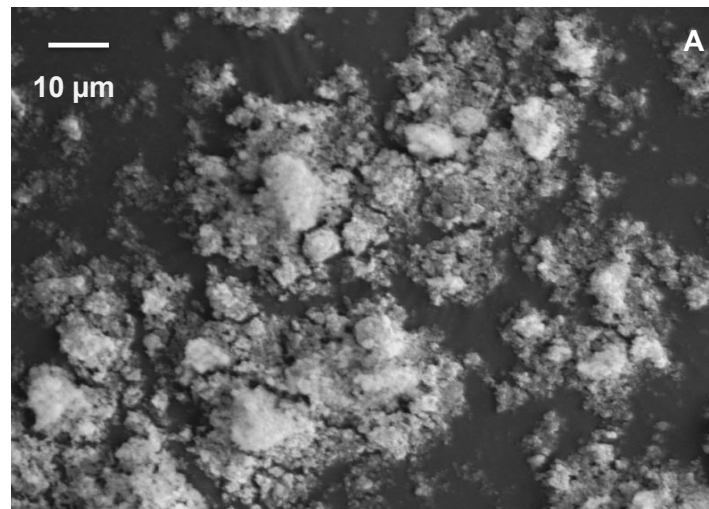


Fig. 11.5. Examen en SEM de los sólidos acumulados en el reactor (F586) (tener en cuenta la diferencia de escala). En A aspecto granular observado en los sólidos deshidratados y en B en una muestra fijada. C, resultado del microanálisis de A

11.3.3. Resultados preliminares de los ensayos con Cy3

La hibridación con Cy3 produjo recuentos de células de perfiles bastante distintos en las muestras tomadas el día 245 y 586. Conforme los datos de la grafica principal de la figura 11.6 la autofluorescencia emitida de las muestras del día 245 no afectó a los recuentos.

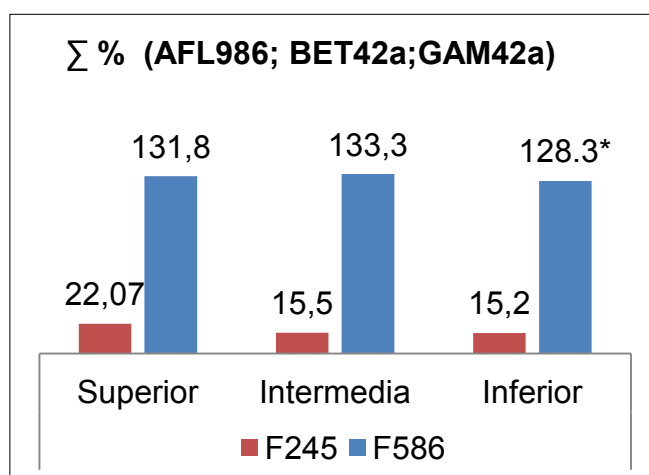


Figura 11.6. Resultados de los análisis con FISH para F245 y F586 hecho con las sondas ALF968, BET42a y GAM42a con Cy3 frente a EUB338mix- Cy5. Los valores representan los sumatorio de las contribuciones., * indica sumatorio de ALF968 y BET42a.

De la gráfica 11.6 se obtiene que los datos de abundancia calculados de las muestras F586 fueron sobrestimados ya que superaron a los 100%. Interesante encontrar sumas de valores también muy similares. Cabe informar que los cálculos para GAM42a no se pudieron ejecutar en ninguna de las muestras preparadas de la región inferior.

La presencia tan marcada de β -proteobacteria reportada por la sonda BET42a en las tres regiones fue un fuerte indicativo de que las señales no se emitirán solo des de las células hibridadas, ya que los datos de *tag-454* habían reportado la eliminación de esta misma clase en 586d. La conclusión que se tomó en el caso particular de la sonda BET42a fue la de que el valor referenciaba autofluorescencia. En base a ello se investigó Aun, es conveniente recordar, que en el caso de la sonda GAM42a el recuento final no incluyó la participación de miembros de *Xanthomonas*, que acercó a 25 % (F 586).

Para e poder hacer se la idea, basta comentar que el incremento del número de píxeles en las muestras de 586 días llegó a tal punto que en algunas ocasiones el programa Matlabno no pudo cumplir las consignas para calcular la proporción

Cy3:Cy5. En estos casos el programa avisaba de la sobrestimación. El efecto también fue reflejado en otros parámetros de cálculos del Matlab. Tanto en los valores mínimos y máximos cuanto en el error experimental se observan discrepancias. Los valores del umbral inferior (valor mínimo) se desplazaron desde un promedio de 5 píxeles hasta el 90 por unidad de área. Los resultados de F586 han puesto de manifiesto del efecto dramático de la autofluorescencia sobre recuentos de células. A pesar de los esfuerzos, en todos los casos no se logró eliminar el ruido por métodos disponibles en la plataforma de adquisición de imágenes. En un intento de apartar el azufre, se probaron distintos métodos tales como la centrifugación diferencial y el sonicado, con los cuales se logró separar la fracción de S^0 dispersa en la solución. Sin embargo los protocolos se mostraron agresivos a las células que se rompieron, probablemente por rocío con el material particulado. Al final, quedó evidente que se debería buscar un método direccionado hacia los marcadores.

11.3.4. Barrido espectral de las muestras y del azufre elemental

El barrido espectral se llevó a cabo con el objetivo de cambiar de fluorocromo. La ventaja evidente de esta opción es que al cambiar la longitud de onda de excitación de pronto se elimina la señal emitida sobre el amarillo (Cy3). Para ello, se llevaron a cabo barridos espectrales de muestras del biofiltro (F245, F468 y F586) y también de una muestra de S^0 (biosulfur), extraído de muestras biológicas con acetona. Los datos de intensidad de fluorescencia generados durante los barridos se utilizaron para construir las gráficas de la fig. 11.7.

Las imágenes espectrales fueron tomadas de un mismo campo alternando el láser y ajustando el rango del barrido. En cada recuadro de la figura se enseña una gráfica con los perfiles de emisión de fluorescencia obtenidos en un determinado λ de excitación para todas las muestras. En el eje horizontal se enseña el rango de emisión y en el eje vertical los valores de intensidad de fluorescencia, en unidades arbitrarias (UA). En el eje Y; a la derecha se representan los valores de intensidad del azufre elemental y, a la izquierda para las muestras biológicas. En el recuadro A se aprecian los resultados de los barridos hechos al 405 nm. En esta gráfica se utilizó una escala distinta para los datos de intensidad de fluorescencia porque alcanzaron valores mucho más elevados en respecto a los demás.

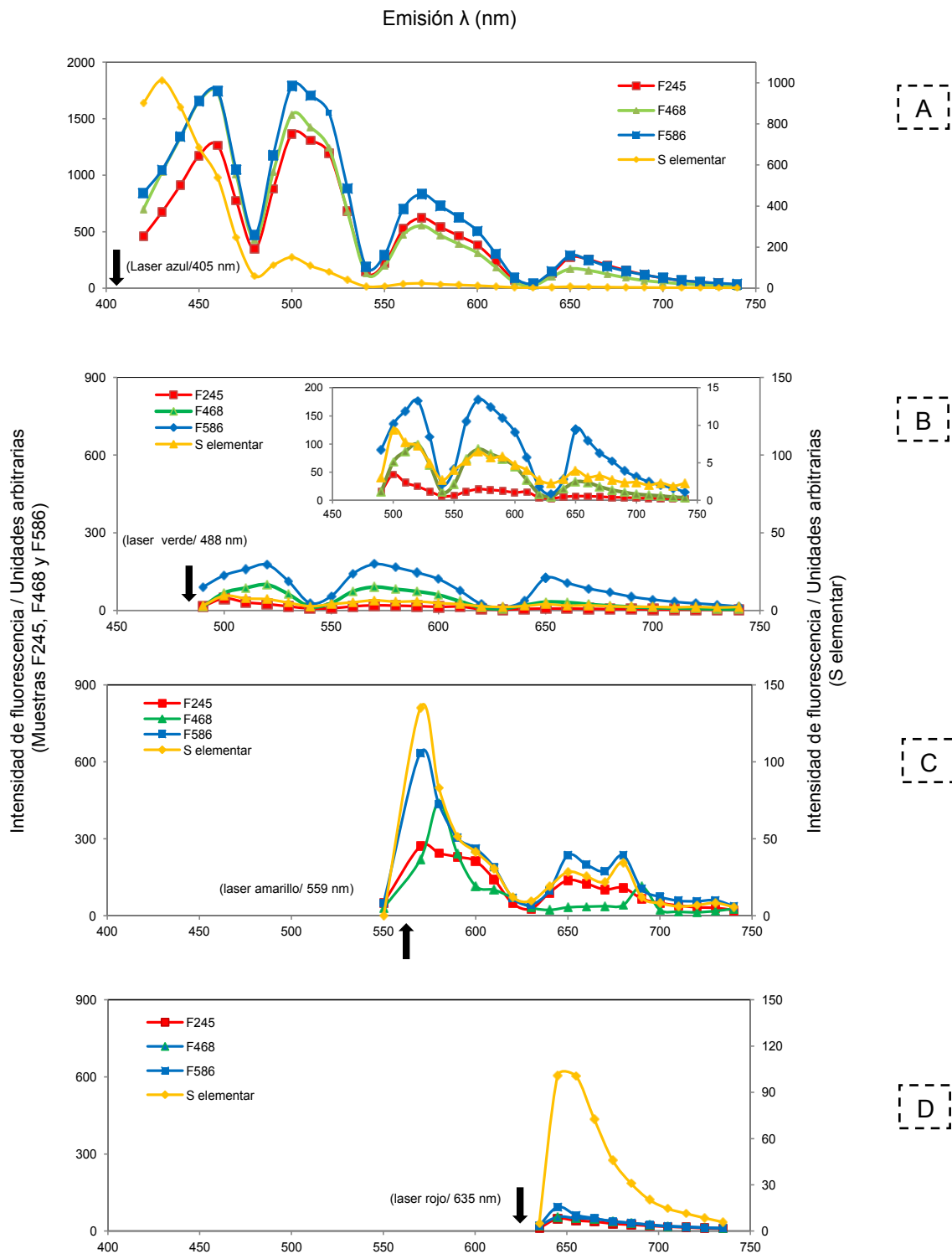


Fig. 11.7. Rango de emisión de autofluorescencia. Eje horizontal enseña el λ y ejes verticales la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias. A la derecha se enseña la intensidad de fluorescencia emitida de las muestras F245, F468, F586; y, a la izquierda para el azufre elemental (S). Las flechas negras indican el λ de excitación máximo para cada láser.

En cada uno de los barridos, tanto de la biomasa cuanto del azufre, se observaron el mismo perfil con tres picos marcados de fluorescencia, que variaron de altura de acuerdo con la intensidad de fluorescencia que se emitió con el láser. Para $\lambda=405$ nm los picos fueron muy altos mientras que en $\lambda=488$ y 635 nm casi no se pudo distinguir. En 488 nm se encontró muy poca señal fluorescente. En el grafica B se presenta una ampliación de la información que permite distinguir el perfil típico, de tres picos. En este barrido la intensidad de fluorescencia del S^0 no superó las 10 UA y en las muestra no superó a las 180 UA.

En la grafica A se observa que la región de emisión del lases azul no fue coincidente con aquella en donde se emitió la fluorescencia. Sin embargo debido a la proximidad el fenómeno de solapado de picos se podría predecir sobre la region inicial del espectro. case coincidiendo sobre el S^0 .

En B, gráfica de λ 405 nm (verde) los picos de fluorescencia fueron coincidentes para las muestras. Interesante notar que el pico emitido des de la muestra no biológica presentó un perfil con forma más típica de barrido espectral, con un único pico pontiagudo lo que se explicó por la estructura más homogénea de las partículas de S^0 , probablemente granos. Se ha descrito que la estructura de las partículas de S^0 influye en los análisis espectrales (Pasteris, 2001). En las muestras de biomasa se habían formado cristales de S^0 probablemente, por el tratamiento de fijación y almacenamiento. Es posible que la variación en la forma de los picos represente las desviaciones del espectro de emisión derivados de la re- estructura de las partículas de S.

En la figura C se presenta el resultado para el lambda amarillo, que coincide con la CY3. Ene sta imagen se vé claramente que el pico de emisión se solapa sobre el rango de emisión de la cianina. La coincidencia de perfiles indicó que la señal fluorescente fue clara y concentrada en dós puntos del espectro. Lo que influenció en la altura y en el formato de las curvas elaboradas de las muestras biológicas fue el montantde de azufre elemental

Por ultimo comentar los resultados de la fig. 11.7D. Al excitar sobre el rojo se logró eliminar la señal emitida de las muestras biológicas, pero no del azufre. La curva del S^0 pareció desplazada hacia la derecha, pero no se comprobó su origen

En la figura 11.8 se reprodujeron algunas imágenes generadas durante el barrido espectral. El λ de excitación se enseña en cada foto. De la izquierda a la derecha y de arriba abajo se enseña la fluorescencia captada con estimulación al láser azul (λ 405 nm); verde (488 nm), amarillo (559 nm) y, rojo (635 nm). De acuerdo con aquellas imágenes el S⁰ emite autofluorescencia en un rango bastante amplio.

Tanto a 405 nm como a 559 nm la señal fue muy fuerte mientras que a 488 nm el background fue muy bajo., lo que es indicado para el cálculo en Matlab. Comparando las fotos se obsevó que cuando se estimuló a 635 nm el ruido fue un poco más fuerte que a 488 nm, pero lo bastante bajo para poder trabajar. Los datos de intensidad fueron calculados como promedios, de la lectura de señal que se captó en dos regiones de interés (ROI).

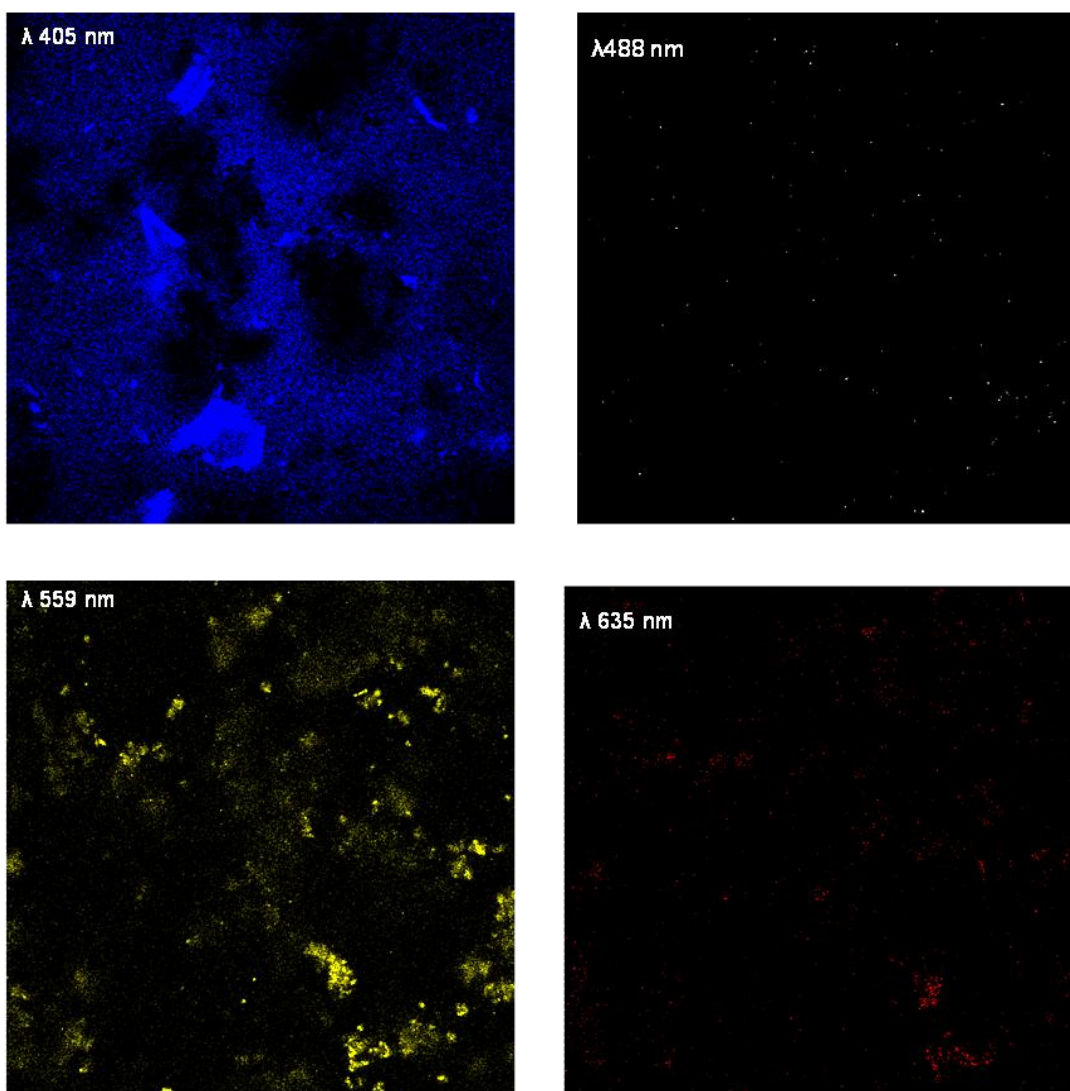


Figura 11.8: Imágenes espectrales de una muestra de azufre elemental en los barridos

Los resultados del barrido con el azufre elemental fueron coherentes con otros trabajos publicados. La autofluorescencia inherente a especies de SOB fue reportada para *Beggiatoa* pero en aquello trabajo no se comprobaron la procedencia de la señal de falso positivo (Ahmad 1999). Pasteris y colaboradores (2001) lograron probar que el S₀ intracelular afecta a los perfiles espectrales. El mismo parece haber pasado en el presente estudio donde la señal fluorescente experimentó cambios de perfil a depender de la estructura del S₀. Fernández (2008) investigaron la interferencia de autofluorescencia en FISH y CARD-FISH en *Thiobacillus* pero no han reportado inconvenientes de falsos positivos. Así como en el caso de F245 del presente estudio aquellos autorepudieron restar con suceso los ruidos de las cuantificaciones.

11.3.5. Elección de fluorocromo

De acuerdo con los resultados presentados, la autofluorescencia que emitió el S⁰ en el verde y en el amarillo, del λ es suficiente para enmascarar las señales específicas de hibridación. Los resultados indicaron que el fluorocromo Cy3 que emiten en 570 nm no se deben utilizar en aplicaciones FISH donde haya azufre elemental. En cambio los barridos al λ 635 nm comprobaron que la Cy5 es adecuada al tipo de muestra. Los perfiles espectrales de los tres fluorocromos Cy3, Cy5 y FAM-6 se pueden apreciar en la figura 11.8. Las gráficas se generaron con datos tomados de la página <http://www.lifetechnologies.com>.

En base a los resultados de los barridos espectrales se llevó a cabo la elección de un nuevo fluorocromo, para substituir la Cy3 en aplicaciones de FISH con Cy5, y doble sonda. En base al coeficiente de extinción y en el perfil espectral el fluorocromo elegido fue la fluoresceína (FAM-6).

11.3.6. Hibridación con FAM-6

La última etapa de este estudio, fue ejecutar una prueba para comprobar la sensibilidad de las sondas con el nuevo fluorocromo FAM-6. Se optó por aplicar las sondas ALF968, BET42a y GAM42a debido a que la abundancia predecible para las células estaba cerca del 10%. Lo interesante de la propuesta fue que la sonda dirigida hacia la clase β serviría como control negativo de la hibridación una vez que con la *tag-454* se comprobó su ausencia en las muestras F586 del biofiltro. De este modo se

obtendría obligatoriamente señal negativa para BET42a y señal positiva para ALF968 y GAM42a, hecho que permitiría la evaluación de cobertura y sensibilidad.

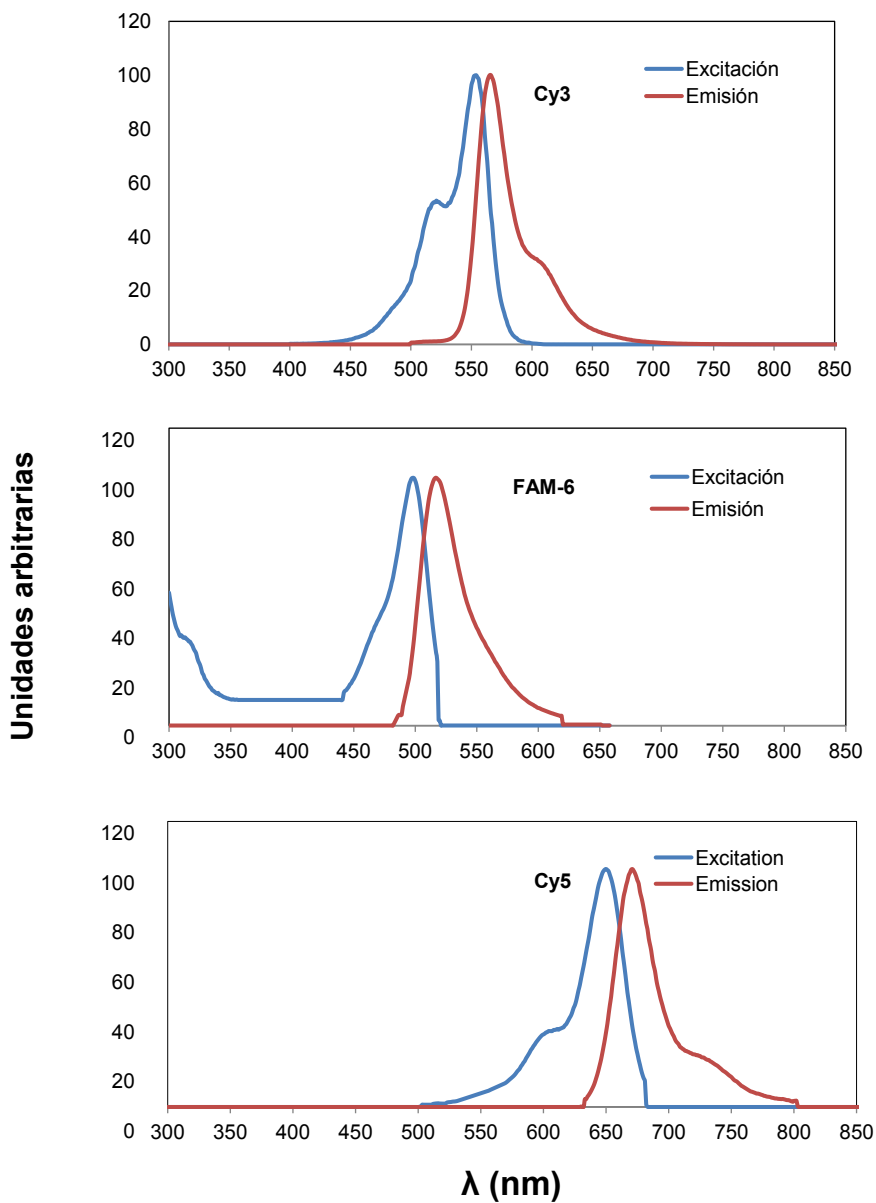


Figura 11.9. Perfiles de longitud de onda para fluorocromos Cy3, FAM-6 y Cy5. En azul espectros de excitación y en rojo, de emisión de fluorescencia

Los resultados de los cálculos de abundancia relativa informaron que el cambio para FAM-6 fue adecuado una vez que los resultados de abundancia relativa para proteobacterias α , β y γ presentaron valores próximos a lo esperado: para ALF968 10%, BET42a 5.6 y para Gama 53.4% (\pm 60%). Sin embargo, los datos aun no coincidieron con las informaciones obtenidas con la *tag-454* a no ser para ALF968.

Las discrepancias en los resultados indicaron que otros problemas estaban asociados. Para BET42a se asumió que la discrepancia fue debida a alguna hibridación inespecífica sobre *Acidithiobacillus*. En el caso de la Sonda GAM42a los problemas de baja afinidad en la hibridación persistieron y parecen haber comprometido el análisis FISH ya que en el recuento de la pirosecuenciación alzó el 80% de abundancia relativa. Debido a los problemas reportados más arriba en el texto esta sonda debería ser utilizada en conjunto con sus otras variantes. Otras sondas se podrían obtener para las gamaproteobacterias diseñadas para hibridar en un conjunto más heterogéneo, de especies. Además, lo indicado sería aplicar sondas más específicas ya que son más sensibles y viables.

11.4. Conclusión

La comparativa de los perfiles de emisión de fluorescencia demostró que la biomasa, independientemente de la fecha de muestreo, tenía un perfil de emisión de fluorescencia que coincidía con el perfil del S⁰. La estrategia de optimización dirigida hacia la sustitución de Cy3 por FAM-6 fue adecuada para las muestras. Sin embargo las sondas utilizadas para clases de proteobacteria no fueron adecuadas para esta comunidad.

11.5. Efectividad del protocolo de optimización del FISH: limitaciones y perspectivas para aplicación en entornos de biofiltración

En procesos biotecnológicos el FISH no ha sido obscurecido por el creciente uso de aproximaciones de alto desempeño para la identificación de las secuencias de ADN y para cuantificación de expresión genética. Los análisis genómicos son más robustos cuando se trata de la identificación pero no lo son para la geografía (relaciones espaciales y temporales). Para ello, FISH ha sido, sin margen a dudas, la herramienta de primera elección; incluso con microorganismos fastidiosos o cuando el ambiente es más complejo o selectivo como en biopelículas. Por estas, entre otras razones, ésta aproximación se consolidó como una herramienta poderosa para estudios de auto ecología microbiana permitiendo el estudio sincrónico de la composición de las comunidades microbianas y de su dinámica (Amann & Fuchs 2008)

Los estudios de microbiología ambiental en biofiltros aun son poco comunes y la aplicación del FISH para identificación y cuantificación de poblaciones ha seguido la tendencia de lo que ocurre en el área de tratamiento de aguas residuales. Todavía, un salto cuantitativo es eminente, visto que las investigaciones empiezan a enseñar tendencia a otro rumbo, con ayuda de micro-sensores y nuevas aproximaciones *in situ*. Es el momento de cambiar el enfoque hacia ecología de paisajes microbianos, entendido que sus características (aspecto de la matriz, distribución de nutrientes, inhibición, control de crecimiento, oxigenación, pH, entre muchos) se aproximan más al del medio ambiente de un biofiltro de gases. Ya se ha visto que las especies cambian de comportamiento cuando se encuentran asociadas en biopelículas y que apenas se puede conjeturar cuando se toma información de identidad. En este sentido se estudiaría muestras que representen el paisaje, la distribución de la diversidad en función a los parámetros micro-ambientales con destaque para la difusión de los gases, la influencia de la distribución de alimento, las rutas metabólicas preferenciales, estudiadas mediante seguimiento de genes expresados (FISH de expresión) de entre tantas posibilidades

Capítulo 12

Conclusiones y perspectivas de trabajos futuros

12. Conclusiones y perspectivas de trabajos futuros

En base a los objetivos planteados para el trabajo de investigación y en las conclusiones ya presentadas a lo largo del documento, se obtuvo el éxito del desarrollo de la metodología para análisis de diversidad y estudio de ecología de la biofiltración, mediante aproximación tag-454, en biofiltros percoladores; así como el proceso de optimización para la técnica de FISH. En función de las particularidades de los trabajos llevados a cabo en la presente tesis, las conclusiones, y las perspectivas de trabajos futuros pertinentes, se resumen en los siguientes subapartados:

12.1. Tag-454 para estudio de la comunidad en biofiltros percoladores

- ✓ Los métodos de preparación de muestras y de extracción de ADN dirigido hacia las biopelículas, permitieron recoger, con alto rendimiento, el material genético de los distintos soportes.
- ✓ Los resultados de clasificación fueron satisfactorios, y se mostraron sensibles al tamaño de las lecturas de secuencias y al grado de similitud
- ✓ La cobertura ofrecida por las bases de datos de secuencia no fue suficiente a la hora de asignar identidad a un montante significativo de secuencias.
- ✓ Los datos de abundancia relativa fueron adecuados para describir el componente biológico, en distintas condiciones medio ambientales.
- ✓ Las discrepancias observadas en los tamaños de las bibliotecas que fueron comparadas no afectaron, para nada, a los estudios de comunidad.
- ✓ La aproximación tag-454 permitió recoger y organizar la información de diversidad para distintos niveles taxonómicos con amplia cobertura y alta resolución.

12.2. Ecología: correlación entre datos de operación y diversidad

- ✓ Se logró describir el comportamiento de la comunidad de los tres biofiltros.
- ✓ Los sistemas presentaron una diversidad sorprendente de bacterias, entre poblaciones especialistas en oxidación aeróbica y anóxica de azufre, y oportunistas (no relacionadas a la biodegradación del contaminante estudiado).
- ✓ BTF-H₂S AER: La acidificación ejerció fuerte presión selectiva. el que promovió cambios significativos en la composición de las SOB representados por la simplificación de la diversidad. La actividad sulfurooxidante, que en condiciones neutras, fue ampliamente distribuída entre diversas poblaciones, pasó a manos de Acidithiobacillus y Acidiphylum con el cambio de pH.
- ✓ BTF-H₂S ANOX: Los régimes de circulación influyeron en la distribución de diversidad y promocionaran la estratificación de la comunidad en función de los gradientes de nitrato y sulfuro de hidrógeno. La actividad desulfurante fue atribuída principalmente a la población de Sedimenticola en todos los ensayos,
- ✓ BTF-NH₃ fue más selectivo, cuando comparado con los otros biofiltros investigados en esta tesis, presentando menor diversidad. Esto fue debido al efecto inhibitorio de amonio y nitrito sobre los AOB y NOB. En cualquiera de los casos, las poblaciones nitrificantes dominantes fueron representadas por Comamonas, Nitrosomonas y Nitrobacter.
- ✓ La competencia entre las especies menos comunes (con abundancia entre el 1 y el 2%) contribuyó para el equilibrio de la comunidad, funcionando como un mecanismo de auto-control de la fracción no especialista.
- ✓ La amplia distribución de diversidad representó un potencial fisiológico auxiliar, que se podría explorar en la actividad de degradación.

12.3. Optimización de protocolo FISH:

- ✓ Demostró que la tag-454 es una herramienta efectiva a la hora de elegir sondas para una aplicación.

- ✓ Los análisis de cobertura y la búsqueda de la especificidad fueron fundamentales a la hora de identificar y predecir problemas de hidridación inespecífica sobre *Acidithiobacillus* y baja especificidad para GAM42a.
- ✓ La autofluorescencia emitida del azufre influyó en los recuentos de Bacteria cuando se aplicó fluorocromo Cy3, que emite sobre el amarillo produciendo resultados supra estimados.
- ✓ El fluorocromo FAM-6 fue utilizado con éxito, permitiendo eliminar la señal de falso positivo.

12.4. Perspectivas de trabajos futuros

La ampliación del conocimiento de la ecología de bioprocesos, y de la biofiltración, depende de la aplicación de herramientas de alto desempeño, como por ejemplo la pirosecuenciación tag-454, para desvelar el componente biológico. En este sentido, el presente estudio abre un abanico de posibilidades para seguir trabajando en el seguimiento de poblaciones en bioreactores. De hecho, desde que el primer trabajo fue publicado, miembros de otros grupos de investigación buscaron ayuda para implementar la tag-454 como herramienta de rutina en sus reactores. De este interés surgieron colaboraciones que terminaron en valiosas publicaciones*. Así que el objetivo de poner a punto una técnica sensible y barata fue alcanzado. Sin embargo, para estudiar la influencia directa de los parámetros de operación sobre la actividad de la microbiota se necesitarían tener el acceso a la estructura interna de la biopelícula durante los ensayos de ajustes de parámetros de operación. Tampoco se encontró referencia a diseño experimental para estudios de la ecología en los artículos revisados. En microbiología, las escalas del ambiente son microscópicas, así como la influencia de los parámetros. Para estudiar la performance, el alcance de las perturbaciones y la resistencia del ecosistema, se necesitaría de métodos menos invasivos para toma de muestras, y métodos de seguimiento de parámetros físico-químicos más efectivos a micro escala. Así que se debería investigar los gradientes por medio de micro-sensores en asociación a FISH de expresión.

Hasta la fecha, los análisis han tenido un abordaje macroscópico y las muestras se tomaron siempre por métodos invasivos, que impidieron investigar la distribución de tareas en la estructura de la biopelícula o relacionar parámetros como composición de la comunidad microbiana. De cara al futuro, se plantea asociar la técnica de

espectroscopía RAMAN para cuantificación del azufre elemental en los biofiltros, asociado al FISH de localización a fin de identificar cambios de actividad sulurooxidante y evitar acumulación de S^0 .

Capítulo 13

Referencias

13. Referencias

- Acosta-Martínez, V. et al., 2010. Pyrosequencing analysis for characterization of soil bacterial populations as affected by an integrated livestock-cotton production system. *Applied Soil Ecology*, 45(1), pp.13–25.
- Acosta-Martínez, V. et al., 2008. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), pp.2762–2770.
- Acuna, M. et al., 1999. Microbiological and kinetic aspects of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. *Biotechnology and bioengineering*, 63(2), pp.175–84.
- Ahmad, A., Barry, J.P., Nelson, D.C., 1999. Phylogenetic affinity of a wide, vacuolate, nitrate-accumulating *Beggiatoa* sp. from Monterey Canyon, California, with *Thioploca* spp. *Applied and environmental microbiology*, 65, pp.270–277.
- Ahn, Y.H., 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*, 41(8), pp.1709–1721.
- Aizpuru, A. et al., 2003. Biofiltration for the Treatment of Complex Mixtures of VOC. *Acta Biotechnol*, 23(2-3), pp.211–226.
- Almenglo, F. et al., 2013. H₂S removal from biogas by a pilot anoxic biotrickling filter . A comparison between co- current and counter-current flow operation mode increasing the loading rate . In I. Malhautier, ed. *Proceedings of the 5th international conference on biotechniquesn for air pollution control and bioenergy*. Paris: Presses des MINES.
- Almengló, F.C., 2014. *Desulfuración de biogás mediante un biofiltro percolador piloto con bacterias nitrato-reductoras sulfoxidantes*. CADIZ.
- Amann, R., Fuchs, B.M., 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature reviews. Microbiology*, 6, pp.339–348.
- Amann, R., Fuchs, B.M., Behrens, S., 2001. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, pp.231–236.
- Amann, R. et al., 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and environmental microbiology*, 56, pp.1919–1925.
- Amann, R.I., Ludwig, W.; Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59, pp.143–169.
- Amend, A.S., Seifert, K., Bruns, T.D., 2010. Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular ecology*, 19(24), pp.5555–65.

- Andres, Y., Dumont, E, Gerente, C., 2009. Characterization techniques of packing material colonization in gas biofiltration processes. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 36, pp.1895–1902.
- Anet, B. et al., 2013. Characterization and Selection of Packing Materials for Biofiltration of Rendering Odourous Emissions. *Water, Air, ; Soil Pollution*, 224(7), p.1622.
- Armeen, A. et al., 2008. Biofilters to treat swine facility air: Part 1. nitrogen mass balance. *Canadian Biosystems Engineering / Le Genie des biosystems au Canada*, 50.
- Aroca, G. et al., 2007. Comparison on the removal of hydrogen sulfide in biotrickling filters inoculated with *Thiobacillus thioparus* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10, pp.0–0.
- Atlas, R.M., Bartha, R., 2002. *Ecología microbiana y Biotecnología ambiental* español. I. Capella, ed., Madrid: Pearson Educación, S.A.
- Baquerizo, G. et al., 2005. A detailed model of a biofilter for ammonia removal: Model parameters analysis and model validation. *Chemical Engineering Journal*, 113, pp.205–214.
- Baquerizo, G. et al., 2009. Long-term ammonia removal in a coconut fiber-packed biofilter: analysis of N fractionation and reactor performance under steady-state and transient conditions. *Water research*, 43(8), pp.2293–301.
- Barcón, T., Alonso-Gutiérrez, J., Omil, F., 2012. Molecular and physiological approaches to understand the ecology of methanol degradation during the biofiltration of air streams. *Chemosphere*, 87(10), pp.1179–85.
- Baspinar, B. et al., 2011. Biogas desulphurization at technical scale by lithotrophic denitrification: Integration of sulphide and nitrogen removal. *Process Biochemistry*, 46(4), pp.916–922.
- Bassin, J.P. et al., 2012. Effect of different operational conditions on biofilm development, nitrification, and nitrifying microbial population in moving-bed biofilm reactors. *Environmental science ; technology*, 46, pp.1546–55.
- Behrens, S. et al., 2003. In situ accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains Bacteria, Archaea, and Eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes. *Applied and environmental microbiology*, 69, pp.1748–1758.
- Benson, R.C. et al., 1979. Cellular autofluorescence--is it due to flavins? *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 27, pp.44–48.
- Bezerra T, Rovira R, Montebello A, Lagostera M, et al., 2013. Metagenomics and metatranscriptomics of a H₂S desulfurizing biotrickling filter, in: Proceedings of the 2013 on 5th IWA Odour and Air Emissions Conference Jointly Held with 10th Conference on Biofiltration for Air Pollution Control, on CD-ROM

- Beristain-Cardoso, R., Gómez, J., Méndez-Pampín, R., 2010. The behavior of nitrifying sludge in presence of sulfur compounds using a floating biofilm reactor. *Bioresource technology*, 101(22), pp.8593–8.
- Bouvier, T., Del Giorgio, P., 2003. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. *FEMS microbiology ecology*, 44(1), pp.3–15.
- Bouvier, T., Del Giorgio, P.A., 2003. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. *FEMS Microbiology Ecology*, 44, pp.3–15.
- Buchholz-Cleven, B.E.E., Rattunde, B.; Straub, K.L., 1997. Screening for Genetic Diversity of Isolates of Anaerobic Fe(II)-oxidizing Bacteria Using DGGE and Whole-cell Hybridization. *Systematic and Applied Microbiology*, 20, pp.301–309.
- Buday, J., Drtil, M. ; Derco, J., 1999. Substrate and Product Inhibition of Nitrification. , 1999(June), pp.379–383.
- Buijsman, E., Maas, H.F.M., Asman, W.A.H., 1987. Anthropogenic NH₃ emissions in europe. *Atmospheric Environment (1967)*, 21, pp.1009–1022.
- Burgess, J.E., Parsons, S.; Stuetz, R.M., 2001. Developments in odour control and waste gas treatment biotechnology: A review. *Biotechnology Advances*, 19, pp.35–63.
- Cabrol, L. et al., 2010. Assessing the bias linked to DNA recovery from biofiltration woodchips for microbial community investigation by fingerprinting. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(3), pp.779–790.
- Cabrol, L., Malhautier, L., Poly, F., Lepeuple, A.S., et al., 2012. Bacterial dynamics in steady-state biofilters: beyond functional stability. *FEMS microbiology ecology*, 79(1), pp.260–71.
- Cabrol, L., Malhautier, L., Poly, F., Roux, X. Le, et al., 2012. Resistance and resilience of removal efficiency and bacterial community structure of gas biofilters exposed to repeated shock loads. *Bioresource technology*, 123, pp.548–57.
- Cabrol, L. et al., 2009. Shock loading in biofilters: impact on biodegradation activity distribution and resilience capacity. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 59(7), pp.1307–14.
- Cabrol, L.; Malhautier, L., 2011. Integrating microbial ecology in bioprocess understanding: the case of gas biofiltration. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(3), pp.837–49.
- Chaiprapat, S. et al., 2011. Removal of hydrogen sulfide by complete aerobic oxidation in acidic biofiltration. *Process Biochemistry*, 46(1), pp.344–352.
- Charnnok, B. et al., 2012. Oxidation of Hydrogen Sulfide in Biogas Using Dissolved Oxygen in the Extreme Acidic Biofiltration Operation. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*.

- Charnnok, B. et al., 2013. Oxidation of hydrogen sulfide in biogas using dissolved oxygen in the extreme acidic biofiltration operation. *Bioresource technology*, 131, pp.492–9.
- Cheng, C.-Y. et al., 2010. Diversity of the bacterial community in a bioreactor during ammonia gas removal. *Bioresource technology*, 101(1), pp.434–7.
- Chiemchaisri, W., Chiemchaisri, C. ; Boonchaiyuttasak, J., 2013. Utilization of stabilized wastes for reducing methane emission from municipal solid waste disposal. *Bioresource technology*, 141, pp.199–204.
- Chung, Y.C., 2007. Evaluation of gas removal and bacterial community diversity in a biofilter developed to treat composting exhaust gases. *Journal of hazardous materials*, 144(1-2), pp.377–85.
- Chung, Y.C., Huang, C., Tseng, C.P., 1996. Operation optimization of Thiobacillus thioparus CH11 biofilter for hydrogen sulfide removal. *Journal of Biotechnology*, 52, pp.31–38.
- Chung, Y.C., Lin, Y.Y., Tseng, C.P., 2005. Removal of high concentration of NH₃ and coexistent H₂S by biological activated carbon (BAC) biotrickling filter. *Bioresource technology*, 96(16), pp.1812–20.
- Clemens, J., Cuhls, C., 2003. Greenhouse gas emissions from mechanical and biological waste treatment of municipal waste. *Environmental technology*, 24, pp.745–754.
- Cohen, Y., 2001. Biofiltration the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource technology*, 77(3), pp.257–74.
- Cox, H., Deshusses, M., 1998. Biological waste air treatment in biotrickling filters. *Current opinion in biotechnology*, 9(3), pp.256–62.
- Cox, H.H.J., Deshusses, M.A., 2001. Biotrickling filters. In C. Kennes ; C. Veiga, M, eds. *Bioreactors for wast gas treatment: Environmental Pollution*. Springer Netherlands, p. (4) 99–131.
- Cydzik-Kwiatkowska, A., 2015. Bacterial structure of aerobic granules is determined by aeration mode and nitrogen load in the reactor cycle. *Bioresource Technology*, 181(1), pp.312–320.
- Daims, H., Nielsen, J.L., et al., 2001. In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and environmental microbiology*, 67, pp.5273–5284.
- Daims, H., Purkhold, U., et al., 2001. Nitrification in sequencing biofilm batch reactors: lessons from molecular approaches. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 43, pp.9–18.
- Daims, H. et al., 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and applied microbiology*, 22, pp.434–444.

- Daims, H.; Wagner, M., 2007. Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(2), pp.237–48.
- Deines, P. et al., 2010. A new coupon design for simultaneous analysis of in situ microbial biofilm formation and community structure in drinking water distribution systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, pp.749–756.
- Delhoménie, M.C.; Heitz, M., 2005. Biofiltration of air: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 25(1), pp.53–72.
- DeLong, E.F. et al., 1999. Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Applied and environmental microbiology*, 65, pp.5554–5563.
- DeLong, E.F., Wickham, G.S. ; Pace, N.R., 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science (New York, N.Y.)*, 243, pp.1360–1363.
- Deng, L. et al., 2009. Process of simultaneous hydrogen sulfide removal from biogas and nitrogen removal from swine wastewater. *Bioresource Technology*, 100, pp.5600–5608.
- Deshusses, M. a., 1997. Biological waste air treatment in biofilters. *Current opinion in biotechnology*, 8, pp.335–339.
- Díaz, I. et al., 2011. Effect of oxygen dosing point and mixing on the microaerobic removal of hydrogen sulphide in sludge digesters. *Bioresource technology*, 102(4), pp.3768–75.
- Ding, Y. et al., 2008. Correlation of reactor performance and bacterial community composition during the removal of trimethylamine in three-stage biofilters. *Biochemical Engineering Journal*, 38(2), pp.248–258.
- Dorado Castaño, A.D., Gabriel B., D., Gamisans N., J., 2013. Biofiltration of WWTP sludge composting emission at contact times of 2 to 8 seconds.
- Douterelo, I., Sharpe, R.L., Boxall, J.B., 2013. Influence of hydraulic regimes on bacterial community structure and composition in an experimental drinking water distribution system. *Water Research*, 47(2), pp.503–516.
- Duan, H., Yan, R. ; Koe, L.C.C., 2005. Investigation on the mechanism of H₂S removal by biological activated carbon in a horizontal biotrickling filter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, pp.350–357.
- Dumont, E. et al., 2014. NH₃ biofiltration of piggery air. *Journal of environmental management*, 140, pp.26–32.
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), pp.2460–2461.
- Edgar, R.C. et al., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27, pp.2194–2200.

- Eickhorst, T., Tippkötter, R., 2008. Detection of microorganisms in undisturbed soil by combining fluorescence in situ hybridization (FISH) and micropedological methods. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, pp.1284–1293.
- Eisen, J. a, 2007. Environmental shotgun sequencing: its potential and challenges for studying the hidden world of microbes. *PLoS biology*, 5(3), p.e82.
- Estrada, J.M. et al., 2012. Influence of gaseous VOC concentration on the diversity and biodegradation performance of microbial communities. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(9), pp.1477–88.
- Feng, Q. et al., 2012. Effects of packing rates of cubic-shaped polyurethane foam carriers on the microbial community and the removal of organics and nitrogen in moving bed biofilm reactors. *Bioresource technology*, 117, pp.201–7.
- Fernández, M. et al., 2014. Biogas biodesulfurization in an anoxic biotrickling filter packed with open-pore polyurethane foam. *Journal of hazardous materials*, 264, pp.529–35.
- Fernández, M. et al., 2013. Hydrogen sulphide removal from biogas by an anoxic biotrickling filter packed with Pall rings. *Chemical Engineering Journal*, 225, pp.456–463.
- Fernández, N. et al., 2008. Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge. *Chemosphere*, 70(3), pp.462–74.
- Finegold, S.M. et al., 2010. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*, 16(4), pp.444–453.
- Fortuny, M. et al., 2008. Biological sweetening of energy gases mimics in biotrickling filters. *Chemosphere*, 71(1), pp.10–7.
- Fortuny, M. et al., 2011. Operational aspects of the desulfurization process of energy gases mimics in biotrickling filters. *Water research*, 45(17), pp.5665–74.
- Fortuny, M. et al., 2010. Oxidation of biologically produced elemental sulfur under neutrophilic conditions. *Journal of Chemical Technology ; Biotechnology*, 85(3), pp.378–386.
- Friedrich, C.G. et al., 2005. Prokaryotic sulfur oxidation. *Current opinion in microbiology*, 8(3), pp.253–9.
- Friedrich, U. et al., 2002. High bacterial diversity of a waste gas-degrading community in an industrial biofilter as shown by a 16S rDNA clone library. *Environmental microbiology*, 4(11), pp.721–34.
- Friedrich, U. et al., 2003. Microbial community and physicochemical analysis of an industrial waste gas biofilter and design of 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Environmental microbiology*, 5(3), pp.183–201.

- Gabriel, D. et al., 2007. Characterisation and performance of coconut fibre as packing material in the removal of ammonia in gas-phase biofilters. *Biosystems Engineering*, 97(4), pp.481–490.
- Gabriel, D., Deshusses, M.A., 2003. Performance of a full-scale biotrickling filter treating H₂S at a gas contact time of 1.6 to 2.2 seconds. *Environmental Progress*, 22, pp.111–118.
- Gevertz, D. et al., 2000. Isolation and characterization of strains CVO and FWKO B, two novel nitrate-reducing, sulfide-oxidizing bacteria isolated from oil field brine. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), pp.2491–2501.
- Ghosh, W., Dam, B., 2009. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *FEMS microbiology reviews*, 33(6), pp.999–1043.
- Gieseke, A. et al., 2005. In situ substrate conversion and assimilation by nitrifying bacteria in a model biofilm. *Environmental microbiology*, 7(9), pp.1392–404.
- Gieseke, A. et al., 2003. Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm. *Environmental microbiology*, 5, pp.355–369.
- Giovannoni, S.J. et al., 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of bacteriology*, 170, pp.720–726.
- Gobet, A. et al., 2012. Diversity and dynamics of rare and of resident bacterial populations in coastal sands. *The ISME journal*, 6(3), pp.542–53.
- Gontcharova, V. et al., 2010. A comparison of bacterial composition in diabetic ulcers and contralateral intact skin. *The open microbiology journal*, 4, pp.8–19.
- Gostelow, P., Parsons, S.A., Stuetz, R.M., 2001. Odour measurements for sewage treatment works. *Water Research*, 35(3), pp.579–597.
- Gregor, J., Marlek, B., 2005. A simple in vivo fluorescence method for the selective detection and quantification of freshwater cyanobacteria and eukaryotic algae. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 33, pp.142–148.
- Guo, F., Zhang, T., 2012. Profiling bulking and foaming bacteria in activated sludge by high throughput sequencing. *Water research*, 46(8), pp.2772–82.
- Haaijer, S.C.M. et al., 2006. Evidence for the involvement of betaproteobacterial Thiobacilli in the nitrate-dependent oxidation of iron sulfide minerals. *FEMS Microbiology Ecology*, 58, pp.439–448.
- Haas, B.J. et al., 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome research*, 21(3), pp.494–504.
- Han, D.W., Chang, J.S., Kim, D.J., 2003. Nitrifying microbial community analysis of nitrite accumulating biofilm reactor by fluorescence in situ hybridization. *Water*

science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research, 47, pp.97–104.

- Hartsock, A., Shapleigh, J.P., 2010. Identification, functional studies, and genomic comparisons of new members of the NnrR regulon in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, 192, pp.903–911.
- Haug, R.T., 1993. The practical handbook of compost engineering. *Lewis publishers*, p.717.
- Ho, K.L. et al., 2008. Microbial populations analysis and field application of biofilter for the removal of volatile-sulfur compounds from swine wastewater treatment system. *Journal of Hazardous Materials*, 152, pp.580–588.
- Ho, K.L., Chung, Y.C., Lin, Y.H., et al., 2008. Microbial populations analysis and field application of biofilter for the removal of volatile-sulfur compounds from swine wastewater treatment system. *Journal of hazardous materials*, 152(2), pp.580–8.
- Ho, K.L., Chung, Y.C. ; Tseng, C.P., 2008. Continuous deodorization and bacterial community analysis of a biofilter treating nitrogen-containing gases from swine waste storage pits. *Bioresource technology*, 99(8), pp.2757–65.
- Hollister, E.B. et al., 2010. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. *The ISME journal*, 4(6), pp.829–838.
- Hort, C. et al., 2009. Evaluation of sewage sludge and yard waste compost as a biofilter media for the removal of ammonia and volatile organic sulfur compounds (VOSCs). *Chemical Engineering Journal*, 152(1), pp.44–53.
- Hu, M. et al., 2012. Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis. *Bioresource technology*, 117, pp.72–9.
- Huse, S.M. et al., 2007. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome biology*, 8(7), p.R143.
- Huse, S.M. et al., 2008. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS genetics*, 4(11), p.e1000255.
- Ibarbalz, F.M., Figuerola, E.L.M. ; Erijman, L., 2013. Industrial activated sludge exhibit unique bacterial community composition at high taxonomic ranks. *Water research*, 47(11), pp.3854–64.
- Isanta, E. et al., 2015. Microbial community shifts on an anammox reactor after a temperature shock using 454-pyrosequencing analysis. *Bioresource Technology*, 181, pp.207–213.
- Ivnitsky, H. et al., 2007. Bacterial community composition and structure of biofilms developing on nanofiltration membranes applied to wastewater treatment. *Water research*, 41(17), pp.3924–35.

- Jaber, M. Ben, Anet, B., et al., 2014. Impact of nutrients supply and pH changes on the elimination of hydrogen sulfide , dimethyl disulfide and ethanethiol by biofiltration . To cite this version : *Chemical Engineering Journal*, 258, pp.420–426.
- Jang, A. et al., 2003. Effect of dissolved oxygen concentration on the biofilm and in situ analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) and microelectrodes. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 47, pp.49–57.
- Jiang, F. et al., 2009. A biofilm model for prediction of pollutant transformation in sewers. *Water research*, 43(13), pp.3187–98.
- Jiang, X., Tay, J.H., 2010. Microbial community structures in a horizontal biotrickling filter degrading H₂S and NH₃. *Bioresource technology*, 101(6), pp.1635–41.
- Jubany, I. et al., 2009. Automated thresholding method (ATM) for biomass fraction determination using FISH and confocal microscopy. *Journal of Chemical Technology ; Biotechnology*, 84(8), pp.1140–1145.
- Jubany, I., 2007. *OPERATION , MODELING AND AUTOMATIC CONTROL OF COMPLETE AND PARTIAL NITRIFICATION OF HIGHLY*, Barcelona.
- Juhler, S. et al., 2009. Distribution and rate of microbial processes in an ammonia-loaded air filter biofilm. *Applied and environmental microbiology*, 75(11), pp.3705–13.
- Jun, Y. ; Wenfeng, X., 2009. Ammonia biofiltration and community analysis of ammonia-oxidizing bacteria in biofilters. *Bioresource Technology*, 100(17), pp.3869–3876.
- Kawase, Y. et al., 2014. Improvement of biodegradation in compact co-current biotrickling filter by high recycle liquid flow rate: Performance and biodegradation kinetics of ammonia removal. *Process Biochemistry*, 49(10), pp.1733–1740.
- Von Keitz, V. et al., 1999. Characterization of microbial communities of biofilters by phospholipid fatty acid analysis and rRNA targeted oligonucleotide probes. *Systematic and applied microbiology*, 22(4), pp.626–34.
- Kelly, D.P. et al., 1997. Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71(1-2), pp.95–107.
- Kelly, D.P. ; Wood, A.P., 2000. Reclassification of some species of Thiobacillus Acidithiobacillus gen . nov ., Halothiobacillus. , pp.511–516.
- Kepner, R.L. ; Pratt, J.R., 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological reviews*, 58, pp.603–615.
- Van Kessel, M. a. H.J. et al., 2010. Biodiversity of N-cycle bacteria in nitrogen removing moving bed biofilters for freshwater recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*, 306(1-4), pp.177–184.

- Khammar, N. et al., 2004. Evaluation of dispersion methods for enumeration of microorganisms from peat and activated carbon biofilters treating volatile organic compounds. *Chemosphere*, 54, pp.243–254.
- Khammar, N. et al., 2005. Link between spatial structure of microbial communities and degradation of a complex mixture of volatile organic compounds in peat biofilters. *Journal of Applied Microbiology*, 98(2), pp.476–490.
- Kim, D.J. ; Kim, S.H., 2006. Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitrification reactor systems and their kinetic characteristics. *Water Research*, 40(5), pp.887–894.
- Kim, D.J., Lee, D.I. ; Keller, J., 2006. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresource technology*, 97(3), pp.459–68.
- Kim, S. ; Deshusses, M. a., 2005. Understanding the limits of H₂S degrading biotrickling filters using a differential biotrickling filter. *Chemical Engineering Journal*, 113(2-3), pp.119–126.
- Kindaichi, T., Ito, T., Okabe, S., 2004. Ecophysiological Interaction between Nitrifying Bacteria and Heterotrophic Bacteria in Autotrophic Nitrifying Biofilms as Determined by Microautoradiography-Fluorescence In Situ Hybridization Ecophysiological Interaction between Nitrifying Bacteria and He.
- Kleerebezem, R. , Mendez, R., 2002. Autotrophic denitrification for combined hydrogen sulfide removal from biogas and post-denitrification. *Water Science and Technology*, 45, pp.349–356.
- Konopka, A., 2009. What is microbial community ecology? *The ISME journal*, 3(11), pp.1223–30.
- Koops, H.P., Pommerening-Röser, A., 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*, 37(1), pp.1–9.
- Krishnakumar, B., Manilal, V.B., 1999. Bacterial oxidation of sulphide under denitrifying conditions. , (1987), pp.437–440.
- Kristiansen, A., Pedersen, K.H., et al., 2011. Bacterial community structure of a full-scale biofilter treating pig house exhaust air. *Systematic and applied microbiology*, 34(5), pp.344–52.
- Kristiansen, A., Lindholm, S., et al., 2011. Butyric acid- and dimethyl disulfide-assimilating microorganisms in a biofilter treating air emissions from a livestock facility. *Applied and environmental microbiology*, 77(24), pp.8595–604.
- Kuever, J.F.A.R., Widdel, F., 2006. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, the Proteobacteria. Part C, the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, the Proteobacteria. Part C, the Alpha, Beta, Delta, and Epsilonproteobacteria*. pp. 922–1143.

- Kumar, G.L., Zucker, R.M., 2013. *Chapter 13, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Imaging* 5 th. G. L. Kumar , L. Rudbeck, eds., Carpinteria/California: Dako North America.
- Kumar, Y. et al., 2005. Graphical representation of ribosomal RNA probe accessibility data using ARB software package. *BMC bioinformatics*, 6, p.61.
- Lebrero, R. et al., 2011. A comparative assessment of biofiltration and activated sludge diffusion for odour abatement. *Journal of hazardous materials*, 190(1-3), pp.622–30.
- Lebrero, R. et al., 2013. Abatement of odorant compounds in one- and two-phase biotrickling filters under steady and transient conditions. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(10), pp.4627–38.
- Lebrero, R. et al., 2010. H₂S and VOCs abatement robustness in biofilters and air diffusion bioreactors: A comparative study. *Water research*, 44(13), pp.3905–14.
- Lebrero, R. et al., 2012. Odor abatement in biotrickling filters: effect of the EBRT on methyl mercaptan and hydrophobic VOCs removal. *Bioresource technology*, 109, pp.38–45.
- Lee, D.J., Wong, B.T. ; Aday, S.S., 2014. *Azoarcus taiwanensis* sp nov, a denitrifying species isolated from a hot spring. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, pp.1301–1307.
- Lee, E.Y. et al., 2006. Removal of hydrogen sulfide by sulfate-resistant *Acidithiobacillus thiooxidans* AZ11. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(4), pp.309–14.
- Lee, E.Y., Cho, K.-S. ; Ryu, H.W., 2005. Simultaneous removal of H₂S and NH₃ in biofilter inoculated with *Acidithiobacillus thiooxidans* TAS. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(6), pp.611–5.
- Lee, H. et al., 2008. Microbial structure and community of RBC biofilm removing nitrate and phosphorus from domestic wastewater. *Journal of microbiology and biotechnology*, 18, pp.1459–1469.
- Lenk, S., 2006. Diversity and Abundance of Sulfur-Oxidizing Bacteria in Wadden Sea Sediments Revealed by DsrAB Phylogeny and dsrAB -Targeted Real-Time PCR.
- Levsky, J.M. ; Singer, R.H., 2003. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of cell science*, 116, pp.2833–2838.
- Lew, S. et al., 2010. Selected fluorescent techniques for identification of the physiological state of individual water and soil bacterial cells - review. *Folia microbiologica*, 55(2), pp.107–18.
- Li, C. ; Moe, W.M., 2004. Assessment of microbial populations in methyl ethyl ketone degrading biofilters by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(4), pp.568–75.

- Li, J. et al., 2012. Performances of two biotrickling filters in treating H₂S-containing waste gases and analysis of corresponding bacterial communities by pyrosequencing. *Applied microbiology and biotechnology*, 95(6), pp.1633–41.
- Liao, R. et al., 2014. Performance and microbial diversity of an expanded granular sludge bed reactor for high sulfate and nitrate waste brine treatment. *Journal of environmental sciences (China)*, 26(4), pp.717–25.
- Lin, W.C., Chen, Y.P., Tseng, C.-P., 2013. Pilot-scale chemical-biological system for efficient H₂S removal from biogas. *Bioresource technology*, 135, pp.283–91.
- López, L.R. et al., 2015. Influence of trickling liquid velocity and flow pattern in the improvement of oxygen transport in aerobic biotrickling filters for biogas desulfurization. *Journal of Chemical Technology ; Biotechnology*, (February), p.n/a–n/a.
- Loy, A. et al., 2007. probeBase--an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic acids research*, 35, pp.D800–D804.
- Lu, H., Chandran, K., Stensel, D., 2014. Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. *Water Research*, 64, pp.237–254.
- Lydmark, P. et al., 2006. Vertical distribution of nitrifying populations in bacterial biofilms from a full-scale nitrifying trickling filter. *Environmental microbiology*, 8(11), pp.2036–49.
- Maclsaac, E.A., Stockner, J.G., 1993. Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence microscopy. In *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. pp. 187–198.
- Madigan, M.T. et al., 2010. *Brock Biology of Microorganisms* 13th ed., San Francisco: Benjamin Cummings.
- Maestre, J.P. et al., 2010. Bacterial community analysis of a gas-phase biotrickling filter for biogas mimics desulfurization through the rRNA approach. *Chemosphere*, 80(8), pp.872–80.
- Maestre, J.P., 2009. *CHARACTERIZATION AND MONITORING OF GAS-PHASE BIOREACTORS , ACCESSING THE BLACK BOX THROUGH*, Barcelona.
- Maia, G.D.N. et al., 2012. Ammonia biofiltration and nitrous oxide generation during the start-up of gas-phase compost biofilters. *Atmospheric Environment*, 46, pp.659–664.
- Malhautier, L. et al., 2003. Biological treatment process of air loaded with an ammonia and hydrogen sulfide mixture. *Chemosphere*, 50(1), pp.145–53.
- Malic, S. et al., 2009. Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization (PNA FISH). *Microbiology*, 155, pp.2603–2611.

- Manz, W. et al., 1992. Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. *Systematic and Applied Microbiology*, 15, pp.593–600.
- Manz, W. et al., 2000. Widefield deconvolution epifluorescence microscopy combined with fluorescence in situ hybridization reveals the spatial arrangement of bacteria in sponge tissue. *Journal of Microbiological Methods*, 40, pp.125–134.
- Mas, J., Maestre, J.P., 2008. Bacterial community diversity in a lab- scale biotrickling filter treating high loads of H₂S, as shown by a 16S rDNA clone library. , (July).
- McNevin, D., Barford, J., 2000. Biofiltration as an odour abatement strategy. *Biochemical engineering journal*, 5(3), pp.231–242.
- McWilliam, H. et al., 2013. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research*, 41.
- Meyer, B., Imhoff, J.F., Kuever, J., 2007. Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the soxB gene among sulfur-oxidizing bacteria - evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system. *Environmental microbiology*, 9(12), pp.2957–77.
- Montebello, A.M., 2013. *AEROBIC BIOTRICKLING FILTRATION FOR Andrea Monzón Montebello*. Barcelona.
- Montebello, A.M. et al., 2010. Monitoring and performance of a desulphurizing biotrickling filter with an integrated continuous gas/liquid flow analyser. *Chemical Engineering Journal*, 165(2), pp.500–507.
- Montebello, A.M. et al., 2013. Operational aspects, pH transition and microbial shifts of a H₂S desulfurizing biotrickling filter with random packing material. *Chemosphere*, 93, pp.2675–2682.
- Montebello, A.M. et al., 2012. Simultaneous methylmercaptan and hydrogen sulfide removal in the desulfurization of biogas in aerobic and anoxic biotrickling filters. *Chemical Engineering Journal*, 200-202, pp.237–246.
- Mora, M. et al., 2014. Examining thiosulfate-driven autotrophic denitrification through respirometry. *Chemosphere*, 113, pp.1–8.
- Mora, M.G., 2014. *CHARACTERIZATION OF S-OXIDIZING BIOMASS THROUGH RESPIROMETRIC TECHNIQUES UNDER ANOXIC AND AEROBIC CONDITIONS*. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Mori, K. et al., 2011. Thioprofundum hispidum sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing gammaproteobacterium isolated from the hydrothermal field on Suiyo Seamount, and proposal of Thioalkalispiraceae fam. nov. in the order Chromatiales. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 61, pp.2412–2418.
- Moter, A. Göbel, U.B., 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 41, pp.85–112.

- Moussavi, G., Khavanin, A., Sharifi, A., 2011. Ammonia removal from a waste air stream using a biotrickling filter packed with polyurethane foam through the SND process. *Bioresource technology*, 102(3), pp.2517–22.
- Munz, G. et al., 2008. Process efficiency and microbial monitoring in MBR (membrane bioreactor) and CASP (conventional activated sludge process) treatment of tannery wastewater. *Bioresource technology*, 99(18), pp.8559–64.
- Nanda, S., Sarangi, P.K., Abraham, J., 2012. Microbial biofiltration technology for odour abatement: An introductory review. *Journal of Soil Science and Environmental Management*, 3(February), pp.28–35.
- Narasingarao, P., Häggblom, M.M., 2006. *Sedimenticola selenatireducens*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic selenate-respiring bacterium isolated from estuarine sediment. *Systematic and applied microbiology*, 29(5), pp.382–8.
- Nelson, M.C. et al., 2012. Shifts in microbial community structure of granular and liquid biomass in response to changes to infeed and digester design in anaerobic digesters receiving food-processing wastes. *Bioresource technology*, 107, pp.135–43.
- Ni, B.-J., Rusalleda, M. ; Smets, B.F., 2012. Evaluation on the microbial interactions of anaerobic ammonium oxidizers and heterotrophs in Anammox biofilm. *Water Research*, 46, pp.4645–4652.
- Nielsen, P.H., Aquino de Muro, M. ; Nielsen, J.L., 2000. Studies on the in situ physiology of *Thiothrix* spp. present in activated sludge. *Environmental Microbiology*, 2, pp.389–398.
- Nielsen, P.H., Lemmer, H., Daims, H., 2009. *FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment*,
- Nosyk, O. et al., 2008. A standardized pre-treatment method of biofilm flocs for fluorescence microscopic characterization. *Journal of microbiological methods*, 75(3), pp.449–56.
- Oh, H.M. et al., 2011. Complete genome sequence of strain HTCC2170, a novel member of the genus *Maribacter* in the family Flavobacteriaceae. *Journal of Bacteriology*, 193, pp.303–304.
- Okabe, S. et al., 2005. Succession of Internal Sulfur Cycles and Sulfur-Oxidizing Bacterial Communities in Microaerophilic Wastewater Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(5), pp.2520–2529.
- Ology, P.A.T.H., 2013. *Education Guide Immunohistochemical Staining Methods Fifth Edition* 5 th. G. L. Kumar ; Lars Rudber, eds., Carpinteria/California: Dako North America.
- Omri, I. et al., 2011. H₂S gas biological removal efficiency and bacterial community diversity in biofilter treating wastewater odor. *Bioresource technology*, 102(22), pp.10202–9.

- Ottosen, L., et al., 2011. Regulation of ammonia oxidation in biotrickling airfilters with high ammonium load. *Chemical Engineering Journal*, 167(1), pp.198–205.
- Padhi, S.K., Gokhale, S., 2014. Biological oxidation of gaseous VOCs – rotating biological contactor a promising and eco-friendly technique. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(4), pp.2085–2102.
- Pagans, E.L., Font, X., Sánchez, A., 2005. Biofiltration for ammonia removal from composting exhaust gases. *Chemical Engineering Journal*, 113, pp.105–110.
- Park, S. et al., 2011. Microbial community structure and dynamics in a mixotrophic nitrogen removal process using recycled spent caustic under different loading conditions. *Bioresource technology*, 102(15), pp.7265–71.
- Park, S. ; Bae, W., 2009. Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid. *Process Biochemistry*, 44(6), pp.631–640.
- Pasteris, J.D., Freeman, J.J., et al., 2001. Raman spectroscopic and laser scanning confocal microscopic analysis of sulfur in living sulfur-precipitating marine bacteria. *Chemical Geology*, 180, pp.3–18.
- Patureau, D., Bernet, N., Moletta, R., 1996. Study of the denitrifying enzymatic system of *Comamonas* sp. strain SGLY2 under various aeration conditions with a particular view on nitrate and nitrite reductases. *Current Microbiology*, 32(1), pp.25–32.
- Pavlekovic, M. et al., 2009. Optimization of three FISH procedures for in situ detection of anaerobic ammonium oxidizing bacteria in biological wastewater treatment. *Journal of Microbiological Methods*, 78, pp.119–126.
- Peng, Y., Zhu, G., 2006. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied microbiology and biotechnology*, 73, pp.15–26.
- Pérez, M.C. et al., 2012. Evolution of Bacterial Community in a Full-scale Biotrickling Filter by Fluorescence in Situ Hybridization (FISH). *Procedia Engineering*, 42(August), pp.666–671.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., Amann, R., 2004. Sensitive multi-color fluorescence in situ hybridization for the identification of environmental microorganisms. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3, pp.711–726.
- Pessi, I.S. et al., 2012. Functional Diversity of Microbial Communities in Soils in the Vicinity of Wanda Glacier, Antarctic Peninsula. *Microbes and Environments*, 27(2), pp.200–203.
- Petrosino, J.F. et al., 2009. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical chemistry*, 55(5), pp.856–66.
- Pianka, E., 1970. On r-and K-selection. *American naturalist*, 104, pp.592–597.

- Pruesse, E. et al., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic acids research*, 35, pp.7188–7196.
- Qin, Q.L. et al., 2010. The complete genome of *Zunongwangia profunda* SM-A87 reveals its adaptation to the deep-sea environment and ecological role in sedimentary organic nitrogen degradation. *BMC genomics*, 11, p.247.
- Quast, C. et al., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41, pp.D590–6.
- Quince, C. et al., 2009. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature methods*, 6(9), pp.639–41.
- Ralebitso-Senior, T.K. et al., 2012. Waste gas biofiltration: advances and limitations of current approaches in microbiology. *Environmental science ; technology*, 46(16), pp.8542–73.
- Ramachandran, V., 2014. Biofiltration for waste gas treatment – a review. , 1(2).
- Ramírez, M. et al., 2011. Biofiltration of reduced sulphur compounds and community analysis of sulphur-oxidizing bacteria. *Bioresource technology*, 102(5), pp.4047–53.
- Ramírez, M. et al., 2009. Removal of ammonia by immobilized *Nitrosomonas europaea* in a biotrickling filter packed with polyurethane foam. *Chemosphere*, 74(10), pp.1385–1390.
- Ramírez-Sáenz, D. et al., 2009. H₂S and volatile fatty acids elimination by biofiltration: clean-up process for biogas potential use. *Journal of hazardous materials*, 163(2-3), pp.1272–1281.
- Reinert, K.C. et al., 2007. Flavoprotein autofluorescence imaging in the cerebellar cortex in vivo. In *Journal of Neuroscience Research*. pp. 3221–3232.
- Rene, E.R., Veiga, M.C., Kennes, C., 2013. *Air Pollution Prevention and Control: Bioreactors and Bioenergy* 1st ed. C. K. and M. C. Veiga, ed., Chichester, UK: John Wiley , Sons, Ltd.
- Rodriguez, G. et al., 2013. Biotrickling filters for biogas sweetening: Oxygen transfer improvement for a reliable operation. *Process Safety and Environmental Protection*.
- Roesch, L.F.W. et al., 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME journal*, 1(4), pp.283–90.
- Roeselers, G. et al., 2010. Complete genome sequence of *Candidatus Ruthia magnifica*. *Standards in genomic sciences*, 3, pp.163–173.
- Roosta, A. et al., 2011. Mathematical modeling of biological sulfide removal in a fed batch bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 58-59, pp.50–56.

- Rovira, R., 2012. *CARACTERITZACIÓ DE L'OPERACIÓ I ESTUDI METATRANSCRIPTÒMIC D'UN BIOREACTOR DE DESSULFURACIÓ D'ALTA CÀRREGA D'H₂S*. Barcelona.
- Russ, L. et al., 2014. Interactions between anaerobic ammonium and sulfur-oxidizing bacteria in a laboratory scale model system. *Environmental microbiology*, 31.
- Sakuma, T. et al., 2008. Removal of ammonia from contaminated air in a biotrickling filter - denitrifying bioreactor combination system. *Water research*, 42(17), pp.4507–13.
- Saleh-Lakha, S. et al., 2009. Effect of pH and temperature on denitrification gene expression and activity in *Pseudomonas mandelii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, pp.3903–3911.
- Satoh, H. et al., 2003. Evaluation of the impact of bioaugmentation and biostimulation by in situ hybridization and microelectrode. *Water Research*, 37, pp.2206–2216.
- Sayavedra-soto, D.J., Hommes, N.G., 2002. Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. , pp.250–255.
- Schramm, A. et al., 2002. Fluorescence in situ hybridization of 16S rRNA gene clones (Clone-FISH) for probe validation and screening of clone libraries. *Environmental microbiology*, 4, pp.713–720.
- Schramm, A. et al., 2000. Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm. *Environmental Microbiology*, 2(6), pp.680–686.
- Sercu, B. et al., 2006. H₂S degradation is reflected by both the activity and composition of the microbial community in a compost biofilter. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(5), pp.1090–8.
- Sercu, B. et al., 2005. Operational and microbiological aspects of a bioaugmented two-stage biotrickling filter removing hydrogen sulfide and dimethyl sulfide. *Biotechnology and bioengineering*, 90, pp.259–269.
- Shoji, T. et al., 2014. Identification of the microbial community responsible for thiocyanate and thiosulfate degradation in an activated sludge process. *Process Biochemistry*, 49, pp.1176–1181.
- Da Silva, M.L.B. et al., 2014. Sulfide removal from livestock biogas by *Azospirillum*-like anaerobic phototrophic bacteria consortium. *International Biodeterioration ; Biodegradation*, 86, pp.248–251.
- Siyambalapitiya, N. ; Blackall, L.L., 2005. Discrepancies in the widely applied GAM42a fluorescence in situ hybridisation probe for Gammaproteobacteria. *FEMS microbiology letters*, 242(2), pp.367–73.
- Smet, E. ; Van Langenhove, H., 1998. Abatement of volatile organic sulfur compounds in odorous emissions from the bio-industry. *Biodegradation*, 9(3-4), pp.273–284.
- Soreanu, G. et al., 2009. Evaluation of different packing media for anoxic H₂S control in biogas. *Environmental technology*, 30(12), pp.1249–59.

- Soreanu, G., Béland, M., et al., 2008. Laboratory pilot scale study for H₂S removal from biogas in an anoxic biotrickling filter. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 57(2), pp.201–7.
- Soreanu, G., Falletta, P., et al., 2008. Study on the Performance of an Anoxic Biotrickling Filter for the Removal of Hydrogen Sulphide from Biogas. *Water Qual. Res. J. Can*, 43(2).
- Steele, J. a. et al., 2005. Structure of microbial communities in ethanol biofilters. *Chemical Engineering Journal*, 113(2-3), pp.135–143.
- Stoecker, K. et al., 2010. Double labeling of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization (DOPE-FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility. *Applied and environmental microbiology*, 76(3), pp.922–6.
- Suárez-Ojeda, M.E. et al., 2011. Characterization of a p-nitrophenol-degrading mixed culture with an improved methodology of fluorescence in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Journal of Chemical Technology ; Biotechnology*, 86(11), pp.1405–1412.
- Syed, M. et al., 2006. Removal of hydrogen sulfide from gas streams using biological processes - A review., (Roth 1993).
- Taghipour, H., Bina, B., Movahedian, H., 2005. Biological Removal of Ammonia from Contaminated Air Streams Using Biofiltration System. *Health (San Francisco)*, 2(2), pp.17–25.
- Tamaki, H. et al., 2011. Analysis of 16S rRNA amplicon sequencing options on the Roche/454 next-generation titanium sequencing platform. *PloS one*, 6(9), p.e25263.
- Tamura, K. et al., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, pp.2725–2729.
- Taslim, C., Huang, T. , Lin, S., 2011. DIME: R-package for identifying differential ChIP-seq based on an ensemble of mixture models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27, pp.1569–1570.
- Taylor, P., Yang, Y., Allen, E.R., 2012. Biofiltration Control of Hydrogen Sulfide 1 . Design and Operational Parameters. , (June), pp.37–41.
- Teeling, H., Glöckner, F.O., 2012. Current opportunities and challenges in microbial metagenome analysis--a bioinformatic perspective. *Briefings in bioinformatics*, 13(6), pp.728–42.
- Terada, A. et al., 2003. Nitrogen removal characteristics and biofilm analysis of a membrane-aerated biofilm reactor applicable to high-strength nitrogenous wastewater treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(2), pp.170–178.

- Terada, A. et al., 2013. Physiological characteristics of predominant ammonia-oxidizing bacteria enriched from bioreactors with different influent supply regimes. *Biochemical Engineering Journal*, 79, pp.153–161.
- Vallero, D.A., 2010. Environmental biotechnology: a biosystems approach. In *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*.
- Valm, A.M. et al., 2011. Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, pp.4152–4157.
- Veillette, M. et al., 2011. Effect of ammonium concentration on microbial population and performance of a biofilter treating air polluted with methane. *Chemical Engineering Journal*, 171(3), pp.1114–1123.
- Vesey, G. et al., 1997. Evaluation of fluorochromes and excitation sources for immunofluorescence in water samples. *Cytometry*, 29, pp.147–154.
- Wagner, M., Haider, S., 2012. New trends in fluorescence in situ hybridization for identification and functional analyses of microbes. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, pp.96–102.
- Wang, Q. et al., 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, 73, pp.5261–5267.
- Webster, T.S. et al., 1997. Microbial ecosystems in compost and granular activated carbon biofilters. *Biotechnology and Bioengineering*, 53, pp.296–303.
- Wertz, S. et al., 2007. Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environmental microbiology*, 9(9), pp.2211–9.
- Wu, C. et al., 2011. Effect of aeration modes on the characteristics of composting emissions and the NH₃ removal efficiency by using biotrickling filter. *Waste management (New York, N.Y.)*, 31(8), pp.1702–10.
- Xia, S. et al., 2010. Tracking composition and dynamics of nitrification and denitrification microbial community in a biofilm reactor by PCR-DGGE and combining FISH with flow cytometry. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), pp.370–378.
- Xiao, Y. et al., 2010. Characterization of microbial populations in pilot-scale fluidized-bed reactors treating perchlorate- and nitrate-laden brine. *Water research*, 44(14), pp.4029–36.
- Xu, M. et al., 2012. Bar-coded pyrosequencing reveals the responses of PBDE-degrading microbial communities to electron donor amendments. *PloS one*, 7(1), p.e30439.
- Xue, N. et al., 2011. Elimination of NH₃ and odor from composting by biotrickling filter and preliminary exploration on molecular biology. *Water Science and Technology*, 63, pp.747–753.

- Xue, N. et al., 2010. Enhanced removal of NH₃ during composting by a biotrickling filter inoculated with nitrifying bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 51, pp.86–93.
- Xue, N. et al., 2013. Odorous composting gas abatement and microbial community diversity in a biotrickling filter. *International Biodeterioration ; Biodegradation*, 82, pp.73–80.
- Yang, C. et al., 2010. Biomass accumulation and control strategies in gas biofiltration. *Biotechnology advances*, 28(4), pp.531–40.
- Yang, L., Wang, X. ; Funk, T.L., 2014. Strong influence of medium pH condition on gas-phase biofilter ammonia removal, nitrous oxide generation and microbial communities. *Bioresource technology*, 152, pp.74–9.
- Ye, L. et al., 2011. Analysis of the bacterial community in a laboratory-scale nitrification reactor and a wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing. *Water research*, 45(15), pp.4390–8.
- Ye, L. ; Zhang, T., 2013. Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(6), pp.2681–90.
- Yeates, C. et al., 2003. Limitations of the widely used GAM42a and BET42a probes targeting bacteria in the Gammaproteobacteria radiation. *Microbiology*, 149, pp.1239–1247.
- YU, G., XU, X., HE, P., 2007. Isolates identification and characteristics of microorganisms in biotrickling filter and biofilter system treating H₂S and NH₃. *Journal of Environmental Sciences*, 19(7), pp.859–863.
- Zhang, L. et al., 2008. Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer systems: a review. *Water research*, 42(1-2), pp.1–12.
- Zhang, S. et al., 2014. Impacts of temperature and nitrifying community on nitrification kinetics in a moving-bed biofilm reactor treating polluted raw water. *Chemical Engineering Journal*, 236, pp.242–250.
- Zhang, S. et al., 2013. Responses of biofilm characteristics to variations in temperature and NH₄(+)-N loading in a moving-bed biofilm reactor treating micro-polluted raw water. *Bioresource technology*, 131, pp.365–73.
- Zwirgmaier, K., 2005. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) - The next generation. *FEMS Microbiology Letters*, 246, pp.151–158.

Anexos

Anexo 1

Método de análisis del Research and Testing Laboratory (consultar en el CD-ROM)

Tabla 5.4. Abundancia relativa para especies que contribuyeron con entre 0.1 y 1% de lecturas de secuencias en la muestra 245d

Identidad	%	Identidad	%	Identidad	%
<i>Bradyrhizobium</i> sp	0.5	Lamiaceae (uncl. género)	0.2	<i>Humicoccus flavidus</i>	0.1
<i>Dyella ginsengisoli</i>	0.5	<i>Lysobacter</i> sp	0.2	<i>Humicoccus</i> sp	0.1
<i>Flavobacterium</i> sp	0.5	<i>Ottowia</i> sp	0.2	<i>Hyphomicrobium</i> sp	0.1
Nitrosomonadaceae (uncl. género)	0.5	<i>Rhodanobacter thiooxydans</i>	0.2	<i>Luteibacter</i> (uncl. especie)	0.1
<i>Rhizobium</i> sp	0.5	<i>Rhodovastum</i> (uncl. especie)	0.2	<i>Lysobacter</i> (uncl. especie)	0.1
<i>Rhodanobacter terrae</i> ¹	0.5	<i>Shinella</i> sp	0.2	<i>Massilia</i> (uncl. especie)	0.1
Chloroflexaceae (uncl. género)	0.4	<i>Stenotrophomonas</i> sp	0.2	Methylobacteriaceae (uncl. género)	0.1
<i>Malikia</i> sp	0.4	<i>Thioalkalivibrio</i> (uncl. especies) ²	0.2	Methylocystaceae (uncl. género)	0.1
<i>Ralstonia</i> (uncl. especie)	0.4	<i>Thiobacillus</i> (uncl. especie)	0.2	<i>Methylocystis</i> (uncl. especies)	0.1
<i>Ralstonia</i> sp	0.4	<i>Variovorax</i> sp	0.2	Microbacteriaceae (uncl. género)	0.1
<i>Rhodomicrobium</i> (uncl. especie)	0.4	<i>Xanthomonas</i> sp	0.2	<i>Microbacterium</i> sp	0.1
<i>Afipia</i> sp	0.3	Acidimicrobiaceae (uncl. género)	0.1	<i>Mycobacterium</i> sp	0.1
<i>Azoarcus</i> sp ²	0.3	<i>Acidiphilium</i> (uncl. especie)	0.1	<i>Niastella</i> sp	0.1
Cytophagaceae (uncl. género)	0.3	<i>Acidisphaera</i> (uncl. especie)	0.1	<i>Parvibaculum</i> sp	0.1
Deinococci (uncl. orden)	0.3	<i>Acidithiobacillus</i> (uncl. especie)	0.1	<i>Phenylbacterium</i> sp	0.1
<i>Dyella</i> (uncl. especies)	0.3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	0.1	<i>Propionivibrio</i> (uncl. especie)	0.1
<i>Nitrosospira</i> (uncl. especie) ¹	0.3	<i>Agrococcus</i> (uncl. especie)	0.1	Rhizobiaceae (uncl. género)	0.1
<i>Actinoplanes</i> (uncl. especie)	0.2	<i>Amoebophilus asiaticus</i>	0.1	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	0.1
<i>Agreia</i> sp	0.2	<i>Azoarcus</i> (uncl. especie) ^{1,2}	0.1	<i>Rhodoplanes</i> sp	0.1
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	0.2	<i>Blastochloris</i> (uncl. especie)	0.1	<i>Rhodopseudomonas faecalis</i>	0.1
<i>Catellibacterium</i> sp	0.2	Chloroflexales (uncl. familia)	0.1	Sphingomonadaceae (uncl. género)	0.1
<i>Comamonas</i> (uncl. especie)	0.2	Comamonadaceae (uncl. género)	0.1	<i>Sphingomonas adhaesiva</i>	0.1
Cryomorphaceae (uncl. género)	0.2	<i>Cryobacterium</i> sp	0.1	<i>Sphingomonas mali</i>	0.1
<i>Dokdonella</i> sp	0.2	Cytophagales (uncl. familia)	0.1	<i>Sphingomonas</i> sp	0.1
<i>Fulvimonas</i> sp	0.2	<i>Dyella</i> sp	0.1	<i>Thermomonas</i> (uncl. especie)	0.1
<i>Geobacter</i> (uncl. especie)	0.2	<i>Edaphobacter</i> (uncl. especie)	0.1	<i>Thermomonas brevis</i>	0.1
Geobacteraceae (uncl. género)	0.2	<i>Flavisolibacter</i> sp	0.1	<i>Thioalkalivibrio</i> sp ²	0.1
<i>Gynumella</i> (uncl. especie)	0.2	<i>Frateuria</i> (uncl. especie)	0.1	<i>Thiobacillus thioparus</i>	0.1
<i>Halothiobacillus</i> (uncl. especie)	0.2	<i>Haemophilus paraahaemolyticus</i>	0.1	<i>Thiomonas</i> (uncl. especie)	0.1
Hyphomicrobiaceae (uncl. género)	0.2	<i>Halothiobacillus neapolitanus</i>	0.1	Total	16.4

Subrayado, SOB; **Negrita**; especie acidófila

Tabla 5.5. Abundancia relativa de especies con menos de 1% y más de 0.03% de lecturas de secuencias en 586d (subrayado para especies SOB).

Identidad	(%)	Identidad	(%)
<u><i>Acidithiobacillus caldus</i></u>	0.48	Lamiaceae (<i>uncl. género</i>)	0.11
<u><i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i></u>	0.47	Acetobacteraceae (<i>uncl. género</i>)	0.09
<i>Leifsonia</i> sp	0.46	Acidithiobacillaceae (<i>uncl. género</i>)	0.08
<u><i>Thiomonas</i></u> sp	0.34	<i>Amoebophilus asiaticus</i>	0.07
<i>Acidisoma tundrae</i>	0.29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.07
<i>Mycobacterium</i> sp	0.19	<i>Acidisoma</i> (<i>uncl. especie</i>)	0.05
<i>Microbacterium</i> sp	0.14	<i>Alcanivorax</i> sp	0.03
<i>Rickettsiales</i> (<i>uncl. género</i>)	0.12	<i>Legionella</i> (<i>uncl. especie</i>)	0.03
Xanthomonadales (<i>uncl. familia</i>)	0.12	<i>Thermomonas</i> (<i>uncl. especie</i>)	0.03
		<i>Total</i>	3.18

Anexo 3

Tabla Resumen de la literatura sobre biofiltración anóxica

Características	Material/ origen inoculo	Objetivo	Comentarios	Técnica / microbiota	Ref.
-Laboratorio -Biogás sintético -[H ₂ S y NH ₃] variadas	Piedra volcanica/ efluente de SBR* (ND)	Evaluación la Influencia de la carga H ₂ S. Viabilidad de dos biofiltros en serie para recoger el azufre elemental.	Estudio de la concentración de H ₂ S. Producto final nitrito y azufre	-	(Soreanu et al. 2008)
-2; Laboratorio -Biogás sintético [H ₂ S y NH ₃] variadas	Fibras de plástico y piedra volcánica/ efluente SBR, (ND)	Estudio del material de soporte, para apoyar modelización de parámetros	Aspectos de proceso/ acumulo de biomasa afectó la performance. La concentración de NH ₃ fue optimizada	-	(Soreanu et al. 2009)
-Laboratorio - Biogás real - [H ₂ S] 2000 ppm _v	Espuma poliuretano / lodo EDAR, (ND)	Comparativa de proceso aerobio y anóxico, en condiciones similares de operación.	Aspectos de proceso. Probó metilmercaptano en mezcla con H ₂ S	-	(Montebello et al. 2012)
-Piloto, 12 litros -Biogás sintético -[H ₂ S y NH ₃] variable	Fibras de plástico/ lodo EDAR (ND)	Estudio de optimización de parámetros de operación	Se utilizó agua residual rica en Nitrato.	FISH y SEM / <i>T. denitrificans</i>	(Soreanu et al. 2008)
-Laboratorio -Biogás sintético -[H ₂ S y NH ₃] variable	Pall rings/ lodo EDAR (ND)	Estudio del efecto de la concentración de entrada de H ₂ S y de régimen de alimentación de solución de nitrato	Estudio de perfil de comunidad, pero no se completó la identificación de la bandas.	DGGE / sin resultados conclusivos	(Fernández et al. 2013)
-Laboratorio -Biogás sintético -[H ₂ S y NH ₃] variable	Espuma poliuretano lodo EDAR (ND)	Estudio del efecto de la concentración de entrada de H ₂ S y de régimen de alimentación de solución de nitrato	Aspectos de proceso.	-	(Fernández et al. 2014)

SBR- reactor biológico secuencial; EDAR- estación depuradora de aguas residuales; ND- inoculo indeterminado

Anexo 4

Este anexo esta formado de tablas 5.3a, 53b, que se elaboran en Excell. (consultar en el CD-ROM)

Tabla: Resumen de las publicaciones de FISH en biofiltración de compuestos azufrados

Característica de la planta condición O ₂ / gas de S	Objetivos y/o comentarios	Técnica de identificación filogenética	Sonda/ especificidad ^(b)	F*	Ref.
Real/ aerobico/ mezcla gases industria animal/ Dimetildisulfuro	Composición de la comunidad microbiana/ diseño de sondas	Clonaje y secuenciación	EUB338mix; NON338; EUK502; ARCH915 ALF968; BET42a; GAM42a CF319a; HGC69a; LGC354mix; PLA46; NIT3; ALBO34 S*-Ntspa-0712-a-A-21; NSO190; SRB385; XAN818; ACA652; a	Cy3 Cy5 FITC Oregon green DAPI	(Friedrich et al. 2003)
Laboratorio/ aerobio/ mistura indeterminada de gases emitidos de compost	Monitorización de cambios en la diversidad	DGGE	Eub338 mix ⁽²⁾ ALF1b ⁽²⁾ ; BET42a ⁽²⁾ ; GAM42a ⁽²⁾	Cy5 DAPI	(Chung 2007)
Piloto EDAR/ aerobio/ H₂S, MT, DMS y DMDS**	Caracterización de la comunidad predominante	-	Eub338 mix ALF968; BET42a; GAM42a HGC69A; LGC354mix PSE/Pseudomonas sp.	Cy3, Cy5 FITC	(K.-L. Ho, Chung, Lin, et al. 2008)
Laboratorio/ aerobio/ H₂S	Distribución espacial de la comunidad BSO y evolución a lo largo del tiempo	Clonaje y secuenciación	EUB338mix ⁽¹⁾ ALF968 ⁽²⁾ ; BET42a ^(2, a) ; GAM42a ^(2, a) , EP402-423 ⁽²⁾ , G123T ^(2, a) , TBD1419 ⁽²⁾ , TMD131S-S-H.neap-635-a-A-19 ⁽²⁾ , S-S-T.int-0442-a-A-18v ⁽²⁾	Cy3 Cy5	(Maestre et al. 2010)
2 Biofiltros reales/ aerobio/ mezcla- de gases/ Dimetil disulfuro	Seguir la degradación del contaminante/MA R-FISH**	Clonaje y secuenciación	-	-	(Kristiansen, Lindholst, et al. 2011)

(continuación) Característica de la planta condición O ₂ / gas de S	Objetivos y/o comentarios	Técnica de identificación filogenética	Sonda/ especificidad ^(b)	F*	Ref.
Laboratorio/ aerobio/ H ₂ S	Distribución espacial de la comunidad BSO y evolución a lo largo del tiempo	-	EUB338mix ⁽¹⁾ ALF968 ⁽²⁾ ; BET42a ^(2, a) ; GAM42a ^(2, a) , EP402-423 ⁽²⁾ ; G123T ^(2, a) TMD131S-S-H.neap-635-a-A-19 ⁽²⁾ TBD1419 ⁽²⁾ ; TMD131 ⁽²⁾ ; TM2GO138 S-S-T.int-0442-a-A-18v ⁽²⁾	Cy3 Cy5	(Rovira 2012)
Real / Aerobio / H ₂ S	Evolución de la comunidad a lo largo del tiempo	-	EUB338mix ⁽¹⁾ ALF968 ⁽²⁾ ; BET42a ⁽²⁾ ; GAM42a ⁽²⁾ ; DELTA495mix ⁽²⁾ HGC69A ⁽²⁾ LGC354mix ⁽²⁾	Cy3 Cy5 ⁽²⁾	(Pérez et al. 2012)

- (1) marcado con Cy3
(2) marcado con Cy5
(3) Marcado con FITC

Cy3 Cianina-3
Cy5 Cianina-5
FITC fluoresceína-5-isotiocianato
DAPI 4',6-diamino-2-fenilindol

*Fluorocromo

**metanotiol, disulfuro de dimetilo y sulfuro de dimetilo

- (a) Con el competidor
(b) (Especificidad) **UB338mix: mescla de EUB338 (I, II, III)** Eubacteria
NON338- Control negativo

ALF968- Proteobacteria α

BET42a -Proteobacteria β

GAM42a -Proteobacteria γ

DELTA495 (a, b, c) - Proteobacteria δ

EP402-423 Proteobacteria ϵ

HGC69A- Actinobacteria

LGC354 (a, b, c)- Firmicutes

G123T- *Thiothrix eikelboomii*, *T. nivea*, *T. unzii*, *T. fructosivorans*,

T. defluvii, *Eikelboom* type 021N group I, II, III

TMD131- *Sulfurimonas denitrificans*

S-S-H.neap-635-a-A-19- *Halothiobacillus neapolitanus*

TBD1419- *Thiobacillus denitrificans*

S-S-T.int-0442-a-A-18v- *Thiomonas intermedia*

TM2GO138- Grupo 2 *Thiomonas*

EUK502-Eucarya

ARCH915-Arqueal

CF319a-Cytophaga-*Flavobacterium* clúster del filo Bacteroidetes

PLA46-Planctomycetal

S*-Ntspa-0712-A-A-21-Nitrospira

SRB385-Sulfato-reductoras

XAN818-Xanthomonas

ACA652-Acinetobacter

ALBO34a-*Bordetella* spp., *Alcaligenes* spp.

NSO190-oxidantes de amoníaco

NIT3-Nitrobacter

Anexo 6

Tablas del análisis de las sondas FISH (consultar en el CD-ROM)

