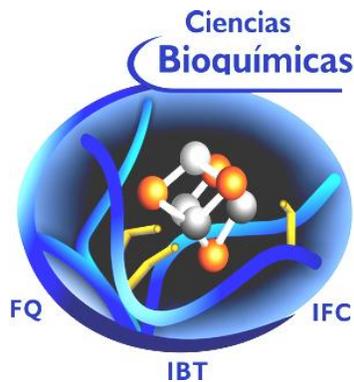


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOQUIMICAS  
FACULTAD DE QUIMICA**



**CARACTERIZACIÓN DE LA BIOPELÍCULA  
TAPONANTE EN MEMBRANAS  
ACOPLADAS A UN BIO-REACTOR ANAEROBIO**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)**

Facultad de Química

P R E S E N T A :

**QFB. KADIYA DEL CARMEN CALDERON ALVARADO**

TUTOR:

**DR. ADALBERTO NOYOLA ROBLES**

MARZO DEL 2009.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente: Dr. Sergio Sánchez Esquivel  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Vocal: Dr. Sergio Revah Moissev  
UAM- Cuajimalpa

Secretario: Dra. Nathalie Cabirol Gilles  
Instituto de Ingeniería, UNAM

1er Suplente: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch  
Facultad de Química, UNAM

2° Suplente: Dra. Amelia Farrés González- Saravia  
Facultad de Química, UNAM

Lugar donde se realizó la tesis:  
INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM.

Tutor de Tesis: Dr. Adalberto Noyola Robles

## **AGRADECIMIENTOS.**

Estos dos años de trabajo transcurridos para lograr esta tesis han estado llenos de diferentes experiencias. Afortunadamente, la mayoría son gratas por lo que quiero aprovechar este espacio y agradecer a un grupo de personas muy especiales para mí.

En primer lugar a Dios, muchas gracias por permitirme hacer y deshacer, especialmente por quererme tanto y siempre estar conmigo.

A mi familia; gracias Mayka por absolutamente todo, principalmente por tu inmenso e incondicional amor. A Eduardo papá, por influir tanto en mi formación y carácter. A Eduardo mi hermano, por toda la alegría y darle ese toque especial a mi vida y a la nonna por todos sus cuidados.

A la Dra. Nathalie Cabirol, gracias por ser un enorme pilar en mi formación en esta área, por transmitirme con mucho cariño toda tu sabiduría a este campo del conocimiento y sobre todo por todo tu apoyo académico, moral y por tu amistad.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Adalberto Noyola, quien además ha sido mi tutor nacional, al Dr. Sergio Revah, y especialmente a la Dra. Carmen Wacher Rodarte por todo su apoyo, disposición y respaldo académico.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por toda mi formación profesional así como su generosidad y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por las becas brindadas para desarrollar esta tesis y las estancias en el extranjero.

A los miembros de mi jurado de examen, gracias por sus comentarios de gran valor.

A los Doctores Jesús González y Belén Rodelas de la Universidad de Granada, por todas sus enseñanzas en Microbiología y Biología Molecular, pero sobretodo por enseñarme otro aspecto de la vida y acogerme con tanto cariño.

A todos mis amigos del Instituto: Abril, Dulce, Toño, Miguel, Mónica, Evelyn, Balmore, Gerardo, Alexandra, Anidia, Dafne, Kathia, Myriam, Emily y

Alejandra. A Girasol Oliva, muchas gracias por tu apoyo como servicio social y sobretodo, por tu gran empeño y gran disposición siempre.

Al Dr. José Sepúlveda de la UAM Iztapalapa, por todos sus conocimientos de microscopia electrónica, por su gran ayuda, siempre amable disposición y sincera amistad.

A mis amigos de toda la vida: muchísimas gracias por aguantarme, por quererme tanto y por que me han demostrado constantemente que son incondicionales. Los quiero mucho.

A mis amigos de Granada, gracias por todo lo que aprendí de ustedes como personas y colegas, por la interminable diversión, por las risas y por todo su amor.

A mis amigos coralistas: gracias por quereme tanto y compartir ese arte con tanta diversión.

A la Dra. Rosa Krajmalnik por darme la oportunidad y confiar en mi. Al personal técnico, estudiantes y amigos de la Universidad Estatal de Arizona, muchas gracias.

Y finalmente al personal técnico administrativo del posgrado de ciencias bioquímicas (Lety y Adelina) por su gran eficiencia y todo su apoyo y al personal técnico administrativo del Instituto de Ingeniería.

<b>1. Resumen</b> .....	8
<b>2. Introducción</b> .....	9
<b>3. Marco Teórico</b> .....	10
3.1 Fundamento de los biorreactores de membrana.....	10
3.2 Tipos de biorreactores de membrana (BRM): .....	11
3.3 Biorreactores anaerobios de membrana .....	12
3.3.1 Biorreactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente UASB .....	13
3.4 Membranas .....	14
3.4.1 Clasificación de membranas .....	14
3.4.2 Taponamiento de membrana (Membrane Biofouling) .....	15
3.4.4 Limpieza de las membranas.....	17
3.4.5 BRM Aerobios versus BRM Anaerobios.....	18
3.5 Comunidades microbianas en el desarrollo de biopelículas asociadas al tratamiento de agua residual. ....	18
3.5.1 Filogenia y biodiversidad .....	18
3.5.2 Diversidad procariota en las aguas residuales .....	19
3.5.3 Diversidad microbiana en biopelículas. ....	20
3.6 Aplicaciones de las técnicas de biología molecular al estudio de la diversidad microbiana .....	21
3.6.1 Técnicas de biología molecular para la detección específica de microorganismos, independientes de cultivo .....	21
3.7 Filogenia y diversidad del dominio Archaea .....	25
3.8 Aplicación de herramientas moleculares al estudio de los microorganismos de los biorreactores de membrana. ....	28
<b>4. Justificación</b> .....	29
<b>5. Planteamiento del problema</b> .....	29
<b>6. Objetivos</b> .....	30
<b>7. Hipótesis</b> .....	31
<b>8. Materiales y Métodos</b> .....	32
8.1 Biorreactor anaerobio con membranas acopladas .....	32
8.2 Análisis específico del influente y efluente del biorreactor UASB.....	34
8.3 Análisis específico a las membranas.....	35
8.3.1 Estudio de las comunidades bacterianas .....	35
8.3.2 Estudio de la población microbiana del biorreactor mediante la técnica de hibridación in situ con fluorescencia (FISH).....	44
8.3.2.1 Evaluación microscópica. ....	45
8.3.3 Microscopía Electrónica de Barrido .....	47
<b>9. Resultados</b> .....	48
9.1 Caracterización fisicoquímica del influente y efluente UASB. ....	48
9.2 Determinación de tamaño de partícula.....	49
9.3 Microscopía Electrónica de Barrido .....	50
9.4 Estudios de biodiversidad de la biopelícula taponante .....	53
9.4.1 Estudio de la población bacteriana y archaea de la biopelícula taponante utilizando fragmentos amplificados del gen codificante del ARN ribosómico 16S .....	53

9.4.2 Caracterización de la biopelícula taponante mediante hibridación in situ de fluorescencia (FISH).....	62
10. Discusión de resultados. ....	64
10.1 Análisis fisicoquímico del influente de membranas .....	64
10.2 Análisis de la biopelícula taponante mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). ....	65
10.3 Población bacteriana del biorreactor utilizando TGGE basada en fragmentos amplificados del gen codificante del ARN ribosómico 16S. ....	66
10.4 Estudio de la población microbiana presente en la biopelícula mediante FISH .....	70
<b>11. Conclusiones</b> .....	<b>72</b>
<b>12. Anexos</b> .....	<b>73</b>
<b>13. Referencias</b> .....	<b>75</b>

## NOMENCLATURA

ADN ácido desoxirribonucleico  
ARC agua residual cruda  
ARN ácido ribonucleico  
BMS biorreactor de membrana sumergida  
BRAM biorreactores anaerobios de membrana  
BRM biorreactores de membrana  
Da daltones  
DBO demanda bioquímica de oxígeno (mgL-1)  
DGGE electroforesis em gel con gradiente desnaturizante  
DQO demanda química de oxígeno (mgL-1)  
DQOs demanda química de oxígeno soluble (mgL-1)  
DQOT demanda química de oxígeno total (mgL-1)  
EDS espectroscopia por dispersión de energía  
EDX espectroscopia de difracción de rayos X  
FISH hibridación *in situ* de fluorescencia  
FPVD fluoruro de polivinilideno  
kDa kilo daltones  
MF microfiltración  
MEB microscopia electrónica de barrido  
NF nanofiltración  
NaOCl hipoclorito de sodio  
OI ósmosis inversa  
pH potencial de hidrógeno  
PCR reacción en cadena de la polimerasa  
PTM presión transmembrana (kPa)  
SDT sólidos disueltos totales (mgL-1)  
SDV sólidos disueltos volátiles (mgL-1)  
SPE sustancias poliméricas extracelulares  
SRT tiempo de residencia de sólidos  
SS sólidos suspendidos (mgL-1)  
SSLM sólidos suspendidos en el licor de mezcla  
SSF sólidos suspendidos fijos (mgL-1)  
SST sólidos suspendidos totales (mgL-1)  
SSV sólidos suspendidos volátiles (mgL-1)  
ST sólidos totales (mgL-1)  
STF sólidos totales fijos (mgL-1)  
STV sólidos totales volátiles (mgL-1)  
TGGE electroforesis en gel con gradiente de temperatura  
TRC tiempo de retención celular (h)  
TRH tiempo de retención hidráulica (h)  
TTGE electroforesis en gel con gradiente temporal de temperatura  
UASB reactor anaerobio de lecho fluidificado con flujo ascendente  
UF ultrafiltración

## RESUMEN

Los Biorreactores Anaerobios de Membrana (BRAM) ofrecen una excelente alternativa para el tratamiento y reuso de agua residual, tanto municipal como industrial. Sin embargo, existe un fenómeno inevitable y difícil de controlar en el proceso que es el taponamiento de membranas o *biofouling*. Es por esto que una de las prioridades actuales de la investigación en este tema es entender el fenómeno para su control y desarrollo de membranas con materiales anti-fouling.

En este sentido, utilizando complementariamente métodos de ecología microbiana como Gel de Electroforesis con Gradiente de Temperatura (TGGE), e Hibridación in situ de Fluorescencia (FISH), se ha analizado la estructura y microbiota de la capa taponante formada en membranas de ultrafiltración (PVDF 100 kDa), acopladas a un reactor anaerobio tipo UASB alimentado con agua residual municipal.

La diversidad microbiana analizada fue determinada por amplificación del ADN de la región hipervariable V3 y V6 del gen ribosomal 16S rRNA. El análisis estructural de la capa taponante se realizó por medio de Microscopía Electrónica de Barrido.

El experimento fue diseñado empleando dos lotes de membranas (nueva y usada) que trataron dos influentes distintos. Los tratamientos I y II corresponden a membranas nuevas, alimentadas (8 horas de operación) con efluente UASB (I) y agua residual cruda ARC (II) con el propósito de desarrollar biopelícula. Los tratamientos III y IV corresponden a membranas que fueron alimentadas con efluente UASB (2400 horas de operación); el tratamiento IV fue extemporáneamente sometido a un proceso de lavado con HClO 300 ppm.

Las herramientas moleculares demostraron que la población predominante en los tratamientos fue representada por Epsilon proteobacteria (*Arcobacter cryaerophilus*), así como notable presencia de alfa de la clase *Sphingomonadaceae*, beta (*Comamonadaceae*) y delta (*Geobacter* sp.) proteobacteria. Miembros del filio Firmicutes fueron detectados en gran número. Todos estos son capaces de producir sustancias poliméricas extracelulares (SPE). Del dominio *Archaea* se encontró que la población predominante corresponde a *Euryarchaeota* (*Methanospirillaceae* y *Methanosarcinales*). Con este trabajo se logró realizar un análisis más detallado de la biopelícula taponante que se forma en las membranas acopladas a un reactor anaerobio tipo UASB. La principal aportación de este trabajo consistió en detectar las especies microbianas que tienen efecto sobre el taponamiento en las membranas acopladas al biorreactor tipo UASB.

**Palabras clave:** Biotaponamiento, SPE, Membrana, UASB, TGGE, FISH.

## INTRODUCCIÓN

En el tratamiento de agua residual, municipal o industrial, las membranas siempre han tenido un papel muy importante. Una membrana puede definirse como una película delgada que separa dos fases y actúa como barrera selectiva al transporte de materia (Aptel y Buckley, 1998). Las membranas han sido ampliamente utilizadas como tratamiento terciario o bien como constituyentes de los biorreactores de membrana (Fane y Chang, 2002). Sin embargo, para su uso existe un fenómeno inevitable en el proceso que es difícil de controlar: el *biofouling* o taponamiento de membranas. Este proceso involucra varios mecanismos como la adhesión y el crecimiento de los microorganismos, así como producción de metabolitos que secretan sobre la superficie de la membrana y otros componentes taponantes como material inorgánico y orgánico, que se denominan sustancias poliméricas extracelulares (SPE) (Sombatsompop *et al.*, 2006). El taponamiento de membranas causa problemas técnicos considerables en los sistemas y puede llevar a pérdidas económicas. Su manifestación principal es la reducción del flujo permeado y el aumento de la presión transmembra, aumento en el consumo de energía y la necesidad de realizar frecuentes lavados a las membranas o en su caso reemplazarlas (Herrera *et al.*, 2007). Una manera de clasificar a los biorreactores de membrana (BRM) es como aerobios o anaerobios. Estos últimos ofrecen una buena alternativa para el tratamiento y reuso del agua residual por sus bajos requerimientos de energía comparado con otros sistemas de membrana como los aerobios, baja producción de lodos y producción de metano. Así mismo, las biopelículas taponantes juegan un papel muy importante en el tratamiento de agua, ya que forman la base del funcionamiento de diferentes reactores, tanto aerobios como anaerobios (filtros percoladores, biodiscos, etc). Por tal motivo, son estructuras de comunidades microbianas creadas por grupos de células atrapadas en matrices poliméricas hidratadas creadas por ellos mismos (Costerton *et al.*, 1999). Durante los últimos quince años ha surgido la necesidad de estudiar la composición de las comunidades microbianas presentes utilizando técnicas moleculares basadas en el gen ribosomal 16S ARNr/ADNr (Amann *et al.*, 2001).

En este trabajo se analizó la biopelícula taponante formada en membranas asociadas a un biorreactor anaerobio tipo UASB bajo diferentes tratamientos, utilizando técnicas moleculares para el estudio del ecosistema microbiano formado en dichas membranas para tratar de determinar su importancia como causante principal del taponamiento.

### 3. Marco Teórico

#### 3.1 Fundamento de los biorreactores de membrana.

Los biorreactores de membrana (BRM) son sistemas que combinan un reactor biológico, responsable de la degradación de compuestos orgánicos del agua a tratar y la tecnología de membrana encargada de llevar a cabo la separación física (filtración) del líquido de la mezcla. Su uso está asociado a membranas de micro y ultrafiltración que evitan la necesidad de pasos limitantes en el tratamiento biológico como la filtración y la sedimentación (Stephenson y Judo, 2000; Visvanathan y Ben, 2000). Lo anterior le permite a un sistema de BRM remplazar varias operaciones unitarias como la coagulación, clarificación y filtración, por lo tanto realizar todo este proceso en una sola etapa. A diferencia de los reactores biológicos convencionales, los BRM pueden operar en condiciones significativamente diferentes, ya que los tiempos de residencia de los sólidos (TRS) y los sólidos suspendidos en el licor de la mezcla (SSLM) son hasta diez veces mayores que los sistemas convencionales.

Con las características mencionadas anteriormente, los BRM tienen las siguientes ventajas sobre otros tratamientos biológicos:

1. Operación con tiempos de residencia hidráulicos (TRH) muy cortos.
2. Al trabajar con TRS muy grandes, menor producción de lodo.
3. Obtención de efluentes de alta calidad en términos de turbidez, cantidad de bacterias, sólidos suspendidos totales (SST) y demanda química de Oxígeno (DQO).
4. Requerimiento de menos espacio para el tratamiento de agua residual.

Entre sus desventajas están:

1. Altos costos de instalación y mantenimiento.
2. Altos costos energéticos para la operación de la membrana
3. Necesidad de controlar el taponamiento de membrana.

La figura 3.1 muestra la operación general de los BRM. El influente (agua a tratar) entra en el biorreactor, donde la biomasa microbiana al igual que en el caso de los lodos activados, permiten la degradación biológica de la materia orgánica.

Posteriormente, la mezcla es bombeada del biorreactor y bajo presión, filtrada a través de la membrana. El agua filtrada es descargada del sistema, mientras que la biomasa microbiana es devuelta al biorreactor. De manera periódica el exceso de lodo se bombea y se descarga con el fin evitar que el lodo madure.

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

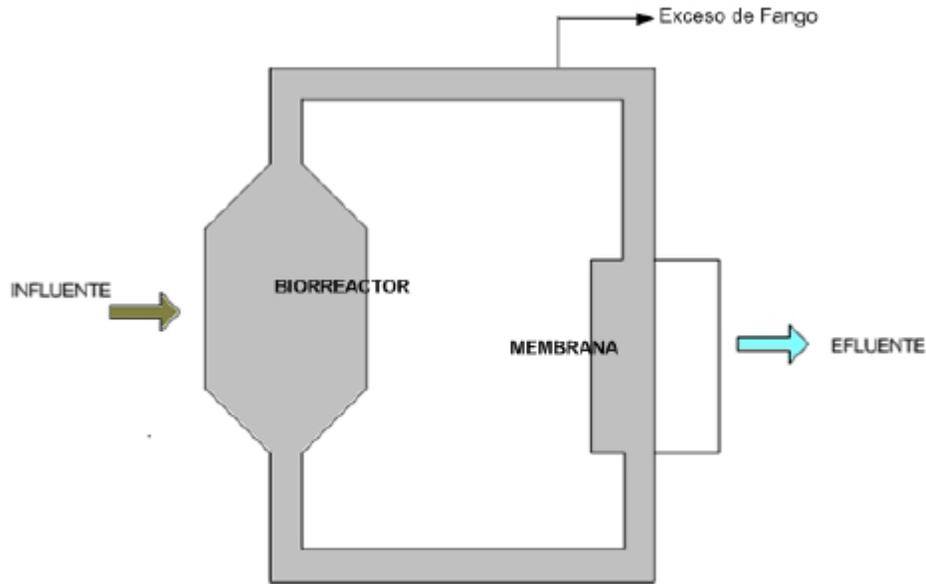


Fig 3.1 Principio del biorreactor de membrana

(Rosenberger *et al.*, 2002)

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

### 3.2 Tipos de biorreactores de membrana (BRM):

*Biorreactor de membrana inmersa o sumergida (BRMS)*; La unidad de membrana que realiza la separación física está inmersa en el tanque biológico. La fuerza impulsora a través de la membrana es alcanzada presurizando el biorreactor o creando presión negativa en el lado permeado de la membrana, que es lo más común (Rosenberger *et al.*, 2002). Generalmente, se coloca un difusor de aire justo debajo del módulo de membrana para suministrar el aire necesario para homogeneizar el licor mezcla. Con esto también se consigue crear un régimen turbulento de aire en la capa límite de la membrana, que evita la formación de biopelícula que acaba por obstruir la membrana. En la figura 3.2 (b) se muestra un esquema de este tipo de biorreactor de membrana (Metcalf y Eddy, 2003).

*Biorreactor de membrana externa o de recirculación*: En este tipo de biorreactor de membrana, la membrana se encuentra fuera del reactor biológico, y el licor de mezcla se recircula desde el biorreactor hasta el módulo de membrana por medio de una bomba capaz de generar cierta presión, aproximadamente 30 kPa (Manem y Sanderson, 1998).

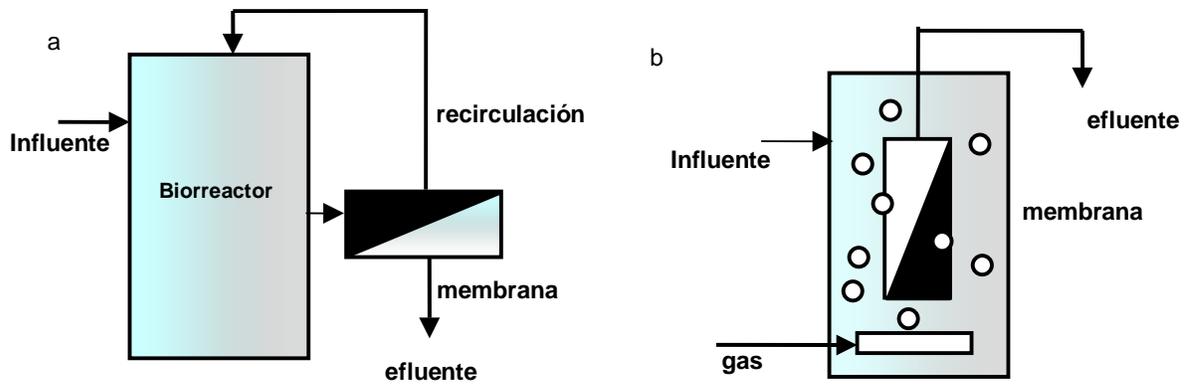


Figura 3.2. Esquemas que representan las dos principales configuraciones de biorreactores de membrana. a) BRM en serie o de recirculación y, b) BRM integrado o sumergido.

La definición del tipo de reactor es importante, dado que harán variar las consideraciones de operación y los costos.

### 3.3 Biorreactores anaerobios de membrana

Desde hace cuarenta años, el tratamiento anaerobio se ha consolidado como un proceso adecuado para el manejo de agua residual. En un inicio con las fosas sépticas para el tratamiento de agua residual doméstica. En años recientes, se ha obtenido un mejor entendimiento de la microbiología de los biorreactores anaerobios de membrana como proceso y una mejora en la tecnología utilizada, lo que ha hecho posible considerar esta opción en el tratamiento de agua residual con baja carga, tales como efluentes municipales. Metcalf y Eddy (2003) presentan las ventajas y desventajas del tratamiento anaerobio en relación al proceso aeróbico en tratamientos de aguas residuales.

Tabla 3.1 Ventajas y desventajas del tratamiento anaerobio en relación al proceso aerobio (Metcalf y Eddy, 2003).

<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Requiere poco gasto energético	Se requiere un tiempo considerablemente largo para su arranque (lento desarrollo de biomasa)
Baja producción de lodos biológicos	Susceptible para generar sustancias tóxicas
Producción de Metano, fuente potencial de energía	Potencial producción de gases corrosivos y de malos olores
Empleo de reactores de menor volumen	Gran sensibilidad a la temperatura
Pocos nutrientes requeridos	No es posible la remoción de N y P biológico
Respuesta rápida a la adición de sustrato después de periodos largos sin alimentación	Puede requerir adición de álcalis

La tecnología BRAM ha demostrado ser muy efectiva al combinar la separación con membranas con un tratamiento biológico anaerobio aplicándose principalmente a efluentes industriales de alta carga (Jeison y van Lier, 2006). También se ha observado la posibilidad de utilizarlos en efluentes municipales aprovechando las ventajas de la vía anaerobia acoplados a membrana, para proporcionar una barrera absoluta a sólidos coloidales suspendidos, además de remover patógenos, parásitos y compuestos orgánicos de alto peso molecular (Herrera M, 2007). Las membranas utilizadas en los BRAM para agua de origen industrial son más propensas a taponarse por las altas cargas orgánicas y la presencia de niveles altos de materia coloidal final y precipitación inorgánica (Saddoud y Sayadi, 2007). Los componentes que forman la capa taponante incluyen materia orgánica e inorgánica como células, restos de células, proteínas, polisacáridos y cristales de estruvita. Esto incrementa los requerimientos de limpieza, dificulta las condiciones de operación y afecta también su desempeño y costo (Seghezzi y Zeeman, 1998).

### **3.3.1 Biorreactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente UASB**

Actualmente, el reactor tipo “UASB” es la tecnología más utilizada en el mundo para tratar aguas residuales de tipo industrial por vía anaerobia. Su característica principal es la retención de biomasa sin necesidad de un soporte gracias a la formación de granos de alta capacidad de sedimentación, lo que lo hace más económico y le da ventajas técnicas sobre otro tipo de reactores avanzados. En este reactor, el influente de agua residual se distribuye en el fondo para pasar en forma ascendente a través del lecho de lodos.

La principal característica de proceso de un reactor tipo “UASB”, que permite el uso de cargas orgánicas volumétricas altas comparadas con otros procesos anaerobios, es el desarrollo de un lodo granular denso. Uno de los requisitos fundamentales para el funcionamiento del reactor tipo “UASB” es la presencia de un lodo con excelentes características de sedimentación, compactación y actividad metabólica. El fenómeno que promueve la presencia de la biomasa con estas características, es el de granulación. La granulación es un proceso natural mediante el cual los microorganismos dispersos en el medio tienden a formar agregados celulares. La agregación celular en forma de granos hace que entre los microorganismos se reduzca la distancia de difusión para la transferencia de metabolitos y se favorezca la asociación celular obligatoria para la degradación de substratos. Para el desarrollo del lodo granular intervienen diferentes parámetros como la calidad del agua residual, las condiciones ambientales y de operación y un diseño adecuado del reactor (Cid, 2007)

### 3. 4 Membranas

#### 3.4.1 Clasificación de membranas:

Existen varias compañías fabricantes de membranas, que ofrecen configuraciones diferentes. Sin embargo, para obtener un rendimiento óptimo las membranas usadas en la unidad de BRM deben satisfacer los siguientes criterios (Adham *et al.*, 2001):

- Deben ser inertes y no biodegradables.
- Deben ser fáciles de limpiar y además de resistir a cambios químicos de presión y temperatura.
- Deben presentar carga negativa o ser neutras para evitar la adhesión de los microorganismos.
- Deben ser duraderas y fáciles de sustituir.
- Presentar distribución uniforme de poros y elevada densidad de éstos.

La aparición de nuevas membranas poliméricas de menor costo y mayor resistencia junto con la disminución en los requerimientos de presión, ha potenciado el uso de BRM a escala mundial. Se han usado varios tipos y configuraciones de membrana.

- De acuerdo a la forma que presenta la membrana se pueden clasificar como planas, tubulares, de disco o de fibra hueca.
- De acuerdo a su composición pueden ser orgánicas o inorgánicas. Las primeras están fabricadas de copolímeros orgánicos como polisulfona, polietersulfona, polietileno, etc. Las inorgánicas están compuestas principalmente por cerámicas.

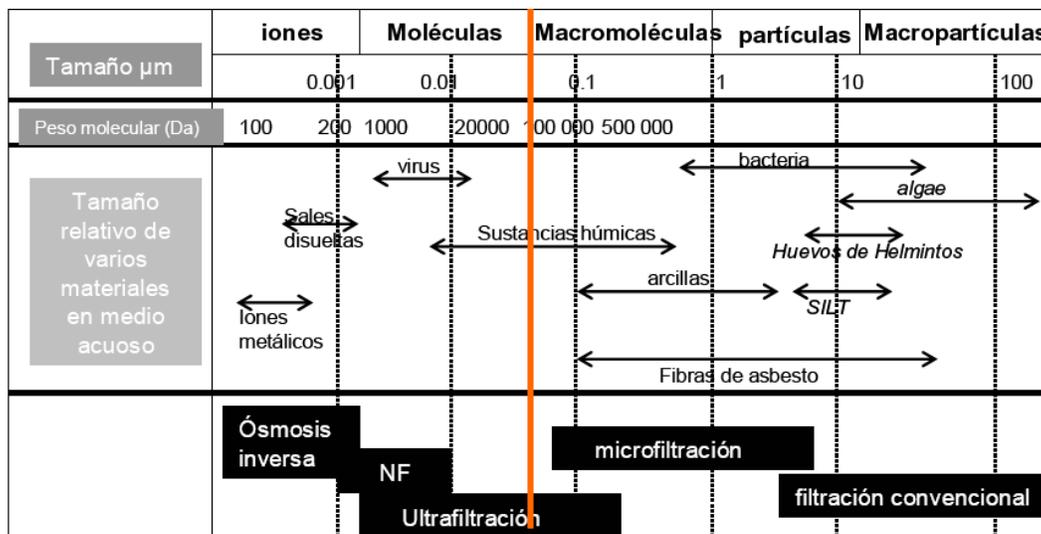


Figura 3.3 Diferentes tamaños de poro de membrana para la filtración de agua (Koch Membrane, 2007).

Como esta esquematizado en la figura 3.3, las membranas pueden tener diferente tamaño de poro y de esto depende el tipo de filtración a desempeñar. Son de Microfiltración MF (si retienen sólidos hasta 0.1 micras), de Ultrafiltración UF (si retienen partículas de hasta 0.01 micras), mientras las membranas de Nanofiltración NF tienen poros de un tamaño inferior a 0.01  $\mu\text{m}$ , lo que permite la eliminación de la mayoría de los contaminantes, excepto de ciertos iones monovalentes y moléculas de bajo peso molecular. Este tipo de membranas raramente son utilizadas en BRM, debido a su alta resistencia hidráulica (Fane y Chang, 2002), por lo que se utiliza la ósmosis inversa para otros procesos, como el ablandamiento del agua por membranas (eliminación de iones polivalentes de calcio y magnesio del agua).

### **3.4.2 Taponamiento de membrana (Membrane Biofouling):**

*Fouling* o taponamiento es el término dado a la disminución de la capacidad de filtración en la membrana debido a la acumulación sobre su superficie de partículas presentes en el agua residual. Esto ocurre por la adsorción (deposición) o intrusión de estas partículas en los poros de la membrana. La presencia de estas partículas (sólidos en suspensión y materia disuelta) tiene una gran importancia sobre el flujo de permeado. Una primera disminución del flujo de permeado viene causada por la concentración-polarización. Este término se utiliza para describir la tendencia del soluto a acumularse en la membrana. A medida que el permeado atraviesa la membrana, los solutos que contenía se quedan en las proximidades de su superficie, este soluto forma una capa de líquido estancado cuya velocidad tiende a cero. Por otro lado, los sólidos en suspensión son transportados hacia la superficie de la membrana formando una capa que reducirá la permeabilidad hidráulica y el flujo de permeado.

El taponamiento puede ser reversible e irreversible. El irreversible es el producido por las partículas que penetran en la membrana y quedan retenidas en ella, produciendo una disminución del flujo que no es posible aumentar con lavados físicos de la membrana, y generalmente es parcialmente eliminado bajo regímenes de limpieza con agentes químicos. Mientras que el reversible es el formado por la deposición de partículas sobre la superficie de la membrana, pudiendo ser eliminado mediante protocolos de limpieza físicos (Metcalf & Eddy, 2003).

Se ha observado que los principales componentes que taponan la membrana al filtrar agua residual son compuestos resultado de interacciones con la biomasa, que incluye células bacterianas, restos celulares y sustancias poliméricas extracelulares (Miura *et al.*, 2007a).

Como se esquematiza en la figura 3.4, hay una serie de pasos involucrados en el biotaponamiento. El paso inicial es el acercamiento de los microorganismos a la

superficie taponante, segundo, la adherencia de las células bacterianas a la superficie de la membrana donde están involucradas fuerzas de Van der Waals y electrostáticas. Tercero, formación de microcolonias asociadas a la síntesis y excreción de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) que estabilizan la adherencia y protege a la biopelícula de agentes biocidas y cuarto, la maduración de la biopelícula; donde se incrementa la capa taponante, la adhesión es más fuerte y las SPE forman un hidrogel. La adherencia celular es mediada por las interacciones moleculares entre las SPE y los polímeros de la membrana (Ridgway y Flemming, 1996).

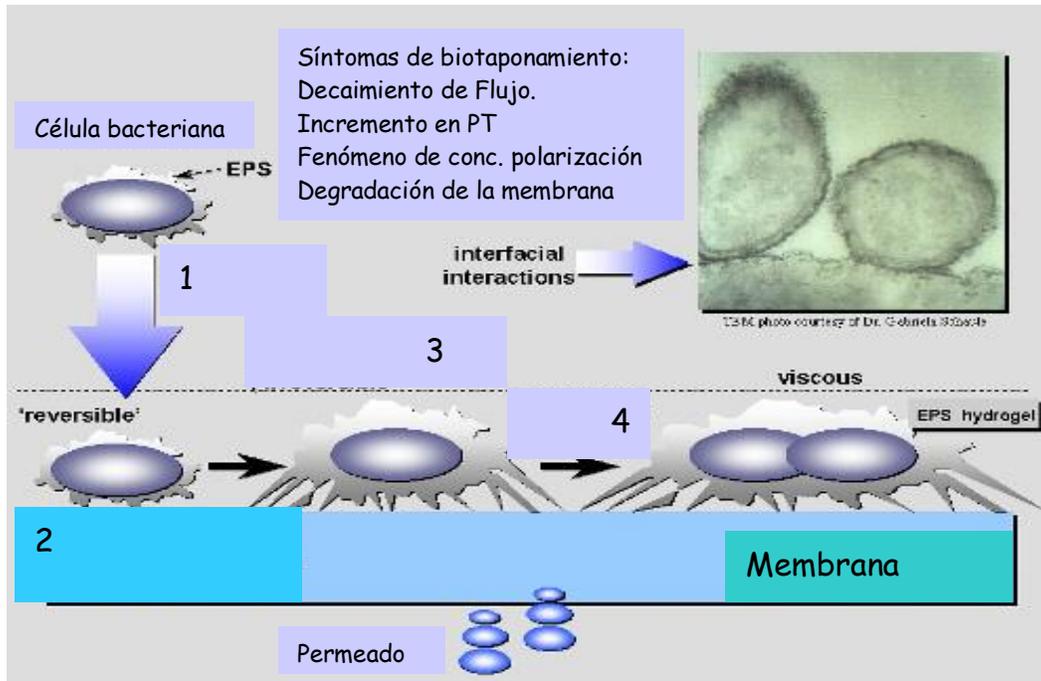


Figura 3. 4 Esquematización de de los pasos involucrados en el biotaponamiento. (Ridgway y Flemming, 1996)

### 3.4.3 Factores que afectan al taponamiento:

Los tres factores principales que afectan al taponamiento son: las características de la membrana, la biomasa y las condiciones de operación (Molina Muñoz, 2007)

- Membrana: la configuración, el material, la hidrofobicidad, la porosidad y el tamaño del poro.
- Biomasa: sólidos suspendidos del licor mezcla (SSLM), sustancias poliméricas extracelulares (SPE), el tamaño de los flocos, y la materia disuelta.
- Condiciones de operación: el flujo cruzado, la aireación, el tiempo de retención celular (TRC), el tiempo de retención hidráulico (TRH), y la presión transmembrana (PTM).

El taponamiento puede reducirse de tres formas:

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

Todas estas operaciones causan costos adicionales al proceso. Generar la turbulencia implica un costo operacional, la eliminación de partículas y reducción del flujo contribuye al costo en la inversión. Es esencial optimizar el sistema para eliminar el taponamiento o reducir los problemas producidos por él sin que esto provoque costos excesivos (Stephenson y Judo, 2000). En los BRM no es viable eliminar las partículas causantes del taponamiento por medio de un pretratamiento debido a que estas constituyen una carga importante de materia orgánica necesaria para el tratamiento biológico (Stephenson y Judo, 2000). De las dos operaciones restantes, la generación de turbulencia mediante el sistema de aireación es la forma más característica para los BRM. Por otro, la reducción del flujo, es la técnica utilizada por los biorreactores de membrana sumergida (BMS), ya que reducir el flujo conlleva operar con PTM inferiores, lo que provoca un menor ensuciamiento de las membranas.

#### **3.4.4 Limpieza de las membranas:**

Para prevenir la continua acumulación de sólidos sobre la superficie de la membrana se lleva a cabo el retrolavado (o *backwashing*) de la misma. La frecuencia de limpieza dependerá de las condiciones de operación (tiempo de operación, características del agua de alimentación, del flujo de permeado, entre otros). Por lo tanto, el retrolavado es un proceso completamente autocrítico, es decir que depende de lo que el sistema tarda para bajar en rendimiento o taponarse. Para la mayoría de los casos, el retrolavado tiene lugar cada 30-60 minutos de trabajo y dura un tiempo de 1 a 3 minutos (Buckley y Jacangelo, 1998) cuando el sistema se encuentra en funcionamiento. Si el retrolavado es insuficiente para restaurar el caudal, entonces se lleva a cabo la limpieza química de las membranas. Después de la limpieza química, se alcanza una parcial o plena restauración del caudal (o presión) a través de la membrana. La limpieza química de las membranas es requerida cada vez que el flujo de permeado disminuye un 20% respecto al original (ACA, 2003), esto viene a ser en la mayoría de los casos una vez cada 3-6 meses (Till y Mallia, 2001). Se utiliza normalmente hipoclorito de sodio (NaOCl), aunque es común que se utilicen limpiadores alcalinos para la eliminación del taponamiento orgánico, mientras que la limpieza ácida se requiere para asegurar la eliminación de precipitados inorgánicos. La limpieza química de las membranas se realiza parando el flujo de alimentación.

### **3.4.5 BRM aerobios versus BRM anaerobios:**

Los sistemas de BRM pueden ser clasificados también en dos grupos: BRM aerobios y BRM anaerobios (BRAM). Sobre estos últimos se tienen pocos estudios y la mayoría de ellos es sobre su empleo para tratamiento de agua residual industrial así como de la proveniente de destilerías de alcohol. Los BRAM se definen como una combinación entre un reactor anaerobio acoplado a una unidad de membrana (Baek y Pagilla, 2006). Estudios realizados por Harada *et al.*, (1994) y Baek y Pagilla, (2006) sugieren que los BRAM son adecuados para el tratamiento de agua residual municipal (ARM) que contiene principalmente sustancias solubles y biodegradables. Las principales ventajas de los BRAM son la posibilidad de recuperar energía gracias al biogás generado y la baja producción de lodos. Además, la remoción de nitrógeno, fósforo y amonio puede esperarse del proceso realizado con un BRAM (Baek y Pagilla, 2006). El principal problema de estos sistemas es que el taponamiento generado por las sustancias orgánicas e inorgánicas no puede ser controlado. Este problema se presenta en los dos tipos de BRMs pero por estudios realizados se ha observado que es considerablemente menor en los sistemas anaerobios (Baek y Pagilla, 2006). Para tratar de controlar el taponamiento, la mayoría de los BRM aerobios trabajan con membranas sumergidas, sin embargo, son procesos más costosos en su operación debido a la alta energía necesaria para promover la aeración (Berube y Soucy, 2004).

## **3.5 Comunidades microbianas en el desarrollo de biopelículas asociadas al tratamiento de agua residual.**

### **3.5.1 Filogenia y biodiversidad:**

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

*Filogenia* es el nombre que se da al ordenamiento sistemático de especies en grupos mayores, basados en rasgos genéticos hereditarios. La filogenia se basa en el concepto de evolución genética, que establece que cambios con aumentos en las secuencias de ADN cromosómico conducen gradualmente a especies nuevas. Para la comprensión moderna de la filogenia, es fundamental determinar un ancestro común que haya evolucionado y constituya la raíz de un árbol filogenético en el que se ubican las especies estudiadas (Rittmann y McCarty, 2001).

# Árbol Filogenético de la Vida

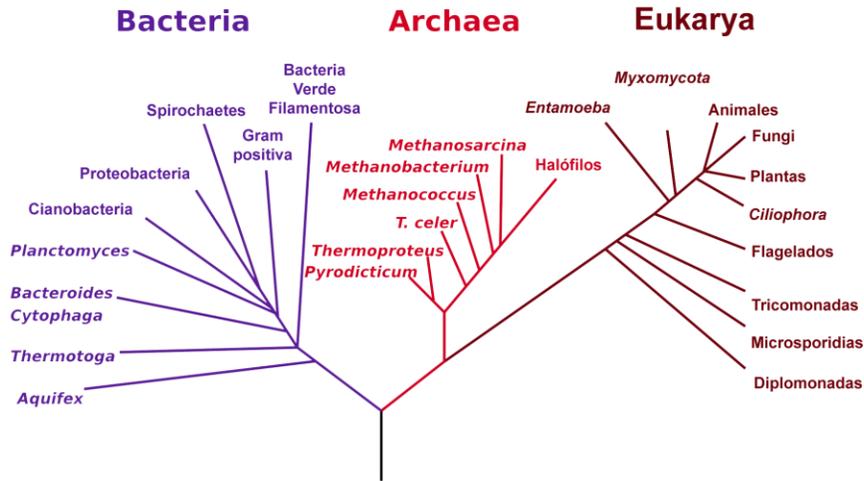


Fig 3.5. Situación de las *Archaeas* en el árbol filogenético de Carl Woese et al., 1987, basado en datos de secuencias genéticas de ARNr 16S.

## 3.5.2 Diversidad procarionta en las aguas residuales:

En un trabajo publicado por Hugenholtz et al. (1998), se analizó la presencia de los diferentes grupos filogenéticos bacterianos en diferentes ambientes, en el se proporciona la imagen que ofrece la biología molecular sobre la diversidad bacteriana en las aguas residuales. Los grupos bacterianos que se encuentran representados en un 75% en muestras de aguas residuales son: las subclases  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -*Proteobacteria*, así como microorganismos Gram-positivos de la clase *Actinobacteria*. Además de estos, aparecen representados en menor número (entre un 25-45%) las subclases  $\delta$ - *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi* y *Planctomyces*. Ciertos grupos filogenéticos bacterianos tienden a predominar en determinados ambientes, e incluso se puede hablar de microorganismos o grupos filogenéticos característicos de un ambiente concreto. Estudios realizados por Witzig et al., (2002) revelan que el grupo predominante en la comunidad de lodos de los BMS (Biorreactores de membrana sumergida) pertenece a la subclase  $\beta$ -*Proteobacteria*. Este grupo es frecuente en habitats naturales y artificiales tales como lodos activados (Wagner et al., 1993; Manz et al., 1994). En cambio, aparecen en muy baja representación las bacterias Gram-positivas con alto contenido en G+C, las subclases  $\delta$ -*Proteobacteria* y  $\epsilon$ -*Proteobacteria* y miembros del cluster *Cytophaga-Flavobacterium* (Ahmed et al., 2007). El grupo más representativo tras las  $\beta$ -*Proteobacterias* son las  $\alpha$ -*Proteobacterias* y las  $\gamma$ - *Proteobacteria* (Luxmy et al., 2000).

Las bacterias del grupo de las oxidadoras de amonio tales como *Nitrosomonas* y *Nitrospira* (Bacterias nitrificantes fase I) no aparecen altamente representadas y en cambio son bastante comunes en los sistemas de lodos activados con actividad nitrificante (Wagner *et al.*, 1995). Las especies de *Nitrospira* (nitrificante fase II) están representadas en mayor número que *Nitrobacter*, por lo que se considera que *Nitrospira* spp. es más importante en el proceso de la oxidación del nitrito de los BMS (Schramm *et al.*, 1998; Witzig *et al.*, 2002). A pesar de que haya una población característica en este tipo de sistemas, la estructura de la población microbiana de los BMS puede variar bastante dependiendo de diferentes condiciones de trabajo, sobre todo al cambiar las condiciones de limitación de nutrientes (Stamper *et al.*, 2003).

### **3.5.3 Diversidad microbiana en biopelículas.**

Las biopelículas son comunidades microbianas formadas por grupos de células retenidas en una matriz polimérica de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) que ha sido producida por los propios microorganismos, hidratada y de densidad variable, así como es continuamente permeada por canales de diversos tamaños (Costerton *et al.*, 1999). Como se ha descrito anteriormente, la formación de las biopelículas está dada en una secuencia de pasos.

Las biopelículas desempeñan un papel muy importante en el tratamiento de agua residual, ya que forman la base de diversos tratamientos tanto aerobios como anaerobios y se caracterizan por su gran eficiencia y viabilidad (Fernández *et al.*, 2007). Consecuentemente, la eficiencia del proceso es el resultado de la diversidad microbiana presente en la biopelícula. Existen gran cantidad de estudios de crecimiento de biopelículas y su consolidación en sistemas de tratamiento de aguas enfocado siempre a los parámetros operacionales, factores fisicoquímicos y propiedades del soporte en el desarrollo de dichas biopelículas (Choo y Lee, 1996). Los reportes de actividad, adhesión y biomasa de los microorganismos en biopelículas basados en técnicas de ecología microbiana son escasos (Fernández *et al.*, 2007).

### **3.6 Aplicaciones de las técnicas de biología molecular al estudio de la diversidad microbiana:**

Los conocimientos de la diversidad de los microorganismos procariontes y su papel en el mundo vivo eran muy limitados hace quince años debido a que las técnicas microbiológicas tradicionales se basaban en la observación microscópica y cultivo de los microorganismos en el laboratorio. Ahora, con el paso del tiempo estas técnicas se han mostrado insuficientes para su identificación y clasificación (Bitton G, 2005). Debido a las particularidades de los microorganismos, como son su pequeño tamaño y simplicidad estructural, la clasificación basada solamente en la observación de caracteres morfológicos es muy poco fiable. La clasificación en función de propiedades fisiológicas y bioquímicas es insuficiente, puesto que se estima que un 99% de la totalidad de los distintos microorganismos que existen en

la naturaleza son viables pero no cultivables, esto es que en su hábitat son activos pero que no han sido jamás aislados ni cultivados en condiciones de laboratorio (Muyzer, 1999).

Esto se debe en gran parte a la falta de conocimientos sobre los requerimientos reales de los mismos en condiciones naturales, que impide emular estas condiciones en el laboratorio, así como al desconocimiento de posibles interdependencias entre organismos en sus hábitats naturales (Muyzer y Smalla, 1998). Por tanto, la diversidad Procarionta conocida representa sólo la punta de un iceberg, y en las últimas dos décadas se ha hecho manifiesta la necesidad de introducir nuevas técnicas, llamadas herramientas moleculares, que proporcionen el complemento necesario a los métodos microbiológicos tradicionales para poder obtener información más precisa sobre la importancia de la diversidad bacteriana en el mantenimiento de los ecosistemas (Molina Muñoz, 2007).

### **3.6.1 Técnicas de biología molecular para la detección específica de microorganismos, independientes de cultivo**

El desarrollo de la biología molecular ha permitido el estudio de la diversidad Procariota desde un punto de vista diferente: el nivel genético. La taxonomía moderna tiende a agrupar los microorganismos en función de la similitud entre sus genes, que a la vez es un reflejo de su proximidad evolutiva (Woese. 1987). Hablando de modo general, los métodos de identificación a nivel de ADN generan una huella dactilar genética de los microorganismos que, de manera similar a un código de barras, resulta útil para su identificación y clasificación. Se han diseñado múltiples métodos agrupados en diferentes categorías, que difieren en su fundamento, poder de discriminación, rango taxonómico al que son aplicables, reproducibilidad y así conseguir su interpretación y estandarización (Vanechoutte, *et al.*, 1996; Savelkoul *et al.*, 1999; Muyzer, 1999; Dabert *et al.*, 2002; Sáenz y Köchling, 2007).

Para el monitoreo de la dinámica de población de las comunidades microbianas, estas herramientas moleculares pueden ser agrupadas en dos categorías: sondas moleculares; que son usadas con mayor eficiencia cuando se tiene un conocimiento previo de la población microbiana existente en la muestra, y análisis de fragmentos de ADN, que no tiene como prerrequisito conocer la estructura de la comunidad microbiana antes de realizar el estudio (Fig. 3.6).

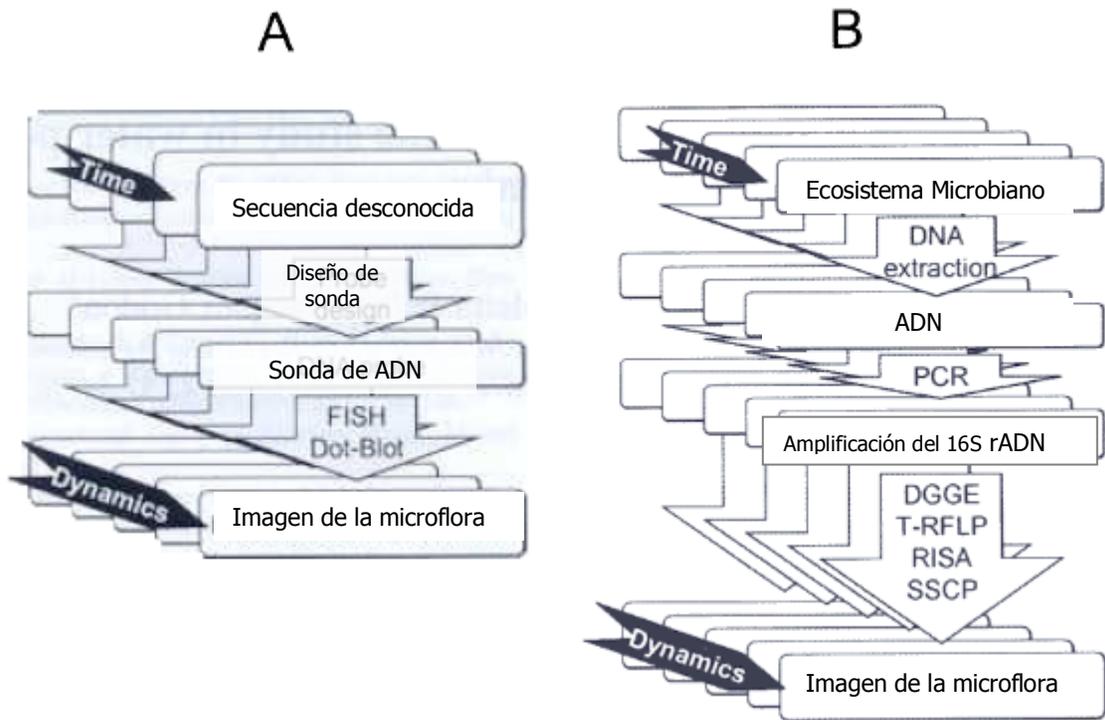


Fig. 3.6 Esquema de las estrategias moleculares utilizadas para el análisis de comunidades microbianas con sondas moleculares (A) o con técnicas de huella genética de ADN (B) (Dabert *et al.*, 2002)

La categoría de técnicas de sondas moleculares incluye la de Hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) y la de Dot-Blot. La técnica de FISH utiliza sondas marcadas con fluorescencia para detectar ARNr 16S dentro de la célula. El grado de conservación de la secuencia marcada por la sonda determina la distancia filogenética del grupo de microorganismos. Pueden diseñarse sondas con dominios específicos para especies, géneros, familias y órdenes (Amann *et al.*, 1995). La principal ventaja de la técnica de FISH comparada con otras técnicas es que se puede determinar directamente la abundancia de los microorganismos detectados y si estos son activos (Amann *et al.*, 2001). En la figura 3.7 se esquematiza la metodología necesaria para desarrollar el estudio.

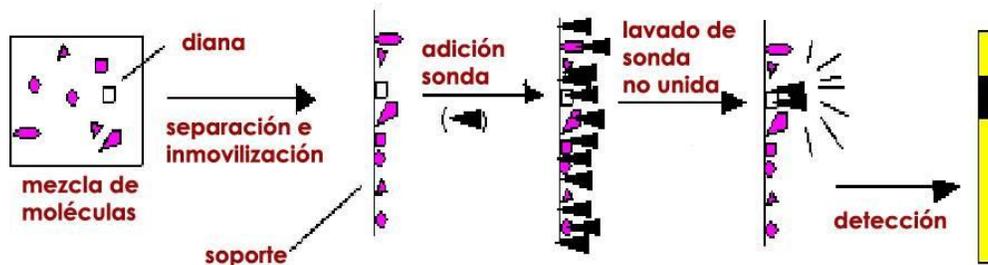


Fig 3.7. Técnica de Hibridación *in situ* de Fluorescencia aplicada a muestras ambientales (Sekiguchi *et al.*, 1999).

En el campo de estudio de muestras ambientales, la técnica FISH ha sido aplicada ampliamente (Amann *et al.*, 2001). Esta técnica presenta también una serie de desventajas, como la ausencia de la señal con sondas específicas cuando realmente están presentes los microorganismos diana, esto puede ser por varias limitaciones de la técnica como: el requerimiento de  $10^3$ - $10^4$  células/ml. Para evitar esto, se pueden filtrar las muestras acuáticas (Pernthaler *et al.*, 2002) o tratar la muestra con un paso de enriquecimiento para favorecer el crecimiento celular (Fang *et al.*, 2003). Por lo tanto, modificará el número inicial y real de las bacterias estudiadas. Otra limitación de esta técnica viene dada por la aparición de falsos negativos, debidos a la impermeabilidad de la sonda provocada por los pasos de fijación anteriores de la célula y la baja concentración de moléculas de ARNr se ha detectado como otra limitación para esta técnica.

Con la técnica de "Dot-blot" los ácidos nucleicos previamente extraídos de la célula, se fijan en una membrana y se hibridan con sondas marcadas radioactivamente (Raskin *et al.*, 1994). Los resultados usualmente se expresan como una porción de los microorganismos detectados con sondas específicas comparado con el total de la población detectada con sondas universales.

La segunda categoría, técnicas de huella genética molecular, se basa en tratar de obtener una aproximación más extendida para el estudio de la diversidad microbiana a nivel genético. Para ello, se basa en la clonación y secuenciación del gen ADNr 16S que codifica para la subunidad ribosómica bacteriana. Este gen cumple con los requisitos para actuar como una buena sonda evolutiva dado que se trata de un gen de distribución universal que posee una función constante y que cambia con suficiente lentitud como para permitir detectar relaciones muy antiguas y de un tamaño relativamente pequeño (1.5 kb) además, tiene una estructura de mosaico que presenta alternancia entre regiones hipervariables altamente conservadas en el reino Procariota, lo que ha facilitado su secuenciación, especialmente antes de la introducción generalizada de los métodos de secuenciación automática a partir de mediados de los años 90. (Dabert *et al.*, 2002)

Gracias a esa estructura, este gen ha permitido el diseño de cebadores universales (*primers*) para la aplicación de estrategias de PCR (Weisburgh *et al.*, 1991) que posibilitan la clonación de fragmentos de los ADNr 16S de microorganismos a partir de ADN total extraído de muestras naturales permitiendo así profundizar en el conocimiento de la diversidad de las comunidades microbianas en los ecosistemas naturales (Muyzer y Smalla, 1998).

El conjunto de las técnicas basadas en huellas genéticas de ADN tiene como punto de partida común, la necesidad de extraer el ADN de las muestras a estudiar y la amplificación de estos fragmentos por PCR. Después de esto, el patrón de bandas se traduce en la separación de los fragmentos de ADN amplificados, así esta separación puede basarse en varios aspectos:

- en las diferencias conformacionales entre estas moléculas, observables tras la migración a través de un gradiente de desnaturalización químico (DGGE, *Denaturing gradient gel electrophoresis*) o térmico (TGGE, *Temperature gradient gel electrophoresis*)
- en el polimorfismo de la conformación de la hebra sencilla de ADN de estas moléculas (SSCP, *Single strand conformation polymorphism*)
- en la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD, *Random amplified polymorphic DNA*)
- en el polimorfismo en longitud de fragmentos de ADN, mismo que se obtiene de manera artificial por digestión enzimática con endonucleasas de restricción (RFLP, *Restriction fragment length polymorphism*; ARDRA, *Amplified ribosomal DNA restriction analysis*; T-RFLP, *Terminal-restriction fragment length polymorphism*), o de manera natural mediante la amplificación de genes o espacios intergénicos con tamaño variable entre las distintas especies bacterianas (RISA, *rDNA internal spacer analysis*) (Dabert *et al.*, 2002)
- en la carga eléctrica de estas moléculas, modificada por medio de una cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento, junto con reactivos químicos (DHPLC, *Denaturing High-performance Liquid Chromatography*). Este método es relativamente nuevo por lo cual no se ha aplicado aún en digestión anaerobia (Nocker *et al.*, 2007).

Aunque como ya se ha mencionado anteriormente que existen diversas técnicas dependiendo de las necesidades del estudio, una de las técnicas de huella genética de elección para los estudios de biodiversidad en muestras ambientales, por el alto porcentaje de microorganismos que pueden ser no cultivables es la de DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante) o TGGE (electroforesis en gel con gradiente de temperatura). Esta técnica fue introducida 1993 por Muyzer *et al.* y permite la separación de fragmentos de ADN de igual tamaño dependiendo de la composición en bases de los mismos. El fundamento de la técnica TGGE se basa en la influencia de la composición de las bases de cada molécula de ADN en la temperatura a la cual dicha molécula se desnaturaliza (temperatura de fusión) y en la disminución de la velocidad electroforética de las moléculas de ADN de doble cadena cuando se encuentran parcialmente desnaturalizadas. Cuando la electroforesis del ADN se realiza en geles de poliacrilamida bajo un gradiente lineal de temperaturas, las moléculas con distinta secuencia se desnaturalizan a distintas temperaturas, y por tanto se detienen en su migración electroforética en distintas posiciones en el gel (Muyzer y Smalla, 1998; Muyzer, 1999). La técnica es tan sensible que, mediante previa puesta a punto y ajuste de las condiciones, permite separar secuencias que

difieran en un único par de bases, así mismo es posible el estudio de grupos concretos de microorganismos mediante el diseño de cebadores (*primers*) específicos para amplificar el ADNr 16S de un determinado grupo microbiano (ej: bacterias filamentosas) y es posible también diseñar cebadores para la amplificación de un gen exclusivo de un grupo microbiano de interés (ej: bacterias nitrificantes, desnitrificantes, etc).

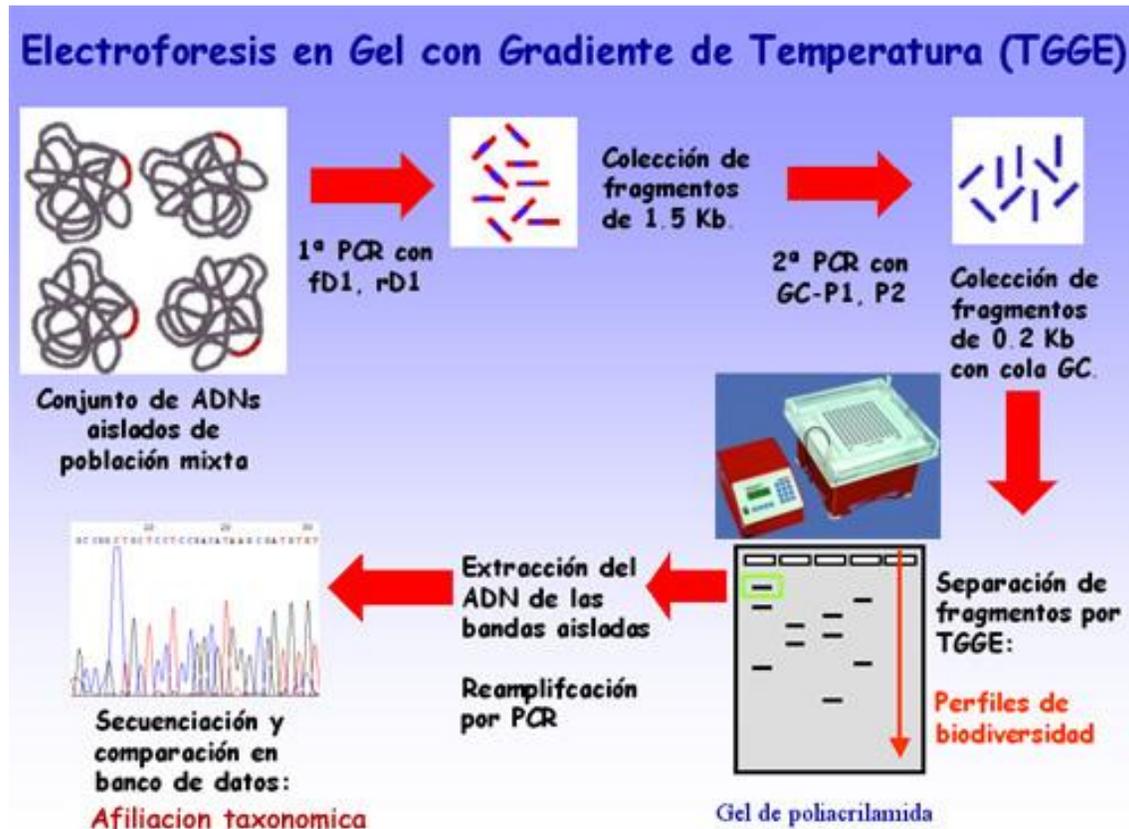


Fig 3.8 Esquema del análisis de la microbiota basado en estudios de TGGE (Molina-Muñoz, 2007).

### 3.7 Filogenia y diversidad del dominio *Archaea*

En los años 70 el Dr. Carl Woese y sus colegas en la universidad de Illinois estudiaron las relaciones entre los microorganismos procariontes usando secuencias de DNA, y encontraron que había dos grupos muy diferentes lo que sorprendió a la comunidad científica. Esas "bacterias" (como se les llamó inicialmente) vivieron en altas temperaturas y produjeron metano para su subsistencia, características generalmente lejanas a las bacterias y eucariontes. Debido a esta diferencia genética, Woese y colaboradores (1987) propusieron que la vida estaría dividida en tres dominios: *Eucariota*, *Bacteria*, y *Archaea*.

El dominio *Archaea* está formado por un grupo heterogéneo de microorganismos capaces de habitar ambientes extremos. Entre sus características distintivas destacan las siguientes (Bullock *et al.*, 2000)

- Carecen de ácido murámico como constituyente de la pared celular.
- Presentan morfología muy similar a la de bacterias pero modificadas, ya que presentan formas poligonales o muy irregulares.
- Poseen membranas lipídicas que contienen cadenas laterales isoprenoide con enlace éter.
- No catabolizan la glucosa mediante glicólisis, sino que lo hacen por oxidación simple.
- La maquinaria de transcripción es muy similar a la que poseen los organismos del dominio *Eucariota*.

Con base en sus propiedades metabólicas y ecológicas, Woese, 1987 diferenció los tres primeros fenotipos de *Archaeas*; **Metanógenos**; microorganismos estrictamente anaerobios y productores de metano, **Halófilos**; microorganismos capaces de vivir en lugares con concentraciones salinas saturantes y **Termoacidófilos**; microorganismos aerobios que viven en ambientes ácidos y con altas temperaturas. Hasta hoy, muchos más fenotipos han sido descubiertos, como los hipertermófilos, anaerobios, alcalófilos y neutrófilos. Finalmente, estudios basados en la amplificación del ARNr 16S por PCR ha puesto de manifiesto la existencia de *Archaeas* mesofílicas en diferentes ambientes, como mares y suelos principalmente y cuyo fenotipo es todavía desconocido. En la figura 3.9 se muestra la filogenia del dominio *Archaea* basados en el ARNr 16S, así los triángulos grises incluyen secuencias de especies cultivables y no cultivables y los blancos sólo secuencias de especies no cultivables (Forterre *et al.*, 2002).

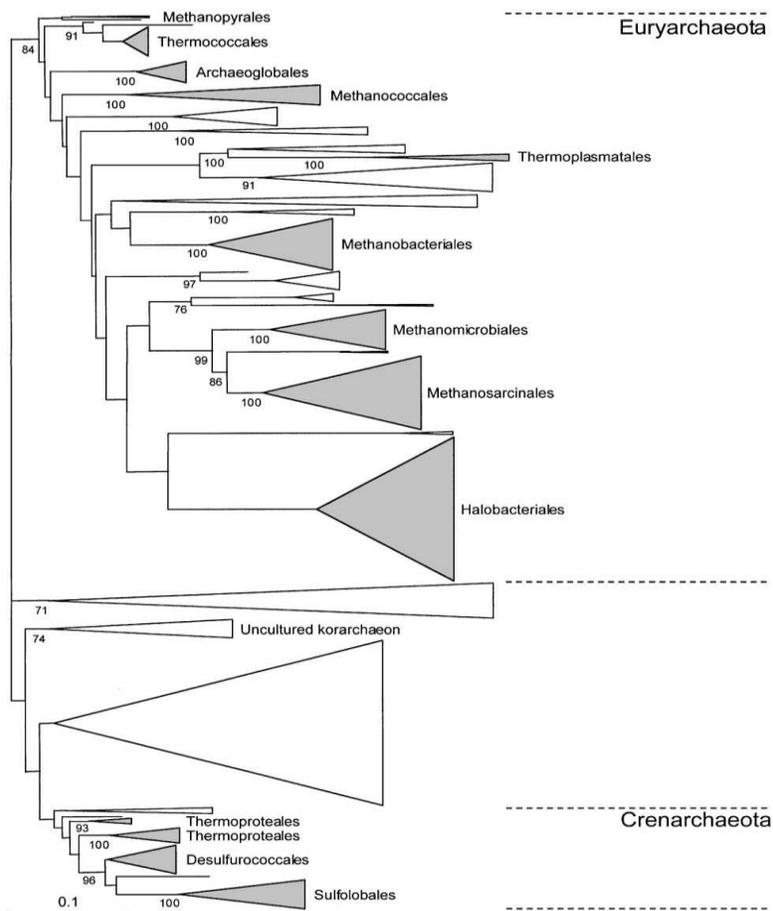


Fig 3.9 Filogenia del Dominio *Archaea* basados en el ARNr 16S de especies cultivables y no cultivables (Forterre *et al.*, 2002).

De acuerdo con las comparaciones del ARNr 16S, el dominio *Archaea* se divide principalmente en cuatro phyla (Woese, 1987).

- *Crenarchaeota*: comprendido por las *Archaeas* hipertermófilas y termoacidófilas, comprenden el 20% del fitoplancton de mares, sedimentos marinos y algunos suelos. (Forterre *et al.*, 2002).
- *Euryarchaeota*: abarca un amplio rango ecológico comprendido por metanógenos, halófilos extremos y *Thermoplasma* (Brown *et al.*, 2001)
- *Korarchaeota*: Es un pequeño grupo de hipertermófilas identificado a partir de secuencias del ARNr 16S de muestras obtenidas de fuentes termales de organismos no aislados. Filogenéticamente diferentes a las *Crenarchaeotas* y se consideran las archaea más primitivas.
- *Nonarchaeota*: Es un taxón especialmente creado para la especie *Nanoarchaeum equitans*, un microorganismo simbiote hipertermófilo de 400nm de diámetro que ha sido encontrado asociado a otra *Archaea* localizada en chimeneas submarinas, descubierta en 2002.

Es importante mencionar que, aunque los dos primeros phyla están firmemente establecidos, los dos restantes comprenden pocas especies escasamente conocidas. Dado el poco conocimiento actual sobre las especies de este dominio, el número de filos puede aumentar con rapidez. Muchos de estos grupos hipotéticos son conocidos por una única secuencia de ARNr, lo que indica que la gran mayoría de la diversidad de estos organismos sigue siendo completamente desconocida (Forterre *et al.*, 2002).

### **3.8 Aplicación de herramientas moleculares al estudio de los microorganismos de los biorreactores de membrana.**

La utilización de las herramientas moleculares al campo de estudio ambiental, ha ido aumentando con el paso de los años. Actualmente, varios grupos de investigación las aplican para tener mayor información del problema presentado y poder encontrar posibles soluciones en base a las dinámicas de población encontradas.

En el rubro del estudio de los biorreactores, ya sean aerobios o anaerobios la mayoría de las publicaciones están enfocadas en los parámetros fisicoquímicos y operacionales para el tratamiento del agua, tal es el caso de los grupos de Ivnitsky *et al.*, 2007, Miura *et al.*, 2007b, Arros-Alileche *et al.*, 2008 y otros más.

Para los BRM aerobios, se reportan diversos estudios de autopsia de las membranas acopladas al biorreactor y que son taponadas. En ellos se reporta la estructura de la biopelícula por medio de microscopía electrónica y se describe la microbiota encontrada por técnicas de biología molecular (Miura *et al.*, 2007a). No es así el caso para los biorreactores de membrana anaerobios y mucho menos si estos tienen acopladas una unidad de membrana externa, como trata esta tesis dado que el campo de investigación es muy reciente y escaso. La mayoría de los trabajos publicados sobre biorreactores de membrana anaerobio se concentran en estudiar la dinámica de poblaciones a los lodos del biorreactor (Sáenz *et al.*, 2007; Briones *et al.*, 2007) o de membranas que tratan efluentes sintéticos y, en la mayoría de los casos, se trata de biorreactores a escala laboratorio (Herrera, 2006). Este último, Herrera M. (2006) se basa en el estudio del taponamiento de membranas acopladas a un biorreactor anaerobio escala laboratorio alimentado en una primera etapa con agua residual cruda y posteriormente con agua sintética. En él se concluye que el biotaponamiento de la membrana filtrante, ocurre como un fenómeno natural, por lo cual, es importante entender el proceso de formación y sus propiedades, centrándose en el análisis de la estructura y de la microbiota que forma la biopelícula taponante. Así, el siguiente paso en esta línea de investigación es continuar estos estudios y desarrollar estrategias de limpieza con el fin de aumentar el tiempo de vida de la membrana filtrante o bien, desarrollar nuevos materiales que eviten este fenómeno.

## **JUSTIFICACIÓN:**

Se sabe que las biopelículas son las principales causantes del taponamiento de membranas filtrantes para el tratamiento de agua residual. Sobre el biotaponamiento de membranas acopladas a biorreactores anaerobios se tienen muy pocos estudios publicados, por lo que este trabajo de investigación pretende aportar al conocimiento a nivel microbiológico de la estructura y composición de estas biopelículas. Con ello se podrá avanzar en el desarrollo de estrategias para el control del taponamiento en estos sistemas.

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

Con el fin de contribuir en el estudio de posibles efectos en el taponamiento de membranas acopladas a biorreactores anaerobios, es necesario analizar la diversidad de la comunidad microbiana presente en la biopelícula taponante utilizando herramientas de biología molecular.

## **6. OBJETIVOS:**

### **6.1 GENERAL**

1. Caracterizar la microbiota presente en una película taponante formada en una membrana filtrante acoplada a un biorreactor anaerobio.

### **6.2 ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar el efluente del BRAM piloto con el fin de identificar las características del agua que va a ser filtrada por las membranas acopladas.
2. Identificar a los microorganismos asociados al material taponante utilizando las herramientas moleculares PCR y TGGE para *Bacteria* y *Archaea*.
3. Estudiar por Hibridación *in situ* de Fluorescencia (FISH) la comunidad bacteriana presente en la biopelícula.

## 7. HIPÓTESIS:

Los microorganismos presentes en la biopelícula taponante formada en la membrana filtrante acoplada a un biorreactor anaerobio serán aquellos que tengan gran capacidad de secretar sustancias poliméricas extracelulares que constituyan parte del factor responsable del taponamiento.

Las *Archaea* responsables del taponamiento de las membranas filtrantes alimentadas con efluente UASB serán aquellas que tienen un papel relevante en la cama de lodos del biorreactor anaerobio.

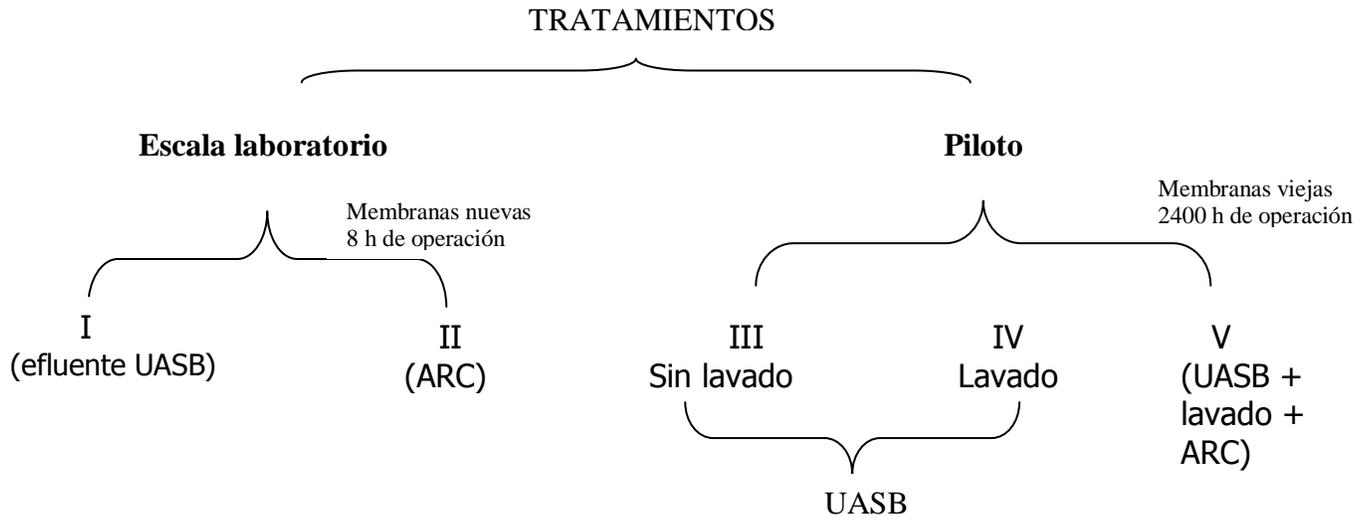
Una parte de la microbiota presente en la biopelícula taponante estará constituida por microorganismos no cultivables y desconocidos.

Los compuestos recalcitrantes que no lograron ser retenidos en la cama de lodos del biorreactor UASB, estarán embebidos en la biopelícula taponante.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS:

### 8.1 Biorreactor anaerobio con membranas acopladas

Para el estudio se utilizaron cinco lotes de membranas que fueron sometidas a diferentes tratamientos.



Esquema 8.1 Diferentes tratamientos evaluados.

Dos lotes de membranas fueron evaluados, el primero que corresponde a los tratamientos I y II escala laboratorio, y el segundo lote proveniente del piloto, comprendido por los tratamientos III, IV y V. Los tratamientos I y II correspondieron a membranas nuevas, alimentadas ambas durante 8 horas de operación. El tratamiento I se alimentó con efluente UASB y el II con agua residual cruda (ARC). Esto se realizó en el laboratorio de Bioprocesos ambientales del Instituto de Ingeniería como se muestra en la figura 8.1



Fig 8.1 Módulo de filtración a escala laboratorio, comprendido por una bomba peristáltica, tanque de recirculación, membrana de ultrafiltración de PVDF de 20 cm y un controlador.

Los tratamientos III, IV y V, contenidos en el segundo lote, provinieron del módulo acoplado a un reactor tipo UASB escala piloto, con diámetro interno de 0.53 m y una altura de 4m. El nivel de agua se ubicó a 3.85 m, dando un volumen útil de  $0.849\text{m}^3$ . El Biorreactor tenía colocada la unidad externa de membrana tubular de ultrafiltración fabricada por la empresa Koch Membrane Systems (USA). El arreglo de membranas se integró con 6 módulos tubulares de 3 m de longitud cada uno. A su vez, cada módulo contenía 7 membranas tubulares de ultrafiltración con un diámetro de 0.0127 m (0.5 pulgadas) dentro de un tubo de diámetro de 0.038 m (1.5 pulgadas) dando en conjunto el área necesaria para el filtrado requerido ( $5.02\text{m}^2$ ). El material de la membrana fue fluoruro de polivinildieno (PVDF) con tamaño de poro para partículas con peso molecular de 100 000 Da. La conformación del sistema se muestra en la figura 8.2. La instalación piloto se ubicó en la planta de tratamiento de Ciudad Universitaria.



Fig 8.2 Biorreactor anaerobio tipo UASB acoplado al módulo de Membrana.

Los tratamientos III y IV correspondieron a membranas que fueron alimentadas previamente con efluente UASB piloto (2400 horas de operación), el IV fue extemporáneamente sometido a un proceso de lavado con  $\text{HClO}$  300 ppm. El tratamiento V, además de las horas de operación con efluente UASB y lavado, posteriormente las membranas fueron alimentadas con ARC.

Los módulos fueron retirados del módulo de membrana acoplado al biorreactor. Las membranas (3 m de largo y 1 cm de diámetro) fueron desmontadas y cortadas en fragmentos de 15 cm, para ser almacenadas a -80 °C y en glutaraldehído a -4 °C para los análisis de microscopía electrónica.

Con el objetivo de caracterizar el agua que alimentaría a las membranas de UF acopladas al biorreactor UASB, se realizaron las siguientes determinaciones.

## **8.2 Análisis específico del influente y efluente del biorreactor UASB**

Se realizó la caracterización fisicoquímica del influente y efluente UASB de la planta piloto durante cinco días realizando el análisis por triplicado. Para cada muestra se midieron DQO total y soluble, sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos y pH.

Se identificaron los metales presentes en el influente y efluente del Biorreactor. Las determinaciones se realizaron en el laboratorio de química analítica de la UAM-Azcapotzalco para los metales: calcio, hierro y magnesio, por absorción atómica. El equipo utilizado fue un GF95 THERMO AA, serie M650192v1.23 con una longitud de onda  $\lambda = 422.7$  nm, corriente de lámpara 75%. Flujo de combustible 4.5, altura de mechero 9.4 y se utilizó llama de óxido nitroso-acetileno.

Para la preparación de las muestras se utilizaron dos métodos diferentes; uno para metales disueltos y otro para totales:

- Totales: 25 mL de muestra + 3 mL de  $\text{HNO}_3$  se sometió a digestión por 20 min y se aforó a 100 mL.
- Disueltos: 30 mL de muestra se agitó por 20 min en el orbital, después de 5 min en el ultrasonido, se centrifugó y se filtró (0.45  $\mu\text{m}$ ). A 25 mL de muestra previa se le adicionaron 0.5 mL de  $\text{HNO}_3$  y se aforo a 100 mL.

Se trataron dos blancos de la misma forma, las muestras se realizaron por triplicado. El factor de dilución fue de 1:5 con excepción de los blancos. Además se realizaron curvas de calibración para cada metal.

Dentro de este análisis específico del efluente del biorreactor UASB se realizó la determinación del tamaño de partícula. Este análisis se realizó en el II-UNAM por principio Coulter. El aparato utilizado para la determinación tiene un límite mínimo de detección de partículas con tamaño de 0.6 micrómetros. Las muestras se tomaron del efluente UASB por cinco días y se filtraron primero por un filtro de 80  $\mu\text{m}$ , después por uno de 30  $\mu\text{m}$  y finalmente por uno de 20  $\mu\text{m}$ . La determinación se realizó en un volumen de 50  $\mu\text{L}$ .

### **8.3 Análisis específico a las membranas**

#### **8.3.1 Estudio de las comunidades bacterianas.**

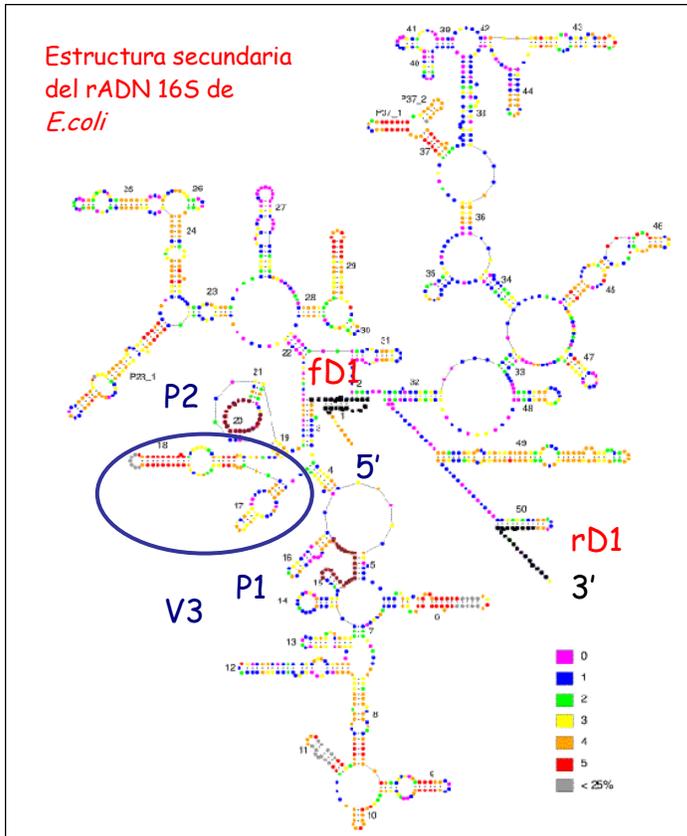
Para el estudio de la comunidad microbiana de la biopelícula formada en las membranas sometidas a diferentes tratamientos, se eligió trabajar con el gen codificante del ARN ribosómico 16S de la región hipervariable V3 (*Bacteria*) y V6 (*Archaea*). Se utilizó la técnica de electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TGGE). Para ello se realizaron unos pasos previos, que consistieron en:

- Extracción del ADN bacteriano total de las muestras procedentes de las membranas por el kit GENETIC -ID®, USA.
- Amplificación específica de los fragmentos del gen codificante del ARN ribosómico 16S (ADNr 16S) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Separación de los fragmentos de distinta secuencia de ADN mediante TGGE.
- Reamplificación por PCR de los fragmentos separados e identificación de las poblaciones mediante secuenciación de ADN.

#### **Amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S**

Las muestras de ADN se sometieron a una reacción de PCR anidada, donde se realizaron dos reacciones consecutivas de amplificación. En la primera PCR, se amplificó una región correspondiente a casi la totalidad del gen codificante del ARNr 16S (aproximadamente 1.5-1.6 Kb), y en la segunda PCR, una región interna de menor tamaño, aproximadamente 0.2 Kb correspondiente a la región hipervariable V3 para el caso de *Bacterias* y *Archaeas*, y de 0.5 Kb para *Archaeas* de la región hipervariable V6. Nucleótidos 341 al 534, numeración de *Escherichia coli* (Muyzer *et al.*, 1993). Se empleó la estrategia de PCR anidada con la finalidad de obtener un mayor rendimiento en la amplificación, ya que evita la unión inespecífica de los cebadores, mejora la amplificación de poblaciones presentes en bajo número, y permite obtener patrones de bandas más completos (Nicolaisen y Ramsing, 2002; Ward y O'Mullan, 2002).

Para la primera PCR en el caso de *Bacterias* se emplearon los cebadores universales fD1 y rD1 (Weisburg *et al.*, 1991), para la segunda PCR se emplearon los cebadores universales GC-P1 y P2 (Muyzer *et al.*, 1993). La secuenciación del cebador GC-P1 está basada en una región conservada del gen a la que se añade una cola de cuarenta pares de bases ricas en GC, necesarias para la separación correcta mediante TGGE (Muyzer *et al.*, 1993). En la figura 8.3 se muestra un esquema del procedimiento completo seguido. La secuencia de todos los cebadores empleados se muestra en la tabla 8.1.



### Estrategia de PCR anidada

1. Amplificación de la secuencia casi completa del ARNr 16S:

1.5 Kb con cebadores universales fD1 y rD1 (Weisburg et al. 1990)

fD1 →



2. Amplificación de la región hipervariable V3:

Nucleótidos 341 a 534 (0.2 Kb) de la secuencia de *E. coli*, con cebadores universales GC-P1 y P2 (Muyzer et al. 1993).

GC-P1 →



cola GC fragmento de ADNr 16S

Figura 8.3 Esquema de la reacción de PCR anidada, donde se realizaron dos reacciones consecutivas de amplificación.

Tabla 8.1. Cebadores utilizados para las reacciones PCR.

Cebadores	SECUENCIA (5' a 3')	REGIÓN
fD1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGTATCCTGGCTCAG	V3
rD1	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC	V3
P1	ACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG	V3
GC-P1	<b>CGCCC GCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGGC</b> CTACGGGAGGCAGCAG	V3
P2	ATTACCGCGGCTGCTGG	V3
PARCH 340 F	ACGGGGGGCCCTACGGGGYGCASCAG	V3
GC- PARCH34 0F	<b>CGCCC GCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGGC</b> CCTACGGGGYGCASCAG	V3
PARCH 519R	TTACCGCGGCKGCTG	V3
ARCH 915F	AGGAATTGGCGGGGGAGCAC	V6
GC- ARCH915 F	<b>CGCCC GCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCAGGAATTGGC</b> GGGGGAGCAC	V6
UNI-b- REV	GACGGGCGGTGTGTRCAA	V6

La primera reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50  $\mu$ L. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos fueron una modificación de los descritos por Vinuesa *et al.*, (1998) para Bacteria.

En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos que se indican en la tabla 8.2.

El programa de PCR se desarrolló empleando el termociclador MCE-2400 (MasterCycler Eppendorff®) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 95 °C durante 7 min
2. 25 ciclos que constan de:
  - A: Desnaturalización: 94 °C durante 1 min y 10 s
  - B: Hibridación: 56 °C durante 40 s.
  - C: Extensión: 72 °C durante 2 min.
3. Extensión final: 72 °C durante 6 min y 10 s
4. Conservación a 4 °C

**Tabla 8.2. Reactivos empleados en la primera reacción de la PCR anidada, efectuada en un volumen final de 50  $\mu$ L.**

Reactivo	Concentración final
PCR Buffer Gold 10x (Applied Biosystems)	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM (Applied Biosystems)	2.0 mM
Seroalbúmina bovina 10 mg/ml (N E Biolabs)	12.5 $\mu$ g
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Roche) 10 mM	20 nM
Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma) 5%	2.5 $\mu$ L
Cebador fD1 100 $\mu$ M (Sigma)	200 $\mu$ M
Cebador rD1 100 $\mu$ M (Sigma)	200 $\mu$ M
Ampli Taq Gold polimerasa (Applied Biosystems)	2 U
ADN molde	30 ng
Agua bidestilada grado PCR	Cbp

Tras la reacción, se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ L y se visualizaron en gel de agarosa al 0.8 %, para confirmar la amplificación del tamaño esperado (1.5- 1.6 Kb). Una vez comprobadas, las muestras fueron sometidas a una segunda PCR con el objetivo de amplificar la región V3. La segunda reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50  $\mu$ L. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos fueron una modificación de la técnica *touch down* descrita por Watanabe *et al.*, (1998). En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos que se indican en la tabla 8.3.

**Tabla 8.3. Reactivos empleados en la segunda reacción de la PCR anidada, efectuada en un volumen final de 50  $\mu$ L.**

Reactivo	Concentración final
PCR Buffer Gold 10x (Applied Biosystems)	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM (Applied Biosystems)	2.0 mM

Seroalbúmina bovina 10 mg/ml (N E Biolabs)	12.5 µg
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Roche) 10 mM	20 nM
Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma) 5%	2.5 µL
Cebador GC-P1 100 µM, purificado mediante HPLC (Sigma)	200 µM
Cebador P2 100 µM, purificado mediante HPLC (Sigma)	200 µM
Ampli Taq Gold polimerasa (Applied Biosystems)	2 U
ADN molde	30 ng
Agua bidestilada grado PCR	Cbp

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

1. Desnaturalización inicial: 94°C durante 7 min

2. Treinta ciclos que consisten en:

Desnaturalización: 94°C durante 1 min

Hibridación: 65°C durante 1 min

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

Extensión: 72°C durante 2 min

3. Extensión final: 72°C durante 10 min

4. Mantenimiento a 4°C

Tras la reacción se tomaron alícuotas de 1 µl que se comprobaron en un gel de agarosa al 2 %, para confirmar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado (0.2 Kb).

En el caso de *Archaea*, la estrategia fue similar, ya que se realizó en la segunda PCR una reacción anidada. La diferencia es que cambian tanto los programas como las reactivos y cantidades para efectuar las reacciones entre la región V3 y V6. Esto se explica en las tablas 8.4, 8.5, 8.6 y 8.7.

**Tabla 8.4 Reactivos empleados en la primera reacción de la PCR anidada, efectuada en un volumen final de 50 µL para la región V3 de *Archaeas*.**

Reactivo	Volumen µl
PCR Buffer Gold 10x (Applied Biosystems)	1.5X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM (Applied Biosystems)	2.0 mM
Seroalbúmina bovina 10 mg/ml (N E Biolabs)	12.5 µg
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Roche) 10 mM	20 nM
Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma) 5%	2.5 µL
Cebador PARCH 340F100 µM (Sigma)	300 µM
Cebador PARCH519R 100 µM Purificado por HPLC (Sigma)	300 µM
Ampli Taq Gold polimerasa (Applied Biosystems)	1.0 U
ADN molde	50 ng
Agua bidestilada grado PCR	Cbp

El programa de PCR se desarrolló empleando el termociclador MCE-2400 (MasterCycler Eppendorff®) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 95°C durante 7 min
2. 30 ciclos que constan de:
  - A: Desnaturalización: 94°C durante 1 min
  - B: Hibridación: 58°C durante 90 s.
  - C: Extensión: 72°C durante 2 min.
3. Extensión final: 72°C durante 7 min.
4. Conservación a 4°C

Tras la reacción se tomaron alícuotas de 1 µL que se visualizaron en un gel de agarosa al 2 %, para confirmar la amplificación del tamaño esperado (0.2 Kb) y se efectuó la segunda reacción de PCR por método *touch down*. Después se realizó de igual forma la visualización de los amplicones.

**Tabla 8.5 Reactivos empleados en la segunda reacción de la PCR anidada, efectuada en un volumen final de 50 µl para la región V3 de *Archaeas*.**

Reactivo	Concentración final
PCR Buffer Gold 10x (Applied Biosystems)	1.5X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM (Applied Biosystems)	2.0 mM
Seroalbúmina bovina 10 mg/ml (N E Biolabs)	12.5 µg
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Roche) 10 mM	20 nM
Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma) 5%	2.5 µL
Cebador GC-PARCH340F 100 µM, purificado mediante HPLC (Sigma)	300 µM
Cebador PARCH 519R 100 µM, purificado mediante HPLC (Sigma)	300 µM
Ampli Taq Gold polimerasa (Applied Biosystems)	1.0 U
ADN molde	50 ng
Agua bidestilada grado PCR	Cbp

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

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

Desnaturalización: 94°C durante 1 min

Hibridación: 68°C durante 1.5 min

Esta temperatura se disminuyó automáticamente 1°C cada dos ciclos, hasta alcanzar 58°C, temperatura a la cual se efectuaron 10 ciclos adicionales.

Extensión: 72°C durante 2 min
3. Extensión final: 72°C durante 7 min
4. Mantenimiento a 4°C

Para la amplificación del ADNr de la región V6 de las *Archaeas* se realizó el mismo procedimiento que para la primer PCR de la región V3 pero esta vez con

25 ciclos. En la tabla 6 se muestran las cantidades de reactivo para la reacción. Una vez visualizadas (0.48 Kb), las muestras fueron sometidas a una segunda PCR con el objetivo de amplificar la región hipervariable V6. La segunda reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos fueron una modificación de la técnica *touch down* descrita por Aman *et al.*, 2007. En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos que se indican en la tabla 8.6

**Tabla 8.6 Reactivos empleados en la primera reacción de la PCR anidada, efectuada en un volumen final de 50 µL para la región V6 de *Archaeas*.**

Reactivo	Concentración final
PCR <i>Buffer</i> Gold 10x (Applied Biosystems)	1.5X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM (Applied Biosystems)	2.5 mM
Seroalbúmina bovina 10 mg/ml (N E Biolabs)	12.5 µg
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Roche) 10 mM	20 nM
Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma) 5%	2.5 µL
Cebador ARCH 915F100 µM (Sigma)	400 µM
Cebador UNI-b-REV 100 µM Purificado por HPLC (Sigma)	400 µM
Ampli Taq Gold polimerasa (Applied Biosystems)	1.0 U
ADN molde	30 ng
Agua bidestilada grado PCR	Cbp

**Tabla 8.7 Reactivos empleados en la segunda reacción de la PCR anidada, efectuada en un volumen final de 50 µL para la región V6 de *Archaeas*.**

Reactivo	Concentración final
PCR <i>Buffer</i> Gold 10x (Applied Biosystems)	1.5X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM (Applied Biosystems)	2.0 mM
Seroalbúmina bovina 10 mg/ml (N E Biolabs)	12.5 µg
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Roche) 10 mM	20 nM
Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma) 5%	2.5 µL
Cebador GC-ARCH915F 100 µM, purificado mediante HPLC (Sigma)	300 µM
Cebador UNI-b-REV 100 µM, purificado mediante HPLC (Sigma)	300 µM
Ampli Taq Gold polimerasa (Applied Biosystems)	1.0 U
ADN molde	50 ng
Agua bidestilada grado PCR	Cbp

El programa de PCR para la segunda PCR de la región hipervariable V6 del ADNr de *Archaeas* se desarrolló empleando el termociclador MCE2400 (Master Cycler Eppendorff®) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 95° C durante 7 min.
2. Treinta ciclos que consisten en:  
Desnaturalización: 94° C durante 30 s  
Hibridación: 70°C durante 0.5 min. Esta temperatura se disminuyó automáticamente 0.5° C cada ciclo, hasta alcanzar 65° C, temperatura a la cual se efectuaron 20 ciclos adicionales.  
Extensión: 72°C durante 1 min
3. Extensión final: 72°C durante 7 min
4. Mantenimiento a 4°C.

### Concentración y purificación del producto de la PCR anidada

Todos los productos de PCR finales para cada una de las muestras se concentraron aproximadamente 5 veces, empleando membranas Microcon YM-100, tamaño de poro 100kDa (Millipore®), siguiendo las indicaciones del fabricante. Gracias al uso de estas membranas, se consiguió además purificar los productos de PCR, eliminando las sales y componentes de bajo peso molecular. Para ello, se tomó el volumen de la PCR y se dispuso en las unidades de filtración, provistas de una membrana de exclusión molecular de corte 100000 Da. Las unidades se centrifugaron a 500x g durante 15 min para retener el ADN. A continuación, se añadieron de 15 a 20 µL de agua MilliQ estéril y se introdujo la unidad de filtración invertida en un tubo eppendorf nuevo, que se centrifugó a 10000x g durante 3 min para recoger el ADN purificado y concentrado. La concentración final de ADN de las muestras tras este paso fue de 60-100 ng/µL.

### Separación de las muestras mediante TGGE

La electroforesis en gel con gradiente de temperatura se realizó empleando el sistema TGGE MAXI (Watman Biometra). Para la separación de los distintos fragmentos, se emplearon geles desnaturalizantes de poliacrilamida, preparados en agua MilliQ, con la composición que se indica en la tabla 8.8

**Tabla 8.8 Composición del gel desnaturalizante de poliacrilamida empleado en la TGGE.**

Reactivos	Concentración
Poliacrilamida-bisacrilamida 37.5:1 (Sigma)	6%
Urea, grado biología molecular (Sigma)	8 M
Formamida desionizada (Sigma)	20%
Glicerol (Sigma)	2%
Buffer tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM (TAE) pH 8,0	1x
N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED), grado B.molecular	0.06%
Persulfato de amonio, grado biología molecular	0.06%

Los geles se dejaron polimerizar entre 3-24 h antes de llevar a cabo la electroforesis. Para la electroforesis se empleó *buffer* TAE (2X). Se cargaron 8 µl de cada muestra más 1 µl de *buffer* de carga (5x) de la siguiente composición: 0.5

% tritón X-100, 0.05 % azul de bromofenol, 0.05 % xilencianol, EDTA 10 mM, y *buffer* TAE 10x.

Las condiciones de la electroforesis para separar los fragmentos amplificados del gen codificante del ARNr 16S de la región V3 tanto de *Archaea* como de *Bacteria* fueron las siguientes:

1. Migración inicial de las muestras:
  - Temperatura inicial de gradiente, L0 = 20°C
  - Temperatura final de gradiente, L10 = 20°C
  - Voltaje 300 V
  - Duración 18 min
2. Establecimiento del gradiente de temperatura:
  - Temperatura inicial de gradiente, L0 = 43°C
  - Temperatura final de gradiente, L10 = 63°C
  - Voltaje 0 V
  - Duración 10 min
3. Separación de muestras:
  - Temperatura inicial de gradiente, L0 = 43°C
  - Temperatura final de gradiente, L10 = 63°C
  - Voltaje 125 V
  - Duración 18 h

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

Como patrón de separación para los fragmentos del gen ADNr 16S, se construyó una referencia de seis especies a partir de las cepas de colección que se muestran en la tabla 8.9 (Gómez-Villalba *et al.*, 2006). El proceso seguido para preparar el fragmento de ADN de los patrones fue idéntico al de las muestras.

**Tabla 8.9 Cepas de colección que se emplearon como marcadores en la TGGE**

<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 8750
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 15308
<i>Escherichia coli</i>	DH5α
<i>Nocardia corynebacterioides</i>	ATCC 21253
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341

ATTC: *American Type Cultura Collection*

Para la separación de bandas de la región V6 de *Archaeas* se modificó el programa de electroforesis como se indica más adelante pero se siguió el mismo procedimiento para preparar las muestras y cargarlas y no se utilizaron marcadores.

1. Migración inicial de las muestras:
  - Temperatura inicial de gradiente, L0 = 20°C
  - Temperatura final de gradiente, L10 = 20°C
  - Voltaje 300 V
  - Duración 15 min
2. Establecimiento del gradiente de temperatura:
  - Temperatura inicial de gradiente, L0 = 45°C
  - Temperatura final de gradiente, L10 = 54°C
  - Voltaje 0 V
  - Duración 10 min
3. Separación de muestras:
  - Temperatura inicial de gradiente, L0 = 45°C
  - Temperatura final de gradiente, L10 = 54°C
  - Voltaje 125 V
  - Duración 18 h

### **Reamplificación de las bandas separadas mediante TGGE**

Las bandas individuales visualizadas en los geles mediante tinción de plata empleando el kit “Gel Code SilverStaining” (Pierce), se punzaron en su parte central con una punta de pipeta estéril, y el fragmento así extraído se suspendió en 10 µl de agua bidestilada grado PCR, en tubos de 0.2 ml para PCR. Partiendo de estos fragmentos como molde, se efectuó la reamplificación de cada banda individual mediante PCR, siguiendo el mismo procedimiento ya descrito para cada región y dominio.

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

Los productos de PCR reamplificados se corrieron en geles de agarosa al 2 % y, tras la tinción con bromuro de etidio, los productos de PCR fueron purificados mediante el kit de limpieza Quiaquick II (Quiagen), y el ADN fue resuspendido en un volumen final de 15 µl de agua MilliQ estéril.

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

### **Análisis informático de las secuencias**

Los datos de secuencia de ADN obtenidos fueron analizados con los programas informáticos de libre distribución *Chromas* v. 1.51. y *Generunner* v. 3.0.5. Para el alineamiento y la comparación de las secuencias de ADN de los distintos fragmentos obtenidos, se emplearon las herramientas de biocomputación *Align*

(Kruskal, 1983) y *WU-BLAST-n*, v. 2.0 (Altschul *et al.*, 1997), todas disponibles en el servidor web del European Bioinformatics Institute ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)). El programa *Clustal X* v. 1.8 (Jeanmougin *et al.*, 1998) fue utilizado para la generación de alineamientos de las secuencias, empleando los parámetros por defecto. Para el cálculo de las matrices de distancia entre las secuencias y la construcción de los árboles filogenéticos mediante el método *Neighbour-Joining* (Saitou y Nei, 1987), se empleó el software de libre distribución MEGA-4 (Kumar *et al.*, 2001). Los árboles se calcularon tomando como criterio la no inclusión de los huecos (*gaps*) del alineamiento. Los valores de confianza se calcularon mediante el método de muestreo con reemplazamiento (método *Bootstrap*) (Felsenstein, 1985), y los porcentajes superiores al 50% con 1000 réplicas aparecen reflejados en los árboles correspondientes.

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

Esta técnica se utilizó sólo para la biopelícula formada en las membranas nuevas alimentadas con ARC y efluente UASB a escala laboratorio. Se puso en práctica para estudiar la comunidad bacteriana completa de la biopelícula, tanto *Bacterias* como *Archaeas*. Estos estudios se realizaron en el Departamento Microbiología Ambiental del Instituto del Agua de la Universidad de Granada. Las sondas empleadas en el estudio y sus características están resumidas en la tabla 8.10. Los datos de todas las sondas se encuentran en la base de datos Probase (<http://www.microbialecolgy.net/probase>) (Loy *et al.*, 2003).

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

1. Fijación de las muestras.
2. Deshidratación.
3. Hibridación de las muestras con las sondas adecuadas y lavado.
4. Evaluación microscópica.

#### 1. Fijación de las muestras.

- Fragmentos de membrana correspondiente a un peso de 500 mg se bañaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml una solución de paraformaldehído al 4% en *buffer* PBS, preparado extemporáneamente y previamente mantenido en hielo, hasta que por pipeteo se desprendió la Biopelícula adherida al soporte.

PBS: *buffer* fosfatosalino: 15% *buffer* fosfato, 390 mM NaCl. El *buffer* PBS se preparó a concentración 3x, a partir de *buffer* fosfato  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$  200 mM, a pH 7.3 y se diluyó como fue conveniente en cada momento

- Se incubó esta mezcla a 4°C durante 4 h.
- Se centrifugó la muestra fijada, y el sobrenadante se reemplazó con 1 volumen de *buffer* PBS previamente mantenido en hielo. Este paso se repitió 3 veces, con el fin de eliminar el paraformaldehído residual.
- Se resuspendió la muestra en 1 volumen de PBS mantenido en hielo, y se añadió 1 volumen de etanol 96%, también mantenido en hielo.
- Se alicuotó la muestra en volúmenes de 500 µl en tubos Eppendorf estériles y

se conservaron a -20° C hasta su posterior análisis.

## 2. Deshidratación.

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

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

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

- Por cada portaobjetos, se preparó 1 ml de *buffer* de hibridación.

Todas las sondas empleadas funcionan adecuadamente con una astringencia del 20, 35 y 55 % de formamida, y se disponía de todas ellas marcadas con los fluorocromos Cy3 (sulfoindocianina, rojo) y FLUOS ([5(6)-carboxi-fluorescein-Mhidroxisuccinimida éster], verde).

- Se tomó 1 µl de cada una de las sondas a emplear en cada muestra (pocillo), a un tubo eppendorf que contenía 10 µl del *buffer* de hibridación. Se mezcló bien, y se aplicó la solución de hibridación con la combinación de sondas adecuada a las muestras deshidratadas en los pocillos.
- Por cada portaobjetos, se preparó una cámara húmeda, introduciendo una lámina de papel absorbente en un tubo Falcon de 50 ml con tapa de rosca y humedeciendo el papel con el resto de la solución de hibridación preparada anteriormente. Se introdujo el portaobjetos en la cámara húmeda en posición horizontal, se cerró el tubo, y se incubó en un horno a 46°C durante 1.5 h.
- Paralelamente se preparó el *buffer* de lavado en un tubo Falcon de 50 ml y se precalentó a 46°C en un baño de agua.
- Tras la incubación, se introdujo el portaobjetos dentro del *buffer* de lavado y se mantuvo durante 10 min a 46°C en el baño de agua. Posteriormente, se introdujo el portaobjetos en agua destilada mantenida en hielo durante 2 segundos para eliminar restos del *buffer* de lavado, y se secó rápidamente bajo una corriente de aire comprimido.

### 8.3.2.1 Evaluación microscópica.

Para observar la muestra al microscopio se utilizó Citifluor AF1 (Citifluor Ltd.) como fluido de montaje. Se empleó un microscopio de Fluorescencia AXIO I Zeiss equipado con un juego de filtros (Termo) para la detección de Cy3 a 543 nm, y uno para la detección de FLUOS a 488 nm. Las imágenes obtenidas se documentaron con el software Axio vision LSM Image Browser versión 4.0.

Tabla 8.10 Sondas para FISH empleadas en este estudio.

SONDA	SECUENCIA 5'-3'	ESPECIFICIDAD y COBERTURA	% FORMAMIDA	Comentarios
EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Bacteria (90%)	0-80	Usar las 3 juntas, en mezcla 1:1:1 Marcadas con FLUOS (verde)
EUB338II	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	Plantomicetales (69%)	0-60	
EUB338III	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Verrucomicrobia y otras (93%)	0-60	
ARCH915	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	<i>Archaeas</i>	20	No se ha determinado, sin embargo se usa en papers FLUOS (Verde)
EURY806	CAC AGC GTT TAC ACC TAG	<i>Archaeas: Euryarchaea</i>	20	CY3 (Rojo)
CREN537	TGA CCA CTT GAG GTG CTG	<i>Archaeas: Crenarcheota</i>	20	CY3 (Rojo)
ALF968	GGT AAG GTT CTG CGC GTT	Alfa Proteobacteria (79%)	20	Excepto <i>Rickettsiales</i> CY3
BET42a +C	GCC TTC CCA CTT CGT TT GCC TTC CCA CAT CGT TT	Beta Proteobacteria	35	Beta y Gamma → aplicar juntas 1:1, sin competidor (compiten la una con la otra)
GAM42a +C	GCC TTC CCA CAT CGT TT GCC TTC CCA CTT CGT TT	Gamma Proteobacteria	35	
DELTA495a +C	AGT TAG CCG GTG CTT CCT AGT TAG CCG GTG CTT CTT	Delta Proteobacteria (73%)	35	Delta proteobacteria y tambien <i>Gemmatimonadetes</i>
EPS549	CAG TGA TTC CGA GTA ACG	Epsilon Proteobacteria	55	CY3
LGC354a	TGG AAG ATT CCC TAC TGC	Gram + bajo G+C	35	LGC354a a veces es problemática en combinación con EUB338 (solapamiento) Usar la 3 juntas 1:1:1 para detectar el 52% de Firmicutes
LGC354b	CGG AAG ATT CCC TAC TGC	Gram + bajo G+C	35	
LGC354c	CCG AAG ATT CCC TAC TGC	Gram + bajo G+C	35	
HGC69A +C	TAT AGT TAC CAC CGC GT TAT AGT TAC GGC CGC CGT	Gram + alto G+C (82%)	25	

### 8.3.3 Microscopía electrónica de barrido

La estructura de la biopelícula desarrollada se observó mediante el microscopio electrónico de barrido (MEB) Jeol JSM 5310LV y las micrografías fueron analizadas con el software del equipo. Se realizó asimismo el microanálisis sobre superficies regulares de biopelícula (150 x 150  $\mu\text{m}$ ) mediante espectroscopia por dispersión de energía (EDS) acoplada al MEB a través de un detector de estado sólido (Si/Li); Marca Oxford, modelo *Pentafet* y analizadas con el software ISIS Link versión 1.04<sup>a</sup> en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) y Facultad de Ciencias ambos de la UNAM.

La preparación de las muestras se llevó a cabo de la siguiente manera: Las membranas sometidas a diferentes tratamientos fueron fijadas con glutaraldehído al 5% y después lavadas con buffer de fosfatos. Una vez eliminado el glutaraldehído, se fijaron con tetraóxido de Osmio por un par de horas y se procedió a realizar la desecación paulatina con etanol, desde 30% hasta absoluto. Después las muestras fueron sometidas en el desecador de punto crítico para ser posteriormente bañadas en oro y poder ser observadas al microscopio. Este procedimiento se realizó gracias a la ayuda del Dr. José David Sepúlveda en la UAM-I.

## 9. RESULTADOS:

### 9.1 Caracterización fisicoquímica del influente y efluente UASB.

Se realizó la caracterización fisicoquímica del influente y del efluente UASB proveniente de la planta piloto (Tabla 9.1). El pH a la salida del biorreactor UASB fue en promedio de 7.8, típico de un efluente anaerobio.

Tabla 9.1. Caracterización Fisicoquímica del agua tratada por el reactor UASB.

Parámetro	ARC	Efluente UASB	% Remoción
DQO Total (mgO <sub>2</sub> /L)	425	123	71
DQO Soluble (mgO <sub>2</sub> /L)	212	94	56
SST (mg/L)	70	19	73
SSV (mg/L)	54	13	75
SSF (mg/L)	16	6	62
ST (mg/L)	624	385	38
STF (mg/L)	317	254	20
STV (mg/L)	307	131	55
Calcio Total (mg/L)	10	11	-----
Magnesio Total (mg/L)	6.2	6.9	-----
Hierro Total (mg/L)	1.0	0.6	-----

Los análisis se realizaron por quintuplicado durante una semana de operación del biorreactor UASB de la planta piloto de CU. En la tabla 9.1 se observa que la concentración final de DQO total en el efluente del biorreactor fue de 123 mg/L, lo que significa que la materia orgánica del ARC fue removida en el biorreactor UASB con una eficiencia del 70%. La disminución de la DQO soluble al igual que los sólidos volátiles confirmaron lo anterior. Que la remoción de los sólidos suspendidos fuera de entre el 60 y 70% indicó que el biorreactor presentó un buen funcionamiento. Así mismo, la remoción entre el 60 y 70 % de los sólidos suspendidos indica que la cama de lodos del biorreactor actuó como un filtro. Los sólidos totales fijos, que representa el material inorgánico, no se remueven sino que se lavan y lo que se observó fue la dilución de los mismos. Sin embargo para los metales calcio y magnesio se observó una mayor concentración en el efluente del biorreactor que en el influente, por lo que se piensa con base a estudios anteriores (Choo y Lee, 1996), que dado el pH del biorreactor se favoreció la formación de estruvita. Todos estos resultados son similares a los que reportó Cid (2007), por lo que las condiciones de operación fueron muy similares.

## 9.2 Determinación de tamaño de partícula

Se determinó el tamaño de partícula del efluente del biorreactor y como resultado se obtuvo que el promedio de las partículas taponantes mide entre 1 y 2 micrómetros. Sin embargo, este equipo tiene un límite de detección alto, por lo tanto no hay que descartar que muchas partículas inferiores a 1 micrómetro no hayan sido detectadas y tuvieran gran implicación en el taponamiento. Bajo esta técnica, los resultados indican que la gran mayoría de material proveniente del efluente UASB operado en aquellas condiciones taponará la membrana por el tamaño de partícula de 100 kDa que presenta.

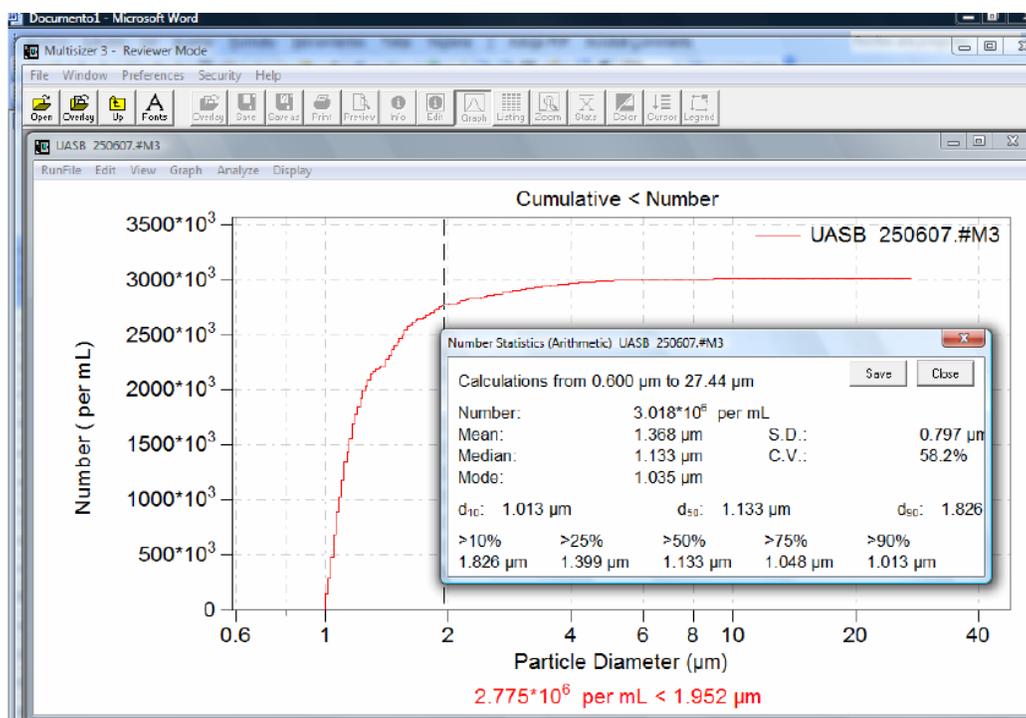


Fig 9.1. Resultado del tamaño de partícula por método Coulter.

Tres técnicas complementarias fueron usadas para estudiar la formación de la biopelícula, su diversidad filogenético y la distribución espacial de las poblaciones mediante MEB, FISH y secuenciación de ADN, previa separación de los amplicones obtenidos por TGGE del gen ribosomal 16S.

### 9.3 Microscopía Electrónica de Barrido

La examinación microscópica muestra que existen cambios en la estructura de la capa taponante, que no permite afirmar una secuencia de colonización de la inmensa cantidad de bacterias entre las que se distinguen cocos, estreptococos, espiroquetas, espirilos y bacilos. Al tiempo cero se observa que ya hay presencia de algunos bacilos. Lo que puede explicarse ya que las membranas vírgenes no se encuentran en condiciones estériles (figura a).

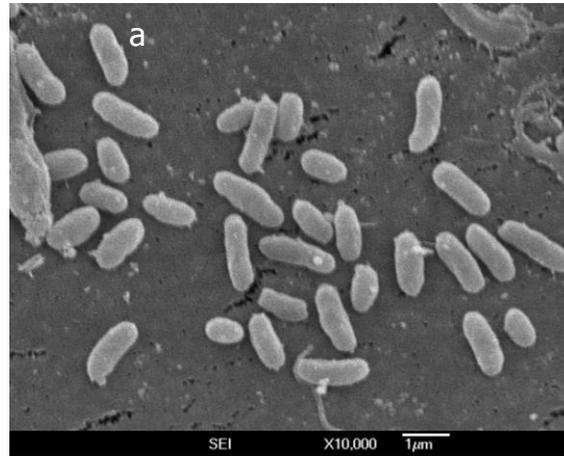


Fig 9.2.1 Imagen de microscopia electrónica de la membrana al tiempo cero (a).

Más adelante, en lo que sería la fase inicial de adhesión (8 h del tratamiento), se observa que la torta taponante se encuentra prematuramente consolidada, los microorganismos en la capa taponante han producido los suficientes exopolímeros hidratados para consolidar la biopelícula y tener mayor resistencia a los lavados, pero no la necesaria para formar una capa uniforme, ya que se observan surcos con poros que dividen a la torta (Fig. b y c; Tratamiento I).

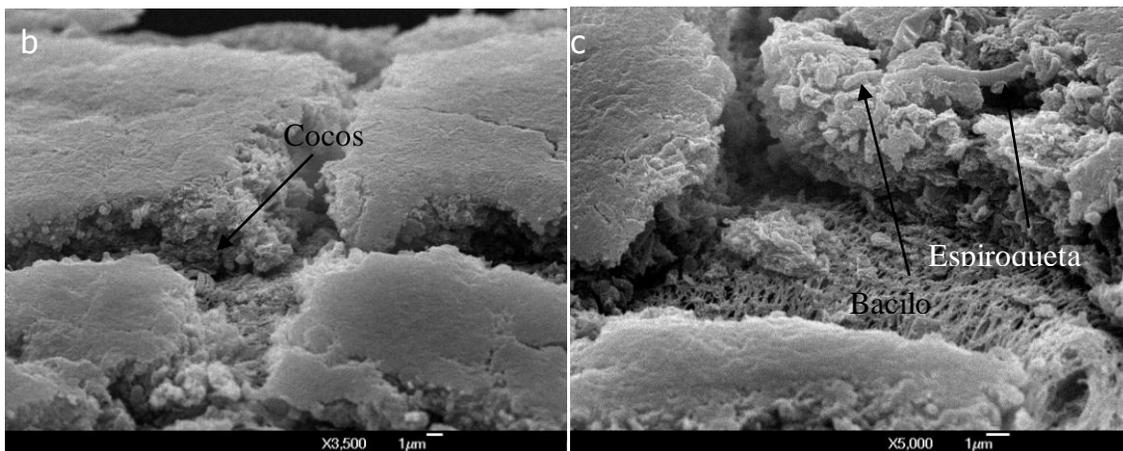


Fig 9.2.2 Imágenes de microscopia electrónica del tratamiento I después de 8 h de operación (b y c).

En las muestras pertenecientes al tratamiento I (figuras b y c) y tratamiento II (Fig. d) estudios de EDX confirman la presencia de cristales embebidos en la matriz de SPE y células bacterianas, relacionadas con carbonatos de calcio y magnesio. La muestra d reflejó además en los análisis la presencia de cobre (anexo 1).

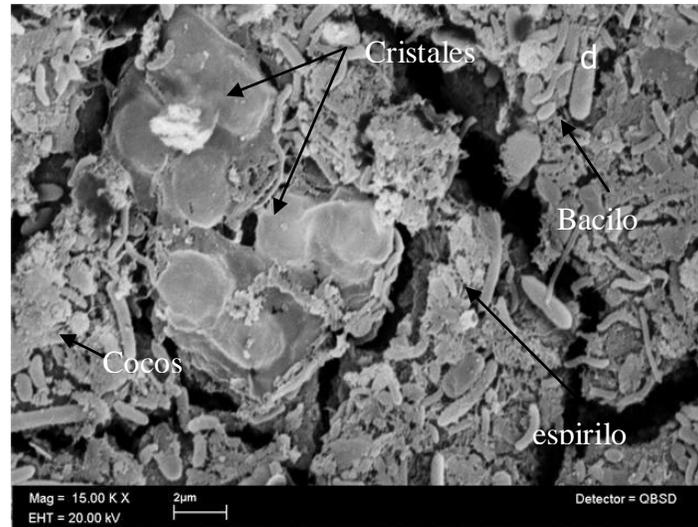


Fig 9.2.3 Imagen de microscopía electrónica del tratamiento II.

En la figura e, correspondiente al tratamiento III, las 2400 h de funcionamiento previo, se considera que la biopelícula está madura y bien consolidada, el microanálisis por EDX de ésta, resulta en la presencia de carbonatos de magnesio que aunque no fue posible determinarlo, quizá esté implicado formando estruvita como complejo, así como óxidos y sulfatos de cobre. Para el tratamiento V, la imagen de la biopelícula es similar al del tratamiento III (imagen no mostrada). La biopelícula se presenta espesa y aunque no es visible, los estudios de EDX reflejan la presencia de Flúor.

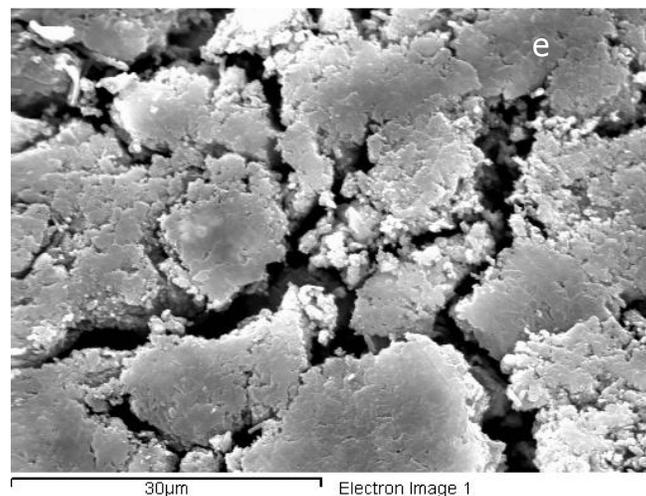


Fig 9.2.4 Imagen de microscopía electrónica del tratamiento III.

La muestra concerniente al tratamiento IV (figura f) refleja estructuras esféricas que no se observan en las otras muestras y los análisis de EDX revelaron que se trata de compuestos de Flúor



Fig. 9.2.5 Imagen de microscopia electrónica del tratamiento IV.

## 9.4 Estudios de biodiversidad de la biopelícula taponante.

### 9.4.1 Estudio de la población bacteriana y archaea de la biopelícula taponante utilizando fragmentos amplificados del gen codificante del ARN ribosómico 16S

Después de obtener los fragmentos resultantes de las reacciones de PCR, se procedió al análisis de biodiversidad por TGGE. Los fragmentos Las muestras analizadas tuvieron un tamaño aproximado de 200 pb para la región hipervariable V3 y de 500 pb para la región hipervariable V6.

La técnica utilizada para el análisis de las comunidades microbianas (TGGE), sólo permite detectar las poblaciones que muestren una abundancia relativa superior al 1%; (Muyzer y Smalla, 1998). Por ello tan sólo aparecen las bandas correspondientes a poblaciones mayoritarias.

Las figuras 9.3, 9.4 y 9.5 muestran los perfiles de biodiversidad de la comunidad procariota de la capa taponante de las membranas durante todos los tratamientos.

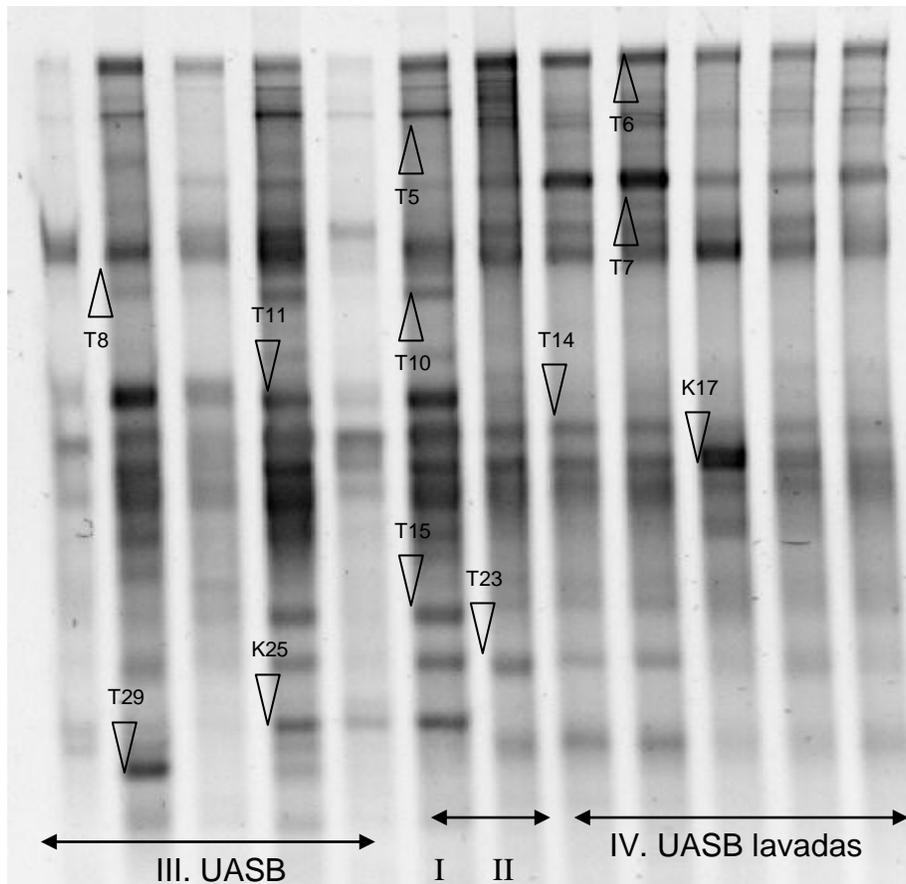
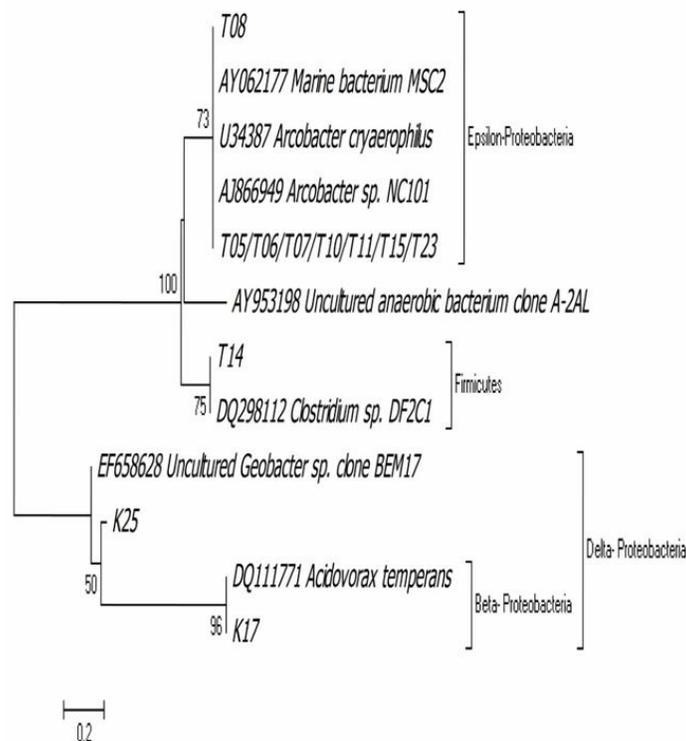


Fig 9.3 Perfil de biodiversidad bacteriana de la biopelícula taponante proveniente de muestras de membranas sometidas a diferentes tratamientos mediante electroforesis con gradiente temporal de temperatura TTGE (BioRAD). Los perfiles están basados en la amplificación y separación de región hipervariable V3 del gen ARNr 16S para *Bacteria*.

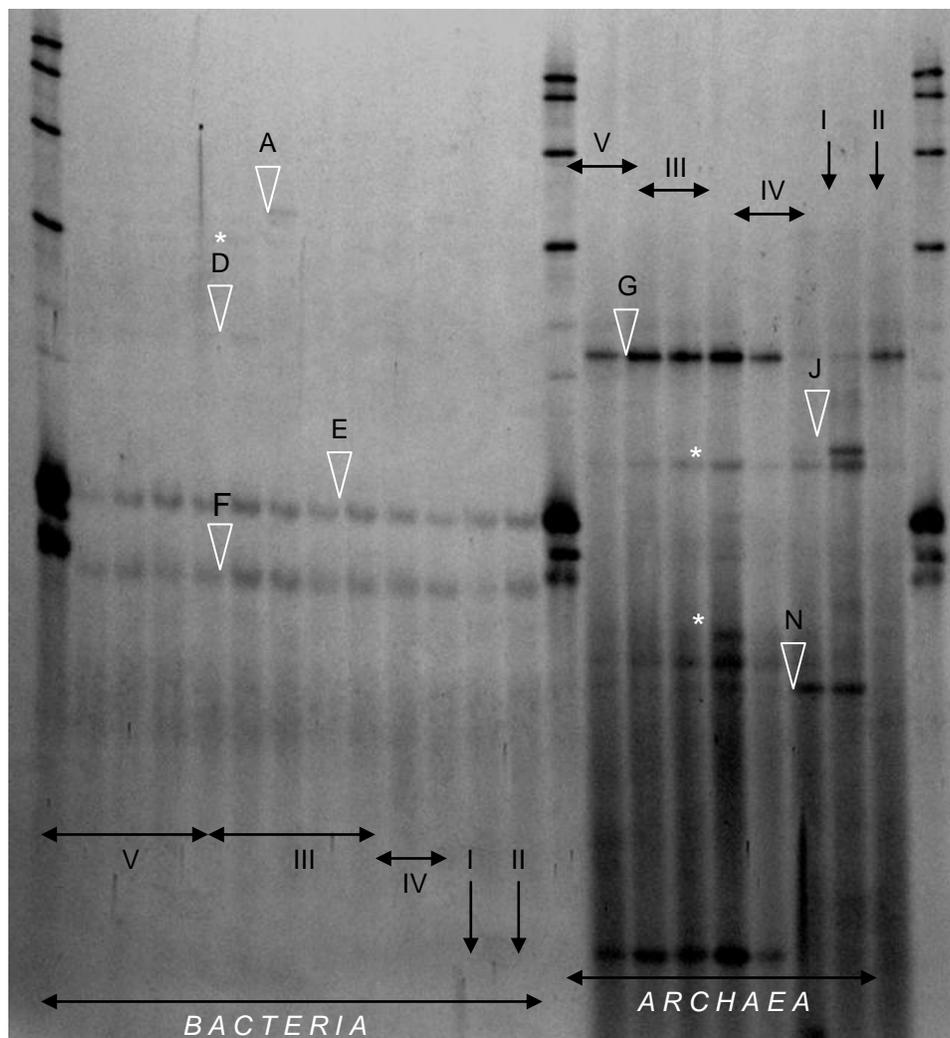
El análisis del gel en la figura 9.3 muestra que existen diferencias en el patrón de bandas obtenidas entre los diferentes tratamientos. En todos los tratamientos está presente la banda T5 y T6. Comparando entre los tratamientos I y II, se observa que las bandas T10 y T15 son exclusivas del tratamiento I, no así para la banda T23 que está en ambos. La comparación entre el tratamiento I y III, ambos alimentados con efluente UASB pero con diferente tiempo de operación, se observa que T5, T8, T10 y T11 son comunes en ambos tratamientos. K25 está en todos los fragmentos excepto en el que corresponde a la mitad de la membrana y las bandas T15 y T29 no aparecen en el tratamiento I pero si en dos fragmentos correspondientes al tratamiento III. Finalmente, comparando los tratamientos I y IV, dos bandas, T11 y T25 son exclusivas del tratamiento I. De un total de 23 bandas cortadas, únicamente 11 pudieron ser analizadas comparándolas con las secuencias de ADNr 16S depositadas en la base de datos EMBL (tabla 9.1). El resto de ellas no pudieron ser reamplificadas o bien se obtuvieron secuencias con un alto número de indeterminaciones. Este 50% de bandas identificadas exitosamente, se debió en parte a la limitación física que existe para separar un número tan elevado de bandas en la superficie de los geles, lo que conduce a problemas de solapamiento. Por otra parte para las bandas que se lograron reamplificar, al compararlas en la base de datos, resultaron en que más de una banda tenían la misma identidad, lo que se llama comúnmente heteroduplex (T5,T6,T7,T10,T11,T15,T23). Es por esto que decidimos mejorar la separación complementando el análisis mediante la técnica de TGGE. No obstante de las bandas que fueron posibles secuenciar se construyó el siguiente árbol filogenético.



**Figura 9.3.1. Árbol filogenético *Neighbour-Joining* basado en la secuencia de la región V3 del ADNr 16S de *Bacteria*, aproximadamente 200 bp, mostrando las posiciones de las secuencias de 11 bandas de TTGE obtenidas en este estudio. La barra indica un 2% de divergencia estimada. Los números junto a las ramas indican el valor de *bootstrap* cuando éste fue superior al 50% para 1000 replicas.**

En la figura 9.3.1 se pueden observar los grupos más numerosos encontrados en la biopelícula taponante formada en las membranas de filtración alimentadas con efluente UASB con 8 horas de operación. Las  $\epsilon$ -proteobacterias, las  $\beta$ -proteobacterias y Firmicutes se encuentran en igual proporción para todos los tratamientos.  $\delta$ -Proteobacteria sólo aparece en ambos tratamientos con efluente UASB. Dentro de las  $\epsilon$ -proteobacterias, la familia más representada es la *Campylobacteraceae* y de las Firmicutes la familia *Clostridiaceae*.

Con el objetivo de incrementar el porcentaje de identificación de las bandas obtenidas por análisis de TTGE (gel de electroforesis con gradiente temporal de temperatura), se repetió el análisis de biodiversidad bajo otras condiciones, ahora como TGGE y añadiendo muestras de biopelícula proveniente de membranas taponadas acopladas al biorreactor anaerobio, alimentadas con efluente UASB, sometidas a lavado y posteriormente alimentadas con ARC (tratamiento V).



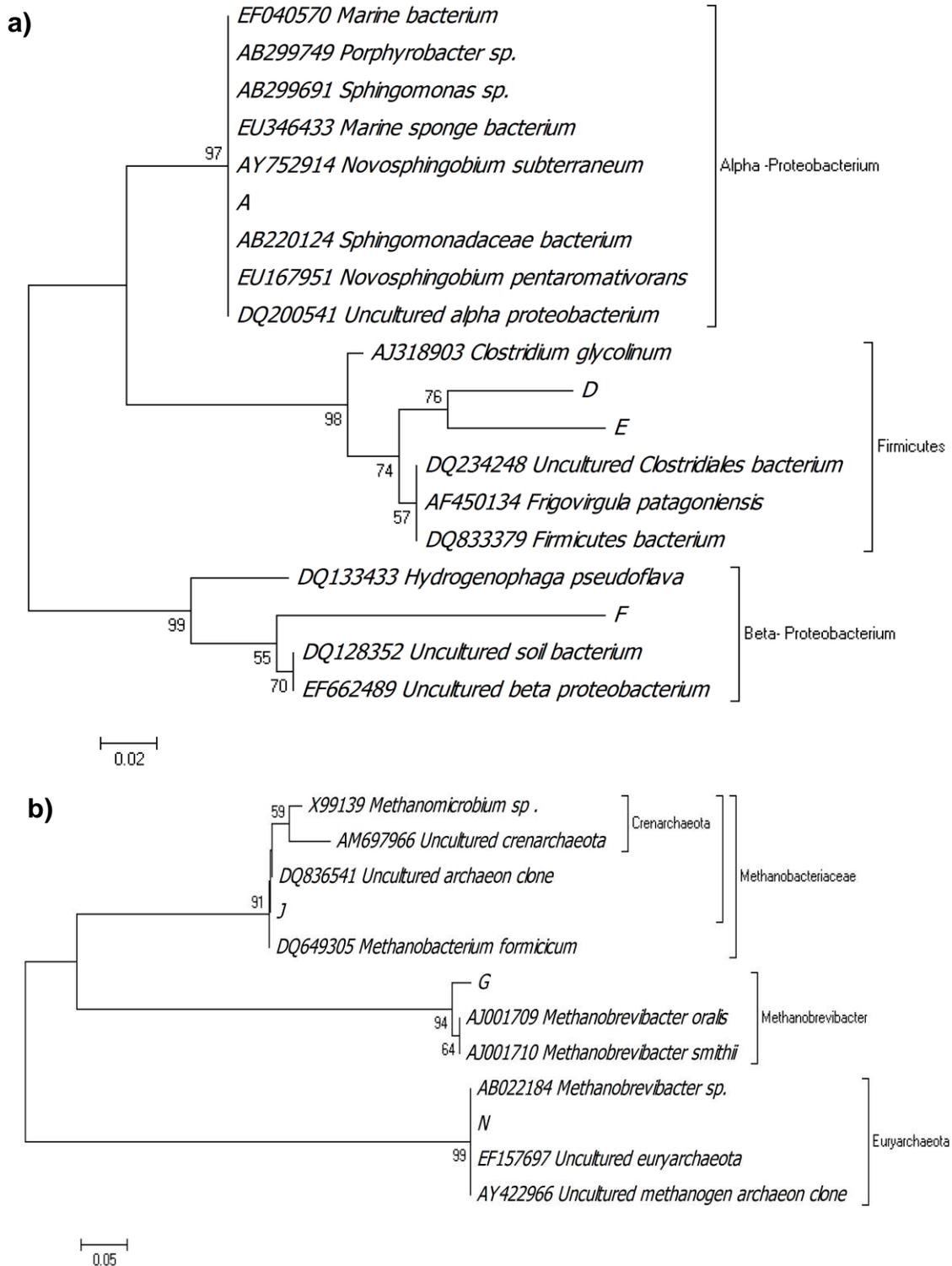
**Fig 9.4** Perfil de biodiversidad de las comunidades microbianas de biopelículas en membranas acopladas a un biorreactor anaerobio para el tratamiento de agua residual municipal obtenidos mediante electroforesis en gel con gradiente de temperatura, TGGE. Región hipervariable V3 (*Bacterias y Archaeas*)

La figura 9.4 muestra el perfil de biodiversidad obtenido entre los diferentes tratamientos para el grupo bacteria y *Archaea* de la región hipervariable V3 del gen ribosomal 16S RNAr. En el caso de bacteria las bandas A, E y F son comunes a todos los tratamientos. La banda D solo está en los tratamientos III y V. Para el perfil de *Archaeas* de esta misma región hipervariable V3, se observa que la banda J es exclusiva del tratamiento I. De este gel se intentó la extracción, reamplificación y secuenciación de un total de 12 bandas, de las cuales 7 se pudieron analizar comparándolas con las secuencias de ADNr 16S depositadas en la base de datos EMBL (tabla 9.1).

Las bandas de bacteria marcadas con asteriscos, no fue posible reamplificarlas y de las marcadas para *Archaea* son artefacto, es decir que no corresponden a ninguna secuencia de nucleótidos. Con los resultados anteriores fue posible elaborar los árboles filogenéticos mostrados en la figura 9.4.1 para su posterior análisis.

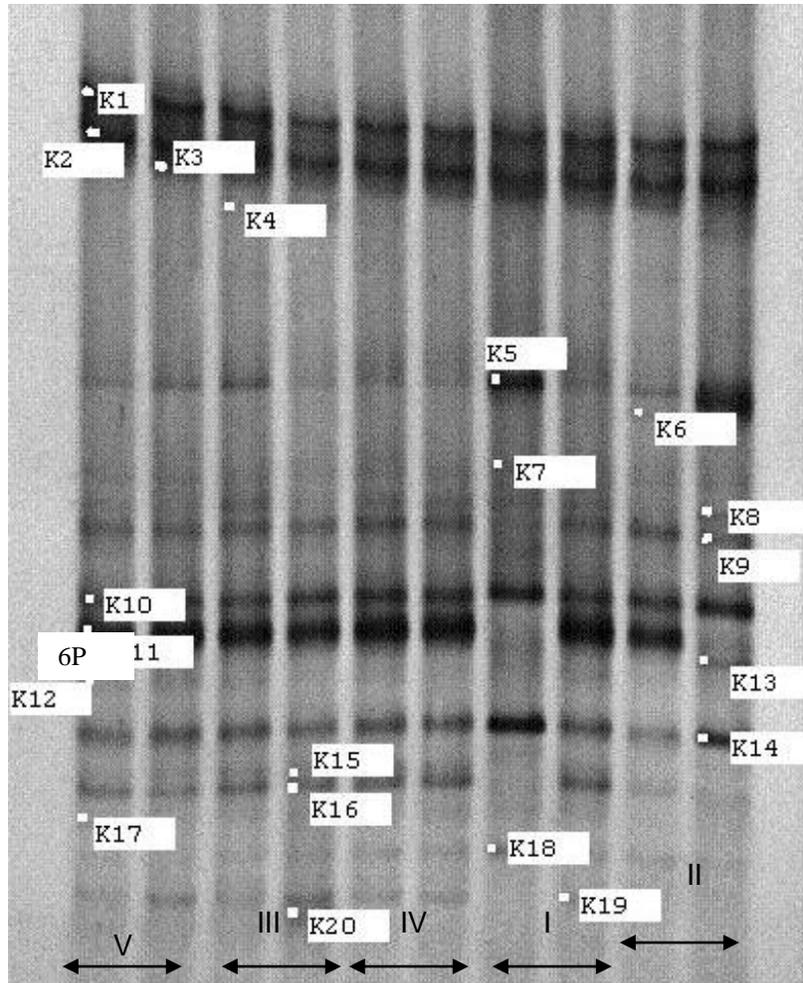
En la figura 9.4.1 se representa el árbol filogenético de todas las secuencias obtenidas, elaborado a partir de un alineamiento múltiple mediante el método *Neighbour-Joining*, incluyendo como referencia secuencias de la misma región V3 del gen codificante del ARNr 16S de los microorganismos más similares depositados en la base de datos.

Como se puede observar en dicho árbol filogenético, los grupos más numerosos que se encuentran taponando las membranas del dominio *Bacteria* son las Firmicutes,  $\alpha$ -proteobacterias y las  $\beta$ -proteobacterias. Dentro de las Firmicutes la familia más representada fue la de Clostridiales. El siguiente grupo más abundante en las biopelículas es  $\alpha$ -proteobacterias la familia más representada es la *Sphingomonadaceae* y de las  $\beta$ -proteobacterias la familia *Comamonadaceae*. Sin embargo el análisis de estos geles no refleja ninguna banda que tenga similitud con algún miembro del grupo  $\epsilon$ -proteobacteria, así como por el método de TTGE no fue posible detectar ninguna  $\alpha$ -proteobacteria. En el caso del dominio *Archaea*, como se observa en las figuras 9.4 y 9.4.1, todos los grupos son igualmente abundantes y corresponden a las familias *Methanobacteriaceae* y *Methanobrevibacteriaceae*.



**Fig. 9.4.1** Árbol filogenético *Neighbour-Joining* basado en la secuencia de la región V3 del ADNr 16S, aproximadamente 200 bp, mostrando las posiciones de las secuencias de 7 bandas de TGGE obtenidas en este estudio y otras descritas en bibliografía. La barra indica un a) 2% y b) 5% de divergencia estimada. Los números junto a las ramas indican el valor de *bootstrap* cuando éste fue superior al 50% para 1000 replicas.

Con el fin de conocer más sobre la biodiversidad del dominio *Archaea* responsable del taponamiento de las membranas analizadas, se estudió dicho dominio con cebadores específicos para la región hipervariable V6 del gen ribosomal ARNr 16S.

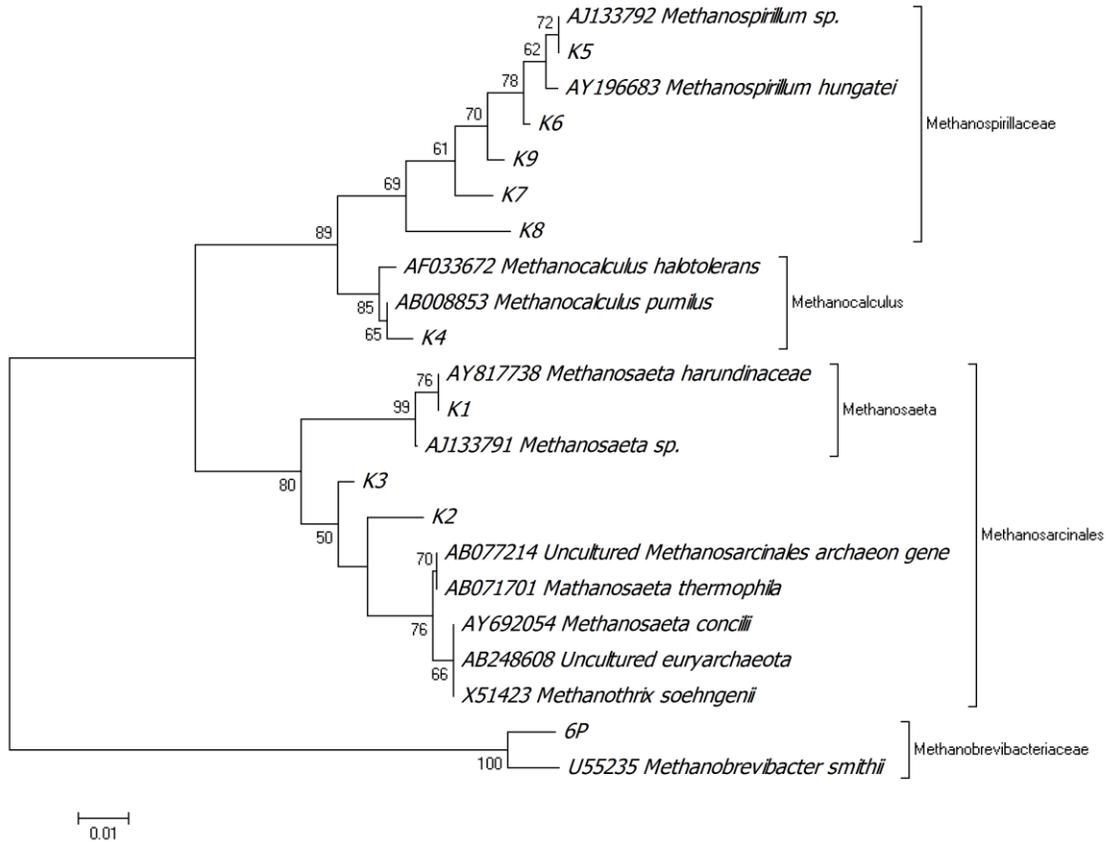


**Fig 9.5 Perfil de biodiversidad de las comunidades microbianas de biopelículas en membranas acopladas a un biorreactor anaerobio para el tratamiento de agua residual municipal obtenidos mediante electroforesis en gel con gradiente de temperatura, TGGE. Región hipervariable V6 para el gen ribosomal 16S ADNr de Archaea.**

De este modo amplificando fragmentos más grandes (500pb), utilizando otras condiciones para su amplificación y otros cebadores para el estudio de labiodiversidad de *Archaeas*, se observan varios puntos. El primero es que fue posible extraer, reamplificar y secuenciar todas las bandas separadas por TGGE. Sin embargo, de la banda K11 a la K19, resultaron ser heteroduplex de las secuencias 6P y K9.

Así mismo se observa en la figura 9.5.1 que la proporción de los grupos no es igual y que el grupo más abundante es el de *Methanospirillaceae*, seguido de *Mathanosarcinales*. A diferencia de los estudios de la región V3, en esta región aparece el grupo de los *Methanocalculus*. El grupo de menor proporción

resulta ser el de *Methanobrevibacteriaceae*, que también es detectado en la figura 9.4.1.



**Fig. 9.5.1.** Árbol filogenético *Neighbour-Joining* basado en la secuencia de la región V6 del RNAr 16S, aproximadamente 500 bp, mostrando las posiciones de las secuencias de 10 bandas de TGGE obtenidas en este estudio. La barra indica un el 1% de divergencia estimada. Los números junto a las ramas indican el valor de *bootstrap* cuando éste fue superior al 50% para 1000 replicas.

Los resultados demuestran que la variabilidad de la diversidad procarionta responde a los diferentes tratamientos aplicados a las membranas. Así aparecen varias bandas, que representan a los componentes mayoritarios de la comunidad microbiana del biorreactor anaerobio en función de las condiciones de trabajo. Tal y como se desprende del estudio de los geles de TGGE de las figuras 9.3, 9.4 y 9.5 la composición de la comunidad microbiana cambia conforme al tiempo o al tipo de agua alimentada a las membranas. Esto se ve reflejado en las bandas que están presentes sólo en algunas muestras y no en otras, o varían de intensidad. Además mediante estos perfiles se puede observar que la diversidad de la microbiota se distribuye de manera irregular a lo largo de la membrana, siendo que en algunos casos como la bacteria epsilon, correspondiente a la secuencia T5 de la figura 9.3, se observa muy marcada en los fragmentos medios de la membrana y no en la entrada ni salida. Otro caso es el de la banda T7, de la misma figura, que se observa marcadamente en las membranas lavadas lo cual se discutirá más adelante.

**Tabla 9.1. Comparación de la secuencia de las bandas separadas por gel de electroforesis de las regiones hipervariables V3 y V6 del ADNr 16S, de las poblaciones integrantes de la biopelícula taponante de los cuatro experimentos, con las secuencias depositadas en la base de datos EMBL.**

B= *Bacteria* A= *Archaea*

Banda	Dominio	Región	Organismo más similar	% de Identidad
A	B	V3	EU167951 <i>Novosphingobium pentaromativorans</i> secuencia parcial del gen RNAr 16S.	100
D	B	V3	AF450134 <i>Frigovirgula patagoniensis</i> secuencia parcial del gen RNAr 16S.	97
E	B	V3	AJ318903 <i>Clostridium glycolinum</i> secuencia parcial del gen RNAr 16S	88
F	B	V3	DQ133433 <i>Hydrogenophaga pseudoflava</i> isolate E4IPC-4130 secuencia parcial del gen RNAr 16S	88
T5, T6, T7, T8			AJ866949 <i>Arcobacter</i> sp.	98
T10, T11			U34387 <i>Arcobacter cryaerophilus</i>	99
T15, T23	B	V3	Secuencia parcial del gen RNAr 16S	
T14	B	V3	DQ298112 <i>Clostridium</i> sp.	98
K17	B	V3	DQ111771 <i>Acidovorax temperans</i> . Secuencia parcial del gen RNAr 16S.	100
K25	B	V3	EF658628 Uncultured <i>Geobacter</i> sp. Clon BEM17 secuencia parcial del gen RNAr 16S	97
J	A	V3	DQ649305 <i>Methanobacterium formicum</i> cepa D secuencia parcial del gen RNAr 16S.	98
G	A	V3	AJ001709 <i>Methanobrevibacter oralis</i> partial SSU rRNA	97
			AJ001710 <i>Methanobrevibacter smithii</i> partial SSU rRNA.	97
N	A	V3	AB022184 <i>Methanobrevibacter</i> sp.	100
K1	A	V6	AY817738 <i>Methanosaeta harundinacea</i> secuencia parcial del gen RNAr 16S.	100
K2			AB071701 <i>Methanosaeta thermophila</i> secuencia parcial del gen RNAr 16S	97
	A	V6	AY692054 <i>Methanosaeta concilli</i> 16S	
K3			secuencia parcial del gen RNAr 16S.	98
K4	A	V6	AB008853 <i>Methanocalculus pumilus</i> secuencia parcial del gen RNAr 16S.	98
K5	A	V6	AY196683 <i>Methanospirillum hungati</i> secuencia parcial del gen RNAr 16S.	98
K6, K7, K8, K9	A	V6	AJ133792 <i>Methanospirillum</i> sp.	97
6P	A	V6	U55235 <i>Methanobrevibacter smithii</i> B181 gen ribosomal RNAr 16S	100

#### 9.4.2 Caracterización de la biopelícula taponante mediante hibridación “*in situ*” de fluorescencia (FISH).

Se realizaron experimentos de hibridación de fluorescencia *in situ* con el objetivo de estudiar a mayor detalle las comunidades de microorganismos implicados en el proceso de taponamiento de las membranas de los tratamientos correspondientes a I (UASB) y II (ARC), ambos alimentadas durante 8 horas.

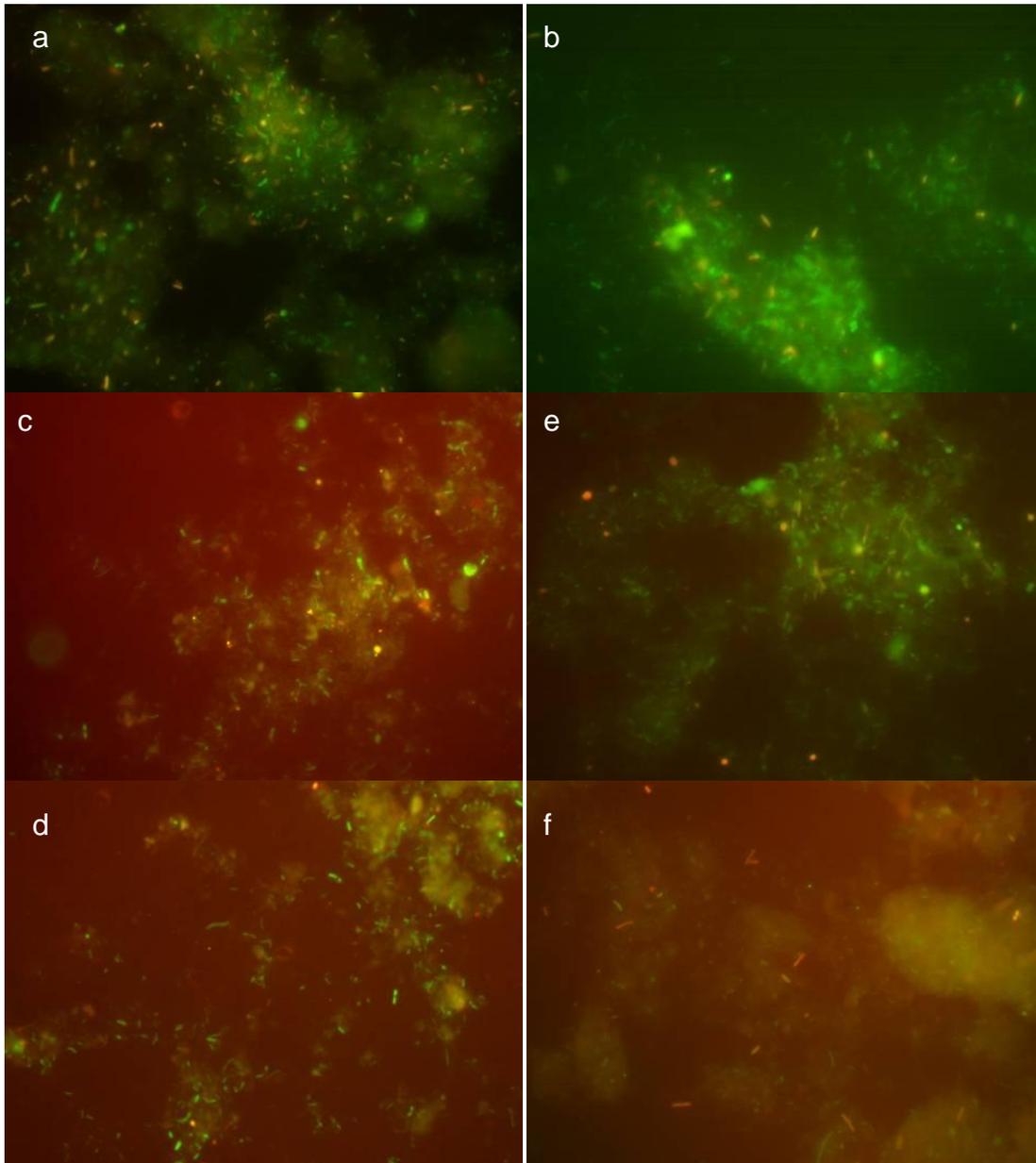


Fig 9.6. Micrografías de epifluorescencia de muestras de biopelícula taponante en membranas alimentadas con UASB (a y f) y con ARC( b,c,d y e) durante 8 horas. a)  $\beta$ -Proteobacteria b)  $\gamma$ -Proteobacteria c)  $\delta$ -Proteobacteria d)  $\epsilon$ - Proteobacteria e y f) Crenarchaeota

Para estudiar la composición de la comunidad bacteriana, se comenzó por emplear la combinación de sondas EUB mix, que comprende tres sondas universales para *Bacteria* EUB338, EUB338-II y EUB338-III (Amann *et al.*, 1990; Daims *et al.*, 1999). Estas fueron hibridadas con la sonda respectiva para cada grupo de bacterias marcada con el fluorocromo Cy3 (rojo), que permitió visualizar microcolonias de los diferentes grupos estudiados y con diferente morfología (Tabla 8.10).

Las *Archaeas* totales fueron hibridadas con la sonda universal ARCH 915 (visibles en color verde) y la sonda respectiva para la detección del grupo *Crenarchaeota* marcadas con Cy3.

De las micrografías obtenidas se observa que a las 8 horas de tratamiento, del dominio bacteria el grupo que predomina en las membranas alimentadas con efluente UASB son  $\alpha$ -proteobacteria, mientras que las membranas que fueron alimentadas con ARC, la población dominante son del grupo  $\epsilon$ -proteobacteria, seguido por las  $\gamma$ -proteobacteria y después las  $\delta$ -proteobacteria. Para las membranas alimentadas directamente con agua residual cruda, la población de *Archaea* dominante fue la del grupo crenarqueota respecto a las alimentadas con UASB.

## **10. Discusión de Resultados.**

### ***10.1 Análisis fisicoquímico del influente de membranas.***

El objetivo de este análisis fue evaluar la calidad del agua que alimentaría a las membranas durante la experimentación. Los resultados obtenidos indican que la DQO total en el agua cruda fue de 425 mgO<sub>2</sub>/L y a la salida del biorreactor de 123 mgO<sub>2</sub>/L, mientras que de DQO soluble en el ARC fue de 212 mgO<sub>2</sub>/L y a la salida del UASB de 94 mgO<sub>2</sub>/L. Por lo que el porcentaje de remoción de la DQO total y soluble que lleva a cabo el reactor anaerobio respecto al ARC es del 70 % y 50 % respectivamente. Según resultados anteriores, después de que el efluente anaerobio UASB ha alimentado a las membranas de UF se obtuvo una remoción hasta del 90% (Cid, 2007). En el caso de los sólidos suspendidos para este efluente, el 70% de su concentración inicial fue removido. El pH del efluente UASB esta dentro del rango especificado para el buen funcionamiento del biorreactor que va de 6.8 a 7.8. Respecto a la determinación de metales, el análisis se realizó para determinar qué cantidad de dichos metales entran a la membrana provenientes del efluente UASB. Lo que se observa es que la remoción de los metales en el biorreactor no es uniforme, es decir que la remoción es variable. Cuando se realizó el análisis hubo días en los que la cantidad del metal fue mayor a la medición del día anterior en el efluente que en el influente. Esto puede deberse a la calidad del ARC y al funcionamiento del biorreactor. Por los resultados de microscopia y espectrometría con difracción de rayos X (EDX) en conjunto con estos análisis fisicoquímicos se observa que dichos metales probablemente están involucrados en el taponamiento de la membrana ya que forman cristales.

Respecto al análisis de tamaño de partícula, determinado por principio Coulter, se observó que las partículas presentes en el efluente UASB operado bajo las condiciones al momento del análisis comprenden un tamaño de 1 a 2 micrómetros, lo cual es de un tamaño suficiente para taponar la membrana cuyo tamaño de poro es de 0.1µm o 100 KDa. Sin embargo, el equipo donde se realizó el análisis tiene un límite de detección muy alto y no es posible detectar partículas con menor tamaño y tienen implicación en el taponamiento. En este sentido, estudios previos elaborados por Cid (2007) muestran que la distribución de tamaños en el efluente del reactor UASB presentó partículas con diámetros desde 200 nm hasta 3042 nm. Este último diámetro es lo suficientemente grande como para no penetrar en los poros de las membranas (diámetro aproximado a 100 nm). Sin embargo, la fuerza de corte que se generó durante el bombeo en la filtración dio como resultado el rompimiento de las partículas. Se observa que el diámetro promedio de las partículas se redujo durante este tiempo, alcanzando un diámetro promedio de 530 nm al final del ciclo.

## **10.2 Análisis de la biopelícula taponante mediante microscopia electrónica de barrido (SEM).**

Se sabe que el mecanismo de colonización microbiana sobre un soporte, en este caso la membrana filtrante, puede verse afectado por procesos de adsorción-desorción causado por fuerzas electrostáticas generadas por la superficie filtrante y la superficie de la bacteria que intenta colonizar la superficie (Liu y Tay, 2002). El examen de microscopia muestra cambios en la capa taponante en los diferentes tratamientos. De los microorganismos observados con esta herramienta se distinguen cocos, estreptococos, espiroquetas, espirilos, bacilos entre otras. Al inicio del taponamiento, 8 h del tratamiento (Figura b y c), lo que corresponde a la fase de adhesión bacteriana sobre la membrana, se observa que la “torta” taponante se encuentra prematuramente consolidada. Los microorganismos adheridos con ayuda de los productos extracelulares excretados al medio y fimbrias bacterianas, permiten que la biopelícula comience a tener cierta rigidez y estabilidad. De este modo se consolida en las primeras 8 horas de filtración y adquiere mayor resistencia para los procedimientos de limpieza posteriores (Figura e), ya que como se observa en conjunto con los perfiles de biodiversidad hay especies que soportan bien los lavados, es decir, se encuentran al inicio del taponamiento (Tratamiento I), observándose una intensidad de banda mayor en el tratamiento III y en el tratamiento IV siguen haciéndose presentes. También se observa que en las primeras horas de tratamiento la biopelícula no forma una capa uniforme, ya que se observan surcos con poros que dividen a la “torta” (Figuras b, c y d). Entre los dos tratamientos evaluados ambos a las 8 horas, no se observan diferencias en la morfología de las poblaciones bacterianas taponantes, pero estudios de EDX confirman la presencia de cristales embebidos en la matriz de SPE y células bacterianas, relacionadas con carbonatos de calcio y magnesio para las tratadas con efluente UASB, por lo que dichos compuestos provienen de la cama de lodos del biorreactor. Así mismo se detectaron cristales de cobre para las tratadas con ARC, por lo que dicho compuesto probablemente venga de las tuberías. En las muestras evaluadas posteriores a 2400 h de funcionamiento, cuando se considera que la biopelícula está madura y bien consolidada, se observa que la membrana está tapizada por la biopelícula y presenta “surcos” más angostos que a las pocas horas de taponamiento (Figura e). Además, microanálisis de estas muestras resultan en la presencia de carbonatos de magnesio, óxidos y sulfatos de cobre que posiblemente el biorreactor no fue capaz de retener, ya que el cobre inicialmente se detectó en el ARC. La figura f, correspondiente al tratamiento IV de membranas filtradas con efluente UASB y posteriormente sometidas a lavado, refleja estructuras esféricas que no se observan en los otros tratamientos. Análisis de EDX revelaron que se trata de estructuras de Flúor, probablemente constituyentes del material de la membrana filtrante y que con el desgaste de los retrolavados, se desprenda en cantidades mínimas. No se observan diferencias estructurales significativas entre los tratamientos I y II. Muchos grupos de investigación han realizado estudios de MEB para observar la estructura de la biopelícula taponante en membranas de filtración (Ivnitsky *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 2007b), sin embargo no hay reportes sobre el tratamiento con efluentes anaerobios.

### **10.3 Población bacteriana del biorreactor utilizando TGGE basada en fragmentos amplificados del gen codificante del ARN ribosómico 16S.**

En los últimos quince años, la aplicación de las técnicas independientes de cultivo al estudio de la microbiología de los sistemas de tratamiento de aguas ha permitido un gran avance en el conocimiento acerca de la ecología microbiana de los mismos. La existencia de nuevos géneros bacterianos con interés biotecnológico se ha descubierto gracias a estas técnicas, al mismo tiempo que se ha podido demostrar que determinados grupos bacterianos, cuyo cultivo en condiciones de laboratorio es difícil o hasta la fecha imposible, juegan importantes papeles en procesos como el tratamiento de las aguas residuales (Molina-Muñoz, 2007; Wagner *et al.*, 2002). Por esta razón en el presente trabajo se consideró esencial el empleo de un método independiente de cultivo para profundizar en el conocimiento de la composición de la biopelícula taponante que se forma en las membranas de filtración acopladas a un biorreactor anaerobio tipo UASB y para ello se escogió la metodología TGGE, basada en la amplificación y secuenciación parcial del gen codificante del ARNr 16S.

La técnica TGGE genera perfiles de bandas que representan las poblaciones dominantes dentro de una comunidad bacteriana compleja. Esta técnica, junto con sus análogas DGGE y TTGE, ha sido ampliamente utilizada en los últimos años para estudiar la variedad de diferentes ecosistemas bacterianos, incluyendo lodos activados de plantas tratamiento, desarrollo de biopelículas, sistemas de depuración basados en filtros sumergidos y sistemas BMS (Fernández *et al.*, 2007; Ivnitsky *et al.*, 2007; Molina-Muñoz, 2007; Miura *et al.*, 2007b; Gómez-Villalba *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2002). Por lo tanto, existen estudios previos sobre las comunidades bacterianas de biopelículas taponantes acopladas a diversos sistemas, sobretodo aeróbicos. Sin embargo, la información sobre la estructura, biodiversidad y estabilidad de las mismas en sistemas que tratan el agua residual por medio de un biorreactor anaerobio es aún muy escasa.

Para el estudio de la comunidad microbiana mediante TGGE, generalmente se asume que cada banda corresponde a una única unidad taxonómica y que su densidad corresponde con la abundancia relativa de la misma. No obstante, es necesario considerar que esta afirmación puede no ser del todo correcta, porque la técnica de TGGE se basa en la reacción de amplificación PCR de las poblaciones desconocidas (Becker *et al.*, 2000; Farrelly *et al.*, 1995; Polz y Cavanaugh, 1998; Suzuki y Giovannoni, 1996) y dicha reacción puede introducir determinados artefactos (Wang y Wang, 1997).

Otra consideración es que en la reacción de PCR existe además una amplificación preferente de las moléculas de ADN más abundantes en la muestra inicial, produciéndose un sesgo en la composición de la muestra amplificada al final. No obstante, la abundancia y la densidad de las bandas puede dar una medida de la diversidad de la comunidad bacteriana original, aunque no exactamente el índice de diversidad de Shannon (Stamper *et al.*, 2003). Aunque la técnica TGGE no es cuantitativa, diversos estudios han constatado que esta metodología sólo es capaz de detectar organismos que constituyan como mínimo el 1% de la comunidad total (Muyzer y Smalla, 1998). Esta es una limitante en la detección de ADN amplificado

a partir de células muertas o poblaciones poco numerosas, por lo cual se ha de considerar que las bandas presentes en los perfiles de TGGE son representativas de poblaciones mayoritarias en las muestras de las que proceden, cuyos genes para el ARNr 16S se encuentran en las concentraciones más altas (Lawrence *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos al analizar los perfiles de biodiversidad, tanto bacteriana como *Archaea*, procedentes de la totalidad de los tratamientos realizados en este estudio, muestran que el comportamiento de la comunidad procariota responsable del taponamiento en los diferentes tratamientos, varía según las condiciones de trabajo, el tiempo y el agua a tratar (Fig. 9.3, 9.4, 9.5).

Al analizar los resultados obtenidos por dominios, en el caso del perfil de biodiversidad bacteriana analizado por TTGE (figura 9.3) se observa que la población dominante es la del grupo  $\epsilon$ -Proteobacteria. De las 22 secuencias analizadas, el 49% (T5, T6, T7, T8, T10, T11, T15 y T23) corresponden a este grupo. Las secuencias T5, T6 y T8 están presentes en todos los tratamientos y las bandas están muy marcadas en el gel, éstas reflejan un alto porcentaje de identidad con el género de *Marine bacterium sp.* y *Arcobacter sp.*, ésta última ha sido descrita por su capacidad de secretar SPE ( Snelling *et al.*, 2005) La mayoría de las bacterias epsilon se reportan como bacterias patógenas y microaerófilicas (Hoi *et al.*, 2008). La secuencia T7 también está dentro de este grupo pero su patrón es diferente a las anteriores: al inicio del taponamiento (I) se observa una banda muy tenue y conforme va pasando el tiempo, cuando la biopelícula se encuentra mejor consolidada (III) la banda se vuelve más intensa en algunos segmentos de la membrana pero no demasiado. En cambio en las membranas lavadas (IV) la banda es muy marcada, lo que indica que esta  $\epsilon$ -Proteobacteria necesita más tiempo que las demás para lograr ser detectada en la biopelícula y se vuelve muy resistente al lavado probablemente por la gran cantidad de exopolímeros que secreta, lo que ayuda a quedar bien adherida a la membrana a pesar de los lavados (Ivnitsky *et al.*, 2005). Las secuencias T10, T11 y T15 sólo están presentes en algunos fragmentos de las membranas alimentadas con efluente UASB, tampoco se presentan en la membrana alimentada con ARC (II) y no resisten al lavado, ya que en el tratamiento IV no se observan dichas secuencias. Estas tres secuencias tienen un alto porcentaje de identidad (99%) con *Arcobacter cryaerophilus*, En estudios previos esta  $\epsilon$ -Proteobacteria se ha reportado como bacteria patógena, microaerófila e indica la presencia de material orgánico en putrefacción así como contaminación fecal en muestras de agua (Collado *et al.*, 2008). Lo mismo sucede con la secuencia de la banda T23, con la diferencia que en el tratamiento IV, su número disminuye, ya que la intensidad de las bandas baja.

El siguiente grupo de Bacterias que predomina son las *Firmicutes*, seguidas por las  $\beta$ -proteobacteria de la familia *Comamonadaceae* muy abundante en agua dulce tanto en sistemas naturales como de ingeniería. Esto se refleja con la secuencia T14, que presenta un porcentaje de identidad del 98% con *Clostridium sp.*, del filio *Firmicutes* y K17, semejante con *Acidovorax temperans* (100 % de

identidad) de la familia *Comamonadaceae*, esta última con actividad desnitrificante y se caracteriza por su alto contenido en G+C que favorece la excreción de SPE (Schloe *et al.*, 2000). Estas dos secuencias están presentes en todos los tratamientos, desde el inicio y también en el tratamiento de las membranas alimentadas con ARC (I), por lo que se sospecha que: o son originarias del ARC o que en el biorreactor UASB están en un número muy elevado y que lo que se observa es producto del lavado normal. Además, prevalecen al lavado de las membranas (IV). En el análisis efectuado por TGGE (figura 9.4), se observa el mismo patrón de dominancia, primero los pertenecientes a *Firmicutes*, secuencias D (*Clostridium glycolium* 88%) que se relaciona como bacteria anaerobia estudiada en suelos para la producción de nitrito (Ihssen *et al.*, 2003) y la secuencia E que presenta similitud con *Firgovirgula patagoniensis*, la cual ha sido descrita como anaerobia psicrófila pero no se ha publicado hasta la fecha. La siguiente familia en orden de dominio es la familia *Comamonadaceae*, secuencia F, *Hydrogenophaga pseudoflava* en un 88 % descrita como bacteria desnitrificante y que se ha utilizado como inóculo en biorreactores para el tratamiento de agua residual municipal cuyo objetivo es desnitrificar el agua a tratar (Hontoria *et al.*, 2005). Ambas secuencias, E y F están presentes en todos los tratamientos. En el mismo porcentaje de abundancia se encuentran las  $\alpha$  y  $\delta$ - proteobacteria. El grupo alfa está representado por la familia *Sphingomonadaceae*, secuencia A, (*Novosphingobium pentaromativorans*, 100 % de identidad). Esta familia, típica de suelos cuyas características principales son alta producción de SPE para formar biopelículas y degradar compuestos recalcitrantes, aparece en sólo un fragmento de la membrana del tratamiento III, por lo que se atribuye a que es arrastrada a la entrada de la membrana desde la cama de lodos del biorreactor. *Novosphingobium pentaromativorans* fue reportada como degradadora de hidrocarburos aromáticos policíclicos de entre dos y cinco anillos aromáticos, en muestras contaminadas en sedimentos marinos (Sohn *et al.*, 2004). La secuencia K25 resulta tener gran similitud (97 %) con la  $\delta$ -proteobacteria anaerobia reductora de hierro *Geobacter* sp. Esta bacteria se reporta como parte de la microbiota de la cama de lodos del biorreactor anaerobio y de tener capacidad de oxidar hierro presente en el material orgánico a degradar (Weber *et al.*, 2006). En los últimos años *Geobacter* sp. ha cobrado gran interés por ser identificada como bacteria generadora de electricidad por la oxidación de materia orgánica disuelta en el agua a tratar. Dicha bacteria forma parte de la biopelícula formadas alrededor de celdas eléctricas MFC (microbial fuel cells) por su alta capacidad de secretar SPE. Así mismo, *Geobacter* sp. es capaz de transferir electrones a través de la superficie de su membrana celular (Min *et al.*, 2005).

En las figuras 9.3 y 9.4 se puede apreciar la existencia de bandas que aparecen sólo en algunas muestras, ya que posteriormente desaparecen, o varían de intensidad. Aunque el TGGE no es una técnica cuantitativa debido a que está influenciada por la reacción de PCR, como ya se ha comentado anteriormente, el hecho de variar la intensidad de una misma banda en las diferentes muestras puede relacionarse con un cambio en su abundancia relativa en la composición de la comunidad bacteriana (Stamper *et al.*, 2003; Brüggemann *et al.*, 2000)

Con respecto al dominio *Archaea*, de las trece bandas secuenciadas, todos los microorganismos identificados en la biopelícula taponante de los diversos tratamientos corresponden a *Archaeas* metanogénicas. Las especies *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* y *Methanosaeta* han sido aisladas de la cama de lodos de un biorreactor tipo UASB reportándose su alta capacidad de secretar SPE y estar implicadas en la formación de gránulos anaerobios (Viega et al., 1996). Todas las *Archaeas* identificadas han sido reportadas por su gran capacidad excretar sustancias poliméricas extracelulares. Como era de esperarse, la biodiversidad de éste genero es menor que para *Bacteria*. Con respecto a la diferencia de tratamientos sobre las membranas, no puede especificarse si cierto tipo de *Archaeas* predomina sobre otras por los perfiles de biodiversidad, ya que el patrón es casi el mismo en todos los tratamientos. El análisis por TGGE (figura 9.4) se refiere al análisis de *Archaeas* de la región hipervariable V3. De las seis bandas obtenidas, solo el 50 % de ellas fue posible reamplificar y analizar. La población dominante se refiere a *Methanobrevibacter* seguido de *Methanomicrobium*. El patrón de bandeo se repite en todos los tratamientos, excepto la secuencia correspondiente a la banda J, que sólo está presente en el tratamiento correspondiente a la fase de adhesión (I) con efluente UASB, por lo que concretamente se trata de *Methanomicrobium* sp. (98 % de identidad). Estos microorganismos han sido reportados en reactores tipo UASB para el tratamiento de aguas residuales provenientes de cervecerías (Chan et al., 2001). El siguiente género es *Methanobrevibacter* (secuencias G y N) representada con un alto porcentaje de identidad con *M.oralis* y *M.smithii* que se caracterizan por presentarse en sedimentos acuosos y reflejan contaminación fecal, se consideran *Archaeas* oxidadoras de amonio (Sponza y Cigal, 2008). En el caso de las *Archaeas* la mayoría de ellas están causando un efecto negativo sobre las membranas dado que las están taponando, provienen de la cama de lodos del biorreactor y no son arrastradas desde el inicio del tratamiento con ARC, por lo que se observa en la figura 9.4 de manera general es su presencia en el lavado normal.

La información recavada de este dominio se complementó con la investigación enfocada en la región hipervariable V6 del gen ribosomal 16 S RNAr.

Se observó que en todos los tratamientos, la familia dominante es *Methanospirilliaceae*, correspondiente al 50% del total de las secuencias reamplificadas (K5, K6, K7, K8, K9). Esto puede entenderse como que; *Methanospirillum* que es *Archaea* hidrogenotrófica metanógena, cualquiera de sus especies, predomina en la "torta", desde el inicio y en etapas tardías. En un inicio, no queda claro si por efecto del lavado, pero en etapas más avanzadas porque gana presencia conforme la red o biopelícula taponante se engruesa formando colonias bien consolidadas en la membrana. La predominancia de *Methanospirillum* sobre *Methanosaeta* en la biopelícula formada en la membrana puede explicarse debido a la energía liberada, pues el rendimiento de la biomasa es menor para metanobacterias consumidoras de acetato que para las consumidoras de hidrogeno, favoreciendo la predominancia de *Methanospirillum* sobre *Methanosaeta* (Fernández et al., 2007).

El siguiente grupo que está presente en orden de dominancia es el de *Methanosarcinales* (secuencias K1, K2, K3). *Methanosaeta* es el agente primordial en la formación de gránulos del lodo del biorreactor anaerobio, por ende, su predominancia en el perfil de biodiversidad es menor, ya que podría lavarse mucho menos que *Methanospirillum* sp. (Fernández et al., 2007).

El análisis demostró que existe gran similitud de las secuencias K1, K2 y K3 con *Methanosaeta concilli.*, la cual se ha reportado como dominante del lodo granular de biorreactores anaerobios y que es exclusivamente un microorganismo acetoclástico con una tasa de crecimiento muy lenta ( $V_{max}=0.11 \text{ días}^{-1}$ ) (Leclerc et al., 2001).

Por último, en esta región hipervariable V6 también se detectan secuencias relacionadas con *Methanobrevibacter* pero en menor abundancia y otra familia que antes no se había detectado, *Methanocalculus*, secuencia K4 que presenta identidad con *Methanocalculus pumilus*, la cual solo se ha identificado en muestras de sedimentos marinos reportando tener capacidad para usar hidrógeno y  $\text{CO}_2$ , como fuente de energía y ser altamente tolerante a metales pesados (Mori et al., 2000).

#### **10.4 Estudio de la población microbiana presente en la biopelícula mediante FISH**

El estudio realizado con la técnica FISH fue desarrollado en paralelo con los estudios de TGGE como complemento del análisis. Se demostró que en las muestras analizadas (tratamientos I y II) presentaron diferencias en la presencia y abundancia de los grupos estudiados, que fueron  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ - proteobacteria y de *Archaeas*, las referentes a los phyla *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota* (fig. 9.6), pero no se detectaron bacterias de la familia  $\alpha$ -proteobacteria y sólo se visualizaron de manera aislada algunas células que hibridaron con la sonda específica de la familia *Euryarchaeota*. Estos resultados indican que en el momento del muestreo las *Euryarchaeas* no se encontraban fisiológicamente activas en la biopelícula de ninguno de los dos tratamientos a diferencia de las *Crenarchaeas*.

Analizando los resultados obtenidos, se observa que al inicio del taponamiento, para las membranas alimentadas con efluente UASB (I), en la fase de adhesión, la población dominante respecto al dominio bacteria es de la familia beta, lo cual explica la abundancia de las especies *Comamonadaceae* refelejada en los otros análisis. En cambio para el tratamiento II, los microorganismos dominantes pertenecen a las familias epsilon, gamma y delta proteobacteria. Esto se puede entender con la diferencia que existe entre que un microorganismo este vivo y/o activo, pues lo que se determina por estudios de FISH es que los microorganismos estén activos, cosa que no se puede probar con análisis de TGGE.

Por medio de esta técnica, se puede interpretar que los microorganismos pertenecientes a las familias epsilon, gama y delta han sido retenidos por el biorreactor, demostrando que la velocidad de taponamiento de las membranas por

estos grupos es menor, ya que tienen un tratamiento previo a diferencia de las membranas alimentadas directamente con ARC (tratamiento II) que refleja presencia abundante de estos grupos.

Respecto al dominio *Archaea*, los resultados obtenidos por esta técnica confirman lo reflejado en análisis anteriores: primero que la abundancia de las *Archaeas* sobre las bacterias es mucho menor; segundo, que al inicio de ambos tratamientos se observa la presencia de *Crenarchaeas*, en mayor número y mejor definidas en el tratamiento II que en el I.

En los estudios de TGGE, la presencia de *Crenarcheota* es casi nula, pero esto puede interpretarse, como que si existen en un número muy pequeño en las biopelículas formadas y que se encuentran activas en el tratamiento II.

Para el otro grupo estudiado (*Euryarchaeota*), es posible que al momento del muestreo las células no estuvieran fisiológicamente activas en la biopelícula (Fernández *et al.*, 2007).

Con todo esto, es posible explicar que los microorganismos encontrados en la biopelícula al inicio del taponamiento tienen un efecto relevante, ya que se encuentran biológicamente activos y son capaces de excretar sustancias poliméricas extracelulares como producto del metabolismo (Miura *et al.*, 2007a). Así mismo se pudo observar que existe gran cantidad de materia orgánica en el medio, quizá como producto de lisis celular, que produjo auto-florescencia (Wagner *et al.*, 2003).

## 11. CONCLUSIONES

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

1. La diversidad encontrada del dominio *Archaea* en todos los tratamientos es menor que la de *Bacteria*.
2. La mayoría de las bacterias causantes del taponamiento de las membranas acopladas al reactor UASB corresponde a la subclase  $\epsilon$ -Proteobacteria.
3. La Bacteria *Arcobacter cryaerophilus* fue identificada en todos los tratamientos y tiene relevancia por su condición de patógena y microaerófila. Además se ha reportado asociada a contaminación fecal proveniente de rastros y granjas.
4. Los grupos filogenéticos bacterianos de las subclases  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$ -Proteobacteria fueron identificados en la torta taponante por su capacidad de excretar SPE.
5. Respecto a las *Archaeas*: los perfiles de biodiversidad indican que la mayoría de la microbiota identificada proviene de la cama de lodos del biorreactor anaerobio UASB, por lo que la composición del influente del biorreactor no tiene un efecto significativo como lo tiene el efluente.
6. Las especies *Methanosaeta* y *Methanobacterium* fueron identificadas y participan en el funcionamiento del biorreactor UASB, así mismo contribuyen en el taponamiento de las membranas por la excreción de SPE.
7. La mayoría de la microbiota identificada por FISH, asociada a la película taponante tiene actividad recalcitrante y capacidad para secretar sustancias poliméricas extracelulares.
8. La microbiota asociada a la película taponante de todos los tratamientos refleja la presencia de microorganismos no cultivables.
9. Compuestos recalcitrantes como el magnesio, silicio y cobre fueron identificados por EDX y se observó por MEB que están embebidos en la biopelícula formando cristales.

## 12. ANEXOS

### 12.1 Análisis general de EDX y MEB.

#### Generación de nuevos materiales nanoestructurados con aplicación en remoción de contaminantes recalcitrantes

Project: Generacion de nuevos materiales nanoestructurados con aplicacion en remocion de contaminantes recalcitrantes

Sample: VSLAV03  
Type: Default  
ID:

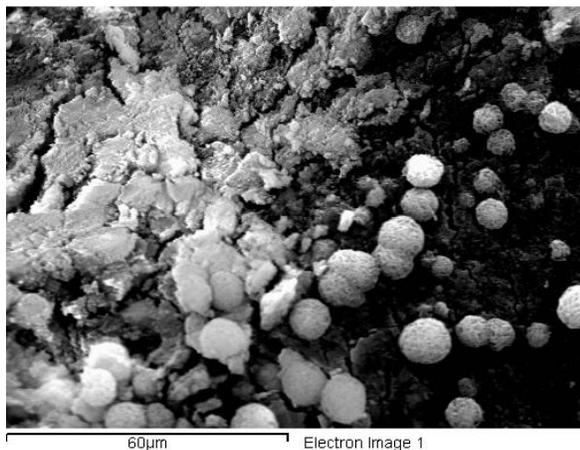
Spectrum processing :  
Peaks possibly omitted : 2.165, 10.290, 11.479 keV

Processing option : All elements analyzed (Normalised)  
Number of iterations = 6

Standard :

C CaCO3 1-Jun-1999 12:00 AM  
O SiO2 1-Jun-1999 12:00 AM  
F MgF2 1-Jun-1999 12:00 AM  
Na Albite 1-Jun-1999 12:00 AM  
Mg MgO 1-Jun-1999 12:00 AM  
Al Al2O3 1-Jun-1999 12:00 AM  
Si SiO2 1-Jun-1999 12:00 AM  
Cl KCl 1-Jun-1999 12:00 AM  
Ca Wollastonite 1-Jun-1999 12:00 AM  
Fe Fe 1-Jun-1999 12:00 AM  
Zn Zn 1-Jun-1999 12:00 AM

Element	Weight%	Atomic%
C K	28.38	37.58
O K	45.84	45.57
F K	14.51	12.15
Na K	-5.81	-4.02
Mg K	1.83	1.20
Al K	1.95	1.15
Si K	7.97	4.51
Cl K	0.99	0.44
Ca K	1.83	0.73
Fe K	1.77	0.50
Zn K	0.73	0.18
Totals	100.00	



# Generacion de nuevos materiales nanoestructurados con aplicacion en remocion de contaminantes recalcitrantes

12/11/2007 11:25:23 a.m.

Project: Generacion de nuevos materiales nanoestructurados con aplicacion en remocion de contaminantes recalcitrantes

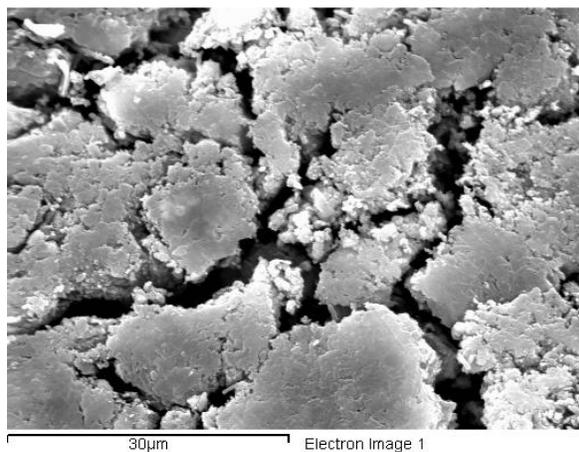
Sample: VSLAV03  
Type: Default  
ID:

Spectrum processing :  
Peaks possibly omitted : 10.329, 11.453 keV

Processing option : All elements analyzed (Normalised)  
Number of iterations = 6

Standard :  
C CaCO3 1-Jun-1999 12:00 AM  
O SiO2 1-Jun-1999 12:00 AM  
F MgF2 1-Jun-1999 12:00 AM  
Na Albite 1-Jun-1999 12:00 AM  
Mg MgO 1-Jun-1999 12:00 AM  
Al Al2O3 1-Jun-1999 12:00 AM  
Si SiO2 1-Jun-1999 12:00 AM  
S FeS2 1-Jun-1999 12:00 AM  
Cl KCl 1-Jun-1999 12:00 AM  
Ca Wollastonite 1-Jun-1999 12:00 AM  
Fe Fe 1-Jun-1999 12:00 AM  
Zn Zn 1-Jun-1999 12:00 AM

Element	Weight%	Atomic%
C K	38.16	49.03
O K	31.64	30.52
F K	20.86	16.95
Na K	-3.92	-2.63
Mg K	0.74	0.47
Al K	1.75	1.00
Si K	3.60	1.98
S K	3.04	1.46
Cl K	0.42	0.18
Ca K	0.59	0.23
Fe K	1.94	0.54
Zn K	1.19	0.28
Totals	100.00	



### 13. REFERENCIAS

Adham, S., P. Gagliardo, L. Boulos, J. Oppenheimer, and R. Trussell (2001) *Feasibility of the membrane bioreactor process for water reclamation*. Water Science & Technology, 43(10):203-209.

Ahmed, Z., Cho, J., Lim, B-R., Song, K-G. and Ahn, K-H. (2007). *Effects of sludge retention time on membrane fouling and microbial community structure in a membrane bioreactor*. Journal of Membrane Science. 287:211-218.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res. 25(17):3389-402. Review.

Amann, R., Fuchs, B.M. Behrens, S. (2001). *The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization*. Current Opinion in Biotechnology. 12:231-236.

Amann, R., Lemmer, H., Wagner, M. (1998). *Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques*. FEMS Microbiology, Ecology 25:205-215.

Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological reviews. 59:143-169.

Amann, R. I, Krumholz, L, Stahl, D.A. (1990). *Fluorescent- oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology*. J. Bacteriol. 172, 762-770.

APHA, AWWA, WEF (1999) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Edition*, American Public Health Association, Washington, DC

Aptel, P. and Buckley, C. (1998) *Tipos de operaciones de membranas. Tratamiento del agua por procesos de membrana. Principios, procesos y aplicaciones*. American Water Works Association Research Foundation. Madrid. McGrawHill.

Arros-Alileche S, Merin U, Daufin G, Gésan-Guiziu G. (2008). *The membrane role in an anaerobic membrane bioreactor for purification of dairy wastewaters: a numerical simulation*. Bioresour. Technol. 99(17):8237-44.

Baek, H. and Pagilla. (2003). *Comparison of aerobic and anaerobic membrane bioreactor for municipal wastewater treatment*. Conference proceedings WEFTEC, Los Angeles.

Becker, S., Coger, P., Oehlmann, R. and Ernst, A. (2000). *PCR base in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities*. Applied and Environmental Microbiology. 66:4945-4953.

Begon, M., Harper, J.L. and Townsend, C.R. (1999). *Ecología, Individuos, poblaciones y comunidades*. ISBN 84-282-1152-3. 3º Edición. Ediciones Omega, S.A., Barcelona.

Berube, D. and Soucy, M. (2004). *Monitoring aluminium before and after filtration*. Journal of Supply. Research and Technology. 53:271-285.

Bitton G. Wastewater microbiology, 2<sup>nd</sup> ed., New York: Wiley-Liss; 2005.

Briones AM, Daugherty BJ, Angenent LT, Rausch KD, Tumbleson ME, Raskin L (2007). *Microbial diversity and dynamics in multi- and single-compartment anaerobic bioreactors processing sulfate-rich waste streams*. Environ Microbiol. 9(1):93-106

Brock, T.D. and M.T. Madigan (2000) *Biología de los Microorganismos*. 8a edición, Prentice Hall. España.

Brown, J. R., Douady, C. J., Italia, M. J., Marshall, W. E., and Stanhope, M. J. (2001). *Universal trees based on large combined protein sequence data sets*, Nat. Genet. 28, 281–285.

Brüggemann, J., Stephen, J.R., Chang, Y.J., Macnaughton, S.J., Kowalchuk, G.A., Kline, E. and White, D.C. (2000). *Competitive PCR-DGGE analysis of bacterial mixture: an internal standard and an appraisal of template enumeration accuracy*. Journal of Microbiology and Methods 49:111-123.

Buckley, C. y Jacangelo, J. (1998). Microfiltración. Tratamiento del agua por procesos de membrana. Principios, procesos y aplicaciones. American Water Works Association Research Fundation. Madrid. McGrawHill.

Bullock C. (2000) *The Archaea- a biochemical perspective*. Biochem. Molec. Biol. Ed., 28: 186-194.

Chan O-C, Liu W-T, Fang HHP (2001). *Study of microbial community of brewery-treating granular sludge by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene*. Water Sci Technol 43:77–82

Choo K.H and Lee C.H, (1996) *Membrane fouling mechanisms in the membrane – coupled anaerobic bioreactor*. Wat.Res.30(8): 1771-1780.

Cid León DM. (2007) *Tesis de Maestría en Ingeniería. Tratamiento de agua residual municipal mediante un biorreactor anaerobio de membrana a escala piloto.* UNAM. México.

Collado L, Inza I, Guarro J, Figueras MJ. (2008). *Presence of Arcobacter spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution.* Environ Microbiol. 2008 Jun;10(6):1635-40.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. (1999) *Bacterial biofilms; a common cause of persistent infections.* Science 284: 1318-1322.

Dabert P, Delgenès JP, Moletta R, Godon JJ. (2002) *Review; Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics.* Reviews in Environmental Science and Biotechnology 1: 29-49.

Daims H, Brühl, A, Amann R.I, Schleifer, K.H, Wagner M. (1999). *The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set.* Syst. Appl. Microbiol. 22, 434-444.

DeLong, E.F., Wickman, G.S. and Pace, N.R. (1989). *Phylogenetic satins: ribosomal RNA based probes for the identification of single cells.* Science 243:1360-1363.

Fane, A, Chang, S. (2002) *Membrane bioreactors: Design and operational options.* Filtration and Separation.

Fang, Q., Brockmann, S., Botzenhart, K. and Wiedenmann, A. (2003). *Improved detection of Salmonella spp. In foods by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA probes: a comparison with conventional culture methods.* Journal of Food Protection 66:723-731.

Farrelly, V., Rainey, F.A. and Stackebrandt. (1995). *Effect of genome size and rrn copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species.* Applied and Environmental Microbiology 61:2798-2801.

Felsenstein, J. (1985). *Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.* Evolution 39:783-791.

Fernández N, Díaz EE, Amils R, & Sanz. JL. (2007) *Analysis of Microbial Community during Biofilm Development in an Anaerobic Wastewater Treatment Reactor.* Microb Ecol. 2008 Jul;56(1):121-32.

Forterre P, Brochier C., Philippe H. (2002) *Evolution of the Archaea. Theoretical Population Biology.* 61, 409–422 (2002).

Gómez-Villalba, B, Calvo, C., Vilchez, R., Gónzale-López, J. and Rodelas, B. (2006) *TGGE analysis of the diversity of ammonia-oxidizing and denitrifying*

*bacteria in submerged filter biofilms for the treatment of urban wastewater.* Applied Microbiology and Technology 72:393-400.

Harada, H., Momoni, K., Yamazaki, S. and Takizawa, S. (1994). *Application of anaerobic-UF membrane reactor for treatment of a wastewater containing high strength particulate organics.* Water Science Technology 30:307-319.

Herrera. M. (2007). *Biorreactores Anaerobios de membrana: Efectividad de Remoción de Contaminantes y Caracterización de los Fenómenos de Taponamiento.* Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. UNAM.

Hoi HT, Lipman LJ, Gaastra IW. (2008) *Arcobacter, a possible new pathogenic bacterium for humans.* Tijdschr Diergeneeskd. 1;133(17):712-4

Hontoria, E., González, F.J., Gómez, M. A. y Moreno, B. 2005. *Reutilización de las Aguas Residuales Urbanas.* Edit. Placido Cuadros. ISBN: 84-931385-4-1.

Hugenholz, P., Goebel, B. M. and Pace, N. R. (1998). *Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity.* Journal of Bacteriology 180:4765-4774.

Ihssen J, Horn MA, Matthies C, Gössner A, Schramm A, Drake HL. (2003). *N<sub>2</sub>O-producing microorganisms in the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* are indicative of ingested soil bacteria.* Appl Environ Microbiol. 69(3):1655-61

Ivnitsky.H, Katz.I, Minz D, Volvovic G., Shimoni E., Kesselman E. Semiat R. Dosoretz CG. (2007). *Bacterial community composition and structure of biofilms developing on nanofiltration membranes applied to wastewater treatment.* Water Research. 41: 3924 – 3935.

Ivnitsky.H, Katz.I, Minz D, Shimoni.E, Chen Y, Trachitzky J, Semiat R, Dosoretz CG. (2005). *Characterization of membrane biofouling in nanofiltration processes of wastewater treatment.* Desalination. 185:255-268.

Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. and Gibson,T.J. (1998). *Multiple sequence alignment with Clustal X.* Trends Biochemical Science. 23:403-405.

Jeison D & van Lier J.B (2006) *On-line cake-layer management by trans-membrane pressure steady state assessment in Anaerobic Membrane Bioreactors for wastewater treatment.* Biochemical Engineering Journal 29 204–209

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. and Nei, M. (2001). *MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software,* Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

Kruskal, J. B. (1983). An overview of sequence comparison. In D. Sankoff and J. B. Kruskal, (ed.), *Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison*, pp. 1-44 Addison Wesley.

Lawrence, J. R., Chenier M. R., Roy, R., Beaumier, D., Fortin, N., Swerhorne, G. D. W., Neu, T. R. and Greer. C. W. (2004). *Microscale and molecular assessment of impacts of nickel, nutrients and oxygen level on structure and function of river biofilm communities*. *Applied and Environmental Microbiology* 70:4326-4339.

Leclerc M, Delbes C, Moletta R, Godon J (2001). *Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester*. *FEMS Microbiol Ecol.* 34(3):213-220.

Liu Y, Tay J-H (2002) *The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge*. *Water Research* 36:1653–1665

Loy, A., Horn, M., and Wagner, M. (2003). *ProbeBase - an online resource for rRNA targeted oligonucleotide probes*. *Nucleic Acids Research* 31:514-516.

Luxmy, B.S., Nakajima, F. and Yamamoto, K. (2000). *Analysis of bacterial community in membrane-separation bioreactors by fluorescent in situ hybridization (FISH) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) techniques*. *Water Science and Technology.* 41:259-268.

Manem, J. y Sanderson, R. (1998). *Biorreactores de membrana. Tratamiento del agua por procesos de membrana. Principios, procesos y aplicaciones*. American Water Works Association Research Fundation. Madrid. McGraw Hill.

Manz, W., Wagner, M., Amann, R. and Schleifer K-H. (1994). *In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants*. *Water Research* 28:1715-1723.

Metcalf and Eddy. (2003). *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 4th edition. Boston, MA: McGraw Hill Inc New York USA.

Min B, Cheng S, Logan BE. (2005). *Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells*. *Water Res.*39(9):1675-86.

Miura. Y, Watanabe, Y. Okabe. S. (2007a). *Membrane biofouling in Pilot- Scale Membrane Bioreactors (MBR's). Treating Municipal Wastewater: Impact of Biofilm Formation*. *Environmental science and Technology*, 41(2): 632-638.

Miura, Y., Hiraiwa, M.N., Ito, T., Itonaga, T., Watanabe, Y., Okabe, S. (2007b). *Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater:*

*relationship between community stability and reactor performance*. Water Research 41:627-637.

Molina Muñoz ML. (2007). Tesis doctoral; *Estudio de los procesos microbianos implicados en el tratamiento de aguas residuales urbanas mediante biorreactores de membrana sumergida*. Universidad de Granada. España.

Mori K, Yamamoto H, Kamagata Y, Hatsu M, Takamizawa K. (2000). *Methanocalculus pumilus sp. nov., a heavy-metal-tolerant methanogen isolated from a waste-disposal site*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2000), 50, 1723–1729

Muyzer.G. (1999). *DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems*. Current opinion in Microbiology. 2:317-322

Muyzer.G & Smalla.K. (1998). *Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology*. Ntionie van Leeuwenhoek. 73: 127-141.

Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993). *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA*. Applied and Environmental Microbiology 59:695-700.

Nicolaisen M.H. and Ramsing N.B. (2002). *Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria*. Journal of Microbiological Methods. 50:189-203

Nocker A, Burr M, Camper AK. (2007). *Genotypic microbial community profiling: a critical technical review*. Microbial Ecol In press.

Pernthaler, A., Preston, C.M., Pernthaler, J., DeLong, E.F. and Amann, R. (2002). *Comparison of fluorescently labelled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea*. Applied and Environmental Microbiology. (68) 661-667.

Polz, M.F. and Cavanaugh, C.M. (1998). *Bias in template to product ratios in multitemplate PCR*. Applied and Environmental Microbiology. 64: 3724-3730.

RaskinL, Stromley JM, Rittmann BE and Stahl DA. (1994) *Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 5368-5382

Ridgway, H.F. and Flemming, H.C. 1996. Membrane biofouling. Treatment Membrane Processes. McGraw-Hill, Boston

Rittmann, B. E. and McCarty, P.L. 2001. *Biotechnología del Medio Ambiente. Principios y Aplicaciones*. 1ª Edición. McGraw-Hill.

Rosenberger, S., Krüger, R., Manz, W., Szewzyk, U. and Kraume, M. (2002). Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal waste water. *Water Research*. 36:413-420.

Saddoud A, Sayadi S (2007). *Application of acidogenic fixed bed reactor to anaerobic membrane bioreactor for sustainable slaughter house waste water treatment*. *J Hazard Mater*. 19;149(3):700-6.

Saitou, N. y Nei, M. (1987). *The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Sánz. J and Köchling.T. (2007). *Molecular biology techniques used in wastewater treatment. An overview*. *Process Biochemistry*. 42:119-133.

Savelkoul, P. H. M., Aarts, H. J. M., De Haas J, Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J. L. W., Schouls L., and Lenstra J. (1999). *Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art*. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:3083- 3091.

Schloe K. Gillis M, Hoste B. Pot B, Vancanneyt M, Mergaert J, Swings J, Biedermann J, Süßmuth R. (2000). *Polyphasic characterization of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (p(HB-co-HV)) metabolizing and denitrifying Acidovorax sp. strains*. *Syst Appl Microbiol*. 23(3):364-72.

Schmidt JE, Ahring BK (1995) *Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors*. *Biotechnol Bioeng* 49:229–246

Schramm, A., De Beer, D., Wagner, M. and Amann, R. (1998). Identification and activities *in situ* of *Nitrosospira* and *Nitrospira spp.* as dominant population in a nitrifying fluidized bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3480-3485

Sekiguchi Y, Kamagata Y, Nakamura K, Ohashi A, Harada H (1999) *Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules*. *Appl Environ Microb* 65:1280–1288

Snelling W.J, Matsuda M, Moore J.E and Dooley J.S.G. (2005). *Under the microscope: Arcobacter*. *Letters in Applied Microbiology* ISSN. Review. 42, 7-14.

Sohn JH, Kwon KK, Kang JH, Jung HB, Kim SJ. (2004) *Novosphingobium pentaromativorans sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic*

*hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54, 1483–1487

Sombatsompop. K, Visvanathan.C. (2006). *Evaluation of biofouling phenomenon in suspended and attached growth membrane bioreactor systems*. Desalination. 201:138-149.

Sponza DT, Cigal C. (2008). *Relationships between anaerobic consortia and removal efficiencies in an UASB reactor degrading 2,4 dichlorophenol (DCP)*. Journal of Environmental Manage. 87(1):177-92.

Stamper, D.M., Walch, M. and Jacobs, R.N. (2003). *Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments*. Applied and Environmental Microbiology. 69:852-860.

Stephenson. T. Judd. S. (2000). *Membrane Bioreactors for Wastewater Treatment*. IWA Publishing. London U.K

Suzuki, M.T. and Giovannoni, S.J. (1996). *Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR*. Applied and Environmental Microbiology. 62:625-630.

Till, S. and Mallia, H. (2001). *Membrane bioreactors: wastewater treatment applications to achieve high quality effluent*. Annual Water Industry Engineers and Operators' Conference. Bendigo.

Vaneechoutte, M., Cartwright, C.P., Williams, E.C., Jäger, B., Tichy, H.-V., De Baere, T., De Rouck, A. and Verschraegen, G. (1996). *Evaluation of 16S rRNA Gene Restriction Analysis for the Identification of Cultured Organisms of Clinically Important Clostridium Species*. Anaerobe 2:249-256.

Viega M.C, Jain M.K, WU W.E, Hollingsworth R.I and Zeikus G. (1997) *Composition and role of extracellular polymers in methanogenic granules*. Applied and Environmental Microbiology 63(2):403-407.

Vinuesa, P., Rademaker, J.L.W., de Bruijn, F.J. and Werner, D. (1998). *Genotypic characterization of Bradyrhizobium strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing*. Applied and Environmental Microbiology 64:2096-2104.

Visvanathan. C, & Ben Aim. R. (2000) *Membrane Separation Bioreactors for Wastewater Treatment*. Critical reviews in Environmental Science and Technology. 30(1) 1-48.

Wagner, M., Horn, M. and Daims, H. (2003). *Fluorescence in situ hybridization for the identification of prokaryotes*. Current Opinion in Microbiology. 6:302-309.

Wagner, M., Loy, A., Nogerira, R., Purkhold, U., Lee, N. and Daims, H. (2002). *Microbial community composition and function in wastewater treatment plants*. Antonie Van Leeuwenhoek 81:665-680.

Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H-P and Schleifer K-H. (1995). *In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria*. Systematic and Applied Microbiology. 19:251-264.

Wagner, M., Amann, R, Lemmer, H. and Schleifer K-H. (1993). *Probing activated sludge with oligonucleotides specific for Proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structures*. Applied and Environmental Microbiology 59:1520-1525.

Wang, G. and Wang C-Y. (1997). *Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes*. Applied and Environmental Microbiology. 63:4645-4650.

Ward, B.B. and O'Mullan, G.D.O. (2002). *Worldwide distribution of Nitrosococcus oceani, a marine ammonia-oxidizing  $\gamma$ -proteobacterium, detected by PCR and sequencing of 16SrRNA and amoA genes*. Applied Environmental and Microbiology. 68:4153-4157.

Watanabe K., Teramoto M., Futamata H. and Harayama S. (1998). *Molecular detection, isolation, and physiological characterisation of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated-sludge*. Applied and Environmental Microbiology. 64:4396-4402.

Weber KA, Urrutia MM, Churchill PF, Kukkadapu RK, Roden EE. (2006). *Anaerobic redox cycling of iron by freshwater sediment microorganisms*. Environmental Microbiol. 8(1):100-13

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. 1991. *16s ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. The Journal of Bacteriology. 173:697-703.

Witzig, R., Manz, W., Rosenberg, S., Krüger, U., Kraume, M. and Szewzyk, U. (2002). *Microbiological aspects of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater*. Water Research. 36:394-402.

Woese, C. R. (1987). *Bacterial evolution*. Microbiological Reviews 5:221-271.

[www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)

[www.microbila-ecology.net/probebase](http://www.microbila-ecology.net/probebase)

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

[www.sterlitech.com](http://www.sterlitech.com)

[http://www.kochmembrane.com/sep\\_mf.html](http://www.kochmembrane.com/sep_mf.html)