



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
(FACULTAD DE QUÍMICA)

**MICROBIOTA ASOCIADA AL
TAPONAMIENTO EN UN BIORREACTOR
ANAEROBIO DE MEMBRANA SUMERGIDA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

TANIA LIZET GÓMEZ BORRAZ

**TUTOR: DR. ADALBERTO NOYOLA ROBLES
(INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM)**

COMITÉ TUTORAL:

- * DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH (FACULTAD DE QUÍMICA)
- * DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO (FACULTAD DE QUÍMICA)
- * DR. ADALBERTO NOYOLA ROBLES (INSTITUTO DE INGENIERÍA)

MÉXICO, D. F.

Diciembre de 2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Adalberto Noyola Robles, en el laboratorio de Ing. Ambiental del Edificio 5, del Instituto de Ingeniería de la UNAM.

El Comité tutorial que asesoró el desarrollo de la presente tesis estuvo integrado por:

- * Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
- * Dr. Víctor Manuel Luna Pabello
- * Dr. Adalberto Noyola Robles (Tutor)

El jurado para la defensa del examen de Maestría lo conformaron:

- * Dr. Rafael Vázquez Duhalt (Presidente)
- * Dr. José Adelfo Escalante Lozada (Vocal)
- * Dr. Alfredo Martínez Jiménez (Vocal)
- * Dra. María del Carmen Wachter Rodarte (Vocal)
- * Dra. Esperanza Martínez Romero (Secretario)

*A mis padres, Gloria y Jesús,
y mis hermanos, Jesús, Katerin,
Manuel y Violeta, con todo mi
amor, esfuerzo y dedicación....*

*Para ti mi cielo, mi amado
Mike, un sueño más cumplido
a tu lado, te amo desde lo más
profundo de mi ser...*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su infinito amor, por la vida que me ha dado y por permitirme continuar haciendo realidad lo imposible.

A mis padres por ser el pilar de mi vida y el mejor ejemplo que pude haber tenido. Gracias por su apoyo incondicional, por ser quienes me enseñaron que la disciplina, la constancia y sobre todo las ganas y el coraje son los elementos claves para el éxito, porque la mediocridad no tiene cabida en nuestras vidas. Los amo y saben que el éxito de uno, es el éxito de 6, vamos pa' delante.

A mis hermanos, Chui, Katy, Manollo y Violet, los mejores hermanos en este mundo. Siempre en las buenas y en las malas, gracias por acompañarme en todo momento, alegrías y tristezas, éxitos y fracasos, a pesar de la distancia, los llevo en mi corazón ahora y siempre. ¡Gracias por todo hermanitos!

Al M. en C. Humberto Castañón y la IQ. Alondra Aguilar, por impulsarme a seguir este camino, gracias por mostrarme lo que es la Ingeniería Ambiental y enseñarme a amarla.

A la UNAM por la oportunidad que brinda a sus estudiantes. Al CONACyT por el apoyo económico durante la maestría. Al Instituto de Investigaciones en Materiales, en especial al Dr. Omar Novelo por su colaboración para los análisis de microscopía electrónica de barrido.

Al Dr. Adalberto Noyola, mi tutor, por su orientación y experiencia transmitida. Gracias por darme la oportunidad de formar parte de su grupo.

A mi comité tutorial, en especial a la Dra. Maricarmen Quirasco, por sus valiosos comentarios y el apoyo demostrado.

A mi jurado asignado, muchas gracias por enriquecer esta tesis con sus valiosas aportaciones a través de sus comentarios y observaciones.

A Lety, no sé que sería el Posgrado en Ciencias Bioquímicas sin ti, gracias por ser el más grande apoyo académico en todos los trámites, por tu siempre cordial y pronta ayuda.

A Maggi, por absolutamente todo lo referente al II-UNAM. Por ayudarme siempre a seguir adelante y no sólo en lo académico, muchísimas gracias por el apoyo incondicional y tu amistad.

A mis amigos de la maestría, Clau, Ere, Oscar y Rolando, gracias por lo que me enseñaron y por su amistad.

A mis hermanitos de Copilco Hills, Almu, Javier, Luis, Tere, Tomo, Vico, Yuan (se cayó) y Zin, porque siempre he disfrutado de su compañía y muchos de los mejores recuerdos de la Ciudad de México y el mundo me los llevo de ustedes.

A mis amigos del Instituto, quiénes se fueron, y quiénes me acompañaron hasta el final de este momento. Gracias Mónica, Miguel y Kady por transmitirme sus conocimientos, por el apoyo y su amistad. Abigail, Adriana, Adrián, Alejandra, Andrea, Ana, Arnold, Carolina, Daniel, Elena, Jani, Lupita, Maribel, Mauricio, Rodolfo y Yans, mil gracias por todos los momentos juntos, por hacer de esta experiencia algo más llevadero en los momentos difíciles, los quiero y saben que pueden contar conmigo siempre que lo necesiten. Y especialmente a Leidy y Alexandra, mis colombianas favoritas, ustedes saben lo que significan para mí, gracias por estar siempre conmigo.

A toda mi familia, abuelitas Emma, Florindita y Lolita (por ser mis ángeles), tíos, primos y padrinos Elva y Bulmaro, por estar siempre al pendiente y compartir todos los logros y experiencias.

A la familia Jiménez-Rosas por hacerme sentir que puedo contar siempre con ustedes. Gracias por todo su amor y por estar conmigo compartiendo siempre y en cada momento.

Y por último a quién ha sido el más bello regalo en esta vida, Mike. Gracias mi cielo por toda tu paciencia, por impulsarme a llegar más lejos y ser una mejor persona. Pero sobre todo gracias por tu amor incondicional. Nunca olvides que: Te quiero a mi lado y para toda la vida. ¡TE AMO!

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
1. Marco teórico	13
1.1 Tratamiento de aguas residuales	13
1.2 Módulos de filtración	14
1.3 Biorreactor de membranas	14
1.4 Taponamiento de las membranas en BRM	16
1.4.1 Mecanismos de taponamiento en BRM	18
1.4.2 Factores en el taponamiento de BRM	19
1.5 Biopelículas en BRM	21
1.6 Estudio de la diversidad microbiana	23
1.6.1 <i>Bacteria</i>	26
1.6.2 <i>Archaea</i>	27
1.6.3 Cálculo de la diversidad microbiana	29
1.7 Microbiota en BRAMS	34
2. JUSTIFICACIÓN	37
3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVOS	38
4.1 Objetivo general	38
4.2 Objetivos específicos	38
5. METODOLOGÍA	39
5.1 Estudio de las comunidades microbianas	42
5.1.1 Extracción de ADN	42
5.1.2 Determinación de la concentración de ADN en las muestras	43
5.1.3 Amplificación de fragmentos del gen codificante para la subunidad ribosomal 16S	43
5.1.4 Separación de los fragmentos por electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturizante (DGGE por sus siglas en inglés)	46
5.2 Análisis del perfil de bandas en geles de poliacrilamida	47
5.3 Reamplificación de las bandas separadas del gel de DGGE	49
5.4 Purificación del ADN de las bandas, y secuenciación	50
5.5 Análisis por microscopía electrónica de barrido y espectroscopía dispersiva de rayos X	50
6. RESULTADOS	51
6.1 Obtención y amplificación de ADN de las muestras de todos los tratamientos	51
6.2 Análisis del perfil de bandas en geles de poliacrilamida	58
6.3 Análisis de secuencias	64
6.4 Imágenes del microscopio electrónico de barrido	70
7. CONCLUSIONES	76
8. BIBLIOGRAFÍA	77
ANEXOS	91
Anexo 1. Métodos de extracción de ADN	91
Anexo 2. Cálculos para el índice de funcionalidad (Fo)	94
Anexo 3. Resultados generales de la operación del sistema BRAMS	104

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	Representación del rango de separación de las membranas	14
1.2	Biorreactor de membrana externa	15
1.3	Biorreactor de membrana sumergida	16
1.4	Representación gráfica de los 4 mecanismos de taponamiento	18
1.5	Mecanismos de taponamiento para BRM operados a flux constante	19
1.6	Factores que afectan el taponamiento en un BRMS	20
1.7	Modelo de formación de una biopelícula	21
1.8	Estructura secundaria de la molécula de ARN ribosomal 16S de <i>Escherichia coli</i> .	24
1.9	a) Regiones conservadas y regiones variables en la subunidad pequeña del ribosoma (16S para procariontes, 18S para eucariontes). b) Diferencias en la región marcada con la estrella; para 3 microorganismos diferentes; <i>E. coli</i> (<i>Bacteria</i>), <i>M. vanielli</i> (<i>Archaea</i>) y <i>S. cerevisiae</i> (<i>Eukarya</i>)	25
1.10	Árbol filogenético de <i>Bacteria</i> basado en las secuencias de ADN ribosomal 16S para cepas puras y librerías de clonas obtenido a partir de muestras naturales	26
1.11	Árbol filogenético de los grupos de <i>Archaea</i> basados en secuencias de proteínas ribosomales. Los autores sugieren estudios posteriores para la confirmación de la posición filogenética de todos los grupos en el árbol	28
1.12	Reacción en cadena de la polimerasa	31
1.13	Esquema del procedimiento general de PCR-DGGE	33
1.14	Ejemplo de un análisis estadístico sobre el perfil de bandas obtenido por DGGE	34
5.1	a) BRAM automatizado escala laboratorio. b) Membrana sumergida	39
5.2	BRAMS escala laboratorio.	39
5.3	Condiciones de operación del sistema BRAMS	40
5.4	Metodología general para el análisis de las muestras de biopelícula	41
5.5	a) Ejemplo de gel de poliacrilamida con muestras de amplificadas. b) Identificación de las bandas presentes en el gel	47
5.6	Ejemplo de matriz binaria del gel de poliacrilamida (muestras del ejemplo anterior)	48
5.7	Curva de Pareto-Lorenz para ecología microbiana	49
6.1	Amplificación de los fragmentos de PCR por los tres diferentes métodos de extracción (1. Genetic ID modificado, 2. Klocke <i>et al.</i> , 2003; 3. Power Soil). Muestra: lodo anaerobio	52
6.2	a) Gel para <i>Bacteria</i> , con cebadores 8f-519-r, 341f-907r y 954f-1369r, de izquierda a derecha respectivamente; b) Gel para <i>Archaea</i> , con cebadores 344f-519r, 787f-1059r y 1106f-1378r	54
6.3	Gel de poliacrilamida de las diferentes muestras para <i>Bacteria</i>	56
6.4	Bandas más representativas del patrón de migración obtenido a partir del gel de poliacrilamida anterior (<i>Bacteria</i>)	56
6.5	Gel de poliacrilamida de las diferentes muestras para <i>Archaea</i>	57
6.6	Bandas más representativas del patrón de migración obtenido a partir del gel de poliacrilamida anterior (<i>Archaea</i>)	57
6.7	Índice ponderado de riqueza (Rr) para todos los tratamientos	61
6.8	a) Membrana taponada para el tratamiento I.1. b) Membrana taponada para el tratamiento I.2.	62
6.9	Índice de funcionalidad (Fo) para todos los tratamientos	63
6.10	Árbol filogenético obtenido con el análisis de secuencias de <i>Bacteria</i> , con el programa MEGA5	65
6.11	Árbol filogenético obtenido con el análisis de secuencias de <i>Archaea</i> , con el programa MEGA5	68

6.12	Micrografías: a) Filtración continua. b) Filtración intermitente con burbujeo de N ₂ .	70
6.13	Micrografía 1200X: biopelícula y membrana	70
6.14	Micrografía 25000X, donde se observa parte de la matriz (capa taponante) que conforman las sustancias poliméricas extracelulares y los microorganismos	71
6.15	a) <i>Trichococcus flocculiformis</i> en agar R2A. b) y c) <i>T. flocculiformis</i> en sus diferentes formas morfológicas	71
6.16	a) y b) Representación de microorganismos de forma cocoide. c) y d) Microorganismos de forma filamentosa.	72
6.17	a) <i>Chlorobi</i> en Beatty <i>et al.</i> , 2005. b) Micrografía de microorganismos con forma bacilar presentes en las muestras de biopelícula.	72
6.18	a) <i>Methanosaeta</i> en Sallis y Uyanik, 2003. b) Micrografía de microorganismos con forma de bastón presentes en las muestras de biopelícula.	73
6.19	<i>Methanobacterium sp.</i> en Mori y Harayama, 2011. b) Micrografía de microorganismos con forma de bastón alargado presentes en las muestras de biopelícula.	73
6.20	Espectros de EDX obtenidos en las muestras de biopelícula. a) Cristal de Cu. b) Cristal de Cr y Fe. c) Cristal de Cl, Ca, Si y K.	74

ÍNDICE DE TABLAS

1.1	Comparación de diferentes métodos de huella molecular (<i>fingerprinting</i>) y clonación/secuenciación para el análisis de comunidades microbianas	32
5.1	Características de la membrana de ultrafiltración	40
5.2	Composición del agua residual sintética	41
5.3	Cebadores para más de una región hipervariable	43
5.4	Reactivos para reacción de amplificación para <i>Bacteria</i>	44
5.5	Reactivos para reacción de amplificación para <i>Archaea</i>	45
5.6	Composición de una solución al 100% de agentes desnaturalizantes (Volumen final de 100 mL)	46
6.1	Resultados de extracción de ADN por tres métodos diferentes	51
6.2	Resultados de extracción de ADN (L, es la muestra de lodo y M, la muestra de membrana)	53
6.3	Resultados de amplificación por PCR para <i>Bacteria</i> con los cebadores 341f-907r	54
6.4	Resultados de amplificación por PCR para <i>Archaea</i> con los cebadores 1106f-1378r	55
6.5	Coefficiente de Sörensen-Dice a partir del perfil de bandas de las muestras de <i>Bacteria</i>	58
6.6	Coefficiente de Jaccard a partir del perfil de bandas de las muestras de <i>Bacteria</i>	59
6.7	Coefficiente de Sörensen-Dice a partir del perfil de bandas de las muestras de <i>Archaea</i>	60
6.8	Coefficiente de Jaccard a partir del perfil de bandas de las muestras de <i>Archaea</i>	60
6.9	Índices de Rr y Fo para todos los tratamientos	61
6.10	Resultados de secuenciación para las bandas escindidas del gel de <i>Bacteria</i> , todos los tratamientos	64
6.11	Resultados de secuenciación para las bandas escindidas del gel de <i>Archaea</i> , todos los tratamientos	67

MICROBIOTA ASOCIADA A UN BIORREACTOR ANAEROBIO DE MEMBRANA SUMERGIDA (BRAMS)

RESUMEN

El uso de procesos anaerobios para el tratamiento de aguas residuales ofrece importantes ventajas con respecto a los aerobios como son: menor generación de biomasa, menor gasto energético y producción de biogás aprovechable. Ahora bien, la tecnología de los biorreactores de membrana ha permitido que al acoplar membranas de micro o ultrafiltración, se mejore aun más el proceso, usando sistemas más compactos (ya que no se requiere un sedimentador secundario como post-tratamiento), y genere un efluente ya filtrado de mejor calidad (libre de sólidos, turbidez y microorganismos). Sin embargo, el principal inconveniente de estos sistemas es el inevitable taponamiento de las membranas, lo cual eleva los costos de operación y mantenimiento. Este taponamiento ha sido investigado con el fin de determinar cuáles son los principales componentes que ocasionan este efecto adverso, y proponer nuevas y mejores estrategias de control.

El objetivo de este trabajo fue por lo tanto, identificar los componentes microbianos de la capa taponante que se desarrolla en una membrana sumergida de un reactor anaerobio (UASB) a diferentes condiciones de operación (tiempo de retención hidráulico y dos métodos de limpieza: retrolavado y burbujeo de N₂). La metodología empleada para identificar lo que ocasionó el taponamiento fue: para los microorganismos, técnicas independientes de cultivo (PCR-DGGE) y la interpretación de sus resultados por medio del nuevo concepto introducido por Marzorati *et al.* (2008) de la gestión de recursos microbianos. El uso de técnicas independientes del cultivo permitió identificar algunos microorganismos de los dominios de *Archaea* y *Bacteria*, presentes en la capa taponante (65% de un total de bandas presentes en los geles de poliacrilamida). De los microorganismos identificados para *Bacteria*, los géneros *Chloroflexi* y *Leptonema*, sólo se encontraron en las muestras de biopelícula. Sin embargo, esto fue probablemente por su mayor abundancia en las muestras de biopelícula a diferencia de las muestras del lodo anaerobio, debido a que al tratarse de un reactor alimentado con agua residual sintética, la fuente de toda la microbiota en la biopelícula es el lecho de lodos y sus gránulos anaerobios. *Trichococcus sp.* fue el microorganismo que se presentó mayormente en todos los tratamientos (tanto filtración continua como filtración intermitente, con y sin burbujeo de nitrógeno). Para el dominio *Archaea* se identificaron especies pertenecientes a los géneros *Methanobacterium* y *Methanosaeta*. Las comunidades de *Bacteria* presentaron una mayor diversidad, medida como índice de riqueza, en las muestras de biopelícula, y por su parte las de *Archaea*, una mayor diversidad en los gránulos anaerobios. Ambas poblaciones fueron determinadas como estables y con funciones altamente especializadas debido a los altos valores del índice de Fo obtenidos (entre 50 y 60%). Las muestras analizadas por la técnica de SEM-EDX permitieron identificar cristales de sustancias inorgánicas como cobre, hierro, cromo, calcio, entre otros, que junto con los componentes orgánicos de la biopelícula, forman la matriz compleja que es la capa taponante.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, el tratamiento de las aguas residuales se ha vuelto indispensable en nuestra sociedad. La escasez del recurso hídrico ha llevado a desarrollar diferentes tecnologías que permitan reutilizar este preciado recurso. Frente a los altos costos del proceso de tratamiento de aguas residuales, específicamente de tipo municipal, los sistemas anaerobios proveen ventajas extras que lo hacen más atractivo frente a los más comúnmente utilizados que son los aerobios. Su operación es más económica con respecto a los costos energéticos debido a que no requiere de aireación, tampoco genera los gastos de tratamiento de lodos, ya que los microorganismos anaerobios destinan la energía derivada del consumo de sustrato a la producción de metano (alrededor del 85 - 90%.) y solo un 10 - 15% a la síntesis de biomasa. Además el biogás producido, rico en metano, puede ser aprovechado para la generación de energía. Una de las principales tecnologías anaerobias es el reactor UASB (Reactor anaerobio de flujo ascendente) desarrollado por Lettinga y colaboradores en la década de 1970-1980.

Según datos de CONAGUA, en el 2010 se generaron 235.08 m³/s de aguas residuales en México, de las cuáles se colectaron 209.07 m³/s (88.9%) y únicamente 93.60 m³/s (39.8%) recibieron algún tipo de tratamiento. En México para el 2010 se encontraban instaladas 152 plantas de tratamiento (11% del total que están instaladas) que incluían en sus procesos reactores UASB, de las cuales 133 contaban solamente con esta tecnología y 19 se integraban con algún tipo de post-tratamiento. Para mejorar la calidad del efluente tratado así como minimizar las dificultades de requerimiento de espacio en las plantas de tratamiento, algunos países han comenzado a instalar sistemas de biorreactores acoplados a membranas de micro o ultrafiltración. Esta tecnología involucra membranas de distintos materiales (poliméricos, cerámicos, metálicos, etc.), configuraciones (externa o sumergida), tamaño de poro, entre otras características. Todo esto, con el fin de optimizar su uso y controlar en la medida de lo posible el taponamiento causado durante el proceso del tratamiento de las aguas residuales. El taponamiento es causado por varios factores y pueden dividirse principalmente en cuatro: las características del efluente, las características de la biomasa, las características de la membrana y las condiciones de operación. Para controlar este efecto adverso se han propuesto diferentes medidas, entre las que se destaca el retrolavado, que consiste en llevar a cabo una recirculación en sentido inverso del flujo de agua; la filtración intermitente, que permite establecer períodos de relajación (sin filtración) a la membrana y con esto permitir que los elementos pobremente adheridos puedan desprenderse, además de que a esta medida puede sumarse el burbujeo de aire, biogás, etc. (dependiendo del tipo de proceso) para provocar el desprendimiento de la capa taponante.

El estudio de todos los factores anteriormente mencionados, así como de los componentes que constituyen la capa taponante en un sistema de biorreactor de membranas, permitirá esclarecer los mecanismos de taponamiento y por consecuencia proponer estrategias de optimización de las membranas (con nuevos materiales anti-taponamiento) y mejorar las medidas de control de taponamiento, volviendo a estos sistemas una tecnología más eficiente y accesible a la población.

Este trabajo está enfocado a investigar las comunidades microbianas en biorreactores anaerobios con membrana sumergida (BRAMS), principalmente en la biopelícula formada sobre la membrana, teniendo como antecedentes los estudios realizados en este grupo de trabajo sobre biorreactores anaerobios de membrana externa: Calderón (2009), Herrera-Robledo (2011) y Salazar-Peláez (2011).

MICROBIOTA ASOCIADA A UN BIORREACTOR ANAEROBIO DE MEMBRANA SUMERGIDA (BRAMS)

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Tratamiento de aguas residuales

El sistema anaerobio es un proceso biológico ampliamente utilizado en el tratamiento de aguas residuales debido a que presenta varias ventajas con respecto a los aerobios. Cuando el agua residual tiene una alta carga orgánica, el tratamiento anaerobio se presenta como única alternativa frente al que sería un costoso tratamiento aerobio, debido al suministro de oxígeno que requiere este último (Foresti, 2002; Hegazi *et al.*, 2011). Los procesos anaerobios producen lodos en una cantidad significativamente más baja que la resultante de sistemas aerobios, además tienen la ventaja de producir metano, que puede ser utilizado en la generación de diversas formas de energía (Foresti, 2001; Jeison y van Lier, 2006; Li *et al.*, 2010).

Entre los tratamientos anaerobios existe una gran variedad de tecnologías. El reactor anaerobio de flujo ascendente y manto de lodos, mejor conocido por sus siglas en inglés como UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*), desarrollado por Lettinga y colaboradores en la década de los setenta, ha tenido gran auge en los últimos años aplicado principalmente para altas cargas orgánicas, correspondientes a aguas residuales industriales, aunque también en ciertos países se utiliza para bajas cargas orgánicas, entre las que se encuentran las aguas residuales de tipo municipal (de Sousa y Foresti, 1996; Chernicharo y dos Reis, 1999; Tandukar *et al.*, 2007). El concepto principal del reactor UASB es retener la biomasa activa mediante la formación de lodos granulares. El flujo ascendente del agua residual en tratamiento provee las condiciones necesarias para desarrollar los gránulos (Batstone *et al.*, 2004) que se componen de microorganismos que naturalmente tienden a formar aglomerados de 0.5 a 2 milímetros de diámetro con una alta velocidad de sedimentación.

Ahora bien, aunque un proceso biológico resulta eficiente para la degradación de la materia orgánica y/o remoción de nutrientes, es necesario en varias ocasiones, en función de la calidad de descarga requerida, un tratamiento posterior que permita eliminar los microorganismos y sólidos que puedan quedar de este proceso. Como una alternativa de solución, se ha planteado la combinación de procesos (físicos, químicos y biológicos) en sistemas más compactos. Actualmente, los países desarrollados han iniciado el empleo de la tecnología de biorreactores que integran una membrana de micro o ultrafiltración en el proceso, con las ventajas que esto implica en la calidad del agua. Además, la incorporación de membranas en el reactor biológico ofrece la ventaja de mantener la biomasa dentro del reactor durante períodos de tiempos más largos (retención completa de la biomasa en el reactor), permitiendo que las bacterias de baja tasa de crecimiento (como son los organismos anaerobios y algunos organismos autótrofos nitrificantes) puedan desarrollarse adecuadamente y en condiciones favorables (Chiemchaisri y Yamamoto, 1993; Fan *et al.*, 1996; Kishino *et al.*, 1996; Nah *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2011a). Sin embargo también existen ciertas desventajas, como los costos de inversión y operación de los módulos de membranas, esto último debido al taponamiento de la membrana (*fouling*), que se convierte en el principal reto de este tipo de sistemas (Le Clech *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009).

1.2 Módulos de filtración

Una membrana es un material que permite el paso selectivo de sustancias (separación física). El flujo de estas sustancias puede estar determinado por diferentes "fuerzas impulsoras", principalmente: la presión, concentración y potencial eléctrico.

En el tratamiento de aguas residuales es el tamaño de poro de la membrana lo que determina hasta qué punto son eliminados los sólidos suspendidos, los sólidos disueltos, y los microorganismos (Figura 1.1). Las sustancias de mayor tamaño que los poros de la membrana son retenidas totalmente. Las sustancias que son más pequeñas que los poros de la membrana son retenidas parcialmente, dependiendo de la construcción de una capa taponante en la membrana.

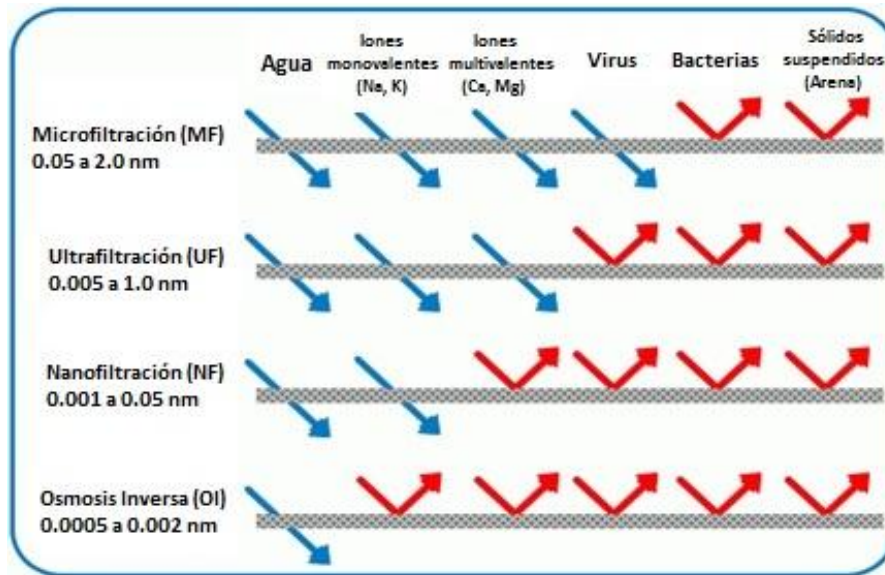


Figura 1.1 Representación del rango de separación de las membranas.
(Adaptado de <http://www.ultrafiltracion.com.mx/>)

1.3 Biorreactor de membranas (BRM)

Este concepto fue introducido en la década de 1960-1970 justo cuando estuvieron disponibles los primeros módulos de membranas de micro y ultra-filtración comerciales (Le-Clech *et al.*, 2006). Al inicio, el alto costo de las membranas fue el principal inconveniente, pero debido a mejoras en la operación de los biorreactores que permitieron alargar la vida de las membranas, así como al empleo de nuevos materiales sobre todo aquellos derivados de materiales plásticos, los costos se redujeron, permitiendo que estos biorreactores fueran una alternativa atractiva frente a sistemas convencionales como los lodos activados.

Este tipo de tratamiento combina un proceso de depuración biológica con un proceso físico que es la filtración por medio de una membrana, la cual puede retener prácticamente la totalidad de los sólidos en suspensión y la biomasa, logrando de esta manera un efluente de gran calidad. Varios autores (Samer y James, 2004; Judd, 2006; Le-Clech *et al.*, 2006) sugieren que la tecnología BRM revolucionará el tratamiento de aguas residuales, debido a que éste sistema involucra dos procesos en uno: el reactor biológico y la separación de sólidos mediante un módulo de membranas.

El BRM presenta muchas ventajas, entre las que se destaca que permite controlar el proceso biológico, pues tiene un mayor tiempo de retención de sólidos (TRS) que funciona de manera independiente del tiempo de retención hidráulica (TRH). El TRS se define como el tiempo que permanece la biomasa dentro del reactor. El TRH representa el tiempo que el sustrato (en este caso el agua residual) permanece en el reactor. Así mismo, elimina un alto porcentaje de los sólidos en suspensión y los microorganismos, tiene una elevada tasa de eliminación de la materia orgánica, menor producción de lodos debido al elevado tiempo de retención celular, su puesta en marcha es mucho más rápida, y además requiere una menor área constructiva (Hu and Stuckey, 2006; Jeison y van Lier, 2006; Huang *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2010).

El agua empleada en las plantas con tecnología BRM puede reutilizarse directamente (para fines de agua no potable) sin necesidad de emplear un sedimentador secundario posterior al tratamiento biológico ni un sistema de filtración, reduciendo así los pasos de post-tratamiento que requiere el agua (Lin *et al.*, 2010; Ballesteros *et al.*, 2011).

Existen principalmente dos tipos de BRM según la ubicación de la membrana:

- ✓ Biorreactor de membrana externa (BRME) y
- ✓ Biorreactor de membrana sumergida (BRMS).

En el primer caso, la configuración de BRME (Figura 1.2) implica que el agua es recirculada, mediante una bomba desde el biorreactor hasta la unidad de membrana que se dispone externamente a la unidad biológica. Una parte del agua se filtra (permeado) mientras que la otra (rechazo) se reenvía al reactor para que continúe la degradación de las partículas orgánicas, o bien si el flujo de permeado es lo suficiente, puede llevarse a cabo la filtración de todo el efluente (filtración “*dead-end*”). La ventaja de la configuración externa es que permite un mayor control de las condiciones hidrodinámicas que influyen en el taponamiento, sin embargo, la energía requerida para mantener la presión de filtración en la membrana conocida como presión transmembrana, es elevada (Chang *et al.*, 2002).

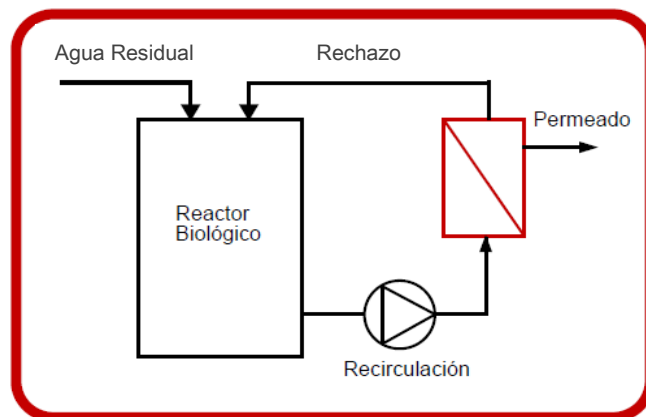


Figura 1.2. Biorreactor de membrana externa.

En el caso de un BRMS (Figura 1.3), tecnología más reciente, la unidad de membrana que realiza la separación física está inmersa en el reactor biológico. La fuerza impulsora a través de la membrana es alcanzada presurizando el biorreactor (poco común) o creando presión negativa (vacío) en el lado del permeado. Las ventajas que presenta esta configuración con respecto a los BRME se basan en la reducción en costos energéticos y el estrés en la biomasa, ocasionado por la recirculación de agua necesaria en las membranas externas (Gander *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2011).

Un parámetro importante en la evaluación del desempeño de los biorreactores de membrana es el flux. El flux es el volumen de agua tratada por unidad de área y por unidad de tiempo.

La configuración de membrana sumergida por lo general opera a condiciones de flux y de presión transmembrana mucho más bajas que un BRME por lo cual también requiere de una mayor área de membrana para el filtrado (Chang *et al.*, 2002).

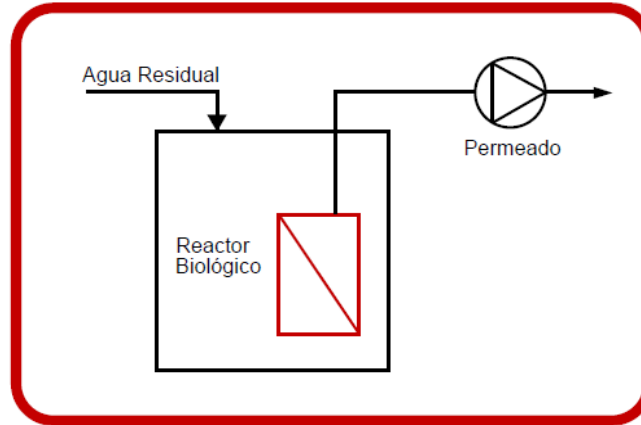


Figura 1.3. Biorreactor de membrana sumergida.

1.4 Taponamiento de las membranas en BRM

El principal inconveniente de los BRM es el inevitable taponamiento del módulo de membranas, que eventualmente reduce la eficiencia del proceso y provoca que los costos de operación y mantenimiento se incrementen al tener que llevar a cabo procesos de limpieza o bien la reposición del módulo de membranas (Chang *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2005). El taponamiento es la consecuencia de las interacciones físico-químicas entre el efluente que se filtra y la membrana (Chang *et al.*, 2002), y su efecto se mide generalmente con el incremento de la resistencia a la filtración, a través del aumento de la presión transmembrana (Lin *et al.*, 2010). En el caso de los tratamientos biológicos, los elementos que suelen producir el taponamiento son materia inorgánica, materias coloidales y las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) que son aquellas sustancias de alto peso molecular (principalmente carbohidratos y proteínas) y que pueden generarse a través del metabolismo microbiano, siendo excretados por la biomasa, misma que también es un factor fundamental en el taponamiento (Hee Yoon *et al.*, 2006; Jinhua *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2007b), o bien, a partir de la lisis celular.

Las consecuencias del taponamiento son muy importantes. La más fácilmente observable es una reducción en el caudal de permeado debido a la obstrucción de los poros, ya sea en el exterior (formación de torta) o en su interior (intra-poro). Como resultado de este hecho, se incrementa el gasto de energía, debido a que si se quiere mantener un caudal de permeado constante, se ha de aplicar un mayor diferencial de presión. Además, el taponamiento de las membranas también es responsable de incrementar la frecuencia de las limpiezas y eventual sustitución de la membrana con las repercusiones económicas y de tiempo que esto implica.

El taponamiento se puede clasificar de dos maneras:

1. De acuerdo a la naturaleza de los elementos taponantes, en taponamiento orgánico, inorgánico, formación de biopelícula o bien,
2. En base al efecto del taponamiento, como reversible o irreversible (algunos investigadores prefieren llamarlo como removible o no removible).

Dependiendo del tipo de taponamiento, existen diversas medidas de control para minimizar o eliminar el taponamiento de la membrana. Estas medidas incluyen la manipulación de las condiciones del biorreactor como son, ajustar los parámetros hidrodinámicos y el flux, así como también la optimización en el diseño de los módulos de membranas, como son las diferentes configuraciones, distintos materiales, etc. (Le-Clech *et al.*, 2006).

En general, para la limpieza de las membranas se habla de métodos físicos y químicos. Usualmente los métodos físicos se utilizan cuando se cree que predomina el taponamiento reversible, que es cuando existe la formación de una capa taponante con sustancias por lo general, de mayor tamaño que los poros de la membrana (Chang *et al.*, 2002). Los métodos físicos más empleados son la relajación (filtración intermitente), el retrolavado y la inyección de un gas (burbujas) para ocasionar un efecto de corte sobre la capa taponante de la membrana. A continuación se explican los mecanismos.

- Para el caso de la filtración intermitente, los sistemas de filtración de membranas mantienen un ciclo de filtración repetido, el cual consta de un periodo de producción (filtración) seguido de una relajación donde se detiene la filtración (Gao *et al.*, 2011). El taponamiento se reduce al combinar el periodo de relajación con inyección de burbujas de gas, como se menciona más adelante.
- El retrolavado consiste en una inversión del flujo de permeado para eliminar las sustancias depositadas sobre la membrana, a través de expandir ligeramente los poros de la membrana. Este proceso colabora a reducir el taponamiento ya que dificulta la deposición de los sólidos sobre la membrana. Durante el modo de retrolavado, la filtración se detiene y las bombas de permeado utilizadas dan marcha atrás al permeado a través de las membranas para limpiar los poros y eliminar las partículas pobremente adheridas a la superficie.
- Otro método físico empleado en los BRMS es la inyección de un gas justo en la parte baja del módulo filtrante (aire en el caso de reactores aerobios o biogás en el caso de reactores anaerobios) para que las burbujas ejerzan una fuerza de corte sobre la biopelícula en la membrana (Lin *et al.*, 2011b).

Para el caso del taponamiento irreversible o no removible, el cual se observa principalmente cuando ocurre un taponamiento por partículas de menor tamaño que el poro (intra-poro), se suelen utilizar métodos de limpieza químicos mediante el lavado de la membrana con diversos agentes. Junto con el ciclo de filtración normal, una limpieza química regular es esencial para mantener el funcionamiento de la membrana, y ésta puede hacerse por ejemplo, con soluciones no muy concentradas de hipoclorito de sodio (Calderón *et al.*, 2011). Habitualmente las membranas se sumergen en soluciones alcalinas u oxidantes como hipoclorito de sodio para la eliminación de los contaminantes orgánicos y soluciones ácidas para la eliminación de los contaminantes inorgánicos. Con este método se restituye casi completamente el flujo de permeado, pero un uso demasiado frecuente puede perjudicar a la membrana reduciendo su vida útil, además de que puede causar la contaminación del efluente con los reactivos químicos (Chee Meng, 2007).

Contrario a lo que puede pensarse, estas medidas de control del taponamiento son limitadas, y la importancia de encontrar métodos más efectivos se centra en que estas estrategias son temporales y llegan a reducir la integridad de la membrana hasta el punto en que el reemplazo de la membrana se vuelve necesario.

1.4.1 Mecanismos de taponamiento en BRM

Como ya se mencionó anteriormente, el taponamiento se refleja en el decremento del flux y el aumento de la presión transmembrana. Existen principalmente cuatro mecanismos de taponamiento en las membranas y son los que se muestran en la figura 1.4 (Le-Clech *et al.*, 2006; Herrera-Robledo, 2011):

1. Bloqueo completo: en el cual ocurre el taponamiento de los poros por las partículas, pero sin que ocurra una superposición de las mismas.
2. Bloqueo estándar: aquí el taponamiento lo causan las partículas más pequeñas que el tamaño de poro (taponamiento interno).
3. Bloqueo intermedio: involucra el taponamiento de los poros, a la vez que sobre la superficie de la membrana ocurre la superposición de otras partículas.
4. Formación de torta: es cuando se dice que se forma una capa taponante, formada por partículas de mayor tamaño que el poro, y se acumulan en la superficie de la membrana.

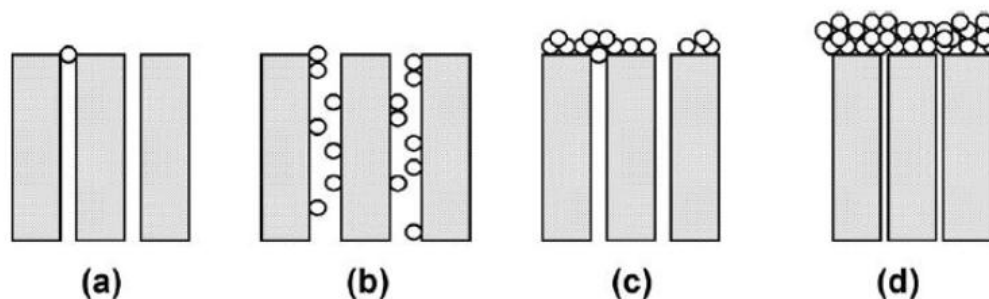


Figura 1.4. Representación gráfica de los cuatro mecanismos de taponamiento.
(a) Bloqueo de poro. (b) Bloqueo estándar. (c) Bloqueo intermedio. (d) Formación de torta.
(Tomado de Le-Clech *et al.*, 2006)

Tomando en cuenta las variables que afectan el grado y tipo de taponamiento de la membrana, se han desarrollado modelos que explican los mecanismos de taponamiento, y los dividen principalmente en tres etapas como se muestra en la Figura 1.5.

Durante la etapa 1 o taponamiento inicial, se dice que muchas de las sustancias presentes en el efluente (SPE, productos microbianos solubles-PMS, agregados microbianos, entre otras) interactúan fuertemente con la membrana. Se dice entonces, que ocurre una "adsorción pasiva", y esto ha sido reportado incluso cuando el flux de la operación es nulo (Zhang *et al.*, 2006a). Esta adsorción pasiva la describen los autores como la interacción entre las sustancias del efluente y la membrana, capaz de producir cambios en la superficie de la membrana (pasar de superficies hidrofóbicas a hidrofílicas) y provocar un descenso en la permeabilidad de la misma. Este último efecto depende del tamaño de poro de la membrana y las características del material, sobre todo de la hidrofobicidad (Ognier *et al.*, 2002) y es conocido como "concentración-polarización". En la segunda etapa, es más fácil para la biomasa fijarse a la membrana debido a los elementos ya presentes en ella, y de esta forma los microorganismos activos comienzan la etapa de colonización o formación de una biopelícula, pero sin que ésta afecte directamente la permeabilidad (no se observan cambios drásticos en el flux o PTM). De esta forma comenzarán a formarse zonas desiguales en cuanto al grado de taponamiento donde la biopelícula ha comenzado a desarrollarse, y conforme la filtración avance, el flux tenderá a disminuir. Por lo general, en los BRM se espera mantener un flux constante, si esto es así, el hecho de tratar de mantener el flux constante con un taponamiento más severo provocará que el flux de operación llegue a los niveles de flux crítico y la PTM sufra un drástico incremento, que es cuando llega a la etapa tres.

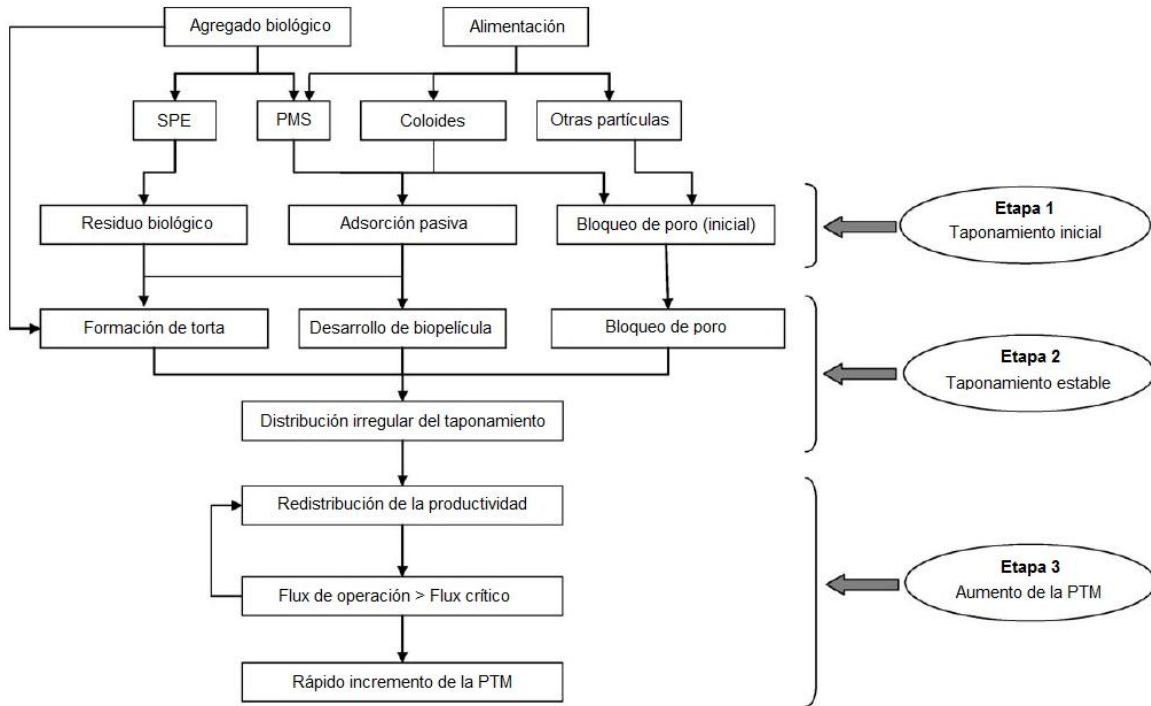


Figura 1.5. Mecanismos de taponamiento para BRM operados a flux constante.
(Tomado de Le-Clech *et al.*, 2006)

Para el caso particular de los BRMS, se ha identificado que el principal mecanismo de taponamiento es la formación de una capa taponante o biopelícula (Bae y Tak, 2005; Cho *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Grelier *et al.*, 2006). Es por esto que recientemente las investigaciones se han centrado también en la caracterización de las comunidades microbianas, especialmente aquellas relacionadas en la formación de la biopelícula sobre la superficie de la membrana y que están inevitablemente ligadas con las características del efluente y la biomasa involucrada en su degradación. Estas comunidades microbianas han sido estudiadas bajo diferentes condiciones de operación (Jinhua *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006b; Huang *et al.*, 2008; Duan *et al.*, 2009; Calderón *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011), sin embargo en reactores anaerobios de membrana sumergida, los estudios aun siguen siendo limitados.

1.4.2 Factores en el taponamiento de BRMS

Existen diferentes investigaciones enfocadas en encontrar que es lo que ocasiona mayoritariamente el taponamiento en un BRM. El taponamiento en los BRMS es atribuido a diferentes factores, y aunque los mecanismos no son del todo claros se dice que en el efluente del biorreactor existen partículas que se incrustan en la membrana y van taponando los poros, así como también formando una biopelícula en la superficie de la misma, y que conforme avanza el proceso, esto se va convirtiendo en algo mucho más complicado de remover (ver Figura 1.4). Bae y Tak (2005) encontraron que los sólidos suspendidos en forma de agregados microbianos presentes en el efluente son los que ocasionaron la mayor contribución al proceso de taponamiento de la membrana, pero que sin embargo la contribución de todos los elementos taponantes varió al cambiar las características hidrodinámicas del proceso (diferentes tiempos de retención hidráulico

en su caso). Por otro lado existen investigaciones que aseguran que el mayor taponamiento es debido a la parte soluble y los coloides en el efluente (Wisniewski y Grasmick, 1998; Bouhabila *et al.*, 2001; Chang y Kim, 2005). Le-Clech *et al.* (2006) indican que la mayoría de las investigaciones consideran como principales responsables del taponamiento a las sustancias poliméricas extracelulares (SPM), sin embargo, debe tomarse en cuenta que para cada biorreactor existen condiciones diferentes, y que también la biomasa tiene sus características particulares. Por lo tanto, las investigaciones apuntan a que se puede considerar que existen cuatro factores (Figura 1.6) que afectan fuertemente el desarrollo de esta capa taponante y son (Chang *et al.*, 2002; Le-Clech *et al.*, 2006):

- ✓ Las características del efluente,
- ✓ las características de la biomasa,
- ✓ las condiciones de operación y
- ✓ las características del módulo de membranas

Dentro de las características de la biomasa, son de especial interés las sustancias poliméricas extracelulares (SPE). Se dice que éstas sustancias pueden provenir de diferentes fuentes, pero todas a través de la actividad de los microorganismos presentes en el biorreactor (Wu *et al.*, 2011). El estudio realizado en este trabajo se enfoca a elucidar la biomasa presente en el reactor, principalmente aquella asociada al taponamiento de una membrana sumergida en un reactor anaerobio, y como se discutirá más adelante, el conocimiento de microorganismos capaces de producir SPE es importante para esclarecer el metabolismo y posible comportamiento de la biopelícula generada a través del tratamiento de aguas residuales.

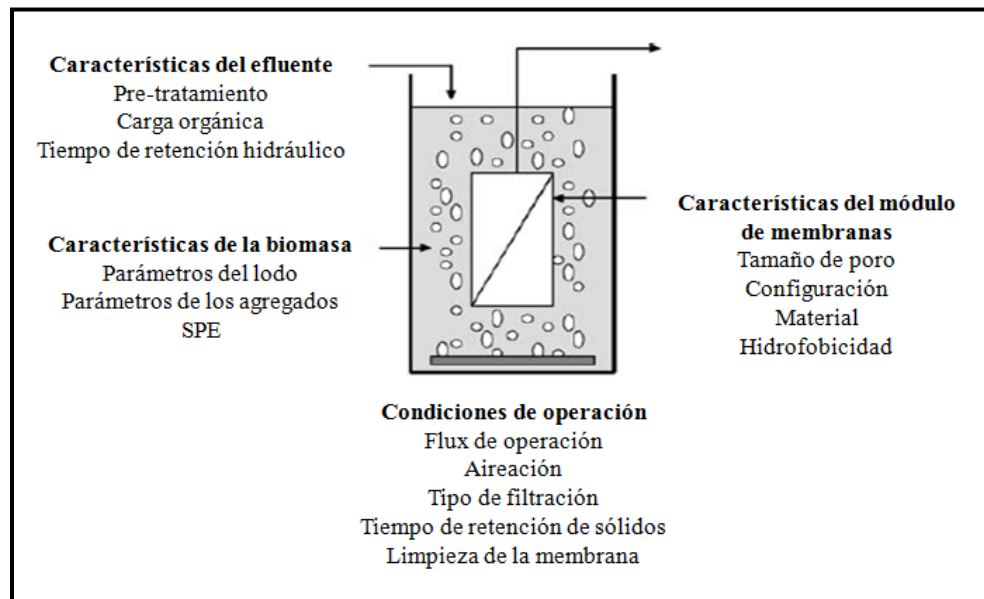


Figura 1.6. Factores que afectan el taponamiento en un BRMS.
 (Tomado de Le-Clech *et al.*, 2006).

1.5 Biopelículas en BRM

El biotaponamiento, por lo general, provoca un taponamiento de tipo irreversible (Ng *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2007a; Xia *et al.*, 2008; Kornboonraksa *et al.*, 2009) razón por la cual es importante conocer su naturaleza y con esto establecer medidas de control eficientes. Las biopelículas son organizaciones microbianas compuestas por microorganismos que se adhieren a las superficies gracias a la secreción de sustancias poliméricas extracelulares. Estas conformaciones microbianas presentan características como heterogeneidad, diversidad de microambientes, resistencia a antimicrobianos y capacidad de comunicación intercelular que las convierten en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen.

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 versatilidad (Fernández *et al.*, 2007; Ho y Sung, 2010; Wu *et al.*, 2011). Es bien sabido que la formación de una biopelícula en la superficie de la membrana es una de las principales causas del taponamiento (Chung-Hak *et al.*, 2006; Hu y Stuckey, 2006; Jeison y van Lier, 2006; Lin *et al.*, 2010). La estructura de la biopelícula llega a ser muy variable debido a las diferencias en las condiciones de operación, la microbiota ya presente en el reactor y la que proviene del influente, entre otros factores (Ng y Ng, 2010).

Existen diferentes modelos que tratan de explicar como ocurre la formación de una biopelícula; a continuación se describe el más empleado (Figura 1.7). Este inicia al momento en que una bacteria se une a una superficie (en este caso la membrana) e inmediatamente varios microorganismos se adhieren también, los cuales comienzan a replicarse activamente y sus componentes extracelulares generados por la unión, interaccionan con moléculas orgánicas e inorgánicas del medio que los rodea, formando así una matriz compleja de muy diversos componentes (Yeon *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006b; Falk *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2009; Molina-Muñoz *et al.*, 2009). El crecimiento de la biopelícula está influenciado por los nutrientes disponibles en el ambiente y la dispersión de estos por la población bacteriana.

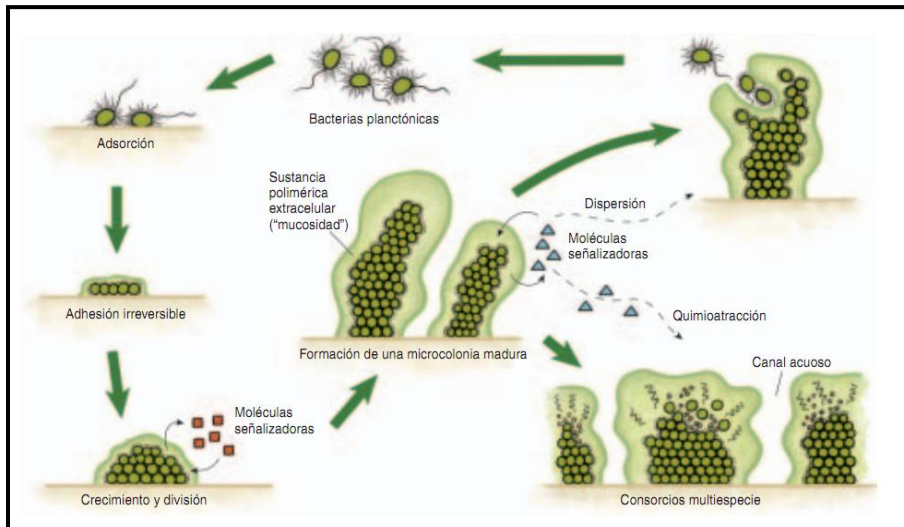


Figura 1.7. Modelo de formación de una biopelícula. (Tomado de Harrison *et al.*, 2006).

Lin *et al.* (2011) proponen que el proceso de taponamiento comienza probablemente con la adhesión de pequeños agregados microbianos que van a colonizar la superficie de la membrana y favorecer la formación de la capa taponante, lo cual ocurre durante las primeras horas de filtración.

Éstos resultados coinciden con los encontrados por Li *et al.*, (2012) en un reactor híbrido anóxico-aerobio, quienes señalan que el desprendimiento de pequeños flóculos del lodo biológico en el efluente y su incorporación en la membrana, ocasionaron un cambio en la biopelícula debido al estrés de la biomasa, elevando las cantidades de SPE producidas por la comunidad microbiana, y ocasionando un taponamiento severo que se vio reflejado en un drástico incremento de la PTM durante las primeras horas de filtración. Por otro lado, los resultados de Herrera-Robledo *et al.* (2011) en un reactor anaerobio, apuntan a que aquellas SPE con un menor tamaño que el del poro en la membrana, tienen un efecto significativo sobre el taponamiento pues son capaces de ser absorbidas por la capa taponante, o bien, de bloquear internamente los poros de la membrana.

Las SPE constituyen una mezcla heterogénea de polímeros que median la biomineralización y la adherencia bacteriana, y estabilizan a la biopelícula (Herrera, 2011). Dentro de las SPE se incluyen a las macromoléculas tales como carbohidratos y proteínas (en mayor composición), ácidos nucleicos y ácidos húmicos (Laspidou y Rittman, 2002; Pan *et al.*, 2010). Entre estas diferentes macromoléculas, hay controversia del papel de cada uno y su efecto en el taponamiento. Cerón-Vivas *et al.* (2012) encontraron que en el caso de un reactor anaerobio alimentado con agua residual municipal sintética, la fracción de carbohidratos en las SPE tuvo el mayor efecto sobre el taponamiento de la membrana, que la fracción proteica y los compuestos aromáticos. La importancia de las SPE en la formación de la biopelícula radica en que estas macromoléculas que pueden provenir de distintas fuentes, ayudarán a formar una resistente matriz en la cual estarán embebidas tanto células como sustancias orgánicas e inorgánicas (Flemming *et al.*, 2007). Estos polímeros se adhieren a la membrana del biorreactor y provocan el fortalecimiento de las comunidades microbianas en el soporte, además de que pueden adherirse a los poros y ocasionar la disminución del tamaño de los mismos (Gao *et al.*, 2009).

Las SPE pueden ser secretadas por las células adheridas a un material (soporte) como un mecanismo de defensa para fomentar la supervivencia de las comunidades, o bien, pueden provenir del medio (nutrientes o lisis celular). Debido a las distintas fuentes de donde pueden provenir esas moléculas, es necesario evaluar no sólo la composición de la biopelícula sino también el efluente del reactor y lodo biológico presente en el reactor (Kimura *et al.*, 2009). No todas las especies de microorganismos son capaces de producir SPE, por lo que el estudio de la composición de la microbiota presente en el medio resulta de gran importancia para determinar las interacciones entre especies que favorecerán la secreción de estas sustancias (Andersson *et al.*, 2009).

La producción de SPE es influida por la calidad nutricional del medioambiente. Se ha observado que un incremento en la concentración de nutrientes está correlacionado con un aumento en el número de células bacterianas adheridas. Además, una disponibilidad excesiva de carbono y/o limitación de nitrógeno, potasio o fosfatos promueve la síntesis de SPE (Sutherland, 2001; Thomas y Nakaishi, 2006).

Las investigaciones actuales se basan en el efecto de las SPE sobre el funcionamiento de los biorreactores de membrana, y cómo las condiciones de operación pueden influir tanto cuantitativa como cualitativamente en las SPE presentes en el lodo, en el efluente del reactor y en la biopelícula de la membrana (Huang *et al.*, 2000; Rosenberger *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006b; Malamis y Andreadakis, 2009). Varios investigadores han reportado que las SPE tienen un efecto significativo en el taponamiento de la membrana (Drews *et al.*, 2008; Andersson *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). El mayor taponamiento ocurre a bajos tiempos de retención de sólidos aunado al incremento en los niveles de SPE en el efluente (Rosenberger *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2007; Kimura *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2009). En ese sentido, los estudios de Salazar-Peláez *et al.* (2011) confirman lo anterior, puesto que encontraron que al disminuir el TRH en un biorreactor (12, 8 y 4 horas) aumenta el contenido de SPE en el efluente. Sin embargo, algunos investigadores encontraron que

no existe una relación clara entre el nivel de SPE y el taponamiento de la membrana (Dvořák *et al.*, 2011). Otros más, han encontrado que el impacto de los SPE sobre el taponamiento sólo ocurre a niveles específicos de los mismos (Lee *et al.*, 2003; Yamato *et al.*, 2006; Drews *et al.*, 2008).

El hecho de que exista una mayor o menor concentración de estas fracciones del efluente es atribuido principalmente a las propiedades de la membrana, las condiciones hidrodinámicas del biorreactor y las características fisiológicas de la biomasa presente, la cual está determinada a su vez también, por las condiciones de operación del reactor (Bouhabila *et al.*, 2001; Bae y Tak, 2005; Meng *et al.*, 2009). Por ejemplo, se ha reportado que los cambios en la composición del agua residual, como una mayor cantidad de materia orgánica degradable (altas cargas orgánicas) pueden provocar que los microorganismos presentes en el biorreactor produzcan una mayor cantidad de SPE (Judd, 2006; Kolter y Greenberg, 2006; Andersson *et al.*, 2009). Uno de los principales parámetros de operación que puede afectar la producción y la composición es el tiempo de retención de sólidos. Brookes *et al.* (2006) observaron que la cantidad total de SPE disminuyó al aumentar el TRS. Mientras que Lee *et al.* (2003) observaron un aumento en la concentración de proteínas en las SPE cuando el TRS se incrementó.

Sin embargo, hasta este momento la mayoría de los estudios relacionados se han enfocado principalmente en el desempeño de los BRMS y el taponamiento de la membrana (aumento en la presión transmembrana, reducción del caudal de permeado) sin considerar la comunidad bacteriana involucrada y su metabolismo (secreción de SPE). El estudio de las características de la biomasa presente en la biopelícula de la capa taponante de un biorreactor de membrana ha sido un tema que comienza a ser discutido en virtud de su importancia en la probable influencia en formar una matriz biológica, difícil de controlar, y que finalmente conlleva al taponamiento de las membranas (Drews *et al.*, 2008; Stewart y Franklin, 2008). Aunque algunos investigadores han estudiado las comunidades bacterianas en los BRM, la información acerca de la estructura, diversidad y estabilidad en las comunidades de estos sistemas para el tratamiento de aguas residuales domésticas es en gran medida, limitada.

1.6 Estudio de la diversidad microbiana

La filogenia es el análisis de las secuencias de genes y proteínas para determinar la relación evolutiva (parentesco) entre los organismos vivos. En 1977, Carl Woese y George Fox dieron un giro a la información que se tenía acerca de la clasificación de los organismos, ampliando el conocimiento de la filogenia microbiana y proponiendo clasificar a los seres vivos en tres dominios: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*. Finalmente la comunidad científica estuvo de acuerdo, y esto fue posible en primer lugar, gracias a la aceptación de la evidencia de que algunas macromoléculas en los organismos se encuentran altamente conservadas, es decir, que presentan muy pocas variaciones en el proceso evolutivo, y sus secuencias fueron la clave para establecer las relaciones entre ellos. Un segundo motivo fue el desarrollo de las técnicas de secuenciación que permitieron que fuera más sencillo llevar a cabo los análisis del ARN ribosomal y otras macromoléculas (Staley *et al.*, 2007). Muchas razones justifican el uso del ARN ribosomal como marcador evolutivo (Staley *et al.*, 2007):

1. Los ribosomas están presentes en todas las células de todos los organismos vivos.
2. La función del ribosoma como el organelo responsable de la síntesis de proteínas es vital para cualquier clase de vida.
3. Los ribosomas tienen secuencias altamente conservadas en el tiempo durante la evolución, y esto se debe a que tienen una estructura compleja y llevan a cabo una función específica.

Los ribosomas procariontes contienen tres tipos de ARN ribosomal: 5S, 16S y 23S (la S se refiere a la unidad *Svedberg* que relaciona la masa y la densidad de una molécula). Para el estudio de la filogenia en procariontes, el más comúnmente utilizado es el ARN de la subunidad pequeña del ribosoma: 16S, sobre todo por su longitud aproximada de 1500 bases, en comparación con las 120 bases aproximadamente de la subunidad 5S que no es capaz de brindar la suficiente información, y la subunidad mayor 23S (>3000 bases) que resulta en una labor más complicada y costosa por el mayor número de bases para secuenciar.

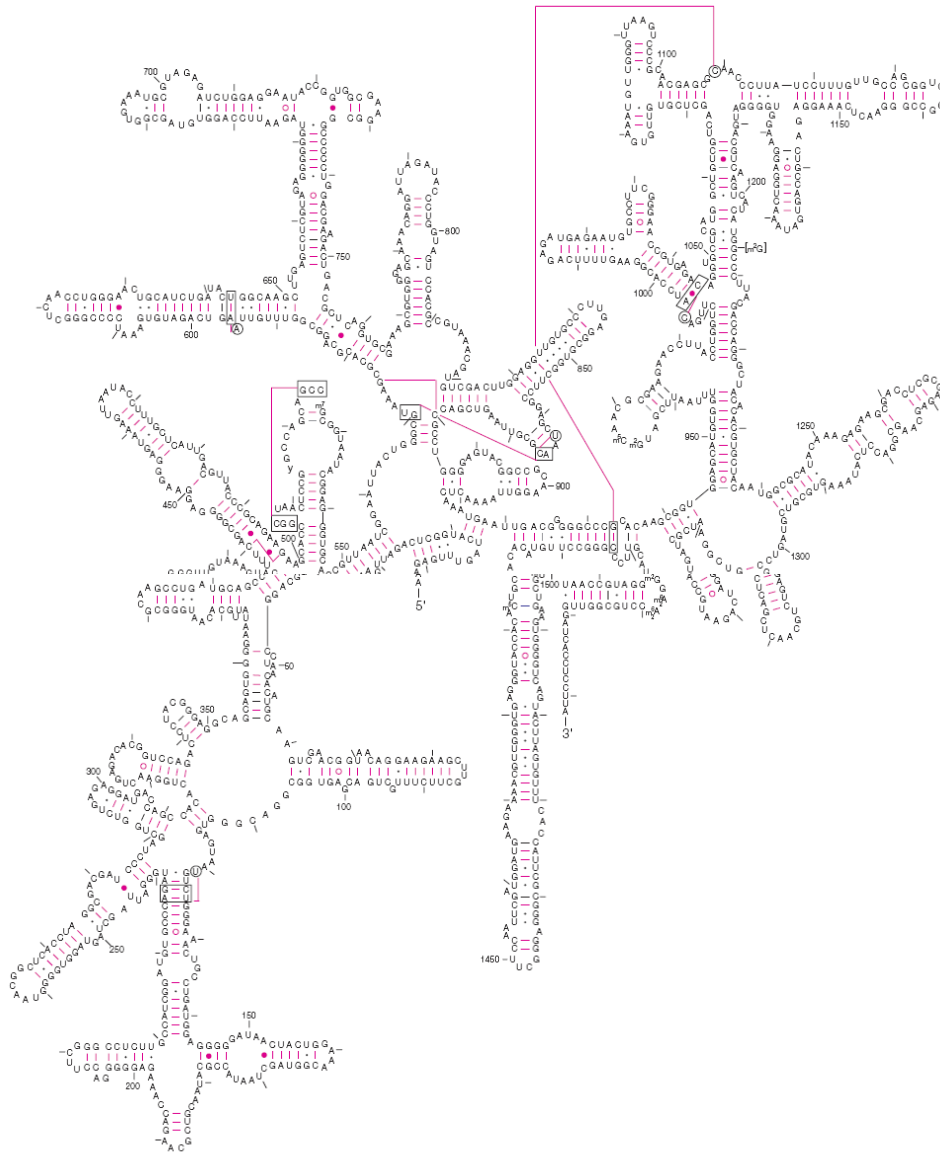


Figura 1.8. Estructura secundaria de la molécula de ARN ribosomal 16S de *Escherichia coli*. Las bases están numeradas de la 1 en el extremo 5' a la 1542 en el extremo 3'.
(Tomado de <http://www.rna.icmb.utexas.edu/>)

A pesar de estar altamente conservado en su estructura y secuencia, el gen 16S presenta regiones variables que permiten hacer distinciones entre los organismos, tal como lo muestra la figura 1.9. Estas regiones variables son muy importantes al momento de elegir y diseñar los cebadores o sondas específicos para llevar a cabo la identificación de microorganismos como se explicará más adelante.

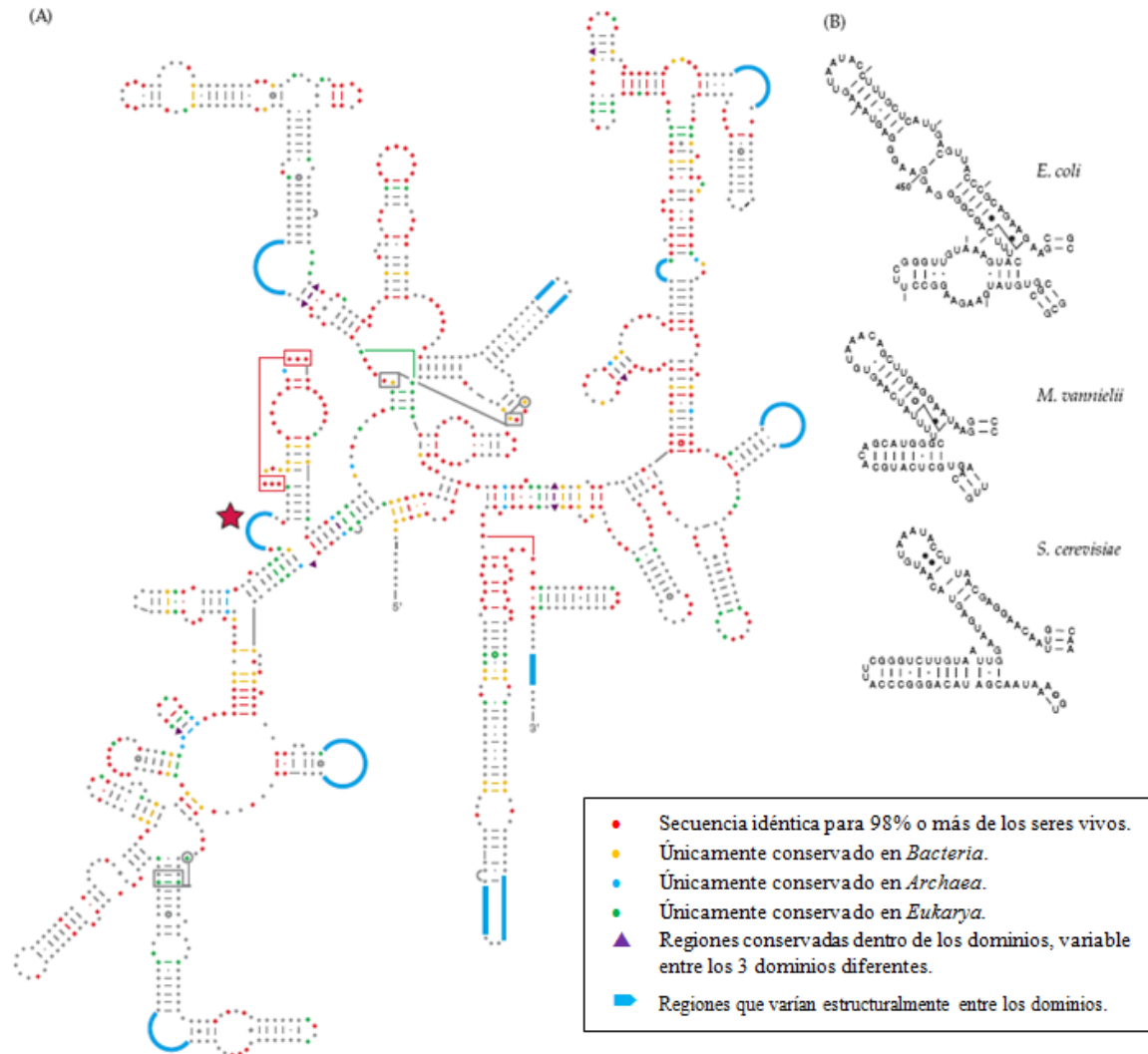


Figura 1.9. a) Regiones conservadas y regiones variables en la subunidad pequeña del ribosoma (16S para procariontes, 18S para eucariontes). b) Diferencias en la región marcada con la estrella; para 3 microorganismos diferentes; *E. coli* (*Bacteria*), *M. vanielli* (*Archaea*) y *S. cerevisiae* (*Eukarya*). (Tomado de <http://www.rna.icmb.utexas.edu/>)

Ahora bien, para el presente trabajo es importante mencionar que el estudio realizado se enfocó al análisis de 2 dominios: *Bacteria* y *Archaea*, razón por la cual se describen brevemente a continuación.

1.6.1 Bacteria

El dominio *Bacteria* comprende una gran variedad de microorganismos, que incluyen organismos fotosintéticos, quimioautotróficos, heterotróficos, etc. Actualmente se han identificado más de 100 grupos filogenéticos importantes en *Bacteria*, aunque únicamente se han logrado cultivar los representantes de 24 de ellos.

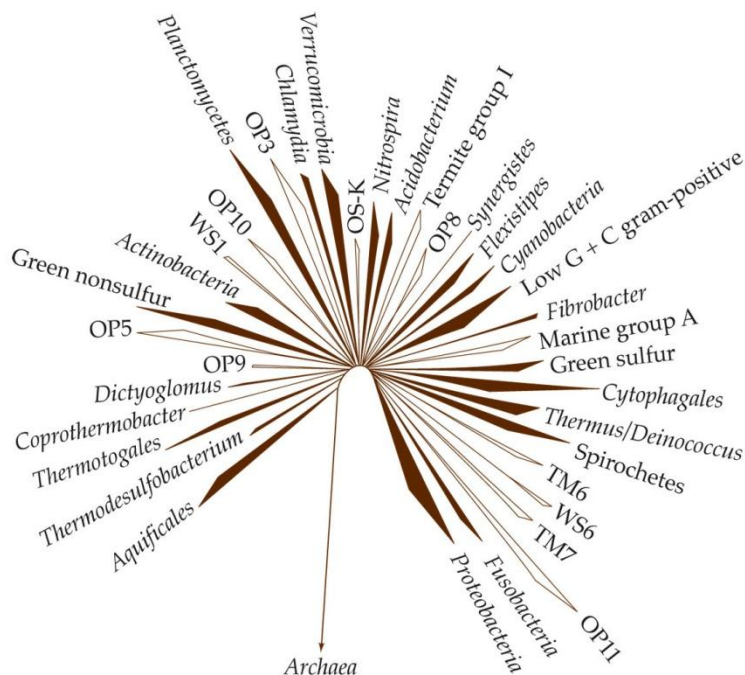


Figura 1.10. Árbol filogenético de *Bacteria* basado en las secuencias de ADN ribosomal 16S para cepas puras y librerías de clonas obtenido a partir de muestras naturales. (Tomado de Staley *et al.*, 2007).

Entre ellos podemos destacar las características de algunos grupos importantes, como son:

1. **Proteobacteria.** Este grupo incluye a un gran número de bacterias heterotróficas gram-negativas como *Pseudomonas* y bacterias entéricas como *E. coli*. También incluye microorganismos quimioautotróficos como las bacterias nitrificantes y las sulfato reductoras (como *Desulfovibrio*). Además son miembros importantes, algunos géneros de bacterias que son organismos simbióticos tales como *Agrobacterium*, *Rickettsia* y *Rhizobium*.
2. **Firmicutes.** Las bacterias de este grupo son Gram-positivas. Se caracterizan por ser organismos unicelulares con bajos contenidos de % de G + C. El grupo *Bacillus* son bacterias aerobias o facultativas, mientras que las especies de *Clostridium* son organismos fermentadores anaerobios. Algunos representantes también son sulfato reductores.
3. **Bacteroidetes.** Este es un *phylum* muy diverso de microorganismos aerobios y anaerobios. Incluyen algunas especies de bajo contenido de % de G + C en su ADN.

1.6.2 Archaea

Las arqueas son microorganismos considerados como extremófilos (termófilos, halófilos, etc.). Se consideran de gran importancia en varias áreas del conocimiento puesto que los científicos han tratado de explicar cómo las macromoléculas de estos microorganismos mantienen su estructura y actividad bajo condiciones de desnaturalización para la mayoría de los seres vivos. Un ejemplo de la aplicación de estos conocimientos es el uso y comercialización de enzimas termoestables muy útiles en los procesos que requieren altas temperaturas. Además, el estudio de *Archaea* ha llegado a representar una importante fuente de datos en la diversidad evolutiva.

Actualmente este dominio está dividido en cinco grupos filogenéticos como se muestra en la figura 1.11 (Brochier-Armanet *et al.*, 2011; Guy y Ettema, 2011; Gribaldo y Brochier-Armanet, 2012). A continuación se presentan algunas de sus características.

1. ***Crenarchaeota* (1990)**. Este *phylum* contiene a la mayoría de los organismos termófilos conocidos (incluso crecen a temperaturas > 100 °C). Por otro lado, también se incluyen aquí los que se han encontrado en ambientes extremos como el fondo marino, o incluso en los océanos polares (organismos psicrófilos). Varios de ellos basan su metabolismo en el azufre como fuente de energía o aceptor en su cadena de electrones para producir sulfuro de hidrógeno. Algunos otros son reductores de hierro o manganeso.
2. ***Euryarchaeota* (1990)**. Aquí se incluyen los metanógenos, algunos de ellos utilizan el dióxido de carbono e hidrógeno, mientras que otros producen metano a partir de metanol o ácido acético. Estas arqueas se consideran organismos anaerobios. Algunos de sus representantes son organismos hipertermófilos. Además, los que son capaces de crecer en ambientes salinos sobresaturados (halófilos), se consideran un importante subgrupo fenotípico.
3. ***Korarchaeota* (1996)**. Los organismos pertenecientes a este *phylum* han sido encontrados en fuentes termales, sin embargo hasta el momento no se ha logrado el cultivo en condiciones de laboratorio, por lo que se sabe poco de sus propiedades fenotípicas.
4. ***Thaumarchaeota* (2008)**. Recientemente descrito, aún no se conocen muchos representantes de este *phylum*, sin embargo, presentan características muy distintivas que los diferencian de los otros *phylums*. Los genomas secuenciados son de microorganismos que tienen funciones como oxidadores del amonio, y juegan un papel muy importante en el ciclo del nitrógeno.
5. ***Aigarchaeota* (2011)**. Este *phylum* presenta características similares a *Thaumarchaeota*, y requiere de más secuencias que permitan esclarecer las diferencias con los otros grupos filogenéticos de *Archaea*.

La secuenciación de genomas completos de organismos pertenecientes al dominio *Archaea*, permitió descubrir genes que nunca antes se habían encontrado en otro ser vivo (Staley *et al.*, 2007). A su vez, ha creado cierta incertidumbre respecto a la información que se tenía, como es el caso del grupo *Nanoarchaeota*. Hasta hace pocos años este era considerado un *phylum* para el dominio *Archaea*. Sin embargo, investigaciones recientes en análisis de varios genes (y no solamente el 16S ARNr) han apuntado a que se trata de un linaje de *Euryarchaeota* y la forma correcta de nombrar a este grupo sería como una clase o un orden (Brochier-Armanet *et al.*, 2011).

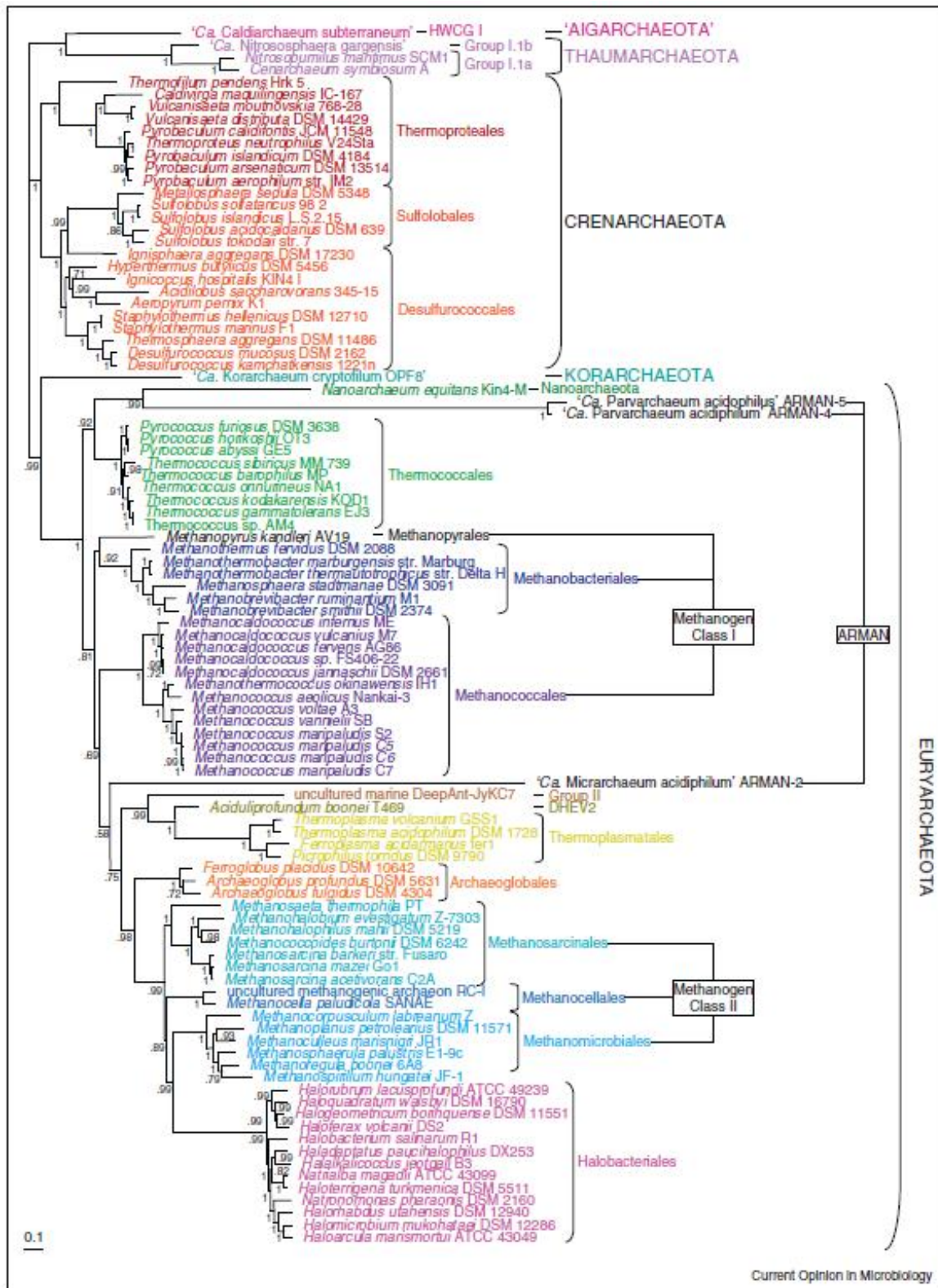


Figura 1.11. Árbol filogenético de los grupos de *Archaea* basados en secuencias de proteínas ribosomales. Los autores sugieren estudios posteriores para la confirmación de la posición filogenética de todos los grupos en el árbol (Tomado de Brochier-Armanet *et al.*, 2011).

1.6.3 Cálculo de diversidad microbiana

La metodología "clásica" para calcular la biodiversidad de los microorganismos del suelo o de ambientes similares consiste en tomar una muestra y sembrarla en medios sólidos y líquidos selectivos y/o de enriquecimiento, luego microscópicamente se separan las colonias de acuerdo a la morfología, se aplican pruebas morfo-fisiológicas (pruebas bioquímicas) y finalmente se realizan los cálculos matemáticos adecuados al estudio (Jenkins *et al.*, 1993; Bitton, 2005).

La incorporación de novedosas técnicas moleculares que no requieren del cultivo previo de los microorganismos permite el estudio de la diversidad, estructura y dinámica de comunidades microbianas (Muyzer y Smalla, 1998; Sanz y Köchling, 2007). El uso de herramientas de biología molecular para estudiar la diversidad y la dinámica de las comunidades microbianas se ha incrementado notablemente. La rápida acumulación de los datos necesarios para la interpretación de los resultados obtenidos a partir de las técnicas moleculares, se ha convertido en una herramienta de alto valor práctico (Prosser *et al.*, 2007; Talbot *et al.*, 2008).

En el caso particular del suelo, algunos autores estiman que sólo el 1% de los microorganismos del suelo crecen en medios de cultivo en el laboratorio (Øvreås y Torsvik, 1998; Marzorati *et al.*, 2008). Por lo tanto, si se pretende valorar la diversidad total de microorganismos que existen en un ecosistema dado, no se pueden obtener conclusiones válidas contando con sólo el 1% de la población. Tratando de ampliar la muestra analizada se plantea otra alternativa: la muestra en cuestión no se siembra en medios de cultivo sino que se aplican directamente métodos moleculares. Estas técnicas se basan en el análisis de marcadores moleculares, como por ejemplo, los genes que codifican para el ARN ribosómico, y en especial del gen que codifica para la subunidad menor del ribosoma bacteriano, 16S ARNr (Baker *et al.*, 2003). Este tipo de marcadores se extraen directamente de las muestras y permiten diferenciar distintos grupos de microorganismos. El paso clave para llevar a cabo estos análisis es entonces, la extracción del material genético (ADN o ARN) a partir de las células presentes en la muestra cruda (Talbot *et al.*, 2008). Debido a la amplia variedad de organismos diferentes que podemos encontrar en las muestras ambientales, se cree que los métodos utilizados para la recuperación del material genético deben evitar, o por lo menos minimizar, el sesgo provocado por una deficiente lisis celular (Frostegard *et al.*, 1999). Existen varias formas de lograr esta lisis, como son, la acción de una digestión enzimática, o bien una lisis mecánica por medio de la agitación de la muestra con perlas.

Para medir la cantidad de ADN extraído, es posible hacerlo de dos formas. La primera es resuspendiendo los ácidos nucleicos en agua estéril o solución tampón TE 1X (solución de tampón de Tris-EDTA), y colocándolos en una cubeta. Las lecturas se hacen en un espectrofotómetro a 260 nm (OD_{260}), y el blanco que se usa es la sustancia que se eligió como disolvente. Por otro lado, también pueden correrse las muestras de ADN extraído en un gel de agarosa, junto con una muestra de marcadores de peso molecular, en una solución que contenga un agente revelador, para que después puedan observarse con luz ultravioleta (UV) y comparar las muestras con marcador de peso molecular (Sambrook y Russell, 2000).

La relación de los valores obtenidos en la medición espectrofotométrica del ADN a 230 y 280 es indicativa de la pureza de los ácidos nucleicos. Esto se logra calculando las relaciones OD_{260}/OD_{230} y OD_{260}/OD_{280} . En el caso de las muestras ambientales, la co-extracción de ácidos húmicos puede ser el mayor problema para un ADN puro. Estos compuestos absorben a una longitud de onda de 230 nm (al igual que otros compuestos como carbohidratos y compuestos aromáticos), mientras que el ADN lo hace a 260 nm y las proteínas a 280 nm. Es por eso que para conocer la pureza del ADN extraído fue necesario medir la relación de las absorbancias, $OD_{260}/280$ y $OD_{260}/230$. Este valor debe estar cercano a 1.8-2.0 para el caso de la relación 260/280 y entre 2.0-2.2 para la relación 260/230,

para que la pureza del ácido nucleico sea aceptable, de otra forma se corre el riesgo de obtener bajos rendimientos en reacciones subsecuentes, como amplificación por PCR, clonación, entre otras (Sambrook y Russell, 2000).

Inceôglu *et al.* (2010) evaluaron cuatro métodos de extracción de ADN en tres tipos de suelos diferentes (dos arenosos y uno arcilloso). Los métodos que utilizaron fueron, dos métodos propuestos, el método CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) y el propuesto por Smalla *et al.* (1993), y 2 kits: Ultraclean y Powersoil de MoBio. Ellos encontraron que para cada tipo de suelo existe una eficiencia de extracción diferente, sin embargo, en todos los casos el kit comercial Power Soil resultó ser el mejor, demostrando un mayor rendimiento final de ADN y la más alta relación OD_{260}/OD_{280} .

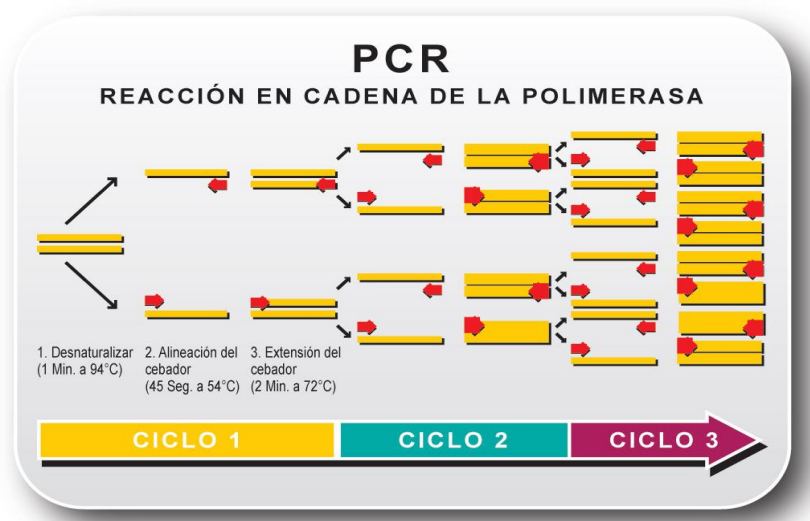
La biología molecular ha permitido reconocer la presencia de una gran diversidad microbiana que hasta la década de 1980 resultaba totalmente desconocida. La invención más destacada fue el desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Kary Mullis. Esta técnica se basa en la obtención de un gran número de fragmentos iguales de ADN a partir de un ADN molde utilizando una enzima, la ADN polimerasa. Para que esta reacción se lleve a cabo, se necesitan condiciones favorables de temperatura (ciclos repetitivos de altas temperaturas que permitan desnaturalizar la doble cadena de ADN, y luego temperaturas óptimas para que la enzima pueda llevar a cabo la replicación de la cadena de ADN), así como también la participación de varios elementos (Sambrook y Russell, 2000).

Los reactivos a utilizarse en la reacción de PCR son (Walker y Rapley, 2008):

- ✓ La cadena de ADN o molde a partir de la cual se harán las copias,
- ✓ Una enzima ADN polimerasa, termoestable (la más usada es la Taq polimerasa),
- ✓ Iones divalentes (el más usado es Mg^{+2} en su forma de $MgCl_2$) que actúan como cofactores de la enzima,
- ✓ Solución tampón (buffer) para mantener condiciones adecuadas de pH para la actividad de la enzima,
- ✓ Los 4 diferentes desoxirribonucleótidos-trifosfatados (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), a partir de los cuales se polimerizarán las copias de ADN,
- ✓ Un par oligonucleótidos complementarios a la cadena de ADN molde, éstos sirven para definir el fragmento de la cadena de ADN que se replicará.

El resultado de la reacción de PCR (figura 1.12) son fragmentos de ADN de tamaño definido por el par de oligonucleótidos, a partir de la cadena de ADN molde y se denominan "amplicones" (Walker y Rapley, 2008).

El uso combinado de diferentes técnicas moleculares por ejemplo: métodos de huella molecular (*fingerprinting*) y FISH (*fluorescence in situ hybridization*), entre otras, se ha impuesto rápidamente debido a la relativa facilidad metodológica que implican estos análisis y a la gran cantidad de información que proporciona respecto a la diversidad y la composición de las comunidades microbianas, la estimación de la abundancia de microorganismos específicos, así como también respecto de sus interacciones y su funcionalidad en el ambiente natural (Marzorati *et al.*, 2008). De esta forma se tiene un valor más real de la diversidad de un ecosistema dado y es posible hacer comparaciones entre muestras que pueden pertenecer a diferentes ambientes.



Una reacción de PCR = 2^n , donde n = no. de ciclos

Figura 1.12. Reacción en cadena de la polimerasa. (Tomado de www.fitolab.com.mx)

Las técnicas de huella molecular se usan para evaluar los cambios en la composición de una comunidad microbiana y han sido recientemente incorporadas en el estudio de la ecología microbiana de diversos ambientes. Estas técnicas se basan en el uso de cebadores universales o específicos para *Bacteria* o *Archaea*, a través de la diferencia en los amplicones. De acuerdo a las propiedades intrínsecas de cada secuencia, es posible observar un patrón diferente que refleja la diversidad de la comunidad microbiana (Talbot *et al.*, 2008). En la tabla 1.1, se muestra la comparación de algunas de estas técnicas de *fingerprinting* y los métodos de clonación/secuenciación.

Todos estos métodos (tabla 1.1) han sido desarrollados para observar los cambios en la composición de la microbiota de diferentes ambientes, y aunque no existe un método "universal" para el campo de la digestión anaerobia, la técnica de PCR-DGGE ha sido ampliamente utilizada en biorreactores de membranas (Choi *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 2009; Ballesteros *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010b; Xia *et al.*, 2010; Wan *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011).

En el año de 1993, Muyzer *et al.* describieron el uso de la técnica de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa, combinada con una electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (PCR-DGGE por sus siglas en inglés). Esta técnica se describe (Figura 1.13) como la extracción del material genético (ADN/ARN) de toda la comunidad, seguida por una amplificación por PCR y una posterior evaluación mediante la DGGE, que resulta en la obtención de un número determinado de bandas que al ser analizadas brindan información útil acerca de la composición de esa comunidad.

Tabla 1.1. Comparación de diferentes métodos de huella molecular (*fingerprinting*) y clonación/secuenciación para el análisis de comunidades microbianas. (Tomado de Talbot *et al.*, 2008).

Método	Perfil basado en	Ventajas	Limitaciones	Instrumentación	Demanda de tiempo	Tamaño de la muestra
Dot blotting	Hibridación por sondas	No hay sesgo por PCR. Existe una amplia gama de sondas para utilizar.	Requiere gran cantidad de sondas específicas y una demanda de tiempo grande para encontrar las condiciones óptimas de temperatura.	Equipo para hibridación y analizador de imágenes	Alta	Pequeña
DGGE	Secuencias diferentes de fragmentos del mismo tamaño	Es posible obtener información por secuenciación a partir de las bandas escindidas en el gel.	Se obtienen secuencias parciales de ADNr. Sensibilidad limitada. Pueden existir variaciones de gel a gel.	Un sistema de gradiente (cámara de electroforesis especializada) y analizador de imágenes	Media	Media
SSCP	Diferencias conformacionales	Alta sensibilidad. No hay digestión por enzimas de restricción	Puede haber más de una conformación estable u ocurrir un reannealing	Secuenciador automático	Baja	Alta
ARISA	Diferencias en la región del espacio intergénico ribosomal (IRS)	Alta sensibilidad. No hay digestión por enzimas de restricción	Los fragmentos obtenidos son muy cortos. Pueden haber múltiples IRS en un genoma	Secuenciador automático	Baja	Alta
T-RFLP	Diferencias en los sitios de restricción	Alta sensibilidad. Es posible realizar simulaciones con las bases de datos registradas.	Puede haber múltiples fragmentos (algunos incompletos) ocasionados por los cortes de las enzimas de restricción.	Secuenciador automático	Media	Alta
Clonación y secuenciación	Diferentes secuencias	Identificación filogenética por medio de la secuenciación. Permite el diseño de nuevos oligos o sondas.	El paso de clonación demanda gran cantidad de tiempo. No es recomendable para el monitoreo de biorreactores.	Secuenciador automático	Alta	Baja

DGGE, electroforesis en gel de gradiente desnaturizante; SSCP, polimorfismo de conformación de cadena individual de ADN; ARISA, análisis automatizado del espacio intergénico ribosomal; T-RFLP, polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción terminal.

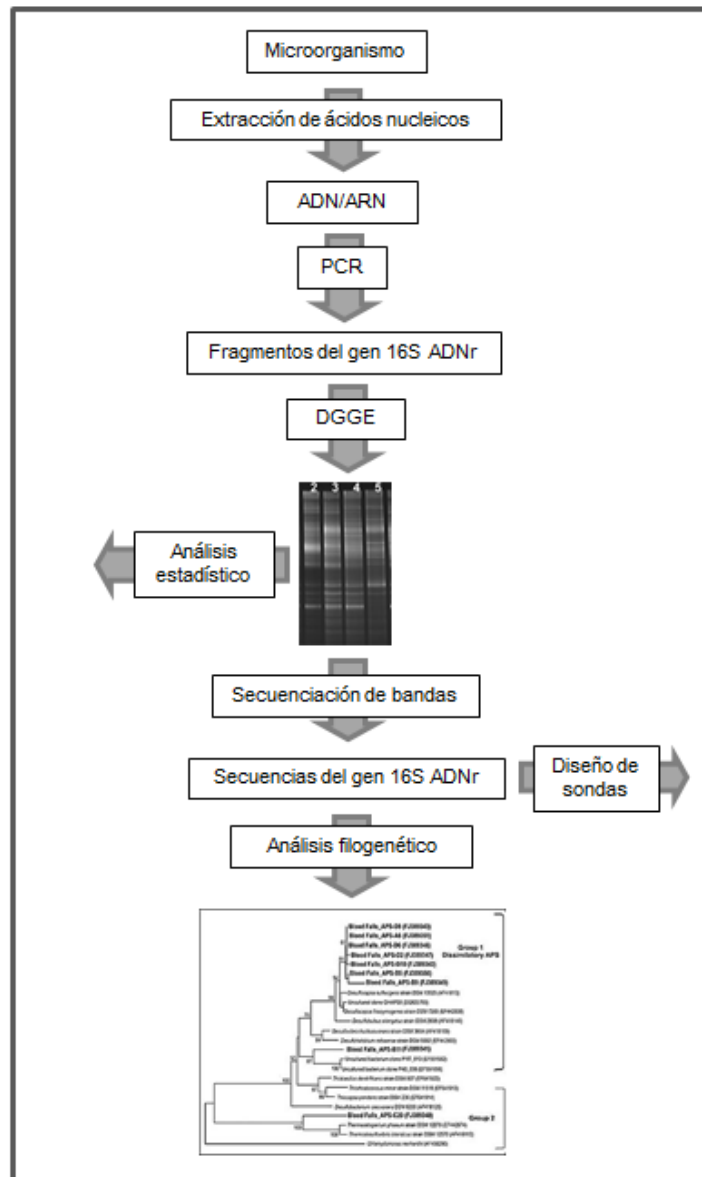


Figura 1.13. Esquema del procedimiento general de PCR-DGGE (Tomado de Muyzer, 2001).

En la DGGE, los fragmentos de ADN de un tamaño muy similar (determinado por los cebadores), son separados por un gradiente de desnaturalizantes químicos (urea y formamida) con base en su composición (diferente grado de guanina-citosina G-C en su secuencia). Cada fragmento de diferente tamaño aparece como una banda sobre el gel de poliacrilamida y representa una unidad taxónomica operacional (OTU), que es una secuencia que puede ser asignada a un grupo filogenético.

Esta técnica puede ser implementada en muchos de los laboratorios y permite la evaluación de varias muestras simultáneamente (Muyzer, 2001). Ha sido usada para evaluar diversidad de poblaciones en muestras complejas, como lo es el caso de un biorreactor anaerobio (Liu y Fang, 2002; Roest *et al.*, 2005; Connaughton *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2007b; Calderón *et al.*, 2011).

1.7 Microbiota en biorreactores anaerobios de membrana sumergida (BRAMS)

Como se mencionó anteriormente, una de las principales características de las biopelículas en los reactores biológicos es su enorme variabilidad. Existen diversos estudios enfocados a comprender la naturaleza de su formación que emplean e integran diferentes modelos para tratar de explicar el fenómeno. Sin embargo, no es sino hasta la década de los 90's que se comenzó a dar importancia al conocimiento de los microorganismos que están involucrados en los procesos de tratamientos de aguas residuales, tanto para la remoción de nutrientes y materia orgánica, así como los que conformaban a las biopelículas. Por ejemplo, existen diversos estudios realizados al estudio de la comunidad microbiana presente en reactores anaerobios (Godon *et al.*, 1997, Sekiguchi *et al.*, 1998). La bibliografía más extensa en BRM se refiere a comunidades en reactores con aireación, siendo más escasa la información para la microbiota en biorreactores anaerobios (BRAM).

Ha sido demostrado que parte de la microbiota presente en la capa taponante de un BRAM proviene del lodo microbiológico. En el caso de los reactores anaerobios, la mayor parte de la comunidad microbiana está representada por organismos que se encargan de la degradación de la materia orgánica hasta metano, dióxido de carbono y agua, mediante el metabolismo de grupos microbianos especializados: bacterias hidrolíticas-fermentativas, bacterias acetogénicas, metanógenos acetoclásticos y metanógenos hidrogenotróficos (Zinder *et al.*, 1993). El primer grupo de bacterias está encargado de la degradación de la materia orgánica hasta ácidos grasos volátiles (AGV's) y otros compuestos como etanol, lactato, etc. Las bacterias acetogénicas transforman los AGV's en acetato, formato, hidrógeno y otros compuestos pequeños. El último paso es la metanogénesis, la cual está representada por organismos del dominio *Archaea* que producen metano y dióxido de carbono a partir de hidrógeno, acetato o formato.

Aunque en los digestores anaerobios podemos encontrar una gran diversidad de microorganismos, existe una redundancia funcional que permite que este tipo de sistemas permanezca estable aun con variaciones en su ambiente. Existen estudios que demuestran cambios en la microbiota, pero sin modificaciones aparentes en el desempeño de la misma (Fernández *et al.*, 1999; Roest *et al.*, 2005). La relación de los cambios en la microbiota y las perturbaciones en su ambiente aun no están bien entendidas y es un tema actual de investigación (Talbot *et al.*, 2008).

Huang *et al.* (2008) evaluaron la microbiota en un BRM aerobio escala laboratorio utilizando agua residual real municipal y encontraron diferencias entre los microorganismos presentes en la biomasa del reactor y los que contribuyeron a la formación de la capa taponante. Principalmente encontraron microorganismos pertenecientes a *Proteobacteria*, especialmente de las subdivisiones α y β , así como también *Bacteroidetes*. Este estudio coincide con el reportado por Wagner *et al.* en 2002, quienes mediante el estudio de las secuencias del gen 16S ADNr encontraron estos mismos grupos en la biopelícula de un BRM aerobio para la remoción de compuestos nitrogenados y fósforo.

En los estudios realizados por Venkata Mohan *et al.* (2010), se realizó un análisis de la diversidad microbiana presente en una biopelícula (soporte a partir de piedras) en un reactor anaerobio para la producción de hidrógeno como fuente de energía, bajo diferentes condiciones a largo plazo. Dentro de sus resultados ellos encontraron que la mayoría de las bandas obtenidas de una DGGE y secuenciadas posteriormente, pertenecían a 4 grupos filogenéticos principalmente: *Bacteroidetes*, *Clostridia*, *Flavobacteria* y *Deltaproteobacteria*.

Padmasiri *et al.* (2007) evaluaron la población metanogénica en un reactor anaerobio de membrana mediante la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (T-RFLP por sus siglas en inglés), encontrando variaciones en las poblaciones de *Methanosarcinaceae* y *Methanosaetaceae* al ocurrir cambios en los niveles de ácidos grasos volátiles presentes en el

reactor, mientras que la población de *Methanomicrobiales* aumentó al disminuir la eficiencia del biorreactor con el tiempo de operación.

Por otro lado, Giménez *et al.* (2011) evaluaron el desempeño de un BRAM escala piloto para tratar aguas residuales municipales, mediante la competencia de las arqueas metanogénicas (MA) contra las bacterias sulfatorreductoras (BSR). Durante los primeros días de operación del BRAM, la población de MA era mucho más alta que las BSR, y se caracterizaban por los grupos de *Methanobacterales*, *Methanomicrobiales* y *Methanosarcinales*. Después de 6 días de operación, la población de MA disminuyó drásticamente, y a los 20 días se observó un incremento en las BSR de la biopelícula, al mismo tiempo que aumentaron los valores de remoción de sulfato en el agua tratada.

Otros estudios más se enfocan a procesos específicos como la oxidación aerobia y anaerobia del amonio en reactores (Park *et al.*, 2010; Wan *et al.*, 2011) para lo cual utilizan cebadores específicos que permitan seguir la actividad metabólica de grupos de microorganismos específicos. Xia *et al.* (2010), por ejemplo, estudiaron la biopelícula de un BRM con alta capacidad de remoción de compuestos nitrificados, y encontraron que la presencia de *Ochrobactrum anthropi sp.* estaba relacionada con biopelículas en la etapa de maduración avanzada (taponamiento severo).

Estudios previos en el grupo de investigación, ayudaron a elucidar los microorganismos involucrados en el taponamiento de un biorreactor anaerobio de membrana externa (Calderón, 2009). Se encontró que la diversidad del dominio *Archaea* fue menor que para el caso de *Bacteria*. Entre los organismos bacterianos, la mayoría provenía de las subclases α , β y ϵ - Proteobacteria. Mientras que las arqueas estaban representadas por organismos pertenecientes a especies de *Methanosaeta* y *Methanobacterium*.

Este trabajo por lo tanto, pretende abarcar el conocimiento de las principales especies microbianas presentes en el taponamiento de un módulo de membrana sumergida en un biorreactor anaerobio.

2. JUSTIFICACIÓN

Hay estudios que reportan como causa del taponamiento en las membranas, diferentes factores tales como componentes orgánicos, inorgánicos y biológicos. Se dice que los microorganismos se adhieren a la membrana y al secretar sustancias extracelulares y éstas unirse con otros componentes del medio, comienzan a formar una matriz, la cual es la razón de que el taponamiento sea difícil de controlar y en muchos casos se considere un proceso irreversible. Este fenómeno ha sido estudiado con cierto detalle en biorreactores aerobios. Por otro lado, los conocimientos que se tienen con respecto a los sistemas anaerobios son pocos (Jinhua *et al.*, 2006; Jeison y van Lier, 2006; Miura *et al.*, 2007a,b; Hu y Stuckey, 2008; Giménez *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011). De ahí que el presente trabajo tenga como objeto investigar estas comunidades microbianas en biorreactores anaerobios con membrana sumergida (BRAMS), teniendo como antecedentes los estudios realizados en este grupo de trabajo sobre operación en biorreactores anaerobios de membrana externa (Herrera-Robledo, 2011; Salazar-Peláez, 2011) y estudio de las comunidades microbianas (Calderón, 2009).

3. HIPÓTESIS

La composición de la microbiota en la película adherida a la membrana filtrante de un UASB que trata agua residual tipo municipal variará con los cambios en las condiciones de operación (tiempo de retención hidráulico y dos métodos de limpieza: retrolavado y burbujeo de N₂) e influirá en la rapidez del taponamiento.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Caracterizar la microbiota de la capa taponante que se desarrolla en una membrana sumergida de un reactor anaerobio (UASB) a diferentes condiciones de operación (tiempo de retención hidráulico y dos métodos de limpieza: retrolavado y burbujeo de N₂), por medio de técnicas moleculares (independientes de cultivo).

4.2 Específicos

- ✓ Identificar los grupos de microorganismos más representativos presentes en la capa taponante de la membrana de un BRAM laboratorio operado a tiempo de retención hidráulico (TRH) de 4 y 8 horas, con agua residual sintética mediante la técnica de PCR-DGGE.
- ✓ Identificar los grupos de microorganismos más representativos presentes en la capa taponante de la membrana de un BRAM laboratorio sujeto a 2 métodos de limpieza: retrolavado y burbujeo de N₂ mediante la técnica de PCR-DGGE.
- ✓ Caracterizar de forma cualitativa la microbiota presente en la capa taponante en una membrana sumergida de un reactor UASB a diferentes condiciones de operación, a través del nuevo concepto de gestión de recursos microbianos (MRM).

5. METODOLOGÍA

Se utilizó un BRAMS conformado por un reactor UASB (volumen útil de 4.33 L) y una membrana de ultrafiltración de fluoruro de polivinilideno (PVDF) en la configuración que se observa en las figuras 5.1 y 5.2.

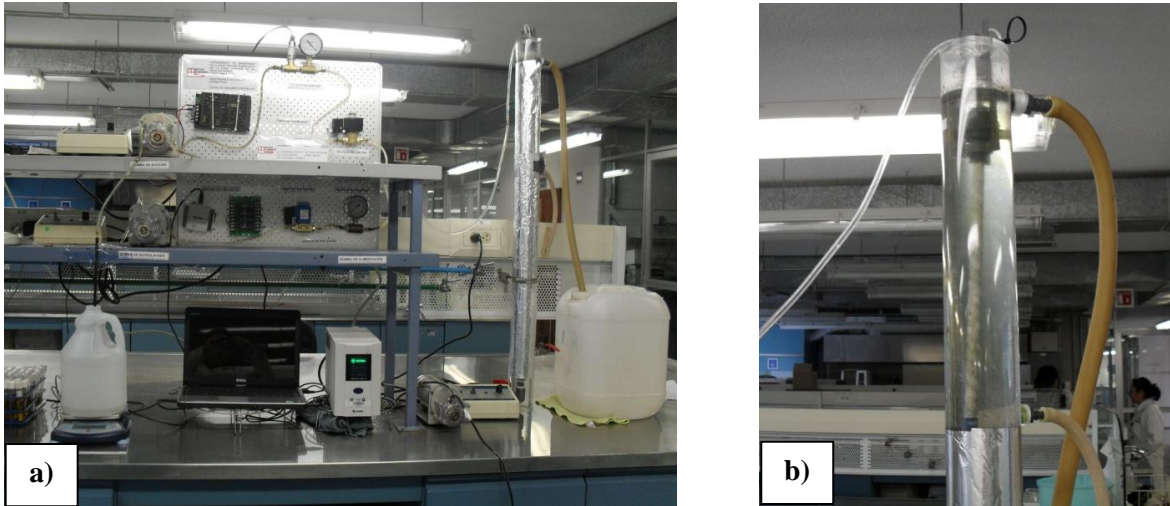


Figura 5.1. a) BRAM automatizado escala laboratorio. b) Membrana sumergida.

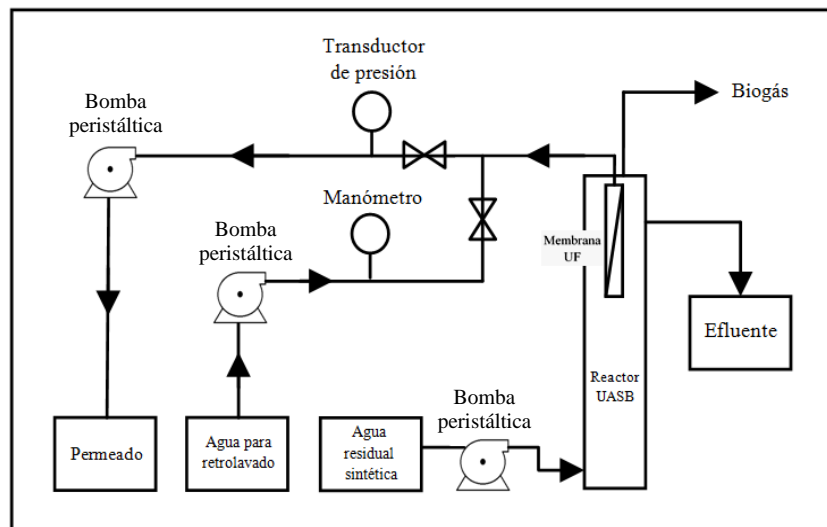


Figura 5.2. BRAMS escala laboratorio.

Como se observa en la figura 5.1b, la membrana se colocó en la parte superior del reactor, ocupando aproximadamente una tercera parte de la altura del mismo. En la parte inferior del reactor UASB está el lodo granular que contiene a la microbiota anaerobia encargada de la degradación de la materia orgánica en el reactor (aproximadamente una tercera parte del volumen útil del reactor). El sistema de automatización del BRAMS fue controlado a través de un software escrito en Labview específicamente para este trabajo, el cual utilizó los datos de presión transmembrana y la masa de efluente filtrado (obtenidos a través de una tarjeta de adquisición de datos National Instrumens Inc.), para controlar el flux de operación.

Las características de la membrana se listan en la siguiente tabla:

Tabla 5.1. Características de la membrana de ultrafiltración.

Parámetro	Escala Laboratorio
Tipo	Tubular
Material	PVDF
Corte de peso molecular (kDa)	100
Diámetro (mm)	9
Longitud (cm)	30
Área (cm ²)	85

Para el estudio de la biopelícula en la capa taponante de la membrana, se eligieron diferentes condiciones de operación que incluyeron dos tiempos de retención hidráulicos (TRH), 4 y 8 horas, así como dos métodos de limpieza, retrolavado y burbujeo de nitrógeno. De acuerdo a esto, se establecieron los siguientes tratamientos que se muestran en la figura 5.3 y que se explican más adelante.

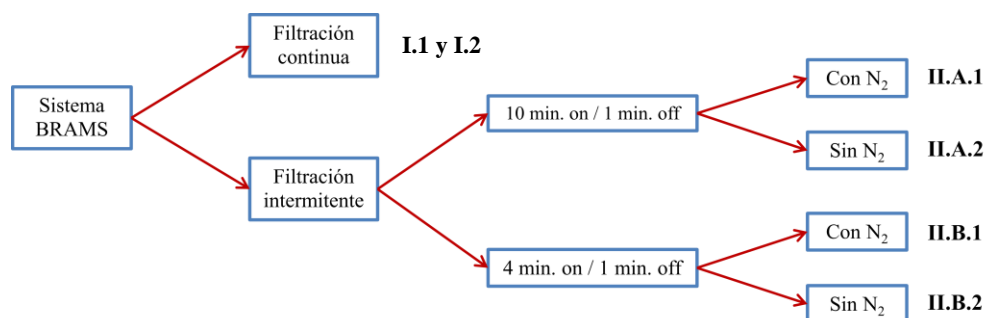


Figura 5.3. Condiciones de operación del sistema BRAMS.

Filtración continua con retrolavado (I.1 y I.2): (4 y 8 horas de TRH respectivamente).

Flux constante ($5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) con retrolavado de agua desionizada de 30 segundos en el momento en que la PTM alcanzó 40 kPa. Esta prueba se dio por terminada cuando los retrolavados se realizaban con una frecuencia de un minuto entre ellos.

Filtración intermitente: (TRH de 8 horas).

1. Flux constante ($5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$), se mantuvo en operación 10 minutos con 1 minuto de relajación: Sin burbujeo (**II.A.1**) y con burbujeo de N_2 (**II.A.2**).
2. Flux constante ($5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$), se mantuvo en operación 4 min con 1 min de relajación: sin burbujeo (**II.B.1**) y con burbujeo de N_2 (**II.B.2**)

Estas pruebas se finalizaron al alcanzar una presión transmembrana de 40 kPa.

Es importante mencionar que la elección de los TRH presentados en este trabajo se debió a estudios previos, en los cuales se demostró que el mejor desempeño de un biorreactor anaerobio de membrana externa se encontraba al utilizar un TRH de 8 horas (Salazar-Peláez, 2011). Sin embargo, como forma de comparación y para saber si podría existir una diferencia por la configuración del módulo de membranas (en nuestro caso, un módulo sumergido), se optó por hacer pruebas también a un TRH de 4 horas (Cerón-Vivas *et al.*, 2012). TRH más largos no son muy recomendados puesto que la calidad del agua no suele mejorar significativamente si se los deja por más tiempo.

Los métodos de limpieza propuestos aquí, retrolavados y relajación (con y sin burbujeo de nitrógeno), fueron explicados en el apartado del marco teórico, y se eligieron por ser lo más comúnmente utilizados tanto en experimentos en laboratorio, como en escala real (Huang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Braak *et al.*, 2011; Dvorák *et al.*, 2011; Monclús *et al.*, 2011).

La metodología general de toma de muestras se presenta en la figura siguiente:

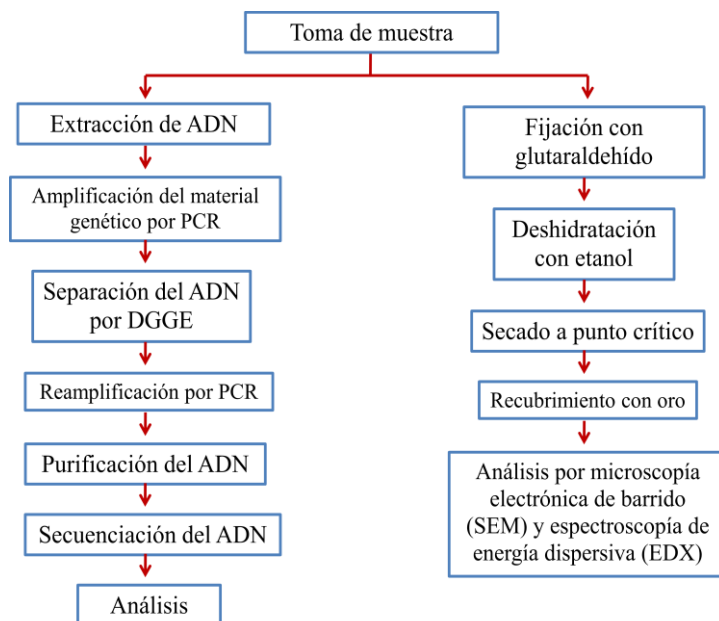


Figura 5.4. Metodología general para el análisis de las muestras de biopelícula.

El biorreactor fue alimentado con agua residual sintética tipo municipal en todas las pruebas, y la composición es la que se presenta en la tabla 5.2. La elección de realizar estos estudios con un agua residual sintética fue la de proveer condiciones controladas durante todo el experimento, no sólo para el estudio de las comunidades microbianas, sino también, la operación del biorreactor: remoción de nutrientes, producción de SPE, entre otras (Cerón-Vivas *et al.*, 2012). También se realizaron pruebas con agua real pero esos resultados no se incluyen en este trabajo.

Tabla 5.2. Composición del agua residual sintética (Cerón *et al.*, 2012).

Reactivo	Concentración mg/L
CH ₃ COONa•3H ₂ O	647.00
C ₆ H ₁₂ O ₆	100.00
Peptona de Caseína	40.00
NaHCO ₃	268.91
NH ₄ Cl	133.75
KH ₂ PO ₄	48.71
MgSO ₄ •7H ₂ O	84.49
FeCl ₃ •6H ₂ O	2.42
MnCl ₂ •4H ₂ O	1.08
ZnCl ₂	0.10
CoCl ₂ •6H ₂ O	0.11
NaMoO ₄ •2H ₂ O	0.076
CuCl ₂ •2H ₂ O	0.007
NiCl ₂ •6H ₂ O	0.028

5.1 Estudio de las comunidades bacterianas

Para llevar a cabo el estudio de las comunidades microbianas, se colectaron muestras de los diferentes tratamientos, y éstas fueron:

- Lodo microbiológico de la cama de lodos del reactor (para efectos de comparación con la biopelícula).
- Membrana con biopelícula (3 fragmentos dependiendo de su ubicación dentro del reactor: parte superior, media e inferior).

Se probaron tres métodos de extracción del material genético diferentes para elegir el que diera un mayor rendimiento y una mejor calidad de ADN. Los métodos fueron:

1. Método propuesto por Klocke *et al.*, 2003 (Anexo 1).
2. Método de extracción con el Genomic DNA Extraction Kit (Anexo 1).
3. Método de extracción con el Power Soil DNA Isolation Kit (Anexo 1).

5.1.1 Extracción de ADN

A cada tipo de muestra (lodo y biopelícula) se le aplicó un procedimiento preliminar a la extracción debido a sus características particulares. A continuación se describen las metodologías.

* Lodo microbiológico

Al final de cada prueba, se tomó una muestra de lodo biológico de la parte inferior del reactor para llevar a cabo el análisis de la microbiota presente. Para la extracción de ADN se utilizó el kit de extracción Power Soil DNA Isolation Kit (Método mecánico de lisis celular) como se describe a continuación:

- 1) La muestra de lodo recolectada se homogenizó con un mortero estéril para provocar el rompimiento de los gránulos.
- 2) Se pesaron aproximadamente 400-500 mg de muestra.
- 3) Se realizaron una serie de lavados de la siguiente manera:
 - a) Muestra + Buffer de fosfatos-PBS (0.8 mL) → vórtex 30 s, centrifugación 10000 $x g$ por 2 min. Se decantó el sobrenadante.
 - b) Muestra + NaCl 0.5% (0.7 mL) → vórtex 30 s, centrifugación 10000 $x g$ por 2 min. Se decantó el sobrenadante. Se repitió la operación en un total de 4 veces.

El lodo se resuspendió en 0.4 mL de PBS y a continuación se siguieron las instrucciones del fabricante.

* Membrana

Al final de cada tratamiento se cortó la membrana, y se colectaron muestras de tres centímetros de largo, de la parte inferior, central y superior, respectivamente, de acuerdo a su ubicación dentro del reactor. Cada fragmento se conservó en solución de buffer de fosfatos (PBS) a -20°C hasta que se llevó a cabo su análisis. Para la extracción de ADN, se utilizó el kit Power Soil DNA Isolation Kit. Se cortaron los fragmentos de membrana en cuadrados de aproximadamente 0.3 x 0.3 cm y se colocaron en los tubos (Bead Tubes) del kit de extracción, colocándolos en el vórtex por 10 minutos con 0.5 mL de PBS. La biopelícula que se desprendió de la membrana se recuperó por centrifugación (3 minutos a 10000 $x g$), se resuspendió en 0.2 mL de PBS 1X y a continuación se siguieron las instrucciones del fabricante.

5.1.2 Determinación de la concentración de ADN en las muestras

Después de cada extracción, se procedió a leer las muestras en un espectrofotómetro (BioPhotometer Eppendorf). Se midió la absorbancia de las muestras a 260 nm para determinar la concentración de ADN. El equipo transforma los valores de absorbancia medidos en resultados de concentración. Cabe mencionar que el equipo cuenta con un factor de conversión de la absorbancia a unidades de ADN de doble cadena. Por otro lado, para establecer la calidad del material genético en base a su pureza, también muestra los valores de los cocientes OD_{260}/OD_{280} y OD_{260}/OD_{230} . Además de las lecturas en el espectrofotómetro, al ADN extraído se le realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% durante 30 minutos a 80V.

5.1.3 Amplificación de fragmentos del gen codificante para la subunidad ribosomal 16S

Posterior a la extracción, purificación y recuperación del material genético, se procedió a llevar a cabo reacciones de PCR para amplificar los fragmentos de ADN deseados de la muestra. Se decidió trabajar con el gen codificante del ARN ribosómico 16S para todas las muestras. Es importante destacar que se realizaron pruebas para conocer las comunidades tanto de *Bacteria* como de *Archaea*. Para cada dominio se eligieron cebadores que permitieran amplificar más de una región hipervariable. Las características de cada par de cebadores se muestran en la tabla 5.3. Los cebadores directos además tenían una cola de G-C para permitir llevar a cabo la DGGE, cuya secuencia era: CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGC.

Tabla 5.3. Cebadores para más de una región hipervariable.

Cebador/ sentido	Secuencia (5' a 3')	Tamaño aprox. del fragmento (pb)	Región amplificada	Bibliografía
BAC 8F (directo) BAC 519R (inverso)	AGACTTTGATCCTGGCTCAG GTATTACCGCGGCTGCTGG	500	V1-V3 del gen 16S ADNr (<i>Bacteria</i>)	Li <i>et al.</i> , 2009
BAC 341F (directo) BAC 907R (inverso)	CCTACGGG GGCAGCAG CCGTCAATTCMTTGTGAGTTT	550	V3-V5 del gen 16S ADNr (<i>Bacteria</i>)	Li <i>et al.</i> , 2009
BAC 954F (directo) BAC 1369 R (inverso)	GCACAAGCGGTGGAGCATCTGG GCCCGGGAACGTATTCACCG	400	V6-V8 del gen 16S ADNr (<i>Bacteria</i>)	Yu y Morrison, 2004
ARC 344F (directo) ARC 519R (inverso)	ACGGGGCGCAGCAGGCGC GA GWATTACCGCGGCGGCTG	200	V3 del gen 16S ADNr (<i>Archaea</i>)	Yu <i>et al.</i> , 2008
ARC 787F (directo) ARC 1059R (inverso)	ATTAGATACCCSBGTAGTCC GCCATGCACCWCCTCT	230	V5-V6 del gen 16S ADNr (<i>Archaea</i>)	Yu y Morrison, 2004
ARC 1106F (directo) ARC 1378R (inverso)	TTWAGTCAGGCAACGAGC TGTGCAAGGAGCAGGGAC	250	V6-V8 del gen 16S ADNr (<i>Archaea</i>)	Watanabe <i>et al.</i> , 2006

*BAC: dominio *Bacteria*; ARC: dominio *Archaea*.

Cada par de cebadores proporcionó un fragmento (amplificado) de tamaño diferente. Como se puede observar en la tabla anterior, los amplificados de *Bacteria* son mucho más grandes comparados con los obtenidos para *Archaea*.

Para llevar a cabo la reacción de amplificación, se optimizó la concentración de los reactivos para *Bacteria* y *Archaea* (Tabla 5.4 y 5.5, respectivamente) de manera individual para un volumen de reacción de 50µL (Calderón, 2009).

Tabla 5.4. Reactivos para reacción de amplificación para *Bacteria*.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
PCR Buffer Gold	10 X	1 X
MgCl ₂	25 mM	2 mM
Seroalbúmina Bovina	10 mg/mL	12.5 µg
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato	25 mM	20 nM
Dimetilsulfóxido grado biología molecular	5%	2.5 µL
Cebador directo	50 µM	0.1 µM
Cebador inverso	50 µM	0.1 µM
Ampli Taq Gold polimerasa	5 U/ µL	2 U
ADN molde	X	30 ng
Agua bidestilada	---	Cbp

Las condiciones de reacción para cada par de cebadores de *Bacteria* fueron las propuestas por cada autor que utilizó ese par de cebadores y son las que se mencionan a continuación (programa de PCR en un termociclador *Master Cycler* de Eppendorf).

BAC 8f-519r

1. Desnaturalización inicial: 94°C, 5 min.
2. 10 ciclos que constan de:
 - 2.1 Desnaturalización: 94°C, 1 min.
 - 2.2 Hibridación: 65°C, 1 min.

Nota: Esta temperatura se disminuyó 1°C cada ciclo hasta alcanzar 55°C, temperatura a la cual se efectuaron 15 ciclos adicionales.

 - 2.3 Extensión: 72°C, 2 min.
3. Extensión final: 72°C, 8 min.
4. Conservación: 4°C.

BAC 341f-907r

1. Desnaturalización inicial: 94°C, 5 min.
2. 10 ciclos que constan de:
 - 2.1 Desnaturalización: 94°C, 1 min.
 - 2.2 Hibridación: 65°C, 1 min.

Nota: Esta temperatura se disminuyó 1°C cada ciclo hasta alcanzar 45°C, temperatura a la cual se efectuaron 15 ciclos adicionales.

 - 2.3 Extensión: 72°C, 2 min.
3. Extensión final: 72°C, 8 min.
4. Conservación: 4°C.

BAC 954f-1369r

1. Desnaturalización inicial: 94°C, 5 min.
2. 10 ciclos que constan de:
 - 2.1 Desnaturalización: 94°C, 30 s.
 - 2.2 Hibridación: 61°C, 30 s.
Nota: Esta temperatura se disminuyó 0.5°C cada ciclo hasta alcanzar 56°C, temperatura a la cual se efectuaron 25 ciclos adicionales.
 - 2.3 Extensión: 72°C, 1 min.
3. Extensión final: 72°C, 7 min.
4. Conservación: 4°C.

A continuación la concentración para los reactivos para el dominio *Archaea*.

Tabla 5.5. Reactivos para reacción de amplificación para *Archaea*.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
PCR Buffer Gold	10 X	1.5 X
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM
Seroalbúmina Bovina	10 mg/mL	12.5 µg
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato	25 mM	20 nM
Dimetilsulfóxido grado biología molecular	5%	2.5 µL
Cebador directo	50 µM	0.1 µM
Cebador inverso	50 µM	0.1 µM
Ampli Taq Gold polimerasa	5 U/ µL	2.5 U
ADN molde	X	30 ng
Agua bidestilada	---	Cbp

De la misma manera, siguiendo las condiciones de reacción propuestas por los autores, para *Archaea* tenemos los siguientes programas de PCR en el termociclador *Master Cycler* de Eppendorf.

ARC 344f-519r

1. Desnaturalización inicial: 94°C, 5 min.
2. 10 ciclos que constan de:
 - 2.1 Desnaturalización: 94°C, 1 min.
 - 2.2 Hibridación: 65°C, 1 min.
Nota: Esta temperatura se disminuyó 1°C cada ciclo hasta alcanzar 45°C, temperatura a la cual se efectuaron 15 ciclos adicionales.
 - 2.3 Extensión: 72°C, 2 min.
3. Extensión final: 72°C, 8 min. 4. Conservación: 4°C.

ARC 787f-1059r

1. Desnaturalización inicial: 94°C, 10 min.
2. 10 ciclos que constan de:
 - 2.1 Desnaturalización: 94°C, 1 min.
 - 2.2 Hibridación: 65°C, 1 min.
Nota: Esta temperatura se disminuyó 0.5°C cada ciclo hasta alcanzar 55°C, temperatura a la cual se efectuaron 20 ciclos adicionales.
 - 2.3 Extensión: 72°C, 1 min.
3. Extensión final: 72°C, 30 min.
4. Conservación: 4°C.

ARC 1106f-1378r

1. Desnaturalización inicial: 94°C, 1.5 min.
2. 35 ciclos que constan de:
 - 2.1 Desnaturalización: 94°C, 30 s.
 - 2.2 Hibridación: 55°C, 30 s.
 - 2.3 Extensión: 72°C, 1.5 min.
3. Extensión final: 72°C, 8 min.
4. Conservación: 4°C.

A cada reacción de PCR también se corroboró su concentración de ADN por espectrofotometría UV. Además, se les realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 40 min a 85V, junto a un marcador de peso molecular cuyo rango abarcaba de 100 a 5000 pb (Gene Ruler Express DNA Ladder, Fermentas) con el fin de comprobar que los fragmentos amplificados fueran los deseados para cada caso.

5.1.4 Separación de los fragmentos por electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturizante (DGGE por sus siglas en inglés).

Para llevar a cabo la separación de secuencias diferentes presentes en las muestras, se procedió a correr las mismas en geles de poliacrilamida (8 y 6%) mediante una electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (Urea-Formamida) cuya composición se muestra en la tabla 5.6, con un Sistema D-Code de BioRad.

Tabla 5.6. Composición de una solución al 100% de agentes desnaturizantes (Volumen final de 100 mL).

Reactivo	Concentración inicial	Cantidad final
Urea	7 M	40 g
Formamida	40 %	40 mL
Buffer tris-acetato-EDTA pH 8.0	50 X	2 mL
Acrilamida bis-acrilamida 37:5:1	40%	15 mL para gel al 6% 20 mL para gel al 8%

Se prepararon geles de 16x16 cm, con un volumen aproximado de 30 mL y una capacidad para correr hasta 15 muestras simultáneas.

Se realizaron pruebas para los amplificadores de *Bacteria* y *Archaea* para todos los tratamientos. Se tomaron alícuotas de 15 mL de amplificado y se les adicionó 12 mL de buffer de carga 1X. Todas las muestras se corrieron en geles perpendiculares, para de esta forma encontrar el área en el que se centraban la mayor parte de las muestras. De acuerdo a los resultados de los geles perpendiculares y tomando en cuenta las recomendaciones hechas por los autores de cada par de cebadores, se establecieron las siguientes condiciones para la electroforesis:

Bacteria.- 82 V, 15.5 h, gradiente desnaturizante 35-70 %.

Archaea.- 82 V, 15 h, gradiente desnaturizante 40-60%.

Los geles se revelaron en una solución de SYBR Gold al 1% (en TAE 1X) durante 40 min. Luego se visualizaron en un fotodocumentador de la marca BioRad con luz UV y se les tomó fotografías, las cuales fueron analizadas utilizando el software Quantity One 1.0 (Biorad, USA)

5.2 Análisis del perfil de bandas en geles de poliacrilamida

A partir de la visualización de los geles de poliacrilamida se procedió a evaluar la comunidad microbiana a través de su perfil de bandas como se muestra a continuación en la figura 5.5.

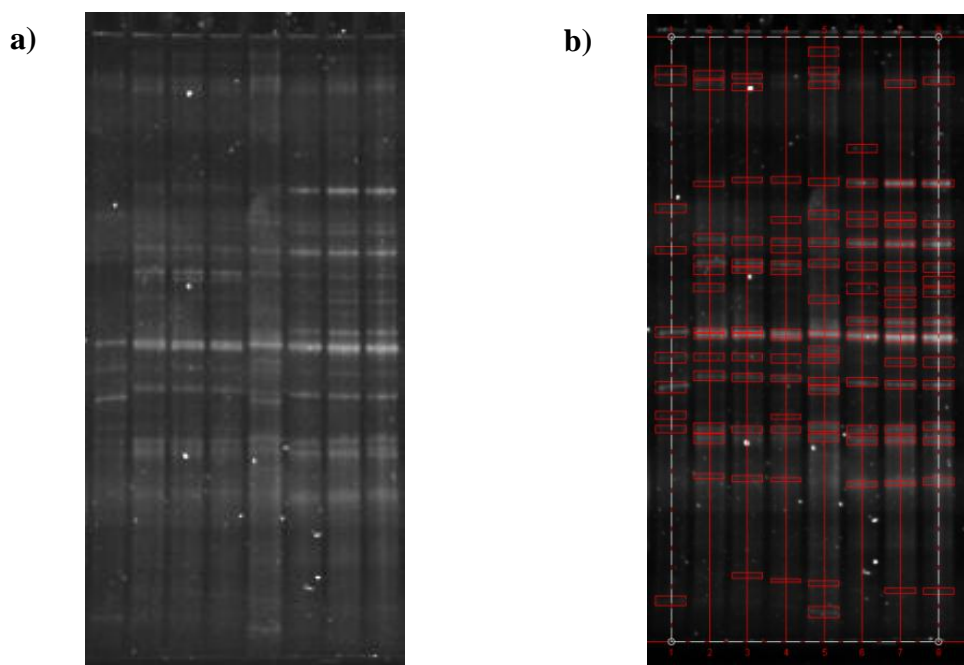


Figura 5.5. a) Ejemplo de gel de poliacrilamida con muestras de amplificados.
b) Identificación de las bandas presentes en el gel.

El software Quantity One 1.0 se usó para identificar las bandas en el gel, teniendo en cuenta un límite de sensibilidad (medio-alto), esto con el fin de lograr que el programa detectara la mayoría de las bandas posibles según su intensidad. Luego de que el programa las señalara, manualmente se seleccionaron aquellas que efectivamente representaban bandas (el equipo detecta cualquier intensidad luminosa como una posible banda, incluyendo las manchas ocasionadas por otros factores). Ya que se tenía el perfil de bandas se procedió a pasar esta imagen a una matriz para visualizar la ausencia como cero o presencia de bandas como uno, tal como se puede ver en la figura 5.6.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0	0	0	0	1	0	0	0
2	1	1	1	0	1	0	0	0
3	1	1	1	0	1	0	1	1
4	0	0	0	0	0	1	0	0
5	0	1	1	1	1	1	1	1
6	1	0	0	0	1	1	1	0
7	0	0	0	1	0	1	1	1
8	0	1	1	1	1	1	1	1
9	1	0	0	1	0	0	0	0
10	0	1	1	1	1	0	0	0
11	0	1	1	1	0	1	1	1
12	0	0	0	0	0	0	0	1
13	0	1	0	0	0	1	1	1
14	0	0	0	0	1	0	1	0
15	0	0	0	0	0	1	1	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1
17	0	1	1	1	0	0	0	0
18	0	0	0	0	1	0	0	0
19	1	1	1	1	1	0	1	1
20	0	1	1	1	1	1	1	1
21	1	0	0	0	1	0	0	0
22	1	0	0	1	0	0	0	0
23	1	1	1	1	1	1	1	1
24	0	1	0	0	1	1	1	1
25	0	1	1	1	0	1	1	1
26	0	0	1	1	0	0	0	0
27	0	0	0	0	1	0	0	0
28	1	0	0	0	0	0	1	1
29	0	0	0	0	1	0	0	0
Total de bandas	10	14	13	14	17	13	16	15

Figura 5.6. Ejemplo de matriz binaria del gel de poliacrilamida (Muestras del ejemplo anterior).

Teniendo en cuenta la matriz obtenida, es posible calcular los coeficientes de similitud de Sorensen-Dice (S_D) y Jaccard (J). Estos coeficientes se utilizan especialmente para comparar las comunidades con atributos similares, y en la cual, datos cualitativos (presencia/ausencia), pueden representar distintos grados de perturbación en el ambiente. Las fórmulas de cada uno se presentan a continuación:

Sorensen-Dice

$$S_D = \frac{2n_{AB}}{n_A + n_B}$$

Jaccard

$$J = \frac{n_{AB}}{n_A + n_B - n_{AB}}$$

Donde:

n_A = Número de bandas en el carril A

n_B = Número de bandas en el carril B

n_{AB} = Número de bandas en ambos carriles

De acuerdo con Marzorati *et al.* (2008) el análisis de los perfiles de bandas obtenidos a partir de técnicas de huella molecular como la TGGE o la DGGE, permite conjeturar características de las comunidades microbianas por medio del nuevo concepto conocido como MRN por sus siglas en inglés (gestión de recursos microbianos), que introduce los índices de: rango ponderado de riqueza Rr, e índice de funcionalidad Fo, los cuales se explican a continuación.

- ✓ **Rr (Range weighted richness):** Nos brinda una estimación del nivel de diversidad microbiana en muestras ambientales. Muchos autores sugieren que el porcentaje de G+C puede ser usado para estudiar la diversidad y el cambio (*shifting*) de una comunidad microbiana aunque no exista una correlación taxonómica.

$$Rr = (N^2 \times Dg)$$

Donde:

N= Número de bandas

Dg= Gradiente desnaturalizante desde la primera hasta la última banda de cada columna

- ✓ **Fo (Functional organization):** Se dice que la organización es el resultado de la acción de los microorganismos que se encuentran más relacionados con las interacciones, microorganismos-medio ambiente, y que por esa razón tienden a volverse dominantes en la estructura de la comunidad microbiana. Este índice se calcula mediante la normalización del número de bandas acumulado, OTUS, (eje de las x), y las intensidades de cada banda normalizadas y acumuladas (eje de las y), utilizando el método de la curva de Pareto-Lorenz (figura 5.7).

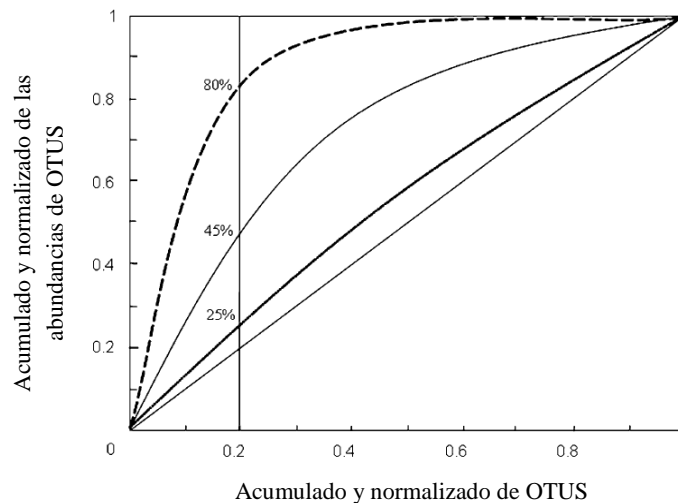


Figura 5.7. Curva de Pareto-Lorenz para ecología microbiana (Marzorati *et al.*, 2008).

5.3.1 Reamplificación de las bandas separadas del gel de DGGE

Después de visualizar los geles en el fotodocumentador, se colocó el gel en un dispositivo portátil para irradiar geles con luz UV (Marca Labotech) y se procedió a cortar las bandas más representativas del gel, mediante el uso de un bisturí estéril. Cada banda se colocó en un microtubo diferente, se resuspendió en 30µL de agua bidestilada estéril y se incubó 24 horas en refrigeración a 4°C. Este procedimiento hace que el ADN atrapado en el gel migre hacia la fase acuosa, para después ser usado como molde de reacciones de amplificación con los mismos cebadores para cada región pero sin la pinza de G-C.

5.3.2 Purificación de las bandas y secuenciación

Por último, cada reacción individual de PCR se purificó con el QIAquick PCR purification kit de QIAGEN®. Las muestras se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. Al recibir las secuencias, se procedió a analizarlas e interpretarlas mediante el uso de la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se llevó a cabo la búsqueda en la base de datos de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), el GenBank, para su posterior análisis y construcción de árboles filogenéticos, con el programa de MEGA 5.0. Con este software, se corrieron todas las secuencias, las encontradas en este estudio y también secuencias de referencias, para encontrar el modelo de sustitución más adecuado para llevar a cabo la construcción del árbol filogenético para todas las secuencias. Al finalizar, el programa muestra los resultados de varios valores, entre los que destaca el valor de BIC (*Bayesian information criterion*), por medio del cual se conocen cuáles son los modelos de sustitución más adecuados para las secuencias analizadas. Para corroborar la identificación de los microorganismos encontrados, se llevó a cabo un análisis de confiabilidad *bootstrap*.

5.4 Análisis por microscopía electrónica de barrido y espectroscopía dispersiva de rayos X

Estos análisis sólo se llevaron a cabo con las muestras de membrana recolectadas al final de cada tratamiento y para la parte superior e inferior de la membrana. La muestra se corta en fragmentos cuadrados de 0.25 cm² y se colocaron en un solución de glutaraldehído al 1% durante 2 horas. Después se retiró y se enjuagó con regulador PBS 1X. Posteriormente se realiza la deshidratación con etanol (50, 60, 70, 80 y 100%). Por último se lleva a cabo un secado a punto crítico y se conservan las muestras en un desecador hasta su observación y análisis en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-7600F) que tiene integrado un sistema de espectroscopía dispersiva de rayos X.

6. RESULTADOS

En total se estudiaron 6 condiciones diferentes para el sistema BRAMS. El TRH aplicado durante los experimentos con filtración intermitente fue de 8 horas.

I.1 Filtración continua con TRH de 8 horas.

I.2 Filtración continua con TRH de 4 horas.

II.A.1 Filtración intermitente 10 min on/1 min off con burbujeo de nitrógeno.

II.A.2 Filtración intermitente 10 min on/1 min off sin burbujeo.

II.B.1 Filtración intermitente 4 min on/1 min off con burbujeo de nitrógeno.

II.B.2 Filtración intermitente 4 min on/1 min off sin burbujeo.

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del efluente del reactor UASB y del permeado durante las diferentes etapas de operación del sistema BRAMS se muestran en el Anexo 3.

6.1 Obtención y amplificación de ADN de las muestras de todos los tratamientos

Al finalizar cada prueba se tomaron las muestras para su análisis. Como se mencionó en la metodología, lo primero que se llevó a cabo fue la extracción de ADN. El paso más crítico para el estudio de muestras ambientales es una buena extracción del material genético.

En este trabajo se probaron tres métodos de extracción diferentes, dos kits (FAST-ID y PowerSoil) y uno propuesto por Klocke *et al.* (2003), para una muestra de 400 mg de lodo anaerobio (gránulos). Los resultados obtenidos del espectrofotómetro a partir de las muestras son los que se encuentran en la tabla 6.1.

Tabla 6.1. Resultados de extracción de ADN por tres métodos diferentes.

Método	Muestra	ng/ μ l	OD _{260/280}	OD _{260/230}
1. FAST-ID	Lodo	2.25	1.34	0.32
2. Klocke <i>et al.</i> , 2003	Lodo	3.25	0.78	0.65
3. Power Soil	Lodo	6.75	1.48	0.65

Como se observa en la tabla, los rendimientos de ADN (ng/ μ l) fueron bajos, así como las relaciones de absorbancias OD_{260/280} y OD_{260/230}. Al correr las muestras en geles de agarosa no se observó ninguna banda debido a la baja cantidad del ADN extraído. Sin embargo, cuando se realizó la amplificación, fue posible observar una banda muy bien definida para el kit Power Soil (Figura 6.1). Considerando que este método también fue el que demostró un mayor rendimiento y pureza con base en los resultados obtenidos a partir del biofotómetro, se decidió trabajar con el kit Power Soil para todas las muestras. En este sentido, Ínceoğlu *et al.* (2010) evaluaron diferentes métodos de extracción para muestras de suelos, utilizando un kit de extracción (Power Soil) y dos métodos propuestos por Smalla *et al.*, (1993) y Zhao *et al.*, (1996), encontrando que el método que les dio mejores resultados fue el kit de extracción Power Soil, que también mostró los mejores resultados en reacciones subsecuentes de amplificación por PCR.



Figura 6.1. Fragmentos amplificados de PCR por los tres diferentes métodos de extracción (1. FAST-ID, 2. Klocke *et al.*, 2003; 3. Power Soil).
Muestras por duplicado de lodo anaerobio.

Como ya se mencionó, se consideró que el mejor método de extracción para el tipo de muestras analizadas fue el kit de PowerSoil, con un tratamiento inicial de las muestras consistente en lavados con NaCl al 5% y PBS 1X, ya que fue el método que brindó el mayor rendimiento de ADN extraído, así como relaciones más altas de $OD_{260/280}$ y $OD_{260/230}$ (Tabla 6.1). Este método de extracción utiliza perlas y SDS para la lisis (mecánica y enzimática respectivamente) de la membrana celular, a diferencia de los otros que utilizan únicamente una lisis enzimática. Este fue el paso clave en las muestras, debido a que como se sabe, los gránulos anaerobios y la biopelícula, son matrices complejas que involucran, además de los organismos vivos, otras sustancias como SPE (carbohidratos y proteínas), ácidos húmicos, entre otros, que deben ser inicialmente separados de la célula y posteriormente purificados en los pasos subsecuentes de la extracción. El kit Power Soil como se describe en el Anexo 1, tiene 2 pasos consecutivos (solución C2 y C3), en donde se agrega a la muestra un reactivo que la compañía ha patentado con el nombre de IRT (*Inhibitor removal technology*), y que es capaz de precipitar el material orgánico (no ADN), inorgánico (incluyendo ácidos húmicos), restos celulares y proteínas.

Al finalizar cada tratamiento, se llevó a cabo la extracción de ADN de todas las muestras con ese kit. Las tres muestras tomadas de cada membrana (parte superior, central e inferior) fueron utilizados como réplicas, por lo que únicamente se llevó a cabo la amplificación de uno de los fragmentos. Los resultados se presentan en la Tabla 6.2.

Aunque la relación de pureza es más baja de la recomendada, hay que tomar en cuenta que se trata de muestras ambientales en matrices complejas, por lo que se procedió a la amplificación y lo que se observó fue que la relación de absorbancias aumentó tanto para $OD_{260/280}$, como para $OD_{260/230}$ (tabla 6.3 y 6.4). El hecho de que las relaciones $OD_{260/280}$ y $OD_{260/230}$ hayan salido bajas puede ser resultado de varios factores. Para el caso de la relación $OD_{260/280}$, algunos estudios señalan que puede deberse a la contaminación con proteínas (Thermo Scientific, 2010; OGT, 2011), o bien, porque se tienen muy bajas concentraciones de ácido nucleico en la muestra, <10 ng/ μ L (Thermo Scientific, 2010), que es precisamente el presente caso. Por otro lado, una baja relación $OD_{260/230}$ indica que hay probablemente contaminación debida a la presencia de carbohidratos (común en muestras vegetales), compuestos aromáticos, ácidos húmicos (presentes en muestras de suelos), y también por residuos de los reactivos de los kit de extracción, como el TRIzol, fenol, entre otros (Luebbehusen, 2010; Thermo Scientific, 2010; OGT, 2011).

Tabla 6.2. Resultados de extracción de ADN (L, es la muestra de lodo y M, la muestra de membrana).

Prueba	Muestra	ng/μl	260/280	260/230
I.1	L	7	1.7	0.41
I.1	M	5	1.77	0.31
I.2	L	8.25	1.43	0.60
I.2	M	8.75	1.92	0.62
II.A.1	L	7.25	1.60	0.65
II.A.1	M	8.75	1.53	0.56
II.A.2	L	7.25	1.35	0.71
II.A.2	M	7.5	1.38	0.41
II.B.1	L	8	1.32	0.56
II.B.1	M	8.25	1.52	0.60
II.B.2	L	8.25	1.43	0.72
II.B.2	M	6.75	1.65	0.45

Otro punto notable, es que no hubo gran diferencia en el rendimiento de extracción dependiendo del tipo de muestra (lodo o membrana), lo que indica que el procedimiento utilizado por el kit es eficiente para ambas matrices complejas en que están inmersos los ácidos nucleicos, los gránulos anaerobios y la biopelícula de la membrana.

Posteriormente se probaron tres pares de cebadores para *Bacteria* y *Archaea*. La intención era visualizar cuál par de cebadores ofrecía un mejor perfil de bandas (mayor número de bandas y mejor definición de las mismas). A continuación se presenta una imagen de un gel de DGGE para cada uno de los diferentes cebadores, utilizando la misma muestra de ADN extraído (a partir de gránulos de lodo anaerobio).

A partir de la visualización de los geles, se tomó la decisión de trabajar con los cebadores 341-F y 907-R para *Bacteria*, y 1106-F y 1378-R para *Archaea*, debido a que presentaban un mayor número de bandas (10 bandas bien diferenciadas para cada caso) que las muestras amplificadas con los otros pares de cebadores. Varios autores han realizado el mismo procedimiento de probar varios pares de cebadores de diferentes regiones hipervariables para el gen 16S ribosomal, o bien, la combinación de dos o tres regiones para su amplificación y de esta manera mejorar los resultados de secuenciación, dependiendo de la muestra (Ferris *et al.*, 1996; Röling *et al.*, 2002; Andreoni *et al.*, 2004; Lyautey *et al.*, 2005; Gelsomino *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009). Estos últimos, en sus estudios de comunidades microbianas en arrozales, llegaron a la conclusión de que la amplificación llevada a cabo con diferentes pares de cebadores, ofrecía distintos perfiles de bandas en el gel de DGGE, así como diferentes filotipos al secuenciar, lo cual implica que la PCR es una técnica que introduce sesgos de la comunidad microbiana, y que es importante la elección de los cebadores adecuados dependiendo del tipo de muestra para cada caso.

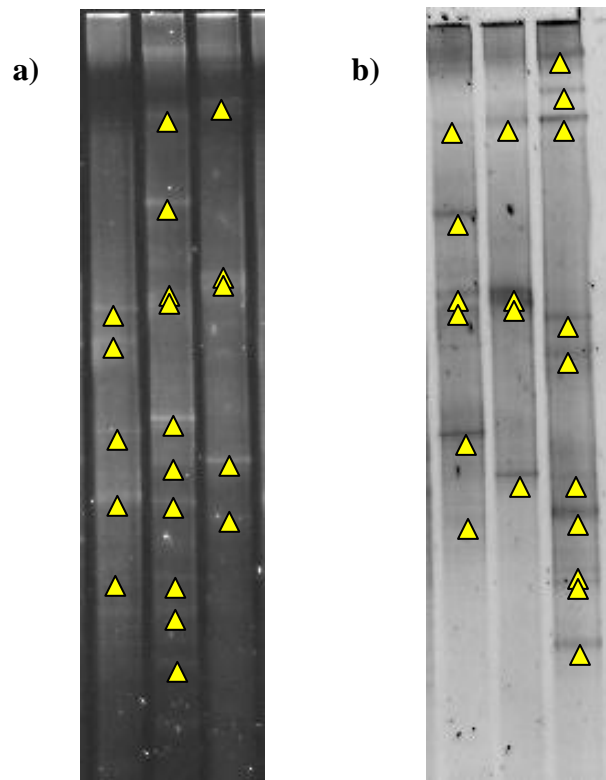


Figura 6.2. a) Gel para *Bacteria*, con cebadores 8f-519-r, 341f-907r y 954f-1369r, de izquierda a derecha respectivamente; b) Gel para *Archaea*, con cebadores 344f-519r, 787f-1059r y 1106f-1378r.

Tabla 6.3. Resultados de amplificación por PCR para *Bacteria* con los cebadores 341f-907r. (L, es la muestra de lodo y M, la muestra de membrana).

Prueba	Muestra	ng/ μ l	260/280	260/230
I.1	L	65	1.8	0.88
I.1	M	54.5	1.87	1.03
I.2	L	60	1.93	1.15
I.2	M	35.25	1.82	0.95
II.A.1	L	45.25	1.92	0.85
II.A.1	M	48.5	1.79	0.71
II.A.2	L	57.75	1.83	0.89
II.A.2	M	63.25	1.92	1.10
II.B.1	L	48	1.99	1.02
II.B.1	M	49.25	1.98	1.08
II.B.2	L	48.5	1.87	0.74
II.B.2	M	55	1.75	0.87

Tabla 6.4. Resultados de amplificación por PCR para *Archaea* con los cebadores 1106f-1378r. (L, es la muestra de lodo y M, la muestra de membrana).

Prueba	Muestra	ng/μl	260/280	260/230
I.1	L	78	1.87	0.79
I.1	M	55	1.92	0.99
I.2	L	49	1.94	0.80
I.2	M	38.75	1.96	0.94
II.A.1	L	47.25	1.89	0.85
II.A.1	M	44.25	1.82	0.99
II.A.2	L	67.5	1.99	1.01
II.A.2	M	57.5	1.88	0.87
II.B.1	L	62	1.89	0.86
II.B.1	M	59.5	1.95	0.92
II.B.2	L	65.25	1.83	0.78
II.B.2	M	60.75	1.89	0.94

Ahora bien, hay que destacar que las condiciones de PCR tuvieron que modificarse para obtener un mejor perfil de bandas para la DGGE: se extendió el tiempo de elongación final hasta 30 minutos para el caso de las amplificaciones que servirían como muestras para la DGGE (no así al momento de reamplificar para la secuenciación), esto con el fin de minimizar el efecto de la formación de dobles bandas (Janse *et al.*, 2004) y sobrestimar el número total de bandas que representan OTUS en cada muestra. Aparentemente la formación de dobles bandas depende de un proceso enzimático que involucra a la Taq polimerasa, y no es simplemente el resultado de cambios conformacionales o la hibridación incorrecta de los cebadores y productos de PCR (amplicones). La explicación que proponen los autores (Janse *et al.*, 2004) es que durante cada ciclo de PCR puede ocurrir la formación de productos secundarios debidos a que la elongación se detiene repentinamente en cada ciclo. Aunque la tasa de elongación es más que suficiente para la Taq polimerasa, la enzima puede estar siendo obstruida por estas estructuras secundarias. Es por esto que ellos proponen extender a 30 minutos, en vez de 5-7 como ocurre normalmente, la temperatura de elongación (72 °C) para permitir que se rompan estas estructuras y que la enzima pueda completar la elongación.

Después de tener los amplificados se procedió a correr las muestras en geles de poliacrilamida al 6% para separar los fragmentos amplificados con base en su contenido de guanina-citosina (GC) en su secuencia específica. Los geles obtenidos para cada muestra en los diferentes tratamientos, tanto para el dominio *Bacteria*, como *Archaea*, se muestran en las figuras 6.3 a 6.6, respectivamente. Cabe mencionar que las muestras de lodo granular para el caso de la filtración intermitente (tratamientos II.A y II.B), fue la misma para las dos condiciones (10-1 y 4-1). Esto debido a la corta duración de las pruebas y que por lo tanto, no se esperaban mayores cambios en la biomasa del biorreactor anaerobio.

De acuerdo a los cebadores elegidos para el estudio de las comunidades microbianas en este trabajo, fue posible identificar hasta un 65% de las bandas escindidas de los geles de poliacrilamida.

BACTERIA

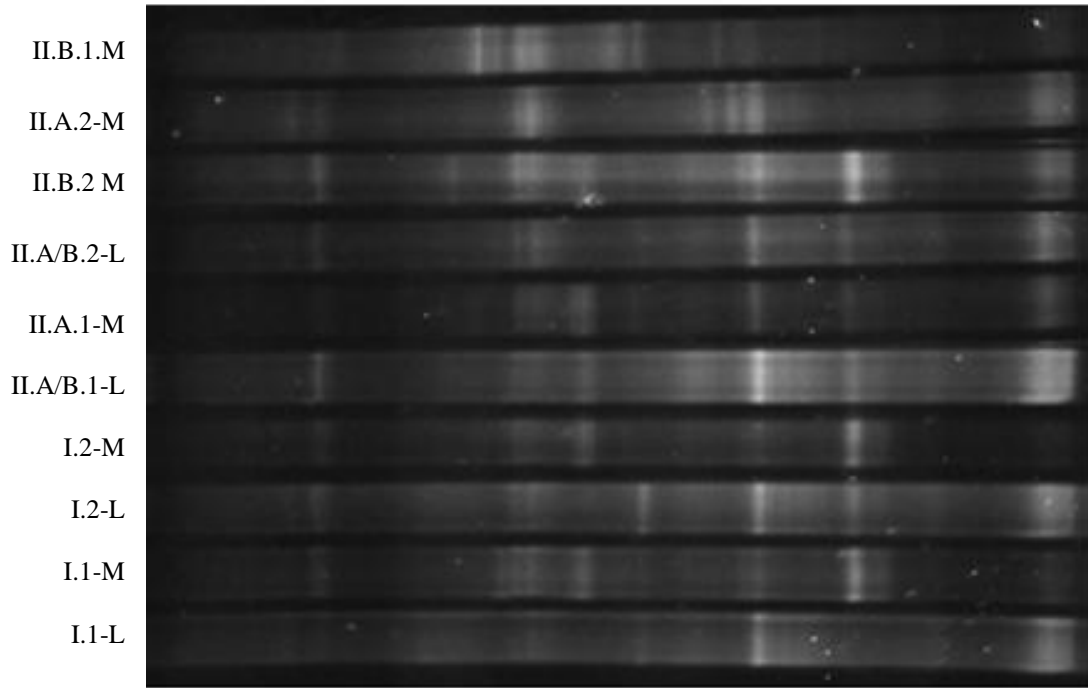


Figura 6.3. Gel de poliacrilamida de las diferentes muestras para *Bacteria*. (L, es la muestra de lodo y M, la muestra de membrana).

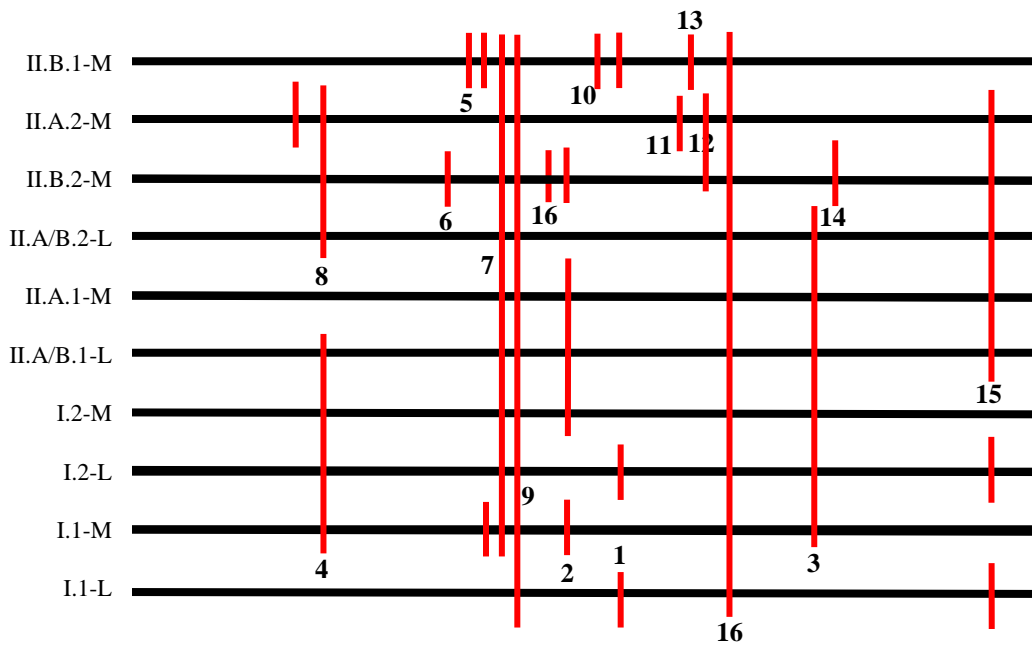


Figura 6.4. Bandas más representativas del patrón de migración obtenido a partir del gel de poliacrilamida anterior (*Bacteria*); las bandas no numeradas no fue posible cortarlas a partir del gel de poliacrilamida. (L, es la muestra de lodo y M, la muestra de membrana).

ARCHAEA

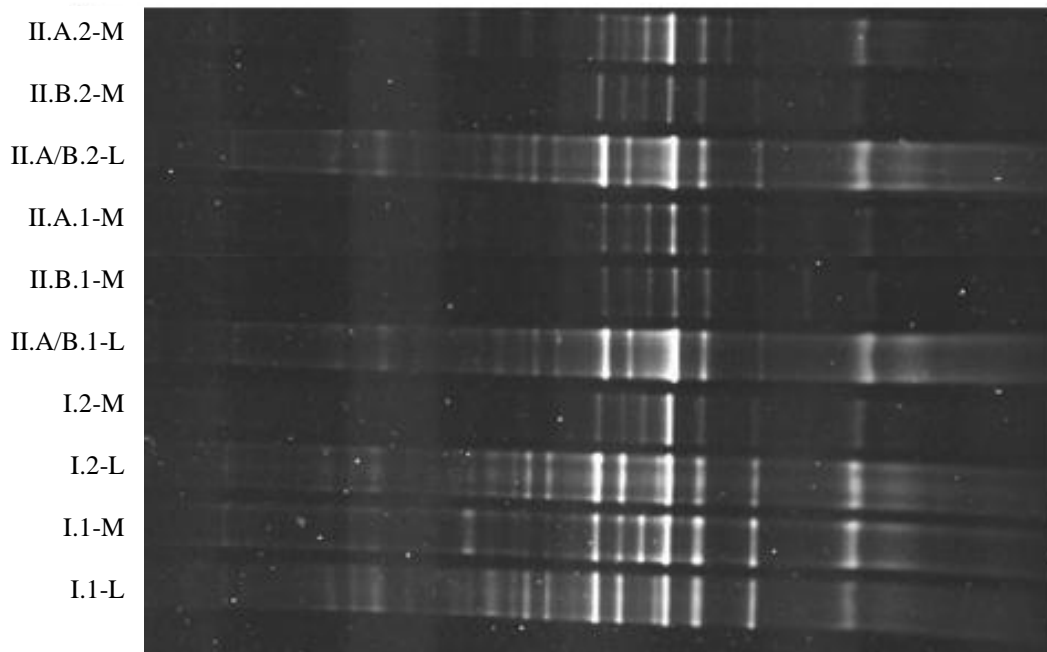


Figura 6.5. Gel de poliacrilamida de las diferentes muestras para *Archaea*. (L, es la muestra de lodo y M, la muestra de membrana).

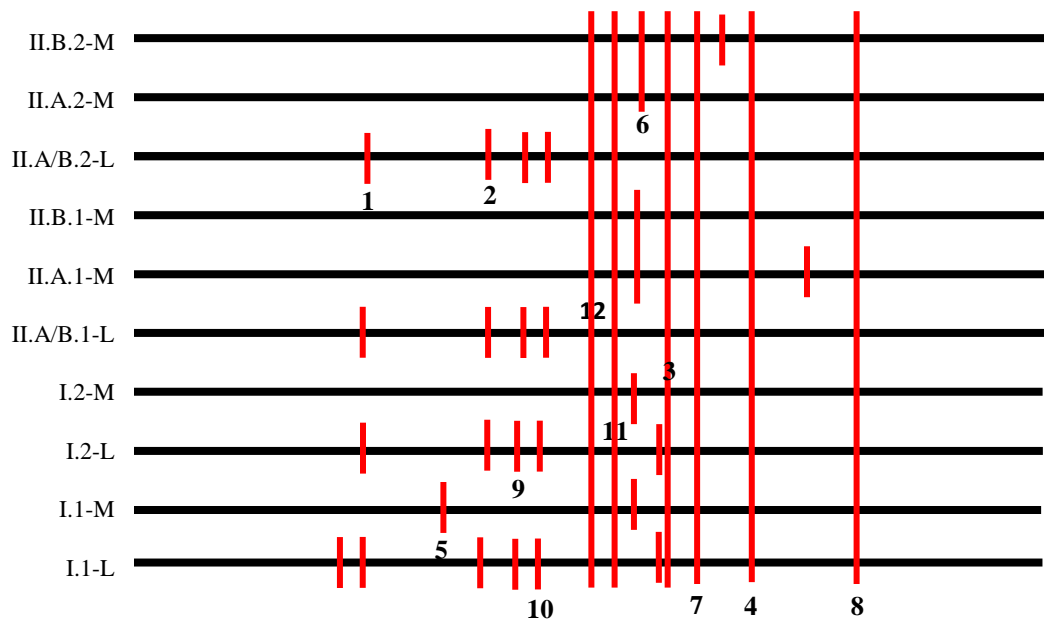


Figura 6.6. Bandas más representativas del patrón de migración obtenido a partir del gel de poliacrilamida anterior (*Archaea*); las bandas no numeradas no fue posible cortarlas a partir del gel de poliacrilamida. (L, es la muestra de lodo y M, la muestra de membrana).

Es importante mencionar que se observó un mayor número de bandas para arqueas, con respecto a las bacterias, contrario a estudios previos (Calderón, 2009), lo que sugiere que aún se pueden mejorar las condiciones de PCR y/o DGGE para favorecer la diferenciación de bandas e incrementar el número de las mismas, para el dominio *Bacteria*.

6.2 Análisis del perfil de bandas en geles de poliacrilamida

Cuando Muyzer *et al.* en 1993 dieron a conocer por primera vez el uso de la técnica de PCR-DGGE para tratar de obtener un método de identificación y diferenciación de los componentes de una comunidad microbiana en muestras ambientales, ellos sugirieron que el patrón de bandas generado podía considerarse como una imagen que representaba a esa comunidad microbiana. Una banda la refirieron a una secuencia “única” de acuerdo a su contenido de guaninas y citosinas, o filotipo (Muyzer *et al.*, 1995; van Hannen *et al.*, 1999). Sin embargo, Kowalchuk *et al.* (1997) comprobaron que algunas secuencias presentan co-migración, es decir, una idéntica movilidad electroforética en el gel. Por otro lado, también se ha demostrado que bacterias muy relacionadas filogenéticamente no necesariamente presentan bandas que co-migren, si no que es posible observar bandas claramente separadas (Jackson *et al.*, 2001). Aún con estas posibles desventajas que presenta, esta técnica de huella molecular es una de las más ampliamente utilizadas para describir los cambios en la microbiota debidos a variaciones en su ambiente, o bien, a la interacción con otros microorganismos (Fromin *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005a; Sanz y Köchling *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009), incluyendo no solo a las comunidades bacterianas, sino también a las arqueas (Rölling *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005b; Calderón *et al.*, 2011) y organismos eucariontes.

El número total de bandas en una muestra puede representar la riqueza de especies y está relacionado con el número de filotipos dominantes (Marzorati *et al.*, 2008), lo cual puede ser usado para establecer comparaciones entre diferentes perfiles (van der Gutch *et al.*, 2001).

A partir de las matrices binarias obtenidas de las imágenes de los geles (tal como se explicó en el apartado 5.2 de la metodología) fue posible calcular los coeficientes de Sørensen-Dice (S_D) y Jaccard (J), considerando la presencia y ausencia de bandas entre los diferentes perfiles (Diez *et al.*, 2001; van der Gutch *et al.*, 2001). Tomando en cuenta los coeficientes de S_D y J, se puede deducir cuáles muestras (lodo o membrana) y tratamientos (filtración continua o filtración intermitente) tienen comunidades microbianas más parecidas, y cuáles son las comunidades que difieren en un mayor grado. Las Tablas 6.5 y 6.6 presentan los resultados de este análisis para *Bacteria* y las Tablas 6.7 y 6.8 para *Archaea*.

Tabla 6.5. Coeficiente S_D a partir del perfil de bandas de las muestras de *Bacteria*. (L, es la muestra de lodo y M, la muestra de membrana).

DICE	I.1-L	I.1-M	I.2-L	I.2-M	II.A/B.1-L	II.A.1-M	II.B.1-M	II.A/B.2-L	II.A.2-M	II.B.2-M
I.1-L	1	0.4	0.7273	0.4	0.5455	0.6	0.6	0.4615	0.5	0.5455
I.1-M		1	0.7692	1	0.9231	0.8333	0.8333	0.6667	0.5714	0.4615
I.2-L			1	0.7692	0.8571	0.7692	0.9231	0.625	0.6667	0.5714
I.2-M				1	0.9231	0.8333	0.8333	0.6667	0.5714	0.4615
II.A/B.1-L					1	0.9231	0.9231	0.75	0.6667	0.4286
II.A.1-M						1	0.8333	0.6667	0.5714	0.4615
II.B.1-M							1	0.6667	0.7143	0.4615
II.A/B.2-L								1	0.5882	0.375
II.A.2-M									1	0.4
II.B.2-M										1

Tabla 6.6. Índice de Jaccard a partir del perfil de bandas de las muestras de *Bacteria*. (L, es la muestra de lodo y M, la muestra de membrana).

JACCARD	I.1-L	I.1-M	I.2-L	I.2-M	II.A/B.1-L	II.A.1-M	II.B.1-M	II.A/B.2-L	II.A.2-M	II.B.2-M
I.1-L	1	0.25	0.5714	0.25	0.375	0.4286	0.4286	0.3	0.3333	0.375
I.1-M		1	0.625	1	0.8571	0.7143	0.7143	0.5	0.4	0.3
I.2-L			1	0.625	0.75	0.625	0.8571	0.4545	0.5	0.4
I.2-M				1	0.8571	0.7143	0.7143	0.5	0.4	0.3
II.A/B.1-L					1	0.8571	0.8571	0.6	0.5	0.2727
II.A.1-M						1	0.7143	0.5	0.4	0.3
II.B.1-M							1	0.5	0.5556	0.3
II.A/B.2-L								1	0.5556	0.2308
II.A.2-M									1	0.25
II.B.2-M										1

La comparación de los patrones de bandas (como los coeficientes S_D y J) para *Bacteria* entre las distintas muestras (lodo granular y biopelícula), fue muy diferente en todos los tratamientos, sobre todo entre los de filtración continua y filtración intermitente (I y II) con valores de S_D desde 0.25 y hasta 0.92, y J desde 0.25 hasta 0.88, con excepción de la comparación entre las muestras I.1-M y I.2-M que alcanzaron la unidad, lo que significa que presentaron un perfil de bandas idéntico. Este es un resultado interesante porque hace suponer que para alcanzar la unidad, las condiciones de crecimiento de los microorganismos sobre la membrana en las pruebas de filtración continua (con TRH de 8 y 4 horas) debieron ser parecidas. Más adelante se discutirán otros índices, desde otro punto de vista, para comprender mejor el efecto que tiene cada cambio en las condiciones de operación de los diferentes tratamientos, sobre las variaciones en las comunidades microbianas.

Para el caso de *Archaea* (tablas 6.7 y 6.8), en las muestras de lodo a partir de los diferentes tratamientos de filtración intermitente con y sin burbujeo de N_2 (IIA/B.1-L y IIA/B.2-L), se llegó a obtener un perfil de bandas idéntico alcanzando el valor máximo de la unidad. Por otro lado, entre las muestras de lodo granular de la filtración continua y la filtración intermitente (I y II) también los valores fueron muy altos, S_D entre 0.90 y 0.95, y J entre 0.83 y 0.91, indicando poca variación en las comunidades de *Archaea* a lo largo del tiempo que duró llevar a cabo todos los tratamientos. Esto confirma que las comunidades de arqueas son estables y más resistentes a los cambios provocados por las condiciones de operación en el reactor anaerobio. Padmasiri *et al.* (2007) encontraron que aunque las condiciones en su reactor experimental cambiaron, la comunidad de *Archaea* no presentó cambios, si se refiere a la “presencia” de géneros, pero que si difirieron en cuanto a la abundancia, es decir, si cambian las condiciones se desarrollarán más unos u otros géneros. También, entre las muestras de biopelícula M en los diferentes tratamientos, de filtración continua y filtración intermitente, se obtuvieron valores elevados de ambos coeficientes (S_D de 0.87-0.93, J de 0.77-0.87). Esto no ocurrió cuando se compararon las comunidades de *Archaea* del lodo (L) *versus* biopelícula (M) (valores de S_D de 0.60-0.70, y de J de 0.42-0.55). Esta diferencia puede deberse a que las condiciones de supervivencia para las arqueas son diferentes en el lodo granular, donde se encuentra la mayor parte del sustrato, que en la biopelícula en donde ocurre una competencia para la obtención de los nutrientes, por lo que las arqueas que presenten la capacidad de adherirse a la membrana y tomar el poco sustrato que resta, pueden no ser las mismas que llevan a cabo la degradación de la materia orgánica en el lodo granular.

Tabla 6.7. Coeficiente S_D a partir del perfil de bandas de las muestras de *Archaea*.
(L, es la muestra de lodo y M, la muestra de membrana).

DICE	I.1-L	I.1-M	I.2-L	I.2-M	II.A/B.1-L	II.A.1-M	II.B.1-M	II.A/B.2-L	II.A.2-M	II.B.2-M
I.1-L	1	0.6	0.9565	0.6316	0.9091	0.6	0.6316	0.9091	0.6316	0.6
I.1-M		1	0.6316	0.9333	0.6667	0.875	0.9333	0.6667	0.9333	0.875
I.2-L			1	0.6667	0.9524	0.6316	0.6667	0.9524	0.6667	0.6316
I.2-M				1	0.7059	0.9333	1	0.7059	1	0.9333
II.A/B.1-L					1	0.6667	0.7059	1	0.7059	0.6667
II.A.1-M						1	0.9333	0.6667	0.9333	0.875
II.B.1-M							1	0.7059	1	0.9333
II.A/B.2-L								1	0.7059	0.6667
II.A.2-M									1	0.9333
II.B.2-M										1

Tabla 6.8. Índice de Jaccard a partir del perfil de bandas de las muestras de *Archaea*.
(L, es la muestra de lodo y M, la muestra de membrana).

JACCARD	I.1-L	I.1-M	I.2-L	I.2-M	II.A/B.1-L	II.A.1-M	II.B.1-M	II.A/B.2-L	II.A.2-M	II.B.2-M
I.1-L	1	0.4286	0.9167	0.4615	0.8333	0.4286	0.4615	0.8333	0.4615	0.4286
I.1-M		1	0.4615	0.875	0.5	0.7778	0.875	0.5	0.875	0.7778
I.2-L			1	0.5	0.9091	0.4615	0.5	0.9091	0.5	0.4615
I.2-M				1	0.5455	0.875	1	0.5455	1	0.875
II.A/B.1-L					1	0.5	0.5455	1	0.5455	0.5
II.A.1-M						1	0.875	0.5	0.875	0.7778
II.B.1-M							1	0.5455	1	0.875
II.A/B.2-L								1	0.75	0.5
II.A.2-M									1	0.875
II.B.2-M										1

De acuerdo con Marzorati *et al.* (2008) pueden calcularse otros índices como son el índice ponderado de riqueza (Rr) y el índice de funcionalidad (Fo) ya definidos en el capítulo anterior. Los valores encontrados para *Bacteria* y *Archaea*, se muestran a continuación en la tabla 6.9. Los resultados de los cálculos se muestran en el Anexo 2.

Tabla 6.9. Índices de Rr y Fo para todos los tratamientos.
(L, es la muestra de lodo y M, la muestra de membrana).

Tratamientos	Rr		Fo	
	<i>Archaea</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>Bacteria</i>
I.1-L	51.14	19.6	63	56
I.1-M	4.94	29.16	64	48
I.2-L	36.27	14.29	61	52
I.2-M	2.86	27.88	58	53
II.A/B.1-L	31.87	18.67	55	50
II.A.1-M	2.86	18.67	61	48
II.B.1-M	3.73	18.96	63	59
II.A/B.2-L	36.27	14.29	56	50
II.A.2-M	2.86	24.81	66	52
II.B.2-M	4.72	35.29	53	51

En la figura 6.7 se muestra gráficamente los resultados para el índice de Riqueza ponderado Rr para llevar a cabo una mejor comparación entre los tratamientos para *Bacteria* y *Archaea*, y más adelante en la figura 6.9 para el índice de funcionalidad. Es interesante notar que el índice Rr es más alto para *Archaea* en las muestras de lodo, y de manera similar para *Bacteria* en las muestras de membrana.

Es bien sabido, que la digestión anaerobia, sobre todo en su etapa final (metanogénesis), está regida por la acción de las arqueas metanogénicas. Esta acción se lleva a cabo en su mayoría en la biomasa del lodo granular, que se encuentra bajo condiciones de anaerobiosis y con el sustrato más rico en nutrientes (entrada de agua residual sintética en la parte inferior del reactor, donde se encuentra el lodo granular). Por eso es de suponerse que la mayor diversidad de arqueas se encuentre en el lodo, mientras que aquellas pocas especies de arqueas conducidas por el flujo de agua hacia la parte superior del reactor y capaces de sobrevivir en la biopelícula bajo condiciones de limitación de sustratos, sean aquellas que se encuentran en las muestras de membrana.

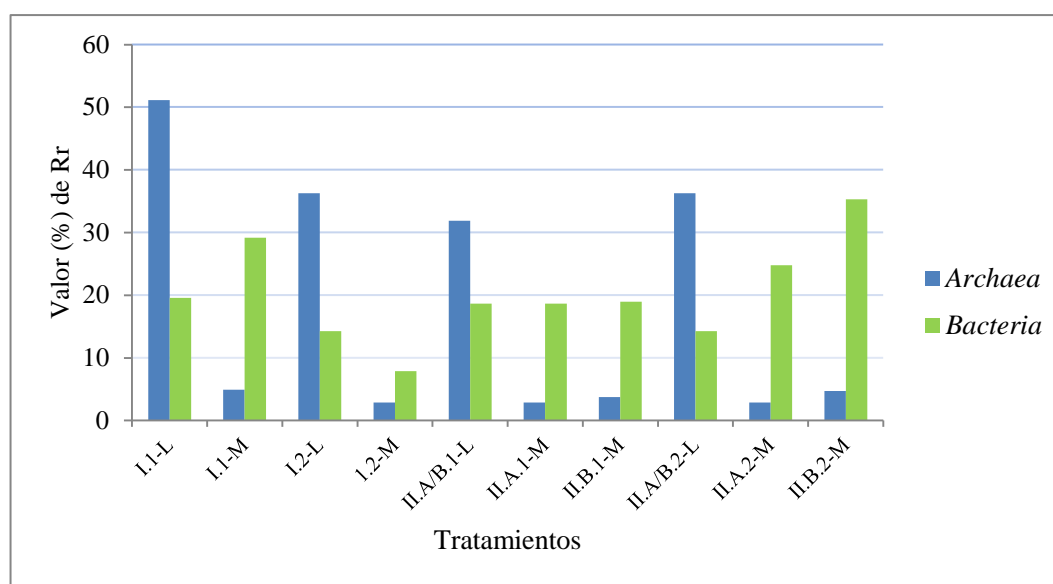


Figura 6.7. Índice ponderado de riqueza (Rr) para todos los tratamientos.

Las bacterias, en cambio, tienen una mayor capacidad de adaptación ante los cambios provocados en su ambiente debido a su baja especialización en el consumo de sustratos (Shen *et al.*, 2010). Así, está reportado que algunas especies de bacterias son capaces de crecer en un soporte y formar una biopelícula para sobrevivir a condiciones adversas en el medio, como lo sería la fuerza tangencial de la filtración en el reactor BRAMS (Percival *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2006b; Gao *et al.*, 2011). Algunas de estas especies pueden secretar sustancias poliméricas extracelulares que permiten el establecimiento de una matriz en la cual están embebidas las células de la biopelícula.

Gao *et al.* (2011) estudiaron las diferencias relativas en la abundancia de especies presentes tanto en un lodo anaerobio, como aquellas que se desarrollaron en la capa taponante. Encontraron que algunas especies a pesar de su abundancia, determinada mediante técnicas como FISH, T-RFLP, ARDRA, en el lodo anaerobio, no aparecían en la biopelícula de la membrana, y por otro lado, algunas especies bacterianas aparecían con mayor abundancia sobre la membrana. Después de llevar a cabo los análisis de clonación-secuenciación encontraron que estas bacterias, *Desferribacteres*, tienen la capacidad de formar biopelículas bajo el efecto de la fuerza tangencial provocada durante la filtración por efecto del flujo del influente.

Al modificar el TRH de 8 a 4 horas, se incrementó el flujo del influente, y esto ocasionó que la velocidad ascendente del agua de entrada fuera mayor, provocando el arrastre de partículas y una mayor presencia de coloides y sólidos suspendidos en el efluente, los cuales se adherían más fácilmente a la membrana, induciendo un taponamiento mucho más rápido y que el permeado también tuviera una alta concentración de los mismos. En la siguiente figura se muestra una comparación entre las membranas taponadas para los tratamientos de filtración continua a los diferentes tiempos de retención hidráulicos. Se observa una textura más rugosa en el segundo caso, posiblemente como resultado de la acumulación de los pequeños flóculos lavados de la cama de lodos debido a la mayor velocidad ascendente para esa condición de operación.

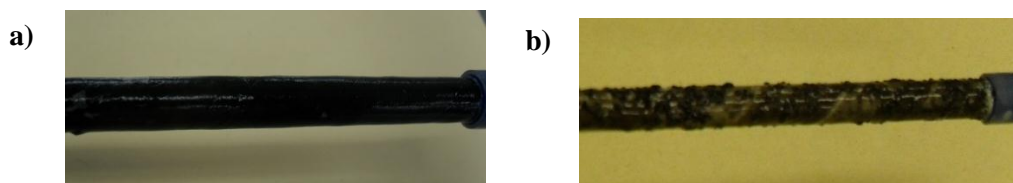


Figura 6.8. a) Membrana taponada para el tratamiento I.1 (Filtración continua, TRH de 8 horas). b) Membrana taponada para el tratamiento I.2 (Filtración continua, TRH de 4 horas).

Esta influencia de un TRH menor (tratamiento I.2-M), se observó claramente en el índice R_r de la muestra de la biopelícula de la membrana. Esta muestra mostró los menores valores de R_r para bacterias y arqueas. En este caso, el taponamiento seguramente no fue por la formación de una biopelícula estable, sino más bien, por el taponamiento ocasionado por estos flóculos pequeños, y sustancias orgánicas (carbohidratos y proteínas) e inorgánicas (sales) provenientes del efluente (Le-Clech *et al.*, 2005). Es importante señalar que además de la biopelícula, las sustancias orgánicas e inorgánicas (cristales), encontradas con la microscopía electrónica y espectroscopía dispersiva de rayos X, permiten identificar otros factores del taponamiento para un sistema BRAMS alimentado con agua residual municipal sintética (Gao *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011a), resultados presentados más adelante.

Los estudios de Menniti *et al.* (2009) señalan que una mayor fuerza tangencial provocada por una mayor velocidad ascendente del flujo de agua de entrada sobre la membrana, puede ocasionar que los pocos microorganismos que consigan adherirse a esa superficie secreten una gran cantidad de sustancias poliméricas extracelulares que taponen más rápidamente la membrana, aprovechando el sustrato disponible del efluente, o bien, a partir de la lisis celular de otros microorganismos sobre la membrana. Esto coincide con lo encontrado por Verhoef *et al.* (2002) y Zhang *et al.* (2006b). Existen investigaciones previas acerca de la diferencia en el efecto del taponamiento de flóculos grandes y los que son de menor tamaño. Según Lin *et al.* (2011b), quienes estudiaron la influencia del tamaño de los flóculos formados bajo diferentes condiciones en un BRAMS, los flóculos más pequeños tienen una estructura más densa, con una mayor cantidad de SPE, así como una microbiota diferente en comparación con los flóculos de mayor tamaño, aunque ambas microbiotas pueden estar presentes en el inóculo del reactor. Además, los estudios realizados por Xuan *et al.* en 2010 en un reactor aerobio, coinciden en que el contenido de SPE es mucho mayor en los flóculos de menor tamaño. Herrera-Robledo *et al.* (2011) encontraron que aquellas SPE con menor tamaño que el poro, son capaces de incrementar el taponamiento, debido a que puede ser absorbido por la superficie de la membrana y también ocasionar un taponamiento interno de los poros.

Por otro lado, el burbujeo de nitrógeno tuvo un efecto de fuerza de corte sobre las comunidades microbianas en las muestras de biopelícula de los tratamientos II.A.1 y II.B.1 (solo se modificó la

frecuencia del burbujeo). Las muestras a partir de membranas de la filtración intermitente con burbujeo de nitrógeno, independientemente de los tiempos de filtración/relajación (10-1 y 4-1), mostraron valores de Rr muy parecidos entre sí, y notablemente más bajos, en cuanto a bacterias, que sus similares sin burbujeo de nitrógeno (II.A.2, II.B.2). Acerca de la duración de las pruebas, aquellas que se llevaron a cabo con el burbujeo de N₂, duraron un tiempo mucho mayor, 8.7 y 17 días (10-1 y 4-1 respectivamente) que sus similares, de 1.3 y 3.2 días (10-1 y 4-1 respectivamente) pero sin esta estrategia de control del taponamiento. Huang *et al.* (2008) describieron el efecto del burbujeo argumentando que éste ocasiona una fuerza de corte sobre lo que se encuentra adherido a la membrana, especialmente si se lleva a cabo durante una fase de relajación. Cerón-Vivas *et al.* (2012) encontraron que la condición de filtración intermitente con burbujeo de nitrógeno durante el período de relajación, además favorece el control del taponamiento debido a que induce un mezclado interno en el reactor que causa una reducción en la concentración de carbohidratos en el efluente, ya que favorece la interacción de estas macromoléculas con la biomasa y así, su degradación biológica.

Para el caso del índice de funcionalidad Fo, la comparación entre los tratamientos y muestras es la que se encuentra a continuación en la figura 6.9.

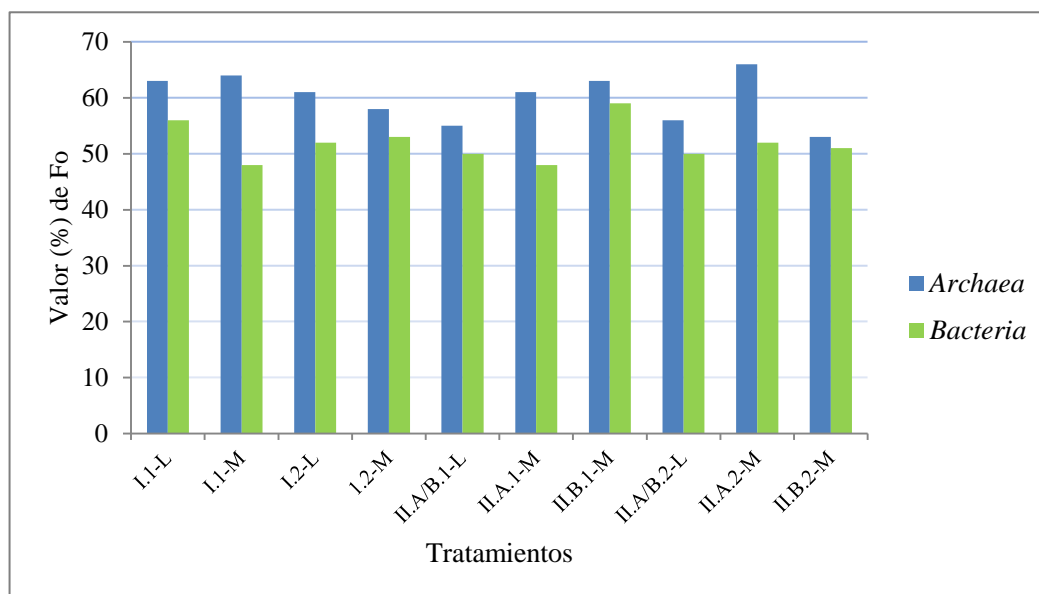


Figura 6.9. Índice de funcionalidad (Fo) para todos los tratamientos. (L, es la muestra de lodo y M, la muestra de membrana).

Como se explicó anteriormente, Marzorati *et al.* (2008) introdujeron la curva de la ley de Pareto utilizada en estudios económicos y aplicada a poblaciones humanas, para compararlas con las comunidades microbianas en muestras ambientales. Estos investigadores afirman que, de igual manera que en las sociedades humanas, cuando el capital y los recursos están distribuidos en una pequeña parte de la población, este índice de funcionalidad es más alto, y nos indica una comunidad altamente especializada. En la figura 6.9 se observa claramente que a diferencia del índice Rr, los valores de Fo son muy parecidos en todos los tratamientos, y también que los valores para bacteria son menores en comparación con los de las arqueas.

Purswani *et al.* (2011) describieron el parámetro Fo, como el índice que representa la especificidad de una comunidad microbiana y su capacidad de adaptación a cambios externos. Es por eso que no

sorprende encontrar valores de Fo por encima del 50 y 60% tanto para bacterias como arqueas, puesto que las funciones de degradación están bien establecidas para la supervivencia de las comunidades microbianas anaerobias, aún a pesar de los cambios de operación en el reactor, e inclusive, de la localización del microambiente (muestra de lodo granular o bien de biopelícula en la membrana). Esto permitiría suponer además, que en la biopelícula de la membrana, existe actividad biológica relacionada con el consumo de sustrato y también la producción de sustancias poliméricas, que permitieron la supervivencia de los microorganismos sobre la superficie de la membrana. Esto es posible suponerlo con base en que la remoción de materia representada como DQO soluble, aumenta del efluente al permeado (datos en el Anexo 3), indicando que en el paso del agua a través de la biopelícula pudo ocurrir la remoción de esta materia soluble, o bien, su retención en la misma biopelícula.

6.3 Análisis de secuencias

Además del análisis del perfil de bandas de la DGGE, se realizó la secuenciación de algunas bandas de los geles de poliacrilamida (numeradas en las figuras 6.3 a 6.6). La Tabla 6.10 presenta los resultados para el dominio *Bacteria*.

Tabla 6.10. Resultados de secuenciación y búsqueda en el GenBank, para las bandas escindidas del gel de *Bacteria*; todos los tratamientos (Figuras 6.3 y 6.4).

No.de Banda	No. de acceso en GenBank	Microorganismo	% de Identidad	Evalue	Referencia
01	CP002967.1	<i>Escherichia coli</i>	100	1e-178	Turner <i>et al.</i> , 2012
02	JN641635	<i>Chlorobi</i>	94	1e-143	Yu <i>et al.</i> , 2012
03	<i>No fue posible su identificación</i>				
04	JF505984	<i>Trichococcus flocculiformis</i>	100	1e-178	Chun <i>et al.</i> , 2011 No publicado
05	HQ008126	Bacteria no cultivable, relacionada a <i>Trichococcus sp.</i>	100	1e-178	Hughes <i>et al.</i> , 2012
06	AM690805	<i>Chlorobium limicola</i>	100	6e-177	Kumar <i>et al.</i> , 2007. No publicado
07	GU356292	<i>Trichococcus sp. no cultivable</i>	100	6e-167	Vande Walle <i>et al.</i> , 2009
08	<i>No fue posible su identificación</i>				
09	GU356098	<i>Trichococcus sp. no cultivable</i>	97	1e-164	Vande Walle <i>et al.</i> , 2009
10	<i>No fue posible su identificación</i>				
11	CU917799	<i>Chloroflexi no cultivable</i>	98	3e-170	Riviere <i>et al.</i> , 2009
12 y 13	<i>No fue posible su identificación</i>				
14	M88719	<i>Leptonema illini</i>	100	2e-177	Woese <i>et al.</i> , 1990
15	JN641635	<i>Escherichia coli</i>	99	2e-176	Turner <i>et al.</i> , 2012
16	AB447751	Bacteria no cultivable, relacionada con <i>Cytophagales</i>	99	1e-173	Tsushima <i>et al.</i> , 2010

A continuación se muestra el árbol consenso obtenido a partir del análisis *bootstrap* (2000 repeticiones) para las muestras de *Bacteria*.

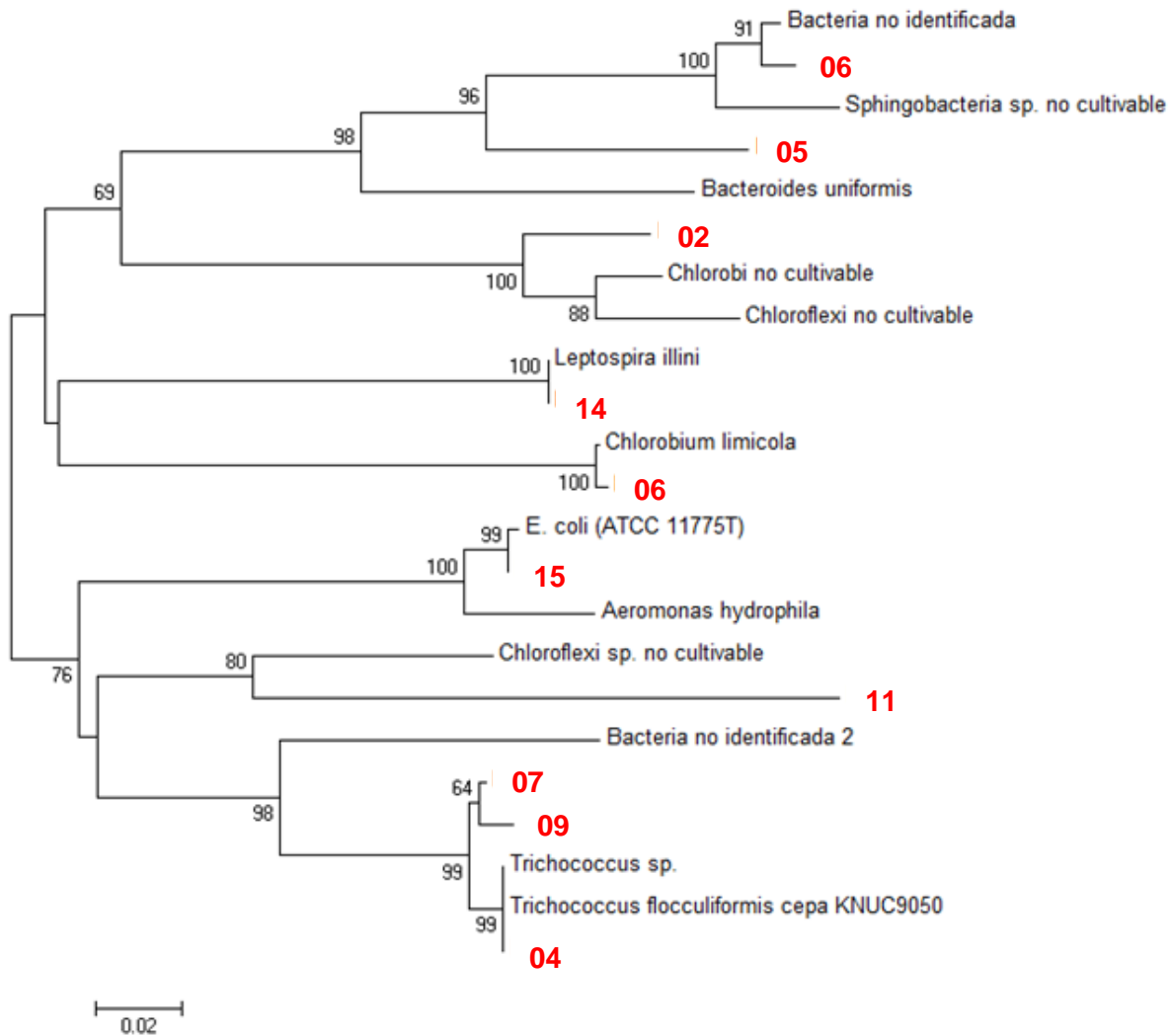


Figura 6.10. Árbol filogenético obtenido con el análisis de secuencias de *Bacteria*, con el programa MEGA5.

Nota. Los modelos con valores más bajos de criterio de información Bayesiano (BIC por sus siglas en inglés) son los que describieron un mejor patrón de sustitución. Para cada modelo, se evaluó el valor del criterio de información Akaike corregido, (AICc por sus siglas en inglés), el valor de *Maximum likelihood* (lnL), y los parámetros como el ancho de cada rama. Se utilizó el parámetro de discreción Gamma con un valor de 5. Para estimar los valores de ML, se llevó a cabo la construcción del anterior árbol filogenético, a través del programa MEGA5, utilizando el modelo Kimura-2 parámetros + parámetro de distribución Gamma.

La comparación con la base de datos del GenBank coincide con la relación obtenida por los análisis filogenéticos y la construcción del árbol con 2000 repeticiones de *bootstrap*.

De acuerdo con las figuras 6.3 y 6.4, la banda marcada como 01 apareció solamente en las muestras del lodo granular en los tratamientos de filtración continua (I.1 y I.2). Esta banda fue identificada como *Escherichia coli*, y su presencia no fue detectada en los tratamientos posteriores. Así mismo, la banda 15 que también fue identificada como *Escherichia coli* apareció en los demás tratamientos, tanto en las muestras de lodo granular como de biopelícula. Algunos microorganismos que fueron detectados únicamente en las muestras de biopelícula fueron: 05 (bacteria no cultivable), 10 (no identificado), 11 (*Chloroflexi*), 12 (no identificado), 13 (no identificado) y 14 (*Leptonema illini*), los cuáles se discuten más adelante.

Las bandas 04, 07, 09 y 16 se encontraban en la gran mayoría de las muestras (tanto en lodo granular como en biopelícula), de distintos tratamientos. *Trichococcus sp.* es un microorganismo filamentosos, que está presente en las plantas de tratamiento de lodos activados (Scheff *et al.*, 1984). El hecho de tener filamentos les permite fácilmente adaptarse a las condiciones de formación de biopelículas, como ocurrió en todos los casos (siempre hubo formación de biopelícula). Este género de bacterias es capaz de vivir bajo condiciones anóxicas (Scheff *et al.*, 1984) y anaerobias (Lee *et al.*, 2008), en las cuáles llega a producir formato, acetato e incluso etanol. Además, en otros estudios, estos microorganismos fueron encontrados en condiciones psicrófilas en muestras de leche almacenadas a 4 y 8 °C, que habían sido sometidas a un pretratamiento con burbujeo de CO₂ (Rasolofa *et al.*, 2010).

Es interesante notar, que algunos de los microorganismos hallados (*Chlorobi* y *Leptonema illini*) en las muestras 02 y 14, aparecen reportados como organismos capaces de vivir en temperaturas psicrófilas (Yu *et al.*, 2012). Esto tiene sentido si se toma en cuenta que las pruebas se realizaron en un rango de temperaturas de 18-25°C que son bajas si se considera que la temperatura óptima de los procesos anaerobios mesófilos es de (37°C). Es probable que la presencia de estos microorganismos únicamente en la biopelícula se deba a su abundancia en esta matriz, considerando que al llevar a cabo los experimentos con agua residual sintética, toda la microbiota proviene de la biomasa presente en el reactor. Sin embargo, la matriz tan compleja que constituye los gránulos anaerobios, debieron impedir la reproducción de estos microorganismos en los gránulos y así presentar una mayor abundancia en la membrana que permitiera amplificarlo a partir de su muestra.

De los microorganismos encontrados en este trabajo, uno muy importante para los biorreactores de membrana es *Chloroflexi* (encontrado en las muestras de 02 y 11), que incluye microorganismos aerobios facultativos (filamentosos) y ha sido reportado numerosamente en biorreactores tratando agua residual municipal (Sekiguchi *et al.*, 2001; Kindaichi *et al.*, 2004; Miura *et al.*, 2007c; Xia *et al.*, 2010). Miura *et al.* (2007c) realizaron un trabajo acerca del papel de este microorganismo en el desempeño de un biorreactor aerobio-anóxico de membranas tratando agua residual municipal. Ellos operaron un biorreactor escala piloto durante tres meses y observaron un fenómeno interesante, que cuando la población de *Chloroflexi* disminuyó de un 30 a un 10% del total del dominio *Bacteria*, la concentración de carbohidratos en el BRM aumentó ocasionando que el taponamiento fuera más rápido. El decremento en la población de *Chloroflexi* lo atribuyen a un descenso en el pH, ocasionado por un aumento en la temperatura que propició una mayor actividad en los procesos de nitrificación en el reactor. Finalmente, después de caracterizar la microbiota de *Chloroflexi*, encontraron que estos microorganismos eran del sub-*phylum* 1, poco estudiado, pero que se ha demostrado que sus representantes son capaces de degradar fácilmente los productos microbianos solubles en efluentes bajo condiciones anóxicas, como parte de un pretratamiento (Ng *et al.*, 2006). Algunos autores más sugieren que *Chloroflexi* está involucrada en la degradación de productos microbianos solubles derivados principalmente de la muerte celular en la biomasa de los reactores (Okabe *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2006).

A pesar de que las bandas 05 y 16 en la base de datos aparecieron relacionados con microorganismos no identificados y no cultivables, la construcción del árbol permitió relacionarlos con *Sphingomonas*. Este grupo de microorganismos aparece en las librerías de clonas y otros estudios de biopelículas en BRM (Calderón *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2008; Ivnitsky *et al.*, 2007). También, Koskinen *et al.* (2000) reportaron la presencia de *Sphingomonas* como el principal organismo involucrado en el taponamiento de membranas para la filtración de agua potable. Además, la secuencia de la banda 16 fue encontrada en los gránulos de un reactor anaerobio experimental en condiciones muy similares a las reportadas en este trabajo, utilizando agua residual de baja carga, operado a bajas temperaturas (Tsushima *et al.*, 2010).

Por otro lado, a continuación en la tabla 6.11, se presentan los resultados de secuenciación e identificación de las bandas para el dominio *Archaea*.

Tabla 6.11. Resultados de secuenciación para las bandas escindidas del gel de *Archaea*, todos los tratamientos (Figura 6.5 y 6.6).

No.de Banda	No. de acceso al GenBank	Microorganismo	% de Identidad	eValue	Referencia
01	AB542742.1	<i>Methanobacterium petrolearium</i>	97	1e-174	Mori <i>et al.</i> , 2010
02	AY552778.3	<i>Methanobacterium beijingense</i>	99	1e-177	Ma <i>et al.</i> , 2005
03	AY552778.3	<i>Methanobacterium beijingense</i>	99	4e-164	Ma <i>et al.</i> , 2005
04	<i>No fue posible su identificación</i>				
05	AB542743.1	<i>Methanobacterium ferruginis</i>	99	1e-177	Mori y Harayama 2011
06	<i>No fue posible su identificación</i>				
07	AB679168.1	<i>Methanosaeta concili</i>	100	1e-177	Mori <i>et al.</i> , 2012
08	<i>No fue posible su identificación</i>				
09	AB679168.1	<i>Methanosaeta concili</i>	100	1e-173	Mori <i>et al.</i> , 2012
10	HQ065268	<i>Methanolinea sp. no cultivable</i>	97	1e-173	Ramos-Padrón <i>et al.</i> , 2010
11	<i>No fue posible su identificación</i>				
12	AY552778.3	<i>Methanobacterium beijingense</i>	99	4e-164	Ma <i>et al.</i> , 2005

De la misma forma que para el caso de *Bacteria*, se construyó el árbol filogenético para las muestras de arqueas, utilizando 2000 repeticiones como valor de *bootstrap* (Figura 6.11).

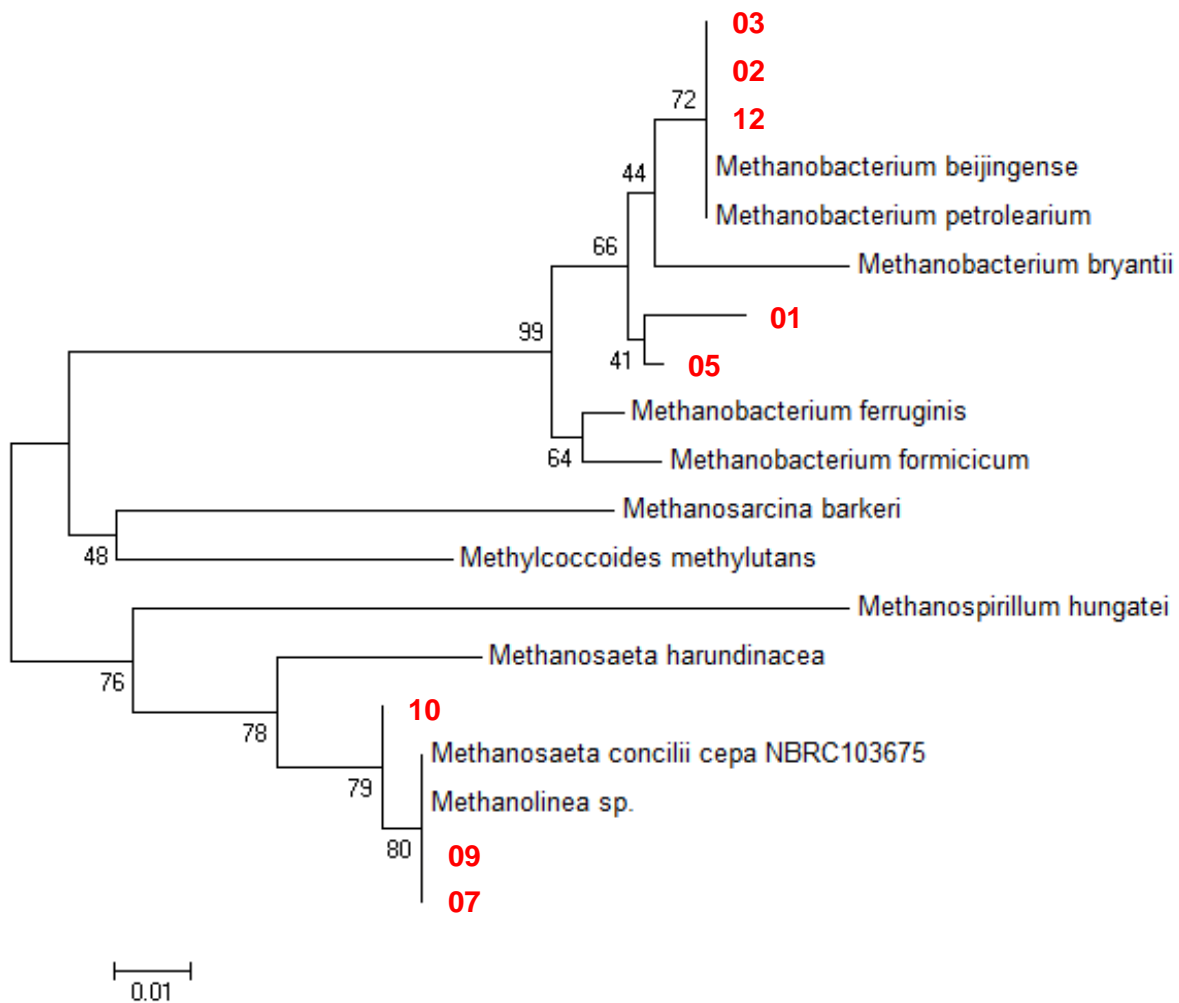


Figura 6.11. Árbol filogenético obtenido con el análisis de secuencias de *Archaea*, con el programa MEGA5.

Nota. Los modelos con valores más bajos de criterio de información Bayesiano (BIC por sus siglas en inglés) son los que describieron un mejor patrón de sustitución. Para cada modelo, se evaluó el valor del criterio de información Akaike corregido, (AICc por sus siglas en inglés), el valor de *Maximum likelihood* (lnL), y los parámetros como el ancho de cada rama. Se utilizó el parámetro de discreción Gamma con un valor de 8. Para estimar los valores de ML, se llevó a cabo la construcción del anterior árbol filogenético, a través del programa MEGA5, utilizando el modelo Kimura-2 parámetros + parámetro de distribución Gamma.

La comparación con la base de datos del GenBank coincide con la relación obtenida por los análisis filogenéticos y la construcción del árbol con 2000 repeticiones de *bootstrap*.

Puede observarse, tanto por las secuencias encontradas a partir de la base de datos de la NCBI, como la construcción del árbol consenso con el programa MEGA5, que las arqueas pertenecen a un *phylum* únicamente: *Euryarchaeota*. De este *phylum*, las muestras se agrupan en el orden de las *Methanobacteriales*, y también de las *Methanosarcinales*, coincidiendo con lo reportado por Padmasiri *et al.* (2007) y Giménez *et al.* (2011). Por su parte, Padmasiri *et al.*, encontraron cinco diferentes poblaciones de arqueas pertenecientes únicamente a tres órdenes: *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales* y *Methanosarcinales*.

Methanosaeta sp. tiene una gran afinidad por el acetato (por ejemplo, es capaz de crecer en condiciones donde las concentraciones de acetato sean muy bajas), y se encuentra fácilmente en la biomasa de los reactores anaerobios. Tomando en cuenta que durante este trabajo, la carga orgánica que se manejó era baja, y además se trataba de un agua residual sintética que contenía acetato en su composición, es normal que este grupo de arqueas aparezca en todas las muestras de lodo (09 y 10), e incluso que la banda 07 se encuentre en todas las muestras, tanto de lodo granular como de la biopelícula, en donde la concentración de sustrato es todavía más baja. Además, estas arqueas han sido reportadas en los procesos de granulación de lodo anaerobio (Zhang *et al.*, 2006b).

La banda 10 según la base de datos aparecía relacionada con *Methanolinea sp.* y en la construcción del árbol aparece relacionado también con las muestras 07 y 09. Este organismo ya ha sido reportado en estudios previos de biorreactores anaerobios que trabajan a bajas temperaturas (<18°C), que coincide con este trabajo, que como ya fue mencionado, se llevó a cabo a intervalos de temperaturas relativamente bajas (18-25°C) para los procesos anaerobios (Zhang *et al.*, 2011).

El grupo de *Methanobacterias* involucra a microorganismos metanogénicos capaces de utilizar el hidrógeno disuelto para la conversión de metano y aparece en las muestras de 01, 02, 03 y 12. Padmisiri *et al.* (2007) señala que estas arqueas en los sistemas anaerobios parecen competir con las del orden de *Methanomicrobiales*, dependiendo de los sustratos en el efluente para la conversión de metano.

Zhang *et al.* (2011) y algunos estudios previos (Schnürer *et al.*, 1999) reportan que cuando las arqueas metanogénicas acetoclásticas (*Methanosaeta sp.*) aparecen como el grupo dominante de metanógenas, significa que la metanogénesis vía acetato es la principal ruta de producción de metano en un biorreactor anaerobio, y que durante períodos de estrés o perturbación de la operación del reactor, como son bajas temperaturas, la actividad metanogénica hidrogenotrófica (*Methanobacteria sp.*) se eleva. Esto resulta por la acción de las arqueas metanogénicas acetoclásticas y la subsecuente oxidación del acetato a CO₂ y H₂, que provee las condiciones favorables para la participación de las arqueas que reducen el CO₂ a metano. Esto coincide con los dos principales grupos de arqueas encontrados en nuestro estudio, y que la biomasa del lodo granular se vio sometida a condiciones de bajas temperaturas y la fuerza tangencial del flujo de agua de entrada y el burbujeo de nitrógeno (para las muestras en la biopelícula).

Una tesis previa en este grupo de investigación (Calderón, 2009) reportó la presencia principalmente de especies pertenecientes a *Methanosarcinales* y *Methanospirilliaceae* involucradas en la operación de un biorreactor anaerobio escala piloto (con un módulo de membrana externa), así como también en la secreción de sustancias poliméricas extracelulares. Algo interesante de esta investigación fue que se comprobó que el uso de diferentes cebadores para llevar a cabo la amplificación de una región específica del gen 16S, puede dar a su vez, diferentes resultados en cuanto a los microorganismos encontrados, también reportado en otros trabajos (Yu y Morrison, 2004; Yu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009). En ese caso, al cambiar los cebadores que amplificaban la región V6 para arqueas, por los cebadores para la región V3, apareció en las bandas secuenciadas e identificadas, el grupo de *Methanocalculus*.

6.4 Imágenes del microscopio electrónico de barrido

En las imágenes de la membrana obtenidas por microscopía electrónica de barrido, se encontró la presencia de microorganismos formando parte de la capa taponante. Como se observa en la Figura 6.12, el burbujeo de nitrógeno tuvo un efecto visible sobre la biopelícula, generando una capa mucho más compacta sobre la membrana. Es indiscutible la presencia de una gran variedad de microorganismos, los cuales componían el elemento más abundante en la biopelícula.

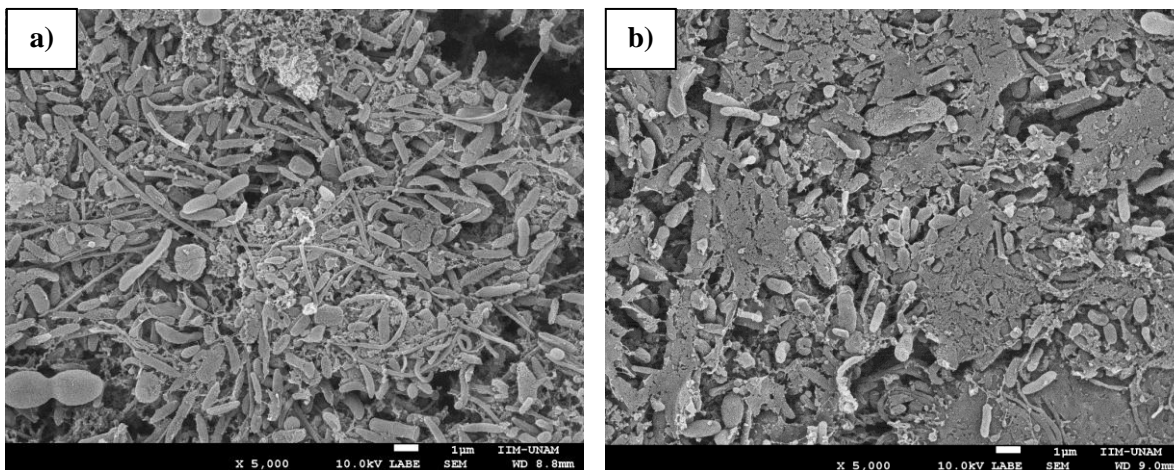


Figura 6.12. Micrografías: a) Filtración continua. b) Filtración intermitente con burbujeo de N₂.

En la micrografía de la Figura 6.13 se observa la biopelícula fraccionada, y en el fondo, la superficie de la membrana, lo cual permite ver el tamaño de poro, con respecto al tamaño de los componentes de la capa taponante. No es posible determinar si la fragmentación de la biopelícula es un efecto natural en la formación y operación de la misma, o se debió al proceso de preparación de las muestras para la microscopía: la deshidratación con etanol y el secado a punto crítico.

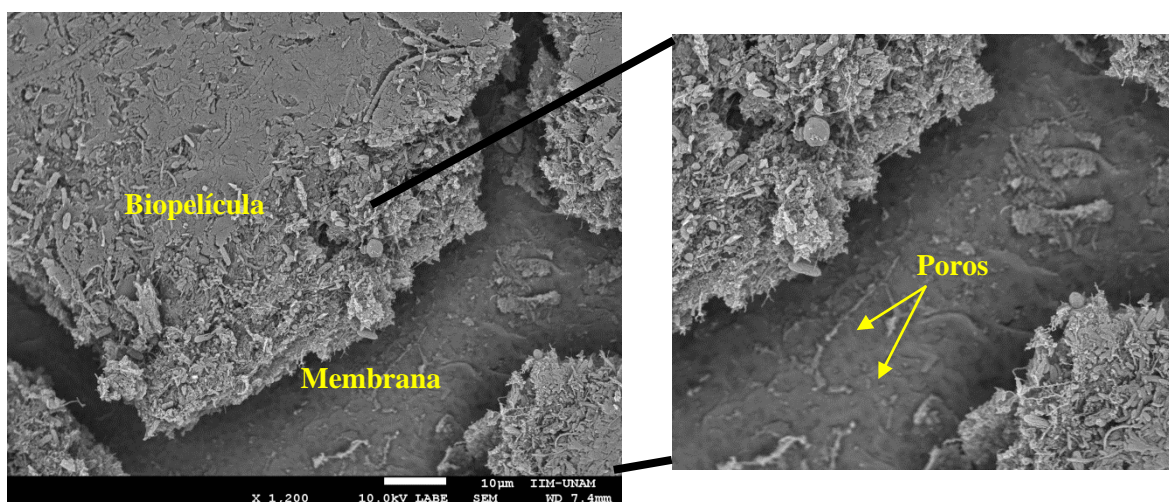


Figura 6.13. Micrografía 1200X: biopelícula y membrana.

Debido a los microorganismos presentes, también fue posible observar las redes de las sustancias poliméricas extracelulares (carbohidratos y proteínas) que constituían, junto con los microorganismos, la matriz de la capa taponante (Figura 6.14). Estas SPE podían provenir de

material extracelular secretado por los microorganismos, o bien, de restos celulares (debris). Aunque es clara la presencia de microorganismos y SPE no es posible confirmar con certeza a partir de las micrografías, que la formación de la biopelícula se debió a la colonización, o al efecto de arrastre de las partículas y los microorganismos hacia la membrana, o bien, por el efecto combinado de ambos procesos.

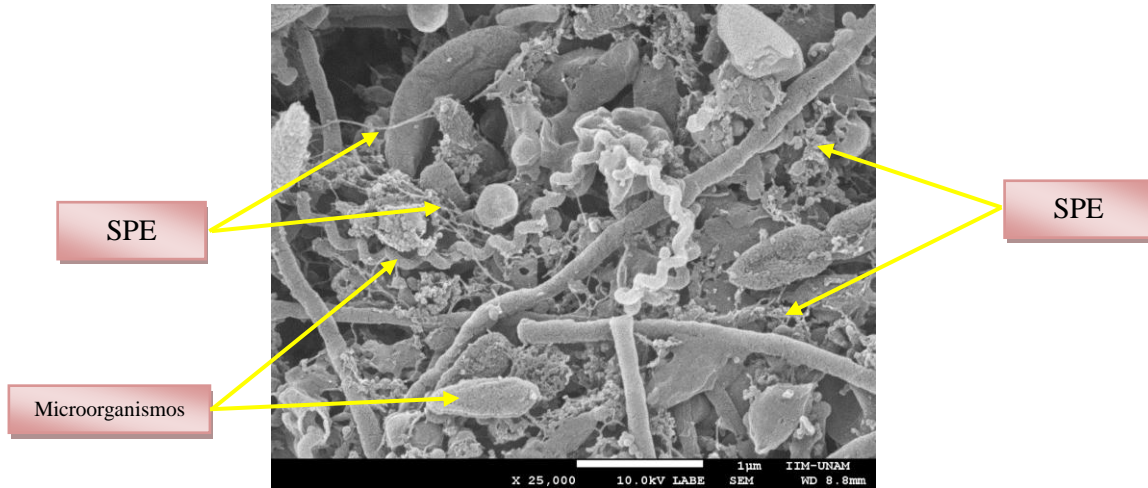


Figura 6.14. Micrografía 25000X, donde se observa parte de la matriz (capa taponante) que conforman las sustancias poliméricas extracelulares y los microorganismos.

De entre los microorganismos secuenciados que se mencionan en el capítulo anterior, se pueden comparar las imágenes obtenidas con estudios previos de otros investigadores. Entre el dominio *Bacteria*, fue identificado el género *Trichococcus* en varias de las bandas secuenciadas. Liu *et al.* (2002) describieron este género en sus diferentes formas dependiendo de la fase de crecimiento y el medio en el que crecen.

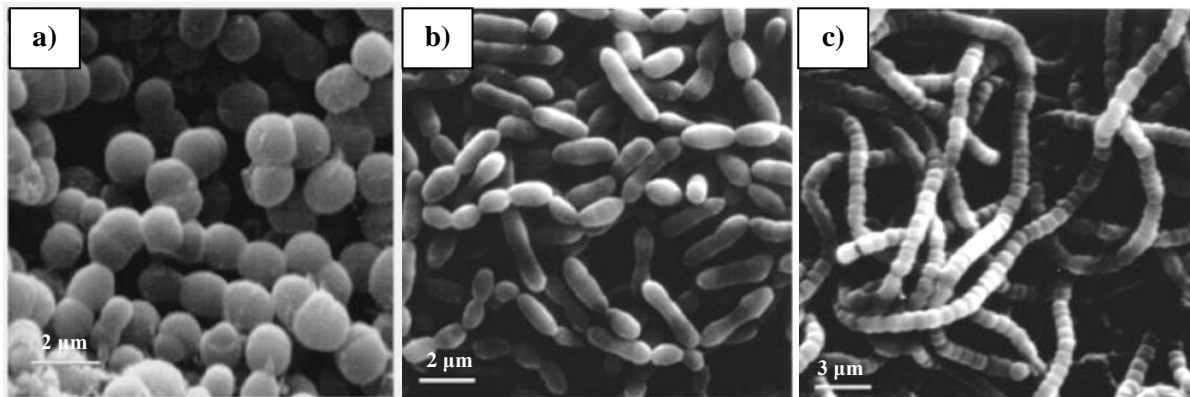


Figura 6.15. a) *Trichococcus flocculiformis* en agar R2A. b) y c) *T. flocculiformis* en sus diferentes formas morfológicas. Tomadas de Liu *et al.*, 2002.

Las micrografías de las figuras 6.15 a 6.19 muestran similitudes entre las formas microbianas presentes en la biopelícula de este trabajo, con imágenes de otras investigaciones.

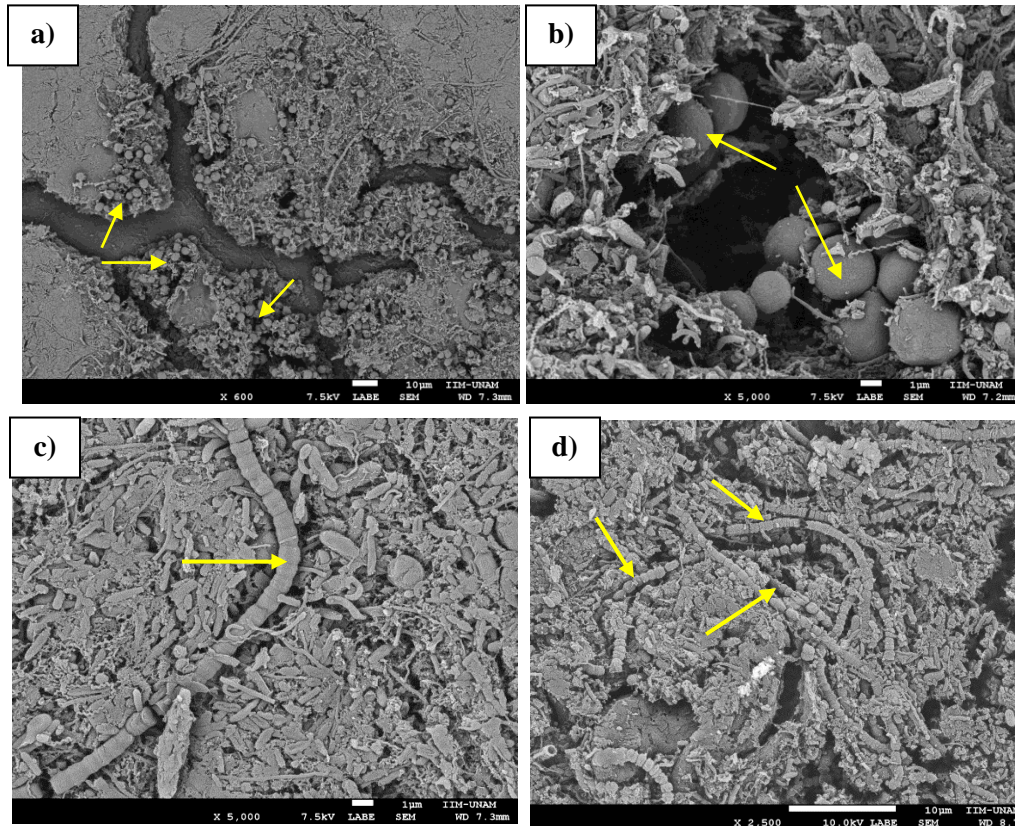


Figura 6.16. a) y b) Representación de microorganismos de forma cocoide. En c) y d) microorganismos de forma filamentosos. (Todos presentes en las muestras de biopelícula).

Así mismo, se encontraron muchas bacterias de forma bacilar. Uno de los géneros identificados, *Chlorobi*, se identifica por esta morfología. Beatty *et al.* (2005) publicaron micrografías de este género, encontradas en muestras de organismos fotosintéticos estrictamente anaerobios (fotosíntesis anoxigénica) de sedimentos del fondo marino.

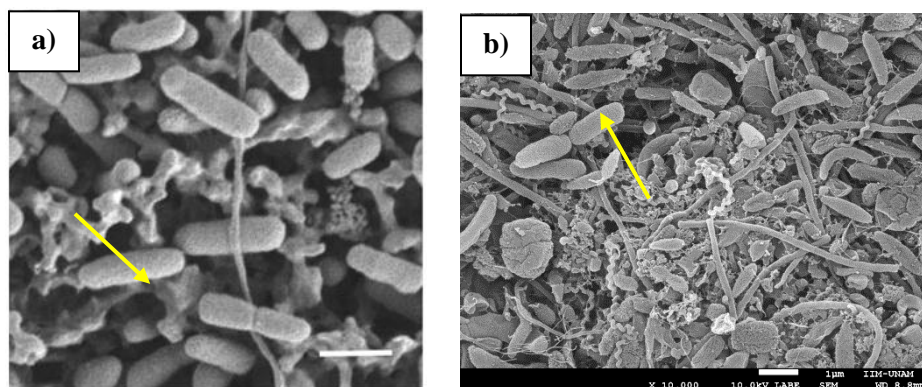


Figura 6.17. a) *Chlorobi* en Beatty *et al.*, 2005. b) Micrografía de microorganismos con forma bacilar presentes en las muestras de biopelícula.

Para el dominio *Archaea*, también se identificaron algunas morfologías en las micrografías tomadas para los diferentes tratamientos de este estudio. Como ya se mencionó anteriormente, la secuenciación permitió identificar especies de arqueas pertenecientes a dos géneros: *Methanosaeta*

y *Methanobacterium*. El primero mencionado está conformado por organismos que presentan forma de bastón, como se muestra en la figura 6.18.

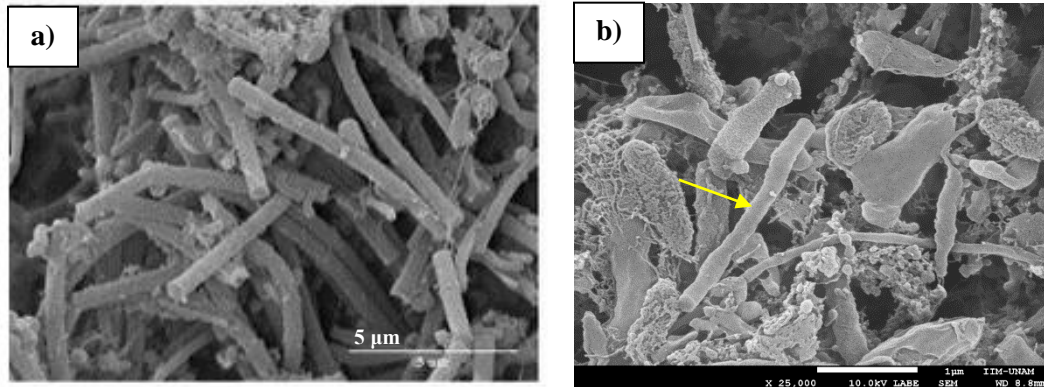


Figura 6.18. a) *Methanosaeta* en Sallis y Uyanik, 2003. b) Micrografía de microorganismos con forma de bastón presentes en las muestras de biopelícula.

De la misma manera, algunas especies de *Methanobacterium* tienen forma de bastón, pero más alargados y pueden ir unidos en los extremos entre sí, o bien, tienen morfologías más parecidas a la forma bacilar.

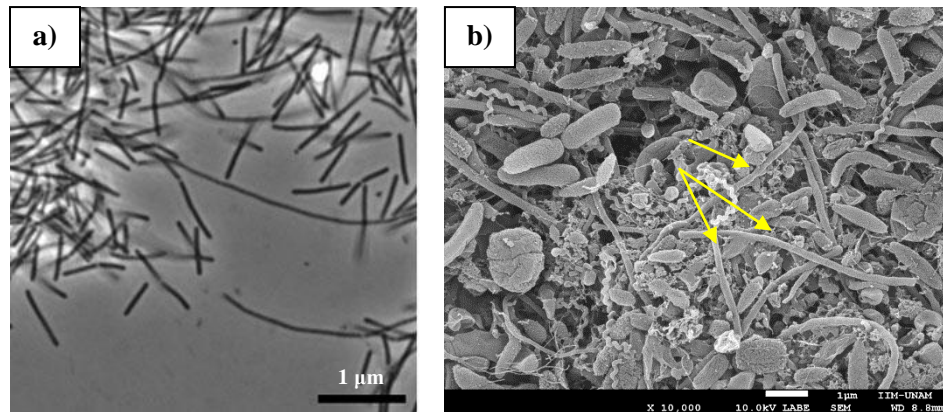


Figura 6.19. a) *Methanobacterium sp.* en Mori y Harayama, 2011. b) Micrografía de microorganismos con forma de bastón alargados presentes en las muestras de biopelícula.

Además de las micrografías, se realizaron estudios de EDX para identificar otros elementos presentes en la biopelícula de la membrana. Dentro de estos elementos, aparecieron cristales inorgánicos de sustancias cuyo origen debe ser la composición del agua residual sintética utilizada para los experimentos, o bien probablemente de la lisis celular. Es importante mencionar, que el análisis de las micrografías permitió conocer lo que se encontraba en la superficie de la biopelícula y que sobre de esta, la cantidad de cristales que fue posible observar fue bajo. Esto no significa que los compuestos inorgánicos en la biopelícula no fueran parte de lo que causa el taponamiento en la membrana, puesto que algunos autores han reportado la presencia de elementos inorgánicos como Ca, Fe, Mg, etc. como componentes necesarios en la formación de la capa taponante (Meng *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Salazar-Peláez, 2011).

A continuación, en la figura 6.20 se presentan algunos ejemplos de los cristales encontrados en los diferentes tratamientos.

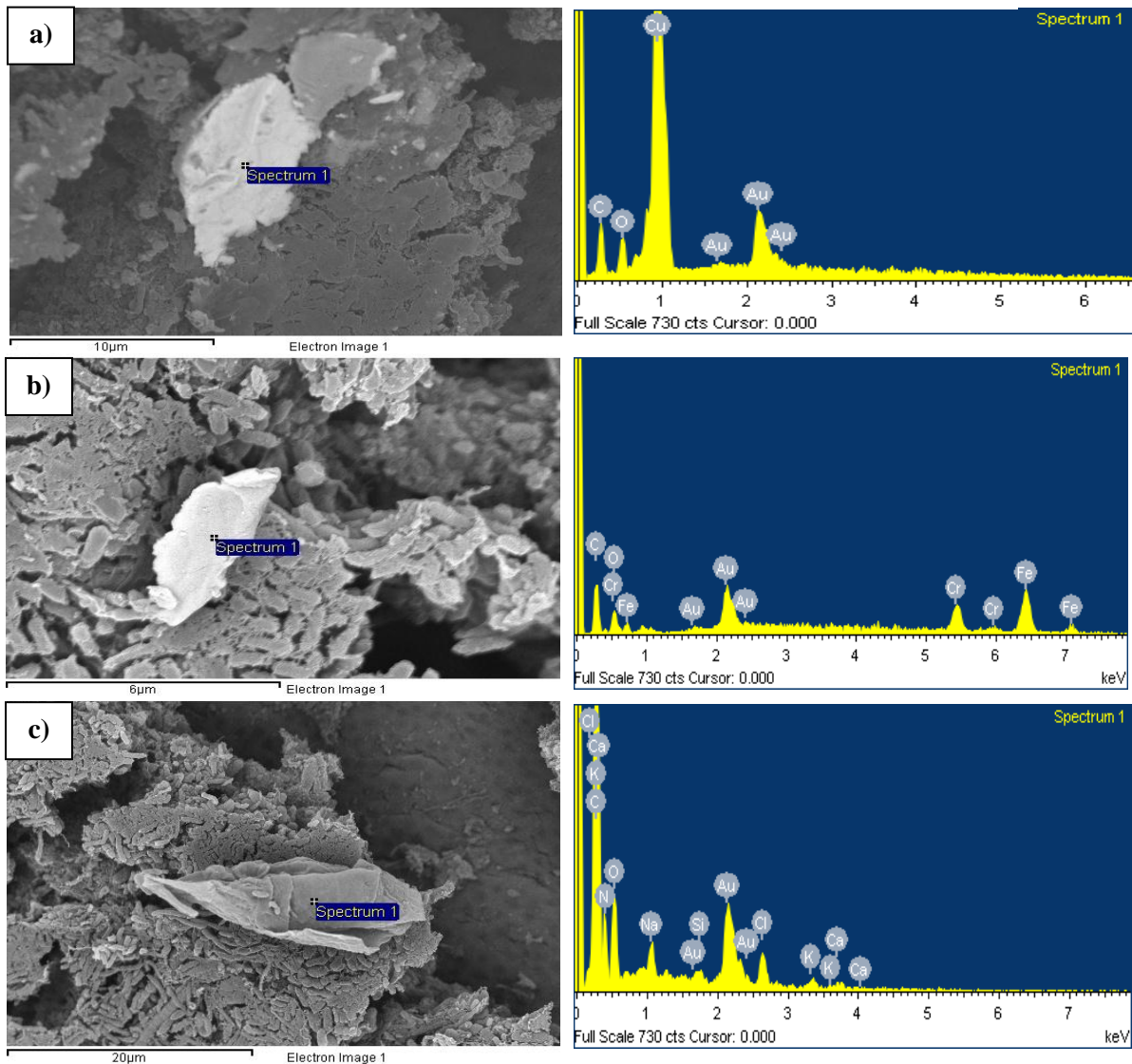


Figura 6.20. Espectros de EDX obtenidos en las muestras de biopelícula.
a) Cristal de Cu. b) Cristal de Cr y Fe. c) Cristal de Cl, Ca, Si y K.

En todas las muestras se encontró Au por el tratamiento de recubrimiento de oro para observar las micrografías más claramente. Sin embargo, fue interesante encontrar cristales de diferente composición como:

- Cobre, presente en forma de cloruro de cobre en la composición del agua residual sintética y que explicaría su presencia en forma de cristales en la biopelícula. En estudios anteriores de este grupo de investigación, Calderón (2009) también encontró este tipo de formación.
- Fe-Cr, probablemente una sal de hierro. El hierro también era parte de la composición del agua residual, mientras que el cromo debió provenir de una fuente externa, probablemente como parte de la matriz que conforman los gránulos anaerobios.

- c) Calcio-cloro-silicio-potasio que probablemente eran cristales de cloruro de calcio con trazas de otros elementos. En el trabajo de Salazar-Peláez (2011) se encontraron cristales de composición parecida, sólo que se trataba de un reactor anaerobio de configuración con membrana externa.

Es importante llevar a cabo un análisis profundo acerca de la aportación de cada elemento (orgánico e inorgánico) en la formación de la biopelícula, y sobre todo su efecto en el taponamiento de la membrana. Las investigaciones al respecto aún no son claras, pues hay autores que afirman que el efecto de los microorganismos es la causa principal del taponamiento (Lee *et al.*, 2003; Bae y Tak, 2005; Huang *et al.*, 2008), mientras que otros señalan que la presencia de las SPE contribuye a disminuir drásticamente la eficiencia de las membranas debido a su deposición sobre ésta, formando matrices complejas (Le-Clech *et al.*, 2005; Malamis y Andreadakis, 2009). Por su parte Herrera-Robledo *et al.* (2011a) llevaron a cabo experimentos para inducir el taponamiento de la membrana con diferentes macromoléculas, quitosán (polisacárido) y albúmina de suero bovino (proteína), y un elemento inorgánico, carbonato de calcio. De esta forma, comprobó que la interacción entre elementos orgánicos e inorgánicos puede conducir al proceso conocido como biomineralización y por consecuencia, al taponamiento irreversible de la membrana.

7. CONCLUSIONES

1. La biopelícula desarrollada sobre la membrana durante la filtración continua a un TRH de 4 horas, presentó un menor número de bandas en comparación con la filtración continua a un TRH de 8 horas. Esto puede deberse a un incremento de la velocidad de ascenso y por lo tanto a un mayor esfuerzo de corte del líquido sobre la membrana.
2. Durante las pruebas de filtración intermitente con burbujeo de nitrógeno (tratamientos II.A.1 y II.B.1) se obtuvo un menor número de bandas con respecto a las pruebas similares sin burbujeo de nitrógeno (tratamientos II.A.2 y II.B.2) lo que puede asociarse a un mayor desprendimiento de la biopelícula.
3. El índice ponderado de riqueza (Rr) fue mayor para *Archaea* en las muestras del lodo anaerobio, mientras que para las muestras de biopelícula ocurrió el caso contrario, siendo mayor el índice para el dominio *Bacteria*.
4. El índice de funcionalidad (Fo) reportado indicó que ambas comunidades están altamente especializadas, como era de esperarse, por ser un reactor anaerobio en etapa estable.
5. La comunidad de *Archaea* estuvo representada en todos los tratamientos por especies pertenecientes al orden *Methanobacteriales* y *Methanosarcinales*.
6. *Chloroflexi sp.* y *Leptonema illini* fueron especies de *Bacteria* que sólo se identificaron en las muestras de biopelícula. Por otro lado, *Escherichia coli* y *Trichococcus sp.*, se encontraron en todas las muestras de todos los tratamientos. *Chloroflexi sp.* está reportado que contribuye a la remoción de carbohidratos en el agua residual (Li *et al.*, 2008).
7. De acuerdo a estudios previos, algunos de los microorganismos encontrados, *Chlorobi sp.*, *Leptonema illini* y *Methanolinea sp.* han sido reportados como organismos que se adaptan para vivir en temperaturas psicrófilas (Yu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012) cercanas a las que se manejaron durante este trabajo, 18-25°C.
8. Las micrografías permitieron observar que además de microorganismos, existen otros compuestos taponantes sobre la biopelícula (exopolímeros, residuos celulares y precipitados de elementos inorgánicos como el cobre, hierro, cromo y calcio). Es el estudio conjunto de todos estos factores el que permitirá elucidar los mecanismos de taponamiento, y el principal efecto de cada uno de sus componentes (microorganismos, sustancias orgánicas, sustancias inorgánicas, etc.).

8. BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, Z., Cho, J., Lim, B.R., Song, K., 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(2): 211–218.

Andersson, S., Dalhammar, G., Land, C., Rajarao, D. (2009). Characterization of extracellular polymeric substances from denitrifying organism *Comamonas denitrificans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82(3): 535–543.

Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M.A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Della' mico, E., Colombo, M., Gianfreda, L. (2004). Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57(5): 401–412.

Avrhami, S., Conrad, R. (2003). Patterns of community change among ammonia oxidizers in meadow soils upon long-term incubation at different temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 69(10): 6152-6164.

Bae, T.H., Tak, T.M. (2005). Interpretation of fouling characteristics of ultrafiltration membranes during the filtration of membrane bioreactor mixed liquor. *Journal of Membrane Science* 264(1-2): 151–160.

Baker, G.C., Smith, J.J., Cowun, D.A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55(3): 541–555.

Ballesteros, M., Garrido, L., Sánchez-Pérez, J.A. (2010). An analysis of the bacterial community in a membrane bioreactor fed with photo-Fenton pre-treated toxic water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38(9): 1171-1178.

Batstone, D.J., Keller, J., Blackall, L.L. (2004). The influence of substrate kinetics on the microbial community structure in granular anaerobic biomass. *Water Research* 38(6): 1390-1404.

Bitton, G. (2005). *Wastewater Microbiology*. 3rd. Edition. Wiley-Liss, Hoboken, N.J. 746 pp. (ISBN: 0-471-65071-4).

Bouhabila, E.H., Aim, R.B., Buisson, H. (2001). Fouling characterisation in membrane bioreactors. *Separation and Purification Technology* 22–23: 123-132.

Braak, E., Alliet, M., Schetrite, S., Albasi, C. (2011). Aeration and hydrodynamics in submerged membrane bioreactors. *Journal of Membrane Science* 379(1-2): 1–18.

Brochier-Armanet, C., Forterre, P., Gribaldo, S. (2011). Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later. *Current opinion in microbiology* 14(3): 274–81.

Brookes, A., Jefferson, B., Guglielmi, G., Judd, S. (2006). Sustainable flux fouling in a membrane bioreactor: impact of flux and MLSS. *Separation Science and Technology* 41(7): 1279-1291.

Calderón, K. (2009). Caracterización de la biopelícula taponante en membranas acopladas a un bioreactor anaerobio. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Calderón, K., Rodelas, B., Cabirol, N., González-López, J., Noyola, A. (2011). Analysis of microbial communities developed on the fouling layers of a membrane-coupled anaerobic bioreactor applied to wastewater treatment. *Bioresource Technology* 102(7): 4618-4627.
- Cerón-Vivas, A., Morgan-Sagastume, J.M., Noyola, A. Intermittent filtration and gas bubbling for fouling reduction in anaerobic membrane bioreactors. *Journal of Membrane Science*. (2012). DOI: 10.1016/j.memsci.2012.08.008.
- Chang, I. S., Kim, J. S., and Lee, C. H. (2001). The effects of EPS on membrane fouling in a MBR process. *Proc., MBR3 Conference, Cranfield*, 19–28.
- Chang, I.S., Kim, S.N. (2005). Water treatment using membrane filtration—effect of biosolids concentration on cake resistance. *Process Biochemistry* 40(3-4): 1307–1314.
- Chang, I.S., Le Clech, P., Jefferson, B., Judd, S. (2002). Membrane fouling in membrane bioreactors for wastewater treatment. *Journal of Environmental Engineering* 118(11): 1018-1029.
- Chee Meng, P. (2007). Biofilms in water separation membrane processes: from community structure and ecological characteristics. Tesis de Doctorado. National University of Singapore.
- Chernicharo, C.A., dos Reis-Cardoso, M. (1999), Development and evaluation of a partitioned upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor for the treatment of domestic sewage from small villages. *Water Science and Technology* 40(8): 107-113.
- Chiemchaisri, C., Yamamoto, K. (1993). Biological nitrogen removal under low temperature in a membrane separation bioreactor. *Water Science and Technology* 28(10): 325–333.
- Cho, J., Song, K.G., Yun, H., Ahn, K.H., Kim, J.Y., Chung, T.H. (2005). Quantitative analysis of biological effect on membrane fouling in submerged membrane bioreactor. *Water Science and Technology* 51(6-7): 9-18.
- Choi, J.-H., Lee, S.H., Fukushi, K., Yamamoto, K. (2007). Comparison of sludge characteristics and PCR-DGGE based microbial diversity of nanofiltration and microfiltration membrane bioreactors. *Chemosphere* 67(8): 1543–50.
- Chung-Hak, L., Hee Yoon, K., Kyung-Min, Y. (2006). Biofilm structure and extracellular polymeric substances in low and high dissolved oxygen membrane bioreactors. *Separation Science and Technology* 41(7): 1213-1230.
- Connaughton, S., Collins, G., O'Flaherty, V. (2006). Development of microbial community structure and activity in a high-rate anaerobic bioreactor at 18°C. *Water Research* 40(5): 1009–1017.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Debeer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology* 176(8): 2137-2142.
- de Sousa, J.T., Foresti, E. (1996). Domestic sewage treatment in an upflow anaerobic sludge blanket-sequencing batch reactor system. *Water Science and Technology* 33(3): 73-84.
- Drews, A., Vocks, M., Bracklow, U., Iversen, V., Kraume, M. (2008). Does fouling in MBRs depend on SMP?. *Desalination* 231(1-3): 141–149.

- Duan, L., Moreno-Andrade, I., Huang, C.L., Xia, S., Hermanowicz, S.W. (2009). Effects of short solids retention time on microbial community in a membrane bioreactor. *Bioresource Technology* 100(14): 3489–3496.
- Dvořák, L., Gómez, M., Dvořáková, M., Růžicková, I., Wanner, J. (2011). The impact of different operating conditions on membrane fouling and EPS production. *Bioresource Technology* 102(13): 6870-6875.
- Falk, M.W., Song, K.G., Matiassek, M.G., Wueytz, S. (2009). Microbial community dynamics in replicate membrane bioreactors natural reproducible fluctuations. *Water Research* 43(3): 842–852.
- Fan, X. J., Urvain, V., Qian, Y., and Manem, J. (1996). Nitrification and mass balance with a membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water Science and Technology* 34(1-2): 129–136.
- Fernandez, A., Huang, S.Y., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C., Tiedje, J. (1999) How stable is stable? Function versus community composition. *Applied Environmental Microbiology* 65: 3697–3704.
- Fernández, N., Díaz, E., Amils, R., Sanz, J.L. (2007). Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor. *Microbial Ecology* 56(1): 121-132.
- Ferraris, M., Innella, C., Spagni, A. (2007). Start-up of a pilot-scale membrane bioreactor to treat municipal wastewater. *Desalination* 237 (1–3): 190–200.
- Ferris, M.J., Muyzer, G., Ward, D.M. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 340–346.
- Flemming, H., Neu, T.R., Wozniak, T.R. (2007). The EPS Matrix: The house of biofilm cells. *Journal of Bacteriology* 189(22): 7945–7947.
- Foresti E. (2001). Anaerobic treatment of domestic sewage: established technologies and perspectives. The 9th World Congress on Anaerobic Digestion–Anaerobic Conversion for Sustainability. Antwerp, Belgium, pp. 37–42.
- Foresti, L. (2002). Anaerobic treatment of domestic sewage: established technologies and perspectives. *Water Science and Technology* 45(10): 181–186.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain- Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M., 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* 4: 634–643.
- Frostegard, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F. (1999). Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied Environmental Microbiology* 65: 5409–5420.
- Gander, M., Jefferson, B., and Judd, S. (2000). Aerobic MBRs for domestic wastewater treatment: A review with cost considerations. *Separation and Purification Technology* 18: 119–130.

Gao, B., Zhu, X., Xu, C., Yue, Q., Li, W., Wei, J. (2008). Influence of extracellular polymeric substances on microbial activity and cell hydrophobicity in biofilms. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83: 227–232.

Gao, D., Fu, Y., Tao, Y., Wu, W., An, R., Li, X. (2009). Current research and development of controlling membrane fouling of MBR. *African Journal of Biotechnology* 8(13): 2993-2998.

Gao, W.J., Lin, H.J., Leung, K.T., Schraft, H., Liao, B.Q. (2011). Structure of cake layer in a submerged anaerobic membrane bioreactor. *Journal of membrane science* 374: 110-120.

Gelsomino, A., Badalucco, L., Ambrosoli, R., Crecchio, C., Puglisi, E., Meli, S.M. (2006). Changes in chemical and biological soil properties as induced by anthropogenic disturbance: a case study of an agricultural soil under recurrent flooding by wastewaters. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 2069–2080.

Giménez, J.B., Robles, A., Carretero, L., Durán, F., Ruano, M.V., Gatti, M.N., Ribes, J., Ferrer, J., Seco, A. (2011) Experimental study of the anaerobic urban wastewater treatment in a submerged hollow-fibre membrane bioreactor at pilot scale. *Bioresource Technology* 102(19): 8799 – 8806.

Godon, J.J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., and Moletta, R. (1997) Microbial 16S rDNA diversity in an anaerobic digester. *Applied Environmental Microbiology* 63: 2802-2813.

Grelier, P., Rosenberger, S., Tazi-Pain, A. (2006). Influence of sludge retention time on membrane bioreactor hydraulic performance. *Desalination* 192(1-3): 10–17.

Gribaldo, S., Brochier-Armanet, C. (2012). Time for order in microbial systematics. *Trends in microbiology* 20(5): 209–10.

Guy, L., Ettema, T.J. (2011). The archaeal “TACK” superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends in microbiology* 19(12): 580–7.

Han, S.S., Bae, T.H., Jang, G.G., Tak, T.M. (2005). Influence of sludge retention time on membrane fouling and bioactivities in membrane bioreactor system. *Process Biochemistry* 40: 2393–2400.

Hee Yoon, K., Kyung-Min, Y., Chung-Hak, L., Lee, S., Tyagarajan, S. (2006). Biofilm structure and extracellular polymeric substances in low and high dissolved oxygen membrane bioreactors. *Separation Science and Technology* 41(7): 1213 — 1230.

Hegazy, T.A., Abdel-Magied, M.A., Al-Asmar, A., Ibrahim, M.S. (2011). Environmental studies of domestic wastewater treatment using integrated anaerobic/Aerobic system. *Journal of American Science* 7(3): 485–492.

Herrera-Robledo, M. (2011). Dilucidación de los fenómenos de taponamiento y su control. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.

Herrera-Robledo, M., Arenas, C., Morgan-Sagastume, J.M., Castaño, V., Noyola, A. (2011). Chitosan/albumin/CaCO₃ as mimics for membrane bioreactor fouling: Genesis of structural mineralized-EPS-building blocks and cake layer compressibility. *Chemosphere* 84: 191-198.

Herrera-Robledo, M., Cid-León, D.M., Morgan-Sagastume, J.M., Noyola, A. (2011b). Biofouling in an anaerobic membrane bioreactor treating municipal sewage. *Separation and Purification Technology* 81: 49-55.

Herrera-Robledo, M., Morgan-Sagastume, J.M., Noyola, A. (2010). Biofouling and pollutant removal during long-term operation of an anaerobic membrane bioreactor treating municipal wastewater. *Biofouling* 26(1): 23-30.

Ho, J.H., Sung, S.W. (2010). Methanogenic activities in anaerobic membrane bioreactors (AnMBR) treating synthetic municipal wastewater. *Bioresource Technology* 101: 2191-2196.

Hu, A.Y., Stuckey, D.C. (2006). Treatment of dilute wastewaters using a novel submerged anaerobic membrane bioreactor. *Journal of Environmental Engineering* 132 (2): 190–198.

Hu, Z., Liang, Z., Das, A., Beerman, D. (2010). Biomass characteristics of two types of submerged membrane bioreactors for nitrogen removal from wastewater. *Water Research* 44: 3313-3320.

Huang, L., De Wever, H., Diels, L. (2008). Diverse and distinct bacterial communities induced biofilm fouling in membrane bioreactors operated under different conditions. *Environmental Science and Technology* 42: 8360-8366.

Huang, X., Liu, R., Qian, Y., (2000). Behavior of soluble microbial products in a membrane bioreactor. *Process Biochemistry* 36: 401–406.

Huang, Z., Ong, S.L., Ng, H.Y. (2008). Feasibility of submerged anaerobic membrane bioreactor (SAMBR) for treatment of low-strength wastewater. *Water Science and Technology* 58(10): 1925–1931.

Hughes, D., Kelly, O., Collins, G., O’Flaherty, V. (2012). Low temperature anaerobic treatment of synthetic sewage. *Current opinion in Biotechnology*.

Inceôglu, O., Hoogwout, E. F., Hill, P., van Elsas, J. D. (2010). Effect of DNA extraction method on the apparent microbial diversity of soil. *Applied and Environmental Microbiology* 76(10): 3378-3382.

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

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

Jackson, C.R., Langner, H.W., Donahoe-Christiansen, J., Inskeep, W.P., McDermott, T.R. (2001). Molecular analysis of microbial community structure in an arseniteoxidizing acidic thermal spring. *Environmental Microbiology* 3: 532–542.

Janse, I., Bok, J., Zwart, G. (2004). A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 57(2): 279–281.

Jeison, D., van Lier, J.B. (2006). Cake layer formation in anaerobic submerged membrane bioreactors (AnSMBR) for wastewater treatment. *Journal of Membrane Science* 284(1-2): 227–236.

Jenkins, D., Richard, M.G., and Daigger, G.T. (1993). *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*. Chelsea, MI: Lewis Publisher.

Jeong, E., Kim, H.W., Nam, J.Y., Shin, H.S. (2010). Enhancement of bioenergy production and effluent quality by integrating optimized acidification with submerged anaerobic membrane bioreactor. *Bioresource Technology* 101(1): S7–S12.

Jiao, Y., Cody, G.D., Harding, A.K., Wilmes, P., Schrenk, M., Wheeler, K.E., Banfield, J.F., Thelen, M.P. (2010). Characterization of Extracellular Polymeric Substances from Acidophilic Microbial Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (9): 2916-2922.

Jinhua, P., Fukushi, K., Yamamoto, K. (2006). Bacterial community structure on membrane surface and characteristics of strains isolated from membrane surface in submerged membrane bioreactor. *Separation Science Technology* 41: 1527–1549.

Judd, S. *The MBR book*. (2006) Principles and applications of membrane bioreactors in water and wastewater treatment. Elsevier, Oxford.

Kim, J.S., Lee, C.H., and Chang, I.S. (2001). Effect of pump shear on the performance of a crossflow membrane bioreactor. *Water Research* 35: 2137–2144.

Kimura, K., Naruse, T., Watanabe, Y. (2009). Changes in characteristics of soluble microbial products in membrane bioreactors associated with different solid retention times: Relation to membrane fouling. *Water Research* 43: 1033–1039.

Kindaichi, T., Ito, T., Okabe, S. (2004). Ecophysiological Interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-Fluorescence In Situ Hybridization. *Applied and environmental microbiology* 70(3): 1641-1650.

Kisand, V., Wikner, J. (2003) Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *Journal of Microbiology Methods* 54: 183-191.

Kishino, H., Ishida, I., and Nakano, I. (1996). Domestic wastewater reuse using a submerged membrane bioreactor. *Desalination* 106: 115–119.

Kolter, R., Greenberg, E.P. (2006). Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature* 441(7091): 300-302.

Kornboonraksa, T., Lee, H.S., Lee, S.H., Chiemchaisri, C. (2009). Application of chemical precipitation and membrane bioreactor hybrid process for piggery wastewater treatment. *Bioresource Technology* 100: 1963–1968.

Koskinen, R., Ali-Vehmas, T., Kampfer, P., Laurikkala, M., Tsitko, I., Kostyal, E., Atroshi, F., Salkinoja-Salonen, M. (2000). Characterization of *Sphingomonas* isolates from Finnish and Swedish drinking water distribution systems. *Journal of Applied Microbiology* 89: 687– 696.

- Kowalchuk, G., Stephen, J., De Boer, W., Prosser, J., Embley, T., Woldendorp, J. (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 63:1489-97.
- Laspidou, C.S., Rittmann, B.E. (2002). A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research* 36: 2711–2720.
- Le Clech, P., Chen, V., Fane, T.A. (2006). Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal of Membrane Science* 284: 17-53.
- Lee, C., Kim, J., Shin, S.G., Hwang, S. (2008). Monitoring bacterial and archaeal community shifts in a mesophilic anaerobic batch reactor treating a high-strength organic wastewater. *FEMS microbiology ecology* 65(3): 544–554.
- Lee, W., Kang, S., Shin, H.S. (2003). Sludge characteristics and their contribution to microfiltration in submerged membrane bioreactors. *Journal of Membrane Science* 216: 217– 227.
- Li, H., Zhang, Y., Li, D.-sheng, Xu, H., Chen, G.-xiong, Zhang, C. (2009). Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for fingerprinting of microbial communities in paddy soils. *Soil Biology and Biochemistry* 41(5): 954-968.
- Li, J., Yang, F., Liu, Y., Song, H., Li, D., Cheng, F. (2012). Microbial community and biomass characteristics associated severe membrane fouling during start-up of a hybrid anoxic-oxic membrane bioreactor. *Bioresource Technology* 103: 43-47.
- Li, P., Wang, Y., Liu, K., Tong, L. (2010). Bacterial community structure and diversity during establishment of an anaerobic bioreactor to treat swine wastewater. *Water Science and Technology* 61: 243-252.
- Li, X., Yang, S. (2007). Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. *Water Research* 41: 1022 – 1030.
- Li, J., He, S., Wang, X., Xia, S. (2010b). Microbial community structures in two membrane bioreactors: sequential and continuous modes. 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE).
- Lima, L. F., Habu, S., Gern, J.C., Nascimento, B., Parada, J.L., Nosedá, M., Gonçalves, A., Nisha, V.R., Pandey, A., Socol, V., Socol, C. (2008). Production and characterization of the exopolysaccharides produced by *Agaricus brasiliensis* in submerged fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151: 283–294.
- Lin, H.J., Gao, W.J., Leung, K., Liao, B. (2011b). Characteristics of different fractions of microbial flocs and their role in membrane fouling. *Water Science and Technology* 63(2): 262-269.
- Lin, H.J., Liao, B., Chen, J., Gao, W., Wang, L., Wang, F., Lu, X. (2011a). New insights into membrane fouling in a submerged anaerobic membrane bioreactor based on characterization of cake sludge and bulk sludge. *Bioresource Technology* 102: 2373–2379.

Lin, H.J., Xie, K., Mahendran, B., Bagley, D.M., Leung, K.T., Liss, S.N., Liao, B.Q. (2010). Factors affecting sludge cake formation in a submerged anaerobic membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science* 361: 126-134.

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

Luebbehusen, H. (2010). *The Significance of the 260/230 Ratio in Determining Nucleic Acid Purity*. Disponible en: <http://www.bcm.edu/mcfweb/?PMID=3100>. (Acceso el 09 de Junio, 2012).

Lyautey, E., Lacoste, B., Ten-Hage, L., Rols, J.L., Garabetian, F. (2005). Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Research* 39: 380–388.

Ma, K., Liu, X., Dong, X. (2005). *Methanobacterium beijingense* sp. nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 325-329.

Malamis, S., Andreadakis, A. (2009). Fractionation of proteins and carbohydrates of extracellular polymeric substances in a membrane bioreactor system. *Bioresource Technology* 100: 3350–3357.

Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W. (2008). How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology* 10(6): 1571-81.

Meng, F., Chae, S.R., Drews, A., Kraume, M., Shin, H.-S., Yang, F. (2009). Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): membrane fouling and membrane material. *Water Research* 43 (6): 1489–1512.

Menniti, A., Kang, S., Elimelech, M., Morgenroth, E. (2009). The influence of shear on EPS production in membrane bioreactors. *Water Research* 43: 4305-4315.

Miura, Y., Hiraiwa, M.N., Ito, T., Itonaga, T., Watanabe, Y., Okabe, S. (2007a). Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: relationship between community stability and reactor performance. *Water Research* 41(3): 627– 637.

Miura, Y., Watanabe, Y., Okabe, S. (2007b). Membrane biofouling in pilot-scale membrane bioreactors (MBRs) treating municipal wastewater: impact of biofilm formation. *Environmental Science and Technology* 41 (2): 632–638.

Miura, Y., Watanabe, Y., Okabe, S. (2007c). Significance of *Chloroflexi* in performance of submerged membrane bioreactors (MBR) treating municipal wastewater. *Environmental Science and Technology* 41(22): 7787–7794.

Molina-Muñoz, M., Poyatos, J.M., Sanchez-Peinado, M., Hontoria, E., Gonzalez- Lopez, J., Rodelas, B. (2009). Microbial community structure and dynamics in a pilot-scale submerged membrane bioreactor aerobically treating domestic wastewater under real operation conditions. *Science of the Total Environment* 407(13): 3994–4003.

Monclús, H., Ferrero, G., Buttiglieri, G., Comas, J., Rodríguez-Roda, I. (2011). Online monitoring of membrane fouling in submerged MBRs. *Desalination* 277(1-3): 414–419.

- Mori, K., Tsurumaru, H., Harayama, S. (2010). *Methanobacterium petrolearium*: iron corrosion activity of anaerobic hydrogen-consuming microorganisms isolated from oil facilities. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110(4): 426-430.
- Mori, K., Harayama, S. (2011). *Methanobacterium petrolearium* sp. nov. and *Methanobacterium ferruginis* sp. nov., mesophilic methanogens isolated from salty environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61(1): 138-143.
- Mori, K., Iino, T., Suzuki, K., Yamaguchi, K., Kamagata, Y. (2012). Acetoclastic and NaCl-requiring methanogen *Methanosaeta pelágica* sp. nov., isolated from marine tidal flat sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 78(9): 3416-3423.
- Muyzer, G. (2001). DGGE/TGGE: a method for identifying, genes from natural ecosystems. *Current Opinion Microbiology* 2: 317-322.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Muyzer, G., S. Hottentrager, A. Teske, and C. Wawer. (1995). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA. A molecular new approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities, p. 3.4.4. In A. Akkermans, J. van Elsas, and F. D. Bruijn (ed.), *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Muyzer, G., Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General Molecular Microbiology* 73: 127–141.
- Nah, Y. M., Ahn, K. H., and Yeom, I. T. (2000). Nitrogen removal in household wastewater treatment using an intermittently aerated membrane bioreactor. *Environmental Technology* 21:107–114.
- Narihiro, T., Terada, T., Kikuchi, K., Iguchi, A., Ikeda, M. Yamaguchi, T., Sekiguchi, Y. (2009). Comparative analysis of bacterial and archaeal communities in methanogenic sludge granules from upflow anaerobic sludge blanket reactors treating various food-processing wastewaters. *Microbes and Environment* 24(2): 88-96.
- Ng, C., Ng, Y. (2010). Characterization of initial fouling in aerobic submerged membrane bioreactors in relation to physico-chemical characteristics under different flux conditions. *Water Research* 44(7): 2336-48.
- Ng, H.Y., Tan, T.W., Ong, S.L. (2006). Membrane fouling of submerged membrane bioreactors: impact of mean cell residence time and the contributing factors. *Environmental Science and Technology* 40(8): 2706–2713.
- Ognier, S., Wisniewski, C., Grasmick, A. (2002). Influence of macromolecule adsorption during filtration of a membrane bioreactor mixed liquor suspension. *Journal of Membrane Science* 209: 27–37.

Okabe, S.; Kindaichi, T.; Ito, T. (2004). MAR-FISH-An ecophysiological approach to link phylogenetical affiliation and in situ metabolic activity of microorganisms at a single-cell resolution. *Microbes Environment* 19: 83-98.

O'Reilly, J., Lee, C., Chinalia, F., Collins, G., Mahony, T., O'Flaherty, V. (2010). Microbial community dynamics associated with biomass granulation in low-temperature (15°C) anaerobic wastewater treatment bioreactors. *Bioresource Technology* 101(16): 6336-6344.

Øvreås, L., Torsvik, V. (1998). Microbial Diversity and Community Structure in Two Different Agricultural Soil Communities. *Microbial ecology* 36(3): 303-315.

Oxford Gene Technology (OGT). (2011). Understanding and measuring variations in DNA samples quality. Disponible en: http://www.ogt.co.uk/resources/literature/483_understanding_and_measuring_variations_in_dna_sample_quality. (Acceso el 09 de Junio, 2012).

Padmasiri, S., Zhang, J., Fitch, M., Norddahl, B., Morgenroth, E., Raskin, L. (2007). Methanogenic population dynamics and performance of an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) treating swine manure under high shear conditions. *Water Research* 41(1): 134-144.

Pan, J.R., Su, Y., Huang, Ch. (2010). Characteristics of soluble microbial products in membrane bioreactor and its effect on membrane fouling. *Desalination* 250(2): 778-780.

Park, J., Jin, H.F., Lim, B.R., Park, K., Lee, K. (2010). Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101: 8649-8657.

Percival, S.L., Knapp, J.S., Wales, D.S., and Edyvean, R.G.J. (1999). The effect of turbulent flow and surface roughness on biofilm formation in drinking water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 22: 152-159.

Pester, M., Schleper, C., Wagner, M. (2011). The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current opinion in microbiology* 14(3): 300-6.

Prosser, J.I., Bohannon, B.J., Curtis, T.P., Ellis, R.J., Firestone, M.K., Freckleton, R.P. (2007). The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology* 5: 384-392.

Purswani, J., Martín-Platero, A., Reboleiro-Rivas, P., González-López, J., Pozo, C. (2011). Comparative analysis of microbial DNA extraction protocols for groundwater samples. *Analytical Biochemistry* 416(2): 240-242.

Ramos-Padrón, E., Bordenave, S., Lin, S., Bhaskar, I.M., Dong, X., Sensen, C.W., Fourinier, J., Voordow, G. (2010). Carbon and sulfur cycling by microbial communities in a gypsum treated oil sands tailings ponds. *Environmental Science and Technology* 45(2): 439-446.

Rasolofo, E., St-Gelais, D., LaPointe, G., Roy, D. (2010). Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *International Journal of Food Microbiology* 138(1-2): 108-118.

Riviere, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P., Sghir, A. (2009). Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME Journal* 3(6): 700-714.

Roest, K., Heilig, H., Smidt, H., Vos, M., Stams, A., Akkermans, A. (2005). Community analysis of a full-scale anaerobic treating paper mill wastewater. *Systematic Applied Microbiology* 28:175–185.

Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J.P., Head, I.M. (2002). Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5537–5548.

Rosenberger, S., Laabs, C., Lesjean, B., Gnirss, R., Amy, G., Jekel, M., Schrotter, J.C. (2006). Impact of colloidal and soluble organic material on membrane performance in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment. *Water Research* 40: 710–720.

Salazar-Peláez, M. (2011). Influencia del tiempo de retención hidráulica en el desempeño y taponamiento de un reactor UASB acoplado a una membrana externa de ultrafiltración. Tesis de doctorado en Ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México.

Salazar-Peláez, M., Morgan-Sagastume, J.M., Noyola, A. (2011). Influence of hydraulic retention time on fouling in a UASB coupled with an external ultrafiltration membrane treating synthetic municipal wastewater. *Desalination* 277: 164-170.

Sallis, P.J., Uyanik, S. (2003). Granule development in a split-feed anaerobic baffled reactor. *Bioresource technology* 89(3): 255-265.

Sambrook, J., Russell, D. (2001). Gel electrophoresis of DNA and pulsed field agarose gel electrophoresis, in: J. Sambrook, D.W. Russell (Eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, third ed, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, NY, USA, (pp. 517).

Samer A., James F., (2004). Optimization of various MBR systems for water reclamation. *Desalination and Water Purification Research and Development Report*. No.103.

Sanz, J.L., Köchling, T. (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: an overview. *Process Biochemistry* 42: 119–133.

Scheff, G., Salcher, O., Lingens, F. (1984). A new gram-positive filamentous bacterium isolated from bulking sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 19: 114–119.

Schnürer, A., Zellner, G., Svensson, B.H. (1999). Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiology and Ecology* 29: 249–261.

Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Syutsubo, K., Ohashi, A., Harada, H., Nakamura, K. (1998). Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology* 144: 2655-2665.

Sekiguchi, Y., Takahashi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A., Harada, H. (2001). In situ detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green nonsulfur bacteria, subdivision I. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5740–5749.

- Shen, Y., Zhao, W., Xiao, K., Huang, X. (2010). A systematic insight into fouling propensity of soluble microbial products in membrane bioreactors based on hydrophobic interaction and size exclusion. *Journal of Membrane Science* 346(1): 187-193.
- Smalla, K., Creswell, N., Mendonca, L., van Elsas, J.D. (1993). Rapid DNA extraction protocol from soil for PCR-mediated amplification. *Journal of Applied Bacteriology* 74: 78–85.
- Staley, J.T., Gunsalus, R.P., Lory, S., Perry, J.J. (2007). *Microbial Life*. 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc.
- Stewart, P.S., Franklin, M.J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews in Microbiology* 6: 199–210.
- Sutherland, I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147: 3-9.
- Talaat, A., Hegazy, M.A., Abdel-Magied, A., Al-Asmar, Ibrahim, M. (2011). Environmental studies of domestic wastewater treatment using integrated anaerobic/aerobic system. *Journal of American Science* 7(3): 485-492.
- Talbot, G., Topp, E., Palin, M. F., Massé, D. I. (2008). Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water Research* 42(3): 513-37.
- Tandukar, M., Ohashi, A., Harada, H. (2007). Performance comparison of a pilot scale UASB and DHS system and activated sludge process for the treatment of municipal wastewater. *Water Research* 41: 2697-2705.
- Thermo Scientific. (2010). *T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers, 260/280 and 260/230 Ratios. Disponible en:* <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf> (Acceso el 09 de Junio, 2012).
- Thomas, J.G., Nakaishi, L.A. (2006) Managing the complexity of a dynamic biofilm. *Journal of the American Dental Association* 137: 10S-15S.
- Tsushima, I., Yoochatchaval, W., Yoshida, H., Araki, N., Syutsubo, K. (2010). Microbial community structure and population dynamics of granules developed in expanded granular sludge bed (EGSB) reactors for the anaerobic treatment of low-strength wastewater at low temperature. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 45(6): 754-766.
- Turner, P.C., Yomano, L., Jarboe, L., York, S., Bagget, C., Moritz, B., Zentz, E., Shanmugan, K., Ingram, L. (2012). Optical mapping and sequencing of the *Escherichia coli* K011 genome reveal extensive chromosomal rearrangements, and multiple tandem copies of the *Zymomonas mobilis* pdC and adhB genes. *Journal of Industrial Microbiology* 39(4): 629-639.
- Van Hannen, E., Gzward, P., van Agterveld, Gons, H., Ebert, J., Laanbroek, H. (1999). Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology* 65:795-801.

- VandeWalle, J., Goetz, G., Huse, S., Morrison, H., Sogin, M., Hoffmann, R., Yan, K., McLellan, S. (2012). Acinetobacter, Aeromonas and Trichococcus populations dominate the microbial community within urban sewer infrastructure. *Environmental Microbiology* 46: 1-15.
- Venkata Mohan, S., Raghavulu, S. V., Goud, R. K., Srikanth, S., Babu, V. L., Sarma, P. N. (2010). Microbial diversity analysis of long term operated biofilm configured anaerobic reactor producing biohydrogen from wastewater under diverse conditions. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(22): 12208-12215.
- Verhoef, R., de Waard, P., Schols, H.A., Rättö, M., Siika-aho, M., Voragen, A.G. (2002). Structural elucidation of the EPS of slime producing *Brevundimonas vesicularis* sp. isolated from a paper machine. *Carbohydrate Resource* 337(20): 1821–1831.
- Vinuesa, P., Rademaker, J., de Bruijn, F.J. Werner, D. (1998). Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2096-2104.
- Wagner, M., A. Loy, R. Nogueira, U. Purkhold, N. Lee, and H. Daims. 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 665–680.
- Walker, J.M., Rapley, R. (2008). *Molecular Biomethods Handbook*. 2nd Edition. Humana Press.
- Wan, C.-Y., De Wever, H., Diels, L., Thoeye, C., Liang, J.-B., Huang, L.-N. (2011). Biodiversity and population dynamics of microorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water Research*, 45(3): 1129–38.
- Wan, C., Yang, X., Lee, D.-J., Du, M., Wan, F., Chen, C. (2011). Aerobic denitrification by novel isolated strain using as nitrogen source. *Bioresource Technology* 102: 7244–7248.
- Wang, S., Guillen, G., Hoek, E. (2005). Direct observation of microbial adhesion to membranes. *Environmental Science and Technology* 39(17): 6461–6469.
- Wang, Z., Wu, Z., Tang, S. (2009). Extracellular polymeric substances (EPS) properties and their effects on membrane fouling in a submerged membrane bioreactor. *Water research* 43(9): 2504-2512.
- Watanabe, K., Teramoto, M., Futamata, H., Harayama, S. (1998). Molecular detection, isolation and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4396-44-02.
- Watanabe, T., Kimura, M., Asakawa, S. (2006). Community structure of methanogenic archaea in paddy field soil under double cropping (rice–wheat). *Soil Biology and Biochemistry* 38(6): 1264-1274.
- Wisniewski, C., Grasmick, A., (1998). Floc size distribution in a membrane bioreactor and consequences for membrane fouling. *Colloids Surface* 138: 403–411.
- Woese, C.R., Mandelco, L., Yang, D., Gherna, R., Madigan, M.T. (1990). The case for relationship of the flavobacteria and their relatives to the green sulfur bacterias. *Systematic Applied Microbiology* 13: 258-262.

- Wu, B., Yi, S., Fane, A.G. (2011). Microbial behaviors involved in cake fouling in membrane bioreactors under different solids retention times. *Bioresource Technology* 102: 2511–2516.
- Xia, S., Guo, J.F., Wang, R.C. (2008). Performance of a pilot-scale submerged membrane bioreactor (MBR) in treating bathing wastewater. *Bioresource Technology* 99: 6834–6843.
- Xia, S., Li, J., He, S., Xie, K., Wang, X., Zhang, Y., Duan, L. (2010). The effect of organic loading on bacterial community composition of membrane biofilms in a submerged polyvinyl chloride membrane bioreactor. *Bioresource Technology* 101(17): 6601-6609.
- Xuan, W., Bin, Z., Zhiqiang, S., Zhigang, Q., Zhaoli, C., Min, J., Junwen, L., Jingfeng, W., 2010. The EPS characteristics of sludge in an aerobic granule membrane bioreactor. *Bioresource Technology* 101(21): 8046–8050.
- Yamada, T., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y. (2006). *Anaerolinea thermophila* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes Anaerolineae classis nov. and Caldilineae classis nov. in the bacterial phylum *Chloroflexi*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 56(6): 1331-1340.
- Yamato, N., Kimura, K., Miyoshi, T., Watanabe, Y. (2006). Difference in membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs) caused by membrane polymer materials. *Journal of Membrane Science* 280 (1-2): 911–919.
- Yeon, K., Yun, M., Park, J., Lee, C.K., Chun, J., Lim, D.J. (2006). Characterization of biofilm structure and its effect on membrane permeability in MBR for dye wastewater treatment. *Water Research* 40: 45 – 52.
- Yu, R., Flanders, J., Mack, E., Turner, R., Mirza, M., Barkay, T. (2012). Contribution of coexisting sulfate and iron reducing bacteria to methylmercury production in freshwater river sediments. *Environmental Science and Technology* 46(5): 2684-2691.
- Yu, Z., García-González, R., Schanbacher, F. L., Morrison, M. (2008). Evaluations of different hypervariable regions of archaeal 16S rRNA genes in profiling of methanogens by Archaea-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology* 74(3): 889-93.
- Yu, Z., Morrison, M. (2004). Comparisons of Different Hypervariable Regions of rrs Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 70(8): 4800-4806.
- Zhang, D., Zhu, W., Tang, C., Suo, Y., Gao, L., Yuan, X., Wang, X., Cui, Z. (2011). Bioreactor performance and methanogenic population dynamics in a low-temperature (5- 18°C) anaerobic fixed-bed reactor. *Bioresource Technology* 104: 136-143.
- Zhang, J., Chua, H.C., Zhou, J., Fane, A.G. (2006a). Effect of sludge retention time on membrane bio-fouling intensity in a submerged membrane bioreactor. *Separation Science Technology* 41: 1313–1329.

Zhang, K., Choi, H., Dionysiou, D.D., Sorial, G.A., Oerther, D.B. (2006b). Identifying pioneer bacterial species responsible for biofouling membrane bioreactors. *Environmental Microbiology* 8 (3): 433–440.

Zhao, F., J. Wu, and S. McGrath. 1996. Soil organic sulphur and its turnover, p. 467–506. In A. Piccolo (ed.), *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.

Zinder SH. 1993. Physiological ecology of methanogens. In: Ferry JG, editor. *Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry and genetics*. New York: Chapman & Hall. p 128–206.

ANEXO 1. Métodos de extracción de ADN

Método propuesto por Klocke *et al.*, 2003.

La muestra se somete a lavados con una solución tampón salina-EDTA 0.15M, que contiene 30-40 mg de PVPP. Para llevar a cabo la lisis enzimática de las células se agregan 20 µl de una solución de lisozima (10 mg/mL). Posteriormente se incuba a 37°C por 30 min., y después se agregan 20 µL de una solución al 1% p/p de solución de proteinasa K y 100 µL de una solución 10% p/v de SDS. Luego de eso, las muestras se incuban a 65°C durante 45 min. Para asegurar la lisis completa de las células, las muestras se someten a 3 pasos de congelación-descongelación. Luego se centrifugan las muestras a 7500g por 10 min. Dependiendo del grado de coloración “café” en las muestras, se llevan a cabo uno o dos pasos de extracción agregando un volumen igual al de la muestra de una mezcla 24:1 v/v de cloroformo-isopentilalcohol. El ADN extraído se precipita agregando 0.25 volúmenes de acetato de sodio 3M y un volumen de isopropanol. Para asegurar la precipitación completa del ADN de las muestras, éstas se conservan a 20°C durante toda la noche. El ADN se recupera por centrifugación a 20,800g por 10 min., y se lava dos veces con etanol al 70% v/v, para finalmente tirar el sobrenadante y resuspender el precipitado en una solución tampón Tris/HCl 10 mM (pH 8.0). Las muestras ya listas se guardan en congelación a -20°C hasta su uso final.

Kit de extracción Genomic DNA Extraction Kit de FAST-ID

- 1) Para la extracción, tomar 1000 µL de la solución de lisis y premezclarla con 30 µL de la solución de proteinasa K.
- 2) En uno de los viales de 2 mL agregar 200 mg de muestra y homogenizarla mezclándola con 1000 µL de la solución preparada en el paso anterior.
- 3) Colocar en el vórtex por 30 s.
- 4) Incubar a 65 °C por 10 a 30 minutos.
- 5) Centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos.
- 6) Tomar 500 µl del sobrenadante y transferirlo a un nuevo vial de 2 mL.
- 7) Agregar un volumen igual al de la muestra de la solución de “Genomic Bind” y agitar en el vórtex.
- 8) Centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos.
- 9) Pasar el sobrenadante a través de una columna “DNA binding”. Centrifugar a 10,000 rpm por 2 minutos y desechar lo que pase a través de la columna.
- 10) Lavar el retenido en la columna con 1000 µl de “Genomic Wash”.
- 11) Lavar tres veces con 1000 µl de etanol al 75% y desechar lo que pase por la columna.
- 13) Colocar la columna en un nuevo vial de 1.5 mL.
- 14) Agregar 50 µL de una solución tampón TE 1X, e incubar de 5 a 10 minutos a 65°C.
- 15) Centrifugar a 10,000 rpm por 30 segundos y coleccionar el ADN eluído. Descartar la columna.

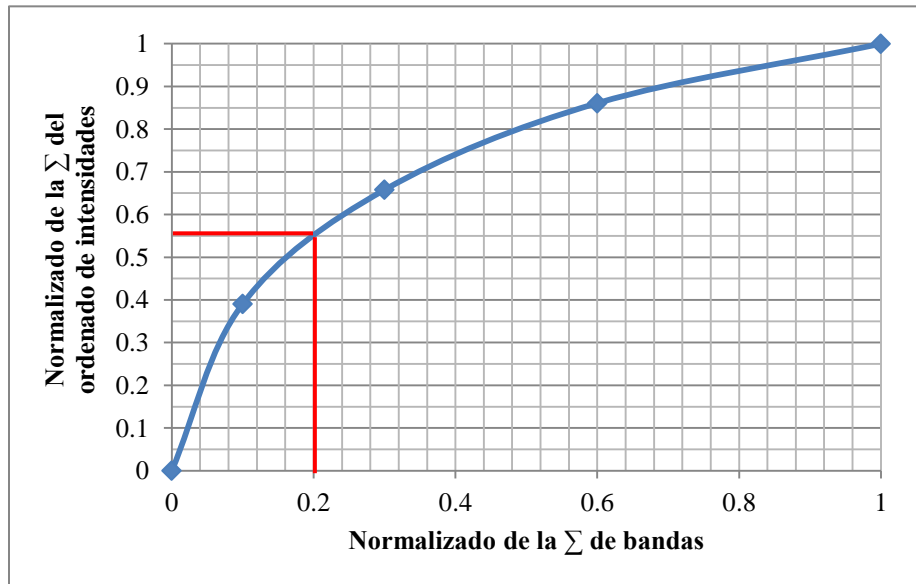
Kit de extracción Power Soil de MoBio

- 1) Colocar la muestra en los tubos “Power Bead Tubes”.
- 2) Mezclar en el vórtex por 30 segundos.
- 3) Agregar 60 μL de la solución C1 e invertir el tubo varias veces para mezclar.
- 4) Asegurar los tubos al vórtex y dejarlos mezclando a la velocidad máxima por 10 minutos.
- 5) Centrifugar los tubos a 10,000 g por 30 segundos.
- 6) Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 2 mL. (no más de 500 μL)
- 7) Añadir 250 μL de la solución C2 y colocar en el vórtex por 5 segundos. Incubar a 4°C por 5 minutos.
- 8) Centrifugar a 10,000 g por 1 minuto.
- 9) Sin tocar el precipitado, transferir no más de 600 μL a un tubo nuevo de 2 mL.
- 10) Agregar 200 μL de la solución C3 y mezclar en el vórtex. Incubar a 4°C por 5 minutos.
- 11) Centrifugar a 10,000 g por 1 minuto.
- 12) Sin tocar el precipitado, transferir no más de 750 μL a un tubo nuevo de 2 mL.
- 13) Agregar 1200 μL de la solución C4 y mezclar en el vórtex.
- 14) Tomar 675 μL y pasarlos a través de un tubo “Spin filter”, centrifugando a 10,000 g durante un minuto. Desechar el remanente. Repetir este procedimiento hasta que se haya pasado toda la muestra.
- 15) Agregar 500 μL de la solución C5 y centrifugar por 30 segundos a 10,000 g. Descartar el remanente.
- 16) Volver a centrifugar a 10,000 g por 1 minuto.
- 17) Colocar cuidadosamente la columna en un tubo nuevo de 2 mL.
- 18) Agregar 100 μL de la solución C6 en el centro de la columna y centrifugar por 30 segundos a 10,000 g.
- 19) Desechar la columna y guardar el ADN extraído bajo congelación (-20 a -80°C) hasta su uso.

ANEXO 2. Cálculos para el índice de funcionalidad (Fo).

LODO FILTRACIÓN CONTINUA 8 HORAS.

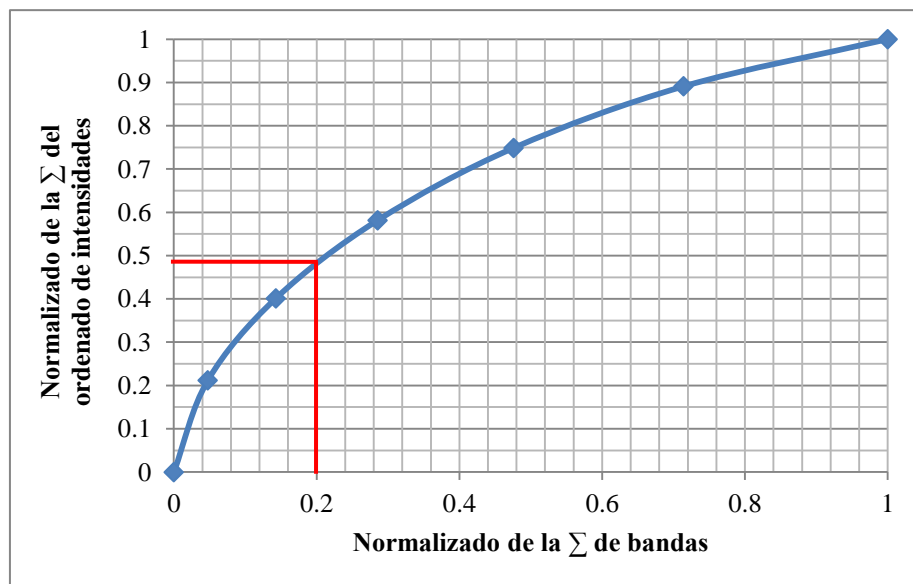
No. de banda	Σ de bandas	Intensidad de la banda	Ordenado de acuerdo a las intensidades de cada banda	Σ del ordenado de intensidades	Normalizado de la Σ de bandas (X)	Normalizado de la Σ del ordenado de intensidades (Y)
1	1	704.688	1978.875	1978.875	0.10	0.39
2	3	1028.125	1353.063	3331.938	0.30	0.66
3	6	1978.875	1028.125	4360.063	0.60	0.86
4	10	1353.063	704.688	5064.751	1.00	1.00



Fo de 0.56 aproximadamente.

MEMBRANA FILTRACIÓN CONTINUA 8 HORAS.

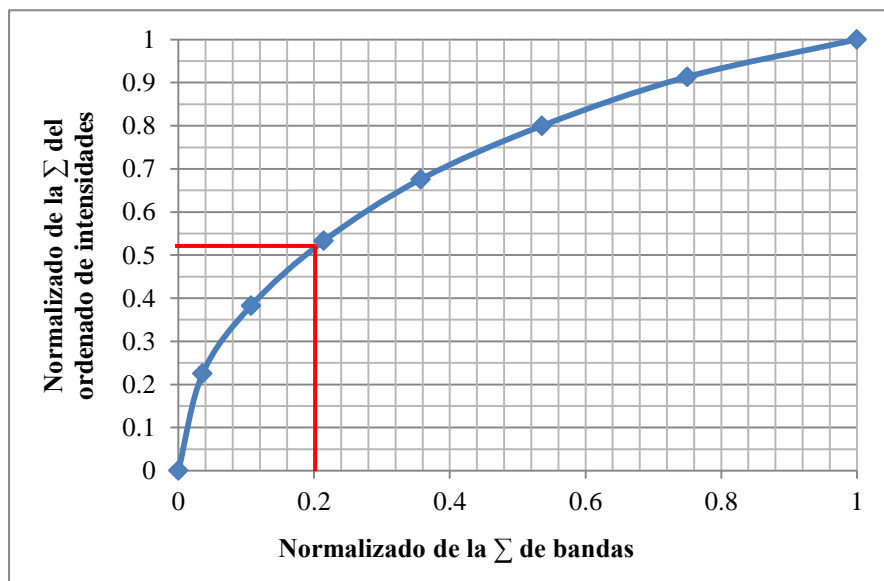
No. de banda	Σ de bandas	Intensidad de la banda	Ordenado de acuerdo a las intensidades de cada banda	Σ del ordenado de intensidades	Normalizado de la Σ de bandas (X)	Normalizado de la Σ del ordenado de intensidades (Y)
1	1	668.188	1299.5	1299.5	0.05	0.21
2	3	1025.625	1162.625	2462.125	0.14	0.40
3	6	1108.375	1108.375	3570.5	0.29	0.58
4	10	1162.625	1025.625	4596.125	0.48	0.75
5	15	1299.5	872.563	5468.688	0.71	0.89
6	21	872.563	668.188	6136.876	1.00	1.00



Fo de 0.48 aproximadamente.

LODO FILTRACIÓN CONTINUA 4 HORAS.

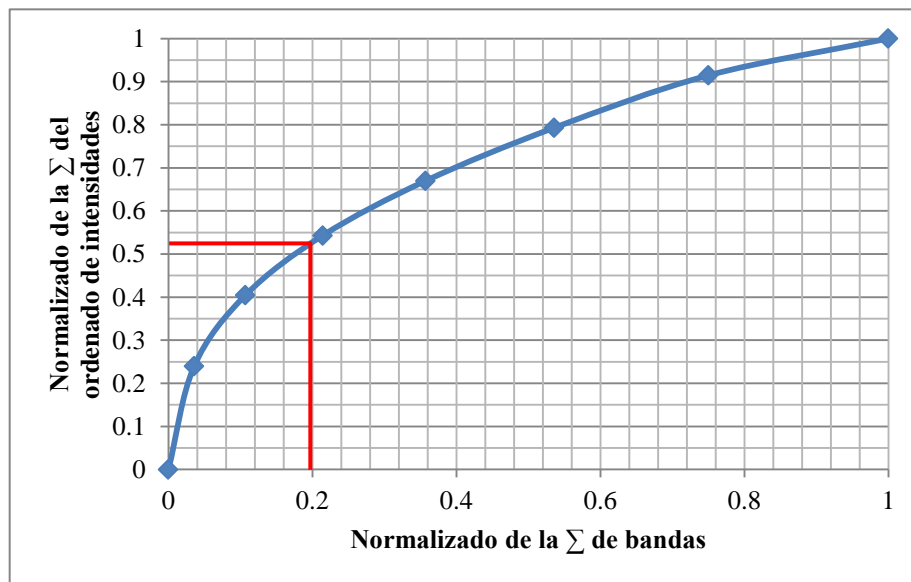
No. de banda	Σ de bandas	Intensidad de la banda	Ordenado de acuerdo a las intensidades de cada banda	Σ del ordenado de intensidades	Normalizado de la Σ de bandas (X)	Normalizado de la Σ del ordenado de intensidades (Y)
1	1	819.313	2131	2131	0.04	0.23
2	3	1075.875	1491.938	3622.938	0.11	0.38
3	6	1173.625	1424.375	5047.313	0.21	0.53
4	10	1491.938	1354.688	6402.001	0.36	0.68
5	15	2131	1173.625	7575.626	0.54	0.80
6	21	1424.375	1075.875	8651.501	0.75	0.91
7	28	1354.688	819.313	9470.814	1.00	1.00



Fo de 0.52 aproximadamente.

MEMBRANA FILTRACIÓN CONTINUA 4 HORAS.

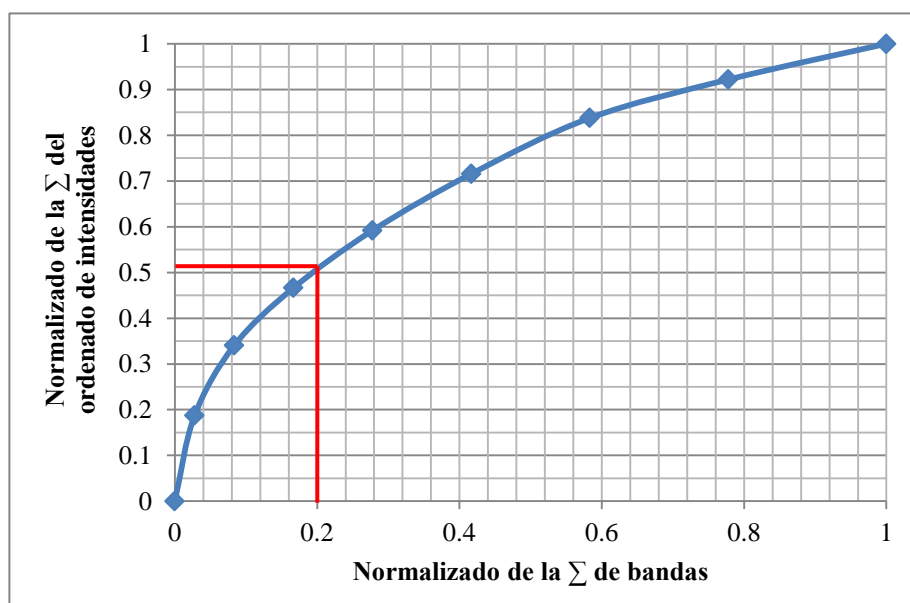
No. de banda	Σ de bandas	Intensidad de la banda	Ordenado de acuerdo a las intensidades de cada banda	Σ del ordenado de intensidades	Normalizado de la Σ de bandas (X)	Normalizado de la Σ del ordenado de intensidades (Y)
1	1	626.063	1756.063	1756.063	0.04	0.24
2	3	929.188	1209.188	2965.251	0.11	0.40
3	6	1209.188	1012.313	3977.564	0.21	0.54
4	10	901.313	929.188	4906.752	0.36	0.67
5	15	1012.313	901.313	5808.065	0.54	0.79
6	21	1756.063	891.000	6699.065	0.75	0.91
7	28	891.000	626.063	7325.128	1.00	1.00



Fo de 0.53 aproximadamente.

LODO FILTRACIÓN INTERMITENTE SIN NITRÓGENO.

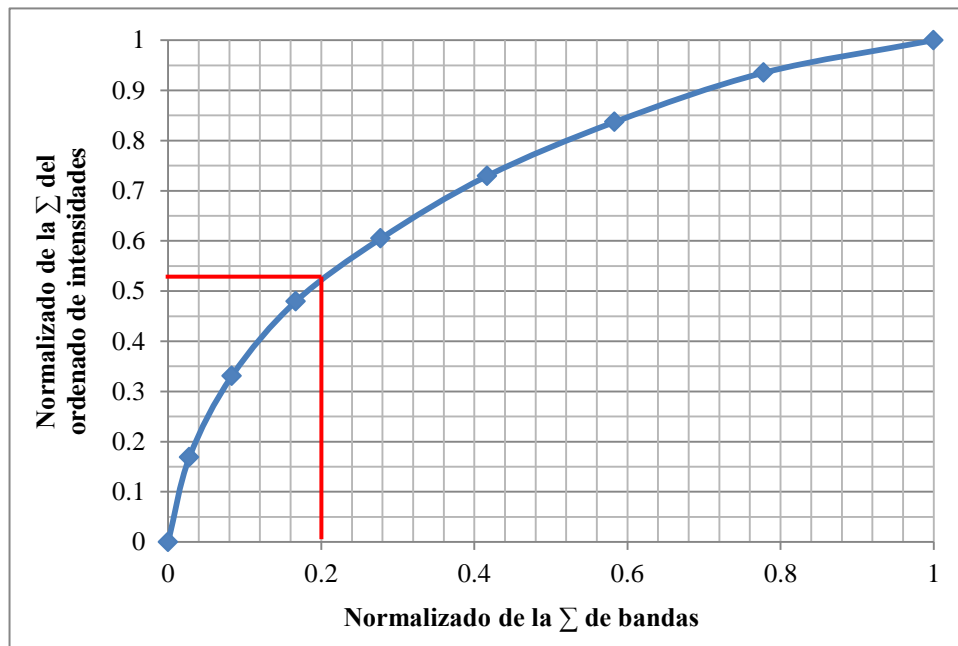
No. de banda	Σ de bandas	Intensidad de la banda	Ordenado de acuerdo a las intensidades de cada banda	Σ del ordenado de intensidades	Normalizado de la Σ de bandas (X)	Normalizado de la Σ del ordenado de intensidades (Y)
1	1	1060.188	2539.5	2539.5	0.03	0.19
2	3	1139	2074.875	4614.375	0.08	0.34
3	6	1680.375	1708.438	6322.813	0.17	0.47
4	10	1656.438	1702.25	8025.063	0.28	0.59
5	15	1702.25	1680.375	9705.438	0.42	0.72
6	21	1708.438	1656.438	11361.876	0.58	0.84
7	28	2074.875	1139	12500.876	0.78	0.92
8	6	2539.5	1060.188	13561.064	1.00	1.00



Fo de 0.51 aproximadamente.

MEMBRANA FILTRACIÓN INTERMITENTE 10-1 SIN NITRÓGENO.

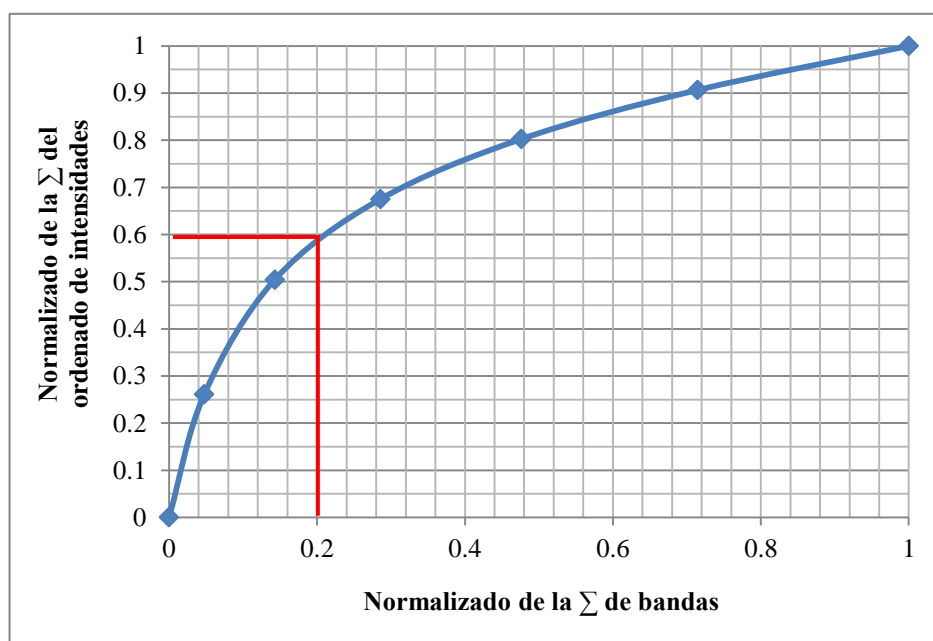
No. de banda	Σ de bandas	Intensidad de la banda	Ordenado de acuerdo a las intensidades de cada banda	Σ del ordenado de intensidades	Normalizado de la Σ de bandas (X)	Normalizado de la Σ del ordenado de intensidades (Y)
1	1	740.688	1928.125	1928.125	0.03	0.17
2	3	1848.938	1848.938	3777.063	0.08	0.33
3	6	1431.813	1693.25	5470.313	0.17	0.48
4	10	1693.25	1431.813	6902.126	0.28	0.60
5	15	1928.125	1422.00	8324.126	0.42	0.73
6	21	1119.188	1229.063	9553.189	0.58	0.84
7	28	1422.00	1119.188	10672.377	0.78	0.94
8	36	1229.063	740.688	11413.065	1.00	1.00



Fo de 0.52 aproximadamente.

MEMBRANA FILTRACIÓN INTERMITENTE 4-1 SIN NITRÓGENO.

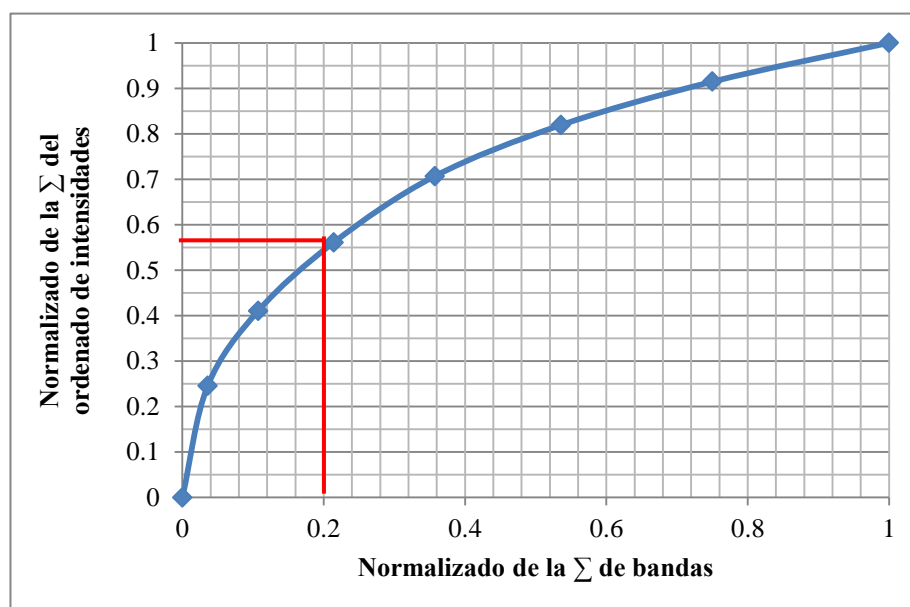
No. de banda	Σ de bandas	Intensidad de la banda	Ordenado de acuerdo a las intensidades de cada banda	Σ del ordenado de intensidades	Normalizado de la Σ de bandas (X)	Normalizado de la Σ del ordenado de intensidades (Y)
1	1	696.125	1944.25	1944.25	0.05	0.26
2	3	1944.25	1808	3752.25	0.14	0.50
3	6	1808	1272.25	5024.5	0.29	0.68
4	10	1272.25	948.125	5972.625	0.48	0.80
5	15	948.125	773.438	6746.063	0.71	0.91
6	21	773.438	696.125	7442.188	1.00	1.00



Fo de 0.59 aproximadamente.

LODO FILTRACIÓN INTERMITENTE CON NITRÓGENO.

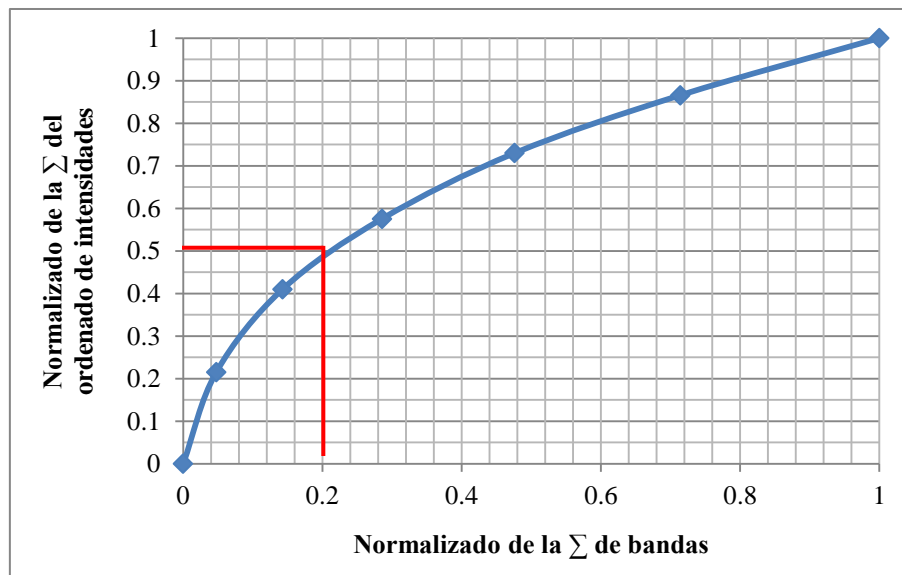
No. de banda	Σ de bandas	Intensidad de la banda	Ordenado de acuerdo a las intensidades de cada banda	Σ del ordenado de intensidades	Normalizado de la Σ de bandas (X)	Normalizado de la Σ del ordenado de intensidades (Y)
1	1	1024.563	2940.438	2940.438	0.04	0.25
2	3	1145.000	1980.625	4921.063	0.11	0.41
3	6	1349.063	1811.000	6732.063	0.21	0.56
4	10	2940.438	1747.063	8479.126	0.36	0.71
5	15	1980.625	1349.063	9828.189	0.54	0.82
6	21	1811.000	1145.000	10973.189	0.75	0.91
7	28	1747.063	1024.563	11997.752	1.00	1.00



Fo de 0.55 aproximadamente.

MEMBRANA FILTRACIÓN INTERMITENTE 10-1 CON NITRÓGENO.

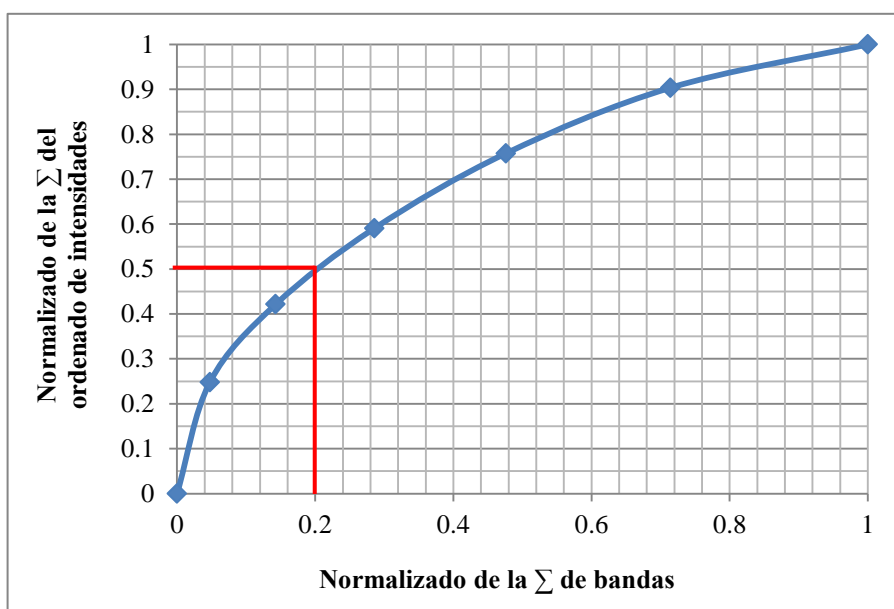
No. de banda	Σ de bandas	Intensidad de la banda	Ordenado de acuerdo a las intensidades de cada banda	Σ del ordenado de intensidades	Normalizado de la Σ de bandas (X)	Normalizado de la Σ del ordenado de intensidades (Y)
1	1	844.125	1177.625	1177.625	0.05	0.22
2	3	904.813	1065.75	2243.375	0.14	0.41
3	6	1065.75	904.813	3148.188	0.29	0.58
4	10	1177.625	844.125	3992.313	0.48	0.73
5	15	743.438	743.438	4735.751	0.71	0.87
6	21	733.188	733.188	5468.939	1.00	1.00



Fo de 0.48 aproximadamente.

MEMBRANA FILTRACIÓN INTERMITENTE 4-1 CON NITRÓGENO.

No. de banda	Σ de bandas	Intensidad de la banda	Ordenado de acuerdo a las intensidades de cada banda	Σ del ordenado de intensidades	Normalizado de la Σ de bandas (X)	Normalizado de la Σ del ordenado de intensidades (Y)
1	1	715.188	1840.938	1840.938	0.05	0.25
2	3	1082.5	1283.688	3124.626	0.14	0.42
3	6	1254.375	1254.375	4379.001	0.29	0.59
4	10	1840.938	1236.813	5615.814	0.48	0.76
5	15	1236.813	1082.5	6698.314	0.71	0.90
6	21	1283.688	715.188	7413.502	1.00	1.00



Fo de 0.50 aproximadamente.

ANEXO 3. Resultados generales de la operación del sistema BRAMS.

Como ya se mencionó en la metodología, el sistema BRAMS fue alimentado con un agua residual municipal sintética, con una DQO total inicial de aproximadamente $450 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, pH de 7.5 ± 0.5 , sólidos totales de $1060 \pm 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y sólidos suspendidos volátiles de $8.9 \pm 5.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Parámetro	Filtración continua			
	TRH 8 horas		TRH 4 horas	
	Efluente	Permeado	Efluente	Permeado
Duración de las pruebas (días)	12		3.6	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	21.7 ± 0.7	21.7 ± 0.7	18.8 ± 1.1	19.0 ± 0.7
pH (unidades)	8.0 ± 0.1	7.3 ± 0.1	7.9 ± 0.1	8.2 ± 0.3
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	378.2 ± 37.8	135.4 ± 162.8	559.0 ± 11.9	581.0 ± 45.0
DQO total ($\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$)	42.6 ± 10.9	16.6 ± 7.9	45.0 ± 8.3	28.1 ± 10.7
DQO soluble ($\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$)	17.8 ± 3.9	8.3 ± 5.5	22.1 ± 7.8	24.3 ± 9.2
Sólidos Totales ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	855.9 ± 35.1	303.4 ± 229.0	864.7 ± 42.6	644.74 ± 297.8
Sólidos Suspendidos Totales ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	34.9 ± 4.5	7.0 ± 1.4	43.2 ± 11.6	22.8 ± 8.3
Sólidos Suspendidos Volátiles ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	26.4 ± 4.7	3.8 ± 3.8	29.2 ± 12.3	11.6 ± 6.8

Parámetro	Filtración intermitente							
	10 on – 1 off sin N_2		10 on – 1 off con N_2		4 on – 1 off sin N_2		4 on – 1 off con N_2	
	Efluente	Permeado	Efluente	Permeado	Efluente	Permeado	Efluente	Permeado
Duración de las pruebas (días)	1.3		8.7		3.2		17	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	21.0 ± 1.0	21.0 ± 1.0	24.2 ± 1.2	24.4 ± 1.3	24.0 ± 1.0	24.3 ± 1.5	22.3 ± 1.3	22.2 ± 1.2
pH (unidades)	7.92 ± 0.05	8.27 ± 0.04	8.13 ± 0.09	8.40 ± 0.10	8.03 ± 0.18	8.01 ± 0.21	8.4 ± 0.1	8.5 ± 0.1
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)	536.0 ± 18.3	578.7 ± 11.5	519.0 ± 21.1	546.0 ± 23.8	556.0 ± 18.2	566.0 ± 20.8	533.4 ± 11.7	540.0 ± 16.2
DQO total ($\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$)	33.4 ± 2.8	16.4 ± 4.5	29.1 ± 6.5	9.5 ± 3.4	24.2 ± 3.1	17.7 ± 4.4	33.6 ± 5.6	7.7 ± 2.9
DQO soluble ($\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$)	5.78 ± 0.7	4.73 ± 1.0	6.6 ± 1.8	6.1 ± 1.3	15.07 ± 1.3	14.70 ± 5.6	4.9 ± 3.5	4.9 ± 3.4
Sólidos Totales ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	864.0 ± 21.1	793.3 ± 26.6	860.3 ± 19.3	830.8 ± 20.5	834.0 ± 12.2	832.7 ± 38.1	853.8 ± 25.7	833.0 ± 17.2
Sólidos Suspendidos Totales ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	21.3 ± 5.5	<LD	29.8 ± 2.7	<LD	19.0 ± 1.7	<LD	28.2 ± 5.5	<LD
Sólidos suspendidos volátiles ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	15.7 ± 2.1	<LD	19.8 ± 4.4	<LD	14.7 ± 3.2	<LD	23.7 ± 7.5	<LD

*LD, límite de detección.