



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Técnicas moleculares para la caracterización microbiológica de los procesos de eliminación de nutrientes en las EDARs

Molecular techniques for microbiological characterization of nutrient removal processes at WWTPs

Tarik Abzazou

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Técnicas moleculares para la caracterización
microbiológica de los procesos de eliminación de
nutrientes en las EDARs

Molecular techniques for microbiological
characterization of nutrient removal processes at
WWTPs

Por/ By Tarik Abzazou

Septiembre 2016



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Universitat de Barcelona
Facultad de Biología
Departamento de Microbiología
Programa de Doctorado: Microbiología
Ambiental y Biotecnología
TESIS DOCTORAL/THESIS

Técnicas moleculares para la caracterización microbiológica de los procesos de eliminación de nutrientes en las EDARs

Molecular techniques for microbiological characterization of nutrient removal processes at WWTPs

Memoria presentada por
Tarik Abzazou Souissa

Para optar al grado de
Doctor en Microbiología

Tesis realizada bajo la codirección de la Dra. Rosa María Araujo Boira y Dr. Humbert Salvadó i Cabré en los departamentos de Microbiología y Biología Animal de la Facultad de Biología, Universidad de Barcelona.

Directora

Co-director

Autor

Rosa María Araujo Boira

Humbert Salvadó i Cabré

Tarik Abzazou

A mis padres

Agradecimientos

Por fin llegó el momento de escribir en este apartado, uno de los pocos sitios donde puedes escribir libremente, sin seguir ningún *Guidline* y sin tener que corregir posteriormente ninguna *major or minor revision*. Por muy difícil que ha sido esta tesis, por no decir imposible, llegó el momento de dedicarla a las personas con que he vivido de todo. Por qué sin personas solo somos unas máquinas.

Mis padres, sé que la probabilidad de haberme nacido en este mundo era del 0.0000000000000025%, lo que significa que era un milagro poder nacer y vivir en este mundo. Gracias padres por hacer esta probabilidad algo real. Cuando digo padres, la familia no se completa sin mencionar a mis queridos hermanos, os dedico esta memoria en nombre de todo vosotros, desde la peque **Soukaina**, **Adil** hermanito por no decir mi gemelo, **Sanae**, el gran corazón que tienes no cabe en ningún lugar, **Karima** llegar a este nivel tiene mucho mérito y gran parte de ello es gracias a ti, **Aziz** el gran hermano nunca mejor dicho, y mi **Fatiha** tú me inscribiste en la UB el primer día, lo recuerdo muy bien gracias a todos por ser mis hermanos y mis amigos a la vez.

En primer lugar quiero dedicar esta tesis a mis directores Dra. Rosa María Araujo y el Dr. Humbert Salvadó i Cabré. Sin ustedes este trabajo no hubiera llegado a este punto, gracias por ayudarme en todos los aspectos tanto a nivel científicos como personal. Gracias por darme la oportunidad de formar parte de vuestro grupo y de compartir con ustedes uno de los mejores periodos académicos. Gracias por confiar en mi persona.

Compis del 8 y del Dep,

Ayalke, ¡amigo! mmm bueno, mejor dicho hermano que no parió mi madre, sabes que sin ti esta tesis no hubiera sido posible ni de lejos sin tu apoyo, siempre me acompañaste en los buenos y los malos momentos. Y siempre te he consultado en casi todo lo profesional como lo personal. **Jesus**, si si tú “**Chuss**”, a veces un buen arranque en la vida te empuja hacia adelante y tú fuiste uno quien me ayudó a seguir adelante sin tirar la toalla nunca, nos une más que una camiseta blanca y lo sabes. **Bayron**, me gustaría si estuvieras aquí en este día especial, siempre me has aconsejado como un buen hermano, nunca olvidaré los cafés de la primera hora de la mañana, estoy seguro que lo tomaremos de nuevo. **Sandri**, siempre sentí que estabas en mi grupo no sé por qué, **Annita**, dicen que a veces uno puede enamorarse de

una ciudad entera por sólo una persona, simplemente por el hecho de verte y escucharte me enamora del catalá y de Cataluña. Una persona abierta, alegre, y nunca le falta clase en tot.

Xavi, qué se puede decir en tu presencia molestas tanto y siempre deseamos que aparezca algún evento o conferencia para que te largues jejejejee pero en tu ausencia et trobem a falta, y el laboratorio se queda muerto. **Martus** y **Lauri** la profesora, me alegro mucho haber pasado tiempo junto a vosotras en Lab, **Alex**, siempre dudaba de si verdaderamente hacías el triatlón, no lo sé, han sido buenos momentos juntos. **Eloy**, mi profesor de estadísticas y de vida en general me alegro mucho haberte conocido y ojala que te hubieras incorporado hace tiempo. **Pablo**, siempre blanca, **Ayuri** verte y escuchar tu sonrisa es el mejor alivio para comenzar un buen día en el dep. **Wiliam** me adelantaste pero no pasa nada, eres gran hermano. **Helena**, qué mejor fichaje puede tener uno en un departamento, me hubiera gustado pasar más tardes de viernes tomando y riendo del resto de la semana. La peña de secretaría, Manolo, Susana, Bea y Macu gracias por soportarnos durante todos estos años y por vuestro alegre toque que nunca ha faltado en los festivales. Dr. **Patxi** han sido una maravilla las conversaciones contigo durante estos años, y seguramente nos tocará el gordo algún día con el tesoro árabe y tu tranquilo me encargaré de resolver la enigma y las letras en árabe. **Javier** no sé cómo agradecer tu apoyo durante todos estos años. También me gustaría dedicar la presente memoria a todos los compis de la fase I, uno por uno. Finalmente, quiero dar las gracias a una persona especial **Montse**, gracias por formar parte de mi vida, aunque ha sido todo rápido, pero la vida se mide en sensaciones y sentimientos y no en minutos...

Abreviaciones

OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
ODM	Objetivo de Desarrollo del Millenio
DBO ₅	Demanda Biológica de Oxígeno transcurridos cinco días de reacción
DQO	Demanda Química de Oxígeno
EDARs	Estaciones de Depuración de Aguas Residuales
SS	Sólidos en Suspensión
N	Nitrógeno
P	Fósforo
NH ₄ -N	Nitrógeno Amoniacal Total
ANAMMOX	<i>Anaerobic Ammonium Oxidation</i>
AOB	<i>Ammonium Oxidizing Bacteria</i>
NOB	<i>Nitrite Oxidizing Bacteria</i>
AOA	<i>Ammonia Oxidizing Archaea</i>
OD	Oxígeno Disuelto
CI	Carbono Inorgánico
EBPR	<i>Enhanced Biological Phosphorus Removal</i>
PAOs	<i>Polyphosphate-Accumulating Organisms</i>
FISH	Fluorescence <i>In situ</i> Hybridization
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
IP	Ioduro de Propidio
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
MBRR	<i>Moving Bed Biofilm Reactor</i>
EAAS	<i>Extended Aeration Activated sludge</i>
SSV	Sólidos en Suspensión Volátiles
MLSS	<i>Mixed Liquor Suspended Solids</i>
TRH	Tiempo de Retención Hidráulico

cg	copies genómicas
LDM	Límite de Detección Mínimo
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>

Contenido

Agradecimientos	i-ii
Abreviaciones	iii-iv
Contenido	v-vi
1. Introducción general	3-44
1.1. Aguas residuales urbanas	3
1.1.1. Impacto ambiental.....	4
1.1.2. Contaminación microbiológica	6
1.2. Tratamiento de aguas residuales.....	9
1.2.1. Línea de agua	11
1.2.1.1. Pretratamiento.....	11
1.2.1.2. Tratamiento primario	12
1.2.1.3. Tratamiento secundario	12
1.2.1.4. Tratamiento terciario	14
1.2.2. Línea de fango.....	16
1.3. Monitoreo de comunidades microbianas.....	21
1.3.1. Bacterias totales	22
1.3.2. Bacterias nitrificantes.....	24
1.3.2.1. Bacterias amonio-oxidantes.....	24
1.3.2.2. Bacterias nitrito-oxidantes	27
1.3.3. Arqueas	28
1.3.4. Microorganismos acumuladores de fósforo	31
1.4. Técnicas microbiológicas moleculares.....	34
1.4.1. Citometría de flujo	34
1.4.2. Hibridación fluorescente <i>In Situ</i> “FISH”	39
1.4.3. PCR cuantitativa “qPCR”	41
2. Objetivos	47-48
3. Resultados	51-124
3.1. Publicaciones.....	51

3.1.1.	Informe de participación.....	53
3.1.2.	Informe sobre el factor de impacto de las revistas.....	55
3.2.	Capítulo I: <i>Evaluación de las células bacterianas totales en plantas de fangos activos con aireación prolongada mediante citometría de flujo como una herramienta de seguimiento microbiana.....</i>	57
3.3.	Capítulo II: <i>Seguimiento y cuantificación de bacterias nitrificantes en la biopelícula y el licor mixto de una planta de nitrificación parcial piloto MBBR utilizando hibridación fluorescente in situ.....</i>	73
3.4.	Capítulo III: <i>Caracterización de las comunidades microbianas responsables de eliminación de nutrientes en tres sistemas diferentes de EDARs a gran escala utilizando un nuevo enfoque de qPCR.....</i>	87
4.	Discusión general.....	127-149
5.	Conclusiones.....	153-155
6.	Referencias.....	159-179
7.	Anexos.....	183-187

1. Introducción general

1. Introducción general

1.1. Aguas residuales urbanas

El agua en sí, incluida el agua residual, siempre ha sido y seguirá siendo fuente de vida para el ser humano y otros seres vivos. La simplicidad de la molécula del agua, dos átomos de hidrógeno y un átomo de oxígeno (H_2O), y la gran polaridad de su superficie son las principales características que la distinguen del resto de las moléculas de la naturaleza. Según el centro de prensa de la organización mundial de la salud (OMS), 1 600 000 de personas mueren anualmente, principalmente en países en desarrollo, por enfermedades diarreicas (incluida el cólera) atribuibles a la falta de acceso a un agua potable y un saneamiento básico. El 90% de estas muertes se producen en niños menores de 5 años.

Aunque pudiera considerarse que la disponibilidad del agua en el planeta Tierra no es factor limitante pues cubre el 71 % de su superficie, únicamente un 2,5 % es dulce y una buena parte de ella está fuera de nuestro alcance.

Además de los factores naturales como la disponibilidad y el acceso al agua potable, el ser humano se enfrenta a otro desafío, que es la gestión sostenible del agua residual. Según el Objetivo de Desarrollo del Milenio (ODM) de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) sólo 77 países de los 185 de los que se disponen datos han logrado los objetivos fijados por la ONU, en concreto el objetivo 10 relacionado con el suministro seguro de agua y disponibilidad de sistema de saneamiento.

Obviamente, la gestión de las aguas residuales, especialmente las urbanas, está relacionada de forma directa con el nivel de desarrollo socioeconómico de los países, tal y como se aprecia en la figura 1, los países que mejor gestionan las aguas residuales son aquellos países de nivel socioeconómico más elevado.

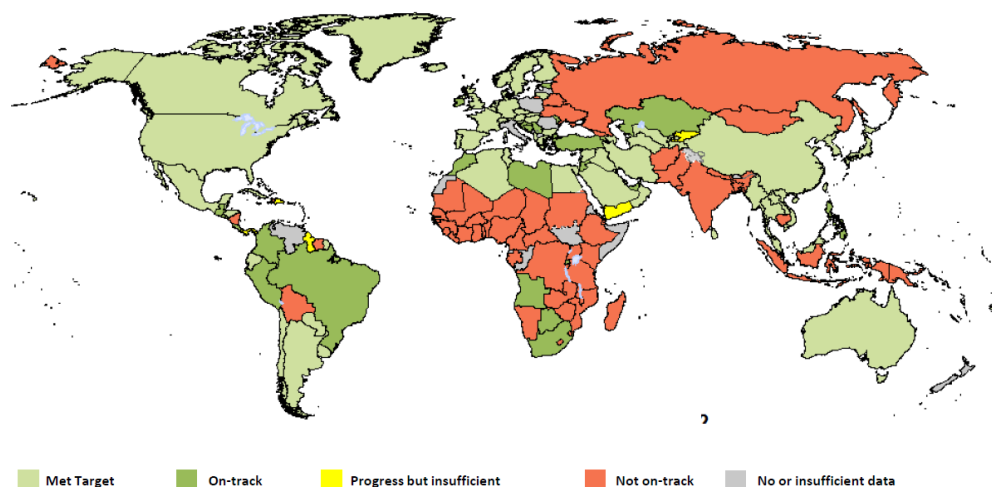


Figura 1: Situación actual del sistema de saneamiento en los distintos países del mundo; 77 países ya han alcanzado la meta de saneamiento de los ODM, 29 están en camino y 79 no están en camino (Eliasson, 2004). Las fronteras y la designación utilizadas en el mapa no implican su reconocimiento oficial de aceptación por parte de UNICEF o de la OMS.

Hoy en día el agua residual urbana una vez tratada ya no se considera como un residuo sin valor, sino como un recurso renovable que puede ser destinado a distintos usos como: usos agrícolas, ambientales, urbanos, recreativos, e incluso como usos para consumo humano directo en algunos países como Namibia o indirecto como en Australia (Khan, 2014). Por ello, tanto en los países desarrollados como algunos que están en vía de desarrollo, la reutilización de las aguas residuales va adquiriendo una mayor importancia y por ello es un tema cada vez más estudiado. No obstante, la reutilización segura de esas aguas o incluso su vertido directo en los ecosistemas requiere el cumplimiento de determinados criterios fisicoquímicos como microbiológicos, los cuales en el caso específico de España, se encuentran recogidos en el Real Decreto 1620/2007.

1.1.1. Impacto ambiental

El agua residual presenta todo tipo de contaminantes que se pueden clasificar en dos grandes conjuntos; contaminantes fisicoquímicos como: los sólidos en suspensión, sedimentables, y filtrables, materia orgánica, nutrientes (Nitrógeno “N”, fósforo “P”, sulfato

“S”), tóxicos, metales pesados, detergentes, HAP (hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc.), y contaminantes microbiológicos como: bacterias, virus, y parásitos, adquiriendo mayor relevancia en estos últimos los agentes patógenos humanos.

Por ello, es necesario el control y el tratamiento de estas aguas. Puesto que el uso de aguas residuales pobremente tratadas así como los vertidos incontrolados pueden tener un elevado impacto negativo tanto en el ser humano como en los ecosistemas receptores.

Los efluentes generados por la actividad humana, principalmente las actividades domésticas, representan las principales fuentes de la carga contaminante del agua natural (Akpor and Muchie, 2013). En la mayoría de los países en vía de desarrollo, el vertido de esas aguas en los sistemas naturales suele realizarse sin ningún tratamiento previo. Se estima que el 95 % de las aguas residuales se vierten directamente en el medio ambiente sin ningún tratamiento previo (Manzano, 2012).

Generalmente, los principales receptores de esas aguas son los ríos, los lagos y los mares. La contaminación reiterada de estos ecosistemas puede resultar en uno de los impactos ambientales más preocupantes, la eutrofización, debido al aporte de materia orgánica con el consiguiente cambio en el flujo materia/energía en el ecosistema. Además, el aporte de materia orgánica conlleva a variaciones sustanciales en la disponibilidad del oxígeno disuelto. Tradicionalmente, dicha disponibilidad se ha considerado como indicador de calidad de las aguas, por lo que la determinación del oxígeno disuelto o de la demanda biológica de oxígeno (DBO_5), demanda química de oxígeno (DQO) y respirometría permite establecer la carga orgánica del agua.

Generalmente, la eutrofización se define principalmente como el crecimiento excesivo de la biomasa acuática, ya sea planctónica como arraigada, en tales niveles que puedan causar interferencias con los usos deseados de la masa del agua (Thomann and Mueller, 1987).

La eutrofización no solo resulta en variaciones poblacionales en la biota, sino que la eutrofización de las aguas conlleva efectos no deseados colaterales tales como: los problemas recreativos y estéticos, condiciones anaeróbicas en la parte inferior de la masa hídrica, mortalidad ocasional de los peces, elevado coste de tratamiento de aguas, etc. (Sperling, 2007). Adicionalmente, la eutrofización puede causar el crecimiento excesivo de

organismos tóxicos como los *Harmful Algal Blooms*, siendo uno de los problemas de ecosistemas acuáticos más estudiado (Diaz and Rosenberg, 2008).

El vertido directo de las aguas residuales en los medios naturales puede ser también reflejado por la bioacumulación de contaminantes (ej. *Persistent Organic Pollutants*), cuyo impacto se produce a escala temporal más larga comparado con la eutrofización. Este parámetro tiempo-espacio de la bioacumulación viene determinado principalmente por la cadena trófica.

1.1.2. Contaminación microbiológica

Las deficiencias en los sistemas de saneamiento tienen graves consecuencias sobre la salud humana ya sea de forma directa o indirecta. En 2004, según la OMS se ha estimado que cada año alrededor de 3.500 millones de personas contraen alguna enfermedad de transmisión hídrica. Situando como la principal causante de muertes, las enfermedades diarreicas. En la figura 2 se muestra la tasa de mortalidad asociada a diarreas de origen hídrico para niños menores de 5 años. Según la figura se puede apreciar la emergencia de disponibilidad de un sistema adecuado de suministro de agua potable y servicio de saneamiento, con lo cual se podría reducir significativamente la mortalidad infantil asociada a infecciones de origen hídrico.

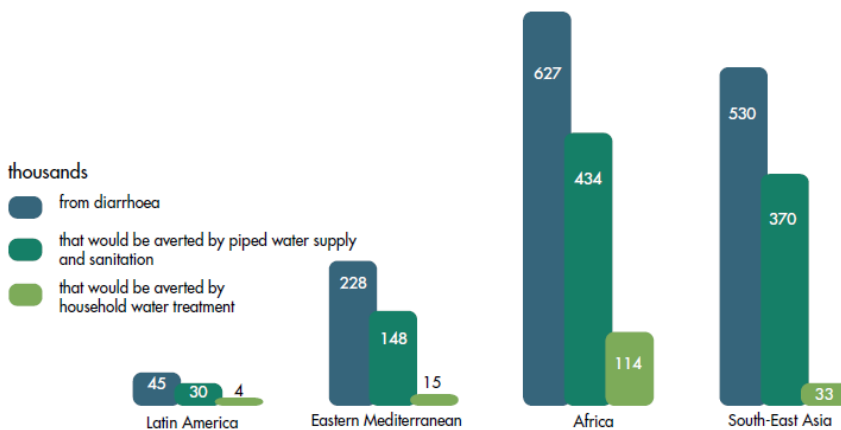


Figura 2: Número anual en miles de muertes de niños menores de 5 años (Bruce Gordon, Richard Mackay, 2004).

Existen diversos tipos de agentes patógenos que pueden transmitirse por el agua de consumo contaminada. Los principales agentes patógenos implicados en las enfermedades de transmisión hídrica se clasifican en tres grandes grupos; parásitos, bacterias y virus. La Tabla 1 proporciona información general sobre los agentes patógenos más importantes en la gestión de sistemas de abastecimiento de agua de consumo. Todos estos agentes infecciosos se propagan principalmente por vía fecal-oral, en la que el agua puede tener un papel intermedio. Por lo tanto, el medio ambiente, el agua, la alimentación, y la falta de higiene son factores de importancia (Ashbolt, 2004). La gama de estos agentes patógenos cambia en función de varios factores como el aumento de las poblaciones de personas y animales, el incremento del uso de aguas residuales, los cambios de los hábitos de la población o de las intervenciones médicas, las migraciones y viajes de la población, y presiones selectivas que favorecen la aparición de agentes patógenos nuevos o mutantes, o de recombinaciones de los agentes patógenos existentes. También existe una considerable variabilidad en la inmunidad de las personas, ya sea adquirida por contacto con un agente patógeno o determinada por factores como la edad, el sexo, el estado de salud y las condiciones de vida.

Tabla 1: Agentes patógenos transmitidos por el agua y su importancia en los sistemas de abastecimiento de agua (WHO, 2008).

Agente patógeno	Importancia para la salud	Persistencia en los sistemas de abastecimiento de agua	Infectividad relativa	Fuente animal importante
Bacterias				
<i>Burkholderia pseudomalle</i>	Baja	Puede proliferar	Baja	No
<i>Campylobacter jejuni, C. coli</i>	Alta	Moderada	Moderada	Sí
<i>Escherichia coli patógenad</i>	Alta	Moderada	Baja	Sí
<i>E. coli enterohemorrágica</i>	Alta	Moderada	Alta	Sí
<i>Legionella spp.</i>	Alta	Prolifera	Moderada	No
<i>Micobacterias no tuberculosas</i>	Baja	Prolifera	Baja	No
<i>Pseudomonas aeruginosae</i>	Moderada	Puede proliferar	Baja	No
<i>Salmonella typhi</i>	Alta	Moderada	Baja	No
<i>Otras salmonelas</i>	Alta	Puede proliferar	Baja	Sí
<i>Shigella spp.</i>	Alta	Corta	Moderada	No
<i>Vibrio cholerae</i>	Alta	Corta	Baja	No
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Alta	Larga	Baja	Sí
Virus				
<i>Adenovirus</i>	Alta	Larga	Alta	No
<i>Adenoviru</i>	Alta	Larga	Alta	No
<i>Virus de la hepatitis A</i>	Alta	Larga	Alta	No
<i>Virus de la hepatitis E</i>	Alta	Larga	Alta	Potencialmente
<i>Norovirus y sapovirus</i>	Alta	Larga	Alta	Potencialmente
<i>Rotavirus</i>	Alta	Larga	Alta	No
Protozoos				
<i>Acanthamoeba spp.</i>	Alta	Larga	Alta	No
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Alta	Larga	Alta	Sí
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Alta	Larga	Alta	No
<i>Entamoeba histolytica</i>	Alta	Moderada	Alta	No
<i>Giardia intestinalis</i>	Alta	Moderada	Alta	Sí
<i>Naegleria fowleri</i>	Alta	Puede proliferar	Alta	No
<i>Toxoplasma gondii</i>	Alta	Larga	Alta	Sí
Helmintos				
<i>Dracunculus medinensis</i>	Alta	Moderada	Alta	No
<i>Schistosoma spp</i>	Alta	Corta	Alta	Sí

Por todo lo expuesto, se comprende la importancia ambiental y sanitaria de disponer un adecuado sistema de saneamiento. El enfoque multidisciplinario de disponer de sistemas de tratamiento de aguas residuales sofisticados es sin duda una de las mejores soluciones para poder alcanzar los objetivos de protección a la población como de los ecosistemas tributarios de estas aguas.

1.2. Tratamiento de aguas residuales

Ya desde la época de la antigua Roma, se ha tratado de aprovechar las aguas residuales en distintas aéreas tales como la agricultura, o el riego de jardines. En la actualidad, disponemos de complejos conjuntos de sistemas depuración de aguas residuales, los cuales consiguen altos rendimientos en términos de calidad fisicoquímica y microbiológica. En Cataluña por ejemplo y según la información actualizada en la página web de la agencia catalana de agua (ACA) en Septiembre de 2016, la agencia cifra en 500 el número de estaciones de depuración de aguas residuales (EDARs) en funcionamiento que dispone actualmente Cataluña y que cubre la práctica totalidad del territorio catalán.

El tratamiento de las aguas residuales también llamado depuración de aguas residuales consiste en la combinación de una serie de procesos fisicoquímicos y biológicos cuyo objetivo es conseguir según las normas y los objetivos establecidos un nivel aceptable de contaminantes físicos, químicos y biológicos. Generalmente, las aguas residuales tratadas tienen como destino final dos posibilidades, la reutilización o vertido en los medios receptores.

En el caso de su reutilización, el agua tratada debe cumplir determinados requisitos que varían en función de su uso, los cuales incluyen, usos urbanos, agrícolas, industriales, recreativos y ambientales. Los criterios de cumplimiento se hallan determinados por la legislación del *REAL DECRETO 1620/2007, de 7 de diciembre*, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas en España.

En el caso de su vertido, los criterios de cumplimiento los establece la *Directiva 91/271/CEE* del Real Decreto español 509/1996, de 15 de marzo (BOE núm. 77, de 29 de marzo). Los criterios de la normativa exigen el tipo de tratamiento función de la zona en la que se realice el vertido (normal, sensible o menos sensible) y también en función del número de habitantes equivalentes de la aglomeración urbana considerada. La definición oficial de habitante equivalente es según indica el *Real Decreto 11/1995* la carga orgánica biodegradable con una demanda bioquímica de oxígeno cinco días (DBO₅), de 60 gramos de oxígeno por día.

Generalmente, la mayoría de los sistemas de tratamiento de las aguas residuales se basan en la combinación de procesos fisicoquímicos y biológicos, y es esta combinación de procesos que proporciona las características del agua residual tratada; afectando a diversos factores; como pueden ser el nivel de tratamiento deseado, el coste del proceso de depuración, y el cumplimiento o no de la legislación según el destino del agua tratada.

Los procesos fisicoquímicos son aquellos procesos que emplean instalaciones, obras de ingeniería y procesos de coagulación-floculación para llevar a cabo la eliminación de distintos contaminantes como materiales inertes (ej. arena, aceites y grasas, plástico, papel, etc.) o contaminantes químicos mediante procesos como coagulación-floculación aplicando productos químicos como sales de hierro y de aluminio.

Respecto al tratamiento de las aguas residuales mediante los procesos biológicos, este se basa principalmente en la actividad biológica de los distintos microorganismos que colonizan éstas aguas como los protistas, hongos, bacterias y arqueas, siendo las bacterias las principales biodegradadoras.

Generalmente, los procesos biológicos en las plantas depuradoras son muy semejantes a los de ecosistemas naturales, donde los microorganismos degradan los contaminantes mediante su actividad enzimática para su posterior asimilación. La degradación de estos contaminantes suele desarrollarse en reactores biológicos bajo control de los diferentes parámetros fisicoquímicos, el diseño de estos reactores como otras partes de las instalaciones depende de varios parámetros como el de habitante equivalente, costo-eficiencia, los criterios marcados por la legislación, etc.

El sistema de tratamiento de aguas residuales más convencional consiste en la utilización de técnicas intensivas (necesitan poca superficie de terreno y tiempos de retención hidráulicos pequeños). Generalmente, en los sistemas de depuración de las EDARs se distinguen dos líneas; línea de agua y línea de fangos (Fig.3).

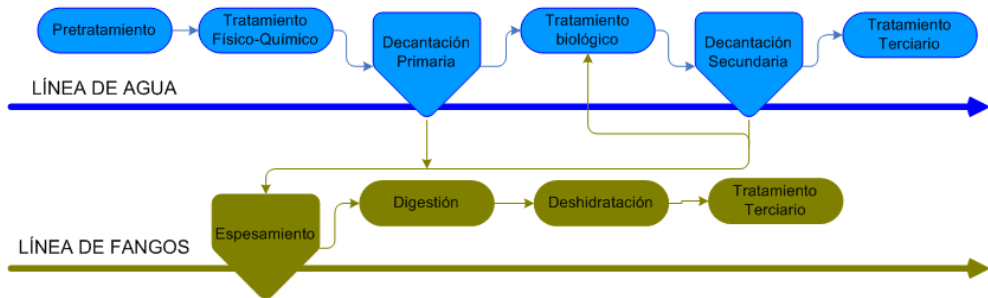


Figura 3: Esquema básico de una depuradora de aguas residuales.

1.2.1. Línea de agua

Generalmente, en una planta depuradora la línea de agua se divide en 4 etapas:

1. Pretratamiento
2. Tratamiento primario
3. Tratamiento secundario
4. Tratamiento terciario

1.2.1.1. Pretratamiento

El objetivo del pretratamiento de las aguas residuales en las EDARs consiste principalmente en la eliminación del agua todo tipo de materiales sólidos (ej. piedras, arena, etc.) que pueden causar serias averías en las instalaciones, como el desgaste de las tuberías y las bombas por abrasión. Además de los materiales sólidos, en la planta llegan aceite y grasas que afectan de forma negativa el funcionamiento de las plantas y sobre todo el tratamiento biológico. Estas materias inertes pueden causar dificultades en la separación de las fases líquidas y sólidas en las aguas, lo que afecta y de forma negativa la actividad de los microorganismos.

Las operaciones del pretratamiento en las EDARs dependen de varios factores como el origen de las aguas residuales (urbana, industrial, etc.), la calidad de las aguas brutas, el tipo de tratamiento posterior en la planta, etc. Generalmente, los pretratamientos más comunes en las EDARs son: desbaste y tamizado, desarenado, desaceitado-desengrasado, y preaireación.

Además, las plantas depuradoras pueden disponer de homogeneizador y sistemas de desviación de aguas de entrada para regular el caudal y la carga entrante.

1.2.1.2. Tratamiento primario

El agua residual una vez pretratada pasa al tratamiento primario, que consiste en la eliminación de los sólidos en suspensión (SS) presentes en el agua mediante procesos físico-químicos. Los SS se pueden dividir en 2 grandes categorías:

- Los sólidos sedimentables: son los que sedimentan al dejar el agua residual en condiciones de reposo durante una hora.
- Los sólidos no sedimentables que incluyen los sólidos coloidales (tamaño entre 3-10 micras).

Una elevada proporción de los SS están constituidos por materia orgánica.

Los procesos físico-químicos habitualmente implicados en el tratamiento primario son; sedimentación, coagulación-floculación y filtración. La sedimentación de los sólidos suele realizarse mediante sedimentadores, mientras los procesos de coagulación-floculación se pueden llevar a cabo mediante la adición de coagulantes y floculantes. Y en cuanto a la filtración existen sistemas de filtración que se basan principalmente en el uso de lechos filtrantes como algunos tipos de arena.

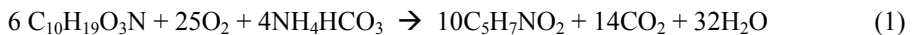
Las características más destacadas del tratamiento primario son: el tiempo de retención que puede variar entre 2 y 4 horas y la tasa de eliminación de los SS (60 – 65 %). De esta manera, el tratamiento primario contribuye en la eliminación hasta 25 - 40 % de la DBO₅. El grado de reducción de éstos índices de contaminación depende del proceso depurador aplicado y de las propias características del agua residual entrante a la instalación.

1.2.1.3. Tratamiento secundario

El tratamiento secundario, también llamado tratamiento biológico, consiste en una serie de procesos físicos y biológicos con el objetivo de eliminar la materia orgánica biodegradable y los sólidos suspendidos. La parte biológica se lleva a cabo principalmente mediante la actividad metabólica de los diferentes microorganismos presentes en la misma agua en presencia de oxígeno. Los rendimientos de depuración y la calidad de tratamiento del

proceso biológico mejoran en función de la mayor biodiversidad y densidad que haya de diferentes especies de cada uno de los tipos de microorganismos. Dentro de estos microorganismos, las bacterias se consideran como los principales microorganismos responsables de eliminación de la carga contaminante. La depuración de las aguas residuales en el tratamiento secundario consiste en primer lugar en la degradación de la materia orgánica biodegradable, tanto coloidal como disuelta, produciendo de ese modo más microorganismos y productos inorgánicos principalmente CO_2 , NH_3 y H_2O . En la mayoría de los sistemas de tratamiento de aguas residuales convencionales, la materia orgánica representa la principal fuente de energía y de carbono necesario para el crecimiento de microorganismos. Al mismo tiempo, los microorganismos necesitan la incorporación de nutrientes esenciales para su crecimiento como N y P.

La ecuación (1) muestra la principal reacción bioquímica que se lleva a cabo en el tratamiento secundario:



Generalmente, el tratamiento secundario se caracteriza en función de los procesos biológicos aeróbicos aplicados, la variación de los procesos biológicos depende principalmente de la manera en que se suministra el oxígeno a los microorganismos y en la velocidad a la cual los microorganismos metabolizan la materia orgánica. El sistema convencional del tratamiento secundario mediante fangos activados es el sistema más ampliamente utilizado en la mayoría de las plantas depuradoras debido a su alto rendimiento de depuración. El sistema consiste en cultivo en suspensión, donde el agua decantada y un cultivo en suspensión denominado fango activado se mezclan junto con el aire en el tanque de aireación. En ese momento se produce la oxidación y la floculación de la materia orgánica y posteriormente la separación por agregación de flóculos en el decantador secundario (Hreiz et al., 2015). No obstante, a parte de los fangos activos existe otros procesos secundarios que suelen ser comunes como; los reactores anaeróbicos (Zhang, 2014), los reactores aeróbicos de biofilm (Nicolella, 2000), bioreactores de membrana, contactores biológicos rotativos, y las lagunas de estabilización (Upadhyay et al., 2007).

Actualmente, existe una gran variedad de procesos de fangos activos, a continuación se citan sólo los principales, bajo ésta perspectiva, los sistemas de fangos activos se pueden clasificar en las siguientes categorías:

Según la edad de fango:

- Fangos activos convencionales con edades de fangos moderados (5-15 días)
- Fangos activos con aireación prolongada con elevados edades de fango (20-30 días)

Según el flujo:

- Flujo continuo
- Flujo intermitente (“SBR” *sequencing batch reactor*)

1.2.1.4. Tratamiento terciario

Generalmente, los sistemas convencionales de tratamiento de aguas residuales se componen solamente de pre-tratamiento y tratamiento secundario. Sin embargo, debido a la rigurosidad de la legislación sobre el tema de tratamiento de aguas residuales, el tratamiento terciario es cada vez más común en las depuradoras, y sobre todo en los países desarrollados.

El tratamiento terciario y/o avanzado es el proceso adicional que consiste en la eliminación de la materia orgánica residual y aquellos contaminantes remanentes en el efluente del tratamiento secundario, como por ejemplo, nitrógeno, fósforo y otros nutrientes. Sin embargo, los procesos de tratamiento avanzado a veces se combinan con el tratamiento primario o secundario (por ejemplo, adición de compuestos químicos a los clarificadores primarios o a los tanques de aireación para eliminar el fósforo) o utilizarse en lugar del tratamiento secundario (por ejemplo, el tratamiento de flujo superficial del efluente primario) de modo que muchas plantas no tienen separado el tratamiento secundario del terciario, incluso existen frecuentemente tratamientos terciarios que pueden llegar a carecer de tratamiento primario, dándose todo el procesos en un solo tanque. En función del grado de tratamiento deseado de las aguas y el concepto costo eficiencia, el tratamiento terciario puede ser basado en procesos biológicos o fisicoquímicos como la oxidación avanzada

(Ribeiro et al., 2015), la ósmosis inversa (Lutchmiah et al., 2014), la irradiación con ultravioleta (UV) (Hijnen et al., 2006).

En el caso de la combinación de ambos tratamientos; secundario y terciario, y dependiendo de la complejidad del tratamiento a aplicar, el efluente del clarificador primario fluye al reactor biológico, que se divide físicamente en cinco zonas por deflectores y presas.

En la secuencia de estas zonas hay: (i) zona de fermentación anaeróbica (caracterizada por bajos niveles de oxígeno disuelto y la ausencia de nitratos); (ii) zona anóxica (bajos niveles de oxígeno disuelto pero con presencia de nitratos); (iii) zona aeróbica (aireada); (iv) zona anóxica secundaria; y (v) zona de aireación final

La función de la primera es para acondicionar al grupo de bacterias responsables de la eliminación de fósforo estresándolas bajo condiciones reductoras, lo que resulta en una liberación de equilibrio de fósforo dentro de las células bacterianas. En la exposición posterior a un suministro adecuado de oxígeno y fósforo en las zonas aireadas, estas células acumulan rápidamente el fósforo considerablemente por encima de sus necesidades metabólicas normales. A continuación, el fósforo se elimina del sistema con el fango activo residual.

En cuanto al nitrógeno en el influente, mayoritariamente en forma de amoníaco, este pasa prácticamente inalterado a través de las dos primeras zonas, en la tercera zona aeróbica, la edad de los lodos es tal que la nitrificación más completa se lleva a cabo, y el nitrógeno amoniacal se convierte en nitritos y luego a nitratos. El licor mezcla rico en nitrato se recicla a continuación de la zona aeróbica de nuevo a la primera zona anóxica. Allí es donde se produce la desnitrificación, donde los nitratos reciclados, en ausencia de oxígeno disuelto, se reducen a gas nitrógeno mediante las bacterias facultativas, usando los compuestos de carbono orgánicos influyentes como donantes de hidrógeno.

El gas nitrógeno se libera a la atmósfera, mientras en la segunda zona anóxica, los nitratos que no fueron reciclados se reducen por la respiración endógena de las bacterias.

Finalmente, en la zona de re-aireación final, los niveles de oxígeno disuelto se aumentan de nuevo para evitar una mayor desnitrificación, que pueda afectar en los clarificadores secundarios por los cuales fluye el licor mezcla.

1.2.2. Línea de fango

La gestión de los fangos (también llamados lodos) procedentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales es una actividad muy compleja y costosa. La generación de lodos puede poner en peligro las ventajas medioambientales y sanitarias que se esperan de los sistemas de tratamiento de las aguas residuales. Las crecientes demandas de la sociedad y de las agencias ambientales hacia la mejora de los niveles de calidad ambiental se han manifestado en el aumento en el número de plantas de tratamiento de aguas residuales. Como consecuencia de ello, también se espera que la cantidad de lodos producidos aumente.

Debido a todo lo citado anteriormente, varios procesos de tratamiento de los fangos se han desarrollado en los últimos años con el fin de estabilizar la fracción biodegradable de materia orgánica presente en los lodos, reduciendo así el riesgo de putrefacción, así como la disminución de la concentración de patógenos. Los tratamientos mediante la estabilización de los lodos se dividen en; estabilización biológica, química, y térmica. Dentro de estas variedades de tratamientos, la estabilización biológica, especialmente mediante la digestión anaeróbica se considera como el tratamiento más ampliamente aplicado en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Actualmente, el uso de la estabilización de los lodos mediante la digestión anaeróbica acompañada con producción de biogás, permite la optimización de los costes de las EDARs y se considera como una parte importante y esencial de las EDARs modernas (Appels et al., 2008).

Sin embargo, la digestión anaeróbica de los lodos genera aguas muy cargadas en amonio como producto final del proceso de centrifugación de los lodos digeridos. Generalmente, el efluente del digester es recirculado a cabecera de planta implicando un incremento notable de oxígeno para oxidar todo el amonio procedente del digester. La figura 4 muestra un esquema del proceso de digestión anaeróbica en una EDAR,

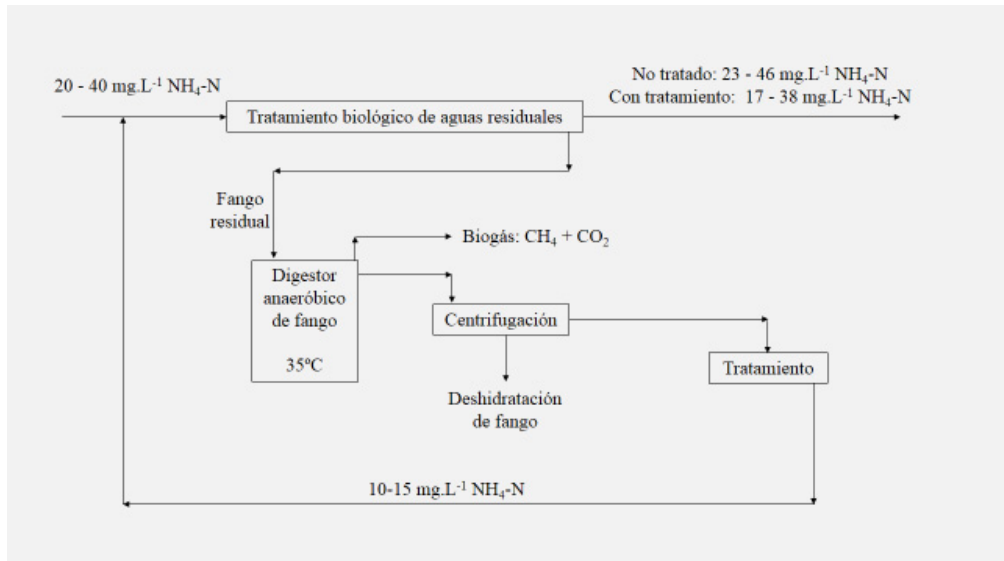


Figura 4: Esquema de un ejemplo de sistema de tratamiento de lodos en una EDAR mediante digestión anaeróbica con valores habituales de nitrógeno amoniacal.

El vertido directo de las aguas cargadas de nitrógeno ($>40 \text{ mg L}^{-1}$) en el medio ambiente sin un adecuado tratamiento previo, supone graves problemas para el medio receptor. Una de las consecuencias más destacadas del vertido directo de esas aguas, es el fenómeno conocido como la eutrofización de los sistemas acuáticos, que en presencia de luz favorece el crecimiento excesivo de las algas y cianobacterias (Conley et al., 2009; Ge et al., 2015a, 2015b). Debido a la gravedad sanitaria y ambiental que pueden ser causadas por el vertido directo de las aguas muy cargadas en amonio en los ecosistemas, la *Directiva 91/271/CEE* modificada por la *Directiva 98/15/CE de 27 de Febrero* (Tabla 2) establece unos requisitos de calidad en relación a la concentración de nitrógeno en los vertidos.

Tabla 2: Requisitos de la *Directiva 98/15/CE de 27 de Febrero* para los vertidos procedentes de instalaciones de depuración de aguas residuales urbanas mediante tratamiento más riguroso.

Parámetro	Concentración		Porcentaje mínimo de reducción (a)
	10000 a 100000 h-e	< 10 000 h-e	
Nitrógeno total (b) (mg L ⁻¹ N)	15	10	70 – 80 %

h.e: Habitante equivalente.

(a) Reducción relacionada con la carga del caudal de entrada.

(b) Nitrógeno total equivalente a la suma del Nitrógeno Kjeldahl total (N orgánico y amoniacal), el nitrógeno en forma de nitratos y nitrógeno en forma de nitrito.

En las últimas décadas e inicialmente con el objetivo de reducir el coste de energía en el proceso tradicional de eliminación biológica de nitrógeno mediante nitrificación-desnitrificación, se han desarrollado varios procesos de eliminación biológica de nitrógeno (Schmidt et al., 2003).

Los procesos de eliminación biológica de nitrógeno más estudiados son; la nitrificación parcial y desnitrificación, nitrificación y desnitrificación simultánea, la oxidación anaerobia de amonio *Anaerobic ammonium oxidation* (Anammox), y la eliminación autotrófica completa de nitrógeno a nitrito *Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite* (CANON) (Verstraete and Philips, 1998).

La eliminación biológica de nitrógeno convencional comprende dos etapas sucesivas: la nitrificación autótrofa en condiciones aeróbicas y desnitrificación heterótrofa en condiciones anóxicas. El ratio de la demanda química de oxígeno-nitrógeno (DQO: N) de las aguas residuales es de gran importancia para el rendimiento general de remoción de N. Un bajo DQO: N es normalmente desfavorable debido al factor limitante de carbono orgánico (C) para la desnitrificación heterótrofa. Para las aguas residuales muy cargadas en amonio (ej. aguas generadas en los digestores anaeróbicos de fangos) con baja DQO: N ratios (por ejemplo, <2,5), la adición de C externo, tal como metanol, conduce a un aumento significativo en el costo operativo.

Comparado con los diferentes procesos mencionados arriba, la nitrificación parcial ha adquirido un amplio interés en las últimas dos décadas. Según la *Web of Science* (WoS) mantenido por Thomson Reuters, el número de artículos publicados en revistas relacionados con la nitrificación parcial ha ido en aumento cada año, con los campos de investigación que van desde sistemas de ingeniería hasta el medio ambiente natural (Figura 5). Por todas estas razones, en la presente memoria nos centramos en el estudio de los procesos de eliminación biológica de nitrógeno, y en especial la nitrificación parcial como una fase clave en el proceso de Anammox y de mayor interés científico.

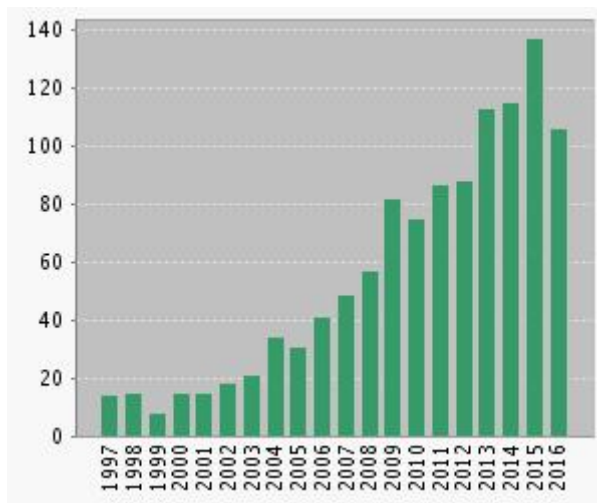


Figura 5: Análisis bibliométrico de número de publicaciones relacionadas con la nitrificación parcial en los últimos 20 años (REUTERS, 2016).

La eliminación biológica de nitrógeno mediante la combinación de los procesos; nitrificación parcial y Anammox tiene numerosas ventajas económicas y se considera como uno de los procesos de eliminación de nitrógeno más sostenibles. En comparación con el proceso convencional, el proceso nitrificación parcial-anammox requiere menos demanda de energía y oxígeno (Jetten et al., 2002). Adicionalmente, el proceso permite un significativo ahorro de materia orgánica añadida de hasta 60 % de DQO comparado con el proceso convencional (Kartal et al., 2008; Kuenen, 2008; Okabe et al., 2011; van de Graaf et al., 1995), y una reducción de hasta el 90 % de fangos que se producían (Strous et al., 1999).

El proceso de nitrificación parcial que procede al Anammox, que forma parte del proceso conocido en inglés como *short-cut biological nitrogen removal process (SBNR)* (Fig.6) es un enfoque rentable para el tratamiento de aguas residuales muy cargadas en amonio con bajo DQO: N ratio (Jetten et al., 1997).

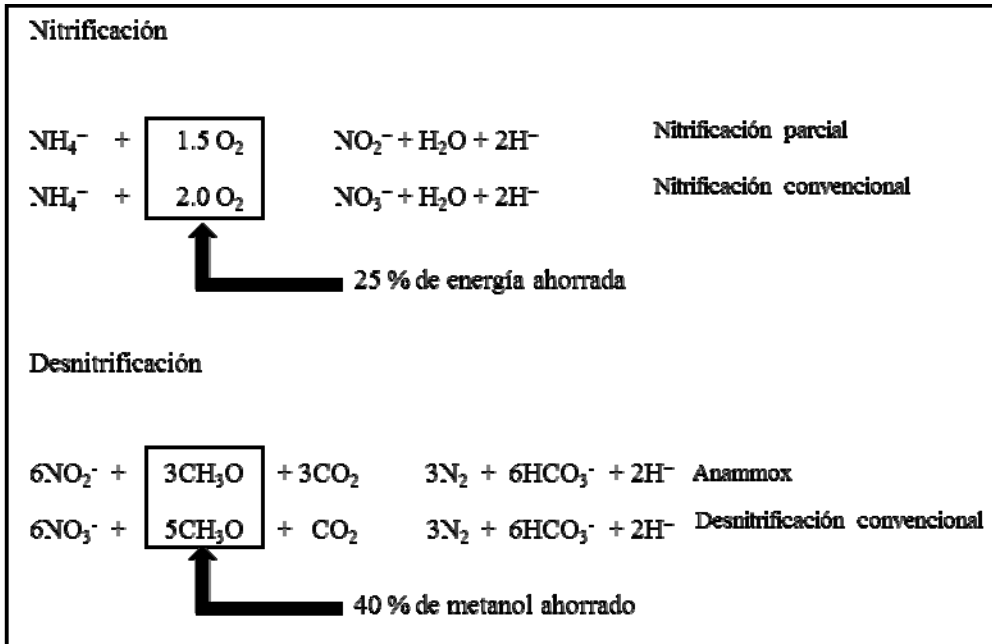
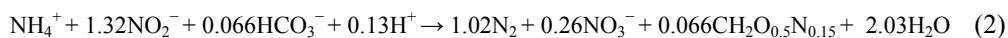


Figura 6: Importancia de nitrificación parcial en frente al proceso convencional (Sinha and Annachatre, 2006).

En el proceso de la eliminación de nitrógeno mediante nitrificación parcial-anammox, las NOB no se implican en la oxidación de nitrito a nitrato; sino, una clase diferente de bacterias llamados anammox (nombre común para referirse a las bacterias responsables del proceso anammox, pero no es reconocido por la *Comité Internacional de Bacteriología Sistemática* “ICSB” por sus acrónimos en inglés), convierten el NH_4^+ en N_2 en dos etapas biológicas. La primera etapa se llama la nitrificación, en el que las AOB (arqueas amonio-oxidantes “AOA” por sus acrónimos en inglés, también pueden intervenir) convierten aproximadamente la mitad del amoníaco en nitrito. La revelación de este proceso viene determinado con el paso dos: desamonificación anaeróbica (Fig.6, 3^{era} ecuación). Donde la biomasa autótrofa

Anammox conocida por su crecimiento lento, utiliza bajo condiciones anóxicas el nitrito como receptor de electrones, convirtiendo alrededor del 89 % de nitrógeno inorgánico (amoníaco y nitrito) en N₂, con 11 % de sobra como nitrato. Como se muestra en la siguiente ecuación (2), el ratio molar óptimo de NH₄⁺ : NO₂⁻ para el proceso de Anammox es 1: 1.32 (Strous et al., 1998).



Como se muestra en el apartado anterior, el funcionamiento del proceso de Anammox está acondicionado por la primera etapa de nitrificación parcial, por ello el estudio de esta etapa (nitrificación parcial) es clave para su mejor optimización. Por ello, en la siguiente memoria nos centramos en el estudio de los principales aspectos físicoquímicos y microbiológicos del proceso de nitrificación parcial.

1.3. Monitoreo de comunidades microbianas

El tratamiento de las aguas residuales tanto municipales como industriales, es uno de los procesos biotecnológicos más importantes que se utiliza en todo el mundo. La mayoría de los procesos de depuración de las aguas residuales se basan en la actividad depuradora de los distintos microorganismos que albergan las mismas aguas. En todos los tipos EDARs, los microorganismos procariotas son los dominantes y son considerados como los principales responsables de las conversiones de los principales contaminantes como el carbono, nitrógeno y fósforos. Por otro lado, ciertas bacterias son las causantes de los problemas que con mayor frecuencia se presentan en los sistemas de tratamiento de aguas residuales como los problemas de sedimentación y floculación de fangos conocidos, fenómenos conocidos como “*Bulking*” y “*Foaming*”. En consecuencia, la eficiencia y la fiabilidad de una EDAR dependen principalmente de la composición y la actividad de su comunidad microbiana.

Aunque el tratamiento biológico de aguas residuales se ha utilizado durante más de un siglo, la investigación sobre la microbiología de este proceso ha presentado importantes limitaciones metodológicas hasta hace una década (Wagner et al., 1993). Solo después de la introducción de la biotecnología avanzada aplicada a la microbiología de aguas residuales

(Juretschko et al., 1998; Lee et al., 1999; Purkhold et al., 2000; M Wagner et al., 1994; M. Wagner et al., 1994) se ha hecho posible determinar la composición y la dinámica de las comunidades microbianas en estos sistemas así como la identificación de los microorganismos claves para los diferentes tipos de procesos de depuración.

El rendimiento de un proceso de tratamiento biológico de aguas residuales depende principalmente de la actividad de los microorganismos involucrados, lo que subraya la importancia de comprender la estructura y la dinámica de la comunidad microbiana. Durante décadas, los sistemas de tratamiento de aguas residuales han sido considerados como una caja negra debido a la compleja composición de las comunidades microbianas y la carencia de métodos exploratorios de estas poblaciones microbianas.

Generalmente, los sistemas de tratamiento de aguas residuales son considerados como ecosistemas muy complejos en relación a su gran diversidad microbiana. La identificación de los microorganismos responsables de los procesos de biotransformaciones específicos en ambientes complejos como los sistemas de tratamiento de aguas residuales sigue siendo uno de los principales retos de la microbiología ambiental y de la ingeniería ambiental (De los Reyes, 2010; González-Martínez et al., 2014). Generalmente, la matriz física de las aguas residuales puede albergar una gran variedad de microorganismos; en la siguiente memoria nos centramos en el estudio de las comunidades procariotas incluyendo bacterias y arqueas, especialmente aquellos involucrados en los procesos de depuración.

1.3.1. Bacterias totales

Dentro de la microbiota de los sistemas de tratamiento de aguas residuales, los microorganismos más importantes son las bacterias. Importancia viene determinada por su gran abundancia y por su papel como los principales microorganismos responsables de la degradación de los contaminantes (Wagner et al., 1993). En algunos sistemas de depuración como los fangos activos, a parte del papel depurador, las bacterias ejercen un importante papel en la estabilidad de los flóculos que forman los fangos mediante la secreción de sustancias poliméricas extracelulares (Sheng et al., 2010). De hecho, la presencia de alguna formas bacterianas, como las bacterias filamentosas pueden disminuir drásticamente la sedimentabilidad de flóculos de fangos activos al aumentar el volumen de los fangos o al

favorecer la formación de espuma de biomasa, fenómenos de *Bulking* y *Foaming* (Guo and Zhang, 2012).

Se estima que las bacterias representan entre el 90 y 95 % de la biomasa total de los fangos activos, uno de los sistemas más convencionales en los tratamientos de aguas residuales. De forma rutinaria el funcionamiento de estos sistemas se controla principalmente mediante el análisis de parámetros fisicoquímicos. La dinámica de variación de la biomasa en el curso del proceso de tratamiento de aguas residuales es uno de los principales parámetros de control que influyen fuertemente en la eficiencia del proceso (Márquez and Costa, 1996). Sin embargo, esta dinámica de biomasa suele ser estimada con limitaciones debido a la falta de técnica adecuadas, puesto que la mayoría de estas bacterias no son cultivables y que los análisis moleculares no se han aplicado hasta hace poco a estas complejas matrices. Adicionalmente, existen varios obstáculos que dificultan el puesto a punto de análisis microbiológicos rutinarios. De forma resumida, el entendimiento de los procesos de depuración no se puede dar por hecho ni con la estimación sólo de la biomasa ni con el análisis rutinario de los parámetros fisicoquímicos, sino con ambos en función del parámetro tiempo y del estado fisiológico de la biomasa.

En los sistemas de tratamiento de aguas residuales biológicos, la mayoría de los microorganismos están presentes en forma de agregados microbianos, tales como flóculos, biopelículas, y gránulos (Sheng et al., 2010). Esta complejidad bioestructural dificulta la cuantificación precisa de las bacterias totales, por eso y durante varios años, la cuantificación de biomasa total en los sistemas de depuración se ha realizado mediante estimaciones poco precisas a base de parámetros como; los sólidos en suspensión volátiles, y DQO (Contreras et al., 2002). Además, la estimación sólo de la biomasa bacteriana mediante estas técnicas no siempre permite el entendimiento de su funcionamiento en las plantas depuradoras.

El enfoque de combinar análisis cuantitativo y cualitativo de las bacterias dominantes en los sistemas de depuración es una forma muy prometedora para investigar las correlaciones entre la presencia de bacterias específicas y el funcionamiento de las plantas depuradoras. Sin embargo, el estudio de bacterias específicas sin la totalidad de biomasa no proporciona el suficiente conocimiento como para sacar conclusiones acerca el funcionamiento de las plantas depuradoras. La presente memoria como otros futuros estudios que vinculan la

identificación y la fisiología de los grupos bacterianos más importantes, junto con el diseño de la planta de tratamiento y su operatividad puede proporcionar importantes conocimientos acerca de los factores claves para optimizar el rendimiento de los sistemas de depuración.

1.3.2. Bacterias nitrificantes

La nitrificación involucra principalmente dos grupos de bacterias quimiolitautótrofas, filogenéticamente no relacionados; las bacterias amonio-oxidantes conocidas por sus siglas en inglés como “AOB” *amonio-oxidizing bacteria* y las bacterias nitrito-oxidantes conocidas por sus siglas en inglés como “NOB” *nitrite-oxidizing bacteria*. Sin embargo, recientemente, estudios biológicos moleculares han demostrado que los miembros del reino *Crenarchaeota*, dentro del dominio arquea, juegan un papel importante en la nitrificación en suelos y sistemas acuáticos (Hansel et al., 2008; Könneke et al., 2005; Tourna et al., 2008). En la presente memoria, las bacterias nitrificantes se mencionan por sus acrónimos en inglés para facilitar la escritura.

1.3.2.1. Bacterias amonio-oxidantes

Las bacterias amonio-oxidantes (AOB), son grupos de procariotas con la capacidad de oxidar el amoníaco. Se caracterizan por la morfología y sus membranas celulares Gram-negativas, y pueden ser móviles por medio de flagelos (Dytczak et al., 2008; Koops, 2001; Sinha and Annachhatre, 2006). En la tabla 3 se describen algunas de las principales características de AOB. Después del primer aislamiento de AOB en 1890, se han reconocido cinco géneros, pertenecientes a las subclases β y γ Proteobacteria (Koops and Pommerening-Roser, 2001a; Purkhold et al., 2000). Dentro de la subclase β se han reconocido 4 géneros de AOB, incluyendo grupos de *Nitrosomonas* (por ejemplo, *Nitrosococcus mobilis*), *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio* (Woese et al., 1984), mientras que el único grupo de la subclase γ pertenece al género *Nitrosococcus* (Junier et al., 2010).

Hasta ahora, únicamente 25 especies de AOB se han podido cultivar y aislar a partir de varios ambientes, siendo los géneros más estudiados *Nitrosomonas* y *Nitrosospira* (Harms et al., 2003; Mobarry et al., 1996).

Tabla 3: Las características y los coeficientes de la cinética de AOB (Dytczak et al., 2008; Koops and Pommerening-Roser, 2001a; Sinha and Annachhatre, 2006).

Nitrificantes	Forma celular	Tamaño celular (μm)	Estrategia	K_s (sustrato) (mg N L^{-2})	K_o ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-2}$)	μ_{max} (d^{-1})	b_{max} (d^{-2})
AOB							
<i>Nitrosococcus</i>	Esférica a elipsoidal	1.5 - 1.8 x 1.7 - 2.5	-	-	-	-	-
<i>Nitrosolobus</i>	Lobulada	1.0 - 1.5 x 1.0 - 2.5	-	-	-	-	-
<i>Nitrosomonas</i>	Bacilos rectos	0.7 - 1.5 x 1.0 - 2.4	r (rápida)	26.60 (NH_4^+) 5.88–46.20 (NH_4^+) 12.27–27.44 (NH_4^+) 0.17–0.27 (NH_3) 0.42–0.84 (NH_3)	0.51 0.22–0.56	0.043 0.039	0.26
<i>Nitrosospira</i>	Espiral enrollada	0.3 - 0.8 x 1.0 - 8.0	K (lenta)	1.96 (NH_4^+) 0.01–0.02 (NH_3) 0.08–0.15 (NH_3)	-	-	-
<i>Nitrosovibrio</i>	Bacilos curvados finos	0.3 - 0.4 x 1.1 - 3.0	-	-	-	-	-

K_s : constante de saturación media de nitrógeno

K_o : constante de saturación media de oxígeno

μ_{max} : tasa de crecimiento máximo

b_{max} : tasa de decaimiento máximo

La mayoría de las AOB obtienen su energía para el crecimiento a partir de la oxidación aeróbica de NH_4^+ . Sin embargo, algunas especies de AOB son capaces de crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. El efecto del oxígeno disuelto (OD) en las comunidades AOB ha sido investigado por varios grupos (Bie et al., 2001; Gieseke et al., 2003, 2001; Park and Noguera, 2004). A base de observación de los gradientes de OD generados por el crecimiento de las biopelículas, Gieseke *et al.* (2001) observaron que los miembros de *Nitrosomonas europaea* y *Nitrosomonas oligotropha* dominaron en las capas externas de un biofilm, donde la concentración de oxígeno es alta, mientras que los miembros de *Nitrosomonas oligotropha* se encuentran exclusivamente en las capas más profundas de la biopelícula, donde la concentración del OD era menor.

En contraste con la aparente adaptación de *Nitrosomonas oligotropha* relacionadas a AOB a ambientes de menor OD, Park y *et al.* (2004) evaluaron el efecto de la reducción del OD en una planta a escala completa, los resultados obtenidos revelaron una evidente ventaja para AOB dentro del *Nitrosomonas europaea*. Del mismo modo, en los experimentos de quimiostato, el reactor de bajo OD fue dominado por las AOB pertenecientes a

Nitrosomonas europaea. La adaptación a la baja concentración de OD de la *Nitrosomonas europaea* relacionada con AOB también es apoyado por otros estudios. Por ejemplo, Helmer *et al.* (1999) observaron que la detección de las AOB pertenecientes a *N. europaea* en un reactor biológico a gran escala diseñado para el tratamiento de lixiviados de vertedero, mostraba pérdidas de nitrógeno debido a las condiciones de bajo OD. Más recientemente, (Gieseke *et al.*, 2003) especularon que la coexistencia de las AOB relacionadas con *Nitrosomonas mobilis* y *Nitrosomonas europaea / eutropha* en secciones limitadas de oxígeno de un biofilm podría estar relacionada con una asociación sintrófica entre estos miembros de AOB, en el que *Nitrosomonas mobilis* tendría una alta afinidad por el oxígeno, mientras que las AOB pertenecientes a *Nitrosomonas europaea / eutropha* usarían preferentemente nitrito como aceptor de electrones, como se ha demostrado en algunas cepas bajo condiciones limitadas de oxígeno (Kuai and Verstraete, 1998; Schmidt and Bock, 1997).

Tanto la oxidación aeróbica, como anaeróbica son iniciadas por la enzima amonio monooxigenasa (AMO), que oxida el amoníaco a hidroxilamina. El producto de la oxidación aeróbica ($OD > 0,8 \text{ mg L}^{-1}$) ejemplificada por *Nitrosomonas eutropha* es nitrito mientras que el gas nitrógeno, óxidos nítricos y nitritos son producidos en condiciones de $OD < 0,8 \text{ mg L}^{-1}$ (Schmidt and Bock, 1997). La conversión de amoníaco a nitrito vía hidroxilamina NH_2OH es catalizada en dos etapas (ec.3, y 4) por la mediación de dos enzimas claves: *amonio monooxigenasa* (AMO) y *hidroxilamina oxidoreductasa* (HAO), en agua, el ácido nitroso (HNO_2) se descompone rápidamente en nitrito (Ge *et al.*, 2015c).

La enzima AMO es codificada por tres subunidades de genes, CMOZ (31,4 kDa), amoA (31,4 kDa) y amoB (38 kDa) (Junier *et al.*, 2010), pero sólo una parte de amoA es la que codifica la función oxidante de las AOB (Fukushima *et al.*, 2012; Kuo *et al.*, 2010). A diferencia de AMO, HAO se aisló y caracterizó más ampliamente. La HAO es codificada por los grupos de genes de Hao (oxidoreductasa hidroxilamina, 1.710 pb), que reveló un gen altamente conservado que codifican proteínas (Bergmann *et al.*, 2005), especialmente en la subdivisión β (Junier *et al.*, 2010).





1.3.2.2. Bacterias nitrato-oxidantes

Dentro de las proteobacterias, las NOB son filogenéticamente más variadas y más ampliamente extendidas en medio ambiente que las AOB (C Fiencke, E Spieck, 2005). En las últimas décadas, y tras muchos intentos, se ha podido cultivar ocho especies de NOB, pertenecientes a cuatro grupos filogenéticamente distintos (Lücker et al., 2010). Dos géneros de *Nitrococcus* y *Nitrobacter* han estado asignados, respectivamente, a la subclase α - y γ de las Proteobacteria (C Fiencke, E Spieck, 2005). Tras el descifrado del genoma completo de *Candidatus Nitrospira defluvii* (Lücker et al., 2010), el género de *Nitrospira* de la subdivisión filo *Nitrospira*, se ha agrupado estrechamente a la subclase δ (Koops and Pommerening-Roser, 2001b). En la tabla 4 se puede observar algunas de las principales características de las NOB como bacterias de tinción Gram negativa.

Tabla 4: Las características y los coeficientes de la cinética de NOB (Dytczak et al., 2008; Koops and Pommerening-Roser, 2001a; Sinha and Annachatre, 2006).

Nitrificantes	Forma celular	Tamaño celular (μm)	Estrategia	K_s (sustrato) (mg N L^{-1})	K_o ($\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$)	μ_{max} (1 h^{-1})	b_{max} (1 d^{-1})
NOB							
<i>Nitrobacter</i>	Forma de pera/bacilos pleomórficos	0.5 - 0.8 x 1.0 - 2.0	r (rápida)	9.88–17.36 (NO_2^-) 1.49 (NO_2^-)	0.17 – 4.32	0.020 0.032 0.043	0.07
<i>Nitrococcus</i>	Esférica	1.5	-	-	-	-	-
<i>Nitrospina</i>	Bacilos curvados finos	0.3 - 0.4 x 1.7 - 6.6	-	-	-	-	-
<i>Nitrospira</i>	Espiral enrollada libremente	0.3 - 0.4 x 0.8 - 1.0	K (lenta)	0.14 (NO_2^-) 0.11–0.50 (NO_2^-)	0.13 0.47	-	0.14 – 0.15

K_s : constante de saturación media de nitrógeno

K_o : constante de saturación media de oxígeno

μ_{max} : tasa de crecimiento máximo

b_{max} : tasa de decaimiento máximo

Al principio, el género *Nitrobacter* era considerado como el género de NOB más importante (Nogueira and Melo, 2006). Sin embargo, *Nitrospira*, descubierta posteriormente, se ha posicionado como el género dominante en la mayoría de las EDARs (Harms et al., 2003). Toshikazu Fukushima *et al.* (2013) encontraron que *Nitrospira* era dominante en

condiciones con alta concentración de carbono inorgánico (CI), mientras que *Nitrobacter* en bajas condiciones de CI. Por otra parte, *Nitrospira* es considerado como género de estrategia k (con alta afinidad al sustrato y baja actividad máxima) para nitrito y oxígeno, mientras *Nitrobacter* sigue la estrategia r bajo condiciones limitadas de sustrato (Huang et al., 2010), y es capaz de utilizar fuentes de energía a partir de la materia orgánica como parte de su metabolismo autótrofo facultativo y anaeróbico (Schmidt et al., 2003).

Las NOB obtienen su energía para el crecimiento a partir de la oxidación de nitrito a nitrato (ec.5) (Sinha and Annachhatre, 2006). La enzima clave implicada en la oxidación en un sólo paso, es nombrado como nitrito oxido-reductasa en *Nitrobacter*, y como sistema oxidante de nitrito en los géneros de *Nitrococcus*, *Nitrospina* y *Nitrospira* (Klotz and Stein, 2008). La compleja composición de la nitrito oxido-reductasa consiste en 2-3 subunidades con hierro, molibdeno, azufre y cobre (Sundermeyer-Klinger et al., 1984).



1.3.3. Arqueas

Los estudios de las comunidades microbianas en los sistemas de depuración de aguas residuales por métodos moleculares han analizado especialmente las poblaciones bacterianas al considerar que las bacterias eran las principales responsables de la eliminación del carbono en estos procesos. Al mismo tiempo, el papel desempeñado por las arqueas en los procesos de tratamiento aeróbicos de aguas residuales ha recibido una menor atención. No obstante, los estudios más recientes de la diversidad de las arqueas aeróbicas no extremófilas y de detección de microambientes anóxicos en fangos activos, donde las arqueas metanógenas (uno de los grupos de arqueas más abundantes en el medioambiente) pueden ser muy activas, han mostrado la existencia de una importante actividad de las arqueas en el lodo activado (Casamayor et al., 2000; DeLong, 1998; Schramm et al., 1999). De hecho, la presencia de arqueas metanógenas dentro de una amplia gama de biopelículas aeróbicas y en reactores de fangos activos se ha deducido a partir de los estudios de proceso y por estudios basados en cultivo (Czepiel et al., 1993; Damgaard et al., 2001; Lens et al., 1995).

Las arqueas se clasifican como uno de los tres dominios de la vida distinguidos por Carl Woese mediante análisis filogenético basado en los genes 16S rRNA (Woese and Fox, 1977). El diámetro de una arquea puede oscilar entre 0.1 a 15 μm y su estructura puede presentar una morfología variada, siendo comunes las formas de cocos, bacilos, espiral y placa (G.M. Garrity, 2001). Por ejemplo, *Candidatus N. "maritimus"* aparece como bacilos rectos con un diámetro de 0.17 a 0.22 μm y una longitud de 0.5 a 0.9 μm (Könneke et al., 2005).

Las arqueas, son abundantes y metabólicamente diversas, conviviendo junto a otras bacterias y eucariotas en la mayoría de los ambientes de la tierra. Sin embargo, siguen siendo una de las ramas del árbol filogenético de la vida menos conocida. A pesar de los muchos esfuerzos realizados para investigar su papel en los sistemas naturales y artificiales (Gribaldo and Brochier-Armanet, 2006), su diversidad sigue siendo bastante inexplorada; aunque se ha estimado que pueda ser comparable a la observada en caso de las bacterias (Gribaldo and Brochier-Armanet, 2006).

Hasta hace unos pocos años, las bacterias amonio-oxidantes eran los únicos microorganismos involucrados en el proceso de oxidación del amonio. Sin embargo, las funciones fisiológicas de las arqueas identificadas en las comunidades microbianas mixtas sugieren que su papel es importante en los ciclos biogeoquímicos del planeta, manteniendo el flujo y el reciclaje de los nutrientes como el nitrógeno en muchos ambientes (Fröls, 2013). En particular, el reciente descubrimiento de arqueas amonio-oxidantes (AOA, por sus siglas en inglés) cambió la visión clásica del ciclo del nitrógeno, ya que son consideradas actualmente como uno de los principales organismos oxidantes de amoníaco en los océanos y los hábitats geotérmicos (Stahl and de la Torre, 2012). Recientemente, estudios de biología molecular han demostrado que los miembros del reino *Crenarchaeota*, dentro del dominio arquea, juegan un papel muy relevante en la nitrificación en suelos y en sistemas acuáticos (Hansel et al., 2008; Könneke et al., 2005; Tourna et al., 2008).

Basándose en estos estudios, Könneke y sus colaboradores aislaron una nueva cepa de arquea amonio-oxidante marina, *Candidatus N. "maritimus"*, que contiene genes putativos para las tres subunidades (amoA, amoB, y CMOZ) de amonio monooxigenasa, la enzima responsable de la oxidación del amonio (Könneke et al., 2005). Por otro lado, *Candidatus*

"*Cenarchaeum symbiosum*" también ha mostrado tener los genes de oxidación de amonio, aunque su cultivo puro no se ha conseguido todavía (Hallam et al., 2006a, 2006b).

En base a los trabajos publicados sobre las secuencias de los genes de la subunidad amonio monooxigenasa (*amoA*), las AOA han sido clasificadas en cinco principales grupos; *Nitrosopumilis*, *Nitrososphaera*, *Nitrosocaldus*, *Nitrosotalae*, y *Nitrososphaera "sister"* (Pester et al., 2011).

Desde su descubrimiento, se ha constatado la presencia de las AOA en diferentes ambientes, incluyendo suelos y sedimentos (Francis et al., 2005; Leininger et al., 2006), las capas marinas óxica y subóxica (Beman et al., 2008; Coolen et al., 2007; Mincer et al., 2007; Wuchter et al., 2006), estuarios (Beman and Francis, 2006; Caffrey et al., 2007), entornos subterráneos (Weidler et al., 2007), fangos de aguas residuales (Park et al., 2006) y corales (Beman et al., 2007).

La actividad metabólica de Candidatus *N. "maritimus"* se caracteriza por su capacidad de utilizar amonio como la única fuente de energía, presentando una tasa de crecimiento y producción celular similar a la de las AOB (Könneke et al., 2005). Se ha estimado una tasa de crecimiento máxima de 0.78 día^{-1} , la cual es similar a la de las AOB en los sistemas de aguas residuales (C.P.L. Grady, G.T. Daigger, 1999). En cultivos discontinuos de agua de mar se ha estimado una tasa de crecimiento de *Crenarchaeota* de 0.23 y 0.47 días^{-1} frente a la tasa de 0.13 y 0.29 días^{-1} de las bacterias (Herndl et al., 2005). Sin embargo, un estudio realizado en la zona afótica del océano indica que las arqueas planctónicas, generalmente, crecen más lentamente que las bacterias (Herndl et al., 2005).

Actualmente, se conoce poco sobre las vías de oxidación del amonio en las arqueas (Hallam et al., 2006a, 2006b). Si bien el metabolismo de arqueas es en muchos aspectos es similar al de las bacterias, las arqueas exhiben diferentes formas de metabolismo. Por ejemplo, *Crenarchaeota* suele utilizar la vía 3-hidroxi-*propionato* o el ciclo de Krebs para la fijación autotrófica de carbono, en comparación con el ciclo de Calvin para la AOB (B.B. Ward, D.G. Capone, 2007). Un factor importante que permite distinguir arqueas de las bacterias es su adaptación al estrés energético crónico. Esta adaptación viene determinada,

principalmente, por los mecanismos bioquímicos de algunas de las arqueas consistentes en la baja permeabilidad de sus membranas y las vías catabólicas específicas que les permite lidiar con el estrés energético crónico (Valentine, 2007).

1.3.4. Microorganismos acumuladores de fósforo

El proceso de eliminación biológica de fósforo (P) más extendido en los sistemas de tratamiento de aguas residuales se conoce como el proceso de eliminación biológica mejorada del fósforo “*enhanced biological phosphorus removal*” (EBPR). El grupo de microorganismos que son en gran parte los principales responsables de la eliminación de P son conocidos como microorganismo acumuladores de polifosfato, conocidos también por sus siglas en inglés “PAOs” “*polyphosphate accumulating organisms*”.

Los PAOs, son conocidos como organismos capaces de almacenar los fosfatos en forma de polifosfato intracelular. A diferencia de la mayoría de los microorganismos y bajo condiciones anaeróbicas, los PAOs pueden usar fuentes de carbono no habituales como los ácidos grasos volátiles (AGV), los cuales pueden ser polimerizados y almacenados intracelularmente en forma de polihidroxialcanoatos (PHA) (Mino et al., 1998). La energía necesaria para estas biotransformaciones se genera principalmente por la degradación de los polifosfatos con la consiguiente liberación del fosfato fuera de la célula. El estudio del metabolismo de los PAOs en los sistemas de eliminación biológica mejorada del fósforo “EBPR” se basa en el uso de acetato como sustrato modelo de carbono, ya que generalmente es la especie más común de los AGV en los influentes de sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Hasta hoy en día, la mayoría de los estudios microbiológicos de los PAOs en diferentes sistemas revelan que los *Candidatus “Accumulibacter phosphatis”* son los PAOs más conocidos en el proceso de EBPR tanto a escala de laboratorio como a escala real (Oehmen et al., 2007).

Aunque existen pocos estudios científicos de los PAOs en sistemas de tratamiento de aguas residuales, en comparación con otras comunidades microbianas, su estudio se inició en la década de los 70 con la caracterización morfológica por parte de Fuhs y Chen (1975). Este

trabajo se basó en observaciones microscópicas de lodos enriquecidos con PAOs. Caracterizándose estos organismos como bacilos no móviles o cocos, generalmente, dispuestos en racimos, que presentan tinción para PHB y para gránulos Neisser positiva. Inicialmente se supuso que eran bacterias Gram negativas, pero más tarde se ha planteado la posibilidad de que sean Gram positivas (Wagner et al., 1994; Liu, 1995). En la tabla 5, se muestran algunas de las principales características morfológicas y fisiológicas de los PAOs.

Tabla 5: Las principales características de PAOs (Mino et al., 1998).

		Características de PAOs
Morfología	Forma celular	Muy probable son de bacilos cortos o cocos Frecuentemente presentes en forma de grupos
	Tinción Gram	Incierto
	Tinción Neisser	Fuertemente positiva, después de un crecimiento aeróbico.
	Tinción PHB	Fuertemente positiva, después de la absorción anaeróbica del sustrato.
	Estructura interior	Son visibles gránulos de poli-P y PHA.
Quimiotaxonomía	Quinona	Q-8 o MK-8(H ₄)
	Ácido graso	16:1 d9c, 16:0, o 18:1 d11c
Filogenia		Se sospecha que pertenecen a bacterias Gram positivas, con un alto contenido de G + C o beta subclase de proteobacterias
Fisiología	Metabolismo anaeróbico	Toman el acetato y lo convierten en PHA acompañado con la degradación de poly-P y el glucógeno y la liberación de fosfato. Consumen gran variedad de compuestos orgánicos de bajo peso molecular como azúcares, ácidos carboxílicos y aminoácidos. Sus enzimas de metabolismo anaeróbico son inducibles
	Metabolismo aeróbico/anóxico	Convierten el PHA almacenado internamente a glucógeno, acumulan poli-P y crecen en ausencia de fuentes de carbono externos. La presencia de fuentes de carbono inhibe la toma de fosfato Algunos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones.

A pesar de que se han realizado muchos intentos de aislamiento de PAOs responsables de EBPR, ninguno ha tenido éxito. Según Barker and Dold (1996), los primeros intentos de identificación de los microorganismos que participan en EBPR datan de hace más de 40 años, y se basaron en técnicas de cultivo. *Acinetobacter* fue propuesta por primera vez por Fuhs y Chen como el principal organismo responsable de la eliminación de P en EBPR (Fuhs and Chen, 1975), creyéndose durante bastante tiempo que era el único PAO presente en plantas EBPR. Sin embargo, con el uso de otras técnicas tales como la hibridación fluorescente in situ (conocida por su acrónimo en inglés “FISH”), el uso de bibliotecas de clones basados en 16S rRNA y la electroforesis en gel desnaturizante en gradiente (DGGE), han demostrado la existencia de una gran diversidad en los grupos filogenéticos que están presentes en los lodos EBPR tanto a escala de laboratorio como a gran escala (Seviour et al., 2003). Fue con el uso de sondas FISH específicas para *Acinetobacter* que se ha demostrado la poca importancia que presenta, en comparación con miembros de otros grupos filogenéticos como *Betaproteobacteria* y *Actinobacteria* (M Wagner et al., 1994), en las plantas a gran escala.

A pesar de la dificultad del aislamiento de PAOs, la identificación de este grupo de organismos ha avanzado en las últimas décadas con el empleo de técnicas moleculares. Basándose en análisis filogenéticos y posteriormente mediante FISH, Bond *et al.* (1995) demostraron que el grupo *Rhodocyclus* de la subclase 2 de Betaproteobacteria es el de mayor representación dentro de la comunidad de eliminadores del fosfato.

La subclase 2 de Betaproteobacteria relativa a *Rhodocyclus*, fue denominada como “*Candidatus Accumulibacter phosphatis*” por Hesselmann et al. (1999) cuyo nombre por el cual se conocen los PAOs hoy en día.

A pesar de los estudios de PAOs en los sistemas de tratamiento de aguas residuales que han demostrado su presencia en plantas domésticas y su particular abundancia en las plantas de aguas residuales industriales (Beer et al., 2006; Kong et al., 2005), el papel de los PAOs en estos sistemas no se ha podido aclarar en la actualidad debido a la falta de datos sobre el rendimiento de los procesos de eliminación de fósforo y a la carencia de información relativa a sus mecanismos bioquímicos.

1.4. Técnicas microbiológicas moleculares

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales se consideran como uno de los sistemas ambientales más complejos en cuanto a la diversidad microbiana que alberga. Se estima que el 99 % de los microorganismos observables en la naturaleza generalmente no son cultivables usando técnicas tradicionales (Amann et al., 1995). Sin embargo, desde la década de 1980, la aplicación de los métodos moleculares, especialmente los basados en la expresión genética después de la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction* “PCR”), ha permitido la investigación independiente de cultivo las comunidades microbianas en diferentes ambientes (Su et al., 2012). Por ejemplo, en el caso de sistemas de fangos activos, mediante los métodos de cultivo sólo se permite la detección y la cuantificación de las bacterias cultivables, que representan sólo el 5 % de la totalidad de la población de los microorganismos (Foladori et al., 2010b). Diferentes métodos independiente de cultivos se han desarrollado desde que Pace *et al.* (1985) propusieron la clonación directa de ADN ambiental.

1.4.1. Citometría de flujo

Por lo comentado anteriormente, no ha de extrañar que exista una evidente necesidad de disponer de métodos rápidos para la cuantificación de células y para determinar su estado fisiológico. La citometría de flujo se ha convertido en una valiosa herramienta de análisis que combina ensayos directos y rápidos que ayudan a revelar la heterogeneidad presente en una población o comunidad de microorganismos al permitirnos su cuantificación, conocer la distribución del tamaño de las células y, en parte, la caracterización bioquímica y fisiológica de células individuales (Vives-Rego et al., 2000). La citometría de flujo es esencialmente el estudio cuantitativo de las células ("citometría") en un líquido ("flujo").

La citometría de flujo tal como la conocemos hoy fue desarrollada durante la última mitad de la década de 1960. Los primeros instrumentos comerciales fueron: el citofluorógrafo, un instrumento basado en láser diseñado por Lou Kamensky y el Phywe ICP, que emplea la excitación mediante la lámpara de arco, fue diseñada por Dietrich y Gohde, ambos instrumentos salieron al mercado en 1970, y fueron orientados inmediatamente hacia usos por los inmunólogos y biólogos celulares (Steen, 2000).

Las principales ventajas de la citometría de flujo son la automatización y su alto rendimiento al permitir el análisis de miles de células por segundo y la posibilidad de su recuperación tras separarlas (Vives-Rego et al., 2000). Estas ventajas son de especial utilidad en los estudios microbiológicos en los sistemas acuáticos pues su alto rendimiento nos posibilita una alta velocidad en la obtención y el procesado de los datos; y su capacidad de clasificación permite el muestreo y separación de poblaciones específicas o células individuales con unas características determinadas. Esta separación/clasificación se puede realizar basándose en el tamaño celular relativo (luz dispersada frontalmente, *forward scatter*), la complejidad interna o granularidad relativa (luz dispersada lateralmente, *side scatter*) y las intensidades relativas de emisión de fluorescencia según los fluorocromos presentes, intrínsecos o artificialmente añadidos (Vives-Rego et al., 2000).

Brevemente, un citómetro de flujo consta de cuatro componentes básicos: sistema fluido, un sistema óptico y un sistema electrónico-informático (Fig.7). Adicionalmente, el citómetro puede disponer de un sistema de selección y separación física de las subpoblaciones de células deseadas, este proceso se realiza por deflexión electrostática; cuya técnica de separación recibe el nombre "*electronic cell sorting*".

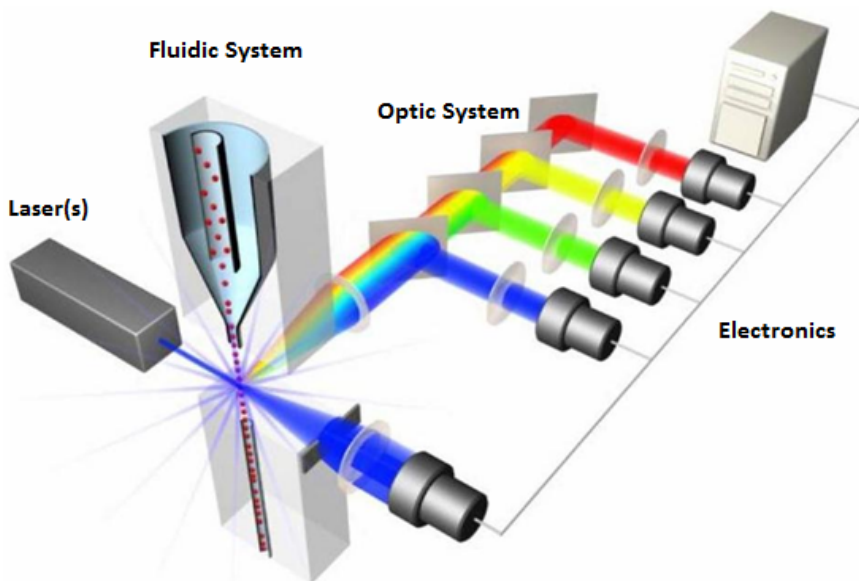


Figura 7: Los componentes básicos de un citómetro de flujo, reimpresión con permiso de “*Life Technologies Corporation*” (Rowley, 2015).

Las células se cargan en la etapa de recolección del citómetro de flujo. La muestra se prepara en el sistema de fluidos y se bombea a la cámara de flujo o celda de flujo. Las células se combinan con una corriente de fluido envolvente que las mueve rápidamente, atravesando de forma individual una o más fuentes de luz (comúnmente láseres). Dependiendo de la longitud de onda del haz de luz se excitan diferentes moléculas de las células a medida que estas van pasando a través de la cámara de flujo. Las dispersiones de luz y el tipo de fluorescencias emitidas según el fluorocromo o fluorocromos que se encuentren presentes en la célula (Fig.8), se capturan, se filtran espectralmente y se convierten en una señal eléctrica (voltaje) a través de los fotodetectores. Un sistema informático digitaliza los datos del voltaje y esa información digitalizada se analiza para cuantificar las características de las células (Rowley, 2015).

El análisis digital de las características de las células se basa en dos principales aspectos: (i) aspecto morfológico y composición estructural de las células; estos aspectos se miden en dos ángulos mediante dos detectores de las dispersiones de luz lateral (*Side scatter*) y frontal (*Forward scatter*) causadas por la célula (Fig.8), y (ii) aspecto óptico de las células, donde las células son excitadas mediante (láser y lentes) de enfoque. La luz emitida desde las células se recoge con la lente de colección y pasa a través de un sistema de espejos ópticos (dicroicos) y filtros (paso de banda, paso corto, o paso largo), que desvían las longitudes de onda de luz específicas a detectores ópticos designados (Fig.7). Este proceso se logra por la óptica de recogida.

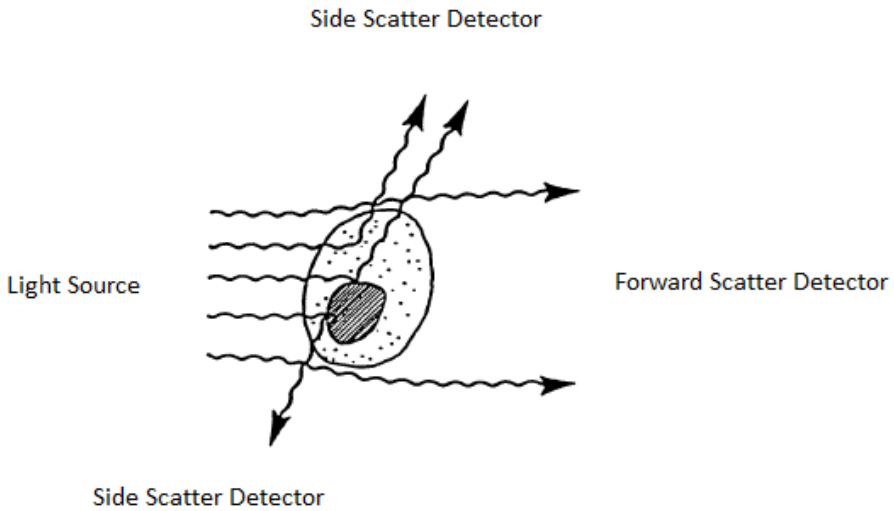


Figura 8: Propiedades de dispersión de luz de una célula (Rowley, 2015).

Los datos finales de los citómetros suelen ser presentados en forma de histogramas (Fig.9, a) y/o en gráficas de dispersión (Fig.9, b). Un histograma es un solo parámetro parcela donde el eje de ordenadas (y) muestra el número de eventos (recuento de células) y el eje abscisa (x) representa el valor (tal cual o en forma logarítmica) de la intensidad relativa de fluorescencia u otro valor óptico. Por ejemplo, la Figura (9, a) representa un histograma de registro donde el eje de abscisas representa la intensidad de señal de DAPI y el eje de ordenadas representa el número de eventos por canal, la área P1 representa *Backgournd* de la muestra y el instrumento. El gráfico de puntos (Fig.9, b) es la representación gráfica de dos parámetros de las propiedades de una muestra que cada punto trazado corresponde a una célula individual. La dispersión típica (*Forward Scatter* “FSC” frente a *Side Scatter* “SSC”) que se utiliza para definir el tamaño y la complejidad de las células en la muestra de interés. Los puntos rojos representan las células mientras los puntos negros representan el *Backgournd*.

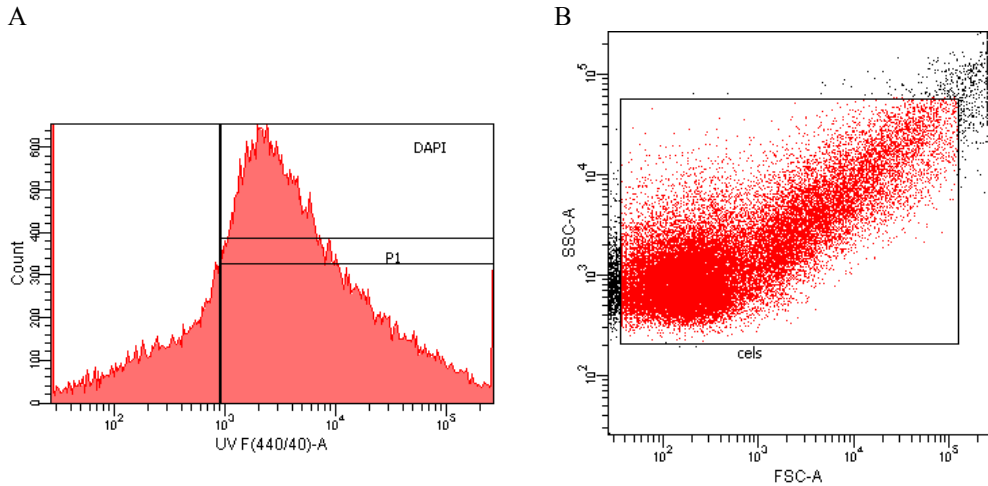


Figura 9: Ejemplo de análisis de citometría de flujo: (a) histograma representa el recuento celular en función de la intensidad relativa de fluorescencia (DAPI), (b) gráfica de puntos representa la clasificación de las células en función de la dispersión de luz lateral (SSC-A) y frontal (FSSC-A).

La técnica de citometría de flujo se puede combinar con varias técnicas de marcaje molecular en función de la diana marcada como por ejemplo; marcaje de los ácidos nucleicos mediante fluorocromos como DAPI, SYBR Green, SYTO9, SYTO13, Ioduro de propidio (IP), etc., y marcaje del ARN ribosomal mediante sondas fluorescentes técnica *de Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH), etc.

Además, ha de tenerse en cuenta que el principio del funcionamiento de citometría de flujo se basa en el análisis individual de las células independientemente del tipo de marcaje molecular que se haya realizado, lo que requiere la disponibilidad de las células individuales en suspensión. Sin embargo, si las células se encuentran agrupadas es necesario un tratamiento previo de la muestra. En muestras de aguas residuales o procedentes de diferentes etapas del tratamiento, las comunidades microbianas suelen encontrarse agrupadas formando flóculos, por lo que es necesario realizar una disgregación previa de estos flóculos usando técnicas de disgregación que variarán en función de las características de la matriz.

1.4.2. Hibridación fluorescente *In Situ* “FISH”

Dado que los procariotas exhiben una elevada diversidad morfológica, y los métodos de cultivo a base de cuantificación de especies y géneros con respecto a su resolución espacial presentan una utilidad limitada que sea relevante para los microorganismos, existe una necesidad urgente de desarrollo de nuevos métodos para analizar los microorganismos y sus comunidades *in situ* (Amann and Fuchs, 2008).

Desde su introducción a finales 1980, la técnica de FISH, se ha convertido en un método ampliamente utilizado para la identificación, cuantificación y, en combinación con otras técnicas, caracterización de las poblaciones microbianas filogenéticamente definidos en entornos complejos (Amann et al., 1990).

La técnica FISH consiste en la identificación de las células individuales mediante hibridación *in situ* fluorescente del ARN ribosomal (rRNA por sus siglas en inglés) con sondas de oligonucleótidos marcadas (Quast et al., 2013). La figura 10 muestra las etapas básicas de FISH. Aunque las células individuales puedan también identificarse mediante anticuerpos marcados con fluorescencia, la simplicidad y el bajo coste de la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida han hecho que los oligonucleótidos sean las herramientas preferidas para la identificación.

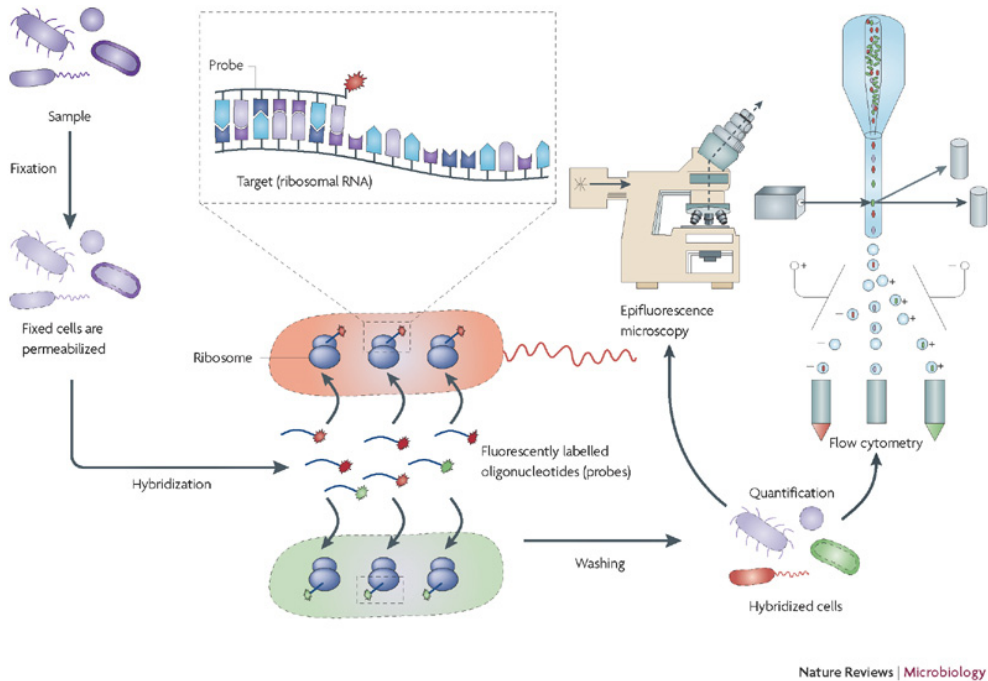


Figura 10: Principales etapas de FISH (Amann and Fuchs, 2008).

Brevemente, la muestra primero se fija con Paraformaldehído para estabilizar las células y permeabilizar las membranas celulares para la sondas de oligonucleótidos. A continuación se añaden las sondas de oligonucleótido marcadas con fluorocromos y se dejan hibridar con sus dianas intracelulares. Una vez completado el proceso de hibridación se elimina el exceso de sondas con un lavado y la muestra se encuentra lista para su identificación y cuantificación ya sea por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo.

En el presente trabajo se ha aplicado la técnica del FISH con el fin de usar las dianas disponibles para identificar y ubicar los procariontas a partir de su rRNA. Estas dianas son muy adecuadas para la identificación de bacterias y Archaea por varias razones. En primer lugar, todas las células procariontas contienen ribosomas formados por dos subunidades, la menor contiene el rRNA 16S de, aproximadamente, unos 1600 nucleótidos, y la mayor que contiene el 23S rRNA de, aproximadamente, 3000 nucleótidos y el 5S rRNA de, aproximadamente, 120 nucleótidos, y cada célula puede contener muchos ribosomas desde

unos pocos cientos a 100 000 por célula (Amann and Fuchs, 2008) por lo que estas moléculas dianas se encuentran naturalmente amplificadas.

En segundo lugar, la conservación evolutiva de las secuencias de rRNA aunque irregular es, generalmente, mucho mayor que la de la mayoría de los genes que codifican las proteínas. Finalmente, la detección del rRNA no solo permite la clasificación de los procariotas en base de su morfología (por ejemplo, bacilos frente a cocos) o su fisiología (por ejemplo, aerobios frente a anaerobios facultativos o anaerobios estrictos) si no también permite su clasificación a gran escala en los tres dominios, Arqueas, Bacterias, Eucariotas, filos y clases, como clase Alfa, Beta y Gammaproteobacteria (Amann and Fuchs, 2008).

1.4.3. PCR cuantitativa “qPCR”

Los estudios microbiológicos mediante los métodos de cultivo celular basados en el aislamiento de microorganismo y su posterior cultivo en laboratorio, se han llevado a cabo desde décadas en diferentes aéreas. Sin embargo, inevitablemente, estos métodos han conducido de manera significativa a proporcionar una visión menos precisa sobre la estructura de las comunidades de microorganismos dado que la mayoría de los microorganismos ambientales no pueden cultivarse (Amann et al., 1995; Sievert et al., 1999).

La eliminación del error inducido por la etapa de cultivo mediante los métodos independientes de cultivo nos están proporcionado una visión más cercana a la verdadera diversidad de una comunidad microbiana (Smith and Osborn, 2009). Actualmente, estos enfoques moleculares se utilizan con frecuencia para el estudio de los sistemas de tratamiento de aguas residuales proporcionando información fundamental para el mejor entendimiento de las comunidades microbianas y su interacción con los diferentes parámetros físicoquímicos de su ambiente.

Una de las técnicas moleculares más ampliamente utilizada en los últimos años, es la técnica de PCR cuantitativa o PCR en tiempo real, conocida también por sus siglas en inglés “qPCR” o Real-Time PCR. La qPCR es una variante de la PCR cuyo enfoque consiste en combinar la amplificación del fragmento deseado junto a la detección de este mediante el

empleo de sondas marcadas con fluorocromos, de forma que el correspondiente incremento en la señal fluorescente asociada a la formación de nuevo producto durante cada ciclo en la PCR pueda ser detectada y cuantificada (Smith and Osborn, 2009). La cuantificación del número de genes se determina durante la fase exponencial de amplificación de la PCR cuando el número de amplicones detectados son directamente proporcionales a los números iniciales de secuencias diana. El SYBR Green y ensayos TaqMan son las químicas habituales para PCR en tiempo real (Fig. 11).

SYBR Green I es una molécula fluorescente bajo excitación que se une al surco menor del ADN de doble cadena de manera independiente de la secuencia, que emite 1.000 veces mayor fluorescencia que cuando no está unida (Wittwer et al., 1997).

La química TaqMan implica un oligonucleótido adicional, llamada sonda TaqMan, además de los dos cebadores para la amplificación por PCR. Una sonda TaqMan se doble marcada con un fluoróforo indicador unido covalentemente al extremo 5' y un desactivador fluorescente (*quencher*) en el extremo 3'. En una sonda TaqMan intacto, donde el fluoróforo y el *quencher* están en estrecha proximidad, la fluorescencia del reportero es absorbida por el colorante extintor a través de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET, por sus acrónimos en inglés) (Giulietti et al., 2001)

Durante la amplificación mediante la PCR, las sondas TaqMan, que se hibridan con las secuencias complementarias en el ADN diana, son degradados por la actividad exonucleasa de la ADN polimerasa mientras la extensión se lleva a cabo. Una vez es rota la sonda, el fluoróforo reportero se libera del *quencher*, y la emisión de fluorescencia del reportero se puede detectar. La intensidad de fluorescencia a continuación indica la cantidad de amplicones producidos, lo que permite la supervisión en tiempo real de la amplificación por PCR. Participación de una sonda, además de los dos cebadores mejora significativamente la especificidad de TaqMan en comparación con el ensayo SYBR Green I.

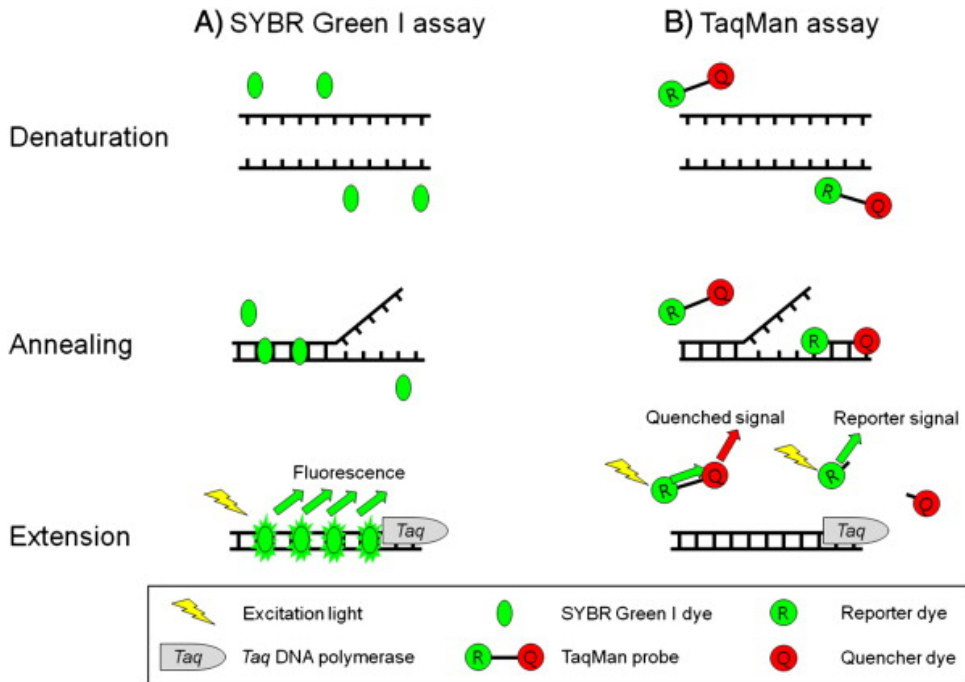


Figura 11: Representación esquemática de la cuantificación específica de una diana mediante qPCR: (A) ensayo con SYBR Green I (B) ensayo con sonda TaqMan (Kim et al., 2013).

Debido a su simple diseño, fácil instalación y su bajo coste, el SYBR Green es predominantemente en uso para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos. Pero en el caso del ensayo de TaqMan con una sonda marcada, la sensibilidad del ensayo es mejor. Un colorante indicador fluorescente conjugado con una sonda de oligonucleótidos garantiza la especificidad de la fluorescencia emitida. El ensayo TaqMan se considera que es el principal método para la detección y cuantificación de la mayoría de microorganismos en diferentes áreas científicas. Por todas estas razones en la siguiente memoria nos centramos en la qPCR a base de sonda TaqMan.

La técnica de qPCR ha sido disponible desde finales de 1990 y se considera actualmente como el método más preciso para la detección y la cuantificación de los ácidos nucleicos. La qPCR fue aplicada por primera vez para la detección de microorganismos patógenos

(Bowers et al., 2000; Kuhnert et al., 2000; Lin et al., 2000); desde entonces, la qPCR se ha convertido en una técnica definitiva para la cuantificación de las diferencias en los niveles de expresión génica entre muestras. En los últimos 10 años, la popularidad de este método ha crecido de manera exponencial, con la publicación de más de 25 000 artículos en diversos campos de la ciencia, incluyendo la investigación agrícola, ambiental, industrial y médica (Taylor et al., 2010). Actualmente, dada su mayor asequibilidad y mayor disponibilidad, su aplicación en aguas residuales se ha incrementado (Zhang and Fang, 2006), ayudando de forma significativa en el entendimiento de las diferentes comunidades microbianas tanto en condiciones de laboratorio como en los diferentes procesos de tratamiento de aguas residuales (Lee et al., 2011; Parameswaran et al., 2009; Saikaly et al., 2010; Tang et al., 2013; Q. Yang et al., 2012; Y. Yang et al., 2012). A diferencia del FISH, en este caso se suele cuantificar las copias genómicas del ADN nuclear, por lo que se excluye la intensidad metabólica, obteniendo un mejor perfil de la cantidad de células presentes sin atender a su actividad.

Ha de tenerse en cuenta que la disponibilidad de información cuantitativa facilita la vinculación de los cambios en la estructura de la comunidad microbiana con los cambios en el rendimiento de los procesos de tratamiento dado que los atributos funcionales de un proceso biológico están fuertemente afectados por la composición de la comunidad microbiana (Akarsubasi et al., 2005; De los Reyes, 2010). A pesar de la gran cantidad de datos cuantitativos sobre la ecología microbiana de las aguas residuales que se ha acumulado en las últimas décadas debido a la utilización de qPCR, hay limitaciones a tener en cuenta para un análisis más fiable. En 2013, Jaai Kim et. al revisaron las aplicaciones de qPCR en diferentes estudios de ecología microbiana de las aguas residuales y analizaron las limitaciones de estos enfoques.

En los últimos años, la técnica de qPCR ha ganado mucho terreno en el estudio de las principales comunidades microbianas responsables de eliminación de materia orgánica y los nutrientes en los sistemas de tratamiento de aguas residuales como una técnica rápida y fiable (Kim et al., 2013).

2. Objetivos

2. Objetivos

Con el objetivo de contribuir al conocimiento de las comunidades microbianas que se desarrollan en los procesos de tratamiento biológico de las aguas residuales se plantea implementar técnicas moleculares para el estudio de estos procesos y proveer nuevas herramientas para mejorar la gestión en este campo de la biotecnología.

El objetivo general planteado en esta memoria se ha desarrollará desde dos puntos de vista: El primero comprende la puesta a punto de diferentes técnicas moleculares para el estudio microbiológico de las comunidades microbianas presentes en los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales, especialmente las comunidades responsables de eliminación de nutrientes. El segundo consiste en aplicar estas técnicas para el análisis de la dinámica de las distintas comunidades microbianas y su relación con el funcionamiento de los procesos de depuración de aguas residuales.

Los objetivos específicos se describen a continuación en tres grandes bloques. Cada uno de ellos se abordará desde los dos puntos de vista en tipos diferentes de procesos depuración:

Primer bloque.

- Desarrollar y poner a punto las técnicas citometría de flujo y microscopía de epifluorescencia para la cuantificación microbiana de las poblaciones presentes en los reactores biológicos de las EDARs y compararlas entre si. Previamente y con el fin de aplicar estas técnicas se diseñará un protocolo de desagregación de los flóculos presentes en los fangos activos para la recuperación máxima de las células procariotas sin efecto negativo sobre su estado de viabilidad.
- Con estas técnicas cuantificar y caracterizar los procariotas totales de fangos activos en muestras procedentes de plantas depuradoras de aguas residuales con aireación prolongada y convencional a escala real.

Segundo bloque

- Desarrollar y aplicar la técnica de DAPI e hibridación fluorescente *In situ* para cuantificar y caracterizar las bacterias totales y las comunidades nitrificantes en un sistema piloto de nitrificación parcial.
- Con estas técnicas se evaluará el funcionamiento de una planta piloto de tratamiento de aguas residuales con alta carga amoniacal diseñada para operar como sistema de nitrificación parcial, comparando la abundancia y la diversidad de las bacterias totales y nitrificantes entre dos matrices de muestras; biofilms formados en *carriers* y la biomasa en suspensión. A continuación se estudiará la relación microorganismo con el funcionamiento de la planta piloto

Tercer bloque

- Poner a punto la técnica de *gBlocks gene Fragments* para desarrollar estándares de ADN para la técnica de qPCR. Para ello se desarrollarán estándares de ADN para cuantificar bacterias totales, amonio-oxidantes, *Nitrospira* spp, *Nitrobacter* spp, Arqueas totales aplicando qPCR. Y poner a punto la técnica de FISH para la cuantificación de organismos acumuladores de polifosfato “PAOs”.
- Con estas técnicas se caracterizará y cuantificará los microorganismos responsables de eliminación de nutrientes en tres plantas de tratamiento de aguas residuales a escala real con distintos sistemas operativos: convencional, eliminación de nitrógeno y con eliminación simultánea de nitrógeno y fósforo.

3. Resultados

3. Resultados

3.1. Publicaciones

Esta tesis está basada en las siguientes publicaciones:

1. **Tarik Abzazou, Humbert Salvadó, Carmina Bruguera-Casamada, Pedro Simón, Carlos Lardín, Rosa M Araujo**. Assessment of total bacterial cells in extended aeration activated sludge plants using flow cytometry as a microbial monitoring tool. *Environ Sci Pollut Res* (2015) 22:11446–11455
2. **Tarik Abzazou, Rosa M Araujo, María Auset, Humbert Salvadó**. Tracking and quantification of nitrifying bacteria in biofilm and mixed liquor of a partial nitrification MBBR pilot plant using fluorescence in situ hybridization. *Science of the Total Environment* 541 (2016) 1115–1123.
3. **Abzazou Tarik, Humbert Salvadó, Rosa M Araujo**. Characterization of nutrient-removing microbial communities in three different full-scale WWTPs systems using a new qPCR approach. Se encuentra en fase de publicación en *Science of the Total Environment*.

3.1.1. Informe de participación

Informe de coautoría sobre la participación del doctorando en los artículos presentados en esta tesis

Tarik Abzazou, Humbert Salvadó, Carmina Bruguera-Casamada, Pedro Simón, Carlos Lardín, Rosa M Araujo. Assessment of total bacterial cells in extended aeration activated sludge plants using flow cytometry as a microbial monitoring tool. *Environ Sci Pollut Res* (2015) 22:11446–11455

El doctorando ha llevado a cabo una gran parte del trabajo experimental como el tratamiento de los datos. Ha realizado la puesta a punto de la técnica de desagregación de flóculos de los fangos y ha cuantificado las bacterias totales presentes en estos fangos mediante la puesta a punto de la técnica de citometría de flujo combinada con técnicas de marcaje molecular.

Tarik Abzazou, Rosa M Araujo, María Auset, Humbert Salvadó. Tracking and quantification of nitrifying bacteria in biofilm and mixed liquor of a partial nitrification MBBR pilot plant using fluorescence in situ hybridization. *Science of the Total Environment* 541 (2016) 1115–1123.

El doctorando ha elaborado la técnica de hibridación fluorescente *In situ* y ha realizado la cuantificación y el seguimiento de las bacterias totales y las comunidades bacterianas nitrificantes en un sistema piloto de nitrificación parcial.

Abzazou Tarik, Humbert Salvadó, Rosa M Araujo. Characterization of nutrient-removing microbial communities in three different full-scale WWTPs systems using a new qPCR approach. Se encuentra en fase de publicación en *Science of the Total Environment*.

El doctorando ha desarrollado la técnica de *Double-stranded gBlocks Gene Fragments* para diseñar estándares de ADN para la cuantificación mediante la técnica de qPCR de los

microorganismos responsables de eliminación de nutrientes en tres EDARs con sistema operativo distinto.

Firma,

Prof. Dra. Rosa María Araujo Boira

Barcelona, 21 de Septiembre de 2016.

3.1.2. Informe sobre el factor de impacto de las revistas

Las publicaciones que forman parte de la presente tesis doctoral, presentada por Tarik Abzazou, han estado publicados o en proceso de publicación en las revistas científicas correspondientes.

El artículo “Assessment of total bacterial cells in extended aeration activated sludge plants using flow cytometry as a microbial monitoring tool” se ha publicado en la revista *Environmental Science and Pollution Research* en el año 2015. En el año 2015 la revista presentaba un índice de impacto de 2.828. El artículo “Tracking and quantification of nitrifying bacteria in biofilm and mixed liquor of a partial nitrification MBBR pilot plant using fluorescence in situ hybridization” se ha publicado en 2015 en la revista *Science of the Total Environment*. El índice de impacto de dicha revista en 2015 es 4.099.

Finalmente, el artículo “Characterization of nutrient-removing microbial communities in three different full-scale WWTPs systems using a new qPCR approach” se encuentra sometido para su publicación en la revista *Environmental Science and Pollution Research*.

Firma,

Prof. Dra. Rosa María Araujo Boira

Barcelona, 21 de Septiembre de 2016.

Capítulo I

3.2. Capítulo I: Evaluación de las células bacterianas totales en plantas de fangos activos con aireación prolongada mediante citometría de flujo como una herramienta de seguimiento microbiana

Resumen de estudio 1:

Desde el enfoque microbiológico, los procesos biológicos representan la columna vertebral del funcionamiento de la mayoría de las EDARs, estos procesos se pueden llevar a cabo mediante la actividad metabólica de los diferentes microorganismos, principalmente las bacterias. El estudio de diferentes aspectos de estas comunidades bacterianas como; su abundancia, su estado de metabolismo, su interacción con los diferentes parámetros de control rutinario como los parámetros físico-químicos, representa sin duda una herramienta útil para la buena gestión de estos sistemas.

El proceso de tratamiento mediante los fangos activos con aireación prolongada, representa uno de los sistemas de tratamiento de aguas más aplicados en la mayoría de las pequeñas comunidades. Sin embargo, muy pocos trabajos se han llevado a cabo sobre el aspecto microbiológico de estos sistemas debido a la complejidad de su matice, debida a la agrupación de las bacterias en forma de flóculos y agregados.

En el siguiente trabajo la técnica de citometría de flujo combinada con los fluorocromos; SYTO13 e Ioduro de propidio (IP) fue desarrollada y aplicada con éxito para el estudio de las bacterias totales durante varios meses en dos plantas depuradoras cuyo funcionamiento se basa en procesos de fangos activos con aireación prolongada. Debido a la complejidad de las matrices de las muestras (fangos activos), la aplicación de las técnicas de marcaje molecular y su posterior análisis sólo ha sido posible después de un pretratamiento de las muestras mediante un método de desagregación. La desagregación de las muestras mediante la combinación de desagregación con jeringuilla y sonicación mediante baño ultrasonidos, ha permitido una eficacia desagregación de flóculos con máxima recuperación de número de células, además, la técnica de desagregación ha demostrado no ser perjudicable sobre la viabilidad de las bacterias.

Comparación de diferentes técnicas de cuantificación bacteriana a base de microscopía de epifluorescencia, citometría de flujo y técnicas de marcaje molecular demostraron, la utilidad de citometría de flujo combinada con la técnica de marcaje de ácidos nucleicos mediante los fluorocromos SYTO13 y IP como eficiente herramienta para el seguimiento de las bacterias

totales en las dos plantas estudiadas. La técnica demostró su gran utilidad en la cuantificación precisa tanto de la abundancia bacteriana (10^3 – 10^5 células/análisis \times minuto) como su estado de viabilidad. Los resultados revelaron una gran estabilidad bacteriana $2.58 - 3.15 \times 10^{11}$ células L^{-1} con viabilidad entre 70 y 72 % en ambas plantas, esta estabilidad ha sido consistente con los principales parámetros físicoquímicos. La comparación de estos resultados con los obtenidos en sistemas de fangos activos convencionales reveló una diferencia de un logaritmo de magnitud menos en la abundancia total de los sistemas de aireación prolongada, esta observación ha sido debida principalmente a las características del funcionamiento de ambos tipos de sistemas, cuyas características son más favorables en caso del sistema convencional a cara de crecimiento de bacterias.

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Assessment of total bacterial cells in extended aeration activated sludge plants using flow cytometry as a microbial monitoring tool

Tarik Abzazou¹ · Humbert Salvadó² · Carmina Bruguera-Casamada¹ · Pedro Simón³ · Carlos Lardín³ · Rosa M Araujo¹

Received: 28 October 2014 / Accepted: 12 March 2015 / Published online: 28 March 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract The extended aeration activated sludge (EAAS) process is one of the most applied biological processes in small towns. Here, we study the abundance and viability of total bacterial cells in two wastewater treatment plants (WWTPs) operating with an EAAS process. We use flow cytometry (FCM) combined with SYTO13 and propidium iodide (PI) dyes as a rapid, easy, reliable and accurate microbial monitoring tool. A disaggregation procedure with an ultrasonic bath was designed to detach total bacterial cells from activated sludge flocs for subsequent FCM analysis. This procedure permitted the recovery of total bacterial cells from sludge flocs without affecting bacterial viability, as indicated by bacterial strain controls. Since FCM is a multi-parameter technique, it was possible to determine total bacterial abundance and their viability in the activated sludge. As a comparative method, epifluorescence microscopy was also used to quantify total bacterial cells; both methods produced similar

results. The FCM analysis revealed relative microbial stability in both the WWTPs. The total bacterial abundance quantified by FCM in the two plants studied was $1.02\text{--}6.23 \times 10^{11}$ cells L^{-1} with 70–72 % viability, one logarithm less than that reported in the literature for WWTPs using the conventional activated sludge process. This can be explained by the difference in the operational parameters between the conventional plant and EAAS, mainly the organic loading rate.

Keywords Extended aeration activated sludge · Total bacterial cells · Bacterial viability · Disaggregation procedure · Flow cytometry

Nomenclature

FCM	Flow cytometry
WWTP	Wastewater treatment plant
EAAS	Extended aeration activated sludge
F/M	Food to microorganisms
BOD ₅	5-day biochemical oxygen demand
MLSS	Mixed liquor suspended solids
EPS	Extracellular polymeric substances
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
PI	Propidium iodide
V/V	Volume/volume
EM	Epifluorescence microscopy
ANOVA	Analysis of variance
COD	Chemical oxygen demand
HRT	Hydraulic retention time
Max	Maximum value
Min	Minimum value
SD	Standard deviation
χ^2	Chi-square

Responsible editor: Gerald Thouand

✉ Rosa M Araujo
raraujo@ub.edu
Tarik Abzazou
tabzazou@ub.edu

¹ Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

² Department of Animal Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

³ ESAMUR (Entidad Regional de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales), C. Madre Paula Gil Cano s/n, Ed. Torre Jemeca P. 9ª, 30009 Murcia, Spain

Introduction

Wastewater treatment plants (WWTPs) are based on a combination of physico-chemical and biological treatment processes. One of the most widely used biological processes is activated sludge. There are several activated sludge processes, one of which is extended aeration activated sludge (EAAS); this differs from the conventional one since the process operates with low organic loading rate. Thus, EAAS plants achieve lower organic loading rates expressed in terms of the food-to-microorganisms ratio (F/M). For the conventional activated sludge, F/M is usually between 0.2 and 0.4 kg BOD₅ kg MLSS⁻¹ day⁻¹ which is reduced to 0.05–0.15 in the case of EAAS plants. The application of EAAS is also characterized by a higher sludge age ranging from 20 to 30 days, compared to just 5 to 15 days in case of the conventional process (Metcalf and Eddy 1998). EAAS can be applied to a wide range of wastewater types and has a high treatment capacity, making it suitable for almost all biological wastewater treatment problems (Metcalf and Eddy 1998), especially for small towns.

As with many biological processes, activated sludge depends upon different groups of microorganisms, but primarily bacteria, which account for between 90 and 95 % of total biomass (Wagner et al. 1993). Total bacterial abundance, considering all prokaryotic cells, and viability are key parameters that must be accurately determined in order to assess their role in the performance of wastewater treatment processes. However, these parameters are not usually analysed directly in activated sludge, and biomass is normally estimated in terms of volatile suspended solids (VSS). Nevertheless, the VSS in activated sludge include volatile matter other than microbial biomass, such as inert biomass, extracellular polymeric substances (EPS) and inert organic solids, thus rendering VSS an inaccurate parameter for expressing the total biomass or active fraction (Ziglio et al. 2002).

For a long time, the assessment of total bacteria and their viability in WWTPs was carried out via several traditional laboratory techniques, such as culture methods (Williams et al. 1971; Banks and Walker 1977), standard microscopy for direct quantification of filamentous bacteria (Salvadó 1990) and epifluorescence microscopy (EM) (Fry Jhon 1988; Kepner and Pratt 1994). However, given the complex structure of WWTP sample matrices, especially in the case of activated sludge, these methods are laborious and time-consuming. For instance, the culture method only permits detection and quantification of cultivable bacteria, which represent a small proportion of the activated sludge population (about 5 %) (Foladori et al. 2010b). Nonetheless, this problem can be resolved by the use of epifluorescence or scanning confocal laser microscopy combined with fluorescent dyes such as 4',6-

diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Lawrence et al. 1997) combined with efficient disaggregation of sludge flocs (Buesing and Gessner 2002; Falcioni et al. 2006). Notwithstanding, in this case, a long time is required in order to achieve good statistical reliability, due to the reduced number of bacterial cells quantified in each observed microscopy field.

In recent years, multi-parameter flow cytometry (FCM) has been shown to be a powerful culture-independent method for rapidly detecting and enumerating bacteria in environmental samples (Porter 1997; Bergquist et al. 2009; Ma et al. 2013), particularly in sewage effluent (Porter et al. 1993) and conventional activated sludge (Ziglio et al. 2002; Forster et al. 2002; Foladori et al. 2007). The FCM process rapidly yields accurate single-cell analysis and can be considered an alternative technique for the study of bacterial communities in activated sludge.

Besides facilitating the evaluation of bacterial abundance, FCM combined with fluorescent staining methods such as staining nucleic acids with SYTO13/PI can be used as an accurate method for assessing bacterial viability. The physiological status of bacteria has long been defined as a function of their cytoplasmic membrane status (Nebe-von-Caron et al. 2000). In this study, we use the terms 'viable', 'injured' and 'dead' to refer to bacteria with an intact, partially damaged and permeable cytoplasmic membrane, respectively.

However, the complex and heterogeneous structure of activated sludge, which forms flocs, prevents direct counting of bacterial cells; thus, a prior disaggregation step is required to freely suspend individual cells. Several studies have proposed disaggregation protocols for the efficient recovery of bacteria from sludge (Buesing and Gessner 2002; Falcioni et al. 2006), but few have studied the possible effect on bacterial viability of the different disaggregation protocols, such as ultrasonic treatment and homogenization of environmental samples (Buesing and Gessner 2002; Foladori et al. 2007). In the present study, we apply a double disaggregation mechanism by combining syringe and ultrasonic bath techniques.

Our main objective here was to study the abundance, dynamics and viability of the total bacterial cell fraction of two EAAS WWTPs. To this end, the following methods were developed and applied: (1) a procedure for disaggregating the flocs present in activated sludge samples in order to achieve maximum bacterial cell recovery without negatively affecting bacterial viability and (2) FCM combined with nucleic acid staining with SYTO13/PI as a microbial monitoring tool to enumerate total bacterial cells in EAAS WWTP samples and assess their viability.

Materials and methods

Sampling

Samples of activated sludge were taken over a period of several months from the bioreactors of WWTPs in the municipalities of Archena (WWTP1) and Las Torres de Cotillas (WWTP2), Murcia (Spain). The WWTPs studied employ an activated sludge system with extended aeration process; the operational parameters are given in Table 1. Periodically sample volume of 1 L of activated sludge was taken from a biological tank at each WWTP and transported to the laboratory in a cool box. The samples were collected and processed within 24 h after collection. Reference samples were taken from conventional activated sludge plant of Montcada, Barcelona (Spain).

Floc disaggregation procedure

The disaggregation procedure was performed in two successive steps: (1): A volume of 1 mL of activated sludge sample previously diluted 1:10 (*V/V*) in Ringer $\frac{1}{4}$ (Scharlau Microbiology) solution was pre-disaggregated passing it ten times through a syringe needle (1 ml, 25G 5/8 in. BD Plastipak). (2): Afterwards, the sample was diluted 1:10 (*V/V*) in glass tube with Ringer $\frac{1}{4}$ to a final volume of 5 mL. The glass tube was sonicated in the ultrasonic bath at 360 W, 50/60 KHz (J.P.SELECTA.s.a) for 9 cycles of 45 s (s) each cycle in a controlled temperature range (22–30 °C); between cycles, the sample was shaken for 10 s using a vortex (VELP, Scientifica) at maximum power. The specific energy of the bath corresponding to 9 cycles was calculated to be about 16 KJ L⁻¹ (Mason et al. 1992; Foladori et al. 2010a).

Effect of disaggregation and storage time on cell viability

The disaggregation procedure was applied to *E. coli* WG5 (ATCC 700078) grown in Luria Broth. The concentration of *E. coli* was adjusted to 1.00×10^8 cells mL⁻¹ corresponding to a suspension absorbance of ~0.03 A determined by spectrometer (DU-640, BECKMAN COULTER) at 670 nm. A dilution of 1:100 was performed with Ringer $\frac{1}{4}$ in a glass tube, which was then subjected to the disaggregation procedure. *E. coli* cells were quantified using the nucleic acid staining with SYTO13/PI combined with FCM analysis. A negative control of the disaggregation assay was performed by analysing the *E. coli* culture without disaggregation. Additionally, this test was performed using *B. cereus* CECT 495 and *S. aureus* CECT 59 strains, both Gram-positive bacteria.

In order to determine the effect of storage time on bacterial viability, we monitored the decay rate in three activated sludge samples during 9 days. Bacterial viability was quantified in triplicate using double-staining method using SYTO13/PI combined with flow cytometry at day 0 (2 h after sample collection), 1, 2 and 9 days of sampling. During this time period, samples were kept in the dark at 4 °C.

Quantification of total bacteria using epifluorescence microscopy

Quantification of the total number of bacterial cells was performed using a modified DAPI staining protocol (Jetten et al. 2005). A volume of 10 μ L of disaggregated sample was applied to a well of Teflon printed microscope slides (Fisher) and fixed by drying the sample at 60 °C for 30 min, the fixed sample was covered with 20 μ L of 0.1 % agarosa (Ecogen) and dried 37 °C for 45 min. The sample was counterstained with DNA-binding dye DAPI (Neef et al. 1998). The stained sample was covered with a thin layer of Citifluor PBS solution AF3 (Electron Microscopy Sciences) and observed with a Leica DMIRB epifluorescence microscope with an A filter (excitation BP340–380 nm, emission LP430 nm). For total bacterial cell counts, ten different fields in each well were randomly observed and photographed by using a Leica DFC360FX camera; the obtained images (about 200–400 cells/field) were analysed by using the Fiji-win32 counting programme.

Fluorescence staining methods and flow cytometry analysis

DAPI staining protocol was used for total bacterial cell quantification by FCM. A volume of 250 μ L of DAPI solution (1 μ g μ L⁻¹) was added to 250 μ L of disaggregated sample and incubated for 30 min at room temperature. The stained samples were pre-mixed for a few seconds and analysed in the cytometer.

Bacterial viability was assessed with the nucleic acid staining method using a mixture of two fluorescent dyes; SYTO13 (Life Technology) and PI (Sigma). For the FCM analysis, 500 μ L of disaggregated sample was stained with 0.5 μ L of SYTO13 at final concentration of 14 μ M and with 5 μ L of PI at final concentration of 0.5 nM; the SYTO13/PI mixture was adjusted to 1:10 (*V/V*) to comply with cytometer sensitivity. False positive counts due to possible auto-fluorescence of samples were discarded through direct analysis of disaggregated samples without staining steps.

Flow cytometry analyses were carried out using a FacsAria I SORP sorter (Beckton Dickinson, San Jose,

Table 1 Operational parameters of studied WWTPs

	WWTP1				WWTP2			
	Average	SD	Min	Max	Average	SD	Min	Max
Flow rate (m ³ day ⁻¹)	5768	1306	2453	16,593	3894	1517	1000	12,555
HRT (days)	3.36	0.66	1.67	7.59	4.16	1.42	1.24	7.53
F/M (Kg DBO ₅ Kg MLSS ⁻¹ day ⁻¹)	0.09	0.06	0.01	0.33	0.11	0.11	0.02	0.61
Sludge age (days)	26.4	10.9	17	58.1	30	26	8	90
TSS (mg L ⁻¹)	2463	377	1845	4700	2918	838	1100	4765
VSS (mg L ⁻¹)	1854	268.8	1409	2804	2185	644.5	836	3574
Temperature (°C)	21.5	4.9	11	29	23.3	5.1	14	33

Data obtained from daily analysis over a period of one year (2012)

HRT hydraulic retention time, *F/M* food to microorganisms, *TSS* total suspended solids, *VSS* volatile suspended solids, *SD* standard deviation, *Min* minimum value, *Max* maximum value

California). Bacterial cells labelled with different fluorophores were excited by a laser light source at different wavelengths, by UV laser at 350 nm for DAPI, by blue laser at 488 nm for SYTO13 and by green laser at 532 nm for PI. Fluorescence emission was detected in blue at 440 nm, in green at 530 nm and at 610 nm for DAPI, SYTO13 and PI dyes, respectively; all fluorescence emissions were collected in log mode. Bacterial cells were selected according to their FS/SS signal to reduce signal background, and fluorescence was analysed according to this gate. For bacterial cell enumeration, samples were analysed at a flow rate of 6 $\mu\text{L min}^{-1}$, which corresponds to more than 1000 cells per second. The flow cytometer was calibrated by Sphero Rainbow Calibration Particles, 8 peaks (BD Biosciences, California).

Statistical analysis

Descriptive statistics and *t* test were used for the comparison between total bacterial cells recovery between different cycles of sonication. Paired *t* test was used to evaluate the possible effect of the disaggregation protocol on studied bacterial strains. A Kruskal–Wallis test was performed to test possible significant differences between the total bacteria data obtained using the different quantifying techniques applied in this study. Analysis of variance (ANOVA) was used to testing the effect of storage time on total bacterial cells. All these analyses were performed for both total bacterial abundance and cell viability. The statistical relationship between total bacterial cells quantified by nucleic acid staining with SYTO13/PI combined with FCM and the VSS values was analysed using the Pearson's correlation coefficient. All statistical analyses were carried out using statistical package R version 3.1.2 (R Core Team 2014); the statistical significance was considered at $p \leq 0.05$.

Results

Disaggregation method

The appearance of sludge flocs was observed by dark field microscopy before and after disaggregation, in order to evaluate the efficiency of the procedure (Fig. 1). In the untreated sample, large flocs with filamentous bacteria were highly abundant. In contrast, when the same sample was treated with using our disaggregation method, cells appeared singly with complete disaggregation of filamentous bacteria. A comparison of the microscopic images showed that the flocs had been totally disaggregated.

To establish the maximal recovery value of disaggregated bacterial cells from the activated sludge, different sonication cycles (3, 6, 9, 15, 20 and 30 cycles) were tested. For this test, samples from conventional activated sludge were used as a reference because the total bacterial cell abundance in this type of sludge has been reported previously (Ismail et al. 2007; Foladori et al. 2010a). The results are shown in Fig. 2; sonicating the samples studied for 9 cycles yielded the maximal bacteria recovery rate with no adverse effects on bacterial viability. According to descriptive statistics, sonicating the sludge samples for 9 cycles allowed the highest recovery of bacterial numbers with one of the lower range compared with the rest of treatment. Moreover, pairwise comparison between sonication treatments showed a statistical significance difference between 3 and 9 cycles and between 9 and 15 cycles ($p \leq 0.05$).

Effect of disaggregation on viability and storage time on cells viability

The possible effect of the disaggregation method on bacterial viability was studied by applying the same protocol to *E. coli*,

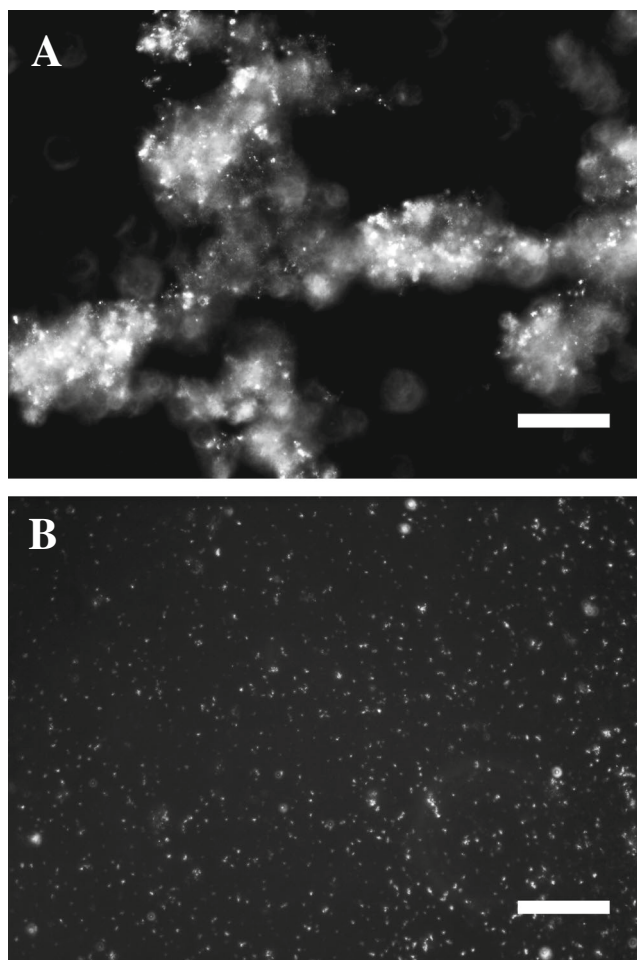


Fig. 1 Dark field images of untreated sample (a) and the same sample after application of the disaggregation procedure (b). Bar represents 40 μm

S. aureus and *B. cereus* cells; the results are shown in the Table 2. A slight decrease in the number of viable *E. coli* cells, from $3.95 \pm 0.29 \times 10^8$ to $3.61 \pm 0.17 \times 10^8$ cells mL^{-1} , was observed after they were subjected to the disaggregation treatment; this corresponds to a decrease of about 1 % in viability. In the case of *S. aureus* and *B. cereus*, no difference was observed in bacterial cell concentration or cell viability between the treated and untreated samples, taking into account the standard deviation. In fact, the slight increase observed in total cells of *S. aureus* and *B. cereus* is due to the fact that in the untreated samples, there were some aggregated bacterial cells; as confirmed by microscopy observation. Statistical analysis of all the strains studied did not show any statistically significant difference in either cell concentration or viability before and after the disaggregation treatment ($p \geq 0.05$, $n=3$).

The evolution of bacterial viability as a function of time for activated sludge samples stored in the refrigerator for 9 days was also tested (Fig. 3). The percentage of

viable bacteria counted using FCM decreased as storage time increased: from 89.4 ± 2.6 % at day 0 to 85.8 ± 0.8 % after 9 days, with no change in the total number of bacterial cells. In our case, the 24 h that elapsed between collection of the WWTP samples and laboratory analysis corresponded to a negligible decay of 0.46 %, according to this test. Thus, no statistically significant difference in either bacterial cell concentration or viability was found between storage days ($p \geq 0.05$, $n=3$).

Comparison of quantification methods

All the bacterial cells recovered from the disaggregated sludge samples were labelled and quantified using FCM and EM: the DAPI staining method combined with EM, DAPI staining combined with FCM and nucleic acid staining with SYTO13/PI combined with FCM (Fig. 4). The results were compared using the Kruskal–Wallis test. The data obtained showed no statistically significant difference between the three quantitative techniques ($p \geq 0.05$, $X^2=3.08$, $n=12$).

Total bacteria and bacterial viability in EAAS plants monitored by FCM

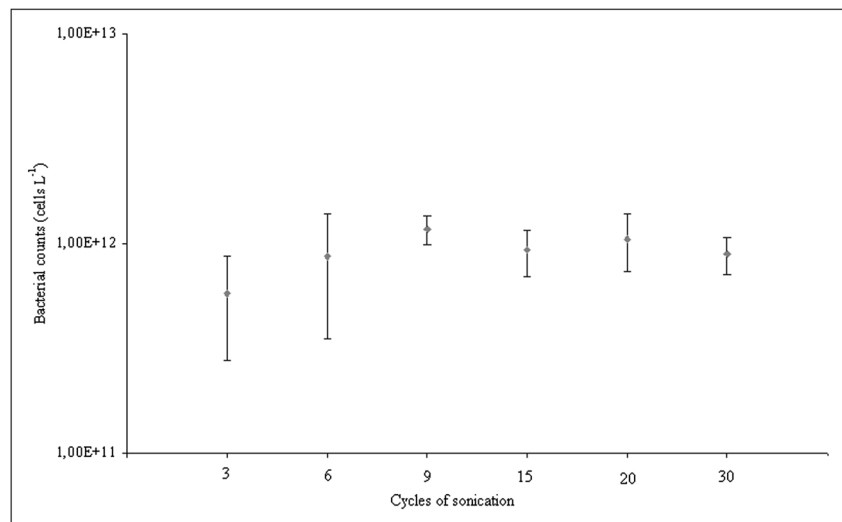
The evolution of the number of bacteria present in the WWTP1 and WWTP2 samples and their viability were studied by combining nucleic acid staining using SYTO13/PI with FCM; Fig. 5 shows the FCM cytograms obtained from one sample. In addition to viable and dead bacterial cells, the cytometer also detected cells that appear double stained with SYTO13 and PI (injured cells).

The results of the FCM analysis of the activated sludge samples from WWTP1 are shown in Fig. 6. The total number of bacterial cells quantified varied over the entire study period between 1.02×10^{11} and 4.03×10^{11} cells L^{-1} . The total bacterial abundance, however, was quite stable throughout the study period, with an average of $2.58 \pm 1.08 \times 10^{11}$ cells L^{-1} of activated sludge, with less than half a logarithm of difference between the maximum and minimum concentrations.

The results of the viability assessment for the total bacterial abundance in the activated sludge samples from WWTP1 are shown in percentage values in Fig. 6. In most of the samples analysed, the total viable bacteria accounted for more than 50 % of the total cells, with an average of 70.3 ± 18.4 %. The average percentages of injured and dead cells were 12.6 ± 3.4 % and 17.1 ± 15.2 %, respectively.

In the case of activated sludge samples from WWTP2, total bacterial abundance and viability were also successfully quantified by FCM (Fig. 6). The graph illustrates the

Fig. 2 Total bacterial cells recovery quantified by nucleic acid staining with SYTO13/PI combined with flow cytometry. The bacterial viability values were (81.05±4.20), (75.49±8.26), (76.74±1.42), (76.76±4.20), (78.64±0.58) and (77.75±0.57) corresponding to 3, 6, 9, 15, 20 and 30 cycles of sonication, respectively. Error bars represent the SD of triplicate measurements



variation in total bacterial cell abundance, which was between 1.57×10^{11} and 6.23×10^{11} cells L⁻¹. In the samples taken in July and October, the total number of bacterial cells was almost five times higher than those counted in the other samples. However, as can be seen from the graph, the total number of bacteria during the study period was more or less stable, with an average value of $3.15 \pm 1.86 \times 10^{11}$ cells L⁻¹ of activated sludge.

The viability of the bacteria in the activated sludge samples from WWTP2 was characterized by a clear predominance of viable cells, with an average of 71.8 ± 10.7 %, taking into account the high concentration of bacteria determined by FCM. The injured and dead cells represented 14.3 ± 3.7 % and 13.9 ± 8.1 % of total bacterial cells as average values, respectively.

The total bacterial abundance in the EAAS and the conventional activated sludge WWTPs studied was compared. For this, conventional plant samples were studied by following the

same protocols designed and reported in this paper for EAAS WWTPs. The results for total bacterial cells in the conventional activated sludge WWTP showed a higher bacterial abundance, $3.12 \pm 1.23 \times 10^{12}$ cells L⁻¹ corresponding to the value of 4290 ± 670 mg L⁻¹ for VSS measured in the plant.

The statistical analysis of the relationship between the total bacterial cell abundance determined by FCM in all the samples analysed from both EAAS plants studied and the corresponding VSS parameter measured in the plants showed a significant correlation coefficient ($R=0.72$, $p \leq 0.05$, $n=12$).

Discussions

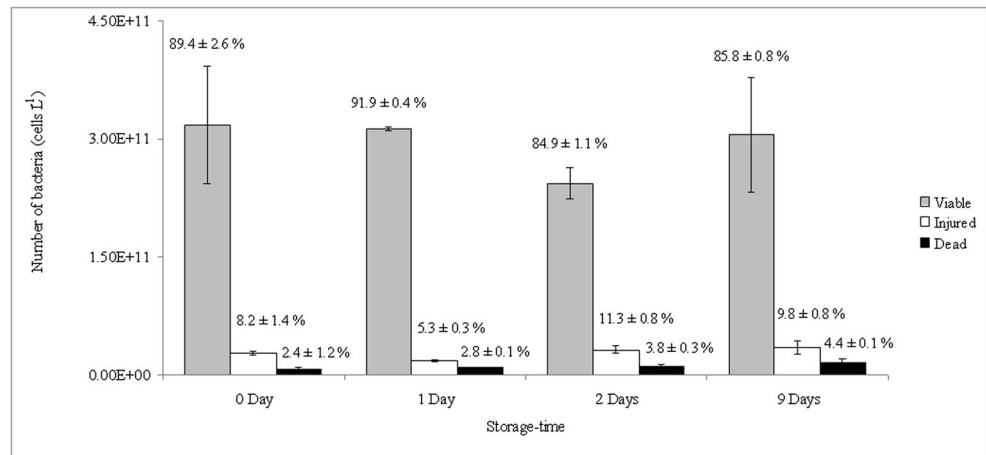
The WWTPs with EAAS are common in small towns, but few data have been published on their microbial communities (Tyagi et al. 2008). In this work, we studied the abundance

Table 2 Effect of disaggregation treatment on total concentration and viability of *E. coli*, *S. aureus* and *B. cereus*, as evaluated by FCM

	Total bacterial cells		Viability		
	Average	SD	Viable	Injured	Dead
<i>E. coli</i> without disaggregation treatment	3.95×10^8	2.91×10^7	98.7±0.2 %	0.3±0.1 %	1.0±0.2 %
<i>E. coli</i> with disaggregation treatment	3.61×10^8	1.70×10^7	97.4±0.9 %	0.6±0.2 %	2.0±0.7 %
<i>S. aureus</i> without disaggregation treatment	8.29×10^7	1.24×10^8	89.9±3.8 %	7.2±3.1 %	2.9±2.3 %
<i>S. aureus</i> with disaggregation treatment	1.88×10^8	1.50×10^8	87.5±18.4 %	11.9±18.5 %	0.6±0.4 %
<i>B. cereus</i> without disaggregation treatment	1.22×10^7	6.63×10^6	96.7±1.5 %	2.6±1.4 %	0.7±0.6 %
<i>B. cereus</i> with disaggregation treatment	1.66×10^7	6.81×10^6	98.4±1.0 %	1.3±0.9 %	0.2±0.2 %

SD standard deviation

Fig. 3 Bacterial viability shifts in activated sludge samples as a function of storage time at 4 °C. The percentage values represent the percentage of viable, injured and dead cells (*error bars* represent the SD of triplicate measurements)



of bacteria and their viability in two EAAS plants by using FCM combined with nucleic acid staining with SYTO13/PI. FCM is currently widely used as a technique for rapid quantification of bacterial cells in different environmental samples (Porter 1997; Steen 2000; Vives-Rego 2000; Grégori et al. 2001). However, very few studies have applied this technique to activated sludge, and it is only in recent years that some studies have been published (Ziglio et al. 2002; Falcioni et al. 2006; Foladori et al. 2010a). This is mainly due to the structural complexity of activated sludge samples, which prevents direct quantification of total bacterial cells using molecular staining methods without an adequate disaggregation method. Several disaggregation techniques have been studied in recent years (Buesing and Gessner 2002; Falcioni et al. 2006); however, in this study, we designed a new technique which is more reliable in terms of bacterial viability. The two-step procedure applied to disaggregate sludge flocs showed good efficacy based on optical microscopy observations, which indicated the total disaggregation of flocs resulting in well-separated bacterial cells which could subsequently be quantified accurately. Due to the total disaggregation of sludge flocs, a pre-

filtration step before FCM analysis, as conducted by other authors (Foladori et al. 2010a), was unnecessary, thus minimizing any possible loss of bacterial cells. The two-step sludge disaggregation method using a syringe and subsequently nine 45 s cycles of ultrasonic bath sonication was adequate for maximum recovery of bacterial cells from the activated sludge samples with a reduced time period of about 10 min for each sample. This procedure was suitable for the activated sludge studied; however, the procedure should be adapted according to the type of sludge by modifying as number of cycles of sonication where necessary.

The study of the effect of the disaggregation procedure on bacterial viability showed little variability in the total concentration of bacterial cells tested, *E. coli*, after disaggregation: *E. coli* decreased by less than half a logarithm, which was probably due to disrupted cells. However, given the high standard deviation calculated in the experiments and the sensitivity of the cytometer, this decrease can be considered negligible. With regard to *B. cereus* and *S. aureus*, no significant change was observed in either bacterial cell concentration or viability. Based on these data and the test conditions (pure cultures), and considering that in the case of activated sludge samples, bacterial cells are usually protected by different materials that make up the flocs; it can be concluded that the disaggregation procedure described here did not have any significant adverse effect on the viability of the bacteria.

WWTP facilities are usually located at a considerable distance from laboratories with adequate equipment to perform accurate measuring procedures such as FCM, therefore entailing a delay between wastewater sampling and subsequent laboratory analysis. In our study, only some 24 h elapsed between sampling activated sludge and laboratory analysis. The effect of this time lapse on bacterial viability was studied. The statistical analysis showed no significant difference in either bacterial cell abundance or viability between storage days, which makes possible the analysis of studied samples even 9 days after sampling.

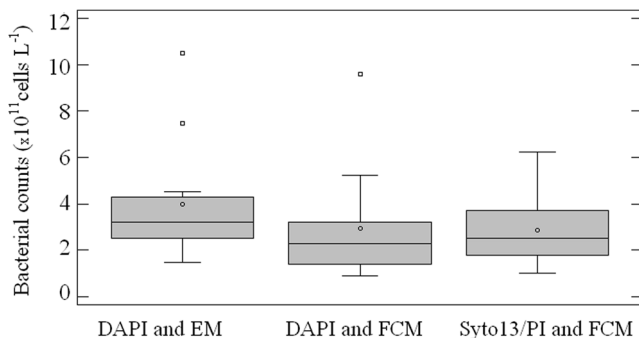
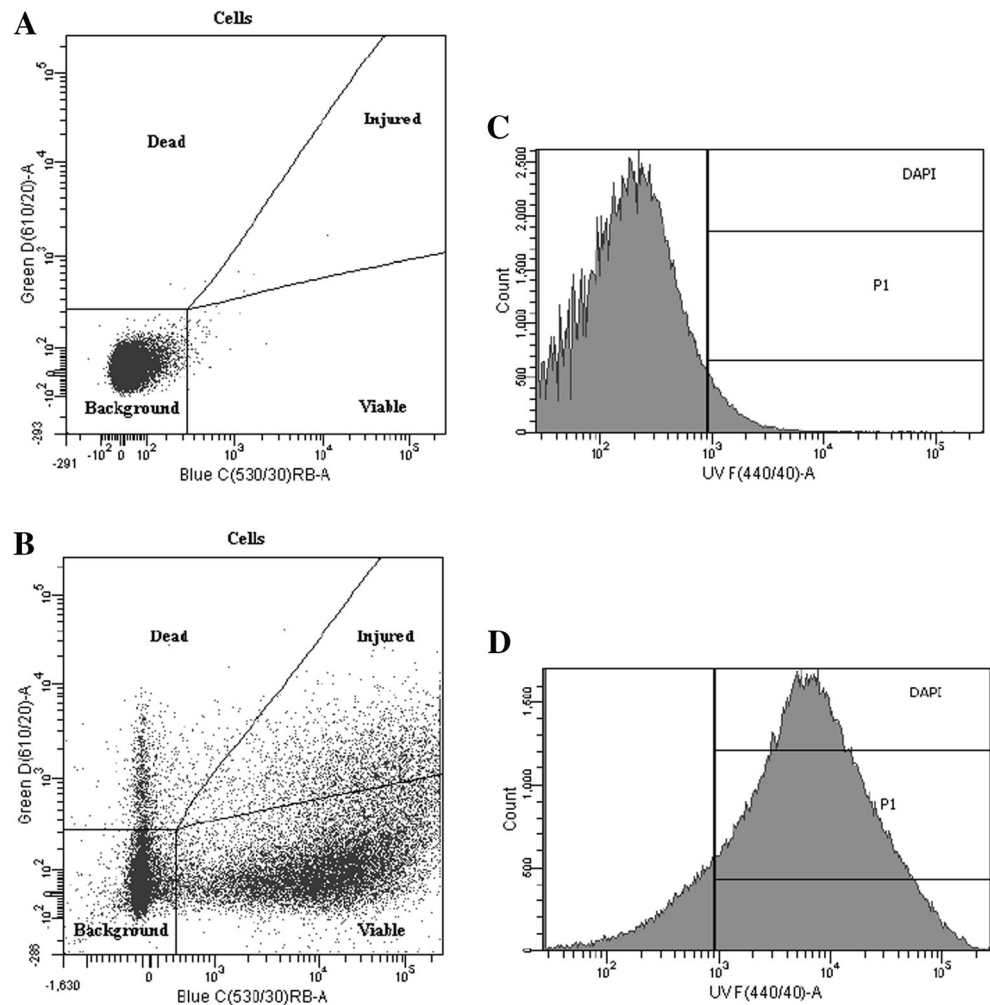


Fig. 4 Box and whiskers plots of total bacterial cells quantified by DAPI combined with epifluorescence microscopy (EM), DAPI combined with flow cytometry (FCM) and SYTO13/PI combined with FCM. Means are presented by *open circles* and medians are *horizontal solid lines* within each box

Fig. 5 Example of FCM analysis: **a** and **b** flow cytometry dot plots of activated sludge without and with SYTO13/PI staining, respectively; **c** and **d** flow cytometry histograms showing fluorescence of total bacterial cells before and after staining with DAPI, respectively



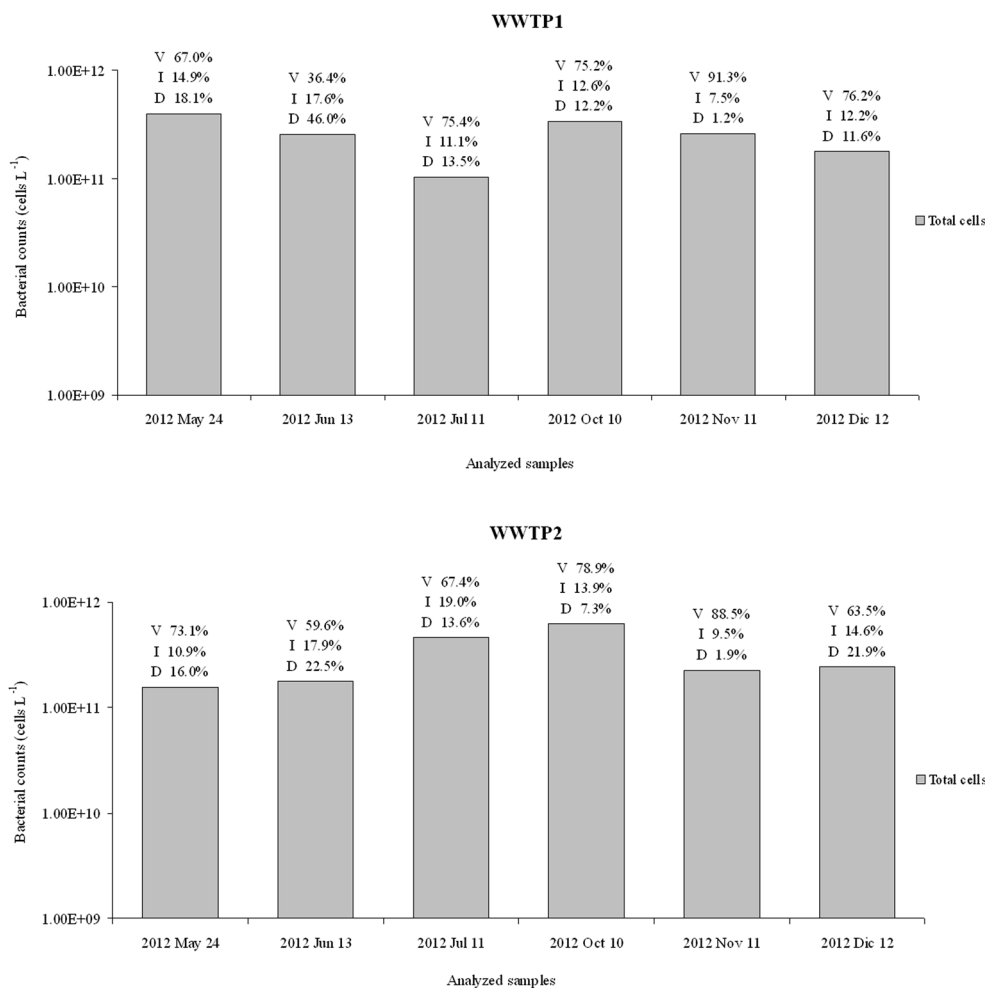
In this study, and for the first time, the use of FCM to enumerate total bacterial cells in activated sludge samples was compared with the conventional epifluorescence microscopy method. A Kruskal–Wallis test statistical comparison of the total number of bacterial cells quantified by the two techniques with the different fluorescent dyes used revealed no significant difference. Based on these results, and since FCM analysis is faster and statistically more accurate due to the wide range of the detection limit (10^3 – 10^5 cells/analysis \times minute) compared with conventional microscopy analysis, its use was considered suitable for monitoring total bacterial cells in activated sludge samples from the WWTPs studied.

Once quantification of total bacterial cells with FCM was implemented, it was used to monitor two EAAS WWTPs. The FCM analysis revealed the relative stability of the abundance of total bacterial cells throughout the study period at both plants. The total bacterial concentration at WWTP1 presented a mean value of 2.58×10^{11} cells L^{-1} , which was about 3.15×10^{11} cells L^{-1} at WWTP2. Although, this small difference is not statistically significant, it was consistent with the differences observed in the operational parameters (see Table 1),

which were more favourable for bacterial growth in the case of WWTP2 than in that of WWTP1. In the case of WWTP1, the sample collected in May has twice as bacterial concentration than in the other samples, which may be explained by the higher organic loading recorded in that month in the influent, specifically the chemical oxygen demand (COD): $863 \text{ mg } L^{-1}$, whereas the average concentration over the 6 months of sampling was approximately $549 \text{ mg } L^{-1}$. A similar explanation may apply to the month of October in the case of WWTP2, when its maximum values were recorded for both total bacterial concentration and COD: 6.22×10^{11} cells L^{-1} and $2919 \text{ mg } L^{-1}$, respectively, while the average COD value for the plant was $1282 \text{ mg } L^{-1}$.

A comparison of the total bacterial cells quantified in the two plants studied with those quantified in a conventional activated sludge plant in this work, and as well with other published data (Ziglio et al. 2002; Falcioni et al. 2006; Foladori et al. 2010a), revealed values one order of magnitude less in the EAAS plants than in conventional activated sludge plants. In general terms, this difference in bacterial abundance may be due to the lower organic loading and higher sludge age

Fig. 6 Total bacterial cells quantified in Archena WWTP (WWTP1) and Las Torres de Cotillas WWTP (WWTP2) by nucleic acid staining with SYTO13/PI combined with FCM. The *percentage values* represent the percentage of viable (*V*), injured (*I*) and dead (*D*) bacterial cells



in EAAS bioreactors (Sette 1977), resulting in low levels of DBO₅ accumulation as biomass cells which consequently could explain the reduced bacterial abundance quantified in the WWTPs studied. However, to confirm this conclusion, more analysis is needed comparing microbial population abundance with the operational parameters in order to find any possible direct relationships between them.

In the EAAS plants studied in this work, a high correlation was found between total bacteria cells and VSS ($R=0.72$), although other studies found no direct correlation between the two parameters (Ziglio et al. 2002).

In summary, since FCM is a multi-parameter technique, and due to the results of combining it with the sludge flocs disaggregation protocol designed in this work, it was possible to enumerate the total bacterial cells in activated sludge and assess their viability. The monitoring of total bacterial cell abundance and their viability over 8 months showed a high degree of stability at both the WWTPs studied, consistent with operational parameters, to be a typical feature of this type of system. In addition, they presented one bacterial cell counts order of magnitude lower than conventional processes, a

finding explained by the fact that the process operates with a low organic loading rate. In this work, we demonstrate the feasibility of applying FCM as a fast and accurate tool to study WWTP bacteria, compared to the traditional epifluorescence microscopy technique.

Acknowledgments The authors thank the ACCIONA Agua Company for funding this study and especially Mr. Amador Rancaño. The authors also thank Dr. Jaume Comas Riu of the Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB) for his help with FCM data analysis, Dr. Javier Méndez Viera for his collaboration, Mr. Pedro Aguiló and Víctor Barreiro of AGBAR, Empresa Metropolitana de Gestió del Cicle Integral de l'Aigua, S.A.

Compliance with ethical standards As authors, we declare that we have no conflict of interest.

References

- Banks CJ, Walker I (1977) Sonication of activated sludge flocs and the recovery of their bacteria on solid media. *J Gen Microbiol* 98:363–368. doi:10.1099/00221287-98-2-363

- Bergquist PL, Hardiman EM, Ferrari BC, Winsley T (2009) Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. *Extremophiles* 13:389–401. doi:10.1007/s00792-009-0236-4
- Buesing N, Gessner MO (2002) Comparison of detachment procedures for direct counts of bacteria associated with sediment particles plant litter and epiphytic biofilms. *Aquat Microb Ecol* 27:29–36
- Falcioni T, Manti A, Boi P et al (2006) Comparison of disruption procedures for enumeration of activated sludge floc bacteria by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 70:149–153. doi:10.1002/cyto.b.20097
- Foladori P, Laura B, Gianni A, Giuliano Z (2007) Effects of sonication on bacteria viability in wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry—fecal indicators, wastewater and activated sludge. *Water Res* 41:235–243. doi:10.1016/j.watres.2006.08.021
- Foladori P, Bruni L, Tamburini S, Ziglio G (2010a) Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry. *Water Res* 44:3807–3818. doi:10.1016/j.watres.2010.04.027
- Foladori P, Tamburini S, Bruni L (2010b) Bacteria permeabilization and disruption caused by sludge reduction technologies evaluated by flow cytometry. *Water Res* 44:4888–4899. doi:10.1016/j.watres.2010.07.030
- Forster S, Snape JR, Lappin-Scott HM, Porter J (2002) Simultaneous fluorescent gram staining and activity assessment of activated sludge bacteria. *Appl Environ Microbiol* 68:4772–4779. doi:10.1128/AEM.68.10.4772-4779.2002
- Fry Jhon C (1988) Determination of biomass. In: Austin B (ed) *Methods Aquat. Bacteriol.* John Wiley & Sons Inc, New York, NY, pp 27–72
- Grégori G, Citterio S, Ghiani A et al (2001) Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining. *Appl Environ Microbiol* 67:4662–4670
- Ismail A, Wentzel MC, Bux F (2007) Using respirometric techniques and fluorescent in situ hybridization to evaluate the heterotrophic active biomass in activated sludge. *Biotechnol Bioeng* 98:561–568. doi:10.1002/bit
- Jetten M, Schmid M, van de Pas-Schoonen K et al (2005) Anammox organisms: enrichment, cultivation, and environmental analysis. *Methods Enzymol* 397:34–57. doi:10.1016/S0076-6879(05)97003-1
- Kepner RL, Pratt JR (1994) Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol Rev* 58:603–615
- Lawrence JC, Korber DR, Wolfaardt GM, Cladwell DE (1997) Analytical imaging and microscopy techniques. In: Hurst CJ, Knudsen G, McNemey M, Stetzenbach LD, Walter M (eds) *Manual of environmental microbiology.* ASM Press, Washington, DC, pp 29–51
- Ma L, Mao G, Liu J et al (2013) Rapid quantification of bacteria and viruses in influent, settled water, activated sludge and effluent from a wastewater treatment plant using flow cytometry. *Water Sci Technol* 68:1763–1769. doi:10.2166/wst.2013.426
- Mason TJ, Lorimer JP, Bates DM (1992) Quantifying sonochemistry: casting some light on a “black art.”. *Ultrasonics* 30:40–42. doi:10.1016/0041-624X(92)90030-P
- Metcalfe, Eddy (1998) In: Brage AG (ed) *Ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento, Vertido y Reutilización* Translated from the third edition in English of (*Wastewater Engineering: Treatment/Disposal/Reuse*), 3rd edn. McGraw-Hill, Madrid, pp 605–633
- Nebe-von-Caron G, Stephens P, Hewitt C et al (2000) Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J Microbiol Methods* 42:97–114. doi:10.1016/S0167-7012(00)00181-0
- Neef A, Amann R, Schlesner H, Schleifer KH (1998) Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* 144:3257–3266
- Porter J (1997) Go with the flow—use of flow cytometry in environmental microbiology. *FEMS Microbiol Ecol* 24:93–101. doi:10.1016/S0168-6496(97)00038-X
- Porter J, Edwards C, Morgan JAW, Pickup RW (1993) Rapid, automated separation of specific bacteria from lake water and sewage by flow cytometry and cell sorting. *Appl Environ Microbiol* 59:3327–3333
- R Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Salvadó H (1990) Método rápido para el control del Bulking: técnica simple y rápida de conteo de microorganismos filamentosos. *Tecnol del Agua* 67:60–63
- Sette RR (1977) Secondary treatment: other aerobic and anaerobic wastewater treatment processes, *Introd. to Wastewater Treat. Process., United Kin.* Academic Press, INC, London, pp 238–239
- Steen HB (2000) Flow cytometry of bacteria: glimpses from the past with a view to the future. *J Microbiol Methods* 42:65–74. doi:10.1016/S0167-7012(00)00177-9
- Tyagi VK, Subramaniyan S, Kazmi AA, Chopra AK (2008) Microbial community in conventional and extended aeration activated sludge plants in India. *Ecol Indic* 8:550–554. doi:10.1016/j.ecolind.2007.07.002
- Vives-Rego J (2000) Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 24:429–448. doi:10.1016/S0168-6445(00)00033-4
- Wagner M, Amann R, Lemmer H, Schleifer KH (1993) Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl Environ Microbiol* 59:1520–1525
- Williams AR, Forster CF, Hughes DE (1971) Using an ultrasonic technique in the enumeration of activated sludge bacteria. *Effluent Water Treat J* 11:83–86
- Ziglio G, Andreottola G, Barbesti S et al (2002) Assessment of activated sludge viability with flow cytometry. *Water Res* 36:460–468. doi:10.1016/S0043-1354(01)00228-7

Capítulo II

3.3. Capítulo II: Seguimiento y cuantificación de bacterias nitrificantes en la biopelícula y el licor mixto de una planta de nitrificación parcial piloto MBBR utilizando hibridación fluorescente in situ

Resumen de estudio 2:

La digestión anaeróbica de los fangos activos es uno de los tratamientos de fangos más ampliamente extendido en plantas depuradoras de cierto tamaño debido principalmente a su alto rendimiento y su potencial de recuperación de energía. Sin embargo, la digestión anaeróbica de los fangos genera aguas muy cargadas en amonio como producto final, lo que supone otro problema a solucionar por parte de las plantas depuradoras.

El vertido directo de estas aguas al ambiente provocaría graves problemas tanto a nivel ambiental como sanitario. Como consecuencia, varios sistemas de tratamiento de aguas muy cargadas en amonio han ido apareciendo en los últimos años. El hecho de optar por un sistema u otro está condicionado por factores tales como la legislación reguladora del vertido de esas aguas, el concepto coste-eficiencia de tratamiento, etc. La nitrificación parcial de amonio seguida de una oxidación anaeróbica de amonio (Anammox), es uno de los sistemas de eliminación de amonio que mayor interés científico ha recibido en la última década, sobretudo en términos de coste-eficiencia.

Las bacterias nitrificantes pertenecientes a los grupos AOB (*ammonia oxidizing bacteria*) y NOB (*nirite oxidizing bacteria*) se consideran los principales responsables de la eliminación de nitrógeno en la mayoría de los procesos biológicos de eliminación de nitrógeno, incluyendo la nitrificación parcial. Por ello, el objetivo principal del presente trabajo fue el estudio cualitativo y cuantitativo y la distribución espaciotemporal de las bacterias nitrificantes en una planta piloto de nitrificación parcial con proceso de lecho móvil con biofilm, también conocido como proceso de lecho fluidizado (MBBR, por sus siglas en inglés).

El presente trabajo, forma parte de la puesta a punto de una planta piloto de nitrificación parcial (MBBR) para el tratamiento de aguas muy cargadas en amonio (676 mg L^{-1}) procedentes de un sistema de digestión anaeróbica de fangos. A parte de la puesta a punto del sistema, se estudiaron la abundancia, diversidad y dinámica de las comunidades nitrificantes junto con los procariotas totales durante un año. Todos estos parámetros fueron estudiados en función de su distribución espaciotemporal en las dos matrices estudiadas; el licor mezcla y los biofilms formados en los lechos de plástico sumergidos en el reactor. Los análisis microbiológicos de los procariotas totales y de las bacterias nitrificantes, se realizaron

mediante las técnicas de marcaje molecular DAPI y FISH, respectivamente, combinados con la técnica de microscopia de fluorescencia. Estos análisis solo fueron posibles después de un protocolo de desagregación de los flóculos formados en el licor mezcla y aquellos recuperados del biofilm formado en lechos. En paralelo, el proceso de nitrificación parcial se controló en base de seguimiento diario de los parámetros operacionales, principalmente, el tiempo de retención hidráulica y la temperatura.

Según el régimen observado del sistema de MBBR, la nitrificación parcial del amonio se alcanzó casi al final a partir del día 211 de la puesta en marcha de la planta piloto. La nitrificación parcial observada correspondía a una tasa de oxidación de amonio del orden de 38.6 ± 14.8 %, este porcentaje era adecuado para la siguiente etapa del proceso de eliminación de amonio, que en este caso era un proceso Anammox. La actividad de nitrificación registrada en la planta piloto fue según lo deseado, limitada a la oxidación parcial de amonio a nitrito con la ausencia de la etapa de nitratación. Esto último fue confirmado por la insignificante producción de nitratos observada en la planta.

En la siguiente parte del estudio comparamos la presencia de células procariotas totales incluyendo las bacterias y las arqueas, cuantificadas a lo largo del estudio en el biofilm y el licor mezcla. Los resultados demostraron una importante oscilación en la abundancia procariota a lo largo del año en ambas matrices analizadas. En el caso del biofilm, la abundancia procariota oscilaba entre 9.52×10^8 y 3.80×10^{12} células mL^{-1} con una mediana de 6.72×10^{10} células mL^{-1} , mientras en el licor mezcla, la oscilaba entre 4.01×10^7 y 2.29×10^{11} células mL^{-1} con una mediana de 7.42×10^8 células mL^{-1} . Estos resultados demostraron de acuerdo con lo esperado, la significativa diferencia entre el grado de colonización procariota de ambas matrices analizadas, donde el 96 % de la totalidad de biomasa colonizaba los lechos en suspensión. Y como consecuencia de estos resultados, se demostró la gran importancia de los lechos como soporte físico para la colonización y estabilidad de la biomasa procariota en el sistema.

En el siguiente trabajo, el funcionamiento de la planta piloto se analizó estadísticamente basándonos en los parámetros operacionales y microbiológicos del sistema. Los resultados demostraron que la actividad nitrificante registrada en el MBBR fue correlacionada significativamente con los resultados cualitativos y cuantitativos de las bacterias nitrificantes. Esta observación nos permitió demostrar que la actividad nitrificante era atribuida

principalmente a las bacterias amonio-oxidantes pertenecientes a la subclase Beta-proteobacterias, cuyo porcentaje dentro de la totalidad de las bacterias era del orden del 11.3 %. Mientras, la presencia de las bacterias nitrito-oxidantes (NOB, por sus siglas en inglés), cuya presencia en el sistema podía alterar el funcionamiento de la nitrificación parcial, era controlada mediante el ajuste de los parámetros operacionales, principalmente el tiempo de retención hidráulico. Sin embargo, los dos géneros estudiados (*Nitrospira* y *Nitrobacter*), fueron detectados de forma variable a lo largo del tiempo con un claro dominio del genero *Nitrospira* en las dos matrices analizadas. No obstante, la actividad demostrada por las NOB resultante en la producción de NO_3^- , fue lo suficientemente baja como para no alterar el funcionamiento del conjunto del sistema nitrificación parcial-Anammox.

En conclusión, la aplicación de las técnicas de marcaje DAPI y FISH combinadas con la microscopia de epifluorescencia junto con el protocolo de desagregación de flóculos de fangos, ha demostrado ser una herramienta clave para el entendimiento y la puesta a punto con éxito del sistema de MBBR para la nitrificación parcial. No obstante, las técnicas diseñadas y aplicadas en este trabajo no están limitadas ni al sistema estudiado ni las comunidades bacterianas analizadas, sino pueden ser adaptadas y aplicadas igualmente a otros sistemas con otros fines.



Tracking and quantification of nitrifying bacteria in biofilm and mixed liquor of a partial nitrification MBBR pilot plant using fluorescence *in situ* hybridization



Tarik Abzazou^a, Rosa M. Araujo^a, María Auset^b, Humbert Salvadó^{c,*}

^a Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

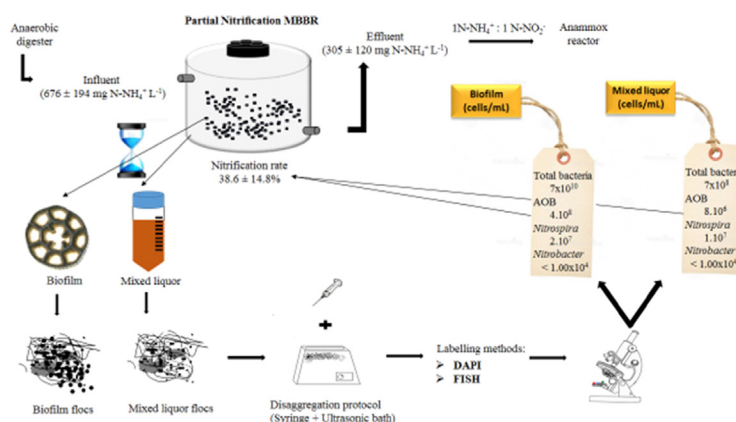
^b ACCIONA AGUA, S.A., Av de les Garrigues 22, El Prat de Llobregat, 08820 Barcelona, Spain

^c Department of Animal Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

HIGHLIGHTS

- Partial nitrification process in a MBBR fed with ammonium-rich liquor was achieved.
- The operational key parameters were the HRT and temperature.
- DAPI and FISH were useful to monitoring microbial composition of MBBR pilot plant.
- The AOB were the dominant nitrifying bacteria, presenting 11.3% of total bacteria.
- A significant correlation ($R = 0.68$) between AOB and ammonia removal was found.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2015

Received in revised form 1 October 2015

Accepted 2 October 2015

Available online xxxx

Editor: D. Barcelo

Keywords:

MBBR

ABSTRACT

A moving bead biofilm reactor (MBBR) pilot plant was implemented as a partial nitrification process for pre-treatment of ammonium-rich liquors ($676 \pm 195 \text{ mg L}^{-1}$), and studied for 479 days under variations in hydraulic retention time. The main purpose of this work, was the study of dynamics abundance of total bacteria and single-cells nitrifying bacteria belonging to ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and nitrite-oxidizing bacteria (NOB) in biofilms and mixed liquor of the plant. The microbial monitoring was successfully achieved using fluorescence *in situ* hybridization combined with flocs disaggregation protocol as a useful microbial monitoring tool. A partial nitrification process with a N-NH_4^+ removal rate of about $38.6 \pm 14.8\%$ was successfully achieved at 211 days after start-up, with a clear dominance of AOB, which accounted for $11.3 \pm 17.0\%$ of total bacterial cells compared with

Abbreviations: MBBR-PP, moving bead biofilm reactor pilot plant; AOB, ammonia-oxidizing bacteria; NOB, nitrite-oxidizing bacteria; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; V/V, volume/volume; PN, partial nitrification; Anammox, anaerobic ammonium oxidation; HRT, hydraulic retention time; DO, dissolved oxygen; PBS, phosphate buffered saline; Cy3, cyanine 3; AOA, ammonia-oxidizing archaea; TSS, total suspended solids; WWTP, wastewater treatment plan.

* Corresponding author.

E-mail addresses: tabzazou@ub.edu (T. Abzazou), raraujo@ub.edu (R.M. Araujo), maria.uset.vallejo@acciona.com (M. Auset), hsalvado@ub.edu (H. Salvadó).

Partial nitrification
FISH
AOB
NOB

only $2.1 \pm 4.0\%$ of NOB. The effluent obtained was subsequently supplied to an Anammox reactor for complete ammonium treatment.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent decades, the global biogeochemical nitrogen cycle has been significantly altered due to high nitrogen contamination caused by different human activities such as industry and agriculture. A large part of this alteration is directly linked to ammonium-rich liquors discharged from wastewater treatment plants (WWTPs). Nowadays, most advanced WWTPs have sludge treatment systems which release an ammonium-rich effluent as a final product of the process. The significant ecological and economic impact that may be induced by these effluents has led to the design and adoption of new treatment processes such as completely autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON), oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification (OLAND), partial nitrification, also known as the single reactor of high activity ammonia removal over nitrite (SHARON) process, and anaerobic ammonium oxidation (Anammox) (Paredes et al., 2007). The combination of partial nitrification (PN) and anaerobic ammonium oxidation (Anammox) has been shown to be one of the most sustainable ammonium removal processes. Compared with the conventional nitrification-denitrification process, the PN-Anammox system saves 20% of oxygen and 40% of supplied organic matter (Zhu et al., 2008).

The PN-Anammox process is very often performed in two separate reactors (Hellings et al., 1998; Van Dongen et al., 2001), although the process can also take place in a single reactor, such as CANON (Cho et al., 2011; Fux et al., 2002). In both cases, the mechanism of the PN process consists of partial oxidation of ammonium through the hydroxylamine pathway. This is an autotrophic process which is achieved by ammonia-oxidizing bacteria (AOB) activity under aerobic conditions, and it differs from conventional nitrification-denitrification in the absence of a nitrification step when the oxidation of NH_4^+ is stopped at the NO_2^- step. Under optimal PN operating conditions, the AOB oxidize 50% of the total ammonium present in the ammonium-rich wastewaters to 50% of NO_2^- , achieving approximately a $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ ratio of 1:1 as the final product, which is essential for the subsequent Anammox process (Van Dongen et al., 2001).

In ammonium removal via the PN-Anammox process, PN is recognized as a key step for full process success due to its rate-limiting role. For this reason and because ammonia removal via the PN process is mainly based on the activity of nitrifying bacteria, the study of these microbial communities, how they change over time and regarding other factors such as physicochemical parameters, is of unquestionable importance in order to achieve optimum PN operation performance.

Several molecular techniques have been developed to date for microbial research studies, most of which provide robust detection and quantification of different bacterial communities present in wastewater treatment installations. In recent years, the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique has been widely applied as a specific microbial monitoring tool (Ge et al., 2014). Compared with other molecular techniques, FISH is recognized as a powerful technique for *in situ* identification of microorganisms and their spatial distribution in WWTP samples (Amann et al., 1995).

Nevertheless, most studies on nitrifying bacteria published in the literature have been limited to the estimation of their percentage with respect to total bacterial cells using a qualitative FISH technique (Almstrand et al., 2011; Li et al., 2011). However, in the majority of cases, the qualitative approach is not adequate for accurate determination of the abundance of single-cells nitrifying bacteria, above all in samples presenting a complex biostructure such as flocs formed in biofilms.

In the present study, a moving bead biofilm reactor pilot plant (MBBR-PP) was implemented as a partial nitrification system for

treatment of ammonium-rich effluent derived from the anaerobic digester of a sludge treatment system. To assess and monitor plant operation as a partial nitrification process, microbial analyses were performed on two MBBR-PP matrices; biofilms formed in moving beads (carriers), and mixed liquor. In this type of plant, biofilms and mixed liquor usually contain a high concentration of aggregated flocs, which serve as a biomass support for nitrifying bacteria, given the slow growth rate of these bacteria (Wang et al., 2012; Wiesmann, 1994). However, this complex biostructure renders it difficult to detect and quantify single-cells bacteria directly when using molecular labeling techniques such as FISH. Consequently, a prior flocs disaggregation protocol must be applied.

The aims of this study were to (i) set up and monitor a MBBR-PP implemented as a partial nitrification process, (ii) apply the DAPI and FISH techniques combined with flocs disaggregation protocol as a microbial quantification method to monitor dynamic changes in total and nitrifying bacteria communities in the two MBBR-PP matrices; biofilms and mixed liquor, (iii) determine the relationship between nitrifying bacteria and the partial nitrification performance.

2. Materials and methods

2.1. Set-up

A MBBR-PP was implemented at a WWTP located in Rubí (Barcelona, Spain). This plant has an influent flow rate of 27,000 m³ per day with 135,000 person equivalent capacity.

The MBBR-PP consisted of a polyethylene tank with a volume capacity of 2000 L which was fed for 312 days with an average influent rate of ($55.7 \pm 20 \text{ L h}^{-1}$) from the anaerobic digester of the WWTP at Rubí. The pilot plant had a hydraulic retention time (HRT) of about $42 \pm 21 \text{ h}$. The plant influent was characterized by a high ammonium concentration with an average value of $676 \pm 194 \text{ mg L}^{-1}$; Table 1 shows the physicochemical parameters of the influent. To promote high biomass growth in the plant, it was fed with 984,000 polyethylene carriers (K1, AnoxKaldnes MBBR) as material support for biofilms, each carrier measuring a total area of 5.08 cm². Both mixed liquor (ML) and carriers were maintained in stable agitation at (53 rpm) by means of a mechanical mixer. To establish plant operation as a partial nitrification system, the MBBR-PP was operated at a temperature of $31 \pm 1.5 \text{ }^\circ\text{C}$ and dissolved oxygen (DO) concentration of 2.5 ppm. This last was monitored using the supervisory control and data acquisition (SCADA) program.

2.2. Plant performance analysis

Changes in the concentration of nitrogen derivatives in the plant were measured according to kits Hach Lange LCK 302, 303, 339, 3340, and 342. The ammonium removal load was calculated in accordance with the substrate balance equation. Variations in the *in situ* DO concentration were monitored and measured using the LDO sensor (Hach Lange LDO), which was also used to measure temperature variations, following the Lange LDO method for both parameters. The total suspended solids (SST) and weight of volatile suspended solids (VSS) were measured by standard methods (Clesceri et al., 1998).

2.3. Sampling and pre-treatment of sludge

For microbiological analysis of nitrifying bacterial communities, two types of matrix were sampled fortnightly from the plant; 80 mL of mixed liquor and 40 carriers randomly collected from the submerged

Table 1
Physicochemical characteristics of MBBR-PP influent.

	T°	pH	TSS (mg L ⁻¹)	VSS (mg L ⁻¹)	COD (mg L ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)
Average (S.D.)	37.97 ± 5.14	7.71 ± 0.13	176.5 ± 73.08	151.5 ± 63.41	882 ± 633	676.36 ± 194.52
Range (max–min)	50–28.9	8.4–7.33	413.3–28	373.3–24	4364–181	1110–195

TSS: total suspended solids.

VSS: volatile suspended solids.

S.D.: standard deviation.

carriers in the tank. For mixed liquor sample analysis, a volume of 1 mL of sample was diluted 2 fold and disaggregated following the double disaggregation method by syringe and ultrasonic bath (Abzazou et al., 2015). For the carrier sample, the biofilms formed in the 40 carriers were first recovered mechanically and suspended in 80 mL of mixed liquor previously filtered through a 0.45 µm filter (EZHAWG474, Millipore) (Canals et al., 2013). Then, 1 mL of the obtained suspension (80 mL) was diluted 10 fold with Ringer ¼ solution (Scharlau Microbiology) and treated following the same disaggregation method as for the mixed liquor sample. The biofilm dilution factor was determined according to the flocs load concentration in the prepared suspension.

2.4. DAPI staining

For the quantification of total bacterial cells, considering all prokaryotic cells, a volume of 10 µL of each disaggregated sample (mixed liquor and biofilm suspension) was analyzed following the protocol described by Abzazou et al., 2015. Briefly, the sample was fixed in a teflon printed microscope slides and covered with DAPI solution (1 µg mL⁻¹).

2.5. Quantitative fluorescence in situ hybridization

2.5.1. Fixation of samples

A volume of 1 mL of each disaggregated sample (mixed liquor and biofilm suspension) was centrifuged at 16,000 × g for 5 min; the recovered pellet were fixed at 4 °C for 3 h by adding three volumes of 4% paraformaldehyde solution and one volume of Phosphate Buffered Saline (PBS) (Amann et al., 1990). The fixed samples were washed twice with 1 mL of PBS and finally suspended in a 1 V/1 V solution of PBS and absolute ethanol (99.98%) and stored at –20 °C.

2.5.2. FISH reaction

For qualitative and quantitative analysis of the nitrifying bacterial community, three DNA probes were used in this study (Table 2). The oligonucleotide probe sequences applied in this study were obtained from the ProbeBase database; for ammonia-oxidizing bacteria (AOB) analysis, the Nso-190 probe was selected for nitrifying bacteria belonging to the subclass of betaproteobacteria, while for nitrite-oxidizing bacteria (NOB) analysis, Nspa-662 and Nit-3 probes were selected for nitrifying bacteria belonging to the genera of *Nitrospira* and *Nitrobacter*, respectively. All probes were labeled at 5' position with the fluorochrome Cy3 (Biomers).

To carry out the hybridization reactions, teflon printed microscope slides (Thermo Scientific) with 10 wells measuring 5 mm² in diameter were used. For the FISH reaction, 10 µL of each fixed sample was

prepared in each slide well following the same protocol as for the DAPI staining method cited above.

For AOB beta-proteobacteria quantification, each well containing an immobilized sample was covered with 9 µL of hybridization buffer (Table 2) plus 1 µL of Nso-190 probe (50 ng µL⁻¹). For *Nitrospira* and *Nitrobacter*, each well was covered with 9 µL of hybridization buffer (Table 2) plus 1 µL of the corresponding probe (50 ng µL⁻¹), Nspa-662 or Nit-3, respectively. The hybridization reaction was performed in a 50 mL tube serving as the hybridization chamber, placing the slide horizontally into the tube. Humidity conditions in the tube were ensured by inserting a folded paper towel moistened with the remaining hybridization buffer (approximately 1900 µL). The tube chamber was incubated at 46 °C for 2 h in the dark using a hybridization oven/shaker (Stuart Scientific).

After 2 h, the paper towel was taken out and the unbound probes were removed by washing the slide for 15 min with 50 mL of wash buffer (Table 2) prewarmed to 48 °C. To avoid any possible fading caused by the Cy3 dye, the preparation was covered with a thin layer (1 drop) of Citifluor mounting solution (PBS solution AF3, EMS). Quantification of nitrifying bacteria was performed by direct counting of 10 random fields in each well using an epifluorescence microscope (Nikon Optiphot, Japan) equipped with a Nikon DM 580 filter.

2.6. Statistical data analysis

Spearman's rank correlation coefficient was used to test the statistical relationship between N-NH₄⁺ influent and N-NH₄⁺ removal load, and between N-NH₄⁺ removal load and NO₂⁻ produced in the tank. A Kruskal–Wallis test was performed to test for possible significant differences between the total bacteria quantified in biofilms and mixed liquor. Statistical relationships between AOB and NH₄⁺ removal load, and between NOB and NO₃⁻ produced were analyzed using Pearson's correlation coefficient. Six outlier values were removed from NOB and NO₃⁻ data due to the FISH detection limit. For normalization of bacterial abundance data, logarithmic transformation was performed. All statistical analyses were carried out using statistical package R version 3.1.2, and statistical significance was set at 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Operational regime

The operational parameters in the partial nitrification reactor pilot plant were monitored for 479 days, as shown in Fig. 1. Based on variations in the HRT, the study period was divided into four phases; A

Table 2
Oligonucleotide probes and hybridization conditions applied in this study.

Probe	Sequence (5' to 3')	Hybridization buffer				Wash buffer				
		1 M tris–HCl (µL)	5 M NaCl (µL)	10% SDS (µL)	100% formamide (µL)	Water Milli-Q (µL)	1 M tris–HCl (µL)	10% SDS (µL)	5 M NaCl (µL)	Water Milli-Q (µL)
Nso-190	CGAT CCC CTG CTT TTC TCC	40	360	2	600 (30% ^a)	998	1000	50	1020	47,930
Nspa-662	GGA ATT CCG CGC TCC TCT	40	360	2	700 (35% ^a)	898	1000	50	700	48,250
Nit-3	CCT GTG CTC CAT GCT CCG	40	360	2	700 (35% ^a)	898	1000	50	700	48,250

^a Percent formamide in hybridization buffer.

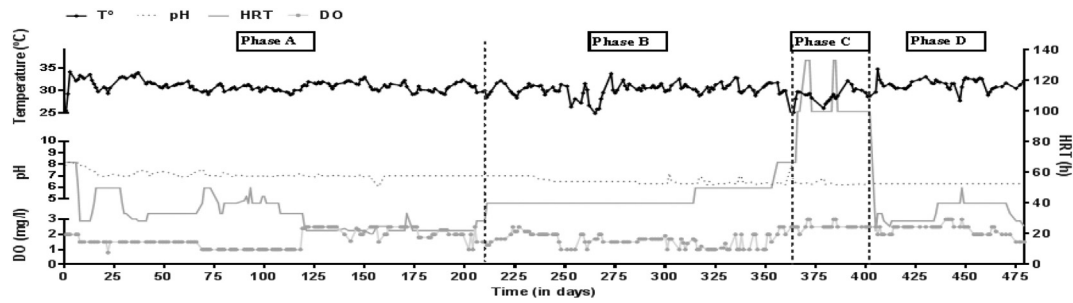


Fig. 1. Changes in operational monitoring parameters (T, pH, HRT and DO) in a MBBR-PP mixed liquor as a function of time. Phase (A): from day 0 to 210, phase (B): from day 211 to 365, phase (C): from day 366 to 402, and phase (D): from day 403 to 479.

(day 0–210), B (day 211–365), C (day 366–402) and D (day 403–479). The changes observed in HRT were due to variations in the influent flow rate implemented in order to achieve the $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ ratio of about 1:1 required to have a PN system. In the set-up phase (phase A), the influent flow rate was changed frequently, producing marked changes in HRT with a median value of 33 h and a range of 20–67 h. Phase B was the most stable phase, during which HRT varied from 40 to 67 h with a median value of 40 h. Phase C was the shortest phase and had the highest HRT, with a median value of 100 h and range of 100–133 h. In the last phase, D, the influent flow rate was readjusted to about 37 h. The other operational parameters, such as temperature (T), pH and dissolved oxygen (DO), were mostly maintained stable in the MBBR-PP throughout all operational periods with the following averages; T (31 ± 1.5 °C), pH (6.7 ± 0.4) and DO (1.8 ± 0.6 mg L⁻¹).

3.2. Partial nitrification performance

The ammonium removal performance of the MBBR-PP and the efficiency of the operational system as a partial nitrification process were studied by monitoring changes in the concentration of nitrogen derived compounds (N-NH_4^+ , N-NO_2^- and N-NO_3^-) in the mixed liquor (Fig. 2a), and the $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ ratio (Fig. 2b). The N-NH_4^+ influent was very variable over time, with a minimum of 195 mg L⁻¹ recorded on the first day and a maximum of 1110 mg L⁻¹ at day 282. Oxidation of N-NH_4^+ was maintained throughout the period studied, as shown in Fig. 2a, including the period with higher N-NH_4^+ influent concentrations between day 255 and day 323. The N-NH_4^+ removal load recorded in the plant was proportional to the N-NH_4^+ influent, the Fig. 3a shows the

lineal relationship between both parameters, corresponding to a high significant correlation ($R = 0.82$; $n = 315$).

Neither N-NO_2^- nor N-NO_3^- were detected in the influent. However as expected they were detected in the tank with the following averages: 322 ± 133.7 mg L⁻¹ and 26.5 ± 32.6 mg L⁻¹, respectively (Fig. 2a). The presence of N-NO_2^- and N-NO_3^- indicated that both nitrogen compounds were derived from the oxidation of NH_4^+ and N-NO_2^- , respectively, while the high correlation ($R = 0.90$; $n = 315$) between the N-NO_2^- produced in the tank and the N-NH_4^+ removal load (Fig. 3b) indicated the presence of active ammonia oxidizing microorganisms in the tank which were responsible for the oxidation of N-NH_4^+ to N-NO_2^- . For N-NO_3^- , the low concentration detected in MBBR-PP compared with the other nitrogen derivatives, was successfully achieved through operating system and it was probably the product of N-NO_2^- oxidation carried out by NOB activity.

The $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ ratio was used to monitor the performance of the MBBR-PP as a partial nitrification system (Fig. 2b). The study period was divided into four phases (A, B, C and D) in accordance with HRT variations, and the observed degree of stability of the $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ ratio was consistent with this division. The $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ ratio was more stable in phases B and D than in phases A and C. The median values of the ratio were 0.9 in phase B with ranges of 0.4–2.3 and 1.1 in phase D with ranges of 0.5–4.2, compared with 0.8 in phase A, with ranges of 0.3–12, and 3.7 in phase C, with ranges of 1.6–5.2. Based on these observations, the importance of monitoring HRT was revealed as one of more important parameters to take into account for system stability. In the set-up phase (phase A), the $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ ratio was quite variable due to instability of the MBBR-PP explained by the modification of

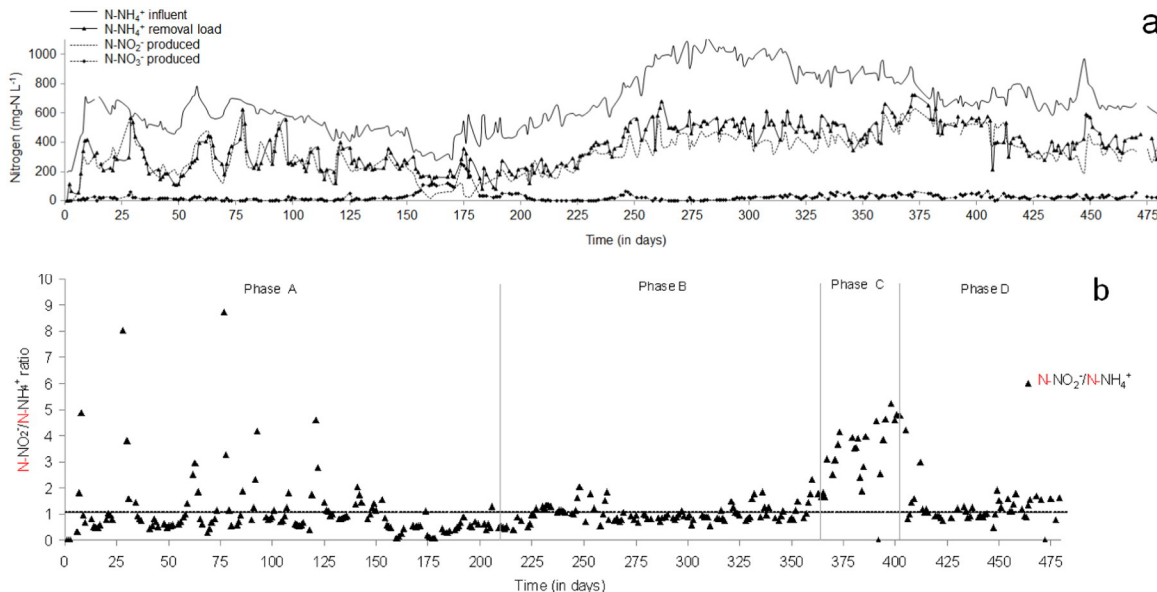


Fig. 2. Changes in the concentration of nitrogen compounds (a) and in the $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ ratio (b) as a function of time. The horizontal line indicates the optimal ratio.

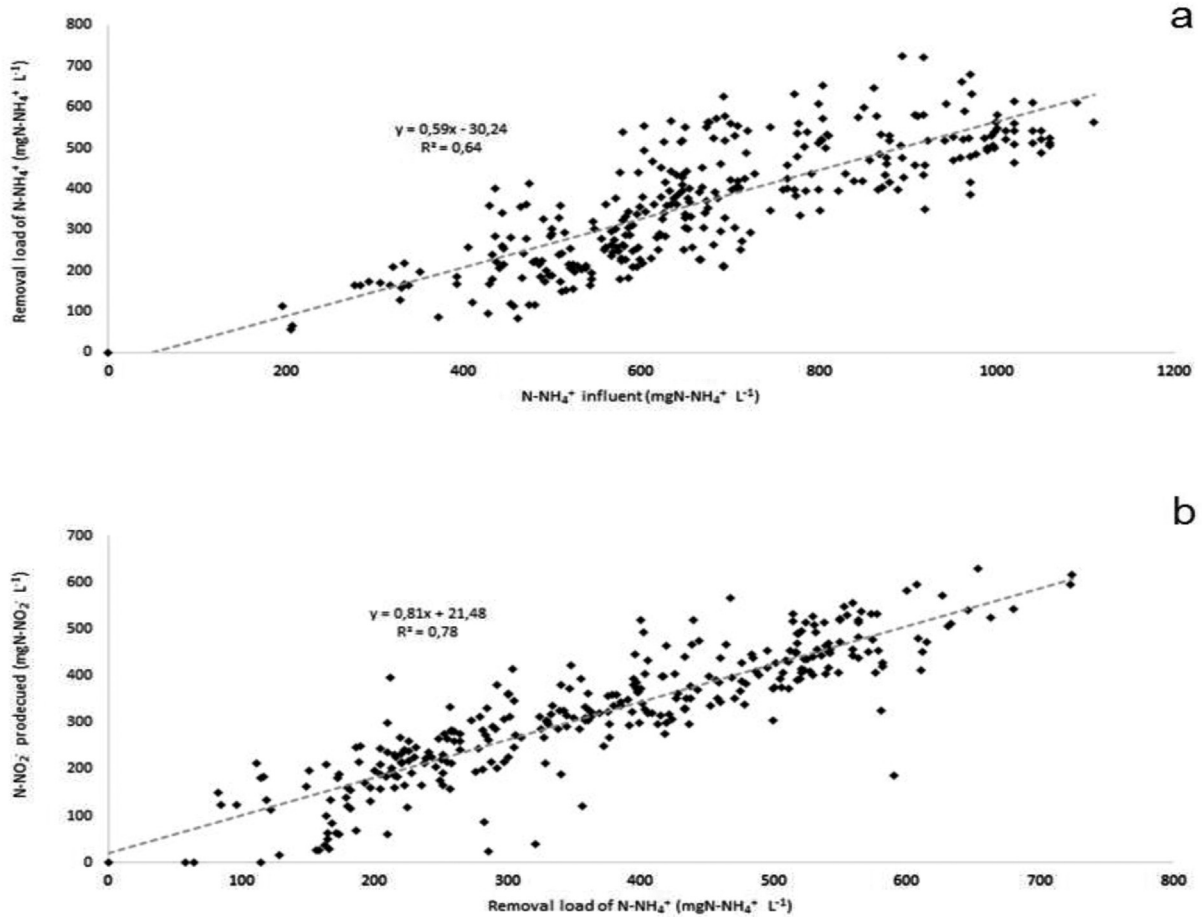


Fig. 3. Relationship between $N-NH_4^+$ influent and $N-NH_4^+$ removal load (a), and between $N-NH_4^+$ removal load and $N-NO_2^-$ produced in the plant.

operational parameters, mainly the HRT. Phase C was characterized by an increase in the $N-NO_2^-/N-NH_4^+$ ratio due to the accumulation of $N-NO_2^-$ in the tank caused by the high HRT, and a similar relationship between HRT and $N-NO_2^-$ accumulation has been reported by (Zekker et al., 2011).

In phases B and D, the MBBR-PP operated as a PN system, with a median $N-NO_2^-/N-NH_4^+$ ratio value of 1 and a range of 0.4–4.2. This ratio was obtained with a HRT of about 40 h, which in turn was obtained by supplying the plant with a flow rate of about $50 L h^{-1}$. For optimal performance of the MBBR-PP as a PN system, the following parameters values were selected: flow rate of $50 L h^{-1}$, temperature of $31\text{ }^\circ C$, DO of $2\text{ mg }L^{-1}$ and pH of 6.3, and subsequently the reactor effluent was fed into an Anammox reactor.

3.3. Total prokaryotic cell abundance

Monitoring abundance of total prokaryotic cells in biofilms and mixed liquor commenced at day 100. The cells were quantified using the DAPI staining method combined with epifluorescence microscopy after flocs disaggregation protocol. Fig. 4 shows the temporal dynamics of total prokaryotic cells present in biofilms and mixed liquor. The results are presented as prokaryotic cells per milliliter to facilitate a comparison of bacterial abundance in both matrices, and they reveal frequent oscillations in prokaryotic cell abundance over time in both matrices. In biofilms formed in the carriers, the abundance ranged from 9.52×10^8 to 3.80×10^{12} cells mL^{-1} with a median value of 6.72×10^{10} cells mL^{-1} , while in the mixed liquor, it ranged from

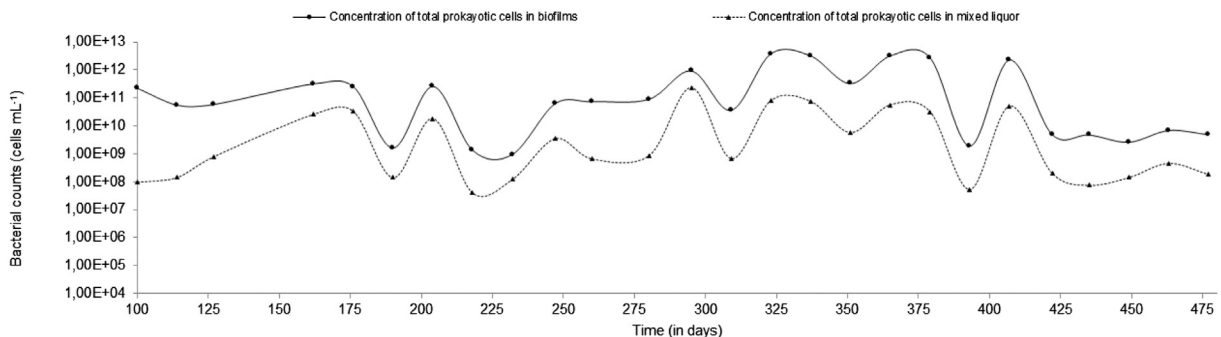


Fig. 4. Changes in total prokaryotic cell abundance in biofilms and mixed liquor as a function of time.

Table 3
Quantitative analysis of nitrifying bacteria in the pilot plant distributed according to the two matrices; biofilms and mixed liquor.

	AOB		NOB	
	Beta-proteobacteria*		<i>Nitrospira</i> ^a	<i>Nitrobacter</i> ^a
Biofilms (+/–)	26/26		19/26	7/26
Median abundance	4.16×10^8		2.70×10^7	1.00×10^4
(Min–max)	$(3.67 \times 10^6–1.02 \times 10^{10})$		$(<1.00 \times 10^4–1.20 \times 10^{10})$	$(<1.00 \times 10^4–4.00 \times 10^{10})$
Mixed liquor (+/–)	26/26		17/26	6/26
Median abundance	8.33×10^6		1.31×10^7	1.00×10^4
(Min–max)	$(2.36 \times 10^6–8.95 \times 10^8)$		$(<1.00 \times 10^4–9.02 \times 10^7)$	$(<1.00 \times 10^4–1.47 \times 10^7)$

(<1.00 × 10⁴): Below the limit of detection.

^a Expressed as bacterial cells mL⁻¹.

4.01×10^7 to 2.29×10^{11} cells mL⁻¹ with a median value of 7.42×10^8 cells mL⁻¹. A comparison between the abundance of total prokaryotic cells in biofilms and in those suspended in the mixed liquor showed that in most of the analyzed samples, the suspended carriers in the MBBR-PP were significantly more colonized by bacterial cells than the mixed liquor. More than 96% of total prokaryotic cells in the plant were attached to carriers, which corresponds to difference of 6.6×10^{11} . This difference was statistically significant (n = 26), revealing the important role of carriers as a good biomass support for the stability of biomass in the plant, as expected.

3.4. Nitrifying bacteria quantification by FISH

The abundance of single-cells nitrifying bacteria was quantified and monitored by combining the flocs disaggregation protocol with a quantitative FISH technique, the results are shown in Table 3. The AOB belonging to the subclass of beta-proteobacteria were detected and quantified in all analyzed samples throughout the study period, while the NOB (*Nitrospira* and *Nitrobacter*) were detected in both matrices but with less frequency and in less abundance (Table 3). The NOB belonging to *Nitrospira* were detected with more frequency (in 70% of analyzed samples) than the NOB of *Nitrobacter* (25% of samples).

A comparison between the abundance of AOB and NOB communities shows a higher abundance of AOB with high stability in the plant (Table 3). The abundance of AOB in the biofilms and mixed liquor showed a difference of about one and a half orders of magnitude (Table 3). On the other hand, the abundance of AOB respecting to total suspended solids (TSS) were; 4.1×10^8 and 6.0×10^7 cells/g of TSS in biofilms and mixed liquor, respectively, showing as the useful of carriers in the MBBR-PP as an efficient biomass support. As expected, the NOB (*Nitrospira* and *Nitrobacter*) showed a high abundance of changes in both matrices. The dominance and stability of AOB in the MBBR-PP was mainly achieved by the plant's operational regime, which was more favorable to AOB than to NOB growth.

There are few data in the literature about the microbial composition of biofilms and mixed liquor in a MBBR. Here, a study was conducted of the spatial distribution of AOB and NOB in two matrices: biofilms and mixed liquor (Table 4). The results show a dominance of AOB beta-

proteobacteria respect NOB within the carriers biofilms, with an average of 87.9%. The dominance of AOB beta-proteobacteria is in agreement with findings reported by (Calderón et al., 2012) in a similar system, and with previous studies performed in laboratory and full-scale WWTP based on technologies other than moving bed biofilm reactors such as; membrane bioreactors, activated sludge and biofilm reactor (Rosenberger et al., 2000; Wagner and Loy, 2002). In most of these systems, the AOB beta-proteobacteria have been demonstrated to be the major microbial component.

As with AOB, the spatial distribution obtained for total NOB shows that they have a greater capacity to colonize biofilms than mixed liquor, with an average percentage of 67.6% versus 32.4% suspended in the mixed liquor. The percentage distribution and number of positive samples indicate that the NOB in the MBBR-PP were clearly dominated by *Nitrospira*. The significant dominance of *Nitrospira* in both matrices agrees with other results obtained by (Kindaichi et al., 2006, 2004a, 2004b; Satoh et al., 2003). With regard to the lower abundance of *Nitrobacter*, this could be attributed to a high ammonium concentration in the influent, which can inhibit their presence (Anthonisen et al., 1976). In addition, some studies have found that *Nitrobacter* prefer to be present in the form of suspended cells, whereas *Nitrospira* have been discovered attached to activated sludge and biofilms (Koops, 2001). This suggests that *Nitrobacter* is more likely to be flushed out with the effluent, while *Nitrospira* is more likely to accumulate in treatment systems, as occurred in our study (Burrell et al., 1998; Daims et al., 2000; Schramm et al., 1999, 1998).

3.5. Nitrifying bacteria and total bacterial cells

Fig. 5 shows the percentage distribution of nitrifying bacteria respect total bacterial cells at the plant, based on the obtained results of FISH technique and DAPI staining method implemented in this work. The findings reveal a marked dominance of AOB beta-proteobacteria, which accounted for $11.3 \pm 17.0\%$ of total bacteria versus $2.1 \pm 4.0\%$ of NOB as average values, corresponding to phases B and D, the period when the MBBR-PP works as partial nitrification. These results agree with those reported in other studies (Wei et al., 2014; Zhang, 2009), where AOB were observed to be the dominant nitrifying bacteria

Table 4
Spatial distribution of nitrifying bacteria in the pilot plant expressed as percentage.

	AOB		Total NOB		NOB			
	(Beta-proteobacteria)				<i>Nitrospira</i>		<i>Nitrobacter</i>	
	Biofilms	ML	Biofilms	ML	Biofilms	ML	Biofilms	ML
Average	87.9%	12.1%	67.6%	32.4%	69.9%	30.1%	58.5%	41.4%
S.D.	±22.2%	±22.2%	±35.5%	±35.5%	±44.3%	±36.3%	±42.0%	±36.4%

ML: mixed liquor.

S.D.: standard deviation.

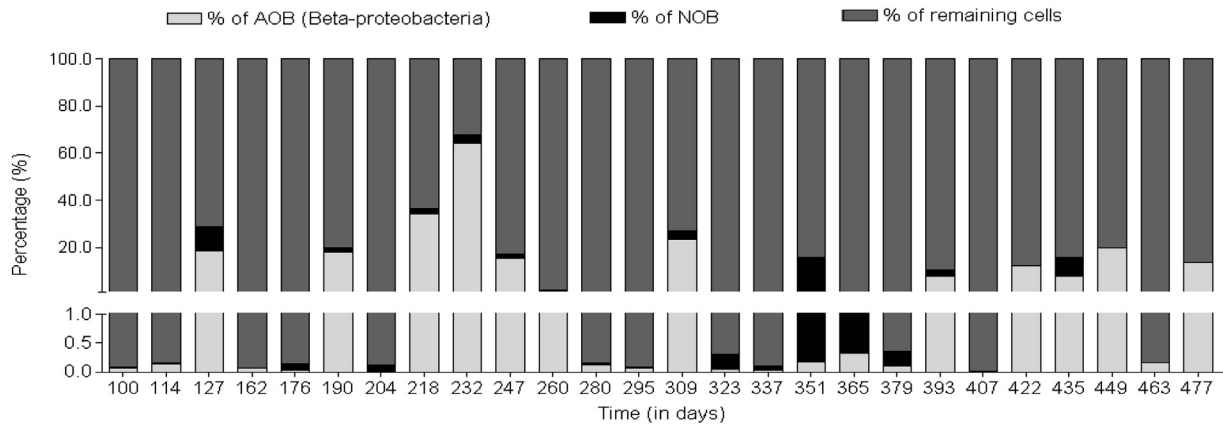


Fig. 5. Changes over time of AOB and NOB in the pilot plant expressed as percentage of total prokaryotic cell.

according to the FISH technique. In general, the percentage distribution of nitrifying bacteria was very variable over the course of the study period: the percentage values of AOB and NOB within total bacterial cells were (2.7%; 0.3%), (12.6%; 2.6%), (3.9%; 1.6%) and (8.9%; 1.3%), corresponding to phases A, B, C, and D, respectively. The maximum AOB abundance detected was 64.1% of total cells at day 232, corresponding to a period between days 218 and 247 when an elevated $N-NH_4^+$ influent concentration was recorded. It also corresponded to phase B, when the MBBR-PP was operating better as a partial nitrification process, which could explain the marked increase in the percentage of AOB in total bacterial cells. In subsequent days, the number of AOB decreased in the plant, while the influent ammonium concentration registered a maximum value of 1060 mg L^{-1} , which may have caused a possible inhibition of AOB. However, this hypothesis requires further data for confirmation. In contrast and as expected, the NOB accounted for a low percentage of total bacterial cells.

3.6. Activity of nitrifying bacteria

The oxidation rate of $N-NH_4^+$ corresponding to phases B and D was about $38.6 \pm 14.4\%$ as an average value, and this rate was sufficient to achieve the $N-NO_2^-/NH_4^+$ ratio of about 1:1 required for the subsequent operation of the Anammox tank. Fig. 6 shows the lineal relationship between $N-NH_4^+$ removal load as a function of HRT, and total AOB beta-proteobacteria quantified combining a flocs disaggregation protocol with a quantitative FISH technique. The statistical relationship between the abundance of AOB and $N-NH_4^+$ removal load recorded on the day -1, day 0 and day +1 of sampling were done, the highest significant

correlation ($R = 0.68$; $n = 26$) was found between the abundance of AOB and $N-NH_4^+$ removal load recorded 1 day after bacterial sampling, suggesting that AOB oxidation activity was responsible for most of the $N-NH_4^+$ removed from the MBBR-PP one day after sampling. The statistical relationship between $N-NH_4^+$ removal load and quantified AOB was clearly influenced in this study by variations in HRT. This study does not include other microorganisms able to oxidize the ammonia, such as ammonia-oxidizing archaea (AOA). However, these microorganisms have shown to be numerically and metabolically less significant than AOB in different WWTP systems (Gao et al., 2013; Jin et al., 2010; Wells et al., 2009; Zhang et al., 2011). Additionally, the operational parameters in the studied plant, especially, NH_4^+ , DO and HRT, were not favorable for the growth of AOA (Park et al., 2006; Sonthiphand and Limpiyakorn, 2011). The potential nitrification rate of AOB (as the principal ammonia-oxidizing microorganisms) in the studied MBBR-PP was estimated at about $0.1 \text{ pmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ according the formula of Harms et al., 2003. However, this estimation should be interpreted with caution, bearing in mind that the potential nitrification rate of AOB can depends on several factors, including the quantity and chemical structure of the substrate supplied, and the AOB strains and WWTP systems studied (Almstrand et al., 2011; Arp and Stein, 2008; Manser et al., 2005).

Meanwhile, the presence of active NOB in the plant may exert a destabilizing effect on the operational regime of the partial nitrification process. For this reason, a statistical correlation was computed between the abundance of total NOB communities quantified and the low $N-NO_3^-$ production rate. The statistical results showed a significant correlation coefficient ($R = 0.67$; $n = 20$), indicating that the quantified NOB were probably responsible for the low production of $N-NO_3^-$ in the

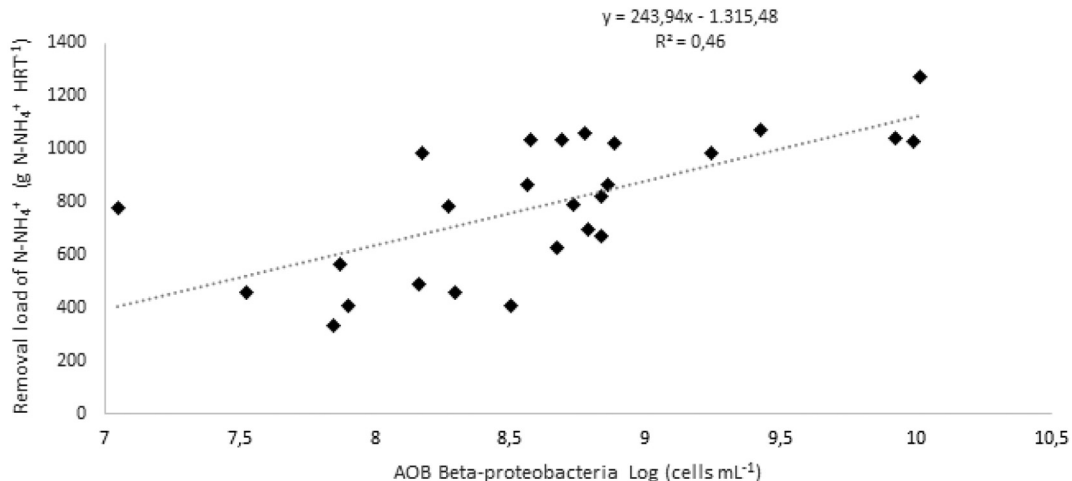


Fig. 6. Relationship between $N-NH_4^+$ removal load and AOB betaproteobacteria abundance.

tank. Given the observed irregularity in the detection of NOB and the low $N-NO_3^-$ recorded in the plant, it can be assumed that the detected NOB did not exert an important adverse effect on the performance of the plant as a partial nitrification system.

4. Conclusions

A MBBR pilot plant was successfully implemented as a partial nitrification process for treatment of ammonium-rich wastewater. The process was achieved mainly through a HRT of about 40 h and temperature of 31 °C. Characterization of total and single-cells nitrifying bacteria using DAPI staining and the FISH technique combined with an efficient flocs disaggregation method has revealed the important role of carriers as a good biomass support, and a clear dominance of AOB beta-proteobacteria. The metabolic activity of nitrifying bacteria cells in the plant was directly related with their abundance based on their significant correlation. The HRT was shown to be a critical parameter for AOB metabolic activity, and also for the frequency detection and the abundance of NOB in the plant. Finally, a good $N-NH_4^+$ removal rate achieved predominantly by AOB activity resulted in the 1 $N-NO_2^-$: 1 $N-NH_4^+$ ratio, required to subsequently feed the Anammox reactor for complete ammonium removal.

Acknowledgments

The authors acknowledge the ACCIONA Agua Company (306393 FBG - UB) for financial support of this study and for providing physico-chemical data especially to Jorge Malfeito and Cristina Hernández, and we are grateful to Eloy Gonzales for his help with statistical analysis and to Oriol Canals and Carme Arnabat for their collaboration.

The authors are also grateful to the UB Water Research Institute for his collaboration.

References

- Abzazou, T., Salvadó, H., Bruguera-Casamada, C., Simón, P., Lardín, C., Araujo, R.M., 2015. Assessment of total bacterial cells in extended aeration activated sludge plants using flow cytometry as a microbial monitoring tool. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-4372-3>.
- Almstrand, R., Lydmark, P., Sörensson, F., Hermansson, M., 2011. Nitrification potential and population dynamics of nitrifying bacterial biofilms in response to controlled shifts of ammonium concentrations in wastewater trickling filters. *Bioresour. Technol.* 102, 7685–7691. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.066>.
- Amann, R.L., Krumholz, L., Stahl, D.A., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172 (2) 762–270.
- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*
- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Srinath, E.G., 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.* 48, 835–852.
- Arp, D.J., Stein, L.Y., 2008. Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria.
- Burrell, P.C., Keller, J., Blackall, L.L., 1998. Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1878–1883.
- Calderón, K., Martín-Pascual, J., Poyatos, J.M., Rodelas, B., González-Martínez, A., González-López, J., 2012. Comparative analysis of the bacterial diversity in a lab-scale moving bed biofilm reactor (MBBR) applied to treat urban wastewater under different operational conditions. *Bioresour. Technol.* 121, 119–126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.078>.
- Canals, O., Salvadó, H., Auset, M., Hernández, C., Malfeito, J.J., 2013. Microfauna communities as performance indicators for an A/O shortcut biological nitrogen removal moving-bed biofilm reactor. *Water Res.* 47, 3141–3150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.017>.
- Cho, S., Fujii, N., Lee, T., Okabe, S., 2011. Development of a simultaneous partial nitrification and anaerobic ammonia oxidation process in a single reactor. *Bioresour. Technol.* 102, 652–659. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.031>.
- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., A., D.E., 1998. *Physical and aggregate properties. Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater.* American Public Health Association, Washington, DC, pp. 58–59.
- Daims, H., Nielsen, P.H., Nielsen, J.L., Jurtschko, S., Wagner, M., 2000. Novel *Nitrosospora*-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology. *Water Science and Technology. Int Water Assoc.* pp. 85–90.
- Fux, C., Boehler, M., Huber, P., Brunner, I., Siegrist, H., 2002. Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitrification and subsequent anaerobic ammonium oxidation (Anammox) in a pilot plant. *J. Biotechnol.* 99, 295–306. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00220-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00220-1).
- Gao, J.-F., Luo, X., Wu, G.-X., Li, T., Peng, Y.-Z., 2013. Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants. *Bioresour. Technol.* 138, 285–296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.176>.
- Ge, S., Peng, Y., Qiu, S., Zhu, A., Ren, N., 2014. Complete nitrogen removal from municipal wastewater via partial nitrification by appropriately alternating anoxic/aerobic conditions in a continuous plug-flow step feed process. *Water Res.* 55C, 95–105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.058>.
- Harms, G., Layton, A.C., Dionisi, H.M., Gregory, I.R., Garrett, V.M., Hawkins, S.A., Robinson, K.G., Saylor, G.S., 2003. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 37, 343–351. <http://dx.doi.org/10.1021/es0257164>.
- Hellinga, C., Schellen, A., Mulder, J., Vanloosdrecht, M., Heijnen, J., 1998. The sharon process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water Sci. Technol.* 37, 135–142. [http://dx.doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00281-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00281-9).
- Jin, T., Zhang, T., Yan, Q., 2010. Characterization and quantification of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) in a nitrogen-removing reactor using T-RFLP and qPCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1167–1176. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2595-2>.
- Kindaichi, T., Ito, T., Okabe, S., 2004a. Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1641–1650. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.3.1641-1650.2004>.
- Kindaichi, T., Kawano, Y., Ito, T., Satoh, H., Okabe, S., 2006. Population dynamics and in situ kinetics of nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by real-time quantitative PCR. *Biotechnol. Bioeng.* 94, 1111–1121. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20926>.
- Kindaichi, T., Okabe, S., Satoh, H., Watanabe, Y., 2004b. Effects of hydroxylamine on microbial community structure and function of autotrophic nitrifying biofilms determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Water Sci. Technol.* 49, 61–68.
- Koops, H., 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37, 1–9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6496\(01\)00137-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00137-4).
- Li, J., Elliott, D., Nielsen, M., Healy, M.G., Zhan, X., 2011. Long-term partial nitrification in an intermittently aerated sequencing batch reactor (SBR) treating ammonium-rich wastewater under controlled oxygen-limited conditions. *Biochem. Eng. J.* 55, 215–222. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.05.002>.
- Manser, R., Muche, K., Gujer, W., Siegrist, H., 2005. A rapid method to quantify nitrifiers in activated sludge. *Water Res.* 39, 1585–1593. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2004.12.040>.
- Paredes, D., Kuschik, P., Mbwette, T.S.A., Stange, F., Müller, R.A., Köser, H., 2007. New aspects of microbial nitrogen transformations in the context of wastewater treatment – a review. *Eng. Life Sci.* 7, 13–25. <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.200620170>.
- Park, H.-D., Wells, G.F., Bae, H., Criddle, C.S., Francis, C.A., 2006. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5643–5647. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00402-06>.
- Rosenberger, S., R. W., W. M., U. S., M. K., 2000. *Operation of Different Membrane Bioreactors: Experimental Results and Physiological State of the Microorganisms.*
- Satoh, H., Okabe, S., Yamaguchi, Y., Watanabe, Y., 2003. Evaluation of the impact of bio-augmentation and biostimulation by in situ hybridization and microelectrode. *Water Res.* 37, 2206–2216. [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00617-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00617-6).
- Schramm, A., De Beer, D., Van Den Heuvel, J.C., Ottengraf, S., Amann, R., 1999. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospora* and *Nitrosira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3690–3696.
- Schramm, A., De Beer, D., Wagner, M., Amann, R., 1998. Identification and activities in situ of *Nitrosospora* and *Nitrosira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3480–3485.
- Sonthiphand, P., Limpiyakorn, T., 2011. Change in ammonia-oxidizing microorganisms in enriched nitrifying activated sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 843–853. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2902-y>.
- Van Dongen, U., Jetten, M.S.M., Van Loosdrecht, M.C.M., 2001. The SHARON®-Anammox® process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Science and Technology*, pp. 153–160.
- Wagner, M., Loy, A., 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 218–227.
- Wang, F., Liu, Y., Wang, J., Zhang, Y., Yang, H., 2012. Influence of growth manner on nitrifying bacterial communities and nitrification kinetics in three lab-scale bioreactors. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 595–604. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-011-1065-x>.
- Wei, D., Xue, X., Yan, L., Sun, M., Zhang, G., Shi, L., Du, B., 2014. Effect of influent ammonium concentration on the shift of full nitrification to partial nitrification in a sequencing batch reactor at ambient temperature. *Chem. Eng. J.* 235, 19–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.09.005>.
- Wells, G.F., Park, H.-D., Yeung, C.-H., Eggleston, B., Francis, C.A., Criddle, C.S., 2009. Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of Crenarchaea. *Environ. Microbiol.* 11, 2310–2328. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01958.x>.
- Wiesmann, U., 1994. Biological nitrogen removal from wastewater. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 51, 113–154.
- Zekker, I., Rikmann, E., Tenno, T., Menert, A., Lemmiksoo, V., Saluste, A., Tenno, T., Tomingas, M., 2011. Modification of nitrifying biofilm into nitrifying one by

- combination of increased free ammonia concentrations, lowered HRT and dissolved oxygen concentration. *J. Environ. Sci.* 23, 1113–1121. [http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60523-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60523-2).
- Zhang, T., Ye, L., Tong, A.H.Y., Shao, M.-F., Lok, S., 2011. Ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in six full-scale wastewater treatment bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 1215–1225. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3408-y>.
- Zhang, Y., 2009. Stability of partial nitrification and microbial population dynamics in a bioaugmented membrane bioreactor. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 1656–1664. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.0906.06006>.
- Zhu, G., Peng, Y., Li, B., Guo, J., Yang, Q., Wang, S., 2008. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York, New York, NY. <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-71724-1>.

Capítulo III

3.4. Capítulo III: Caracterización de las comunidades microbianas responsables de eliminación de nutrientes en tres sistemas diferentes de EDARs a gran escala utilizando un nuevo enfoque de qPCR

Resumen de estudio 3

Durante tres meses se caracterizó y se cuantificó de forma quincenal la composición microbiana de tres plantas de tratamiento de aguas residuales a escala real, las plantas estudiadas fueron las plantas municipales de Roses, Llançà y Castelló d'Empúries, localizadas en la provincia de Gerona al noreste de España. Las tres plantas funcionan con distintos procesos; la planta de Roses opera como planta convencional, mientras que las plantas de Llançà y Castelló d'Empúries emplean el proceso de eliminación biológica de nitrógeno y eliminación biológica de nitrógeno con eliminación biológica mejorada de fósforo, respectivamente. Los grupos microbiológicos analizados en este estudio fueron las bacterias totales, las bacterias nitrificantes incluyendo a los dos grupos de AOB y NOB, las arqueas totales y los PAOs. Para el estudio cualitativo y cuantitativo de estas comunidades microbianas, dos técnicas moleculares fueron implementadas, la técnica de qPCR para las bacterias totales, nitrificantes y arqueas y la técnica de FISH para los PAOs. La técnica de FISH para PAOs fue seleccionada al no disponer de sonda fluorogénica específica para la cuantificación de PAOs mediante la qPCR.

La técnica de qPCR desarrollada en este capítulo se basó en el uso de un nuevo método de diseño de estándares ADN como nueva alternativa al uso tradicional de los estándares basados en plásmidos como portadores de secuencia de ADN a cuantificar. El método implementado consiste el uso de la técnica de *Double-stranded gBlocks Gene Fragments*, la técnica se basa en sintetizar artificialmente fragmentos de ADN de doble cadena que contienen la secuencia diana a cuantificar mediante la qPCR. Los resultados de diseño de los diferentes estándares para cuantificar los microorganismos estudiados revelaron la simplicidad, rapidez, fiabilidad y asequibilidad de la técnica de *Double-stranded gBlocks Gene Fragments* como un método adecuado para la preparación de los estándares para la qPCR. Hasta donde llega nuestro conocimiento, este trabajo representa los primeros resultados de la aplicación de esta técnica en el estudio microbiológico de los sistemas de tratamiento de aguas residuales. En comparación con lo publicado hasta el día de hoy, los resultados obtenidos de los estándares desarrollados fueron satisfactorios a nivel de todos los parámetros importantes de la qPCR; valor de pendiente (-3.18), coeficiente de regresión R^2

(0.99), la eficiencia (105) y rango lineal de detección. Una de las características más relevantes de la técnica de *Double-stranded gBlocks Gene Fragments*, es el hecho de poder sintetizar en un mismo fragmento de ADN dos o más secuencias dianas a cuantificar, lo que permite usar el mismo estándar para cuantificar diferentes microorganismos y eso reduce los costes de la preparación de los estándares. En este estudio esta característica se confirmó analíticamente mediante la preparación simultánea de los estándares de bacterias totales y *Nitrospira* spp. en el mismo fragmento de ADN.

Para los análisis microbiológicos mediante la qPCR, el primer paso fue la extracción de ADN. Para ello las muestras de fangos activos procedentes de las plantas fueron sometidas un protocolo de extracción de ADN. La repetitividad de la extracción fue evaluada mediante la realización de extracciones por duplicado, los resultados no mostraron diferencias significativas en las réplicas. Por otro lado, la recuperación del ADN de las muestras fue evaluada y comparada entre las tres plantas estudiadas. La cantidad de ADN recuperada de las muestras fue generalmente similar entre las plantas, caracterizada por una cierta estabilidad a lo largo del tiempo, excepto la planta Castelló d'Empúries que mostró más fluctuaciones. En cuanto a los análisis realizados mediante la técnica de FISH, los resultados mostraron la fiabilidad de la técnica como herramienta de cuantificación de los PAOs en las muestras de fangos de las plantas estudiadas. La técnica se ha desarrollado con éxito tras un tratamiento previo de las muestras mediante un protocolo de desagregación de los flóculos de fangos presentes.

Los resultados de la puesta a punto de los estándares de qPCR mostraron diferentes rangos de detección para cada grupo de microorganismos estudiados. Para las bacterias totales el rango fue de seis órdenes de magnitud con un límite de detección mínimo (LDM) de 3.72×10^2 copias genómicas (cp) del 16S rDNA por reacción. Disponer de un estándar con un amplio rango de detección es de gran importancia, sobre todo cuando se trata de aguas menos cargadas como las aguas potables por ejemplo. Sin embargo, en el caso estudiado, aguas residuales, el número de bacterias totales no fue un factor limitante.

Para las bacterias nitrificantes, se obtuvo un rango de detección de siete órdenes de magnitud para las AOB y *Nitrobacter* spp. con unos límites de detección mínimo de $2.62 \times$

10^1 y 2.54×10^1 cg del 16S por reacción, respectivamente. En caso de las *Nitrospira* spp. el rango de detección fue más amplio con 8 órdenes de magnitud y con un LDM de 3.72 cg del 16S por reacción. En el caso de las arqueas totales, el presente trabajo presenta la primera referencia detallada respecto a la cuantificación relativa de la arqueas mediante qPCR, ya que el estándar diseñado sólo facilita el número de cg del gen 16S rDNA de las arqueas totales, sin transformar esta información a número de células de arqueas debido a que el número de copias genómicas de este fragmento por célula de arquea es desconocido hasta la fecha. Los resultados de diseño del estándar de las arqueas mostró el rango de detección menos amplio con un LDM de 2.41×10^3 cg del 16S rDNA reacción⁻¹.

Los resultados de la aplicación de las técnicas de qPCR y FISH mostraron unos perfiles microbianos distintos de una a planta a otra, sobre todo de las bacterias nitrificantes y los PAOs. En caso de las bacterias totales y las arqueas, los resultados fueron estadísticamente similares entre las plantas. Los resultados de la cuantificación de bacterias totales juntamente con la concentración de ADN recuperado de las muestras, y tal como se esperaba estaban correlacionados. Dicha información puede servir en muchos casos para predecir el aspecto microbiológico general y la carga microbiana de las muestras basándose en la cantidad de ADN recuperada de las mismas, siempre y cuando las condiciones de trabajo sean parecidas al presente estudio. Por otra parte, teniendo en cuenta que la materia orgánica, usualmente medida mediante la DBO₅, es eliminada mayoritariamente mediante las bacterias heterótrofas que conforman un porcentaje importante de las bacterias totales, tanto la abundancia bacteriana cuantificada como la tasa de DBO₅ registrada en los reactores biológicos fueron parecidas entre las tres EDARs estudiadas.

Los datos microbiológicos juntamente con los parámetros operacionales de las tres EDARs se han estudiado estadísticamente. Los resultados revelaron ciertas correlaciones estadísticamente significativas mientras otras no. En caso de la eliminación de nitrógeno, no se observó correlación directa entre la abundancia de las AOB, y la tasa de eliminación de amonio. Sobre todo en caso de la planta convencional donde se esperaba alta eliminación de amonio teniendo en cuenta la alta abundancia de las AOB cuantificadas en esta planta. Esta observación puede ser debido al tiempo de retención hidráulico de la planta que fue relativamente menor comparado con el de la planta de eliminación de nitrógeno donde se

cuantificó una abundancia bacteriana de AOB parecida pero con mayor tasa de eliminación de amonio.

En cuanto al otro grupo de bacterias nitrificantes, NOB, los resultados mostraron mayoritariamente un dominio de las *Nitrospira* spp. sobre todo en las plantas diseñadas para la eliminación de nitrógeno. En caso de la planta convencional las *Nitrobacter* spp. predominaron las NOB. La actividad de las NOB fue evaluado mediante la medición de NO_3^- producido en las plantas, teniendo en cuenta la ausencia de este último en los influentes que alimentan las plantas. La relación estadística entre la abundancia de NOB y la concentración de NO_3^- medida en los reactores mostró una correlación lineal significativa lo que describe el estado de actividad de las NOB. Estudiando de forma separada entre las *Nitrospira* spp. y *Nitrobacter* spp. esta correlación fue marcada más por las *Nitrospira* spp. como grupo NOB más activo.

El estudio cuantitativo de las arqueas, aunque de forma relativa, reveló una alta presencia del gen 16S rDNA de arqueas en las muestras estudiadas. La extrapolación de estos resultados suponiendo un escena en el que cada célula de aqueas tiene una sola copia del gen 16S rDNA, mostraría sin duda la gran abundancia que puedan tener estos microorganismos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Dentro de las arqueas totales, uno de los grupos más relevantes son las AOA que contribuyen de forma significativa en el proceso de eliminación de amonio. Por lo tanto la detección de altas concentraciones de aqueas totales en las EDARs aumenta la probabilidad de presencia de AOA, lo que puede ayudar a entender mejor la tasa nitrificante de las plantas.

Por último, los PAOs fueron detectadas y cuantificadas con éxito mediante la técnica de FISH. Los resultados mostraron su presencia en todas las muestras de las tres EDARs. La comparación de la abundancia de los PAOs entre las plantas, y tal como se esperaba, reveló una mayor abundancia en la planta diseñada para la eliminación de fósforo. Como era de esperar, la actividad de eliminación de fósforo en esta planta fue la más alta en comparación con el resto de las EDARs, lo que concuerda con los datos de cuantificación de los PAOs. Generalmente la actividad de los PAOs, según los cálculos realizados, fue significativamente

alta a nivel de todas las plantas estudiadas en comparación con los datos publicados por otros autores.

Characterization of nutrient-removing microbial communities in three different full-scale
WWTPs systems using a new qPCR approach

Authors: Abzazou Tarik^a, Salvadó H^b, Araujo Rosa M^a.

^aDepartment of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona Av. Diagonal 643,
08028 Barcelona, Spain.

^bDepartment of Animal Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona Av. Diagonal
643, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail address:

tabzazou@ub.edu +34 67 302 7099

hsalvado@ub.edu +34 93 402 1440

raraujo@ub.edu +34 93 402 1491

Abstract

The biological wastewater treatment process involves a very complex microbial composition. The culture-independent molecular methods are new tools to analyze the presence of different microbial communities, such as nutrient-removing communities. gBlocks gene Fragments technique was performed as a new Real-Time PCR approach for the development of DNA standards for the quantification of total bacterial cells, AOB, NOB, and Archaeal DNA gene in three different WWTPs. PAOs were also quantified using FISH technique. The findings highlight a significant improvement in Real-Time PCR detection ranges of studied microorganisms. The applied of qPCR and FISH technique has allowed the characterization of microbial composition of three WWTPs operated as conventional, biological nitrogen removal and nitrogen removal and enhanced biological phosphorus removal processes. The results revealed a significant difference in microbial profile of studied WWTPs, especially in nitrifying bacterial communities and PAOs, which was in accordance with operational performance.

Key words: gBlocks, FISH, AOB, NOB, Archaeal, PAOs.

Introduction

Nowadays, the biological processes are widely used as the main bioengineering facilities for treatment of wastewater, especially for those of domestic origin. Because all these biological processes are necessarily dependent on the microbial composition that are present in wastewater treatment plants (WWTPs), especially bacterial composition, understanding the ecological links that govern the biological processes in these plants is of a great importance. By determining the underlying principles dictating structure and function in these complex microbial communities, treatment systems may be optimized and process failure avoided.

Since nutrient elements; nitrogen and phosphorus are an important cause of eutrophication (Kroeze et al., 2013), the use of biological nutrient removal systems has been widely applied in most of the wastewater treatment plants with the aim to prevent eutrophication problems in water sources (Semerci and Hasilci, 2016). The biological nutrient removal processes are usually based on anaerobic, anoxic and aerobic reactors linked in-series (Cosenza et al., 2013; Lu et al., 2015).

In the case of nitrogen, the need to remove its excess concentration present in wastewaters arises from its potential toxic effect on aquatic life in receiving water bodies, its effect on the nitrogenous oxygen demand and on its role as a nutrient in enhancing eutrophication especially in marine environments (Metcalf and Eddy, 2003). Nitrogen is mainly present in wastewaters in its reduced form as ammoniacal nitrogen. The biological nitrogen removal (BNR) process is the most common method for removing low quantities of ammonium from wastewater. In BNR system, the nitrogen is removed in two steps through nitrification and denitrification processes. In the nitrification step, the ammonium (NH_4^+) is firstly oxidized metabolically to nitrite (NO_2^-) via hydroxylamine (NH_2OH) under aerobic conditions, step known as nitritation. This process is carried out mainly by ammonia-oxidizing bacteria (AOB), as the principal oxidizing organisms. However, other organisms can be involved in this process, such as ammonia-oxidizing archaea (AOA) (Gao et al., 2013). In the second step of nitrification, step called nitratation, the nitrite is oxidized rapidly to nitrate by nitrite-oxidizing bacteria (NOB) in the presence of molecular oxygen.

Phosphorus as well as an important macronutrient is considered as a remarkable pollutant that contributes directly in the eutrophication of aquatic systems as a key limiting nutrient. The biological process used for phosphorus removal processes is known as enhanced biological phosphorus removal (EBPR), which is based on the ability of certain microorganisms, such as polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) to take up excess orthophosphate and store it as polyphosphate. Then stored phosphorus is removed with the biomass from the WWTP (Bao et al., 2007). The features of EBPR; high P-removal efficiency, lower operational costs, lower sludge production and the potential recovery of phosphorus have contributed to its application and popularity (Nielsen et al., 2012).

Since all mentioned biological nutrient removal processes are necessarily dependent on microorganisms, the understanding of the community dynamics of different microorganisms involved in these processes is becoming essential for performance optimization of wastewater treatment. The achievement of this objective requires the availability of accurate, rapid and easy microbial techniques. For this reason, the recent use of advanced biotechnology, especially molecular techniques have been remarkably applied in different environmental fields (Gilbride et al., 2006). Generally, the molecular techniques used to explore wastewater microbial communities can be roughly grouped into four categories: clone library, molecular fingerprinting, hybridization and quantitative real-time PCR (qPCR) (Kim et al., 2013). In this work, we focused the study on the use of qPCR and FISH techniques as promising techniques for the monitoring of microbial composition of WWTP to study. The selection of qPCR was attributed to its rapidity, specificity and accurate application as a routine microbial monitoring tool. For all these features, the use of qPCR is widely applied in different wastewater treatment processes, including processes with fixed and suspended microbial communities under both aerobic and anaerobic conditions (Hall et al., 2002; Kindaichi et al., 2006; Lee et al., 2011; Limpiyakorn et al., 2005). The traditional qPCR involves the use of DNA plasmids as standard DNA for the achievement of standard curves of a known target DNA quantity; however, this method can be expensive and high time consuming.

The objectives of this work were; (i) design and application of easy DNA standards for qPCR using Double-stranded gBlocks Gene Fragments technique, (ii) set-up of

qPCR technique for the quantification of total bacterial cells, AOB, NOB, and Archaeal 16S rDNA gene in three different WWTPs, (iii) set up and application of FISH technique for the quantification of PAOs and (iv) comparison of microbial composition among three different WWTPs according to their operational performance.

Material and methods

Sampling

Activated sludge samples (1L) were collected fortnightly for three months from three different WWTPs in the province of Gerona (Spain), the samples were collected and processed within 24 h after collection. The WWTPs studied were the municipal plants of Roses, Llançà and Castelló d'Empúries, for abbreviation the plants are mentioned as WWTP I, WWTP II and WWTP III, respectively. All the plants employ a conventional activated sludge combined with Carrousel system with different organic load. The plant of Roses is designed for the conventional biological treatment, while the plants of Llançà and Castelló d'Empúries are designed biological nitrogen removal and biological nitrogen removal with enhanced biological phosphorus removal, respectively. The table 1 shows the principals physicochemical features of studied plants.

Table 1: Description of operational parameters of bioreactors of three studied WWTPs.

Parameter	WWTP's			
	WWTP I	WWTP II	WWTP III	
Volume capacity (m ³)	7500	3435	7700	
Flow rate (m ³ day ⁻¹)	7691 ± 2363	4049 ± 1610	5023 ± 1061	
HRT (days)	0.86 ± 0.08	1.25 ± 0.48	1.50 ± 0.23	
F/M (Kg DBO5 Kg MLSS ⁻¹ day ⁻¹)	0.17 ± 0.13	0.11 ± 0.09	0.06 ± 0.05	
O ₂ (mg L ⁻¹)	0.62 ± 0.29	0.26 ± 0.09	2.16 ± 0.14	
TSS (mg L ⁻¹)	1698 ± 360	2930 ± 1157	4816 ± 801	
VSS (mg L ⁻¹)	1347 ± 420	2319 ± 915	3460 ± 643	
BOD ₅ (mg L ⁻¹)	Influent	140.33 ± 32.88	225 ± 120	303.17 ± 121.53
	Effluent	4.33 ± 2.16	3.16 ± 0.41	3.00 ± 0.00
	Removal rate (%)	96.9	98.6	99
COD (mg L ⁻¹)	Influent	419.16 ± 152.57	606.67 ± 198.32	748.67 ± 216.11
	Effluent	103.16 ± 19.80	42.16 ± 20.10	41.83 ± 10.07
	Removal rate (%)	75.38	93.05	94.41
NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	Influent	41.17 ± 3.37	56.5 ± 16.00	53.17 ± 5.70
	Effluent	29.50 ± 6.35	1.60 ± 1.31	3.41 ± 5.40
	Removal rate (%)	28.34	97.17	93.58
TN (mg L ⁻¹)	Influent	53.16 ± 5.98	78.00 ± 21.00	68.50 ± 5.2
	Effluent	38.15 ± 10.42	5.43 ± 2.42	6.85 ± 4.50
	Removal rate (%)	28.23	93.03	90
TKN (mg L ⁻¹)	Influent	53.16 ± 5.98	78.00 ± 21.00	68.50 ± 5.2
	Effluent	38.00 ± 10.50	4.9 ± 2.46	3.31 ± 2.17
	Removal rate (%)	28.51	93.71	95.16
P (mg L ⁻¹)	Influent	5.41 ± 1.55	10.15 ± 3.45	9.68 ± 2.89
	Effluent	1.80 ± 1.87	3.46 ± 1.73	2.08 ± 2.63
	Removal rate (%)	44.5	59	72

Preparation of qPCR standards

The standard curves for the quantification of all microorganisms studied in this work were performed in triplicate using **Double-stranded gBlocks Gene Fragments as control templates. The gene fragments consisted of linear double stranded DNA sequences designed from the conserved 16S rDNA gene of studied microorganisms.** The table 2 resumes the specific features of each sequences of oligonucleotides. In the case of total bacterial cells and *Nitrospira* spp. two 35-bp clamps were added to the extremes of 16S rDNA to stabilize the DNA standard; CGTGACATCCAGTCAGATCGTACGTCAGACTTCGA was added at 5', while TAGCCGAATCGTCCATTGAAATCGATCCTACGTAG was added at 3'. All gBlocks were synthesized by IDT (Integrated DNA Technologies). The complete sequence of all standards are listed as Annex material. The preparation of desired concentration of standards was carried out following the manufacturing instructions. The quality and accurate amount of DNA of all standards provided by manufacturing company were checked using Qubit Fluorometer (Invitrogen). The number of copies was calculated using the following equation (Whelan et al., 2003):

$$\text{DNA (copy)} = \frac{6.02 \times 10^{23} (\text{copy mol}^{-1}) \times \text{DNA amount (g)}}{\text{DNA length (bp)} \times 660 (\text{g mol}^{-1} \text{pb}^{-1})}$$

Table 2: Double-stranded gBlocks Gene Fragments.

Specificity	Sequence 5'-3'	Length (bp)	Location on 16S rDNA	GBNA** of 16S rDNA
Total bacterial cells and <i>Nitrospira</i> spp.*	See annex	507***	1-437	AF420301
AOB	See annex	348	2933-3280	AL954747
<i>Nitrobacter</i> spp.	See annex	359	151-500	DQ388518
Archaeal 16S rDNA	See annex	493	263-755	AB019724

*: Same standard was used for the quantification both total bacteria and *Nitrospira* spp.

** : GenBank Accession Number

Real-Time PCR analysis

A volume of 1 mL of each homogeneous sample was centrifuged at 16000 g during 5 min, the total genomic DNA was extracted from the obtained pellet using Power Soil DNA Isolation Kit (MOBIO) by following the manufacturing instructor. The quality and yield of DNA recovered was measured using Qubit Fluorometer (Invitrogen). The DNA extraction was performed in duplicate and stored at - 80 °C. Real-time PCR assays for the quantification of 16S rDNA of total bacteria, AOB, *Nitrospira* spp., *Nitrobacter* spp., and Archaea were performed using a StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher, SCIENTIFIC). All Real-time PCR assays were performed in duplicate in 48-Wells Plate, including no template controls. The primers sets and probes applied in this work were synthesized by Biomers and are displayed in the Table 3.

Table 3: Oligonucleotide primers and Taqman probes used in this work

Target	Primer/probe	Sequence (5' to 3')	Ta (°C)	Reference
Bacterial 16S rDNA	1055f	ATGGCTGCGTCAGCT	50	(Ferris et al., 1996)
	1392r	ACGGCCGGTGTGATC		(Lane, 1991)
	16S _{Taq1115}	6-FAM-CAACGAGGCCAACCC-TAMRA		(Harris et al., 2003)
Ammonia-oxidizing bacterial 16S rDNA	CTO 189fA/B	GGAGRAAAGCAGGGGATCG	60	(Hermansson and Lindgren, 2001)
	CTO 189fC	GGAGGAAAGTAGGGGATCG		(Hermansson and Lindgren, 2001)
	RT1r	CGTCCTCTCAGACCARCTACTG		(Hermansson and Lindgren, 2001)
	TMP1	6-FAM-CAACTAGCTAATCAGRCATCRCCGGCTC-TAMRA		(Hermansson and Lindgren, 2001)
	NSR1.113f	CCTGCTTTCAGTTGCTACCG	60	(Dionisi et al., 2002)
Nitrospira spp. 16S rDNA	NSK1.264r	GTTTGCAGCGCTTTGACCG		(Dionisi et al., 2002)
	NSR1.149Taq	6-FAM-AGCACTCTGAAAGGACTGCCAGG-TAMRA		(Harris et al., 2003)
	Nitro-1198f	ACCCCTAGCAAATCTCAAAAACCG	58	(Graham et al., 2007)
	Nitro-1423r	CITCACCCAGTCGGTGACC		(Graham et al., 2007)
	Nitro-1574Taq	6-FAM-AACCCGCAAGGAGCCAGCC-TAMRA		(Graham et al., 2007)
Archaeal 16S rDNA	ArchB49F	GYGCASCAGKCGMGAA W	56	(Takai and Horikoshi, 2000)
	ArchB06R	GGACTACVSGGGTATCTAAT		(Takai and Horikoshi, 2000)
	ArchB16F	6-FAM-TGYCAGCCCGGGGTAHAACCTYGC-TAMRA		(Takai and Horikoshi, 2000)

Real-Time PCR for quantification of bacterial 16S rDNA

The copy numbers of bacterial 16S rDNA was quantified using primers set 1055f, 1392r and TaqMan probe 16STaq1115 (Table 2). The real-time PCR mixture with a total volume of 25 μ L was prepared using FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche), the same master mix was used for the rest of q-PCR's, 15 pmol of each primer, 6.25 pmol of TaqMan probe 16STaq1115 and 10 μ L of template DNA diluted 1:10 in sterile water. The PCR thermal profile was 3 min at 50 $^{\circ}$ C, 10 min at 95 $^{\circ}$ C, 45 cycles at 95 $^{\circ}$ C for 30 s, 50 $^{\circ}$ C for 1 min, and 72 $^{\circ}$ C for 20s. Standard curves for the quantification of total bacterial 16S rDNA was performed using a serial dilution of known concentration of double stranded gBlock fragment as control standard (Table 3). The standard was adjusted to 372 to 3.72×10^8 copies per reaction.

Real-Time for quantification of AOB 16S rDNA

The AOB 16S rDNA was amplified using set of two forwards CTO 189fA/B and CTO 189fC, the reverse RT1r and probe TMP1 (Table 2). The real-time PCR mixture of 25 μ L was prepared using master mix with 7.5 pmol of 1:2 ratio of forwards CTO 189fA/B and CTO 189fC, 7.5 pmol of reverse RT1r, 3.125 pmol of probe TMP1 and 10 μ L of template DNA diluted 1:10 in sterile water. The real-time PCR program was 2 min at 50 $^{\circ}$ C, 10 min at 95 $^{\circ}$ C, 40 cycles at 95 $^{\circ}$ C for 30 s and combined annealing and extension at 60 $^{\circ}$ C for 1 min. Standard curves for the quantification of AOB 16S rDNA was performed using a serial dilution of DNA standard (Table 3). The dilutions was adjusted between 2.62×10^1 and 2.62×10^8 copies per reaction.

Real-Time for quantification of *Nitrospira* 16S rDNA

The real-time PCR for the quantification of *Nitrospira* spp. 16S rDNA was carried out using set of primers NSR1113f, NSR1264r and probe NSR1143Taq (Table 2). The real-time PCR mixture of 25 μ L was prepared using master mix with 15 pmol of primers NSR1113f and NSR1264r, 6.25 pmol of probe NSR1143Taq and 10 μ L of template DNA diluted 1:10 in sterile water. The real-time PCR program consisted of 2 min at 50 $^{\circ}$ C, 10 min at 95 $^{\circ}$ C, 55

cycles at 95 °C for 30 s and annealing and extension at 63 °C for 1 min. Standard curves for the quantification of *Nitrospira* spp. 16S rDNA were performed using the same serial dilutions concentration of standard of bacterial 16S rDNA.

Real-Time for quantification of *Nitrobacter* 16S rDNA

The number copies of *Nitrobacter* spp. 16S rDNA was achieved using primers set Nitro-1198f, Nitro-1423r and probe Nitro-1374Taq (Table 2). The real-time PCR reaction was performed in a total volume of 25 µl mixture containing: Master mix, 15 pmol of primers Nitro-1198f and Nitro-1423r, 6.25 pmol of dual-labeled probe Nitro-1374Taq and 10 µL of template DNA. Thermal profile for real-time PCR was 2 min at 50 °C, initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 20 s and annealing at 68 °C for 40 s. Standard curves were carried out using eight logarithmic dilution of DNA standard from 25.4 to 2.54 x 10⁸ copies per reaction.

Real-Time for quantification of Archaeal 16S rDNA gene

The real-time PCR for the quantification of Archaeal 16S rDNA gene was performed using universal PCR primers set Arch349F, Arch806R and universal fluorogenic probe Arch516F (Table 2). The real-time PCR mixture of 25 µL was prepared using master mix, 20 pmol of primers Arch349F and Arch806R, 6.25 pmol of probe Arch516F and 10 µL of direct template DNA. The real-time PCR program was adapted from Takai and Horikoshi (2000), consisted of 2 min at 50 °C, 10 min at 96 °C, 30 cycles at 96 °C for 25 s and annealing and extension at 56 °C for 6 min. Standard curves were achieved based on a serial dilution of DNA standard. The dilutions were performed in four orders of magnitude, from 2.41 x 10⁴ to 2.41 x 10⁸ copies per reaction.

Quantification of PAOs by FISH

The activated sludge samples were disaggregated by double mechanism, combining syringe treatment and sonication method (Abzazou et al., 2015b). The disaggregated samples were fixed in 4% paraformaldehyde (R I Amann, 1990), and processed by FISH technique according to Abzazou *et al.* (2015a). Briefly, the samples were fixed in a teflon printed

microscope slide and covered with FISH mixture solution. The hybridization reactions were performed in an equilibrated humidity chamber at 46°C for 90 min. The oligonucleotides probes applied in this work were PAO462, PAO651 and PAO846 (Table 4), all probes were labeled at 5' position with the fluorochrome Cy3 (Biomers). The FISH quantification was performed by direct counting of 10 random fields in each well using an epifluorescence microscope (Nikon Optiphot, Japan) equipped with a Nikon DM 580 filter, the following equation was used:

$$C = X \cdot A_c / A_{MF} \cdot D.F$$

C: PAOs cells L⁻¹

X: Average of PAOs cells counted in each observed microscopic field

A_c: Total area of each field of Teflon slide

A_{MF}: Area of microscopic field

D.F: Dilution factor

Table 4: Oligonucleotide probes and hybridization conditions applied in this study (Crocetti et al., 2000).

Probe	Sequence (5' to 3')	Specificity	Formamide (%)
PAO462	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	Most Accumilbacter	35%
PAO651	CCCTCTGCCAAACTCCAG	Most Accumilbacter	35%
PAO846	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	Most Accumilbacter	35%

Statistical analysis

The comparison between microbial abundance of different studied plants was performed using Statgraphic Centurion XVI (v.16.1.18). According to *Shapiro-Wilk test* of normality, the abundance of total bacterial cells, NOB (sum of *Nitrospira* spp. and *Nitrobacter* spp.) and PAOs were compared between the plants using ANOVA test, while the abundance of AOB, *Nitrospira* spp., *Nitrobacter* spp. and Archaeal 16S rDNA gen copies were compared using Kruskal wallis test. The statistical relationships between the abundance of total bacteria, AOB, NOB, PAOs and DNA recovery, DO, NO₃⁻ produced and PO₄-P uptake, respectively,

were checked using comparison test of alternative models. All tests of these hypotheses were performed at the $p \leq 0.05$ as significance level.

Results

Set-up and optimization of Real-Time PCR standard curves

The development of standard curves for the quantification of studied microorganisms through Real-Time PCR was performed using **double-stranded gBlocks gene fragments as template controls**. The results of the principal parameters of standards curves are shown in the table 5. The findings showed a successful achievement of all designed standard with optimal values of efficiency and regression coefficient (R^2). The results show also the different linear ranges detection of the standard curve according to its corresponding targets performed from a series of dilution of standards Gblocks fragments. Regarding the minimum detection limits, the standard curve of *Nitrospira* spp. 16S rDNA has showed a lower detection limit of 3.72 copies per reaction, while the curve of Archaeal 16S rDNA presented a higher detection limit of 2.41×10^3 copies per reaction. In the case of total bacteria, there was a possibility of improving the minimum detection limit to below 3.71×10^2 , at least one log, but in this case it was not necessary due to the fact that the total bacterial abundance in studied samples is not a limiting factor. Examples of qPCR standard curves of all studied microorganisms are listed as Annex material.

Table 5: Detection limit and parameters of standard curve of studied Real-Time PCR.

Specificity	Slope value	R^2	Efficiency %	Linear detection (copies.reaction ⁻¹)
Bacteria 16S rDNA	-3.20	0.99	105	$3.72 \times 10^2 - 3.72 \times 10^8$
AOB 16Sr DNA	-3.15	0.99	107	$2.62 \times 10^1 - 2.62 \times 10^8$
<i>Nitrospira</i> spp.16S rDNA	-3.16	0.99	106	$3.72 \times 10^0 - 3.72 \times 10^8$
<i>Nitrobacter</i> spp. 16S rDNA	-3.23	0.99	103	$2.54 \times 10^1 - 2.54 \times 10^8$
Archaeal 16S rDNA	-3.17	0.97	106	$2.41 \times 10^3 - 2.41 \times 10^9$

Application of Real-Time PCR assays to sludge samples

The extraction of genomic DNA from activated sludge samples was achieved using the commercial Power Soil DNA Isolation Kit. The average values of extracted DNA with corresponding ranges were 17.35 (*Min* 11.3 - *Max* 20.90), 19.28 (*Min* 11.25- *Max* 27.25) and 20.16 ng μL^{-1} (*Min* 9.90- *Max* 30.35) in WWTPs I, II and III, respectively. According these results the recovery of genomic DNA of the activated sludge samples was slightly different between the three WWTPs, with a remarkably high variation in samples collected from WWTP III.

The application of Real-Time PCR was carried out on diluted samples with the aim to minimize possible inhibition. In the case of Archaeal 16S rDNA gene, the samples were analyzed directly due to the high detection limit found for standard of Archaea. The results of all applied qPCRs are summarized in the table 6. As can see from the table, all microorganisms studied in this study were successfully detected and quantified in all WWTPs. Besides the average values of studied microorganism in six samples of each WWTP, the table shows also the percentage of each microorganism studied within total bacterial biomass. Assumed gene copy number/cell is 3.6 for bacterial 16S rDNA, 1 for both *Nitrospira* spp. 16S rDNA, *Nitrobacter* spp. 16S rDNA and AOB 16S rDNA. In the case of Archaeal 16S rDNA, the results are presented as copies of Archaeal 16S rDNA gene per liter without final conversion to cells number due to the unavailability information in the literature regarding the number of gene copies per cell. In all analysis, no signal detection was observed in the no template control. Regarding total bacterial cells a significant linear correlation was found between concentration of total DNA extracted from samples and the abundance of total bacteria (Fig 1).

Table 6: Average values with standard deviation of microorganisms studied in the three plants.

Target cells	Cells. L ⁻¹ *			% Respecting to total bacteria		
	WWTP I	WWTP II	WWTP III	WWTP I	WWTP II	WWTP III
Bacteria 16S rDNA	1.92 ± 0.3 x 10 ¹¹	2.01 ± 0.8 x 10 ¹¹	1.47 ± 0.6 x 10 ¹¹	100	100	100
AOB 16S rDNA	1.26 ± 1.6 x 10 ⁸	6.52 ± 2.7 x 10 ⁸	7.34 ± 2.8 x 10 ⁸	0.65 ± 0.8	0.33 ± 0.07	5.26 ± 1.5
Nitrospira 16S rDNA	8.61 ± 7.7 x 10 ⁴	2.20 ± 1.2 x 10 ⁶	3.24 ± 1.2 x 10 ⁶	>0.00 ± 0.0	1.29 ± 1.0	2.33 ± 0.9
Nitrobacter 16S rDNA	2.29 ± 1.2 x 10 ⁶	1.07 ± 0.4 x 10 ⁶	1.42 ± 0.8 x 10 ⁶	1.25 ± 0.8	0.57 ± 0.2	1.08 ± 0.7
Archaeal 16S rDNA	1.40 ± 1.1 x 10 ¹⁰	1.08 ± 0.5 x 10 ¹⁰	5.80 ± 2.6 x 10 ⁹	-	-	-

*: In the case of Archaeal 16S rDNA the values are presented in copies of gene per L instead cells L⁻¹.

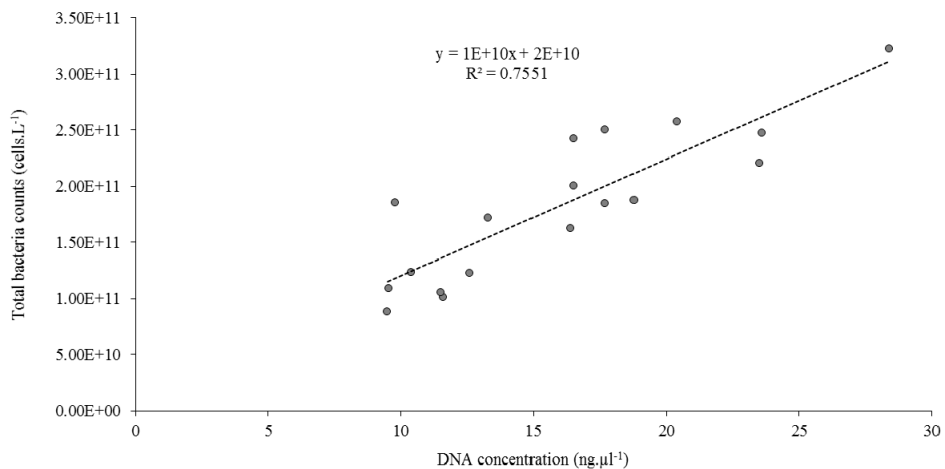


Figure 1: Linear relationship between DNA extraction concentration and total bacterial cells abundance.

In the conventional plant WWTP I, the total bacterial cells was about 1.92×10^{11} cells L⁻¹ as average value with a minor standard deviation of 0.3×10^{11} cells L⁻¹ showing a good stabilization in the plant over the study period of three months. In terms of numerical abundance, the NOB belonging to genera of *Nitrobacter* spp. were placed as the first subpopulation most abundant with 2.29×10^9 cells L⁻¹ (more than 1 % of total bacteria) followed by AOB, with averages value of 1.26×10^9 cells L⁻¹ (0.65 % of total bacteria). Respecting to NOB of *Nitrospira* spp., the results showed that they were less abundant and less stable compared with *Nitrobacter* spp.; the number of *Nitrospira* spp. per liter of activated sludge samples was close to the detection limit found by the standard curve. Finally, the qPCR of Archaea has showed the present of high values of copies of Archaeal 16S rDNA gene with an average value of 1.40×10^{10} copies L⁻¹.

In the WWTP designed for biological nitrogen removal, WWTP II, the total bacterial cells concentration had a value of 2.01×10^{11} cells L⁻¹ with a clear dominance of both genera of NOB in comparison with AOB. The number of *Nitrospira* spp. has been twice *Nitrobacter*

spp., with average values of 2.20×10^9 and 1.07×10^9 cells L^{-1} , respectively. Both NOB represented 1.29 % of total bacteria compared with 0.33 % occupied by AOB. The presence of Archaea was confirmed by a high value of number of Archaeal 16S rDNA gene with an average value of 1.08×10^{10} copies per liter of activated sludge samples.

In the WWTP III, designed for both biological nitrogen removal and enhanced biological phosphorus removal processes, the total bacterial cells abundance was about a value of 1.47×10^{11} cells L^{-1} . Respecting to nitrifying bacteria, the AOB were more abundant than NOB, with average value of 7.34×10^9 cells L^{-1} corresponding to more than 5 % of total bacteria. While in the NOB, *Nitrospira* spp. was the dominate group, with an average of 3.24×10^9 cells L^{-1} occupying 2.3 % of total bacteria compared with 1.42×10^9 cells of *Nitrobacter* spp. per liter of activated sludge samples which corresponds to a percentage of 1 % of total bacteria. In the case of Archaea, the number of copies of Archaeal 16S rDNA gene was a little minor in this plant with an average value of 5.80×10^9 copies of 16S rDNA per liter of activated sludge samples.

Detection and quantification of PAOs using FISH assay

The choice of FISH technique for PAOs in this work using fluorescent probes PAO462, PAO651 and PAO846 was necessarily attributed to the unviability of specific *fluorogenic probes for the quantification of PAOs by qPCR*. According to periodically analysis of activated sludge samples during all study period, PAOs were successfully detected and quantified in all studied WWTPs, the results are presented in the table 7. Quantification of PAOs in studied plants, shows that they were present in high abundance (1.70×10^9 cells L^{-1}) in the WWTP III, designed for both biological nitrogen removal and enhanced biological phosphorus removal processes, representing 1.26 % of total bacterial cells. While in the WWTPs I and II, the abundance of PAOs was relatively similar with averages values of $6.46 \pm 5.29 \times 10^8$ and $8.62 \pm 3.91 \times 10^8$ cells L^{-1} , respectively.

Table 7: Average values of PAOs using FISH technique.

	WWTP I	WWTP II	WWTP III
PAOs (cells.L ⁻¹)	6.46 ± 5.29 x 10 ⁸	8.62 ± 3.91 x 10 ⁸	1.70 ± 0.46x 10 ⁹
% biomass*	0.36	0.47	1.26

*Provide the percentage of PAOs respecting total bacterial cells quantified by qPCR.

Nutrient-removing microbial communities in WWTPs

Comparison of microbial structure of the three different WWTPs working with different processes was done. The figures 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8, show graphically a comparative depiction of microbial abundance between total bacterial cells, AOB, NOB, *Nitrospira* spp., *Nitrobacter* spp., PAOs and Archaea, respectively. The statistical analysis of obtained data showed no significant difference between total bacterial cells in three studied plants ($p \geq 0.05$, $n = 18$), same results were found for *Nitrobacter* spp. ($p \geq 0.05$, $n = 18$), and Archaeal 16S rDNA gene ($p \geq 0.05$, $n = 18$). In the case of AOB, and according to figure 3, it can be observed a clear difference (more than one logarithm) between the abundance of AOB counted in WWTP III and both WWTPs I and II. This difference was statistically significant ($p \leq 0.05$, $n = 18$). On the other hand, the abundance of NOB showed a different profile between three WWTPs, this observation was necessarily attributed to NOB belonging to *Nitrospira* spp. as a dominate NOB group. Which showed a statistically significant difference between the studied plants ($p \leq 0.05$, $n = 18$), explained by low concentration of *Nitrospira* spp. found in conventional plant WWTP I. Regarding to *Nitrobacter* spp., there was no significant difference between plants despite the double concentration registered in WWTP I compared with the rest of plants.

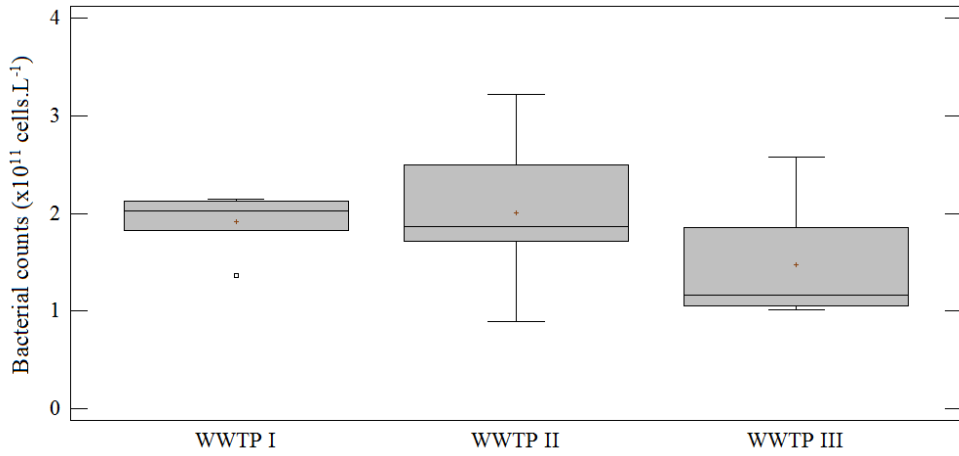


Figure 2: Box and whiskers plots of total bacterial cells quantified by qPCR.

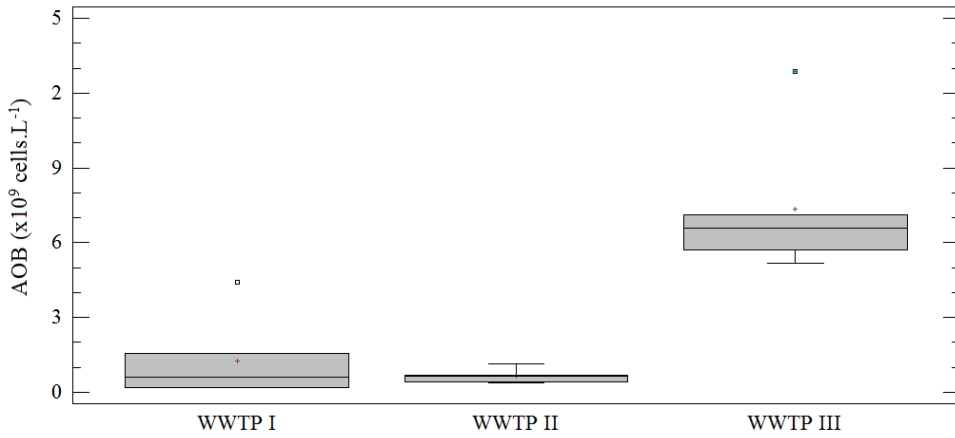


Figure 3: Box and whiskers plots of AOB quantified by qPCR.

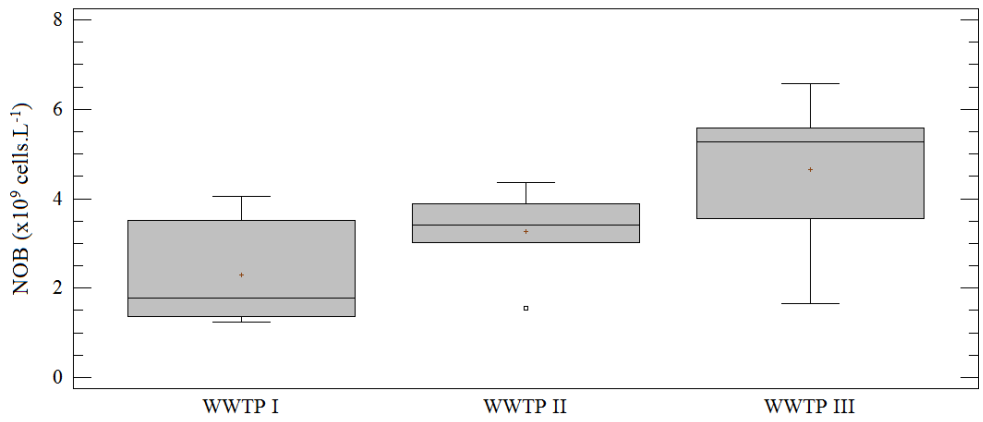


Figure 4: Box and whiskers plots of NOB (sum of *Nitrospira* and *Nitrobacter*) quantified by qPCR.

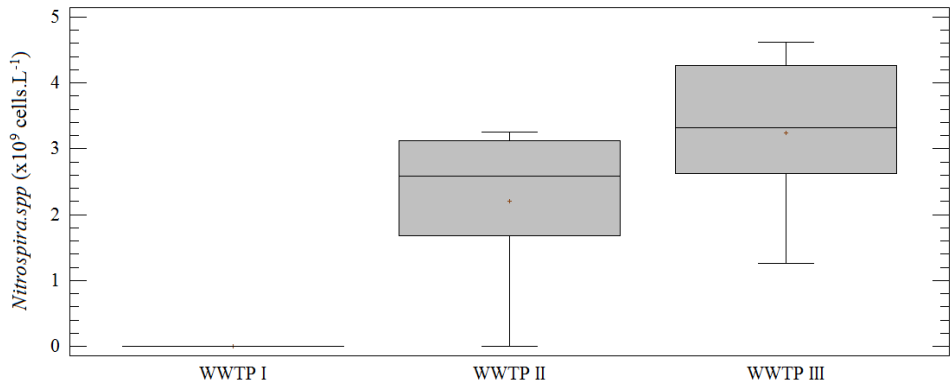


Figure 5: Box and whiskers plots of *Nitrospira* spp quantified by qPCR.

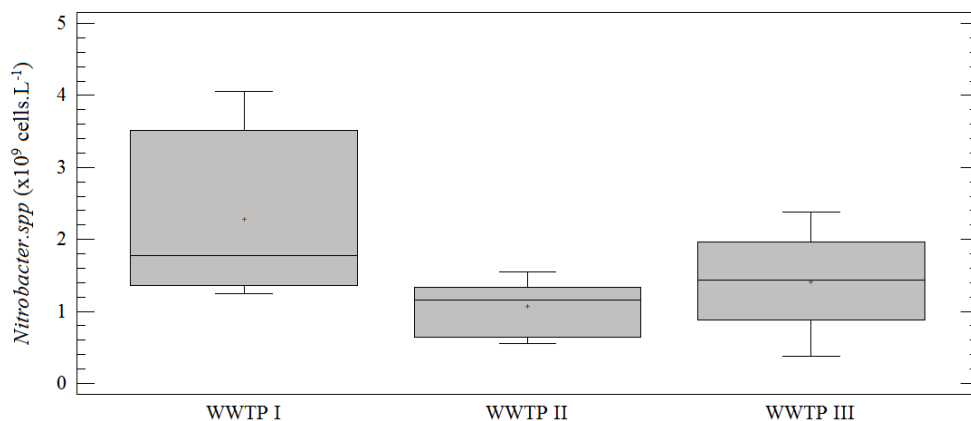


Figure 6: Box and whiskers plots of *Nitrobacter* spp. quantified by qPCR.

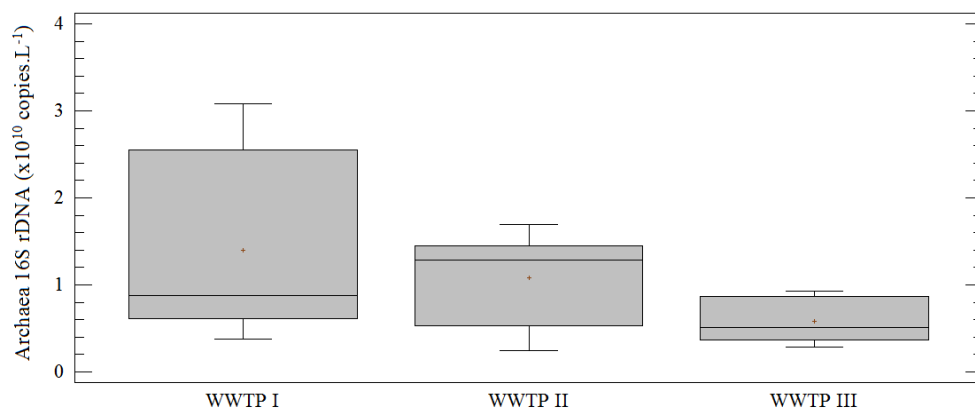


Figure 7: Box and whiskers plots of Archaeal 16S rDNA gene quantified by qPCR.

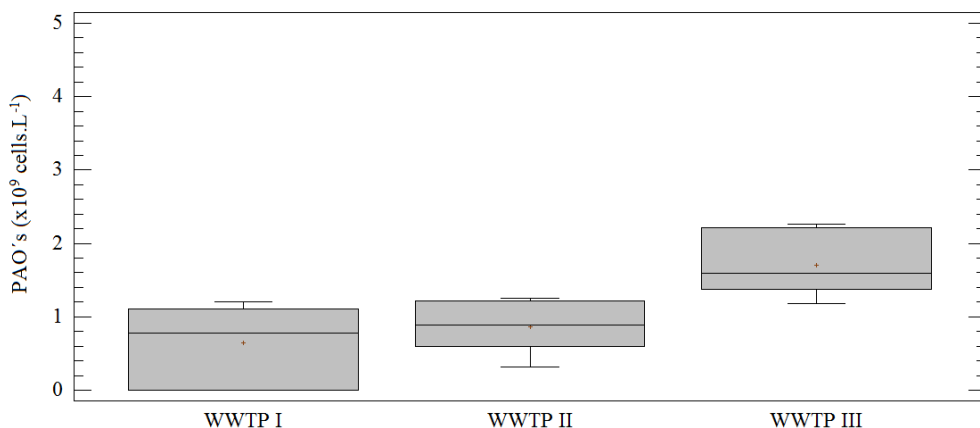


Figure 8: Box and whiskers plots of PAOs quantified by FISH technique.

The comparison of PAOs based on FISH results, was showed a statistically significant difference between their abundance in each plant ($p \leq 0.05$, $n = 18$). This difference was mainly due to the high concentration of PAOs counted in WWTP III designed for nitrogen removal and enhanced biological phosphorus removal processes. Finally and respecting to Archaea the quantification of Archaeal 16S rDNA gene showed a no significant difference between plants ($p \geq 0.05$, $n = 18$).

In spite of the limited number of samples analyzed per plant, possible significant correlations between microbial composition data and operational performance of studied plants were studied. Only significant correlations were presented in this work. On other hand, and due to the insignificant difference between the microbial abundance of the same month ($p \geq 0.05$, $n = 27$), the obtained data were analyzed monthly based on average values of each month.

The figure 9 shows the relationship between AOB quantified in studied WWTPs and dissolved oxygen (DO). The statistical analysis, comparing alternative models, showed a significant linear correlation between both parameters with a high correlation ($R= 0.91$, $p \leq 0.05$, $n = 9$). On the other hand, NOB were significantly correlated with NO_3^- produced in the plants ($R= 0.85$, $p \leq 0.05$, $n = 9$) (Fig.10). Taking into account the insignificant concentration

of NO_3^- influent registered in all studied WWTPs, the produced NO_3^- was an evidence of activity of NOB. Nevertheless, possible complete denitrification may have occurred in the plants, which can results in an underestimation of real NO_3^- released in the plants by NOB.

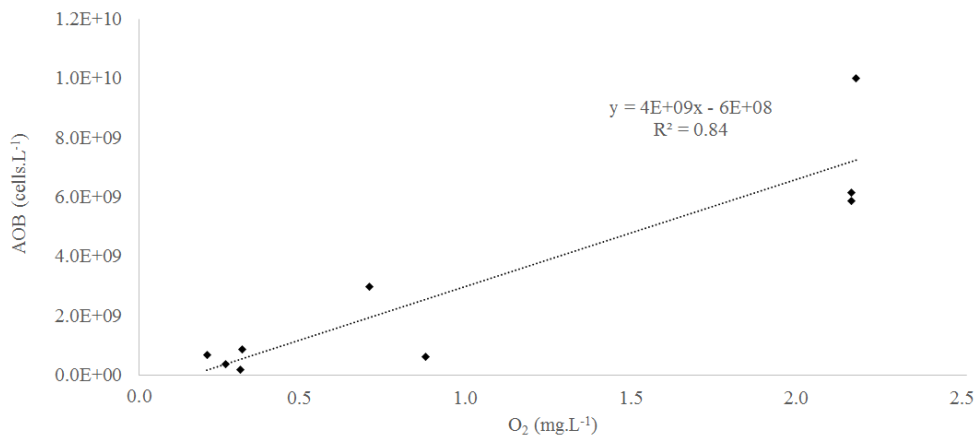


Figure 9: Lineal relationship between quantified AOB and dissolved oxygen in the WWTPs.

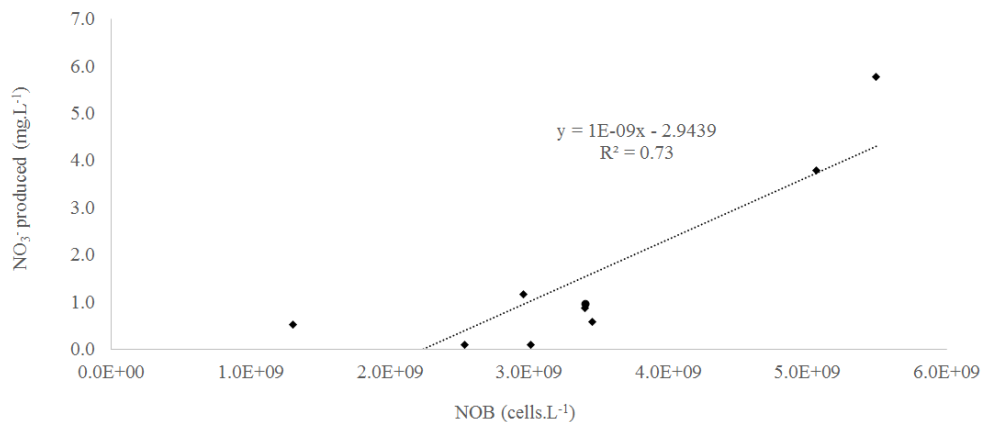


Figure 10: Lineal relationship between NO_3^- produced in the plants and quantified NOB.

The quantitative results of PAOs achieved using FISH technique, were studied statistically as a function of $\text{PO}_4\text{-P}$ removal load, the results are shown in figure 11. The findings showed a high significant correlation between both parameters, following a linear relationship ($R=$

0.79, $p \leq 0.05$, $n = 9$). As expected, the higher phosphorus removal activity was observed in WWTP III designed for this purpose. The PAOs activity per cell x hour was calculated based on the quantified PAOs and the amount of $\text{PO}_4\text{-P}$ uptake from the plants. The results showed a high activity of 2.54×10^{-10} mg of $\text{PO}_4\text{-P}$ removed per cell and hour.

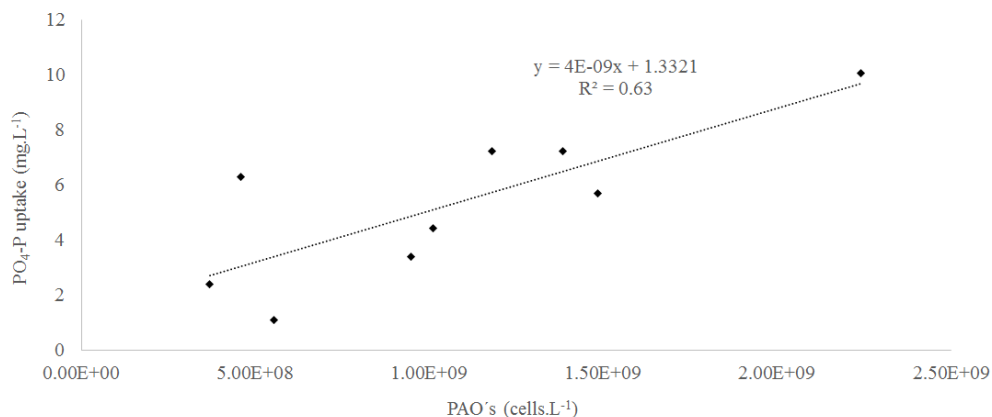


Figure 11: Lineal relationship between $\text{PO}_4\text{-P}$ removal from WWTPs and PAOs quantified using FISH technique.

Discussion

A new approach of Real-Time PCR using **Double-stranded gBlocks Gene Fragments** as standard was performed jointly with FISH technique for characterization and tracking of microbial composition of three WWTPs working with different nutrient removal processes. During three months, samples of activated sludge samples were collected fortnightly from three WWTPs and analyzed using Real-Time PCR and FISH technique.

The development of standard curves based on the synthesized double DNA technique was successfully performed for total bacterial cells, AOB, NOB including *Nitrospira* spp and *Nitrobacter*. spp, and Archaeal 16S rDNA gene. In addition to the advantages of being fast, easy and reliable, the technique of gBlocks fragment DNA, allows also the possibility to

carry more than one DNA target in the same **gBlocks Gene Fragment**, which represent a significant cost savings for designing DNA standards.

For total bacteria, the log-linear detection range was six orders of magnitude from 3.72×10^2 to 3.72×10^8 copies of 16S rDNA per reaction. As mentioned in the second point of results section, the minimum detection limit of total bacteria was possible to improve for one less order of magnitude reaching a limit detection of 37 copies per reaction; this data was based on additional tests performed in this work (no details shown). However, in this work, the abundance of total bacterial cells was not a limiting factor in spite of making previous dilution of samples. The comparison of these results with the few previous published works (Harms et al., 2003), suppose an improvement of detection limits of total bacterial cells in WWTPs. The importance of getting a broad detection limit will be most relevance in case of working with very diluted activated sludge samples, when such dilution supposes a decrease of number of bacteria cells in analyzed sample. Also in case of samples collected from other sampling point such as effluent samples of WWTPs, which usually present a reduced number of bacterial cells.

For AOB 16S rDNA, the standard curve showed a log-linear range of seven orders of magnitude from 2.62×10^1 to 2.62×10^8 copies per PCR. Additionally to present a broad detection range, the standard performed by gBlocks technique has made possible the detection and quantification of less copies per PCR compared than reported by previous studies (Harms et al., 2003). In the case of *Nitrospira* spp, the detection limit of *Nitrospira* spp 16S rDNA was ranged from 3.72 to 3.72×10^8 copies per reaction. Compared with all the rest of standards DNA designed in this work, the standard of *Nitrospira* spp has the most broad range across eight orders of magnitude with the lower minimum limit detection. Due to limited number of publications regarding the use of Real-PCR with fluorogenic probes for study of nitrifying bacteria in WWTPs, all obtained data were compared with the work published by Harms et al in 2003. For *Nitrobacter* spp, the standard curve showed a linear detection range of seven orders of magnitude form 2.54×10^1 to 2.54×10^8 copies per reaction. Compared with major part of published works, which have used for long time the SYBR Green molecule as a fluorescent marker instead fluorogenic specific probes (Zeng et al., 2014), the findings of present work represent a detailed information regarding the

detection limits of *Nitrobacter* spp in WWTPs using qPCR technique with specific DNA probe.

For total Archaeal communities, and in spite of the ecological importance that can play in WWTPs systems, there are very few published data regarding to the methods of its quantification using qPCR technique (Bai et al., 2012), especially qPCRs based on fluorogenic probes. In this work, DNA standard was successfully achieved for accuracy quantification of total Archaeal 16S rDNA gene. The results showed a linear detection range of six orders of magnitude from 2.41×10^3 to 2.4×10^9 copies of Archaeal 16S rDNA per reaction. With obtained data from all microorganism studied in the present work, tend to offer a new alternative to traditional use of plasmids as a DNA standard for Real-Time PCR. One of the most important advantages of the technique gBlocks besides being a fast, and simple compared with traditional use of plasmids as standards, is the fact that, it can allow also the design of a single gBlocks fragment that can carry more than one DNA target as standard, which suppose an importance save in both time-consuming and manufacturing cost.

Real-Time PCR using **double-stranded gBlocks Gene fragments** as standard DNA was successfully applied for all studied microorganism present in activated sludge samples. The application of Real-Time PCR on environmental samples such as activated sludge samples can be limited or totally inhibited by the presence of different inhibitors. For this reason in the present work, it was worked with a dilution 1:10 of DNA extraction, except for Archaeal 16S rDNA, when the reactions were performed directly from DNA extraction. The test of possible Real-Time PCR inhibition was only carried out for total bacterial cells. The preliminary results (no details shown) showed a total inhibition of Real-Time PCR of total bacterial cells in those samples where the DNA extracted concentrations extended $25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Considering that the bacterial cells account for between 90 and 95 % of total biomass in activated sludge (Wagner et al., 1993) and based on the significant linear correlation $R = 0.87$ ($p \leq 0.05$, $n = 18$) between DNA concentration recovered from activated sludge samples and total bacterial cells counted (Fig.1), the total bacteria abundance it can estimate directly through DNA concentration extracted. Nevertheless, this estimation can be valid only

considering the type of samples studied in this work and the conditions work performed in this study as well as the ranges of both DNA concentration and bacterial abundance found.

The characterization and quantification of different microorganism using Real-Time PCR with gBlocks DNA fragments as standards was successfully achieved in three full WWTPs operated with at different processes. All the results has shown a different microbial composition profile, especially for nitrifying bacteria. Regarding the total bacterial cells, the results has shown a similar bacterial cells abundance in all WWTPs, around $1 - 2 \times 10^{11}$ cells L^{-1} , about a half of abundance reported by other works (Dionisi et al., 2002; Harms et al., 2003). The similarity observed in the abundance of total bacterial was reflected in BOD₅ removal efficiency (>95 % of BOD₅ removal) which was also similar between the three WWTPs, taking into account that the majority of these bacteria are heterotrophic microorganisms.

The quantitative comparison of AOB between the three studied WWTPs, revealed similar abundance between WWTP I and II but not the same can be said for the WWTP III. The AOB abundance was six times higher in WWTP III than WWTP I and more than one logarithm compared with those found in WWTP II. However, this difference in AOB abundance was not directly linked with the observed ammonia removal rate, especially in the case of conventional plant (WWTP I), where the ammonia removal rate has not exceed 30 % taking into account the high AOB abundance quantified in the plant. This observation can be attributed to the intervention of other factors such as HRT, which was relatively low in the case of WWTP I, or factors such as possible limited probe specificity (Harms et al., 2003). On the other hand, DO was strongly correlated with the abundance of AOB showing the importance role of DO as a key parameter in the achievement of a high and stable AOB population in biological reactors. Regarding NOB, *Nitrospira* spp was the most predominant NOB members in studied plants, especially in the WWTP II and III, both designed for nitrogen removal. This finding was in agreement with previous study, which highlight the predominance of *Nitrospira* spp versus *Nitrobacter* spp (Huang et al., 2010). In the case of conventional plant (WWTP I), *Nitrobacter* spp was the predominant NOB. The statistical analysis has shown that the activity of NOB registered in all WWTPs was more contributed to *Nitrospira* spp than *Nitrobacter* spp as reported by several published studies (Daims et al.,

2001; Huang et al., 2010; Schramm et al., 1999). The low oxidation rate of ammonium registered in WWTP I can also explain the very low *Nitrospira* spp abundance quantified taking into account the significant positive correlation between NOB and NO₃⁻ produced in bioreactors, which was more likely linked with *Nitrospira* spp. than *Nitrobacter* spp. Generally, the characterization of total nitrifying bacteria was marked by a clear dominance of NOB in both WWTP I and II with percentages of 70 and 82 % respectively. While in the WWTP III the dominant nitrifying bacteria were AOB with 61 %, respecting to total nitrifying bacteria.

Respecting to the Archaeal cells, the present work was limited only to its detection as one of most microorganisms member that can play a key role in nutrient removal processes, e.g. ammonia oxidation process. The 16S rDNA gene from Archaea was successfully amplified from all activated sludge samples of studied WWTPs showing their presence in high number of copies per liter. Due to limited information regarding the number of copies of 16S rDNA gene per Archaeal cell, the results were presented without final transformation to number of Archaeal cells per liter. However, in the case of estimating that the Archaeal cells carry no more than one copy of 16S rDNA, the findings of the present study will show the high abundance that can have Archaeal cells in WWTPs, which can be even higher than nitrifying bacteria. As consequence, the detection of high number of copies of Archaeal 16S rDNA gene, suppose the possibility presence of also specific Archaeal members, especially those involved in nutrient removal process as well as AOA, which can contribute simultaneously with AOB in nitrification (Bai et al., 2012).

Due to the unavailability of specific fluorogenic probe for quantification of PAOs using Real-Time PCR, these last were successfully detected and quantified using FISH technique. The specificity of applied probes PAO462, PAO651 and PAO846, was tested and confirmed previously using GenBank database. The findings of quantitative FISH showed as was expected a significance abundance of PAOs in WWTP III, which was designed for enhanced biological phosphorus removal. The high PAOs abundance registered in WWTP III was clearly reflected in a high removal rate of PO₄-P around 72 % compared with 44.5 and 59 % registered in WWTP I and WWTP II, respectively. According to PO₄-P uptake calculated in this work taking into account all studied WWTP (2.54×10^{-10} mg of PO₄-P x cell⁻¹ x hour⁻¹),

the quantified PAOs have shown a high metabolism activity compared with other published works (Bao et al., 2007).

In summary, q PCR technique was successfully achieved using gBlocks gene Fragments technique as a new alternative to the traditional DNA plasmids technique. All q PCRs implemented in this study were significantly improved in terms of detection limits of studied microorganisms. Microbial composition of three WWTPs operating differently was successfully characterized using q PCR and FISH techniques. The obtained microbial profile of all studied plants has showed to be different between WWTPs, especially for microorganisms responsible of biological nutrient removal process. Major part of quantified microorganism were directly linked with the observed performance operation of WWTPs investigated.

Acknowledgements

The authors thank the Aigües de la Costa Brava (EMACBSA) Company for their contribution by providing samples and physicochemical data, and especially thanks for Mrs. Eva Ciriero and Anna María. The authors also thanks to Mr. Alberto Becerril Rodriguez for her contribution in laboratory analysis.

References

- Abzazou, T., Araujo, R.M., Auset, M., Salvadó, H., 2015a. Tracking and quantification of nitrifying bacteria in biofilm and mixed liquor of a partial nitrification MBBR pilot plant using fluorescence in situ hybridization. *Sci. Total Environ.* 541, 1115–1123. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.10.007
- Abzazou, T., Salvadó, H., Bruguera-Casamada, C., Simón, P., Lardín, C., Araujo, R.M., 2015b. Assessment of total bacterial cells in extended aeration activated sludge plants using flow cytometry as a microbial monitoring tool. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* doi:10.1007/s11356-015-4372-3
- Bai, Y., Sun, Q., Wen, D., Tang, X., 2012. Abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in industrial and domestic wastewater treatment systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80, 323–330. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01296.x
- Bao, L., Li, D., Li, X., Huang, R., Zhang, J., Yang, L. V, Xia, G., 2007. Phosphorus accumulation by bacteria isolated from a continuous-flow two-sludge system. *J. Environ. Sci. (China)* 19, 391–5.
- Cosenza, A., Bella, G. Di, Mannina, G., Torregrossa, M., Viviani, G., 2013. Biological nutrient removal and fouling phenomena in a university of Cape Town membrane bioreactor treating high nitrogen loads 139, 773–780. doi:10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000667
- Crocetti, G.R., Hugenholtz, P., Bond, P.L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D., Blackall, L.L., 2000. Identification of Polyphosphate-Accumulating Organisms and Design of 16S rRNA-Directed Probes for Their Detection and Quantitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1175–1182. doi:10.1128/AEM.66.3.1175-1182.2000
- Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.H., Wagner, M., 2001. In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5273–84. doi:10.1128/AEM.67.11.5273-5284.2001
- Dionisi, H.M., Layton, A.C., Harms, G., Gregory, I.R., Robinson, K.G., Sayler, G.S., 2002. Quantification of Nitrosomonas oligotropha-Like Ammonia-Oxidizing Bacteria and Nitrospira spp. from Full-Scale Wastewater Treatment Plants by Competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 245–253. doi:10.1128/AEM.68.1.245-253.2002
- Gao, J.-F., Luo, X., Wu, G.-X., Li, T., Peng, Y.-Z., 2013. Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants. *Bioresour. Technol.* 138, 285–96. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.176

- Gilbride, K.A., Lee, D.-Y., Beaudette, L.A., 2006. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *J. Microbiol. Methods* 66, 1–20. doi:10.1016/j.mimet.2006.02.016
- Hall, S.J., Hugenholtz, P., Siyambalapitiya, N., Keller, J., Blackall, L.L., 2002. The development and use of real-time PCR for the quantification of nitrifiers in activated sludge, in: *Water Science and Technology*. pp. 267–272.
- Harms, G., Layton, A.C., Dionisi, H.M., Gregory, I.R., Garrett, V.M., Hawkins, S.A., Robinson, K.G., Saylor, G.S., 2003. Real-Time PCR Quantification of Nitrifying Bacteria in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Environ. Sci. Technol.* 37, 343–351. doi:10.1021/es0257164
- Huang, Z., Gedalanga, P.B., Asvapathanagul, P., Olson, B.H., 2010. Influence of physicochemical and operational parameters on *Nitrobacter* and *Nitrospira* communities in an aerobic activated sludge bioreactor. *Water Res.* 44, 4351–8. doi:10.1016/j.watres.2010.05.037
- Kim, J., Lim, J., Lee, C., 2013. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnol. Adv.* 31, 1358–73. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.05.010
- Kindaichi, T., Kawano, Y., Ito, T., Satoh, H., Okabe, S., 2006. Population dynamics and in situ kinetics of nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by real-time quantitative PCR. *Biotechnol. Bioeng.* 94, 1111–21. doi:10.1002/bit.20926
- Kroeze, C., Hofstra, N., Ivens, W., Löhr, A., Stokal, M., van Wijnen, J., 2013. The links between global carbon, water and nutrient cycles in an urbanizing world — the case of coastal eutrophication. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 5, 566–572. doi:10.1016/j.cosust.2013.11.004
- Lee, I.-S., Parameswaran, P., Rittmann, B.E., 2011. Effects of solids retention time on methanogenesis in anaerobic digestion of thickened mixed sludge. *Bioresour. Technol.* 102, 10266–72. doi:10.1016/j.biortech.2011.08.079
- Limpiyakorn, T., Shinohara, Y., Kurisu, F., Yagi, O., 2005. Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 205–17. doi:10.1016/j.femsec.2005.03.017
- Lu, Q., Wu, H., Li, H., Yang, D., 2015. Enhanced biological nutrient removal in modified carbon source division anaerobic anoxic oxic process with return activated sludge pre-concentration 23, 1027–1034. doi:10.1016/j.cjche.2014.11.013

- Metcalf and Eddy, 2003. Wastewater engineering: Treatment, disposal and reuse, 4th ed. McGraw-Hill, Boston, USA.
- Nielsen, P.H., Saunders, A.M., Hansen, A.A., Larsen, P., Nielsen, J.L., 2012. Microbial communities involved in enhanced biological phosphorus removal from wastewater--a model system in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 452–9. doi:10.1016/j.copbio.2011.11.027
- R I Amann, L.K.D.A.S., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.*
- Schramm, A., de Beer, D., van den Heuvel, J.C., Ottengraf, S., Amann, R., 1999. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3690–6.
- Semerci, N., Hasilci, N.B., 2016. Fate of carbon, nitrogen and phosphorus removal in a post-anoxic system treating low strength wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 108, 166–174. doi:10.1016/j.ibiod.2015.12.008
- Takai, K., Horikoshi, K., 2000. Rapid Detection and Quantification of Members of the Archaeal Community by Quantitative PCR Using Fluorogenic Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5066–5072. doi:10.1128/AEM.66.11.5066-5072.2000
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., Schleifer, K.H., 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: Inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1520–1525.
- Whelan, J.A., Russell, N.B., Whelan, M.A., 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J. Immunol. Methods* 278, 261–9.
- Zeng, W., Bai, X., Zhang, L., Wang, A., Peng, Y., 2014. Population dynamics of nitrifying bacteria for nitritation achieved in Johannesburg (JHB) process treating municipal wastewater. *Bioresour. Technol.* 162, 30–7. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.102

4. Discusión general

4. Discusión general

El suministro del agua potable y la disponibilidad de un sistema sanitario adecuado forman parte de la base del bien estar del ser humano. Sea donde sea que habite el ser humano, el agua potable es constantemente requerida y eso supone la generación de las aguas residuales como consecuencia. El suministro de agua potable y la gestión de las aguas residuales siempre han sido cruciales para el avance de la civilización humana. Desde los antiguos acueductos romanos hasta los proyectos de presas gigantes modernas proporcionan ejemplos impresionantes del éxito de la humanidad para garantizar el suministro necesario de este bien escaso (Daims et al., 2006).

Normalmente, la gestión de las aguas residuales incluye su tratamiento, habitualmente mediante procesos biológicos. La explotación exitosa de estos procesos se ha logrado desde hace casi un siglo en las plantas de tratamiento biológico de aguas residuales. En los tratamientos biológicos de las aguas residuales, los microorganismos son los principales protagonistas debido a su gran capacidad de biodegradación y eliminación de una inmensa variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos tales como el nitrógeno y el fósforo. Hoy en día, las instalaciones de tratamiento de aguas residuales son consideradas como algunas de las aplicaciones tecnológicas más importantes debido a su determinante papel en la eliminación de la contaminación en las aguas residuales, la prevención de la degradación de los ecosistemas naturales y la reducción de las enfermedades transmitidas por aguas residuales.

Basándose en la crucial importancia de los microorganismos involucrados en los procesos biológicos de depuración de aguas residuales y el rendimiento operativo de las plantas depuradoras, los vínculos inherentes entre ambas partes se han puesto en énfasis (Rittmann, 2006). Generalmente, la gestión de las EDARs se controla de modo rutinario con un extenso conjunto de parámetros físico-químicos, como el contenido de oxígeno disuelto, pH, temperatura y concentración de nutrientes. Parámetros que suelen usarse como herramienta de medición del estado operacional y de rendimiento de las EDARs. Durante muchos años, los procesos de depuración de aguas residuales se han estudiado mayoritariamente en base a

los parámetros físico-químicos y operacionales, siendo menos el esfuerzo dedicado al estudio de la composición biótica de estos procesos. Hoy en día, la microbiología de las aguas residuales está despertando un enorme interés científico y por ello se está realizando un gran esfuerzo cualitativo y cuantitativo a nivel mundial. Sin embargo, para una descripción objetiva de los sistemas de tratamiento de aguas residuales y de su propio funcionamiento, tanto los parámetros fisicoquímicos como microbiológicos se han de estudiar de forma conjunta teniendo en cuenta el concepto espacio temporal. Eso ayudaría, sin duda, a entender mucho mejor el funcionamiento de los procesos biológicos permitiendo así la toma de decisiones claves en la gestión de los mismos.

Durante mucho tiempo, la complejidad física de la matriz de las aguas en los sistemas de tratamiento de aguas residuales ha dificultado el estudio con fiabilidad de su composición microbiológica. Sin embargo, recientemente gracias al desarrollo de las técnicas moleculares independientes de los métodos tradicionales de cultivo, el estudio de las comunidades microbianas complejas, incluyendo las que se encuentran en las aguas residuales, ha progresado de manera significativa. Antes de la llegada de tales técnicas, muchos microorganismos claves en el funcionamiento de las EDARs eran desconocidos, incluso ha habido casos donde algunos microorganismos han sido considerados claves para el funcionamiento de las EDARs, cuando en realidad no lo eran según estudios recientes.

La presente memoria está elaborada sobre dos enfoques; el primer enfoque consiste en el desarrollo y la puesta a punto de técnicas moleculares independientes de cultivo para el estudio microbiológico de las comunidades bacterianas y el segundo enfoque es la aplicación de dichas técnicas en el estudio tanto cualitativo como cuantitativo de las comunidades microbianas presentes en las plantas depuradoras de aguas residuales, especialmente las comunidades responsables de eliminación de nutrientes.

Los dos enfoques descritos previamente se llevaron a cabo en la presente memoria en tres capítulos; en el **Capítulo I** se evaluó en función del tiempo, la abundancia y la viabilidad de las células procariotas totales en dos plantas depuradoras de fangos activos con aireación prolongada, para ello se puso a punto la cuantificación y la caracterización de los procariotas mediante la técnica de citometría de flujo combinada con un tratamiento previo de

desagregación de los flocúlos presentes en los fangos. En el **Capítulo II**, se realizó el seguimiento y la cuantificación de las bacterias nitrificantes en el biofilm y el licor mezcla de una planta piloto MBBR diseñada para la nitrificación parcial de un efluente altamente cargado en amonio procedente de un digestor anaeróbico. Para ello se puso a punto y se aplicó la técnica de hibridación fluorescente *in situ*. Finalmente en el **Capítulo III**, se estudió y se aplicó un nuevo enfoque de diseño de estándares para la técnica de PCR cuantitativa con el fin de caracterizar y cuantificar las poblaciones microbianas responsable de eliminación de nutrientes en tres EDARs a escala real que funcionan con diferentes procesos biológicos.

En el **Capítulo I**, se estudió durante seis meses la abundancia y el estado de viabilidad de los procariotas totales (incluyendo bacterias y arqueas), en dos plantas depuradoras que operan con proceso de fangos activos con aireación prolongada (“EAAS” por sus acrónimos en inglés).

Una de las razones por la que se ha estudiado el sistema de EAAS en este trabajo, es la gran aplicabilidad que representa dentro del proceso de los fangos activos y sus diferentes variantes (Metcalf and Eddy, 1991). El sistema de depuración de aguas residuales mediante el proceso de EAAS, es una de las variantes más extendidas del proceso de fangos activos que proporciona un tratamiento biológico sofisticado para la eliminación de la materia orgánica biodegradable en condiciones aerobias. El aire puede ser suministrado por aireación mecánica o mediante difusores lo que proporciona el oxígeno necesario para sostener el proceso biológico aeróbico. En general, las plantas depuradoras con proceso de EAAS son aplicadas en zonas con bajo número de habitantes, zonas rurales y aéreas de pequeños flujos de agua residual, sobre todo en los pequeños municipios como el caso estudiado.

A pesar de la amplia aplicación de estos sistemas, pocos trabajos se han llevado a cabo para su exploración tanto a nivel microbiológico como operacional. Tyagi *et al.* (2008) estudiaron y compararon las comunidades microbianas de una planta convencional de fangos activos y otra con proceso de EAAS. En cuando a lo relacionado con el funcionamiento operacional del sistema de EAAS, Mohammadi *et al.* (2012) publicaron un estudio comparativo entre este sistema y los bioreactores de membrana.

Las plantas estudiadas en este capítulo fueron las plantas depuradoras municipales de Archena y Las Torres de Cotillas localizadas en Murcia (España). Las dos plantas operan con el proceso de EAAS con algunas diferencias a nivel de parámetros operacionales como el tiempo de retención hidráulico, la edad de fango y la carga másica. Durante seis meses y de forma mensual, muestras de licor mezcla fueron recogidas del reactor biológico de ambas plantas y transportadas en condiciones de oscuridad a 4°C al laboratorio donde fueron procesadas posteriormente. Los principales objetivos de este capítulo fueron la cuantificación de los procariotas totales y la evaluación de su estado de viabilidad en base a la integridad de su membrana celular, cuyos objetivos se realizaron mediante la combinación de la técnica de citometría de flujo y la doble tinción de los ácidos nucleicos mediante los fluorocromos SYTO13 y IP.

El uso de la técnica de citometría de flujo ha ganado mucho protagonismo dentro de la biotecnología avanzada aplicada en diferentes áreas de investigación. Su aplicación tanto a nivel de clínico como ambiental, la han convertido en un instrumento de gran valor científico (Pedreira et al., 2013; Veal et al., 2000; Wang et al., 2010). Adicionalmente al uso de la citometría como técnica de cuantificación y caracterización de los procariotas totales en los sistemas de bioingeniería, su aplicación también puede ser mucho más amplia e interesante a niveles taxonómicos específicos tanto de interés sanitario como ambiental siempre y cuando es combinada con técnicas de marcaje específico como por ejemplo la técnica de FISH. En las últimas décadas, la aplicación de la técnica de citometría en diferentes medios acuáticos como herramienta de cuantificación bacteriana ha sido ampliamente estudiada por diferentes autores. En 2001 por ejemplo, Gégori *et al.*, estudiaron la viabilidad de las bacterias totales en aguas de mar y en aguas dulces aplicando la técnica de citometría en combinación con la doble tinción de los ácidos nucleicos mediante SYBR Green y IP. Años más adelante, Xia *et al.* (2010) realizaron el seguimiento de las bacterias nitrificantes en un reactor biológico con biofilm mediante la técnica de citometría combinada con FISH. Aun así, son pocos los trabajos que se han publicado respecto a la aplicación de citometría en los sistemas de tratamiento de aguas con procesos de fangos activos (Foladori et al., 2010a, 2010b; Ziglio et al., 2002). En todos estos trabajos los autores se centraron en el estudio cuantitativo de las bacterias totales y su estado de viabilidad. Una de las razones que puede explicar el número

reducido de los trabajos realizados sobre estos sistemas, es la complejidad bioestructural de los flóculos que forman parte de los fangos activos, lo que dificulta su posterior análisis mediante la citometría.

La técnica de citometría permite el análisis simultáneo tanto cualitativo como cuantitativo de miles de células por minuto de forma individual presentadas como eventos por minuto, sin embargo a veces existe la probabilidad de confundir entre células individuales y pequeños agregados que pueden contener varias células de tamaño pequeño. Por ello, el análisis fiable mediante citometría requiere la disponibilidad de células individuales en suspensión. En las plantas estudiadas en este trabajo, las muestras de licor mezcla de los fangos activos presentaron una alta concentración de flóculos en forma de agregados, tal y como era de esperar, lo que dificultó el análisis preciso de las células procariotas colonizadoras de los flóculos. Por ello, un tratamiento previo de desagregación de flóculos fue necesario.

Durante los últimos años, varias técnicas de desagregación han sido estudiadas, como la desagregación mediante agitación manual, homogenización, sonicación o incluso mediante la adición de surfactantes (Falcioni et al., 2006; Fernández-Rendón and Barrera-Escorcia, 2013; Salhani and Uelker-Deffur, 1998). En este capítulo, una nueva técnica de desagregación de flóculos de fangos fue implementada. La técnica desarrollada consistía en la doble acción consecutiva ejercida por una jeringuilla de 0.5 mm de diámetro y por la sonicación de las muestras en un baño de ultrasonidos. La jeringuilla permitió desagregar mediante la fuerza de cizallamiento todos aquellos flóculos que cuyo diámetro es superior a 0.5 mm, mientras el baño de ultrasonidos permitió la desagregación de los flóculos de diámetro inferior a 0.5 mm mediante la fuerza de cavitación generada por los ultrasonidos del baño. Según las comparaciones de los resultados antes y después de la desagregación, el protocolo diseñado mostró una gran eficacia en el grado de desagregación de los flóculos, lo que permitió una elevada recuperación de células procariotas confirmada posteriormente mediante la observación directa de las células bajo el microscopio.

Por otra parte, el posible efecto negativo de la desagregación sobre la viabilidad de las células recuperadas fue evaluado. El efecto fue poco significativo en base a los resultados obtenidos de las pruebas de viabilidad realizadas sobre las cepas bacterianas control de *E.*

coli, *B. cereus* y *S. aureus* antes y después de la desagregación. La importancia del protocolo de desagregación diseñado en este trabajo en comparación con los protocolos mencionados anteriormente, viene explicada principalmente por dos aspectos; uno por su rendimiento mostrado en la recuperación de las células procariotas de los fangos activos sin efecto adverso sobre la viabilidad celular y dos por la sencillez de su puesta a punto en el laboratorio. Sin embargo, para poder estandarizar este protocolo se ha de tener en cuenta ciertas consideraciones, como el tipo de la matriz a estudiar, los factores de dilución de las muestras, etc.

Normalmente, la mayoría de las plantas depuradoras se sitúan a gran distancia de los grandes núcleos urbanos, donde habitualmente se encuentran los laboratorios con equipos sofisticados como el citómetro en este caso. La distancia entre los puntos de muestreo y estos laboratorios implica un margen de tiempo entre la recogida de muestras y su procesado. En este trabajo el tiempo transcurrido fue aproximadamente de unas 24 h. El posible efecto de este tiempo fue estudiado sobre unos fangos activos con características fisicoquímicas similares a los fangos de las plantas estudiadas, las pruebas se realizaron en oscuridad y a 4°C condiciones bajo las cual fueron transportadas las muestras de las EDARs estudiadas. Según los resultados de este estudio, el tiempo transcurrido entre el muestreo y los análisis (24 h) no mostró ningún efecto adverso ni sobre la abundancia de las células procariotas ni sobre su viabilidad. Concluyendo así la importancia de los parámetros de temperatura y oscuridad en el mantenimiento de las características vitales de las células procariotas por el tiempo suficiente para su posterior análisis. El mantenimiento de las muestras a temperaturas superiores a 4°C (ej. temperatura ambiente) puede causar efecto significativo sobre las características vitales de las células, sobretodo su abundancia y su actividad (Coello Oviedo et al., 2003). Estos efectos son directamente debidos al decaimiento endógeno de las células procariotas.

En este capítulo, la principal técnica de análisis microbiano fue la citometría, no obstante, la técnica de microscopía de epifluorescencia fue aplicada en paralelo como técnica de referencia (Hobbie et al., 1977; Porter and Feig, 1980). Para los análisis de las células procariotas mediante ambas técnicas, las células fueron marcadas previamente con los fluorocromos de marcaje DAPI, SYTO9, SYTO13 y IP. Generalmente, para unos análisis

fiables mediante microscopía, la suspensión celular a analizar debe ser inmovilizada para evitar falsos contajes. La mayoría de las técnicas de inmovilización de células en el portaobjeto se basan en el uso de soluciones de montaje de elevada densidad, lo que ralentiza la movilidad de las células. Sin embargo, estas técnicas presentan los inconvenientes de ser costosas, difícil de manejar y poco precisas a la hora de contar las células.

En este estudio, se desarrolló con éxito una nueva técnica de fijación de bacterias en los portaobjetos. La técnica consistía en el uso de la solución de agarosa como capa protectora frente a la posible pérdida de las células a lo largo de los análisis. Este método se basó en el trabajo de Daims *et al.* (2001) donde el método fue aplicado por primera vez para la fijación de flóculos agregados. La técnica demostró una gran eficacia en la conservación de las células a lo largo de los análisis, otra de las ventajas de técnica fue la sencillez de su implementación en laboratorio lo que permitiría su estandarización.

En este estudio se realizó por primera vez, según nuestro conocimiento, la comparación de las técnicas de microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo para la cuantificación de los procariotas totales en los fangos activos. Las dos técnicas se compararon estadísticamente, los resultados no mostraron diferencias significativas ni a nivel de abundancia ni viabilidad de los procariotas cuantificados por ambas técnicas, lo que permite estadísticamente, la libre elección entre ambas técnicas como una opción. En base a estas comparaciones y teniendo en cuenta la rapidez, la alta precisión de la técnica de citometría debido a además del amplio rango de detección (10^2 - 10^5 células/análisis x minuto), la técnica de citometría fue considerada como la mejor opción para el seguimiento de las células procariotas totales en los sistemas de fangos activos estudiados.

Los resultados de la aplicación de la técnica de citometría como herramienta de cuantificación y seguimiento microbiano revelaron una gran estabilidad en ambas plantas, tanto a nivel de abundancia bacteriana como su viabilidad basada en el estado de integridad de la membrana celular. Generalmente, la estabilidad de los sistemas de depuración de aguas residuales se basa en la magnitud de las perturbaciones en la calidad del efluente (Oliveira and Von Sperling, 2008). En los sistemas de fangos activos con aireación prolongada, el caso estudiado, la alta estabilidad se considera una de las principales características de estos

sistemas. En este estudio se confirmó por primera vez esta estabilidad no solo demostrada por los parámetros operacionales sino también basándose en los análisis microbiológicos. Por otra parte, el estudio comparativo entre las dos plantas estudiadas mostró pequeñas diferencias que no llegaron a ser significativas estadísticamente. Estas observaciones fueron consistentes con los resultados obtenidos de los principales parámetros fisicoquímicos, como los SSV y la DQO controlados de forma rutinaria en las plantas.

La abundancia de los procariotas totales, mayoritariamente bacterias, cuantificada en las muestras de fangos activos fue relativamente estable y osciló entre 1×10^{11} y 4×10^{11} células L^{-1} en la planta de Archena con una tasa de viabilidad del orden del 70 %, mientras en la planta de Las Torres de Cotillas la abundancia de procariotas osciló entre 1×10^{11} y 6×10^{11} células L^{-1} con una viabilidad del orden 72 %. La oscilación de los procariotas en ambas plantas se correlacionó significativamente con los valores registrados de SSV. No obstante y dado que la biomasa se estima usualmente como SSV, en los últimos años han ido apareciendo técnicas alternativas de cuantificación de biomasa. Por ejemplo Contreras *et al.* (2002) mostraron la utilidad del DQO como método simple y alternativo al uso tradicional de los SSV para la cuantificación de biomasa. No obstante, la biomasa no siempre se refiere a las bacterias y lo contrario es correcto. A pesar todo este esfuerzo dedicado por diferentes investigadores, no cabe duda que la mejor manera de cuantificar la biomasa bacteriana es cuantificándola en términos de células por unidad de volumen y no a base de estimaciones. Por otro lado, pese a las posibles correlaciones directas que se pueden encontrar entre los SSV y la concentración de procariotas, como el caso estudiado, el estudio conjuntamente entre los parámetros operacionales y microbiológicos es requerido para un mejor entendiendo del funcionamiento de las EDARs.

La mayoría de los trabajos publicados en relación a la abundancia bacteriana en los sistemas de fangos activos, se han realizado sobre sistemas convencionales. En este estudio se comparó cuantitativamente las células procariotas entre los procesos de fangos activos con aireación prolongada y los fangos convencionales. Los resultados mostraron una diferencia del orden de un logaritmo, marcada con una mayor abundancia en el caso de los fangos convencionales. La abundancia bacteriana de la planta de fangos convencionales fue del orden 3×10^{12} células L^{-1} , resultados semejantes han sido hallados por estudios previos

realizados también en fangos convencionales (Falcioni et al., 2006; Foladori et al., 2010a; Ziglio et al., 2002). La menor concentración de bacterias observada en los procesos de fangos activos con aireación prolongada puede estar directamente relacionada con el régimen operacional marcado con la baja carga másica ($0.09 - 0.11 \text{ Kg DBO}_5 \text{ Kg MLSS}^{-1} \text{ day}^{-1}$) y alta edad de los fangos (26.4 – 30 días) en las plantas estudiadas (Sette, 1977).

La fiabilidad de los resultados obtenidos tanto a nivel cualitativo como cuantitativo de los procariotas totales en las plantas estudiadas, demostró la gran aplicabilidad de la técnica de citometría como técnica de cuantificación y seguimiento de las células bacterianas en comparación con la técnica de microscopía. Una de las ventajas de la técnica de citometría es la menor dedicación de personal y tiempo por análisis y la posibilidad de automatizar los análisis. La combinación del uso del citómetro conjuntamente con el protocolo de desagregación de fangos y con la doble tinción de los ácidos nucleicos permitió a la vez la cuantificación de la abundancia procariota, así como la descripción de su viabilidad.

En el **capítulo II**, se ha realizado el seguimiento cualitativo y cuantitativo de las bacterias nitrificantes en los biofilms y licor mezcla de una planta piloto diseñada para la nitrificación parcial de un efluente con elevada carga de amonio procedente de un digestor anaeróbico. Esta planta fue implementada en base al proceso de lecho móvil con biofilm, (*moving bed biofilm reactor*, conocido por sus siglas en inglés MBBR).

El exceso del contenido de nitrógeno en las aguas residuales derivado mayoritariamente de la actividad humana, es reconocido como uno de los factores más desequilibradores a nivel ecológico de los medios acuáticos naturales. Uno de los aspectos más destacados como consecuencia de ese exceso de nitrógeno es la eutrofización de los sistemas acuáticos que causa en presencia de luz el crecimiento excesivo de algas y cianobacterias (Conley et al., 2009; Ge et al., 2015a, 2015b). Para reducir los compuestos nitrogenados en las aguas residuales, el proceso de eliminación biológica de nitrógeno convencional mediante la nitrificación y desnitrificación se considera como el método más eficaz y rentable en comparación con los procesos físico-químicos, por ejemplo mediante la adición de coagulantes o *Stripping* (Ge et al., 2015c; Lei et al., 2007).

En los últimos años, nuevas tecnologías de eliminación biológica de nitrógeno se han ido descubriendo a medida que la biotecnología avanzaba, lo que ha llevado a uno nuevo entendimiento del ciclo global del nitrógeno (Ahn, 2006). Dentro de la amplia gama de los procesos biológicos de eliminación de nitrógeno, el proceso de nitrificación parcial combinado con la oxidación anaeróbica de amonio (*Anammox* por sus siglas en inglés) juntos conocidos como el proceso de *short-cut biological nitrogen removal*, es reconocido como uno de los procesos con mayor interés científico en los últimos años. Según la *Web of Science* (WoS) mantenido por Thomson Reuters, en los últimos 20 años, el número de trabajos publicados relacionados con el proceso de nitrificación parcial ha estado en aumento. El sistema de eliminación biológica de nitrógeno mediante la combinación de nitrificación parcial y *Anammox* tiene varios beneficios en comparación con el sistema convencional vía nitrificación-desnitrificación. No hay necesidad de carbono adicional externo, hay una menor producción de lodos y lo que es de mayor interés es la menor demanda de energía y de oxígeno (Jetten et al., 2002). Aunque los aspectos técnicos y teóricos de estos sistemas parecen bastante bien resueltos, debido a la complejidad de su puesta a punto, aun se precisa de un importante soporte desde el campo de la investigación en procesos biotecnológicos.

Los principales microorganismos responsables de la oxidación de amonio en el proceso de nitrificación parcial son las bacterias amonio-oxidantes, sin embargo otros microorganismos pueden involucrarse también en dicha oxidación, como por ejemplo las arqueas amonio-oxidantes (Gao et al., 2013a). Por otra parte, el correcto funcionamiento de la nitrificación parcial exige evitar la posible desnitrificación en el proceso, para ello las bacterias nitrato-oxidantes deben ser evitadas o eliminadas del sistema (Ma et al., 2015).

En este capítulo, se desarrollaron estudios microbiológicos a medida que se ponía a punto una planta piloto a base de lecho móvil (*carriers*) con biofilms con el objetivo de lograr el proceso de nitrificación parcial como un tratamiento previo de un influente muy cargado en amonio procedente de un digestor anaeróbico. Además de la eliminación del 50% de amonio, la nitrificación parcial tiene también como objetivo acondicionar el efluente para su posterior tratamiento con el sistema *Anammox*. Durante más de 379 días se realizaron análisis microbiológicos de seguimiento de la composición microbiana del licor mezcla y biofilms formados en el sistema. El seguimiento consistía en el análisis cualitativo y cuantitativo de

los procariotas totales y de las comunidades nitrificantes, principalmente las bacterias amonio-oxidantes y nitrito-oxidantes. Este seguimiento se llevó a cabo mediante la combinación de la técnica de microscopía de epifluorescencia y las técnicas de marcaje molecular con DAPI y FISH (R I Amann, 1990). Las muestras fueron previamente desagregadas de acuerdo con el protocolo de desagregación desarrollado en el capítulo I. En paralelo, el rendimiento de la planta como sistema de nitrificación parcial fue controlado mediante los parámetros operacionales habituales como el TRH, temperatura y pH junto con las variaciones de la concentración de los distintos derivados nitrogenados en el licor mezcla, principalmente $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$ y $N-NO_3^-$.

Generalmente, la aplicación fiable de las técnicas de marcaje molecular de las células bacterianas requiere la disponibilidad de una suspensión bacteriana desagregada en forma de células individuales (Busing and Gessner, 2002). Por ello y debido a la compleja bioestructura de las matrices analizadas en este estudio; los biofilms formados en los *carriers* fueron recuperados según el método descrito por Canals *et al.* (2013), posteriormente los biofilms y el licor mezcla fueron desagregados con éxito mediante el protocolo de desagregación de los fangos desarrollado. Adicionalmente, la fiabilidad de la observación bajo microscopía de las bacterias marcadas con DAPI y FISH requiere también la disponibilidad previa de una suspensión bacteriana inmóvil bajo microscopio, para ello se aplicó la técnica de fijación de bacterias en los portaobjetos mediante agarosa desarrollada también en el capítulo I.

Las comunidades microbianas estudiadas fueron los procariotas totales (incluyendo bacterias y arqueas), las bacterias amonio-oxidantes, y las bacterias nitrito-oxidantes, principalmente las pertenecientes a los géneros *Nitrospira* y *Nitrobacter*. Los análisis se llevaron a cabo de forma quincenal en las dos matrices; licor mezcla y los biofilms formados en los *carriers*. El análisis de ambas matrices permitió por primera vez poder hacer una comparación cuantitativa entre el grado de colonización bacteriana de los lechos móviles respecto al licor mezcla del mismo reactor. Los resultados del seguimiento revelaron notables fluctuación en la abundancia procariota durante todo el periodo de estudio, mostrando una irregularidad en ambas matrices. Por otra parte, la comparación del grado de colonización entre ambas matrices mostró la importancia de los *carriers* como soporte eficaz

de biomasa con un 96 % de la totalidad de los procariotas cuantificados en toda la planta. Este porcentaje fue significativo y correspondía a una concentración del orden de 6.72×10^{10} células mL^{-1} en el reactor.

Los análisis de las comunidades de bacterias nitrificantes de la planta piloto, se desarrollaron con la misma frecuencia que los procariotas totales. Estos análisis se llevaron a cabo mediante la técnica de FISH combinada con microscopía de epifluorescencia. Generalmente, la mayoría de los trabajos publicados en relación a la cuantificación de las bacterias nitrificantes mediante el uso de la técnica de FISH, se llevaron a cabo en términos de porcentaje de nitrificantes dentro de la totalidad de biomasa, sobre todo cuando se trata de muestras ambientales complejas como los fangos activos (Almstrand et al., 2011; Ge et al., 2014).

Ciertamente, la mayoría de estos trabajos tienen la ventaja de la simplicidad y la rapidez de los análisis realizados en base a estimación fotográfica mediante microscopía. Sin embargo, cuando se trata de muestras de bioestructura compleja como el caso estudiado en este trabajo, existe la probabilidad de una subestimación en el recuento de células, sobre todo en el recuento de aquellas bacterias que colonizan las capas inferiores de los flóculos de fangos y biofilm. Por todo lo anterior, en este trabajo se aplicó un protocolo de desagregación con el fin de recuperar las bacterias nitrificantes individuales de los fangos activos. La técnica de desagregación aplicada fue clave en la cuantificación fiable de las bacterias de forma individual, este método representa nueva alternativa a los métodos publicados en relación, donde los resultados son estimados en porcentajes (Sinha and Annachatre, 2007; Wei et al., 2014). La importancia de obtener resultados cuantitativos en términos de número de células por unidad de volumen en lugar de porcentajes, permite sin duda obtener una visión mucho más clara del sistema estudiado, sobre todo cuando no se sabe la abundancia de la biomasa total como para extrapolar la abundancia de microorganismos específicos, las bacterias nitrificantes en este caso.

Los resultados cuantitativos de las bacterias nitrificantes mostraron una regularidad en la frecuencia de su detección. Las bacterias amonio-oxidantes fueron detectadas y cuantificadas durante todo el periodo de estudio en ambas matrices analizadas; biofilms y licor mezcla.

Mientras en el caso de las bacterias nitrito-oxidantes que en principio no deberían desarrollarse en el sistema, la frecuencia de su detección fue significativamente menor y además en menor abundancia en comparación con las amonio-oxidantes. Otros trabajos relacionados encontraron resultados semejantes (Wei et al., 2014). Las bacterias pertenecientes al género *Nitrospira* fueron detectadas con más frecuencia (en el 70 % de las muestras) que las del género *Nitrobacter* (25 % de muestras), mostrando una elevada tendencia de lavado de las *Nitrobacter* del sistema.

La comparación cuantitativa de las bacterias nitrificantes dentro de la planta, mostró un predominio significativo de las amonio-oxidantes acompañado con una alta estabilidad en comparación con las nitrito-oxidantes, sobre todo en las muestras de los biofilms. Estos resultados fueron atribuidos principalmente al régimen operacional de la planta, donde la mayoría de los parámetros fisicoquímicos eran más favorables para el crecimiento y el mantenimiento de las amonio-oxidantes que para las nitrito-oxidantes. Los parámetros operacionales más destacados fueron; el tiempo de retención hidráulico, la temperatura y el pH. El predominio de las amonio-oxidantes como el principal grupo bacteriano nitrificante en el sistema estudiado, concuerda con otros trabajos realizados en sistemas de depuración parecidos y también en otros sistemas como los fangos activos convencionales, y bioreactores de membrana (Calderón et al., 2012; S et al., 2000; Wagner and Loy, 2002). Las bacterias nitrito-oxidantes en la planta estudiada fueron mayoritariamente del género *Nitrospira*, la baja abundancia observada en las *Nitrobacter* pudo atribuirse a la alta concentración de amonio en el sistema, lo que puede ejercer una inhibición de su crecimiento de acuerdo con Anthonisen *et al.* (1976). Además, las bacterias del género *Nitrobacter* suelen tener la tendencia de ser fácilmente eliminadas del sistema debido a su preferencia de crecimiento en suspensión en licor mezcla en cambio las *Nitrospira* tienden a crecer de forma de agregados en los biofilms (Koops and Pommerening-Roser, 2001b).

Generalmente, el estudio comparativo de la distribución de las bacterias nitrificantes entre los biofilms formados en los *carriers* y el licor mezcla, mostró una afinidad preferente por colonizar más los biofilms que el licor mezcla. Esta observación puede ser atribuida al hecho que esas bacterias crecen en la superficie interior protegida de los lechos, lo que hace que estén menos expuestas al posible lavado del sistema (Barwal and Chaudhary, 2014). Estas

observaciones también son atribuidas a un factor clave, el tiempo de retención de la biomasa de ambas matrices analizadas, ya que la biomasa en suspensión permanece en el licor mezcla muy poco tiempo respecto a la biomasa del biofilm.

Basándose en todos los resultados microbiológicos obtenidos, las técnicas moleculares implementadas de DAPI y FISH combinadas con microscopia de epifluorescencia y el protocolo de desagregación de fangos, demostraron su gran utilidad como una herramienta fácil de implementar para la caracterización y seguimiento microbiológico de las bacterias en los sistemas de depuración de aguas residuales.

Por otra parte, el funcionamiento del sistema de nitrificación parcial piloto fue controlado de forma diaria mediante los parámetros operacionales. Entre estos parámetros, el TRH fue determinante en la obtención de un ratio estable $N-NO_2^-/N-NH_4^+$ alrededor de 1:1. Este ratio es característico de un sistema de nitrificación parcial y es necesario para el funcionamiento correcto del sistema *Anammox* establecido en el siguiente reactor de la planta piloto (Zeng et al., 2014). El control de la concentración de los derivados nitrogenados, principalmente, $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$ y $N-NO_3^-$, mostró una gran fluctuación a lo largo del periodo de estudio, sobre todo $N-NH_4^+$, y $N-NO_2^-$.

Basándose en la estabilidad del TRH, el periodo de estudio se subdividió en diferentes fases. Estas subdivisiones coincidieron con las variaciones observadas en los valores del ratio $N-NO_2^-/N-NH_4^+$. Según el régimen de la tasa de nitrificación registrada en las diferentes fases operacionales, la planta piloto mostró una nitrificación parcial del 50 % durante aquellas fases donde el TRH estaba estabilizado alrededor de 40 h. La oxidación parcial del amonio correspondiente a estas fases fue del orden de 38.6 ± 14 %, lo suficientemente adecuada para la obtención de un ratio $N-NO_2^-/N-NH_4^+$ de 1:1. De acuerdo con lo observado, la importancia del TRH fue obviamente clave en la obtención de un sistema de nitrificación parcial estable. Esta importancia viene explicada por el tiempo necesario por parte de las bacterias amonio-oxidantes para que oxiden el 50 % de amonio, 40 h en este caso. En algunas fases operacionales de la planta, se registró valores elevados de TRH que causó la desestabilización del sistema, principalmente por el hecho de que altos valores de TRH

favorecen el crecimiento de las NOB. Estos resultados están de acuerdo con los trabajos realizados por otros autores (Guo et al., 2010).

La actividad nitrificante registrada en el sistema fue evaluada en función de la tasa de oxidación de amonio y la producción de nitratos. Los resultados estadísticos de las correlaciones entre los diferentes derivados nitrogenados, mostraron una gran correlación entre la concentración de entrada de amonio y la tasa de eliminación de este. Estos resultados, demostraron la eficacia del sistema en la eliminación de amonio al nivel deseado (alrededor del 50 %), incluso en periodos donde la planta piloto recibió altas concentraciones de amonio de entrada ($990 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$). Estos resultados concordaron con otros trabajos parecidos (Fux et al., 2002). La tasa de eliminación de N-NH_4^+ fue estadísticamente proporcional con la producción de N-NO_2^- , demostrando la eficacia del sistema en la eliminación de N-NH_4^+ . Basándose en esta observación y teniendo en cuenta la ausencia de N-NO_2^- en el influente de la planta, la oxidación registrada del N-NH_4^+ fue atribuida directamente a las bacterias amonio-oxidantes cuantificadas.

La relación entre el régimen de nitrificación y las diferentes comunidades nitrificantes cuantificadas, fue evaluada estadísticamente. Los resultados revelaron una correlación estadísticamente significativa entre la abundancia de bacterias amonio-oxidantes cuantificadas con FISH y la tasa de oxidación de amonio registrada en el sistema en función del TRH. Sin embargo, la actividad nitrificante no siempre es limitada a las bacterias amonio-oxidantes debido a la posible participación de otros microorganismos en la oxidación de amonio como las arqueas amonio-oxidantes (Gao et al., 2013b). En el caso estudiado en este capítulo y de acuerdo con los parámetros operacionales de la planta como la alta concentración de amonio y la concentración de OD de alrededor de 2 mg L^{-1} , condiciones que favorecen la presencia de las arqueas amonio-oxidantes, su posible participación en el proceso de nitrificación fue descartada, aunque no de forma absoluta (Park et al., 2006; Sonthiphand and Limpiyakorn, 2011).

Por otra parte, las bacterias nitrito-oxidantes cuantificadas mostraron una actividad metabólica reducida en comparación con las amonio-oxidantes, cuya actividad fue confirmada estadísticamente en base a la significativa correlación lineal entre la baja producción de NO_3^- registrada en la planta y la abundancia de las nitrito-oxidantes. Sin

embargo, según el funcionamiento de la planta, esta actividad no ha sido lo suficientemente preocupante como para alterar el funcionamiento de la planta como un sistema de nitrificación parcial. Los factores limitantes que han frenado el funcionamiento de las NOB fueron principalmente, el TRH y la temperatura.

En el **capítulo III** de la presente memoria, titulado *Caracterización de las comunidades microbianas eliminadoras de nutrientes en tres sistemas diferentes de EDARs a gran escala utilizando un nuevo enfoque de qPCR*, se desarrolló una nueva técnica de diseño para los estándares de ADN para la cuantificación de microorganismos mediante la PCR en tiempo real.

El control del funcionamiento de las plantas depuradoras de aguas residuales, se realiza habitualmente en base al control rutinario de los parámetros fisicoquímicos y algunos indicadores de calidad microbiológica. En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia del estudio microbiológico, especialmente los microorganismos responsables de eliminación de nutrientes, juntamente con los parámetros fisicoquímicos de control habitual, sobre todo en aquellos sistemas que implementan procesos biológicos. Por ello, muchas técnicas moleculares han ido apareciendo en los últimos años para la caracterización de la estructura de las comunidades microbianas colonizadores de los sistemas de depuración de aguas (Gilbride et al., 2006). Eso se debe principalmente al papel determinante de los diferentes microorganismos que colonizan estos sistemas, ya que son los principales responsables de la eliminación de los distintos contaminantes. Las técnicas moleculares han ayudado mucho a descifrar las relaciones existentes entre el funcionamiento de estos sistemas y la carga microbiana que albergan. Además de las técnicas de citometría y FISH estudiadas en los capítulos anteriores, la técnica de qPCR ha ganado mucho terreno en los últimos años dentro de las técnicas moleculares más aplicadas. A diferencia de las técnicas de citometría y FISH que permiten el estudio cualitativo y cuantitativo de microorganismos individuales, la técnica de qPCR permite la cuantificación en tiempo real de copias genómicas de los microorganismos, en este caso concreto, el número de copias del 16S rDNA.

La utilidad de la técnica de qPCR dentro de la amplia gama de técnicas moleculares aplicadas en el ámbito de microbiología, específicamente en los sistemas acuáticos, es indiscutible, y está avalada por el elevado número de trabajos publicados al respecto (Kim et al., 2013). Tradicionalmente y en la mayoría de los trabajos publicados donde se ha aplicado la técnica de qPCR, los estándares de ADN se elaboraban en base al uso de plásmidos o a partir de cultivos puros (Zhang and Fang, 2006). Hoy en día la adopción de nuevas técnicas moleculares a escala de laboratorio necesita determinados requisitos, como la simplicidad, estandarización, rapidez y el coste efectivo. Es por eso en este estudio se ha diseñado un nuevo método para la elaboración de los estándares para qPCR.

El capítulo III de esta tesis se desarrolló en tres bloques, (i) el primero consistía en la puesta a punto de una nueva técnica de elaboración de estándares mediante el uso de la técnica de *gBlocks gene Fragments*, (ii) el segundo bloque fue la aplicación de la técnica de qPCR juntamente con la técnica de FISH para la caracterización y cuantificación de la composición microbiana de tres EDARs a escala real con sistemas operativos distintos, los microorganismo estudiados fueron las bacterias totales, las bacterias nitrificantes, arqueas totales y PAOs (iii) finalmente las tres EDARs se compararon a nivel microbiológico teniendo en cuenta los parámetros operacionales.

El método tradicional del uso de los plásmidos como vector de las dianas de ADN a cuantificar para la obtención de curvas estándares para las reacciones de qPCR requiere mucha dedicación de tiempo y elevados costes. Además, la elaboración de los estándares a base plásmidos no siempre se libra de posibles complicaciones técnicas a la hora de su diseño.

En este capítulo, se estudió una de las alternativas más prometedoras, la técnica de *gBlocks gene Fragments*. La técnica consiste en la síntesis artificial de concentraciones determinadas de fragmentos de ADN de doble cadena que albergan el fragmento diana a cuantificar mediante la qPCR. Las ventajas de esta técnica son varias, entre ellas la rapidez y la sencillez de su puesta a punto, la fiabilidad, la estandarización y el coste que es relativamente bajo. Además, con la técnica de *gBlocks gene Fragments*, existe la posibilidad de diseñar fragmentos de ADN que pueden albergar más de una diana a cuantificar,

permitiendo así el uso del mismo estándar (fragmento ADN) para la cuantificación de varias dianas, es decir varias especies de microorganismos.

Hasta donde sabemos, esta es la primera la vez que se aplica la técnica de *gBlocks gene Fragments* para el diseño de estándares para la cuantificación de microorganismos de interés ecológico en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Los microorganismos estudiados en este capítulo mediante la técnica de qPCR fueron las bacterias totales, bacterias nitrificantes pertenecientes a los dos grandes grupos de amonio-oxidantes y nitrito-oxidantes, y las arqueas totales. Por otra parte, los PAOs fueron estudiadas mediante la técnica de FISH debido a no disponer, en el momento del diseño experimental, de sonda fluorogénica para la cuantificación de PAOs mediante qPCR.

La preparación de los estándares mediante la técnica de *gBlocks gene Fragments* estuvo marcada por la simplicidad, rapidez y asequibilidad. Uno de los resultados más destacados en este estudio fue a nivel de los rangos de detección obtenidos para los diferentes microorganismos. Los rangos de detección de algunos microorganismos fueron ampliados entre uno y dos órdenes de magnitud respecto a lo publicado, suponiendo una mejora en la utilización de la técnica qPCR en aguas residuales (Hall et al., 2002; Harms et al., 2003; Limpiyakorn et al., 2005). La importancia de obtener rangos amplios es aún de mayor interés cuando se trata de trabajos realizados en matrices complejas como los fangos activos, nuestro caso estudiado. Donde la disponibilidad de amplios rangos de detección de qPCR, permite la detección de microorganismos tanto en muestras muy concentradas como muestras que han sido sometidas previamente a una serie de diluciones con el objetivo de evitar posibles inhibiciones (Stubner, 2002).

Los estándares desarrollados en este capítulo con la técnica de *gBlocks gene Fragments*, todos fueron en base al 16S rDNA. Para las bacterias totales, se obtuvo un rango de detección de seis ordenes de magnitud, con un LDM del orden de 3.72×10^2 cg por reacción de PCR con 25 μ L como volumen final en cada reacción. Sin embargo, según los resultados observados (detalles no presentados), hubo la posibilidad de bajar el LDM hasta 37.2 cg reacción⁻¹. En el caso estudiado y, debido a la naturaleza del agua analizada, agua residual procedente de un reactor biológico con fangos activos, el número de bacterias totales no fue

limitante. Pero la obtención de un límite de detección muy bajo es importante siempre y cuando se trata de análisis de aguas de otros puntos de muestreo, como el efluente de las plantas depuradoras, donde se supone la presencia de un número reducido de bacterias totales o incluso en caso de análisis de microorganismos de interés sanitario, como los patógenos presentes en aguas de consumo.

El rango de detección del estándar diseñado para las AOB fue de siete órdenes de magnitud con un LDM de 30 copias reacción⁻¹. Comparado con lo encontrado por Harms *et al.* (2003), hasta donde sabemos el único grupo que trabajó sobre el tema, el estándar desarrollado en este capítulo supone una mejora en la detección de las AOB, donde se pudo detectar la mitad de copias establecidas como LDM por el estándar desarrollado por Harms *et al.* (2003). Respecto a las NOB, el estándar de las *Nitrospira* spp., comparado con el resto de los estándares, presentó el rango más amplio (8 órdenes de magnitud) con el límite de detección más bajo (3.72 cg reacción⁻¹). Mientras el estándar de las *Nitrobacter* spp. fue en general parecido al de las AOB.

Como se mencionó anteriormente la técnica de *gBlocks gene Fragments* tiene la ventaja de poder desarrollar en el mismo estándar más de una diana de ADN a cuantificar, en este caso el 16S rDNA. Esta ventaja se aprovechó cuando se elaboró el estándar de las bacterias totales, el estándar se desarrolló de manera que contenga el gen 16S rDNA de *Nitrospira* spp (AF420301: número de acceso en GenBank), así el mismo estándar sirve para la cuantificación las bacterias totales y las bacterias del género *Nitrospira* spp. La característica de sintetizar más de una diana de ADN en el mismo *gBlocks gene Fragment*, pueda ser aún más amplia aumentando el número de dianas de interés a sintetizar, eso sí, siempre y cuando se sigan las instrucciones de diseño facilitadas por la empresa fabricante a la hora de realizar el pedido. La mayoría de estas instrucciones tienen como objetivo evitar problemas técnicos como por ejemplo la formación de dímeros.

En cuanto a las arqueas, a pesar de los pocos trabajos que hay publicados en relación a su detección mediante las técnicas moleculares (Sawayama *et al.*, 2006; Takai and Horikoshi, 2000), en este trabajo se pudo desarrollar un estándar para su detección mediante la qPCR. Comparado con el resto de los estándares desarrollados a lo largo de este estudio, el LDM

del estándar fue el mayor con 2.41×10^3 cg de 16S rDNA reacción⁻¹. Según lo publicado hasta hoy en día, el presente trabajo facilita por primera vez un estándar de ADN para la cuantificación de arqueas totales mediante qPCR con unos límites de detección bien determinados.

La aplicación de la técnica de qPCR mediante los estándares desarrollados, permitió la cuantificación y caracterización de la composición microbiana de tres plantas depuradoras de aguas residuales, una planta convencional, una de eliminación biológica de nitrógeno y otra de eliminación biológica de nitrógeno con eliminación biológica mejorada del fósforo. La caracterización microbiológica de estos sistemas, procesos ampliamente aplicados en las EDARs, representa una nueva aportación al entendimiento del funcionamiento de la depuración de aguas residuales. Donde se ha podido observar notables diferencias a escala microbiológica, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo. Al inicio de este trabajo, se esperaba fuertes correlaciones entre lo observado a nivel microbiológico y lo observado a nivel del rendimiento operacional de las plantas, ya que la depuración biológica depende mayoritariamente tal como indica el nombre de la composición microbiológica de estos sistemas. Sin embargo, por razones aún no resueltas, la relación microorganismo/rendimiento, no siempre fue concluyente. De hecho, algunas de estas relaciones se confirmaron como por ejemplo la estabilidad observada en la tasa de eliminación de DBO₅ y la abundancia de las bacterias totales cuantificadas en las tres plantas. Respecto a las bacterias totales, curiosamente no se observó correlación significativa entre los SSV medidos en los bioreactores, parámetro habitual de medición de la biomasa, y las bacterias cuantificadas. En primer lugar se pensó que esta observación puede ser atribuida a varias razones, como por ejemplo, la posible limitación del kit de extracción de ADN, sin embargo las bacterias totales se cuantificaron en paralelo mediante la técnica de citometría y los resultados (no presentados en detalle) tampoco concordaron de forma significativa con los valores de SSV registrados en las plantas.

Por otra parte, tal y como se esperaba, el test de correlación lineal entre la tasa de recuperación de ADN de las muestras y las bacterias totales cuantificadas fue significativamente positivo. Cuya información nos permite la posibilidad de predecir el número de bacterias totales basándose solo en la cantidad de ADN recuperada de las

muestras, lo que facilita una visión previa del estado general de carga microbiana de las muestras. No obstante, esta conclusión queda limitada a este trabajo a la espera de realización de más trabajos que lo confirman de manera más concluyente debido a la existencia de varios factores que puedan alterar dicha correlación como, el tipo de matriz de agua analizada, posibles limitaciones del kit de extracción aplicado, el rango del límite de detección de ADN y las bacterias, etc.

La identificación de las bacterias nitrificantes, AOB y NOB como principales responsables de eliminación de nitrógeno, reveló un comportamiento distinto de una planta a otra tanto a nivel cualitativo como cuantitativo. Teniendo en cuenta que dos de las tres plantas estudiadas están diseñadas para la eliminación de nitrógeno, además de eliminación fosforo y uno de ellas, se esperaba una elevada abundancia de las nitrificantes en ambas plantas en comparación con la planta convencional. Sin embargo, esta elevada abundancia solo se observó en la planta de eliminación de nitrógeno y fósforo, mientras en la planta convencional y la de eliminación de nitrógeno, la abundancia de nitrificantes fue relativamente parecida. La actividad nitrificante registrada en todas las plantas, concretamente la eliminación de amonio, fue tal como se esperaba según el diseño de las plantas. Sin embargo, en el caso de la planta convencional la baja tasa de eliminación de amonio fue difícil de interpretar teniendo en cuenta la elevada abundancia de AOB cuantificada en esta planta. En cambio, la actividad nitrificante de la segunda etapa del proceso de nitrificación, oxidación de amonio a nitrito, estaba significativamente correlacionada con la abundancia de NOB detectadas en todas las plantas.

La cuantificación precisa de arqueas totales en este capítulo tuvo limitaciones debido a la falta de información sobre el número de copias genómica del 16S rDNA por célula, en todo modo en este trabajo se ha podido poner de manifiesto la alta presencia del gen 16S rDNA de arqueas en todas las plantas estudiadas. La estimación de la abundancia de arqueas totales suponiendo, en los mejores casos, una copia de *Archeal* 16S rDNA por célula, reflejaría sin duda alguna una alta presencia de arqueas en los tres sistemas de tratamiento de aguas residuales. Esta presencia puede contribuir de manera significativa en el rendimiento de las estaciones de depuración de aguas residuales, ya que las arqueas se consideran como uno de los grupos de microorganismos más investigados en los últimos años, especialmente el grupo

de las arqueas amonio-oxidantes por el gran papel que pueden ejercer en la eliminación de amonio (Bai et al., 2012).

En cuanto a los resultados obtenidos mediante la técnica FISH, respecto a la cuantificación de los PAOs, se observó una correlación significativa entre la tasa de eliminación de fósforo y la abundancia de los PAOs cuantificados en las plantas. La actividad de estos microorganismos, poco estudiados a pesar de su gran contribución en la eliminación de fosforo en los sistemas de depuración, fue relativamente elevada respecto a lo publicado por otros autores (Bao et al., 2007).

A modo resumido, y según todos los resultados obtenidos en este capítulo, la disponibilidad solo de los datos microbiológicos junto con la tasa de eliminación de contaminantes no siempre suele ofrecer información suficiente como para sacar decisiones concluyentes que pueden ayudar a mejorar los rendimientos de estos sistemas de aguas residuales. Sin embargo, el análisis de ambos grupos de parámetros conjuntamente con otros factores que pueden ser claves, factores que pueden influir en el metabolismo de las bacterias como por ejemplo la concentración de oxígeno disuelto en el caso la nitrificación, puede ofrecer una visión más clara en el entendimiento correcto del funcionamiento de los sistemas de bioingeniería destinados al tratamiento de aguas residuales, siempre teniendo en cuenta el factor espaciotemporal. Todo esto añadido a la complejidad de las comunidades microbianas en los sistemas de fangos activos, caso estudiado, es seguramente una de las razones que pueden explicar cómo evoluciona el número de publicaciones en relación al aspecto microbiológico y operacional de los sistemas de tratamiento de aguas residuales a escala real.

En esta tesis, se ha desarrollado y estudiado la aplicabilidad de diferentes técnicas moleculares para la exploración microbiana de diferentes sistemas de tratamiento de aguas residuales, las técnicas de citometría, FISH, y qPCR desarrolladas representan la actual alternativa a los métodos tradicionales de cultivos. La selección de una técnica u otra depende de varios factores, entre los más relevantes encontramos; el grado de fiabilidad de la técnica dependiendo de lo que se pretende estudiar, el coste-beneficio, la dedicación de tiempo y de personal, etc. En caso de la técnica de citometría, los microorganismos se pueden cuantificar de manera muy rápida y precisa siempre y cuando los microorganismos

estén muy bien desagregados. La técnica de FISH tiene la ventaja de poder extrapolar la actividad de los microorganismos, ya que lo que se cuantifica en realidad es el 16S ribosomal que depende del número de ribosomas que contiene cada microorganismo, aunque no siempre es correcto relacionar directamente el número de ribosomas con la actividad metabólica, ya que algunos microorganismos pueden tener la capacidad de conservar sus ribosomas a pesar de la baja actividad metabólica (Daims et al., 2006, 2001; Grégori et al., 2001). Seguramente, la combinación de ambas técnicas, citometría y FISH, será una de las mejores opciones, en esta tesis se ha intentado esa combinación pero los resultados no fueron lo suficientemente concluyentes debido a la compleja matriz de las muestras de fangos activos, sin embargo se puede mejorar. Últimamente, la técnica de qPCR suele ser considerada como una de las técnicas más prometedoras debido a la fiabilidad de los análisis y la rapidez, no obstante existe algunas limitaciones dado que lo que se suele cuantificar son fragmentos de ADN que cuya información no siempre es extrapolable a la actividad metabólica. Es verdad que la disponibilidad de información tanto cualitativa como cuantitativa de las comunidades microbianas en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, independientemente de la técnica aplicada, ayudaría a mejorar nuestro conocimiento a cara del funcionamiento de estos sistemas. No obstante, completar esta información con otros datos adicionales, en la mayoría de los casos datos fisicoquímicos, que están de manera u otra relacionados con el metabolismo de los microorganismos involucrados en los proceso de tratamiento de aguas residuales ayudaría sin duda a mejorar la visión ecológica global de los servicios de saneamiento en general.

5. Conclusiones

5. Conclusiones

El trabajo realizado en esta tesis ha dado lugar a una serie de resultados publicados o en fase de publicación, de los cual concluimos los siguientes puntos:

1. Se ha puesto a punto una nueva técnica de desagregación de flóculos que permite la recuperación de las células presentes en los fangos activos de las depuradoras de agua residual. La desagregación de los flóculos mediante las fuerzas de cizallamiento y cavitación, generadas por una jeringuilla y un baño de ultrasonidos, respectivamente, permite la recuperación de células procariotas que componen el flóculo sin efecto adverso sobre su viabilidad.
2. La técnica de citometría combinada con fluorocromos de marcaje permitió simultáneamente la evaluación fiable de la abundancia de células procariotas desagregadas y su viabilidad en muestras de fangos activos.
3. La técnica de citometría comparada con la microscopía de epifluorescencia presenta la ventaja de sencillez y rapidez en el análisis bacteriano tanto a nivel cualitativo como cuantitativo.
4. Con las técnicas implementadas se han analizado fangos activos de diferentes EDARs. En las plantas de tratamiento de aguas residuales mediante el proceso de fangos activos con aireación prolongada han demostrados tener una abundancia de bacterias totales muy constantes a lo largo de los seis meses de análisis. La abundancia de las bacterias en la EDAR con proceso de fangos activos convencional es un logaritmo mayor (3.12×10^{12} células L^{-1}) comparada la abundancia cuantificada en los procesos de fangos activos con aireación prolongada (2.86×10^{11} células L^{-1}). Eso es debido al régimen operacional, con un TRH de varios días en comparación con el de los procesos convencionales de menos de una decena de horas, y a baja carga másica en los fangos con aireación prolongada.

5. La aplicación de la técnica de microscopia combinada con los métodos de marcaje mediante DAPI y FISH mostró la fiabilidad del uso de la técnica como herramienta de cuantificación y seguimiento de las bacterias totales y nitrificantes en muestras previamente desagregadas de un sistema piloto de nitrificación parcial con una elevada carga amoniacal.
6. Se ha podido establecer un sistema de nitrificación parcial, con un ratio nitrógeno amonio 1:1, en la planta piloto de lecho móvil después de 211 días de su puesta en marcha, mediante los parámetros operacionales principalmente mediante el control de la temperatura a 31°C y el TRH alrededor de 40h.
7. La importancia de los soportes de plástico (*carriers*) para el mantenimiento de la biomasa en estructura de biofilms en el planta piloto de lecho móvil, se ha demostrado en base a los resultados microbiológico tanto cualitativos como cuantitativos.
8. Se ha encontrado una elevada correlación entre la abundancia de las bacterias nitrificantes cuantificadas mediante FISH de *Nitrobacter* y *Nitrospira* el rendimiento de nitrificación de la planta, confirmando la actividad de las comunidades nitrificantes en la planta. Y con un predominio de *Nitrospira* en este tipo de planta.
9. Se han implementado cinco qPCR para cuantificar bacterias totales, bacterias AOB i NOB y arqueas totales de los fangos activos de tres EDARs con distinta capacidad para eliminar nutrientes del agua residual. Con el fin de implementar las qPCR se han diseñado los respectivos estándares usando la técnica de gBlocks. Los resultados de la implementación de la técnica de *gBlocks gene Fragments* mostraron la rapidez, sencillez, y asequibilidad de la técnica como mejor alternativa para la síntesis de los estándares de ADN para la qPCR.
10. La aplicación de qPCR juntamente con la técnica de FISH de PAOs, han permitido la caracterización microbiana de tres EDARs con sistemas operativos distintos:

convencional, sistema de eliminación biológica de nitrógeno y sistema de eliminación biológica de nitrógeno y fósforo. La comparación de la composición microbiana entre las EDARs estudiadas mostró diferentes perfiles microbiológicos, sobre todo para los microorganismos eliminadores de nutrientes, lo que concordó con el régimen operacional de las EDARs.

6. Referencias

Referencias**-A-**

- Ahn, Y.-H., 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochem.* 41, 1709–1721. doi:10.1016/j.procbio.2006.03.033
- Akarsubasi, A.T., Ince, O., Kirdar, B., Oz, N.A., Orhon, D., Curtis, T.P., Head, I.M., Ince, B.K., 2005. Effect of wastewater composition on archaeal population diversity. *Water Res.* 39, 1576–84. doi:10.1016/j.watres.2004.12.041
- Akpor, O., Muchie, B., 2013. Environmental and public health implications of wastewater quality. *African J. Biotechnol.* doi:10.4314/ajb.v10i13.
- Almstrand, R., Lydmark, P., Sörensson, F., Hermansson, M., 2011. Nitrification potential and population dynamics of nitrifying bacterial biofilms in response to controlled shifts of ammonium concentrations in wastewater trickling filters. *Bioresour. Technol.* 102, 7685–91. doi:10.1016/j.biortech.2011.05.066
- Amann, R., Fuchs, B.M., 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 339–48. doi:10.1038/nrmicro1888
- Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172, 762–70.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*
- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Srinath, E.G., 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.* 48, 835–852.
- Appels, L., Baeyens, J., Degève, J., Dewil, R., 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34, 755–781. doi:10.1016/j.peccs.2008.06.002
- Ashbolt, N.J., 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology* 198, 229–38. doi:10.1016/j.tox.2004.01.030

-B-

- B.B. Ward, D.G. Capone, J.P.Z., 2007. What's New in the Nitrogen Cycle? *Oceanography* 20, 101–109.
- Bai, Y., Sun, Q., Wen, D., Tang, X., 2012. Abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in industrial and domestic wastewater treatment systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80, 323–30.
- Bao, L., Li, D., Li, X., Huang, R., Zhang, J., Yang, L. V, Xia, G., 2007. Phosphorus accumulation by bacteria isolated from a continuous-flow two-sludge system. *J. Environ. Sci. (China)* 19, 391–5.
- Barker, P.S., Dold, P.L., 1996. Denitrification behaviour in biological excess phosphorus removal activated sludge systems. *Water Res.* 30, 769–780. doi:10.1016/0043-1354(95)00217-0
- Barwal, A., Chaudhary, R., 2014. To study the performance of biocarriers in moving bed biofilm reactor (MBBR) technology and kinetics of biofilm for retrofitting the existing aerobic treatment systems: a review. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 13, 285–299. doi:10.1007/s11157-014-9333-7
- Beer, M., Stratton, H.M., Griffiths, P.C., Seviour, R.J., 2006. Which are the polyphosphate accumulating organisms in full-scale activated sludge enhanced biological phosphate removal systems in Australia? *J. Appl. Microbiol.* 100, 233–43. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02784.x
- Beman, J.M., Francis, C.A., 2006. Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahía del Tóbari, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7767–77. doi:10.1128/AEM.00946-06
- Beman, J.M., Popp, B.N., Francis, C.A., 2008. Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. *ISME J.* 2, 429–41. doi:10.1038/ismej.2007.118
- Beman, J.M., Roberts, K.J., Wegley, L., Rohwer, F., Francis, C.A., 2007. Distribution and diversity of archaeal ammonia monooxygenase genes associated with corals. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5642–7. doi:10.1128/AEM.00461-07
- Bergmann, D.J., Hooper, A.B., Klotz, M.G., 2005. Structure and sequence conservation of hao cluster genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria: evidence for their

evolutionary history. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5371–82.
doi:10.1128/AEM.71.9.5371-5382.2005

Bie, M.J.M. de, Speksnijder, A.G.C.L., Kowalchuk, G.A., Schuurman, T., Zwart, G., Stephen, J.R., Diekmann, O.E., Laanbroek, H.J., 2001. Shifts in the dominant populations of ammonia-oxidizing β subclass Proteobacteria along the eutrophic Schelde estuary. *Aquat. Microb. Ecol.*

Bowers, H.A., Tengs, T., Glasgow, H.B., Burkholder, J.M., Rublee, P.A., Oldach, D.W., 2000. Development of real-time PCR assays for rapid detection of *Pfiesteria piscicida* and related dinoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4641–8.

Bruce Gordon, Richard Mackay, E.R., 2004. Inheriting the world: The Atlas of Children's Health and the Environment. World Health Organization, London, pp. 14–15.

Buesing, N., Gessner, M.O., 2002. Comparison of detachment procedures for direct counts of bacteria associated with sediment particles plant litter and epiphytic biofilms. *Aquat. Microb. Ecol.* 27, 29–36.

-C-

C Fiencke, E Spieck, E.B., 2005. Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment, Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress. Springer Netherlands, Dordrecht. doi:10.1007/1-4020-3544-6

C.P.L. Grady, G.T. Daigger, H.C.L., 1999. Biological Wastewater Treatment, second ed. ed. Marcel Dekker, New York, NY.

Caffrey, J.M., Bano, N., Kalanetra, K., Hollibaugh, J.T., 2007. Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. *ISME J.* 1, 660–2. doi:10.1038/ismej.2007.79

Calderón, K., Martín-Pascual, J., Poyatos, J.M., Rodelas, B., González-Martínez, A., González-López, J., 2012. Comparative analysis of the bacterial diversity in a lab-scale moving bed biofilm reactor (MBBR) applied to treat urban wastewater under different operational conditions. *Bioresour. Technol.* 121, 119–26.
doi:10.1016/j.biortech.2012.06.078

Canals, O., Salvadó, H., Auset, M., Hernández, C., Malfeito, J.J., 2013. Microfauna communities as performance indicators for an A/O Shortcut Biological Nitrogen Removal moving-bed biofilm reactor. *Water Res.* 47, 3141–50.
doi:10.1016/j.watres.2013.03.017

- Casamayor, E.O., Schäfer, H., Bañeras, L., Pedrós-Alió, C., Muyzer, G., 2000. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 499–508.
- Coello Oviedo, M.D., López-Ramírez, J.A., Sales Márquez, D., Quiroga Alonso, J.M., 2003. Evolution of an activated sludge system under starvation conditions. *Chem. Eng. J.* 94, 139–146. doi:10.1016/S1385-8947(03)00022-6
- Conley, D.J., Paerl, H.W., Howarth, R.W., Boesch, D.F., Seitzinger, S.P., Havens, K.E., Lancelot, C., Likens, G.E., 2009. Ecology. Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science* 323, 1014–5. doi:10.1126/science.1167755
- Contreras, E.M., Bertola, N.C., Giannuzzi, L., Zaritzky, N.E., 2002. A modified method to determine biomass concentration as COD in pure cultures and in activated sludge systems. *Water SA* 28, 463–468. doi:10.4314/wsa.v28i4.4920
- Coolen, M.J.L., Abbas, B., van Bleijswijk, J., Hopmans, E.C., Kuypers, M.M.M., Wakeham, S.G., Sinninghe Damsté, J.S., 2007. Putative ammonia-oxidizing Crenarchaeota in suboxic waters of the Black Sea: a basin-wide ecological study using 16S ribosomal and functional genes and membrane lipids. *Environ. Microbiol.* 9, 1001–1016. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01227.x
- Czepiel, P.M., Crill, P.M., Harriss, R.C., 1993. Methane emissions from municipal wastewater treatment processes. *Environ. Sci. Technol.* 27, 2472–2477. doi:10.1021/es00048a025

-D-

- Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.H., Wagner, M., 2001. In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5273–84. doi:10.1128/AEM.67.11.5273-5284.2001
- Daims, H., Taylor, M.W., Wagner, M., 2006. Wastewater treatment: a model system for microbial ecology. *Trends Biotechnol.* 24, 483–489. doi:10.1016/j.tibtech.2006.09.002
- Damgaard, L.R., Nielsen, L.P., Revsbech, N.P., 2001. Methane microprofiles in a sewage biofilm determined with a microscale biosensor. *Water Res.* 35, 1379–86.

- De los Reyes, F.L., 2010. Challenges in determining causation in structure-function studies using molecular biological techniques. *Water Res.* 44, 4948–57. doi:10.1016/j.watres.2010.07.038
- DeLong, E.F., 1998. Everything in moderation: archaea as “non-extremophiles”. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 649–54.
- Diaz, R.J., Rosenberg, R., 2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* 321, 926–9. doi:10.1126/science.1156401
- Dytczak, M.A., Londry, K.L., Oleszkiewicz, J.A., 2008. Activated sludge operational regime has significant impact on the type of nitrifying community and its nitrification rates. *Water Res.* 42, 2320–8. doi:10.1016/j.watres.2007.12.018

-E-

- Eliasson, J., 2004. WHO/UNICEF Joint Monitoring Programme (JMP) for Water Supply and Sanitation. Luxembourg.

-F-

- Falcioni, T., Manti, A., Boi, P., Canonico, B., Balsamo, M., Papa, S., 2006. Comparison of disruption procedures for enumeration of activated sludge floc bacteria by flow cytometry. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 70, 149–53. doi:10.1002/cyto.b.20097
- Fernández-Rendón, C.L., Barrera-Escorcía, G., 2013. Comparación de técnicas para la extracción de bacterias coliformes del sedimento del lago de Xochimilco, México. *Rev. Argent. Microbiol.* 45, 180–184. doi:10.1016/S0325-7541(13)70022-1
- Foladori, P., Bruni, L., Tamburini, S., Ziglio, G., 2010a. Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry. *Water Res.* 44, 3807–18. doi:10.1016/j.watres.2010.04.027
- Foladori, P., Tamburini, S., Bruni, L., 2010b. Bacteria permeabilization and disruption caused by sludge reduction technologies evaluated by flow cytometry. *Water Res.* 44, 4888–99. doi:10.1016/j.watres.2010.07.030

- Francis, C.A., Roberts, K.J., Beman, J.M., Santoro, A.E., Oakley, B.B., 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14683–8. doi:10.1073/pnas.0506625102
- Fröls, S., 2013. Archaeal biofilms: widespread and complex. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 393–398. doi:10.1042/BST20120304
- Fuhs, G.W., Chen, M., 1975. Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microb. Ecol.* 2, 119–38. doi:10.1007/BF02010434
- Fukushima, T., Whang, L.-M., Chiang, T.-Y., Lin, Y.-H., Chevalier, L.R., Chen, M.-C., Wu, Y.-J., 2013. Nitrifying bacterial community structures and their nitrification performance under sufficient and limited inorganic carbon conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6513–23. doi:10.1007/s00253-012-4436-y
- Fukushima, T., Wu, Y.J., Whang, L.M., 2012. The influence of salinity and ammonium levels on amoA mRNA expression of ammonia-oxidizing prokaryotes. *Water Sci. Technol.* 65, 2228–35. doi:10.2166/wst.2012.142
- Fux, C., Bohler, M., Huber, P., Brunner, I., Siegrist, H., 2002. Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitrification and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant. *J. Biotechnol.* 99, 295–306. doi:10.1016/S0168-1656(02)00220-1

-G-

- G.M. Garrity, D.R.B., 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. 20. ed. New York, NY.
- Gao, J.-F., Luo, X., Wu, G.-X., Li, T., Peng, Y.-Z., 2013a. Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants. *Bioresour. Technol.* 138, 285–96. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.176
- Gao, J.-F., Luo, X., Wu, G.-X., Li, T., Peng, Y.-Z., 2013b. Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants. *Bioresour. Technol.* 138, 285–296. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.176

- Ge, S., Agbakpe, M., Wu, Z., Kuang, L., Zhang, W., Wang, X., 2015a. Influences of surface coating, UV irradiation and magnetic field on the algae removal using magnetite nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 49, 1190–6. doi:10.1021/es5049573
- Ge, S., Agbakpe, M., Zhang, W., Kuang, L., 2015b. Heteroaggregation between PEI-coated magnetic nanoparticles and algae: effect of particle size on algal harvesting efficiency. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 6102–8. doi:10.1021/acsami.5b00572
- Ge, S., Peng, Y., Qiu, S., Zhu, A., Ren, N., 2014. Complete nitrogen removal from municipal wastewater via partial nitrification by appropriately alternating anoxic/aerobic conditions in a continuous plug-flow step feed process. *Water Res.* 55C, 95–105. doi:10.1016/j.watres.2014.01.058
- Ge, S., Wang, S., Yang, X., Qiu, S., Li, B., Peng, Y., 2015c. Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: A review. *Chemosphere* 140, 85–98. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.02.004
- Gieseke, A., Bjerrum, L., Wagner, M., Amann, R., 2003. Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm. *Environ. Microbiol.* 5, 355–369. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00423.x
- Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., Schramm, A., 2001. Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1351–62. doi:10.1128/AEM.67.3.1351-1362.2001
- Gilbride, K.A., Lee, D.-Y., Beaudette, L.A., 2006. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *J. Microbiol. Methods* 66, 1–20. doi:10.1016/j.mimet.2006.02.016
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C., 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25, 386–401. doi:10.1006/meth.2001.1261
- González-Martínez, A., Pesciaroli, C., Martínez-Toledo, M.V., Hontoria, E., González-López, J., Osorio, F., 2014. Study of nitrifying microbial communities in a partial-nitritation bioreactor. *Ecol. Eng.* 64, 443–450. doi:10.1016/j.ecoleng.2014.01.009
- Grégori, G., Citterio, S., Ghiani, A., Labra, M., Sgorbati, S., Brown, S., Denis, M., 2001. Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4662–70.
- Gribaldo, S., Brochier-Armanet, C., 2006. The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361, 1007–1022. doi:10.1098/rstb.2006.1841

- Guo, F., Zhang, T., 2012. Profiling bulking and foaming bacteria in activated sludge by high throughput sequencing. *Water Res.* 46, 2772–82. doi:10.1016/j.watres.2012.02.039
- Guo, J., Peng, Y., Huang, H., Wang, S., Ge, S., Zhang, J., Wang, Z., 2010. Short- and long-term effects of temperature on partial nitrification in a sequencing batch reactor treating domestic wastewater. *J. Hazard. Mater.* 179, 471–479. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.03.027

-H-

- Hall, S.J., Hugenholtz, P., Siyambalapitiya, N., Keller, J., Blackall, L.L., 2002. The development and use of real-time PCR for the quantification of nitrifiers in activated sludge, in: *Water Science and Technology*. pp. 267–272.
- Hallam, S.J., Konstantinidis, K.T., Putnam, N., Schleper, C., Watanabe, Y., Sugahara, J., Preston, C., de la Torre, J., Richardson, P.M., DeLong, E.F., 2006a. Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 18296–301. doi:10.1073/pnas.0608549103
- Hallam, S.J., Mincer, T.J., Schleper, C., Preston, C.M., Roberts, K., Richardson, P.M., DeLong, E.F., 2006b. Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *PLoS Biol.* 4, e95. doi:10.1371/journal.pbio.0040095
- Hansel, C.M., Fendorf, S., Jardine, P.M., Francis, C.A., 2008. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1620–33. doi:10.1128/AEM.01787-07
- Harms, G., Layton, A.C., Dionisi, H.M., Gregory, I.R., Garrett, V.M., Hawkins, S.A., Robinson, K.G., Sayler, G.S., 2003. Real-Time PCR Quantification of Nitrifying Bacteria in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Environ. Sci. Technol.* 37, 343–351. doi:10.1021/es0257164
- Helmer, C., Kunst, S., Juretschko, S., Schmid, M., Schleifer, K., Wagner, M., 1999. Nitrogen loss in a nitrifying biofilm system. *Water Sci. Technol.* 39, 13–21. doi:10.1016/S0273-1223(99)00145-6
- Herndl, G.J., Reinthaler, T., Teira, E., van Aken, H., Veth, C., Pernthaler, A., Pernthaler, J., 2005. Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2303–9. doi:10.1128/AEM.71.5.2303-2309.2005

- Hesselmann, R.P.X., Werlen, C., Hahn, D., Van Der Meer, J.R., Zehnder, A.J.B., 1999. Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 454–465.
- Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F., Medema, G.J., 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res.* 40, 3–22. doi:10.1016/j.watres.2005.10.030
- Hobbie, J.E., Daley, R.J., Jasper, S., 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1225–1228.
- Hreiz, R., Latifi, M.A., Roche, N., 2015. Optimal design and operation of activated sludge processes: State-of-the-art. *Chem. Eng. J.* 281, 900–920. doi:10.1016/j.cej.2015.06.125
- Huang, Z., Gedalanga, P.B., Asvapathanagul, P., Olson, B.H., 2010. Influence of physicochemical and operational parameters on *Nitrobacter* and *Nitrospira* communities in an aerobic activated sludge bioreactor. *Water Res.* 44, 4351–8. doi:10.1016/j.watres.2010.05.037

-J-

- Jetten, M.S.M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L.A., Vries, S. de, Loosdrecht, M.C.M. van, Kuenen, J.G., 1997. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71, 75–93. doi:10.1023/A:1000150219937
- Jetten, M.S.M., Schmid, M., Schmidt, I., Wubben, M., van Dongen, U., Abma, W., Sliemers, O., Revsbech, N.P., Beaumont, H.J.E., Ottosen, L., Voleke, E., Laanbroek, H.J., Campos-Gomez, J.L., Cole, J., van Loosdrecht, M., Mulder, J.W., Fuerst, J., Richardson, D., van de Pas, K., Mendez-Pampin, R., Third, K., Cirpus, I., van Spanning, R., Bollmann, A., Nielsen, L.P., den Camp, H.O., Schultz, C., Gundersen, J., Vanrolleghem, P., Strous, M., Wagner, M., Kuenen, J.G., 2002. Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 1, 51–63. doi:10.1023/A:1015191724542
- Junier, P., Molina, V., Dorador, C., Hadas, O., Kim, O.-S., Junier, T., Witzel, J.-P., Imhoff, J.F., 2010. Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 425–40. doi:10.1007/s00253-009-2228-9

Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.P., Wagner, M., 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: Nitrosococcus mobilis and Nitrospira-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3042–3051.

-K-

Kartal, B., van Niftrik, L., Rattray, J., van de Vossenberg, J.L.C.M., Schmid, M.C., Sinninghe Damsté, J., Jetten, M.S.M., Strous, M., 2008. Candidatus “Brocadia fulgida”: an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63, 46–55. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00408.x

Khan, S., 2014. The US, South Africa and Australia are turning wastewater into drinking water. *Theguardian*.

Kim, J., Lim, J., Lee, C., 2013. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnol. Adv.* 31, 1358–73. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.05.010

Klotz, M.G., Stein, L.Y., 2008. Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. *FEMS Microbiol. Lett.* 278, 146–56. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00970.x

Kong, Y., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., 2005. Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4076–85. doi:10.1128/AEM.71.7.4076-4085.2005

Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., Stahl, D.A., 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437, 543–6. doi:10.1038/nature03911

Koops, H., 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37, 1–9. doi:10.1016/S0168-6496(01)00137-4

Koops, H.-P., Pommerening-Röser, A., 2001a. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37, 1–9. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00847.x

- Koops, H.-P., Pommerening-Roser, A., 2001b. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37, 1–9. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00847.x
- Kuai, L., Verstraete, W., 1998. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4500–6.
- Kuenen, J.G., 2008. Anammox bacteria: from discovery to application. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 320–6. doi:10.1038/nrmicro1857
- Kuhnert, P., Boerlin, P., Frey, J., 2000. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 107–17.
- Kuo, D.H.-W., Robinson, K.G., Layton, A.C., Meyers, A.J., Sayler, G.S., 2010. Transcription levels (amoA mRNA-based) and population dominance (amoA gene-based) of ammonia-oxidizing bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 751–7. doi:10.1007/s10295-010-0728-3

-L-

- Lee, I.-S., Parameswaran, P., Rittmann, B.E., 2011. Effects of solids retention time on methanogenesis in anaerobic digestion of thickened mixed sludge. *Bioresour. Technol.* 102, 10266–10272. doi:10.1016/j.biortech.2011.08.079
- Lee, N., Nielsen, P.H., Andreasen, K.H., Juretschko, S., Nielsen, J.L., Schleifer, K.H., Wagner, M., 1999. Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography—a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1289–97.
- Lei, X., Sugiura, N., Feng, C., Maekawa, T., 2007. Pretreatment of anaerobic digestion effluent with ammonia stripping and biogas purification. *J. Hazard. Mater.* 145, 391–397. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.11.027
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C., 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442, 806–9. doi:10.1038/nature04983
- Lens, P.N., De Poorter, M.-P., Cronenberg, C.C., Verstraete, W.H., 1995. Sulfate reducing and methane producing bacteria in aerobic wastewater treatment systems. *Water Res.* 29, 871–880. doi:10.1016/0043-1354(94)00195-D

- Limpiyakorn, T., Shinohara, Y., Kurisu, F., Yagi, O., 2005. Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 205–17. doi:10.1016/j.femsec.2005.03.017
- Lin, M.H., Chen, T.C., Kuo, T.T., Tseng, C.C., Tseng, C.P., 2000. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4121–5.
- Lücker, S., Wagner, M., Maixner, F., Pelletier, E., Koch, H., Vacherie, B., Rattei, T., Damsté, J.S.S., Spieck, E., Le Paslier, D., Daims, H., 2010. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13479–84. doi:10.1073/pnas.1003860107
- Lutchmiah, K., Verliefde, A.R.D., Roest, K., Rietveld, L.C., Cornelissen, E.R., 2014. Forward osmosis for application in wastewater treatment: a review. *Water Res.* 58, 179–97. doi:10.1016/j.watres.2014.03.045
- M-**
- Ma, B., Bao, P., Wei, Y., Zhu, G., Yuan, Z., Peng, Y., 2015. Suppressing Nitrite-oxidizing Bacteria Growth to Achieve Nitrogen Removal from Domestic Wastewater via Anammox Using Intermittent Aeration with Low Dissolved Oxygen. *Sci. Rep.* 5, 13048. doi:10.1038/srep13048
- Manzano, J.R., 2012. Detección y caracterización de virus patógenos emergentes de interés general en seguridad alimentaria. University of Barcelona.
- Márquez, M.C., Costa, C., 1996. Biomass concentration in PACT process. *Water Res.* 30, 2079–2085. doi:10.1016/0043-1354(96)00007-3
- Metcalf and Eddy, 1991. *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse*, 3rd ed. McGraw-Hill, New York, NY.
- Mincer, T.J., Church, M.J., Taylor, L.T., Preston, C., Karl, D.M., DeLong, E.F., 2007. Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environ. Microbiol.* 9, 1162–75. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01239.x
- Mino, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 1998. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Res.* 32, 3193–3207. doi:10.1016/S0043-1354(98)00129-8

Mobarry, B.K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B.E., Stahl, D.A., 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2156–2162.

Mohammadi, H., Sabzali, A., Gholami, M., Dehghanifard, E., Mirzaei, R., 2012. Comparative study of SMBR and extended aeration activated sludge processes in the treatment of high-strength wastewaters. *Desalination* 287, 109–115. doi:10.1016/j.desal.2011.05.045

-N-

Nicolella, C., 2000. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *J. Biotechnol.* 80, 1–33. doi:10.1016/S0168-1656(00)00229-7

Nogueira, R., Melo, L.F., 2006. Competition between *Nitrospira* spp. and *Nitrobacter* spp. in nitrite-oxidizing bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 95, 169–75. doi:10.1002/bit.21004

-O-

Oehmen, A., Lemos, P.C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall, L.L., Reis, M.A.M., 2007. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water Res.* 41, 2271–300. doi:10.1016/j.watres.2007.02.030

Okabe, S., Oshiki, M., Takahashi, Y., Satoh, H., 2011. N₂O emission from a partial nitrification-anammox process and identification of a key biological process of N₂O emission from anammox granules. *Water Res.* 45, 6461–70. doi:10.1016/j.watres.2011.09.040

Oliveira, S.C., Von Sperling, M., 2008. Reliability analysis of wastewater treatment plants. *Water Res.* 42, 1182–1194. doi:10.1016/j.watres.2007.09.001

-P-

Pace, N.R., Stahl, D.A., Olsen, G.J., 1985. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM News* 51: 4-12. *ASM News* 51.

- Parameswaran, P., Torres, C.I., Lee, H.-S., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E., 2009. Syntrophic interactions among anode respiring bacteria (ARB) and Non-ARB in a biofilm anode: electron balances. *Biotechnol. Bioeng.* 103, 513–23. doi:10.1002/bit.22267
- Park, H.-D., Noguera, D.R., 2004. Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge. *Water Res.* 38, 3275–86. doi:10.1016/j.watres.2004.04.047
- Park, H.-D., Wells, G.F., Bae, H., Criddle, C.S., Francis, C.A., 2006. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5643–7. doi:10.1128/AEM.00402-06
- Pedreira, C.E., Costa, E.S., Lecrevisse, Q., van Dongen, J.J.M., Orfao, A., 2013. Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. *Trends Biotechnol.* 31, 415–425. doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.008
- Pester, M., Schleper, C., Wagner, M., 2011. The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 300–6. doi:10.1016/j.mib.2011.04.007
- Porter, K.G., Feig, Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25, 943–948. doi:10.4319/lo.1980.25.5.0943
- Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M.C., Koops, H.-P., Wagner, M., 2000. Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and amoA Sequence Analysis: Implications for Molecular Diversity Surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5368–5382. doi:10.1128/AEM.66.12.5368-5382.2000

-Q-

- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–6. doi:10.1093/nar/gks1219

-R-

- R I Amann, L.K.D.A.S., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.*
- REUTERS, T., 2016. Web of Science [WWW Document].
- Ribeiro, A.R., Nunes, O.C., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T., 2015. An overview on the advanced oxidation processes applied for the treatment of water pollutants defined in the recently launched Directive 2013/39/EU. *Environ. Int.* 75, 33–51. doi:10.1016/j.envint.2014.10.027
- Rittmann, B.E., 2006. Microbial ecology to manage processes in environmental biotechnology. *Trends Biotechnol.* 24, 261–6. doi:10.1016/j.tibtech.2006.04.003
- Rowley, T., 2015. *Flow Cytometry - A Survey and the Basics.* Mater. Methods.

-S-

- S, R., R, W., W, M., U, S., M, K., 2000. Operation of different membrane bioreactors: experimental results and physiological state of the micro-organisms.
- Saikaly, P.E., Hicks, K., Barlaz, M.A., de Los Reyes, F.L., 2010. Transport behavior of surrogate biological warfare agents in a simulated landfill: effect of leachate recirculation and water infiltration. *Environ. Sci. Technol.* 44, 8622–8. doi:10.1021/es101937a
- Salhani, N., Uelker-Deffur, A., 1998. Improved quantification of aggregated bacteria by combined enzymatic and mechanical treatment of flocs and biofilm from a rotating drum bioreactor. *Water Res.* 32, 1287–1295. doi:10.1016/S0043-1354(97)00284-4
- Sawayama, S., Tsukahara, K., Yagishita, T., 2006. Phylogenetic description of immobilized methanogenic community using real-time PCR in a fixed-bed anaerobic digester. *Bioresour. Technol.* 97, 69–76. doi:10.1016/j.biortech.2005.02.011
- Schmidt, I., Bock, E., 1997. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Arch. Microbiol.* 167, 106–11.

- Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., Strous, M., 2003. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 481–92.
- Schramm, A., Santegoeds, C.M., Nielsen, H.K., Ploug, H., Wagner, M., Pribyl, M., Wanner, J., Amann, R., de Beer, D., 1999. On the Occurrence of Anoxic Microniches, Denitrification, and Sulfate Reduction in Aerated Activated Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4189–4196.
- Sette, R.R., 1977. Secondary Treatment: Other Aerobic and Anaerobic Wastewater Treatment Processes, in: *Introduction to Wastewater Treatment Processes*. Academic Press, INC., London, pp. 238–239.
- Seviour, R.J., Mino, T., Onuki, M., 2003. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 99–127. doi:10.1016/S0168-6445(03)00021-4
- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., Li, X.-Y., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnol. Adv.* 28, 882–94. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.08.001
- Sievert, S.M., Brinkhoff, T., Muyzer, G., Ziebis, W., Kuever, J., 1999. Spatial heterogeneity of bacterial populations along an environmental gradient at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3834–42.
- Sinha, B., Annachhatre, A.P., 2007. Assessment of partial nitrification reactor performance through microbial population shift using quinone profile, FISH and SEM. *Bioresour. Technol.* 98, 3602–3610. doi:10.1016/j.biortech.2006.11.034
- Sinha, B., Annachhatre, A.P., 2006. Partial nitrification—operational parameters and microorganisms involved. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 6, 285–313. doi:10.1007/s11157-006-9116-x
- Smith, C.J., Osborn, A.M., 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67, 6–20. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x
- Sonthiphand, P., Limpiyakorn, T., 2011. Change in ammonia-oxidizing microorganisms in enriched nitrifying activated sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 843–53. doi:10.1007/s00253-010-2902-y
- Sperling, M. van, 2007. Wastewater characteristics, Treatment and Disposal, in: *Biological Wastewater Treatment Series*. IWA Publishing, London, pp. 134–136.

- Stahl, D.A., de la Torre, J.R., 2012. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 83–101. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150128
- Steen, H.B., 2000. Flow cytometry of bacteria: glimpses from the past with a view to the future. *J. Microbiol. Methods* 42, 65–74. doi:10.1016/S0167-7012(00)00177-9
- Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., 1998. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 589–596. doi:10.1007/s002530051340
- Strous, M., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., 1999. Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation. *Appl. Envir. Microbiol.* 65, 3248–3250.
- Stubner, S., 2002. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreenTM detection. *J. Microbiol. Methods* 50, 155–164. doi:10.1016/S0167-7012(02)00024-6
- Su, C., Lei, L., Duan, Y., Zhang, K.-Q., Yang, J., 2012. Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 993–1003. doi:10.1007/s00253-011-3800-7
- Sundermeyer-Klinger, H., Meyer, W., Warninghoff, B., Bock, E., 1984. Membrane-bound nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter*: evidence for a nitrate reductase system. *Arch. Microbiol.* 140, 153–158. doi:10.1007/BF00454918

-T-

- Takai, K., Horikoshi, K., 2000. Rapid Detection and Quantification of Members of the Archaeal Community by Quantitative PCR Using Fluorogenic Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5066–5072. doi:10.1128/AEM.66.11.5066-5072.2000
- Tang, Y., Ontiveros-Valencia, A., Feng, L., Zhou, C., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E., 2013. A biofilm model to understand the onset of sulfate reduction in denitrifying membrane biofilm reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 763–72. doi:10.1002/bit.24755
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., Nguyen, M., 2010. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50, S1–5. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.005

Thomann, R., Mueller, J., 1987. Principales of surface water quality modeling and control. p. 644.

Tourna, M., Freitag, T.E., Nicol, G.W., Prosser, J.I., 2008. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environ. Microbiol.* 10, 1357–64. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01563.x

Tyagi, V.K., Subramaniyan, S., Kazmi, A.A., Chopra, a. K., 2008. Microbial community in conventional and extended aeration activated sludge plants in India. *Ecol. Indic.* 8, 550–554. doi:10.1016/j.ecolind.2007.07.002

-U-

Upadhyay, A.R., Mishra, V.K., Pandey, S.K., Tripathi, B.D., 2007. Biofiltration of secondary treated municipal wastewater in a tropical city. *Ecol. Eng.* 30, 9–15. doi:10.1016/j.ecoleng.2006.09.004

-V-

Valentine, D.L., 2007. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 316–23. doi:10.1038/nrmicro1619

Van de Graaf, A., Mulder, A., de Bruijn, P., Jetten, M., Robertson, L., Kuenen, J., 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl. Envir. Microbiol.* 61, 1246–1251.

Veal, D., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J., Attfield, P., 2000. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J. Immunol. Methods* 243, 191–210. doi:10.1016/S0022-1759(00)00234-9

Verstraete, W., Philips, S., 1998. Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. *Environ. Pollut.* 102, 717–726. doi:10.1016/S0269-7491(98)80104-8

Vives-Rego, J., Lebaron, P., Nebe-von Caron, G., 2000. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 429–448. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00549.x

-W-

- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., Schleifer, K.H., 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: Inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1520–1525.
- Wagner, M., Assmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P., Amann, R., 1994. In situ analysis of microbial consortia in activated sludge using fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal scanning laser microscopy. *J. Microsc.* 176, 181–187. doi:10.1111/j.1365-2818.1994.tb03513.x
- Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D., Schleifer, K.H., 1994. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 792–800.
- Wagner, M., Loy, A., 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 218–27.
- Wang, Y., Hammes, F., De Roy, K., Verstraete, W., Boon, N., 2010. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends Biotechnol.* 28, 416–424. doi:10.1016/j.tibtech.2010.04.006
- Wei, D., Xue, X., Yan, L., Sun, M., Zhang, G., Shi, L., Du, B., 2014. Effect of influent ammonium concentration on the shift of full nitrification to partial nitrification in a sequencing batch reactor at ambient temperature. *Chem. Eng. J.* 235, 19–26. doi:10.1016/j.cej.2013.09.005
- Weidler, G.W., Dornmayr-Pfaffenhuemer, M., Gerbl, F.W., Heinen, W., Stan-Lotter, H., 2007. Communities of archaea and bacteria in a subsurface radioactive thermal spring in the Austrian Central Alps, and evidence of ammonia-oxidizing Crenarchaeota. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 259–70. doi:10.1128/AEM.01570-06
- WHO, 2008. Recommendations, in: *Guidelines for Drinking-Water Quality*. WHO, Geneva, p. 122.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P., 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22, 130–1, 134–8.

- Woese, C.R., Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5088–5090. doi:10.1073/pnas.74.11.5088
- Woese, C.R., Stackebrandt, E., Weisburg, W.G., Paster, B.J., Madigan, M.T., Fowler, V.J., Hahn, C.M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K.H., Fox, G.E., 1984. The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* 5, 315–26.
- Wuchter, C., Abbas, B., Coolen, M.J.L., Herfort, L., van Bleijswijk, J., Timmers, P., Strous, M., Teira, E., Herndl, G.J., Middelburg, J.J., Schouten, S., Sinninghe Damsté, J.S., 2006. Archaeal nitrification in the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12317–22. doi:10.1073/pnas.0600756103

-X-

- Xia, S., Li, J., Wang, R., Li, J., Zhang, Z., 2010. Tracking composition and dynamics of nitrification and denitrification microbial community in a biofilm reactor by PCR-DGGE and combining FISH with flow cytometry. *Biochem. Eng. J.* 49, 370–378. doi:10.1016/j.bej.2010.01.013
- Yang, Q., Wang, J., Wang, H., Chen, X., Ren, S., Li, X., Xu, Y., Zhang, H., Li, X., 2012. Evolution of the microbial community in a full-scale printing and dyeing wastewater treatment system. *Bioresour. Technol.* 117, 155–63. doi:10.1016/j.biortech.2012.04.059

-Y-

- Yang, Y., Zhang, T., Zhang, X.-X., Liang, D.-W., Zhang, M., Gao, D.-W., Zhu, H.-G., Huang, Q.-G., Fang, H.H.P., 2012. Quantification and characterization of β -lactam resistance genes in 15 sewage treatment plants from East Asia and North America. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 1351–8. doi:10.1007/s00253-011-3810-5

-Z-

- Zeng, W., Bai, X., Zhang, L., Wang, A., Peng, Y., 2014. Population dynamics of nitrifying bacteria for nitrification achieved in Johannesburg (JHB) process treating municipal wastewater. *Bioresour. Technol.* 162, 30–7. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.102

- Zhang, T., Fang, H.H.P., 2006. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 281–9. doi:10.1007/s00253-006-0333-6
- Zhang, X.J., 2014. *Comprehensive Water Quality and Purification*, *Comprehensive Water Quality and Purification*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-382182-9.00046-3
- Ziglio, G., Andreottola, G., Barbesti, S., Boschetti, G., Bruni, L., Foladori, P., Villa, R., 2002. Assessment of activated sludge viability with flow cytometry. *Water Res.* 36, 460–468. doi:10.1016/S0043-1354(01)00228-7

7. Anexos

Preparación de la solución de fijación Paraformaldehído al 4%

1. En un vaso de precipitado de 150 mL con imán, se calienta un volumen de 65 mL de agua Milli-Q a 60°C mediante el baño termostático.
2. Bajo vitrina de extracción de gases se añade al agua 4 g de Paraformaldehído (95,5%) y se mantiene la solución a 60°C en la placa calefactora.
3. Se añade mediante pipeta Pasteur entre 2-5 gotas de NaOH 2M y se agita rápidamente mediante un imán hasta que la solución se vuelva clara (entre 1 y 2 minutos).
4. La solución se retira de la fuente de calor y se añade 33 mL de 3x PBS estéril.
5. La solución de fijación se deja enfriar y se almacena en alícuotas de 2 mL a -20°C.

Proceso de fijación de las muestras para el FISH

1. 1 mL de muestra de licor mezcla (sin flóculos) se centrifuga a 16.000 x g durante 5 minutos en la centrifuga *Eppendorf*.
2. Se quita el sobrenadante, se añade 1 mL de PBS, se agita al máximo en el vortex VELP durante 30s y se centrifuga a 16.000 x g durante 5 minutos.
3. Se quita el sobrenadante y se añade al pellet formado 200 µL de PBS más 600 µL de la solución de fijación de Paraformaldehído al 4%.
4. La preparación se agita al máximo con el vortex VELP durante 2 minutos y se incuba a 4°C durante 3 horas con constante agitación mediante el vortex Mixer a velocidad mínima.
5. Trabajando en la vitrina de extracción se realiza 3 lavados de con PBS (frío a 4°C), centrifugando y quitando el sobrenadante (16.000 x g, 5 minutos).

6. Se añade 500 μ L de PBS más 500 μ L de etanol al 99,99%. La preparación se agita con el vortex VELP al máximo hasta que se deshace el pellet (la muestra fijada se puede conservar a -20°C entre 6 meses y de 12 meses).

DNA standards of studied microorganisms

DNA standard of total bacteria cells and *Nitrospira* spp.

CGTGACATCCAGTCAGATCGTACGTCAGACTTCGAATGGCTGTCGTCAGCTCGTG
CCGTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCCGAACGAGCGCAACCCCTGCTTTCAGTTGCT
ACCGGGTCATGCCGAGCACTCTGAAAGGACTGCCAGGAGAACGGGGAGGAAG
GTGGGGGTGACGTCAAGTCAGCATGGCCTTTATGCCTGGGGCCACACACGTGCT
ACAATGGCCGGTACAAAGCGCTGCAAACCCGTGAGGGGGAGCCAATCGCAAAA
AACCGGCCTCAGTTCAGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGGCGGAATC
GCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
CACCGCCCGTCACACCACGAAAGCCTGTTGTACCTGAAGTCGCCACGCCAACCC
GCAAGGAGGCAGTGCCACGGTATGGCCGGTGATTGGGTGTAGCCGAATCGTCC
ATTGAAATCGATCCTACGTAG

DNA standard of AOB

TTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGGGGGCTTCGGCCTGCCGGCGAGTGGCG
AACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCTTAAGTGGGAATAACGCATCGAA
AGATGTGCTAATACCGCATATCTCTGAGGAGAAAAGCAGGGGATCGCAAGACCT
TGCGCTAAAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTA
CCAAGGCAACGATCAGTAGTTGGTCTGAGAGGACGGCCAACCACACTGGGACTG
AGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGG
GCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCG

DNA standard of *Nitrobacter* spp.

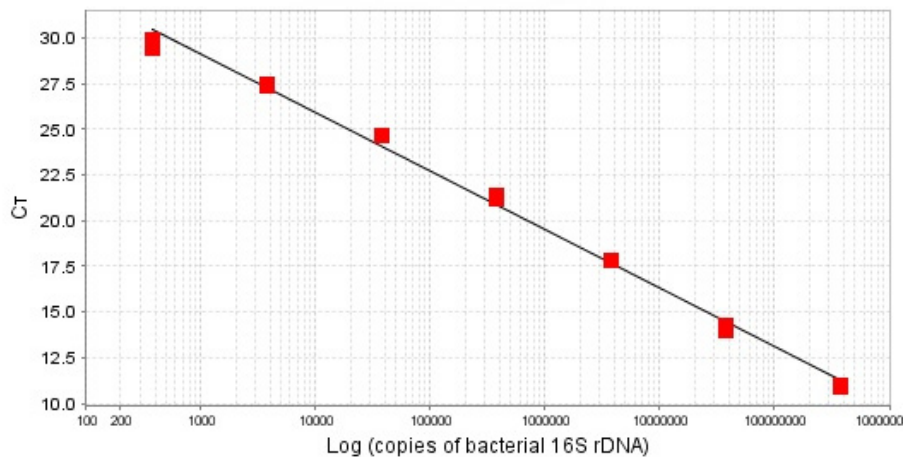
CTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAG
GGGTGACCCCTAGCAAATCTCAAAAAACCGTCTCAGTACGGATTGGGCTCTGCA
ACCGAGCCCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGT
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTT
ACCTGAAGGCGGTGCGCTAACCCGCAAGGGAGGCAGCCGACCACGGTAGGGTC

AGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGA
TCACCTCCTTTATCACCTCCTT

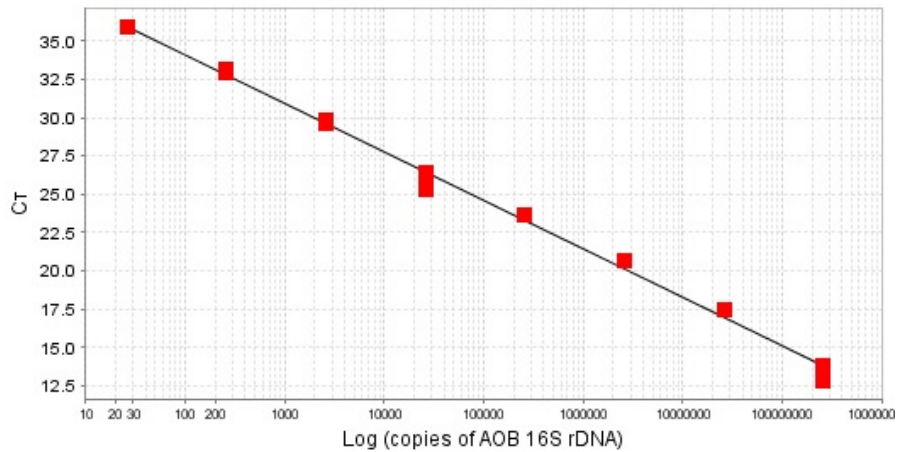
DNA standard of Archaeal 16S rDNA.

CGGAGATGGGTACTGAGACACGGACCCAGGCCCTATGGGGCGCAGCAGGCGAG
AAAACCTTTGCAATGTGCGAAAGCACGACAAGGTTAATCCGAGTGATTTGTGCTA
AACGAATCTTTTGTAGTTCTAGAAATACTAACGAATAAGGGGTGGGCAAGTTC
TGGTGTCAGCCGCCGCGGTAAAACCAGCACCTCAAGTGGTCAGGATGATTATTG
GGCCTAAAGCATCCGTAGCCGGCTCTGTAAGTTTTTCGGTTAAATCTGTACGCTTA
ACGTACAGGCTGCCGGGAATACTGCAGAGCTAGGGAGTGGGAGAGGTAGACGG
TACTCGGTAGGAAGGGGTAAAATCCTTTGATCTATTGATGACCACCTGTGGCGA
AGGCGGTCTACCAGAACACGTCCGACGGTGAGGGATGAAAGCTGGGGGAGCAA
ACCGATTAGATACCCGGGTAGTCCCAGCTGTAAACTATGCAAACCTCAGTGATG
CATTGACTT

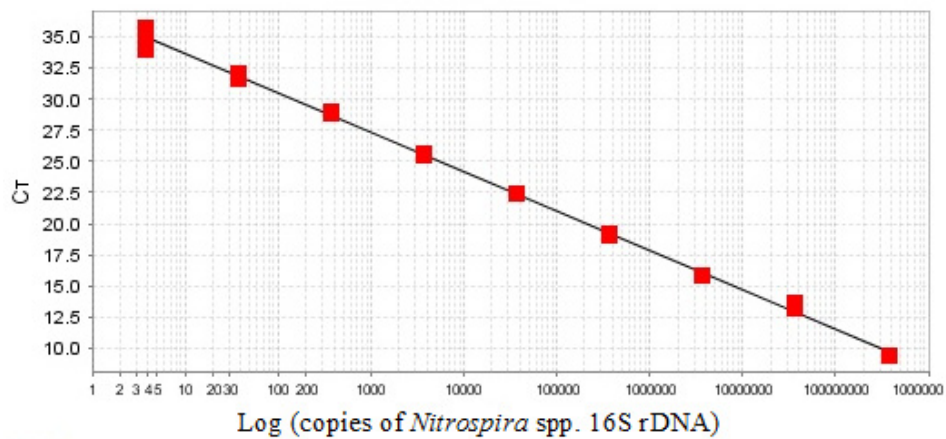
Standard curves of qPCRs



Standard curve of total bacterial cells



Standard curve of AOB



Standard curve of *Nitrospira* spp.

*Error bars were negligible in all studied standards.

