



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS DE CAMINOS,
CANALES Y PUERTOS



MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

Escuela Técnica Superior de Ingenieros de caminos, Canales y Puertos

EFECTO DEL TIEMPO DE RETENCIÓN HIDRÁULICO SOBRE LA DINÁMICA POBLACIONAL EN UN REACTOR ANAEROBIO DE MEMBRANAS PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Curso 2017/2018

Valencia, septiembre de 2018.

Autor: Pablo Romeu Luque

Tutor: Luis Borrás Falomir

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	5
TRATAMIENTO AGUAS RESIDUALES	5
TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS ANAEROBIOS.....	6
BIORREACTORES ANAEROBIOS DE MEMBRANAS	9
COMUNIDAD MICROBIOLOGÍA DE INTERÉS EN PROCESOS ANAEROBIOS	13
<i>Organismos Metanogénicos</i>	14
<i>Bacterias Sulfatoreductoras</i>	16
TÉCNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN COMUNIDADES MICROBIANAS	17
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	22
PLANTA PILOTO	22
<i>Descripción de la planta</i>	22
<i>Toma de muestras</i>	24
<i>Parámetros de funcionamiento durante el periodo de estudio</i>	25
MÉTODOS	28
<i>Viabilidad</i>	28
<i>FISH</i>	29
<i>Visualización en microscopio y cuantificación</i>	31
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
CARACTERIZACIÓN POBLACIÓN MICROBIANA.....	36
<i>Viabilidad</i>	36
<i>Cuantificación FISH</i>	39
RELACIÓN RESULTADOS CON PARÁMETROS OPERACIONALES	43
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXO I	64
ANEXO II	67
ANEXO III	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Fechas muestreo y preparación para análisis.	24
Tabla 2: Tiempo de retención celular (TRC), tiempo de retención hidráulico medio (TRH) del reactor en las muestras estudiadas. La M4 no cuenta con microbiología.....	25
Tabla 3: Condiciones de entrada al reactor; caudal de entrada, demanda química de oxígeno (DQO). Condiciones dentro del reactor; temperatura del agua en las muestras, sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), relación DQO por sulfuro presente en el agua para TRH medio de 20h.	25
Tabla 4: Condiciones dentro del reactor; sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV). Condiciones de salida; demanda química de oxígeno del caudal de salida, porcentaje de metano, volumen de metano y volumen de biogás para TRH medio de 20h.	26
Tabla 5: Condiciones de entrada al reactor; caudal de entrada, demanda química de oxígeno (DQO). Condiciones dentro del reactor; temperatura del agua en las muestras, sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), relación DQO por sulfuro presente en el agua para TRH medio de 10h.	26
Tabla 6: Condiciones dentro del reactor; sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV). Condiciones de salida; demanda química de oxígeno del caudal de salida, porcentaje de metano, volumen de metano y volumen de biogás para TRH medio de 10h.	26
Tabla 7: Condiciones de entrada al reactor; caudal de entrada, demanda química de oxígeno (DQO). Condiciones dentro del reactor; temperatura del agua en las muestras, sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), relación DQO por sulfuro presente en el agua para TRH medio de 8h.	27
Tabla 8: Condiciones dentro del reactor; sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV). Condiciones de salida; demanda química de oxígeno del caudal de salida, porcentaje de metano, volumen de metano y volumen de biogás para TRH medio de 8h.	27
Tabla 9: Sondas utilizadas para FISH con sus respectivas secuencias y el porcentaje de formamida necesario.	29
Tabla 10: Sondas y marcadores utilizados durante la hibridación en sus portaobjetos correspondientes.	30
Tabla 11: Media de resultados citómetro de flujo para TRC 70d y TRH medio 20h.	36
Tabla 12: Media de resultados citómetro de flujo para TRC 70d y TRH medio 10h.	36
Tabla 13: Resultados de las citometrías para 20h y 10h mostrando la proporción respecto el total.	38
Tabla 14: Resultados para la familia Desulfobacteraceas en FISH.	39
Tabla 15: Resultados para la familia Methanobacteriales en FISH.	40
Tabla 16: Resultados para la familia Methanomicrobiales en FISH.	41
Tabla 17: Valores de la DQO residual a la salida en relación con el TRH y los días de operación.	42
Tabla 18: Relación DQO/S-SO ₄ en mg DQO/mg S en los diferentes días de operación.....	47
Tabla 19: Solución de hibridación para los diferentes porcentajes de formamida.	70
Tabla 20: Sondas para los diferentes organismos y porcentaje de formamida.....	70
Tabla 21: Solución de lavado para los diferentes porcentajes de formamida.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema proceso convencional EDAR.	5
Figura 2: Conversión biológica en sistemas aerobios y anaerobios.....	6
Figura 3: Transformaciones digestión anaerobia (Grady Jr. et al., 2011).	7
Figura 4: Rangos de aplicación de las membranas.....	10
Figura 5: Vista general del diagrama del proceso A (SAnMBR) y B (AnMBR), Bomba (B).	11
Figura 6: Esquema de la planta piloto (Giménez et al., 2011).	23
Figura 7: Citómetro de flujo. Fuente: Cambridge Scientific Flow Cytometer.	28
Figura 8: Microscopio Leica DM 2500 laboratorio UV.	31
Figura 9: Binarización para cuantificación FISH en Matlab.	32
Figura 10: Resultados obtenidos del software de cuantificación en Matlab.....	32
Figura 11: Resultados obtenidos en la comparación de los diferentes tiempos de operación en media y grado de incertidumbre.....	37
Figura 12: Resultados obtenidos en la cuantificación mediante FISH de familia Desulfobacteraceas respecto al total de arqueas y bacterias con su incertidumbre.	39
Figura 13: Resultados obtenidos en la cuantificación mediante FISH de familia Methanobacteriales respecto al total de arqueas y bacterias con su incertidumbre.	40
Figura 14: Resultados obtenidos en la cuantificación mediante FISH de familia Methanomicrobiales con su incertidumbre.....	41
Figura 15: Población de los órdenes estudiados, desulfobacteracea, desulfobulbus, desulfovibrionales y desulfotomaculum en relación con el tiempo de retención hidráulico (TRH).	43
Figura 16: Población de los órdenes estudiados, methanosarcinales, methanobacteriales y methanomicrobiales en relación con el tiempo de retención hidráulico (TRH).	44
Figura 17: Población de los órdenes estudiados, desulfobacteracea, desulfobulbus, desulfovibrionales y desulfotomaculum en relación la temperatura (°C) del reactor.....	45
Figura 18: Población de los órdenes estudiados, methanosarcinales, methanobacteriales y methanomicrobiales en relación la temperatura (°C) del reactor.....	45
Figura 19: Población de los órdenes estudiados, desulfobacteracea, desulfobulbus, desulfovibrionales y desulfotomaculum en relación con los sólidos totales a la entrada del reactor (SST) y los sólidos volátiles (SSV).	46
Figura 20: Población de los órdenes estudiados, methanosarcinales, methanobacteriales y methanomicrobiales en relación con los sólidos totales a la entrada del reactor (SST) y los sólidos volátiles (SSV).	46
Figura 21: Producción de biogás y metano medidos en L/día y porcentaje de metano en el reactor.....	47

RESUMEN

Resumen

El tratamiento de las aguas residuales avanza hacia una gestión más sostenible, satisfaciendo las necesidades actuales sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras. En la actualidad el sistema de trabajo más utilizado es el modelo aerobio, cuyas desventajas son elevados costes de energía y una gran producción de fango. Una de las líneas de investigación con más potencial son los modelos anaerobios, que no sólo reducen los problemas antes mencionados, sino que además permiten la generación de biogás para la producción de energía.

El mayor inconveniente de estos procesos biológicos es que debe operarse en tiempos de retención hidráulico bajos y en tiempos de retención de sólidos suficientemente largos para permitir el crecimiento de microorganismos y que resulte económico. La introducción de los reactores de membrana permite solventar los problemas del lento crecimiento dando altas concentraciones de biomasa y además permite desacoplar el tiempo de retención hidráulico del de sólidos.

Para determinar la realidad de las ventajas del sistema de los reactores anaerobios de membrana, se plantea el siguiente trabajo donde se pretende estudiar el efecto del tiempo de retención hidráulico sobre la dinámica poblacional del reactor. Estudiando la presencia de las arqueas metanogénicas, dado que son los organismos de mayor interés por la producción de metano, y estudiando la población de bacterias sulfatoreductoras y cómo afecta la competencia entre ambas al proceso anaerobio y a la generación de metano. Utilizando diferentes técnicas para la identificación y cuantificación de la población se demostró la relación existente entre la población microbiológica y el metano producido.

Resum

El tractament d'aigües residuals avança cap a una gestió més sostenible, satisfent les necessitats actuals sense comprometre la capacitat de les generacions futures. En l'actualitat el sistema de treball més utilitzat és el model aerobi, els desavantatges són elevats costos d'energia i una gran producció de fang. Una de les línies d'investigació amb més potencial són els models anaerobis, que no solament redueixen els problemes abans esmentats, sinó també permeten la generació de biogàs per a la producció d'energia.

El major inconvenient d'aquests processos biològics és que s'ha d'operar en temps de retenció hidràulic baixos i en temps de retenció de sòlids prou llargs per a permetre el creixement de microorganismes i que resulte econòmic. La introducció dels reactors de membrana permet solucionar els problemes del lent creixement donant altes concentracions de biomassa i a més permet desacoblar el temps de retenció hidràulic del de sòlids.

Per a determinar la realitat dels avantatges del sistema dels reactors anaerobis de membrana, es planteja el següent treball on es pretén estudiar l'efecte del temps de retenció hidràulic sobre la dinàmica poblacional del reactor. Estudiant la presència dels arqueus metanògens, atès que són els organismes de major interès per a la producció de metà, i estudiant la població de bacteries sulfatredutores i com afecta la competència entre les dues al procés anaerobi i a la generació de metà. Utilitzant diferents tècniques per a la identificació i quantificació de la població es va demostrar la relació existent entre la població microbiològica i el metà produït.

Abstract

Wastewater treatment moves towards more sustainable management, meeting current needs without compromising the capacity of future generations. Currently the most used work system is the aerobic model, whose disadvantages are high energy costs and a large production of sludge. One of the research lines with the most potential is the anaerobic models, which not only reduce the aforementioned problems, also allow the generation of biogas for the production of energy.

The major drawback of these biological processes is that they must be operated in times of low hydraulic retention and times of retention of solids long enough to allow the growth of microorganisms and be economical. The introduction of the membrane reactors allows solving the problems of slow growth giving high concentrations of biomass and being enabled to uncouple the hydraulic retention time of the solids.

In order to determine the reality of the advantages of the system of anaerobic membrane reactors, the following work is proposed, where it is intended to study the effect of hydraulic retention time on the population dynamics of the reactor. Studying the presence of methanogenic archaea, given that they are the organisms of greatest interest for the production of methane, and studying the population of sulfate-reducing bacteria and how the competition between them affects the anaerobic process and the generation of methane. Using different techniques for the identification and quantification of the population, the relationship between the microbiological population and the methane produced was demonstrated.

INTRODUCCIÓN

El sistema capitalista en el que vivimos contamina para poder mantenerse. Acumulamos grandes cantidades de recursos, contaminamos suelos para producir más alimentos y contaminamos las aguas de las cuales nos abastecemos y dependemos vitalmente. (Hans, 1997).

No todos los seres humanos o industrias generan la misma cantidad de residuos. La cantidad y el tipo de residuos que se producen en los hogares se ve influenciada por el comportamiento, estilo y nivel de vida de los habitantes.

La producción de residuos generados por las actividades humanas es inevitable, y gran parte de estos residuos se encuentran en las aguas residuales.

Tratamiento aguas residuales

El tratamiento de las aguas residuales tiene como objetivo la eliminación, o la reducción de la contaminación presente en el agua, que posteriormente será vertida al medio. Las plantas de tratamiento no solo tienen que eliminar la materia orgánica y los nutrientes, sino que también deben eliminar bacterias y los virus presentes. (Visvanathan et al., 2000).

El sistema habitual de depuración de aguas en una planta de tratamiento consiste en una serie de etapas en las que, en base a procesos físicos, químicos y/o biológicos, se lleva a cabo la eliminación o separación de los contaminantes. (Jiménez, 2013). Funcionando en dos líneas de trabajo (tal y como vemos en la figura 1), la de aguas compuesta por un pretratamiento, un tratamiento primario, un tratamiento secundario y un postratamiento, y una línea de fangos.

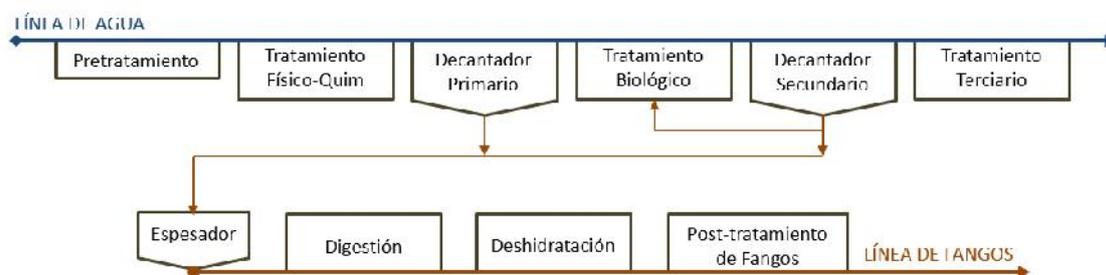


Figura 1: Esquema proceso convencional EDAR.

Es importante la mejora del tratamiento, así como el aprovechamiento de las ventajas de las recientes innovaciones, avanzando hacia la reducción del gasto energético y minimizando el impacto producido.

Uno de los problemas más comunes se encuentra en la gran generación de fango que tiene el propio proceso. Además, los fangos contienen demasiados metales pesados haciendo cada vez más difícil y costosa su eliminación, ya que los lodos ya no se pueden depositar en tierras agrícolas. (Rosenberger et al., 2002).

Siguiendo este horizonte, se ha caminado hacia el desarrollo de proyectos y su implementación en plantas de tratamiento con serios problemas conceptuales.

Tratamientos biológicos anaerobios

Un proceso biológico anaerobio es el que tiene lugar en un ambiente en el que no se encuentra presente oxígeno ni nitratos. En principio, todos los compuestos orgánicos pueden degradarse mediante un proceso anaerobio, que es más eficiente y económico cuando los residuos son fácilmente biodegradables.

Los tratamientos anaerobios, comúnmente aplicados a aguas residuales cargadas (digestión de lodos y tratamiento de aguas industriales), tienen los siguientes beneficios principales en comparación con los tratamientos aerobios: (Figura 2) (Ho & Sung, 2010).

-) Producción mínima de lodos debido al bajo rendimiento de biomasa de organismos anaerobios.
-) Menor demanda de energía ya que no se requiere aireación y producción de biogás que se puede usar para cumplir con los requisitos de energía del proceso.

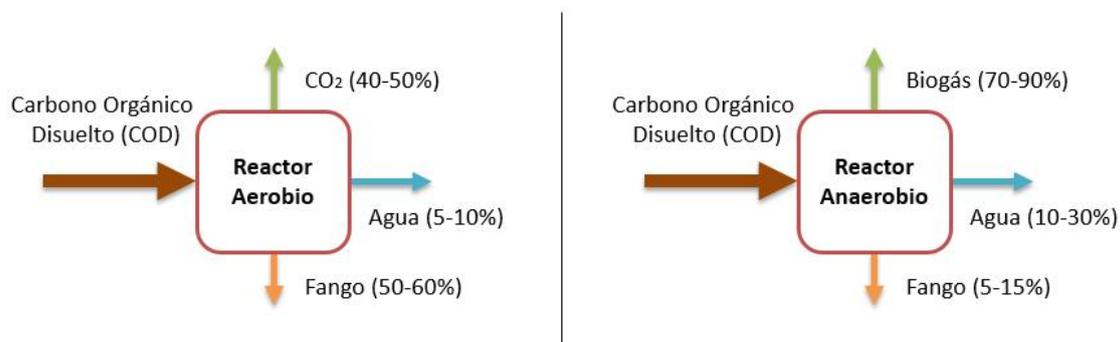


Figura 2: Conversión biológica en sistemas aerobios y anaerobios.

En la figura 2 podemos apreciar las ventajas de la digestión anaerobia en relación con el tratamiento aerobio, especialmente con respecto a la producción de biogás y la menor producción de fango.

Los procesos anaerobios también se consideran un enfoque sostenible para el tratamiento de aguas residuales con bajas concentraciones de sólidos suspendidos ya que implican un menor impacto ambiental que los procesos aerobios en muchos aspectos, como el equilibrio neto de emisiones de gases de efecto invernadero y la posibilidad de recuperación total de nutrientes del agua recirculada. (Giménez et al., 2011).

Este tipo de procesos tienen lugar en sistemas complejos y dinámicos en los que los aspectos mecánicos, microbiológicos y fisicoquímicos están estrechamente vinculados y los cuales se llevan a cabo por un amplio grupo de microorganismos, de los cuales los principales responsables de la generación de metano son bacterias estrictamente metanogénicas. Mediante dicho proceso la materia orgánica contenida en la mezcla de fangos primarios y secundarios es transformada biológicamente en metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2).

Los procesos que tienen lugar en la digestión anaerobia se muestran en la figura 3.

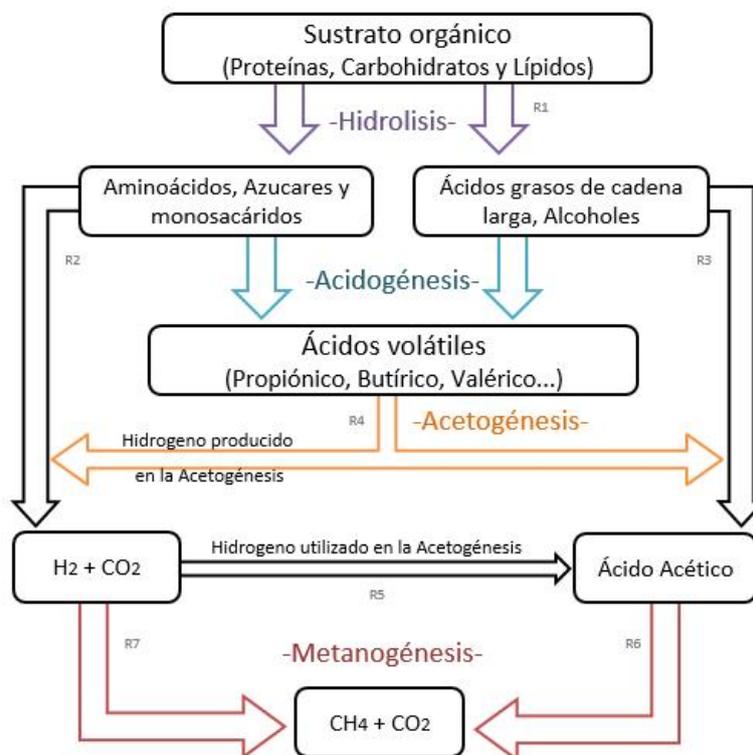


Figura 3: Transformaciones digestión anaerobia (Grady Jr. et al., 2011).

Los procesos anaerobios se dan en tres pasos sucesivos.

- Hidrólisis

La materia orgánica suspendida debe ser solubilizada antes de poder ser consumida por las bacterias. Además, las moléculas orgánicas solubles de gran tamaño y peso molecular deben ser transformadas en otras más simples para facilitar su transporte a través de la membrana celular. Estas transformaciones son reacciones hidrolíticas catalizadas por enzimas extracelulares sintetizadas por las bacterias y se han agrupado bajo el nombre de reacciones de hidrólisis (Reacción 1).

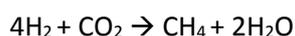
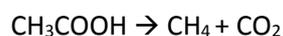
- Acidogénesis

Comprende los procesos de fermentación, a través de los cuales se degradan los aminoácidos y azúcares (Reacción 2), y los procesos de degradación anaerobia, a través de los cuales se degradan los ácidos grasos de cadena larga y los ácidos volátiles (Reacciones 3 y 4), así como el proceso de formación de ácido acético a partir de hidrogeno y dióxido de carbono (Reacción 5).

Los principales productos de las reacciones de fermentación de azúcares y aminoácidos son ácidos grasos de cadena corta (propiónico, butírico...) y los precursores directos de metano, como son el hidrogeno (H₂) y acético. La producción de hidrogeno es pequeña y se produce mediante reacciones de deshidrogenación.

- Metanogénesis

La etapa de metanogénesis comprende la formación de metano a partir de acético y a partir de hidrogeno. Habitualmente dos terceras partes del metano producido en el proceso proceden del ácido acético y el resto del hidrogeno (Reacciones 6 y 7).



El papel del hidrogeno es clave para el correcto funcionamiento del proceso. El crecimiento de las bacterias metanogénicas que consumen hidrogeno está obligatoriamente ligado al crecimiento de las bacterias productoras de hidrogeno puesto que son estas las que proporcionan el sustrato necesario para su crecimiento.

Es decir, la estabilidad del proceso depende del equilibrio entre las tasas de crecimiento simbióticas de los principales grupos de bacterias y arqueas, bacterias acidogénicas, acetogénicas y arqueas metanogénicas (Schink, 1997).

En reactores que contienen sulfato o sulfito, estos compuestos pueden ser utilizados por bacterias reductoras de sulfato (SRB) como aceptores de electrones liberados durante la oxidación de materiales orgánicos.

El metabolismo de las SRB es importante en el proceso anaeróbico, principalmente debido a su producto final, sulfuro de hidrógeno (de Lemos, 2017). Adicionalmente compiten con las metanogénicas por el acético y el hidrógeno disponible para realizar esta transformación, y como su consumo es más rápido, puede presentar un problema para el desarrollo de las metanogénicas.

Además, las condiciones de operación como son el tiempo de retención celular (TRC) e hidráulico, la temperatura y las fluctuaciones en la entrada de materia orgánica hacen que los reactores sean muy susceptibles, dando lugar a una inestabilidad en el proceso.

Biorreactores anaerobios de membranas

La aplicación de procesos de separación de membranas en el tratamiento de aguas residuales se ha venido aplicando cada vez más durante la última década. (Lesjean & Huisjes, 2008).

Un proceso de tratamiento biológico tiende a ser económico si puede operarse en tiempos de retención hidráulica bajos y en tiempos de retención de sólidos suficientemente largos para permitir el crecimiento de microorganismos.

Esto fue durante muchos años el mayor problema de la digestión anaeróbica, ya que el tiempo de retención de sólidos no podía controlarse independientemente del tiempo de detención hidráulica (TRH). Por lo tanto, los microorganismos involucrados en el proceso, que tienen bajas tasas de crecimiento, necesitan tiempos de retención de sólidos (TRS) extremadamente largos y, en consecuencia, reactores de grandes volúmenes. (de Lemos, 2017).

La tecnología de membrana aplicada al tratamiento de aguas residuales mediante los llamados biorreactores de membrana (MBR) es una alternativa prometedora para obtener altas concentraciones de biomasa y DQO al desacoplar el TRH y el TRS. La retención completa de los

microorganismos dentro del sistema MBR permite que se obtenga una alta TRS con volúmenes de trabajo reducidos. (Huang et al., 2011).

Además, entre los diferentes tipos de membranas, las de fibra hueca se han identificado como las membranas más adecuadas para lograr altos flujos de efluentes y alta calidad con bajas demandas de energía de filtración. (Lew et al., 2009).

Las membranas son barreras selectivas que limitan el transporte en una determinada dirección de sustancias y organismos presentes en el medio. El diámetro de poro de las membranas permite asociar el tamaño molecular con los diferentes procesos (figura 4), siendo: microfiltración (MF) de tamaño molecular de 0.001 a 0.01 (μm), ultrafiltración (UF) de tamaño molecular de 0.01 a 1 (μm) y osmosis inversa (OI) de tamaño molecular de 1 a 10 (μm).

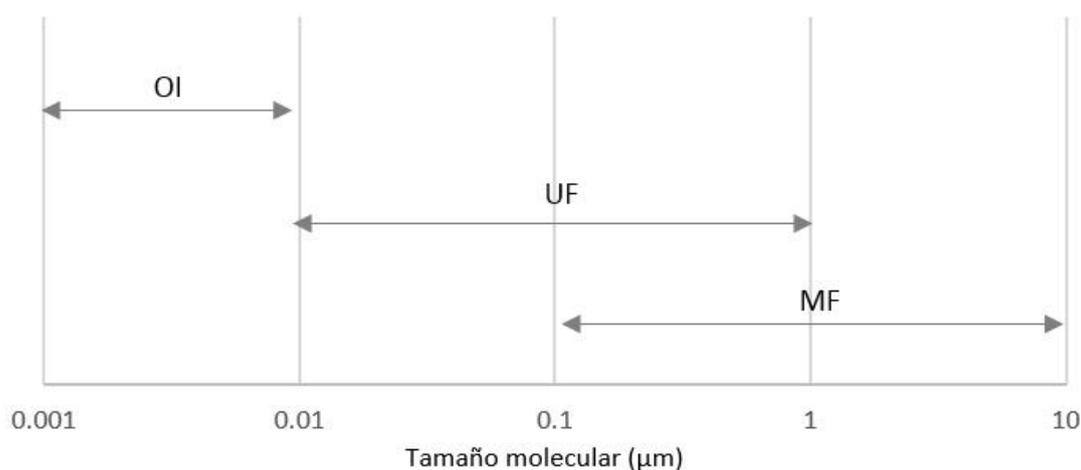


Figura 4: Rangos de aplicación de las membranas.

El proceso más común de un biorreactor de membrana consiste en un reactor de crecimiento y un dispositivo de filtración combinados. La membrana de filtración puede ser colocada para trabajar en paralelo o sumergida. (Y. Hu et al., 2018).

Trabajando de forma externa al reactor o en paralelo, se consiguen disminuir los problemas de ensuciamiento, de forma que el flujo influente entra directamente al reactor, donde es degradado. A continuación, es transporta hasta el dispositivo de filtración donde el permeado es el producto y el retenido vuelve al biorreactor a través de una bomba como fango

concentrado. La ventaja de este modelo es la facilidad de limpieza y mantenimiento, pero requiere de una bomba con un gasto energético adicional. (Figura 5, Esquema B).

En el caso de una membrana sumergida, el módulo de filtración se encuentra dentro del biorreactor, dando un sistema más compacto. Lo cual implica mayores problemas de ensuciamiento, siendo habitual colocar un sistema de inyección de gas para favorecer el desprendimiento de los sólidos que se depositan sobre la membrana. Como contrapartida, la limpieza supone el vaciado del reactor. (Figura 5, Esquema A).

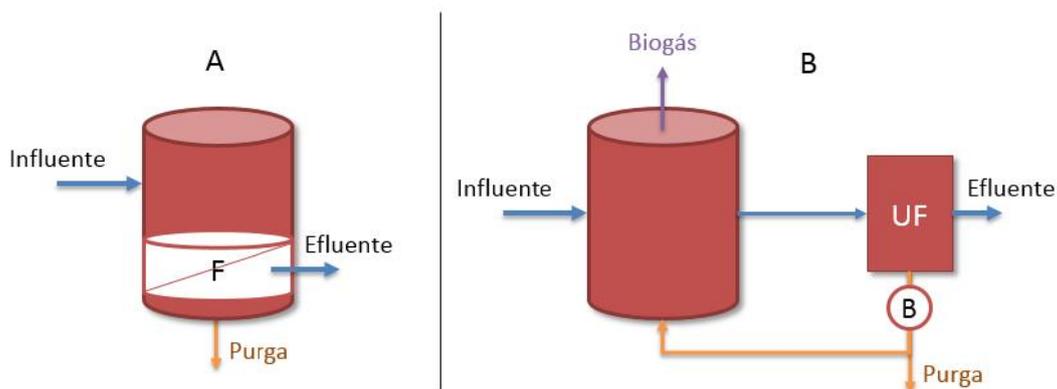


Figura 5: Vista general del diagrama del proceso A (SAnMBR) y B (AnMBR), Bomba (B).

La retención de biomasa activa en procesos anaerobios de alta carga depende de una serie de factores y mecanismos, que se comentan seguidamente. (Veiga, 2015).

Adhesión

La inmovilización de los microorganismos por adhesión es posible en superficies fijas (como ocurre en los filtros anaerobios), o en superficies que se mueven, como son los procesos de lecho expandido y lecho fluidizado.

Floculación

Las bacterias crecen formando flóculos, los cuales se pueden separar de la fase líquida por sedimentación permitiendo obtener un efluente con baja concentración de sólidos en suspensión.

Granulación

Los mecanismos que controlan la selección y formación de gránulos están relacionados con factores físicos, químicos y biológicos. Los gránulos normalmente tienen una forma definida y pueden tener varios milímetros de diámetro presentando buena sedimentabilidad y encontrándose densamente agrupados.

Intersticios

Este tipo de retención de biomasa ocurre en los intersticios de un soporte que sirve para el crecimiento de la biomasa adherida, mientras que los espacios vacíos del soporte son ocupados por los microorganismos que crecen dispersos.

Si se puede garantizar un contacto suficiente entre la biomasa y los compuestos orgánicos, se pueden aplicar altas cargas volumétricas al sistema.

A continuación, comentaremos otros problemas que se han presentado en estudios y aplicaciones de la tecnología de MBR anaerobia a los tratamientos de aguas residuales urbanas.

El primer problema, es la presencia de metano disuelto en el efluente. (Solomon et al., 2007). Se requerirá un proceso posterior al tratamiento para oxidar este metano antes de que sea emitido a la atmósfera. Varios estudios han demostrado que el metano es oxidado biológicamente por medio de las Bacterias Oxidantes de Metano (BOM), que son capaces de usar metano como fuente de carbono y energía. (Hanson & Hanson, 1996).

Estudios recientes han demostrado que el metano se puede oxidar mediante una asociación de metanótrofos y microalgas que crezcan juntas. Las algas proporcionaron el oxígeno necesario para el proceso de oxidación de metano y casi todo el carbono que se originó a partir del metano se asimiló en biomasa sin una liberación general de dióxido de carbono. (Van der Ha et al., 2011).

Otros estudios, han demostrado que el metano podría usarse como fuente de carbono para la desnitrificación si se contase con un sistema que permita su recirculación. (Modin et al., 2009).

Otra cuestión clave es la competencia entre las arqueas metanogénicas (Metanog) y las SRB por el sustrato disponible (Hulshoff Pol, 1998) cuando hay una concentración significativa de sulfato en el afluente. Para las aguas residuales urbanas, que pueden presentar fácilmente una baja relación COD / SO₄-S, esta competencia puede ser nefasta para la producción de biogás. Además, la presencia de SRB puede dar lugar a varios problemas adicionales que deben resolverse, como problemas de olor y corrosión, inhibición de metanogénicas y disminución de cantidad y calidad del biogás producido.

Con respecto al proceso de separación física, el ensuciamiento de la membrana es la principal cuestión clave de la tecnología MBR, ya que disminuye la permeabilidad de la membrana y aumenta los costos de operación y mantenimiento. (Chang et al., 2002).

La necesidad de trabajar a altos SRT para el tratamiento anaeróbico de aguas residuales podría conducir a altas concentraciones de sólidos totales en licor mezcla (MLTS) y, por tanto, a una baja permeabilidad de la membrana. Por lo tanto, se debe evaluar el efecto de los MLTS sobre el ensuciamiento de la membrana.

El ensuciamiento de la membrana se puede reducir mediante diferentes estrategias (Vallero et al., 2005) tales como: optimizar la frecuencia y la duración de las etapas de limpieza física (retrolavado y relajación); optimización de diferentes variables operativas (intensidad de burbujeo de gas); y membranas en condiciones de filtración subcrítica (limitadas por el flujo crítico).

El efecto de estas variables operativas sobre el ensuciamiento de la membrana no se evalúa adecuadamente a escala de laboratorio, ya que depende en gran medida del tamaño de la membrana. Entre los estudios dados de MBR anaeróbica para tratar aguas residuales urbanas, la mayoría de ellos se evaluaron en plantas a escala de laboratorio. (A. Y. Hu & Stuckey, 2006).

Comunidad microbiología de interés en procesos anaerobios

El ecosistema anaerobio es el resultado de complejas interacciones entre microorganismos de varias especies.

El presente trabajo se centra únicamente en el estudio del último paso de un proceso biológico anaerobio, la metanogénesis, estudiando la población de las arqueas metanogénicas que la llevan a cabo, y la población de Sulfatoredutoras que conviven con ellas.



A continuación, se describen los principales organismos estudiados, con sus características y sondas específicas utilizadas para su detección mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

Organismos Metanogénicos

Estos organismos forman parte del proceso final de los tratamientos anaerobios, por lo que son el paso final de la descomposición de la biomasa.

Estos organismos forman parte del proceso final de los tratamientos anaerobios, por lo que son el paso final de la descomposición de la biomasa.

) *Methanobacteriales* (Bonin & Boone, 2006).

Dentro del dominio *Archaea*, Filo AII: *Euryarchaeota*, se encuentran dentro de la Clase I *Methanobacteria*, en el Orden I de las *Methanobacteriales*. Los miembros pertenecientes a este grupo son anaerobios muy estrictos que habitan en diversos hábitats anóxicos.

Las *methanobacteriales* se distinguen de otros metanógenos por su rango limitado de sustratos catabólicos, su morfología y composición de lípidos. Las *methanobacteriales* son generalmente hidrogenotróficas, usando H₂ para reducir el CO₂ a CH₄. Algunos miembros de este orden pueden usar formiato, CO o alcoholes secundarios como dadores de electrones para la reducción de CO₂. Sin embargo, los miembros de un género dentro de este orden usan H₂ para reducir el metanol al metano.

Las células se suelen teñir en Gram negativo y generalmente tienen forma de barras formando cadenas o filamentos largos de hasta 40 µm de longitud.

) *Methanococcales* (Jones et al., 1983).

Dentro del dominio *Archaea*, Filo AII: *Euryarchaeota*, se encuentran dentro de la Clase II *Methanococci*, en el Orden I de las *Methanococcales*. Las *methanococcales*, como otras arqueas productoras de metano, son anaerobios estrictos que requieren técnicas especializadas para su cultivo.

El género *methanococcus* incluía individuos productores de metano que no formaban paquetes regulares (es decir, *Methanosarcina*) o cadenas. Teñidas de Gram negativo. Encontrados solo en ambientes marinos. Usando como sustrato H₂, encontrándose dentro de las metanogénicas hidrogenófilas.



) *Methanomicrobiales* (García et al., 2006).

Dentro del dominio *Archaea*, Filo AII: *Euryarchaeota*, se encuentran dentro de la Clase II *Methanococci*, en el Orden II de las *Methanomicrobiales*. Aunque su morfología es diversa, las *methanomicrobiales* pueden distinguirse de otros metanógenos por las propiedades de crecimiento, la composición de la pared celular y los lípidos y la secuencia de ADNr.

Todos las *methanomicrobiales* pueden usar $H_2 + CO_2$ como sustrato para la metanogénesis, siendo consideradas metanogénicas hidrogenófilas. La mayoría de las especies pueden utilizar formiato, y muchas especies utilizan alcoholes.

Los organismos *methanomicrobiales* habitan en diversos hábitats anaerobios que comprenden sedimentos marinos, de agua dulce y digestores anaerobios.

Estas células Gram negativas, pleomórficas, cortas y altamente irregulares en forma de lóbulo (alrededor de 1.5-2.0 μm de diámetro) generalmente se presentan aisladas y flageladas, pero solo son débilmente móviles o no móviles.

) *Methanosarcinales* (Kendall & Boone, 2006).

Dentro del dominio *Archaea*, filo AII: *Euryarchaeota*, se encuentran dentro de la Clase II *Methanococci*, en el Orden III de las *Methanosarcinales*. Los organismos *methanosarcinales* producen la degradación de la materia orgánica en ambientes anóxicos donde los aceptores de electrones son limitantes. Se encuentran en agua dulce, ambientes marinos y sedimentos extremadamente halófilos, así como en los digestores anaerobios y en el tracto gastrointestinal de los animales.

Estas células Gram positivas, pueden presentarse en forma de cocoide (alrededor de 1-2.0 μm de diámetro) o en forma de barras (de aproximadamente 5 μm) en función de su familia. Dentro de este orden, existen géneros que degradan el ácido acético (AGV) como son las *methanosaeta* y otros que degradan tanto AGV como H_2 como las *methanosarcinas*.

Bacterias Sulfatoreductoras

Las SRB forman un grupo de microorganismos filogenéticamente diverso y heterogéneo, que sin embargo comparten características fisiológicas y ecológicas comunes.

) *Desulfovibrionales* (Kuever et al., 2015).

Dentro del dominio *Bacteria*, Filo BXII: *Proteobacteria*, se encuentran dentro de la Clase IV *Delta-proteobacteria*, en el Orden II de las *Desulfovibrionales*. En concreto para el género *desulfovibrionales* se tienen en cuenta las siguientes propiedades taxonómicas: Ausencia de formación de esporas. Composición de ácido desoxirribonucleico (ADN).

) *Desulfobacteraceae* (Garrity, 2006).

Dentro del dominio *Bacteria*, Filo BXII: *Proteobacteria*, se encuentran dentro de la Clase IV *Delta-proteobacteria*, en el Orden III de las *Desulfobacterales* la Familia I de *Desulfobacteraceae*. Las *desulfobacteraceae* varían ampliamente en forma y tamaño en todos los géneros.

Teñidas de Gram negativo y no se sabe que produzcan esporas. Algunas especies contienen un único flagelo polar utilizado para la motilidad.

El género y la especie de *desulfobacteraceae* solo pueden distinguirse mediante el análisis de las secuencias de ADNr 16S, pero ciertos géneros pueden determinarse únicamente mediante características fisiológicas. *Desulfofrigus* muestra una tasa de crecimiento óptima a temperaturas muy bajas en comparación con otras bacterias reductoras de sulfato. Tampoco puede crecer en presencia de propionato.

) *Desulfobulbus* (Anandkumar et al., 2012).

Dentro del dominio *Bacteria*, Filo BXII: *Proteobacteria*, se encuentran dentro de la Clase IV *Delta-proteobacteria*, en el Orden III de las *Desulfobacterales* la Familia II de *Desulfobacterales*. El Género I *Desulfobulbus*, posee tres cepas Gram negativas. De forma similar, las tres cepas son Gram negativas, reductoras de azufre con la capacidad de crecer exclusivamente en lactato o piruvato sin fuentes externas de electrones o carbono. Una de sus cepas es su capaz de reducir el sulfito y el tiosulfato a sulfuro de hidrógeno (H₂S), reducir el nitrato a amoníaco, y, por último, su presencia de citocromo tipos b- y c -. Además, la cepa se diferencia de las demás en la forma, motilidad y la presencia de fimbrias.

) *Desulfotomaculum* (Anandkumar et al., 2009).

Dentro del dominio *Bacteria*, Filo BXIII *Firmicutes*, se encuentran dentro de la Clase I *Clostridia*, en el Orden I de las *Clostridiales* la Familia V de *Peptococcaceae*. El género XII *Desulfotomaculum*, es un género de bacterias Gram positivas, anaerobias, que viven en el suelo. Es un tipo de bacterias sulfato reductoras que usan el sulfuro de hidrogeno como aceptor de electrones. Son bacterias formadoras de endosporas.

Técnicas para la caracterización comunidades microbianas

La identificación y clasificación de la comunidad microbiana presente en las muestras, se realiza a través de técnicas genético-moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa, la microscopía de fluorescencia o una combinación de ambas.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica permite la detección directa de genes mediante la extracción y amplificación de una secuencia específica de ADN y su visualización por electroforesis.

Hibridación Fluorescente in-situ (FISH)

Basada en el principio de que una cadena sencilla de DNA reconocerá y se unirá a su secuencia complementaria en un cromosoma en metafase o dentro de una interfase nuclear, marcando los cromosomas buscados con sondas permitiendo su visualización.

Estas técnicas presentan ventajas e inconvenientes, su principal fuerza reside en que permiten identificar organismos con rapidez y alta sensibilidad a partir de cualquier muestra. Por contra, requieren de personal especializado y la disposición de un equipo muy caro.

Nuevas técnicas de Secuenciación Masiva (NGS)

Secuenciando las partes del DNA ribosomal (16S rDNA or ITS) de muestras, con NGS se puede generar grandes cantidades de datos que permitirán un rápido y profundo análisis de las comunidades microbianas monitorizando a tiempo real la síntesis del ADN.

Las ventajas de estas nuevas técnicas son la obtención de valores diagnósticos (sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos) en poco tiempo. Por el contrario, pueden suponer un aumento de los costos para el propio laboratorio, a corto plazo

por la inversión inicial, y la desaparición de técnicas tradicionales y competencias específicas del laboratorio de microbiología. (Romero, 2015).

En el presente trabajo se optó por el aislamiento e identificación mediante la técnica FISH debido a la sencillez y rapidez en la obtención de resultados, permitiendo la detección, identificación y recuento de especies de interés en el medio dispuesto.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Máster consiste en estudiar la dinámica poblacional de arqueas metanogénicas y bacterias sulfatoreductoras en un reactor anaerobio de membranas (AnMBR) y su relación con el tiempo de retención hidráulico.

Los objetivos específicos de este trabajo se detallan a continuación:

- ✓ Revisión bibliográfica de antecedentes y selección de sondas a utilizar.
- ✓ Identificar la población de arqueas metanogénicas y bacterias sulfatoreductoras en las muestras mediante la técnica FISH.
- ✓ Cuantificar la población de arqueas metanogénicas y bacterias sulfatoreductoras en las muestras.
- ✓ Evaluar la viabilidad de las muestras.
- ✓ Relacionar los cambios poblacionales con el parámetro de tiempo de retención hidráulico del reactor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Planta piloto

Las muestras estudiadas proceden de una planta piloto que se encuentra en la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) Cuenca del Carraixet, Alboraya. La planta consta de un biorreactor anaerobio de membrana sumergida (AnMBR) el cual tiene de afluente agua que procede del tratamiento primario de la propia EDAR (posterior al decantador primario).

Descripción de la planta

La planta piloto fue diseñada para tratar un caudal máximo de 1200 L h^{-1} , suponiendo un flujo neto de $20 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ en ambos tanques de membrana, lo que produciría a un TRH mínimo de 2 h.

Siguiendo el diagrama de flujo a continuación se exponen los diferentes elementos de los que se compone (figura 6):

- Rotofiltro (RF): Después del sistema de pretratamiento de la EDAR, hay instalado un pretratamiento de rotofiltro de 0,5 mm de pantalla para evitar la entrada de elementos que puedan dañar al sistema.
- Tanque de regulación (TR): El agua entra a un depósito de $0,3 \text{ m}^3$ donde, a través de un sistema de agitación, se homogeneiza el contenido y posteriormente entra al reactor.
- Reactor anaerobio (AnR): El agua es bombeada por la bomba (B-1) hasta un reactor anaerobio de $1,3 \text{ m}^3$ de volumen total (con $0,4 \text{ m}^3$ de su volumen de la cabeza para el almacenamiento de biogás). El tanque está encamisado y conectado a un sistema de calentamiento/enfriamiento de agua para controlar su temperatura. En el reactor existe una recirculación del biogás (C-2) y del fango (B-2) con sus purgas correspondientes.
- Tanques de membrana (MT1 y MT2): A través de las bombas (B-12 y B-22) el fango llega a dos tanques de membrana de $0,8 \text{ m}^3$ de volumen total cada uno (con $0,2 \text{ m}^3$ de volumen del espacio de cabeza).

Cada tanque de membrana incluye un módulo de membrana de ultrafiltración de fibra hueca industrial (PUR-PSH31¹) de tamaño de poro de $0,05 \mu\text{m}$.

¹ PURON® Koch Membrane Systems (PUR-PSH31).

Cada módulo consta de 9 haces de fibras huecas de 1,8 m de longitud de un total de 30 m² de superficie de membrana. Se produce una recirculación del biogás (B-11 y B-21) para mantener una agitación continua y minimizar la deposición de partículas en las membranas.

- Desgasificador (DV1 y DV2): Se trata de dos tanques, que son utilizados para la separación del biogás y la fase líquida que posteriormente es recirculada.
- Tanque de limpieza (CIP): Es el depósito de 0,2 m³ al que llega el permeado final, donde se almacena una parte para la limpieza de las membranas.

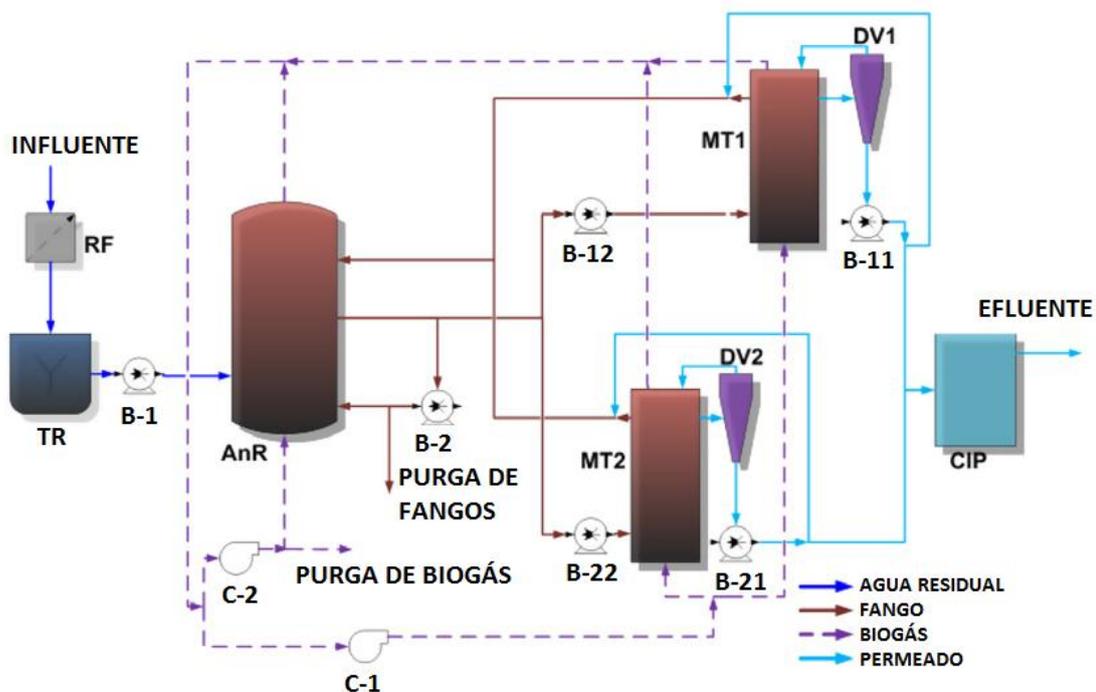


Figura 6: Esquema de la planta piloto (Giménez et al., 2011).

Al utilizar dos tanques de membrana en paralelo, la planta tiene una gran flexibilidad operativa, lo que permite que la planta piloto trabaje con un tanque de membrana o ambos tanques. Por lo tanto, se pueden probar diferentes flujos transmembrana sin afectar al TRH de la planta, además de facilitar las labores de limpieza y mantenimiento. Con el fin de controlar el TRC en el sistema, una fracción del lodo se extrae intermitentemente del reactor anaeróbico durante todo el día.

Toma de muestras

La toma de muestras fue llevada a cabo en tres etapas diferentes tras conseguir la estabilización del reactor anaerobio; se tomó una inicial en julio de 2017. Muestras sucesivas fueron tomadas durante el mes de octubre de 2017 y gradualmente se tomaron en diciembre de 2017.

Posteriormente a la toma, las muestras fueron alicuotadas en tubos de 1 mL a -20°C para su fijación tanto para Gram positivos como Gram negativos (ver anexo I) y posterior análisis mediante FISH. Por otra parte, una fracción de cada muestra sin fijar (en fresco) fue utilizada para examinar la viabilidad celular.

A continuación, se detallan los preparativos realizados a cada muestra para los diferentes análisis (tabla 1).

Tabla 1: Fechas muestreo y preparación para análisis.

Punto	Muestra	Fecha	Fijación	Citometría
1	M1	27/07/2017	X	-
	M2	13/10/2017	X	-
	M3	16/10/2017	X	-
	M4	17/10/2017	-	X
2	M5	01/12/2017	X	-
	M6	04/12/2017	X	-
	M7	05/12/2017	X	X
	M8	18/12/2017	X	-
	M9	20/12/2017	X	-

Parámetros de funcionamiento durante el periodo de estudio

Este trabajo se basa en el estudio de la dinámica poblacional en un reactor anaerobio de membrana trabajando a un TRC de 70 días, y la variación del TRH. El TRH es la unidad de tiempo que está un líquido, en este caso, dentro del reactor. En este caso, el volumen del reactor es fijo, por lo que la variación del TRH está ligada al caudal de entrada (Tabla 2).

Ligado al caudal medio de entrada, por tanto, está sujeto el parámetro de DQO_{ent}. Además, teniendo en cuenta la actividad microbiana, podemos encontrar los parámetros dentro del reactor de: SST, SST, SV, SSV, relación DQO/SO₄ (Tablas 3 a 8). Y a la salida del sistema: DQO_{res}², volumen de CH₄, volumen de biogás, porcentaje de CH₄ generados (Tablas 3 a 8).

Tabla 2: Tiempo de retención celular (TRC), tiempo de retención hidráulico medio (TRH) del reactor en las muestras estudiadas. La M4 no cuenta con microbiología.

Punto	TRC(d)	TRH(h) medio ³	Muestra	Fecha
1	70	20	M1	27/07/2017
			M2	13/10/2017
			M3	16/10/2017
			M4	17/10/2017
2	70	10	M5	01/12/2017
			M6	04/12/2017
			M7	05/12/2017
			M8	18/12/2017
			M9	20/12/2017

Tabla 3: Condiciones de entrada al reactor; caudal de entrada, demanda química de oxígeno (DQO). Condiciones dentro del reactor; temperatura del agua en las muestras, sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), relación DQO por sulfuro presente en el agua para TRH medio de 20h.

PARÁMETROS	Unidades	FECHAS (TRH medio 20h)			
		27/07/2017	13/10/2017	16/10/2017	17/10/2017
Q entrada	L/d	2422	2218	2145	2157
DQO entrada	mg/L	236	237	-	250
Temperatura	°C	29,1	24,1	24	24,1
SST	mg/L	117	84	80	99
SSV	mg/L	93	71	60	81
DQO/SO ₄	mg DQO/mg S	3,39	2,61	-	2,78

² El concepto de DQO residual hace referencia a la cantidad de materia orgánica que no es degradada a la salida del reactor.

³ Puesto que el caudal varía, los valores del TRH son la media de los días de operación de la planta.

Tabla 4: Condiciones dentro del reactor; sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV). Condiciones de salida; demanda química de oxígeno del caudal de salida, porcentaje de metano, volumen de metano y volumen de biogás para TRH medio de 20h.

PARÁMETROS	Unidades	FECHAS (TRH medio 20h)			
		27/07/2017	13/10/2017	16/10/2017	17/10/2017
ST	mg/L	2725	2712	2868	2893
SV	mg/L	1399	1407	1468	1585
DQOres salida	mg/L	58,41	66,12	-	59,71
%CH ₄	%	5,7	5,7	5,7	5,7
Volumen CH ₄	L/d	0	0	0	0
Volumen Biogás	L/d	0	0	0	0

Tabla 5: Condiciones de entrada al reactor; caudal de entrada, demanda química de oxígeno (DQO). Condiciones dentro del reactor; temperatura del agua en las muestras, sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), relación DQO por sulfuro presente en el agua para TRH medio de 10h.

PARÁMETROS	Unidades	FECHAS (TRH medio 10h)				
		1/12/2017	04/12/2017	05/12/2017	18/12/2017	20/12/2017
Q entrada	L/d	4390	3180	4114	4985	4678
DQO entrada	mg/L	259	-	280	-	283,5
Temperatura	°C	15,7	13	13,4	15,1	14,4
SST	mg/L	105	97	96	83	105
SSV	mg/L	90	65	67	64	82
DQO/SO ₄	mg DQO/mg S	3,07	-	2,73	-	2,35

Tabla 6: Condiciones dentro del reactor; sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV). Condiciones de salida; demanda química de oxígeno del caudal de salida, porcentaje de metano, volumen de metano y volumen de biogás para TRH medio de 10h.

PARÁMETROS	Unidades	FECHAS (TRH medio 10h)				
		1/12/2017	04/12/2017	05/12/2017	18/12/2017	20/12/2017
ST	mg/L	5066	4840	5014	5299	5404
SV	mg/L	3302	3233	3328	3668	3762
DQOres salida	mg/L	87,93	-	78,11	67,2	68,28
%CH ₄	%	2,41	2,41	2,41	2,41	2,41
Volumen CH ₄	L/d	0	0	0	0	0
Volumen Biogás	L/d	*4	*4	*4	*4	*4

*4 El volumen de biogás es muy próximo a cero, por lo que está por debajo del límite que puede medir el sensor del aparato.

Tabla 7: Condiciones de entrada al reactor; caudal de entrada, demanda química de oxígeno (DQO). Condiciones dentro del reactor; temperatura del agua en las muestras, sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), relación DQO por sulfuro presente en el agua para TRH medio de 8h.

PARÁMETROS	Unidades	FECHAS (TRH medio 8h)		
		16/01/2018	23/01/2018	13/02/2018
Q entrada	L/d	6086	5949	5705
DQO entrada	mg/L	255	260	212
Temperatura	°C	15,2	17,4	14,1
SST	mg/L	93	92	113
SSV	mg/L	74	69	76
DQO/SO ₄	mg DQO/mg S	2,28	2,45	2,33

Tabla 8: Condiciones dentro del reactor; sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV). Condiciones de salida; demanda química de oxígeno del caudal de salida, porcentaje de metano, volumen de metano y volumen de biogás para TRH medio de 8h.

PARÁMETROS	Unidades	FECHAS (TRH medio 8h)		
		16/01/2018	23/01/2018	13/02/2018
ST	mg/L	5576	5880	6384
SV	mg/L	3785	4106	4570
DQOres salida	mg/L	101,4	106,4	111,2
%CH ₄	%	0	0	0
Volumen CH ₄	L/d	0	0	0
Volumen Biogás	L/d	*4	*4	*4

Cabe mencionar que durante la toma de muestras se estableció que los dos primeros puntos de muestreo de 20h y 10h son de estado estacionario mientras que el tercero de 8h es transitorio por lo que no existe microbiología y sólo se tomaran los datos como referencias para sustentar las conclusiones.

Métodos

Para la identificación y cuantificación de la comunidad microbiana se utilizaron diferentes técnicas, como son la viabilidad mediante citometría de flujo (FCM) y el análisis mediante microscopía de fluorescencia *in situ* (FISH).

Viabilidad

Uno de los compuestos fluorescentes más comúnmente utilizadas para determinar la viabilidad celular relativa a la integridad de la membrana es el yoduro de propidio (PI). El PI es un colorante fluorescente rojo (con máximos de excitación/emisión de 493/636 nm, respectivamente) que normalmente no penetra las células con las membranas intactas. Si la membrana celular está comprometida, el PI generalmente cruza la membrana celular y luego se une a los ácidos nucleicos internos.

Se utilizaron los kits de viabilidad bacteriana *LIVE/DEAD BacLight* (ThermoFisher, cat. # L-7007)⁵ que usan el PI para teñir células comprometidas con membrana en combinación con SYBR Green (una tinción de ácido nucleico total verde fluorescente) para teñir todas las células en el citómetro de flujo (imagen 7).

Los kits para distinguir entre células vivas y muertas en comunidades microbianas se vuelven aún más útiles en combinación con técnicas cuantitativas, por lo que se procedió a utilizar la Citometría de Flujo (FCM) siguiendo el protocolo del anexo II. Posteriormente se realizó la identificación mediante FISH y finalmente se realizó el recuento de organismos.



Figura 7: Citómetro de flujo. Fuente: Cambridge Scientific Flow Cytometer.

⁵ Kit L7007 LIVE/DEAD® *BacLight*TM Bacterial Viability Kit *for microscopy* de *Molecular Probes*.

FISH

La hibridación *in situ* mediante sondas fluorescentes se realizó para la identificación de bacterias y arqueas. Además de la identificación se utilizó esta técnica para tomar imágenes digitales y proceder a la cuantificación de cada organismo hibridado.

Para realizar las hibridaciones se utilizaron las diferentes sondas y marcadores⁶ fluorescentes mostrados en la tabla 9:

Tabla 9: Sondas utilizadas para FISH con sus respectivas secuencias y el porcentaje de formamida necesario.

Objetivo	Sonda	Secuencia (5'-3')	%FA	Referencia
-	<i>EUBmix</i>	-	-	-
La mayoría de las bacterias	<i>EUB338</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0-50	(Amann et al., 1990)
<i>Planctomycetales</i>	<i>EUB338 II</i>	GCAGCCACCCGTAGGTGT	0-50	(Daims et al., 1999)
<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>EUB338 III</i>	GCTGCCACCCGTAGGTGT	0-50	(Daims et al., 1999)
<i>Archaea</i>	<i>ARCH915</i>	GTGCTCCCCGCAATTCCT	35 (20-55)	(Stahl & Amann, 1991)
<i>Methanosarcinales</i>	<i>MSMX860</i>	GGCTCGTTACGGCTTCCT	45	(Raskin et al., 1994)
<i>Methanomicrobiales</i>	<i>MG1200b</i>	CTGATAATTCGGGGCATGCTG	20	(Crocetti et al., 2006)
<i>Methanobacteriales</i>	<i>MB311</i>	ACCTTGCTCAGGTTCCATCTCC	30	(Crocetti et al., 2006)
<i>Methanococcales</i>	<i>MC1109</i>	GCAACATAGGGCACGGGTCT	45	(Raskin et al., 1994)
<i>Desulfobulbus</i>	<i>DBB660</i>	GAATTCCTTTCCCTCTG	60	(Devereux et al., 1992)
<i>Desulfotomaculum</i>	<i>Dtm230</i>	TAATGGGACGCGGACCCA	10	(Hristova et al., 2000)
<i>Desulfovibrionales</i>	<i>SRB385</i>	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	35	(Amann et al., 1990)
<i>Desulfobacteracea</i>	<i>SRB385Db</i>	CGGCGTTGCTGCGTCAGG	30	(Rabus et al., 1996)

⁶ Los marcadores fluorescentes utilizados fueron FAM (6-carboxi-fluoresceína), el cual emite luz verde ($\lambda=520$ nm) al excitarse con luz azul ($\lambda=490$ nm) y TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina), el cual emite luz roja ($\lambda=580$ nm) al excitarse con luz verde ($\lambda=546$ nm).

La disposición de las muestras y sondas en los portaobjetos para poder realizar las cuantificaciones fueron las mostradas en la tabla 10.

Tabla 10: Sondas y marcadores utilizados durante la hibridación en sus portaobjetos correspondientes.

Portas	Sonda FAM	Orden	Sonda TAMRA	Organismos
1	EUBmix ARC915	Bacte y Arqueas	SRB385db	Desulfobacteracea
2	EUBmix ARC915	Bacte y Arqueas	SRB385db	Desulfobacteracea
3	EUBmix ARC915	Bacte y Arqueas	MB311	Methanobacteriales
4	EUBmix ARC915	Bacte y Arqueas	MSMX860	Methanosarcinales
5	EUBmix ARC915	Bacte y Arqueas	MSMX860	Methanosarcinales
6	EUBmix ARC915	Bacte y Arqueas	DBB660	Desulfobulbus
7	EUBmix ARC915	Bacte y Arqueas	DBB660	Desulfobulbus
8	EUBmix ARC915	Bacte y Arqueas	SRB385	Desulfovibionales
9	EUBmix ARC915	Bacte y Arqueas	SRB385	Desulfovibionales
10	EUBmix ARC915	Bacte y Arqueas	DTM230	Desulfotomaculum
11	EUBmix ARC915	Bacte y Arqueas	DTM230	Desulfotomaculum
12	EUBmix ARC915	Bacte y Arqueas	MG1200b	Methanomicrobiales
13	EUBmix ARC915	Bacte y Arqueas	MG1200b	Methanomicrobiales
14	EUBmix ARC915	Bacte y Arqueas	MB311	Methanobacteriales
15	EUBmix ARC915	Bacte y Arqueas	MC1109	Methanococcales
16	EUBmix ARC915	Bacte y Arqueas	MC1109	Methanococcales

Una vez establecida la distribución de cada porta, la hibridación se llevó a cabo mediante el protocolo FISH incluida en el Anexo III.

Visualización en microscopio y cuantificación

Una vez finalizada la hibridación se procedió a la visualización de los resultados en un microscopio de epifluorescencia Leica DM 2500 (Figura 8) que emplea como fuente de luz una lámpara de mercurio. Antes de incidir sobre la muestra, la luz atraviesa un filtro que selecciona la longitud de onda incidente que excitará el fluorocromo presente en las muestras y la luz se refleja en un espejo dicromático que incide sobre la muestra. La imagen observada es el resultado de la excitación del fluorocromo que reemite una luz con mayor longitud de onda. La luz reemitida atraviesa el espejo dicromático y para dejar pasar únicamente la emisión deseada, se utiliza un segundo filtro supresor que selecciona la longitud de onda de emisión.



Figura 8: Microscopio Leica DM 2500 laboratorio UV.

Antes de colocar el portaobjetos en el microscopio, se añadió *Vectashield*, de *Vector Laboratories*, para evitar la pérdida de fluorescencia.

Para realizar la cuantificación, se tomaron imágenes a un aumento de $630\times^7$ en 20 campos para los canales rojo y verde para cada muestra.

El microscopio cuenta con una cámara digital acoplada con la que se capturaron imágenes para poder realizar una posterior cuantificación mediante la automatización en Matlab.

⁷ El objetivo es de $63\times$ y los oculares de $10\times$, por lo que los aumentos totales son $630\times$.

Obtenidas las imágenes, fue utilizado un script de Matlab (Borrás, 2008) mediante el cual se descompone la imagen en escala de grises, para posteriormente realizar una binarización (Figura 9) diferenciando los píxeles con señal de los que no tienen señal. Mediante dos parámetros es posible ajustar el brillo de la imagen y eliminar parte de la imagen de fondo que representa falsos positivos (background).

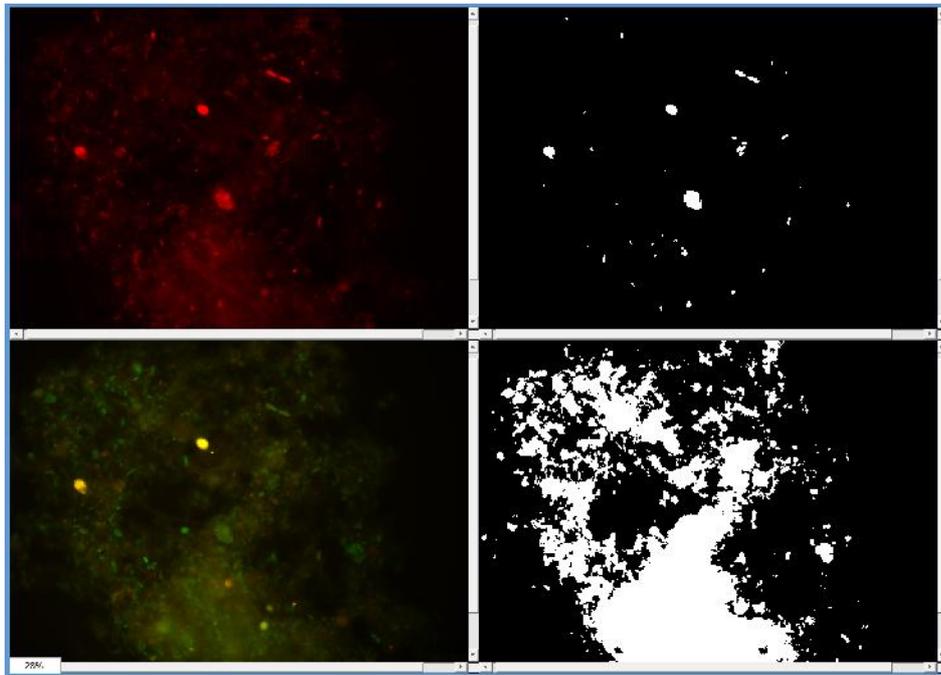


Figura 9: Binarización para cuantificación FISH en Matlab.

El programa realiza una cuantificación en tanto por cien de los píxeles con señal del canal de interés, respecto de los píxeles con señal del canal en el que se encuentra el total. También presenta el resultado de la desviación estándar y la incertidumbre y un gráfico de barras donde se representa el porcentaje de bacterias específicas en cada campo y una media acumulada (Figura 10).

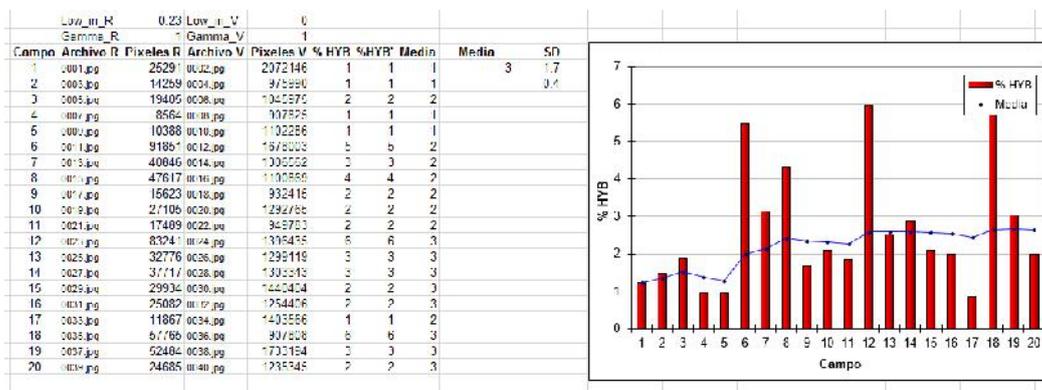


Figura 10: Resultados obtenidos del software de cuantificación en Matlab.

Análisis estadístico

Para estimar en función de los resultados del análisis la presencia de organismos y su incertidumbre empleamos:

) Media aritmética

Es el valor característico de una serie de datos cuantitativos adquiriéndose a partir de la suma de todos sus valores dividida entre el número de sumandos.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Donde:

\bar{X} = media aritmética

n = número de valores de la variable X

X_i = valores de la variable X

) Desviación estándar, s

Es una medida de dispersión para variables de razón que se define como la raíz cuadrada de la varianza de la variable.

$$\bar{\sigma} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Donde:

σ = desviación estándar

\bar{X} = media aritmética

N = número de valores de la variable X

X_i = valores de la variable X

) Coeficiente de variación

Hace referencia a la relación entre el tamaño de la media y la variabilidad de la variable, es decir la desviación con respecto a la media.

$$\overline{Cv} = \sigma \cdot |X|$$

Donde:

Cv = coeficiente de variación

σ = desviación estándar

|X| = media aritmética en valor absoluto

) Incertidumbre

Es el resultado de medir tal mensurando tras aplicar las correcciones debidas a efectos.

$$\bar{\delta} = \sqrt{\frac{\sigma}{n}}$$

Donde:

δ = incertidumbre

σ = desviación estándar

n = número de campos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización población microbiana

Los resultados presentados a continuación son los de los ensayos que se realizaron con el objetivo de conocer la población microbiana que existe en el reactor.

Tal y como se ha explicado anteriormente, los datos obtenidos son presentados en dos momentos diferentes de trabajo, para un tiempo de retención celular de 70 días, con tiempo de retención hidráulico de 20 horas y 10 horas. Por último, se aportó datos de unas condiciones de TRH de 8 horas, perteneciente a un estado transitorio utilizado para comprobar la validez de las conclusiones.

Viabilidad

A continuación, se muestran las medias de los resultados obtenidos de la citometría de flujo para la muestra del día 17 de octubre de 2017 a TRH medio de 20h y del 5 de diciembre de 2017 a TRH medio de 10h en las tablas 11 y 12 respectivamente, donde el resultado es la media de las dos replicas biológicas más las dos replicas en citómetro.

Tabla 11: Media de resultados citómetro de flujo para TRC 70d y TRH medio 20h.

	% Total Media	Incertidumbre
<i>Live</i> (%células)	17,4	0,2
<i>Dead</i> (%células)	82,3	0,2
<i>Otros</i>	11,0	0,2
<i>Células</i>	89,0	0,2

Tabla 12: Media de resultados citómetro de flujo para TRC 70d y TRH medio 10h.

	% Total Media	Incertidumbre
<i>Live</i> (%células)	19,9	0,2
<i>Dead</i> (%células)	78,6	0,2
<i>Otros</i>	36,4	0,2
<i>Células</i>	63,6	0,2

Células Vivas ₂	= 17,4 ± 0,2 %
Células Vivas ₁	= 19,9 ± 0,2 %
Células Muertas ₂	= 82,3 ± 0,2 %
Células Muertas ₁	= 78,6 ± 0,2 %

Cabe destacar el bajo porcentaje de células vivas que se obtiene, dando un resultado menor para un tiempo de retención hidráulico menor, tal y como podemos ver en la figura 11, donde se representan tanto los valores medios como los grados de incertidumbre que tienen los resultados.

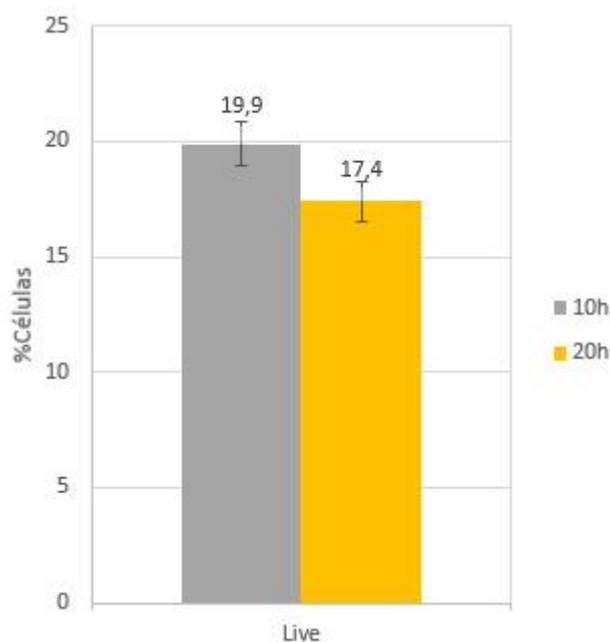


Figura 11: Resultados obtenidos en la comparación de los diferentes tiempos de operación en media y grado de incertidumbre.

La viabilidad de las células en condiciones anaerobias está relacionada con el tiempo de retención hidráulico, no podemos determinar a raíz de los resultados que las condiciones son aceptables para el desarrollo de la vida de forma concluyente, puesto que estadísticamente son muy similares y se requeriría de un tercer punto para reforzarla. Esto se ve reforzado por la presencia de autores que concluyen que las condiciones anaeróbicas favorecieron la hidrólisis y

la solubilización del material no bacteriano con un gran aumento en la DQO biodegradable soluble y NH_4 en el lodo tratado anaeróbicamente. (Foladori et al., 2015).

Tabla 13: Resultados de las citometrías para 20h y 10h mostrando la proporción respecto el total.

	20h	10h
All Events	100,0 %	100,0 %
Others	11,0 %	36,4 %
Cells	89,0 %	63,6 %
Xi	1,2 %	17,1 %
Live	15,5 %	12,7 %
Xs	73,2 %	50,0 %

Teniendo en cuenta los resultados de toda la citometría, cabe destacar que en ambos casos el porcentaje de células vivas está comprendido entre el 12 y 16%, lo que pone de manifiesto que mayor parte de los sólidos del reactor son sólidos no volátiles (“Others”, no son materia orgánica), sólidos volátiles no biodegradables (equivalentes a “Xi”) y sólidos volátiles biodegradables que aún no se han degradado (equivalente a parte de la “Xs”).

Cuantificación FISH

Los resultados obtenidos a través de la técnica FISH (en % Organismo frente al total de bacterias + arqueas) se muestran en las siguientes tablas y figuras.

) *Desulfobacteracea*

Tabla 14: Resultados para la familia *Desulfobacteraceas* en FISH.

<i>TRH_{medio}</i>	<i>Días de Operación</i>	<i>Media</i>	<i>Incertidumbre</i>
20h	1	4	0,5
	78	4	0,8
	81	4	0,5
10h	127	5	0,3
	130	3	0,3
	131	3	0,3
	144	4	0,3
	147	4	0,3

Tras realizar la hibridación y post procesado digital encontramos presencia de la familia de *Desulfobacteraceae* de las bacterias Sulfatoredutoras en ambos periodos de trabajo, por lo que en la figura 12, podemos apreciar que es más estable en el primer periodo y más inestable en el segundo.

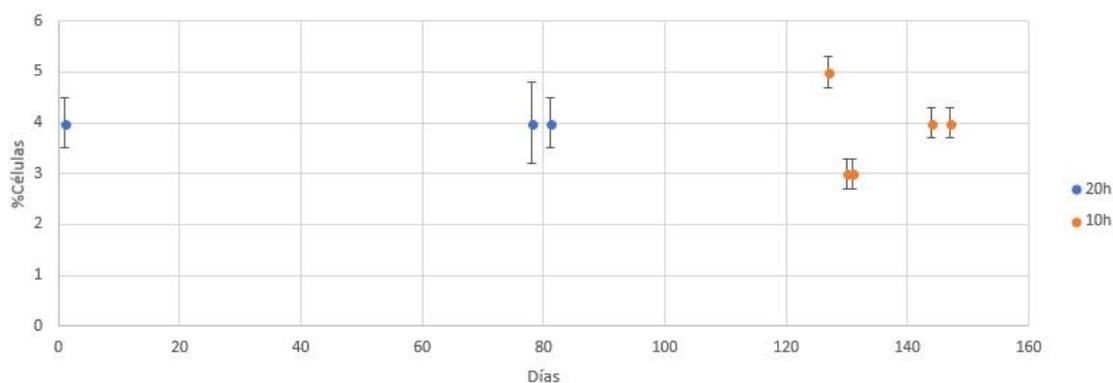


Figura 12: Resultados obtenidos en la cuantificación mediante FISH de familia *Desulfobacteraceas* respecto al total de arqueas y bacterias con su incertidumbre.

A continuación, se muestran los resultados del resto de hibridaciones para los organismos metanogénicos (Tablas 15 a 16):

) *Methanobacteriales*

Tabla 15: Resultados para la familia *Methanobacteriales* en FISH.

<i>TRH</i> _{medio}	Días de Operación	Media	Incertidumbre
20h	1	0	0
	78	0	0
	81	0	0
10h	127	0	0
	130	2	0,3
	131	2	0,2
	144	2	1,1
	147	2	0,2

Se puede observar cómo, una vez alcanzado el punto de estabilización, para un TRH de 10h, se aprecia la aparición de la familia de *Methanobacteriales*, que se ven beneficiadas por estas condiciones y se aprecia en su aparición (figura 13).

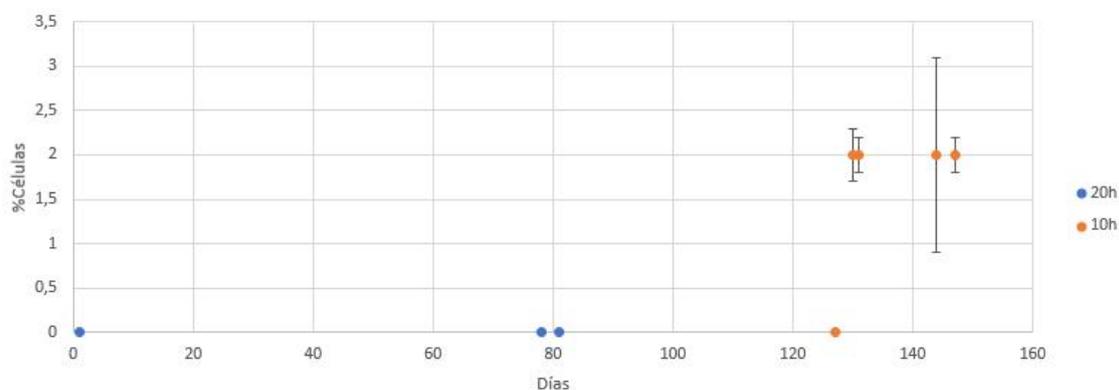


Figura 13: Resultados obtenidos en la cuantificación mediante FISH de familia *Methanobacteriales* respecto al total de arqueas y bacterias con su incertidumbre.

) *Methanomicrobiales*

Tabla 16: Resultados para la familia *Methanomicrobiales* en FISH.

TRH_{medio}	Días de Operación	Media	Incertidumbre
20h	1	1	0,1
	78	1	0,1
	81	1	0,1
10h	127	1	0,3
	130	1	0,1
	131	0	0,1
	144	0	0,1
	147	0	0,1

A través del microscopio se puede apreciar que existe la presencia de *Methanomicrobiales*, y coincide con ese pequeño porcentaje que es hibridado por la técnica, dándose en un valor muy pequeño, del 1%, podemos utilizar la incertidumbre como medida de dispersión (figura 14).

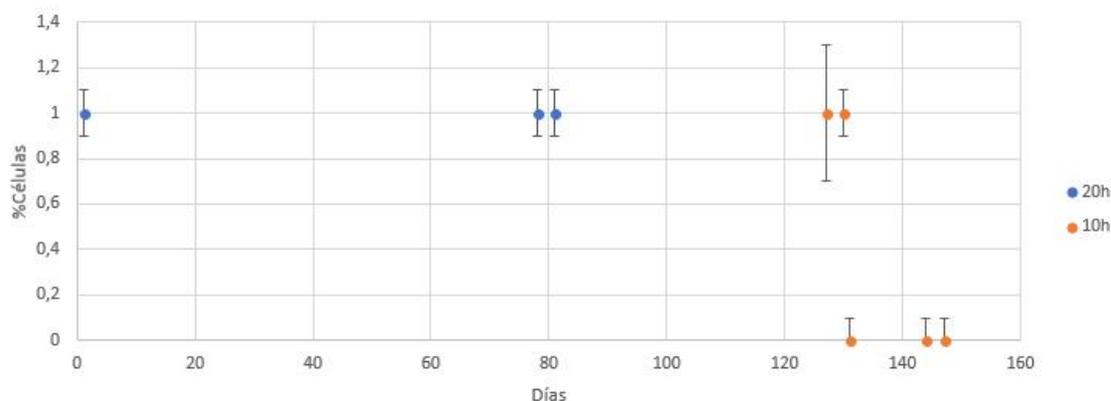


Figura 14: Resultados obtenidos en la cuantificación mediante FISH de familia *Methanomicrobiales* con su incertidumbre.

Cabe destacar que en cuanto a los órdenes de *Desulfobulbus*, *Desulfovibrionales*, *Desulfotomaculum*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* y *Methanococcales*, el porcentaje de hibridación de dichos órdenes respecto del total resultó ser menor que un 1% en la mayoría de las muestras, por lo que se ha realizado la cuantificación de estos órdenes mediante la técnica FISH, sabiendo que la baja sensibilidad del método daría lugar a una cuantificación imprecisa al tratarse de un porcentaje tan reducido y no se consideró exponer las tablas con los resultados.

A rasgos generales los resultados obtenidos mediante el método FISH presentan valores admisibles y razonables en cuanto a cantidad de arqueas en las muestras estudiadas, además de presentar una incertidumbre reducida por lo que podemos asumir la fiabilidad del método.

La presencia de ambas familias, sulfatoreductoras y metanogénicas se ve precedida por hipótesis que otros autores han demostrado, planteando la competencia entre estas por el sustrato disponible (Daims et al., 1999). Uno de los aspectos clave que determinan la competencia entre bacterias sulfatoreductoras y otros microorganismos del proceso de digestión anaerobia es la relación DQO/SO₄ (Choi y col., 1991). La variación de la familia de *Desulfobacteraceae* puede ser explicada por la reducción en el reactor de los sulfuros puesto que mayor sea su presencia, mayor es la actividad.

La aparición del orden de *methanobacteriales* se ve beneficiado por la desaparición de *methanomicrobiales*, que se ve perjudicada con el incremento de materia orgánica (y el acético que contiene) (Moñino, 2017) dado que al reducir el TRH se aumenta el caudal de entrada. En ese caudal, la DQO no es transformada totalmente en productos fácilmente asimilables (tanto por las SRB como por las AM). A continuación, se muestra la tabla 17 con los valores de la salida de la DQO residual donde se muestra la tendencia que se sigue.

Tabla 17: Valores de la DQO residual a la salida en relación con el TRH y los días de operación.

TRH medio	Días Operación	DQOres salida (mg/L)
20h	1	58,41
	78	66,12
	81	59,71
10h	127	87,93
	130	78,11
	144	67,20
	147	68,28
8h	174	101,4
	181	106,4
	202	111,2

Relación resultados con parámetros operacionales

Como se presentaba en los objetivos del trabajo, procederemos a comprobar si el cambio en la dinámica poblacional está ligado a cambios en los parámetros de operación o ambientales, como son el tiempo de retención hidráulico o la temperatura.

Cabe destacar que se realizó el estudio únicamente sobre dos puntos de funcionamiento estacionarios, de modo que las posibles relaciones que se destaquen entre los parámetros y la población de arqueas Metanogénicas y Sulfatoreductoras son meramente orientativas y para nada concluyentes. Posteriormente se añadieron los datos de un punto transitorio de un TRH menor (8h) del que no existe microbiología. Tal punto sólo será utilizado para corroborar las tendencias observadas en el análisis de los otros dos puntos, que si eran estacionarios.

A modo de resumen, se plantea las figuras 15 y 16, donde podemos ver como el TRH influye en la comunidad microbiana. Podemos observar, por tanto, que llegando a la estabilización y habiendo reducido el tiempo de retención hidráulico, aparecen ordenes de bacterias Sulfatoreductoras (*desulfobulbus*, *desulfovibrionales* y *desulfotomaculum*) y disminuye la presencia de organismos metanogénicos (*methanomicrobiales*). El orden de las *Methanococcales* no se detectó en ninguna de las muestras por lo que se abstuvo de representación.

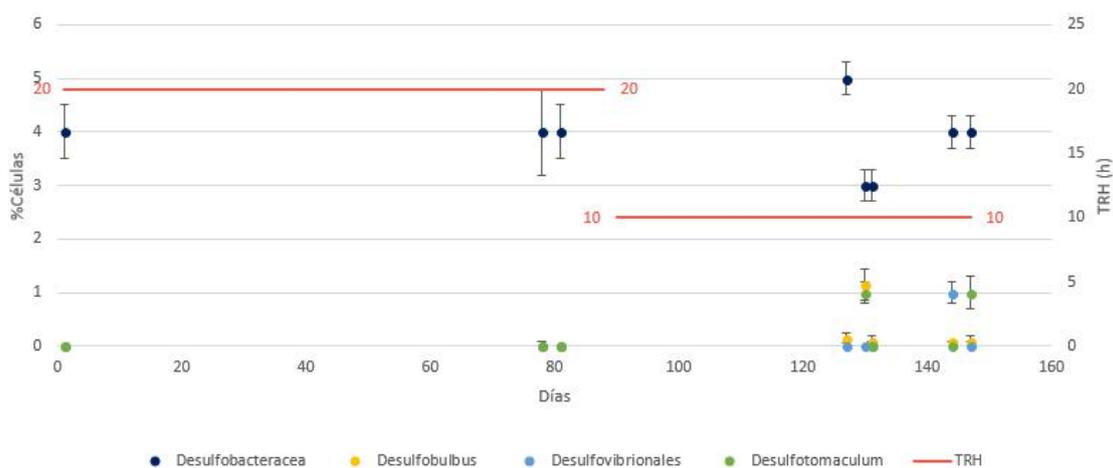


Figura 15: Población de los órdenes estudiados, *desulfobacteracea*, *desulfobulbus*, *desulfovibrionales* y *desulfotomaculum* en relación con el tiempo de retención hidráulico (TRH).

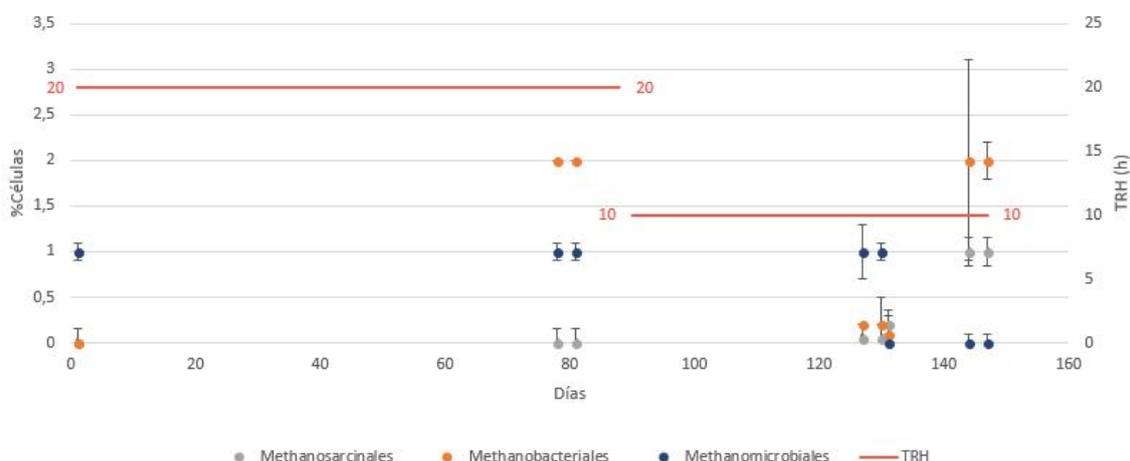


Figura 16: Población de los órdenes estudiados, methanosarcinales, methanobacteriales y methanomicrobiales en relación con el tiempo de retención hidráulico (TRH).

También se puede apreciar que la temperatura es un factor importante en el desarrollo de las bacterias y arqueas. En las figuras 17 y 18 podemos observar como a medida que disminuye la temperatura desaparecen también la presencia de organismos metanogénicos y hay un pequeño incremento de las bacterias sulfatoreductoras.

En la práctica se ha observado que el resultado de la competencia puede estar afectado por los factores ambientales como pH y temperatura (Patidar & Tare, 2005), además de que existen estudios que indican que las metanogénicas son más sensibles al incremento de la temperatura que las sulfatoreductoras (Rintala & Lettinga, 1992).

El proceso de reducción de sulfato puede ser llevado a cabo en condiciones psicrófilas (0-25°C) y mesófilas (23-35°C), no obstante, alterar la temperatura para alcanzar estas condiciones tiene un coste añadido, por lo que se ha optado por trabajar bajo condiciones próximas a la del agua a tratar (Bijmans, 2008).

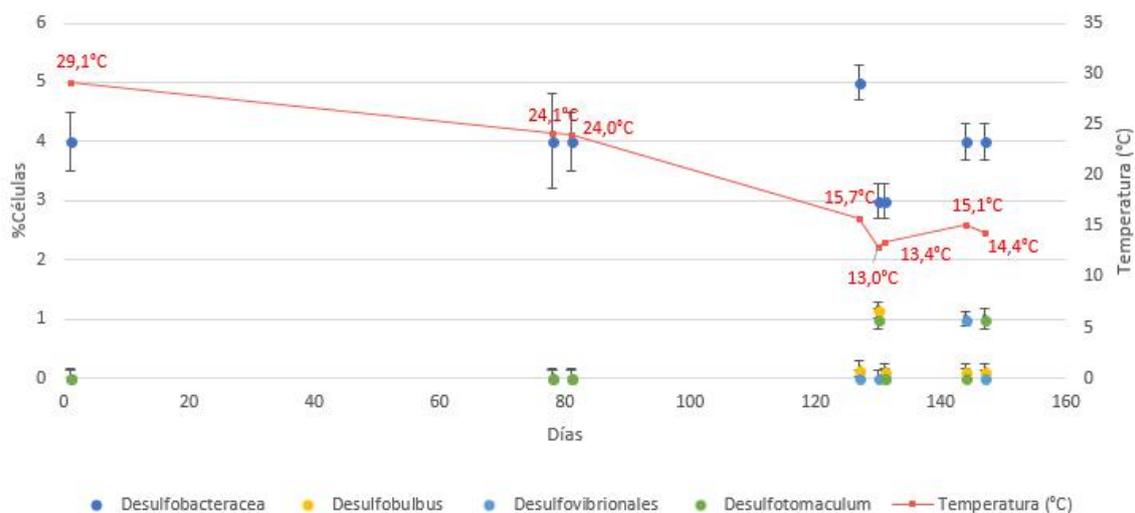


Figura 17: Población de los órdenes estudiados, desulfobacteracea, desulfobulbus, desulfovibrionales y desulfotomaculum en relación la temperatura (°C) del reactor.

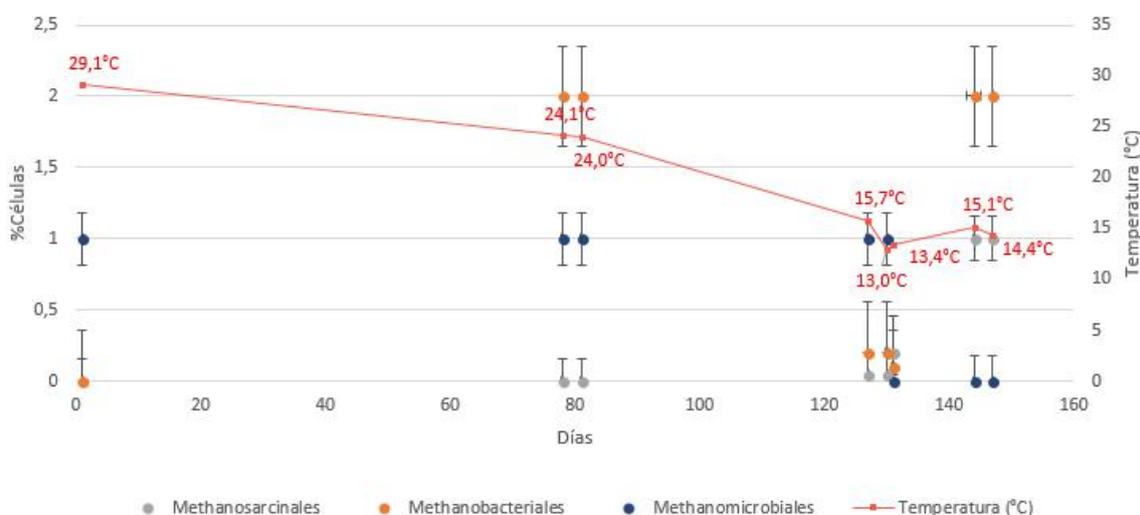


Figura 18: Población de los órdenes estudiados, methanosarcinales, methanobacteriales y methanomicrobiales en relación la temperatura (°C) del reactor.

En cuanto a los sólidos totales presentes en la entrada al reactor y los sólidos volátiles (Figura 19 y 20), se observa cómo no existe una relación directa entre la población y los sólidos, tanto para los totales como para los volátiles. Una relación esperable, sería una mayor entrada de materia orgánica, obtenemos una concentración mayor de células en el reactor (y por lo tanto más sólidos en su interior). Sin embargo, no se puede relacionar con los órdenes específicos estudiados. (Alibardi et al., 2016).

En cuanto a las tendencias, son muy similares en ambos, lo que indica que la fracción volátil se mantiene relativamente constante (Volátil = 76,85 %) durante el periodo de tiempo del estudio.

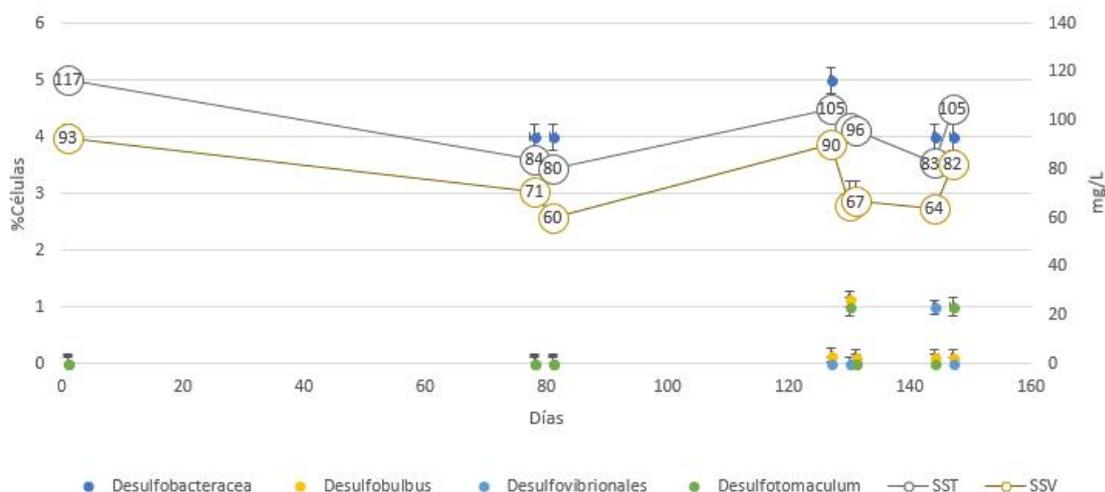


Figura 19: Población de los órdenes estudiados, desulfobacteracea, desulfobulbus, desulfovibrionales y desulfotomaculum en relación con los sólidos totales a la entrada del reactor (SST) y los sólidos volátiles (SSV).

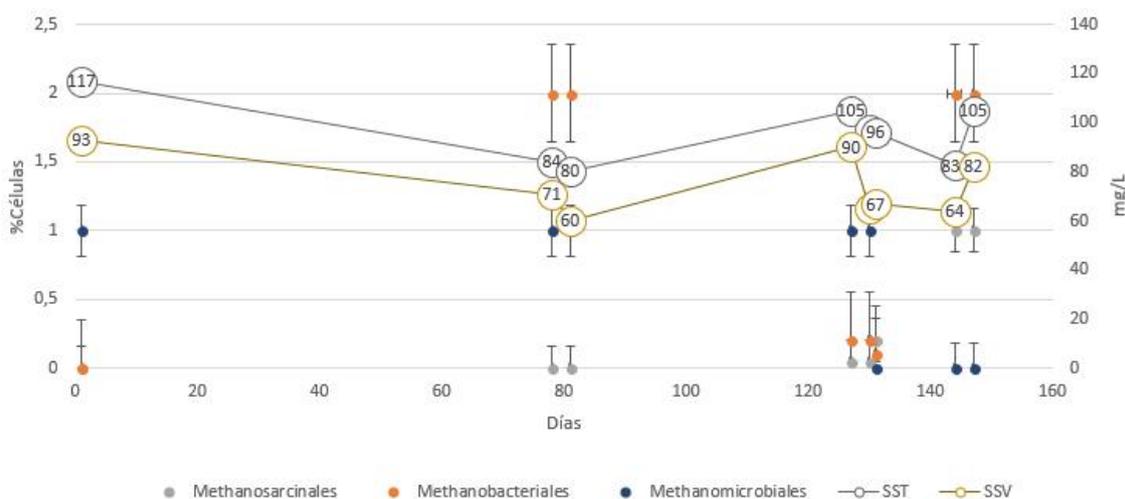


Figura 20: Población de los órdenes estudiados, methanosarcinales, methanobacteriales y methanomicrobiales en relación con los sólidos totales a la entrada del reactor (SST) y los sólidos volátiles (SSV).

La baja producción de metano no implica una actividad nula de las metanogénicas, puesto que están presentes en el reactor. Se determinó que el volumen de producción de metano y biogás estaba por debajo del límite de detección (por lo tanto, partimos de la hipótesis

que se produce, pero en cantidades prácticamente despreciables), y es razonable dado que la población de organismos metanogénicos compite con las bacterias sulfatoredutoras.

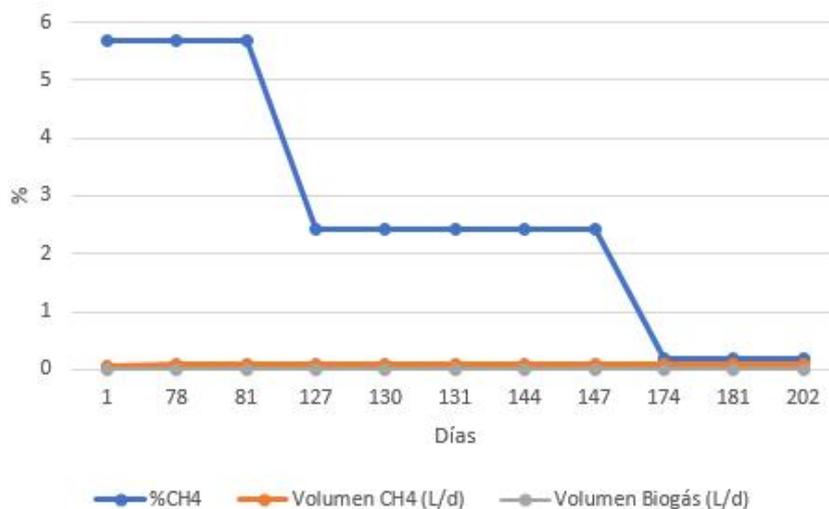


Figura 21: Producción de biogás y metano medidos en L/día y porcentaje de metano en el reactor.

A raíz de los resultados de la producción de biogás se puede concluir erróneamente, que la producción de biogás es despreciable, pero debemos tener en cuenta que esta tecnología (el AnMBR en estas condiciones de operación) es interesante solo para el tratamiento de agua con alto contenido en sulfatos. Estas condiciones son propicias para la reducción del contenido en sulfatos de la decantación primaria, de forma que se maximiza la cantidad de materia orgánica que es enviada posteriormente a una digestión posterior, donde se valorizará en forma de metano.

Tabla 18: Relación DQO/S-SO₄ en mg DQO/mg S en los diferentes días de operación.

TRH medio	Días Operación	DQO/SO ₄ (mg DQO/mg S)
20h	1	3,39
	78	2,61
	81	2,78
10h	127	3,07
	130	2,73
	144	-
	147	2,35
8h	174	2,28
	181	2,45
	202	2,33

A continuación, se muestran los valores de la relación DQO/S-SO₄ presentes a la entrada del reactor, según autores (Moñino, 2017) el aumento de la relación favorece a las AM. Teóricamente, un valor de 2 es necesario para reducir el sulfato de entrada, lo que implica que la DQO disponible para los organismos (acidogénicos, hidrolíticos, metanogénicos) será muy limitado. En el caso de que esta relación bajase del valor de 2, indicaría que no se reducirían todos los sulfatos.

Al evitar que entre la materia particulada en el reactor esta llegará directamente a un digestor anaerobio, pudiendo maximizar allí la producción de metano y disminuyendo el volumen necesario de tratamiento.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha estudiado la dinámica poblacional de un reactor anaerobio de membrana sumergida, con diferentes tiempos de retención hidráulico. Por lo que las conclusiones a las que se ha llegado con su realización son las que se muestran a continuación:

) El tiempo de retención hidráulico afecta a la dinámica poblacional de un reactor, reduciendo su valor (con el aumento del valor del caudal de entrada), se produce la aparición de órdenes de bacterias Sulfatoreductoras (*desulfobulbus*, *desulfovibrionales* y *desulfotomaculum*) y a su vez disminuye la presencia de organismos metanogénicos (*methanomicrobiales*).

El reactor AnMBR se usa (en este caso) para eliminar casi toda la DQO soluble y suspendida (proveniente del decantador primario) que entra a la planta, y lo hace por medio de las SRB, es decir, eliminación de DQO sin producción de metano.

) Para las condiciones de TRH de 20h y 10h, los organismos Metanogénicos no disponen de suficiente DQO, están presentes en muy baja medida, y en condiciones no suficientemente favorables para que se produzca su desarrollo, por lo tanto, el biogás producido es despreciable.

) Una vez analizada la viabilidad de las muestras se concluyó que el reactor estaba compuesto en gran medida por sólidos no volátiles (11% para TRH de 20h y 36% para TRH de 10h), sólidos no biodegradables (1,2% para TRH de 20h y 17,1% para TRH de 10h) y sólidos biodegradables (73,2% para TRH de 20h y 50% para TRH de 10h) que aún no se han degradado. Estadísticamente, no se puede determinar si el TRH incide directamente sobre el porcentaje de células viables, en los rangos de TRH estudiados en este trabajo.

) Al realizar la identificación de la población microbiana presente en reactor, se identificaron las familias de sulfatoreductoras y metanogénicas presentes y se llevó a cabo su cuantificación. Por parte de las sulfatoreductoras, se obtuvo la presencia mayoritaria de *Desulfobacteraceas* de un 4%. Por otro lado, se obtuvo la presencia de metanogénicas de *Methanobacterales* de un 1% (hidrogenotróficas, que aparecen con

la disminución del TRH) y de *Methanomicrobiales* de un 1% (hidrogenotróficas, que desaparecen con la disminución del TRH).

La presencia de ambas familias sulfatoreductoras y metanogénicas, plantea la competencia entre éstas por el sustrato disponible.

-) En cuanto a los sólidos volátiles, son muy similares durante el periodo de estudio, lo que indica que la fracción volátil se mantiene relativamente constante y no se puede establecer una relación con la dinámica poblacional.
-) Se ha observado, y contrastado con bibliografía, que la temperatura es un parámetro que influye en gran medida en el desarrollo de los organismos. Disminuyendo la temperatura desaparece la presencia de organismos metanogénicos (*Methanomicrobiales*) y hay un pequeño incremento de las bacterias sulfatoreductoras (*desulfobulbus* y *desulfotomaculum*). Esto es debido a que su metabolismo depende de forma muy sensible de la temperatura.
-) Se ha obtenido el valor mínimo del TRH de 8h, donde es viable operar cumpliendo los límites de vertido (en zona no sensible) en la DQO de salida.

El efluente obtenido con el AnMBR, cumple con los límites de DQO, pero es un efluente rico en nutrientes. Este efluente podría ser utilizado en la agricultura para fertirrigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahring, B. K., & Westermann, P. (1985). *Methanogenesis from acetate: Physiology of a thermophilic, acetate-utilizing methanogenic bacterium.*
- Alibardi, L., Bernava, N., Cossu, R., & Spagni, A. (2016). Anaerobic dynamic membrane bioreactor for wastewater treatment at ambient temperature. *Chemical Engineering Journal, 284*, 130-138.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., & Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology, 56*(6), 1919-1925.
- American Public Health Association. (2005). APHA (2005) standard methods for the examination of water and wastewater.
- Amman, G. D., McGregor, M. D., & Dolph, R. E. (1990). *Mountain pine beetle* US Department of Agriculture, Forest Service Washington, DC.
- Anandkumar, B., Choi, J., Venkatachari, G., & Maruthamuthu, S. (2009). Molecular characterization and corrosion behavior of thermophilic (55 C) SRB desulfotomaculum kuznetsovii isolated from cooling tower in petroleum refinery. *Materials and Corrosion, 60*(9), 730-737.
- Anandkumar, B., George, R. P., Maruthamuthu, S., Palaniswamy, N., & Dayal, R. K. (2012). Corrosion behavior of SRB desulfobulbus propionicus isolated from an indian petroleum refinery on mild steel. *Materials and Corrosion, 63*(4), 355-362.

Anderson, I., Ulrich, L. E., Lupa, B., Susanti, D., Porat, I., Hooper, S. D., . . . Goltsman, E. (2009).

Genomic characterization of methanomicrobiales reveals three classes of methanogens.

PloS One, 4(6), e5797.

Blotevogel, K., Gahl-JanBen, R., Jannsen, S., Fischer, U., Pilz, F., Auling, G., . . . Tindall, B. J.

(1991). Isolation and characterization of a novel mesophilic, fresh-water methanogen

from river sediment methanoculleus oldenburgensis sp. nov. *Archives of Microbiology*,

157(1), 54-59.

Bonin, A. S., & Boone, D. R. (2006). The order methanobacteriales. *The prokaryotes* (pp. 231-

243) Springer.

Borrás, L. (2008). Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de

microorganismos presentes en sistemas EBPR. *Valencia: Universidad Politécnica De*

Valencia.

Brockmann, M., & Seyfried, C. F. (1996). Sludge activity and cross-flow microfiltration-a non-

beneficial relationship. *Water Science and Technology*, 34(9), 205-213.

Bryant, M. P., & Boone, D. R. (1987). Isolation and characterization of methanobacterium

formicum MF. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(2),

171.

Cabrita, E., Martínez-Páramo, S., Gavaia, P. J., Riesco, M. F., Valcarce, D. G., Sarasquete, C., . . .

Robles, V. (2014). Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm

analysis. *Aquaculture*, 432, 389-401.

- Chang, I., Le Clech, P., Jefferson, B., & Judd, S. (2002). Membrane fouling in membrane bioreactors for wastewater treatment. *Journal of Environmental Engineering*, 128(11), 1018-1029.
- Corder, R. E., Hook, L. A., Larkin, J. M., & Frea, J. I. (1983). Isolation and characterization of two new methane-producing cocci: *Methanogenium olentangi*, sp. nov., and *methanococcus deltae*, sp. nov. *Archives of Microbiology*, 134(1), 28-32.
- Crocetti, G., Murto, M., & Björnsson, L. (2006). *An update and optimisation of oligonucleotide probes targeting methanogenic archaea for use in fluorescence in situ hybridisation (FISH)*
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K., & Wagner, M. (1999). *The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set.*
- de Lemos Chernicharo, Carlos Augustos. (2017). *Anaerobic reactors* IWA publishing.
- Devereux, R., Kane, M. D., Winfrey, J., & Stahl, D. A. (1992). *Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria.*
- Elberson, M. A., & Sowers, K. R. (1997). Isolation of an acetoclastic strain of *methanosarcina siciliae* from marine canyon sediments and emendation of the species description for *methanosarcina siciliae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 1258-1261.
- Ersahin, M. E., Ozgun, H., Tao, Y., & van Lier, J. B. (2014). Applicability of dynamic membrane technology in anaerobic membrane bioreactors. *Water Research*, 48, 420-429.

- Ersahin, M. E., Tao, Y., Ozgun, H., Gimenez, J. B., Spanjers, H., & van Lier, J. B. (2017). Impact of anaerobic dynamic membrane bioreactor configuration on treatment and filterability performance. *Journal of Membrane Science*, 526, 387-394.
- Esteves, S. (2014). Demonstrating management systems at full-scale anaerobic digestion plants.
- Ferrer Polo, J., & Seco Torrecillas, A. (2008). *Tratamientos biológicos de aguas residuales* México, MX: Alfaomega.
- Foladori, P., Velho, V. F., Costa, R. H. R., Bruni, L., Quaranta, A., & Andreottola, G. (2015). *Concerning the role of cell lysis-cryptic growth in anaerobic side-stream reactors: The single-cell analysis of viable, dead and lysed bacteria.*
- Fuchs, W., Binder, H., Mavrias, G., & Braun, R. (2003). *Anaerobic treatment of wastewater with high organic content using a stirred tank reactor coupled with a membrane filtration unit.*
- Garcia, J., Ollivier, B., & Whitman, W. B. (2006). The order methanomicrobiales. *The prokaryotes* (pp. 208-230) Springer.
- Garrity, A. (2006). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Gen*, 1, 28.
- Giménez, J. B., Robles, A., Carretero, L., Durán, F., Ruano, M. V., Gatti, M. N., . . . Seco, A. (2011). Experimental study of the anaerobic urban wastewater treatment in a submerged hollow-fibre membrane bioreactor at pilot scale. *Bioresource Technology*, 102(19), 8799-8806.

- Gouveia, J., Plaza, F., Garralon, G., Fdz-Polanco, F., & Peña, M. (2015). Long-term operation of a pilot scale anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) for the treatment of municipal wastewater under psychrophilic conditions. *Bioresource Technology*, 185, 225-233.
- Grady Jr, C. L., Daigger, G. T., Love, N. G., & Filipe, C. D. (2011). *Biological wastewater treatment* CRC press.
- Hans, J. (1997). Técnica, medicina, y ética: Sobre la práctica del principio de responsabilidad.
- Hanson, R. S., & Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews*, 60(2), 439-471.
- Ho, J., & Sung, S. (2010). *Methanogenic activities in anaerobic membrane bioreactors (AnMBR) treating synthetic municipal wastewater*.
- Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2006). Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1623-1630.
- Hristova, L. (2000). Tripartism in the central and eastern europe. *UPOZ, Skopje*,
- Hu, A. Y., & Stuckey, D. C. (2006). Treatment of dilute wastewaters using a novel submerged anaerobic membrane bioreactor. *Journal of Environmental Engineering*, 132(2), 190-198.
- Hu, Y., Wang, X. C., Ngo, H. H., Sun, Q., & Yang, Y. (2018). Anaerobic dynamic membrane bioreactor (AnDMBR) for wastewater treatment: A review. *Bioresource Technology*, 247, 1107-1118.

- Huang, Z., Ong, S. L., & Ng, H. Y. (2011). *Submerged anaerobic membrane bioreactor for low-strength wastewater treatment: Effect of HRT and SRT on treatment performance and membrane fouling.*
- Huang, Z., Ong, S. L., & Ng, H. Y. (2013). Performance of submerged anaerobic membrane bioreactor at different SRTs for domestic wastewater treatment. *Journal of Biotechnology*, 164(1), 82-90.
- Hulshoff Pol, L. W. (1998). Treatment of sulphate-rich wastewaters: Microbial and process technological aspects TMR summer school programme the biological sulfur cycle: Environmental science and technology. *April, Wageningen, the Netherlands*,
- Jiménez Benítez, A. L. (2013). Estudio en planta piloto de la aplicación de la tecnología de membranas para el tratamiento anaerobio de aguas residuales urbanas. Estudio de las condiciones críticas de filtración.
- Jones, W. J., Leigh, J. A., Mayer, F., Woese, C. R., & Wolfe, R. S. (1983). *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Archives of Microbiology*, 136(4), 254-261.
- Kendall, M. M., & Boone, D. R. (2006). The order methanosarcinales. *The prokaryotes* (pp. 244-256) Springer.
- Keswani, J., Orkand, S., Premachandran, U., Mandelco, L., Franklin, M. J., & Whitman, W. B. (1996). Phylogeny and taxonomy of mesophilic methanococcus spp. and comparison of rRNA, DNA hybridization, and phenotypic methods. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(3), 727-735.

- Kuever, J., Rainey, F. A., & Widdel, F. (2015). Order II. desulfovibrionales ord. nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2(Part C), 925-926.
- Lesjean, B., & Huisjes, E. H. (2008). *Survey of the european MBR market: Trends and perspectives*.
- Lew, B., Tarre, S., Beliavski, M., Dosoretz, C., & Green, M. (2009). Anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) for domestic wastewater treatment. *Desalination*, 243(1-3), 251-257.
- Liao, B., Kraemer, J. T., & Bagley, D. M. (2006). Anaerobic membrane bioreactors: Applications and research directions. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36(6), 489-530.
- Modin, O., Fukushi, K., Nakajima, F., & Yamamoto, K. (2009). Aerobic methane oxidation coupled to denitrification: Kinetics and effect of oxygen supply. *Journal of Environmental Engineering*, 136(2), 211-219.
- Moñino c, P. (2017). Estudio de viabilidad de la incorporación de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) al tratamiento de aguas residuales mediante la tecnología de bioreactor de membranas anaerobias (AnMBR).
- Ozgun, H., Dereli, R. K., Ersahin, M. E., Kinaci, C., Spanjers, H., & van Lier, J. B. (2013). A review of anaerobic membrane bioreactors for municipal wastewater treatment: Integration options, limitations and expectations. *Separation and Purification Technology*, 118, 89-104.
- Patidar, S. K., & Tare, V. (2005). *Effect of molybdate on methanogenic and sulfidogenic activity of biomass*.

- Rabus, R., Fukui, M., Wilkes, H., & Widdle, F. (1996). Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3605-3613.
- Raskin, L., Poulsen, L. K., Noguera, D. R., Rittmann, B. E., & Stahl, D. A. (1994). Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4), 1241-1248.
- Raskin, L., Zheng, D., Griffin, M. E., Stroot, P. G., & Misra, P. (1995). Characterization of microbial communities in anaerobic bioreactors using molecular probes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 68(4), 297-308.
- Romero, J. (2015). Aplicabilidad de las nuevas técnicas de diagnóstico microbiológico; innovación tecnológica. *Quimioterapia*, 28(1), 5-7.
- Rosenberger, S., Krüger, U., Witzig, R., Manz, W., Szewzyk, U., & Kraume, M. (2002). Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal waste water. *Water Research*, 36(2), 413-420.
- Ruiz-Martinez, A., Martin Garcia, N., Romero, I., Seco, A., & Ferrer, J. (2012). Microalgae cultivation in wastewater: Nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresource Technology*, 126, 247-253.
- Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2), 262-280.

- Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B., . . . Miller, H. L. (2007). Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change, 2007.
- Stahl, D. A. (1991). Development and application of nucleic acid probes. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, , 205-248.
- Torres, L., & Tiersch, T. R. (2016). Amine reactive dyes: An alternative to estimate membrane integrity in fish sperm cells. *Aquaculture*, 463, 71-78.
- Vallero, M. V., Lettinga, G., & Lens, P. N. (2005). High rate sulfate reduction in a submerged anaerobic membrane bioreactor (SAMBaR) at high salinity. *Journal of Membrane Science*, 253(1-2), 217-232.
- Van der Ha, D., Bundervoet, B., Verstraete, W., & Boon, N. (2011). A sustainable, carbon neutral methane oxidation by a partnership of methane oxidizing communities and microalgae. *Water Research*, 45(9), 2845-2854.
- Veiga Barbazán, Maria del Carmen. (2015). *Ficha técnica informativa para el tratamiento de efluentes en plantas de la industria textil.* ().
- Visvanathan, C., Aim, R. B., & Parameshwaran, K. (2000). Membrane separation bioreactors for wastewater treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 30(1), 1-48.
- Vyrides, I., Santos, H., Mingote, A., Ray, M. J., & Stuckey, D. C. (2010). Are compatible solutes compatible with biological treatment of saline wastewater? batch and continuous studies using submerged anaerobic membrane bioreactors (SAMBRs). *Environmental Science & Technology*, 44(19), 7437-7442.

Water Environment Federation. (2018). *Manual aids design of water resource recovery facilities.*

Anexo I

ANEXO I

Preparación de reactivos para la *hibridación*:

▪ **NaCl 5M**

1. Pesar 292.2 g de NaCl y disolver en 800 mL de agua destilada.
2. Enrasar hasta un volumen final 1000 mL con agua destilada.
3. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
4. Filtrar con 0.45 µm un volumen de 50 mL y guardar a temperatura ambiente en tubos Falcon.

▪ **Tris-HCl 1M pH 8.0**

1. Pesar 121.1 g de TRIS base [tris-aminometano] y disolver en 800 mL de agua destilada.
2. Añadir 42 mL de HCl concentrado.
3. Enrasar hasta un volumen final de 1000 mL.
4. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
5. Filtrar con 0.45 µm un volumen de 50 mL y guardar a temperatura ambiente en tubos Falcon.

▪ **Agua Mili-Q**

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y filtrar antes de su uso.

▪ **SDS 10%**

1. Pesar 10 g de SDS y disolver en 100 ml de agua destilada.
2. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos

Preparación de reactivos para la *fijación* de las muestras:

▪ **Paraformaldehido (PFA)**

1. Calentar 65 ml de agua bidestilada hasta 60°C.
2. Añadir 4 g de PFA al agua y agitar.
3. Añadir 1 gota de solución de NaOH 2M y agitar rápidamente hasta que la solución se haya clarificado.
4. Quitar de la fuente de calor y añadir 33 ml de PBS 3X.
5. Ajustar el pH a 7.2 con HCl.
6. Eliminar cualquier resto de cristales por filtración a través de 0.20-0.45 µm.
7. Enfriar rápidamente a 4°C y conservar a esa temperatura.
8. Alicuotar 800 µL en tubos de 1.5 mL y conservar a -20°C.

▪ **Tampón fosfato salino (PBS 3X)**

1. Para 1L: disolver en primer lugar los fosfatos y después el cloruro sódico:

) 22.8 g de NaCl.

) 3 g de NaH₂PO₄.

) 2.88 g de Na₂HPO₄.

2. Enrasar hasta 1000 ml con agua destilada y ajustar a pH 7.4.
3. Esterilizar por filtración con diámetro 0.20-0.45 µm.
4. Conservar a 4°C alicuotado en tubos Falcon de 50 mL.

▪ **Soluciones de Etanol al 50, 80 y 100%**

Preparar con Etanol Absoluto grado PRS en un volumen final de 40-50 mL, conservado en tubos Falcon.

100%: para la fijación.

50,80 y 100%: para el secado de la muestra fijada.

Preparación de reactivos para la *preparación de los portas*:

▪ **Portas con gelatina 0.1%+sulfato potásico 0.01%**

La gelatina favorece la adhesión de las muestras sobre los pocillos de los portas.

1. Pesar 0,100 g de gelatina y 0,010 g de sal de cromato hidratada.
2. Calentar 100 mL de agua destilada a 60°C.
3. Disolver la mezcla de gelatina y sal de cromato.
4. Una vez disuelta, dejar enfriar a 50°C.
5. Sumergir durante 2-3 segundos cada porta y dejar secar en posición vertical *overnight*.

▪ **Solución de limpieza de portaobjetos FISH**

Preparar Etanol con 10% KOH.

▪ **Solución de PBS 3X**

NaCl	22.8 g
NaH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄	2.88 g
Agua destilada	1L
pH	7.5

1. Disolver los fosfatos y el cloruro sódico por separado.
2. Autoclavar a 115°C durante 20 minutos.

Anexo II

ANEXO II

El protocolo para determinar la Viabilidad vía Citometría de Flujo (FCM) para la detección de microorganismos en fangos activos, es el siguiente:

A. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE FANGO

1. Diluir 10 mL de fango con PBS 1X hasta 40 mL y transferir a un vaso de 250 mL.
2. Desagregar la muestra con Turrax (IKA) y los siguientes parámetros: posición de velocidad 1, 40 s; durante al menos un ciclo.
3. Control de células muertas: calentar 10 mL de la muestra de fango diluida durante 30-60' a 100 °C. *(Conservar 30 mL de la muestra no tratada térmicamente a 4°C hasta el siguiente paso.)*
4. **Fijación de FISH** a partir de la muestra diluida en PBS 1X no tratada térmicamente.

B. CITÓMETRO

5. Siguiendo la tabla, prepara las cinco muestras (por duplicado, cuando sea necesario).
 - 5a. SYBR-Green debe ser añadido al principio, con 60' de incubación.
 - 5b. Pasados los 60' añadir el IP y dejar incubar 5'.

	1	2	3	4	5
Volumen de muestra (tipo)	500µL (L)				500µL (D)
Pretratamiento térmico	-	-	-	-	100°C 1h
SYBR-Green/Syto9 (60' incubación)	-	25µL	-	25µL	-
IP (5' incubación)	-	-	10µL	10µL	10µL

D: dead sample; L: live sample

REAGENTS SYBR-Green: 25x concentrado (1 mg/mL stock)

SYTO9: 1 mg/mL

6. Transferir y filtrar por completo el volumen de la muestra teñida a los tubos de 5 mL del citómetro. Los filtros de tapa tienen un tamaño de 30 µm. Usa la micropipeta y añade volúmenes pequeños hasta que la muestra se haya filtrado por completo.

7. Lleva a cabo la medida de la viabilidad de las muestras de fango con el citómetro.

MEDIDAS

P1. La muestra 1 permite localizar al citómetro el área de medida, dependiendo del tamaño del evento (*FSC-A*) y su complejidad (*SSC-A*).

FSC “Forward Scatter”, mide la luz frontal que deja de transmitirse.

SSC “Side Scatter”, mide la luz lateral y depende de la granularidad y la relatividad interna de la partícula y también, del número de orgánulos de cada célula.

P2. Selecciona todos los eventos que se consideran células, teniendo en cuenta su complejidad y si dan señal detectable por un filtro FIT (“*Isotiocianato de Fluoresceína*”). Mediante la muestra 2 se hace una primera comprobación, dado que el reactivo *SYBRgreen* o *SYTO* es un agente intercalante (cualquier evento con un determinado contenido en DNA dará una señal positiva detectable por FIT). De esta forma se determina además en qué área aparecerán los eventos que se considerarán células viables al introducir la muestra 4.

La muestra 3 permite delimitar el área donde aparecerán las células no viables, mediante la señal que emite el IP “*yoduro de propidio*” (que atraviesa las membranas de las células dañadas, tiñendo su interior) y que es a su vez detectable por un filtro PerCP-Cy5 (peridinina-R-ficoeritrina cianina 5).

La muestra 5 funciona como un control para el IP, ya que corresponde a las células pretratadas térmicamente.

P3. Área correspondiente a las células viables presentes en la muestra.

Anexo III

ANEXO III

El protocolo Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) para la detección de microorganismos en fangos activos, es el siguiente:

A. FIJACIÓN

1. Centrifugar 1 mL de cultivo líquido a 5000 g durante 3 minutos.
- 2a. Para organismos Gram negativos:
 - Eliminar 750 μ L de sobrenadante.
 - Añadir 750 μ L de PFA 4 % y mantener a 4 °C durante 1-3 horas.
- 2b. Para organismos Gram positivos:
 - Eliminar 500 μ L de sobrenadante.
 - Añadir 500 μ L de Etanol (98 %) y mantener a 4 °C durante 4-16 horas.
3. Centrifugar a 5000 g durante 3 minutos. Eliminar el sobrenadante.
4. Lavar (resuspender) con PBS 1x y volver a centrifugar.
5. Eliminar el sobrenadante y resuspender en PBS1x y Etanol (frio) en la misma proporción.
6. Almacenar en el congelador.

B. HIBRIDACIÓN

7. Colocar 8 μ L de muestra fijadas en cada pocillo de portas con pocillos previamente gelatinizados. Secar a temperatura ambiente.
 8. Deshidratar en etanol al 50 %, 80 % y 100 %, 3 minutos cada uno.
 9. Preparar solución de hibridación (2000 μ L) según el porcentaje de formamida (Ver Tabla 19).
- La formamida debe ser manipulada en campana extractora.

Tabla 19: Solución de hibridación para los diferentes porcentajes de formamida.

Reactivo	% Formamida								
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%	60%
NaCl (5M)	360 µL	360 µL	360 µL	360 µL	360 µL	360 µL	360 µL	360 µL	360 µL
HCl-Tris (1M)	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL
Formamida	200 µL	400 µL	500 µL	600 µL	700 µL	800 µL	900 µL	1000 µL	1200 µL
H2O MiliQ	1.398 µL	1.198 µL	1.098 µL	998 µL	898 µL	798 µL	698 µL	598 µL	398 µL
SDS 10%	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Volumen Final	2.000 µL	2.000 µL	2.000 µL	2.000 µL	2.000 µL	2.000 µL	2.000 µL	2.000 µL	2.000 µL

10. Por cada pocillo con muestra, se pondrá 1 µL de cada sonda y 8 µL de solución de hibridación.

11. Con el resto de la solución de hibridación se humedece el papel del falcon y se prepara su cama.

12. A continuación se muestra en la tabla 20, las sondas utilizadas para estudiar los diferentes microorganismos.

Tabla 20: Sondas para los diferentes organismos y porcentaje de formamida.

Sonda	Organismo	Secuencia (5'-3')	%FA	Ref.
EUBmix	-	-	-	-
EUB338	La mayoría de las bacterias	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0-50	(Amann et al., 1990)
EUB338 II	Planctomycetales	GCAGCCACCCGTAGGTGT	0-50	(Daims et al., 1999)
EUB338 III	Verrucomicrobiales	GCTGCCACCCGTAGGTGT	0-50	(Daims et al., 1999)
ARCH915	Archaea	GTGCTCCCCGCAATTCCT	35 (20-55)	(Stahl y Amann, 1991)
MSMX860	Methanosarcinales	GGCTCGTTCACGGCTTCCT	45	(Raskin et al., 1994)
MG1200b	Methanomicrobiales	CTGATAATTCGGGGCATGCTG	20	(Crocetti et al., 2006)
MB311	Methanobacteriales	ACCTTGTCTCAGTTCCATCTCC	30	(Crocetti et al., 2006)
MC1109	Methanococcales	GCAACATAGGGCACGGGTCT	45	(Raskin et al., 1994)
DBB660	Desulfobulbus	GAATTCCACTTTCCTCTG	60	(Devereux et al., 1992)
Dtm230	Desulfotomaculum	TAATGGGACGCGACCCA	10	(Hristova et al., 2000)
SRB385	Desulfovibrionales	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	35	(Amann et al., 1990)
SRB385Db	Desulfobacteracea	CGGCGTTGCTGCGTCAGG	30	(Rabus et al., 1996)

13. Incubar a 46 °C durante 1-2 horas.

14. Preparar solución de lavado (50 mL) según % de formamida (Ver Tabla 21). Atemperar en baño a 48 °C.

Tabla 21: Solución de lavado para los diferentes porcentajes de formamida.

Reactivo	% Formamida								
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%	60%
NaCl (5M)	4.500 µL	2.150 µL	1.490 µL	1.020 µL	700 µL	460 µL	300 µL	180 µL	41 µL
EDTA (0,5M)	-	500 µL							
HCl-Tris (1M)	1.000 µL	1.000 µL	1.000 µL	1.000 µL	1.000 µL	1.000 µL	1.000 µL	1.000 µL	1.000 µL
H2O MilliQ	43,95 mL	46,3 mL	47,96 mL	47,43 mL	47,75 mL	47,99 mL	48,15 mL	48,27 mL	48,41 mL
SDS 10%	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Volumen Final	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL

15. Sacar el porta de la estufa rápidamente, lavar con solución de lavado e introducir en la solución de lavado. Incubar a 48 °C durante 10-15 minutos.

16. Lavar con agua MilliQ, secar rápidamente en oscuridad. (Una vez seco, el portaobjetos se puede congelar).