



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIEROS DE CAMINOS,  
CANALES Y PUERTOS



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Máster Universitario en Ingeniería Ambiental

## TRABAJO FINAL DE MÁSTER

---

ESTUDIO DE LA DINÁMICA POBLACIONAL  
DE ARQUEAS METANOGÉNICAS EN UN  
REACTOR ANAEROBIO DE MEMBRANAS  
MEDIANTE PCR CUANTITATIVA Y MÉTODOS  
MICROSCÓPICOS Y SU RELACIÓN CON LOS  
PARÁMETROS OPERACIONALES

---

Autora:  
Cristina Marconell Alonso

Directores:  
Luis Borrás Falomir  
Núria Zamorano López

Septiembre de 2017





<b>3.3. TÉCNICAS BASADAS EN MISCROSCOPIA DE FLUORESCENCIA</b> .....	47
3.3.1. DAPI.....	47
3.3.2. HIBRIDACIÓN IN SITU CON SONDAS FLUORESCENTES (FISH) .....	48
3.3.3. VISUALIZACIÓN EN EL MICROSCOPIO Y CUANTIFICACIÓN .....	49
<b>3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	52
3.4.1. MEDIA ARITMÉTICA.....	53
3.4.2. DESVIACIÓN ESTÁNDAR .....	53
3.4.3. COEFICIENTE DE VARIACIÓN .....	54
3.4.4. AJUSTE DE UNA RECTA POR MÍNIMOS CUADRADOS.....	54
3.4.5. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE PEARSON Y COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN $R^2$ .....	55
3.4.6. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA).....	55
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	57
<b>4.1. EXTRACCIÓN DE ADN</b> .....	57
<b>4.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA</b> .....	57
<b>4.3. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL</b> .....	60
4.3.1. RECTAS DE CALIBRADO .....	60
4.3.2. RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN MEDIANTE qPCR .....	66
<b>4.4. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE DAPI Y FISH</b> .....	73
<b>4.5. COMPARACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE qPCR y FISH</b> .....	75
<b>4.6. RELACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS PARÁMETROS OPERACIONALES</b> .....	78
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	91
<b>6. RECOMENDACIONES</b> .....	95
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	97
<b>ANEXO I</b> .....	109
<b>ANEXO II</b> .....	111

---

<b>ANEXO III</b> .....	113
<b>ANEXO IV</b> .....	116



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de doble cadena de ADN y enlaces entre Adenina y Timina y Citosina y Guanina. Modificado de <a href="https://goo.gl/mtp9t8">https://goo.gl/mtp9t8</a> y <a href="https://goo.gl/M6ip2o">https://goo.gl/M6ip2o</a> .....	22
Figura 2. Ribosomas de las células procariotas y sus dos subunidades y macromoléculas que lo componen. Fuente: <a href="https://goo.gl/pkqkZu">https://goo.gl/pkqkZu</a> .....	23
Figura 3. Estructura secundaria del ARNr 16S mostrando secuencias altamente conservadas en negrita y secuencias variables o hipervariables en doble línea. V1 a V9 indica las regiones más variables. (Tortoli, 2003) .....	24
Figura 4. Componentes necesarios para la PCR.....	26
Figura 5. Fases de la PCR, desnaturalización, hibridación y elongación. ....	27
Figura 6. . Esquema de la planta piloto de reactor anaerobio de membrana sumergida (A. Jiménez, 2012).....	34
Figura 7. Kit comercial E.Z.N.A. Soil DNA Kit para la extracción de ADN. ....	36
Figura 8. Espectrofotómetro NanoDrop 2000. Fuente: <a href="https://goo.gl/JY2Ebe">https://goo.gl/JY2Ebe</a> .....	37
Figura 9. Cabina de flujo laminar vertical Telstar Mini-V/PCR. ....	38
Figura 10. a) Termociclador Prime Thermal Cycler y b) condiciones de amplificación. ....	41
Figura 11. Molde para gel de electroforesis. ....	42
Figura 12. Marcador de peso molecular NZYDNA Ladder VII. Modificado de <a href="https://goo.gl/89uKjq">https://goo.gl/89uKjq</a> .....	42
Figura 13. Transluminador MiniBis Pro. ....	43
Figura 14. MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode de Thermo Fisher....	45
Figura 15. Termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System. Fuente: <a href="https://goo.gl/NarN3F">https://goo.gl/NarN3F</a> .....	46
Figura 16. Ejemplo de recta de calibrado, ecuación de la recta, valor de $R^2$ y cálculo de cantidad de copias a partir de un Ct. ....	47
Figura 17. Microscopio Leica DM 2500. Fuente: <a href="https://goo.gl/GSknez">https://goo.gl/GSknez</a> .....	50
Figura 18. Ejemplo de binarización para llevar a cabo la cuantificación DAPI en Matlab. ....	50
Figura 19. Ejemplo de binarización para llevar a cabo la cuantificación FISH en Matlab. ....	51
Figura 20. Resultados obtenidos del software de cuantificación en Matlab para DAPI. ....	52
Figura 21. Resultados obtenidos del software de cuantificación en Matlab para FISH.....	52
Figura 22. Imágenes de electroforesis para comprobar la amplificación de a) Arqueas y b) el orden <i>Methanosarcinales</i> respectivamente. ....	59
Figura 23. Imágenes de electroforesis para comprobar la amplificación de a) el orden <i>Methanomicrobiales</i> y b) el orden <i>Methanobacterales</i> respectivamente. ....	59

Figura 24. Imágenes de electroforesis para comprobar la amplificación del gen <i>mcrA</i> .....	60
Figura 25. Recta de calibrado utilizada en la cuantificación de arqueas, ecuación de la recta y valor de $R^2$ .....	61
Figura 26. Recta de calibrado utilizada en la cuantificación del orden <i>Methanosarcinales</i> , ecuación de la recta y valor de $R^2$ .....	62
Figura 27. Recta de calibrado utilizada en la cuantificación del orden <i>Methanobacteriales</i> , ecuación de la recta y valor de $R^2$ .....	63
Figura 28. Recta de calibrado utilizada en la cuantificación del orden <i>Methanomicrobiales</i> , ecuación de la recta y valor de $R^2$ .....	64
Figura 29. Recta de calibrado utilizada en la cuantificación del gen <i>mcrA</i> , ecuación de la recta y valor de $R^2$ .....	65
Figura 30. Cantidad de células/mL calculadas para arqueas (ARC), <i>Methanosarcinales</i> (MSL), <i>Methanobacteriales</i> (MBT) y <i>Methanomicrobiales</i> (MMB) mostrando el resultado en una escala de tiempo en días.....	69
Figura 31. Composición relativa de la población de arqueas metanogénicas, <i>Methanosarcinales</i> (MSL), <i>Methanomicrobiales</i> (MMB) y <i>Methanobacteriales</i> (MBT) respecto del total de arqueas presentes en las diferentes muestras. ....	70
Figura 32. Comparación entre la amplificación del gen 16S, graficando el total de arqueas metanogénicas, y el gen <i>mcrA</i> . ....	72
Figura 33. Resultados obtenidos en la cuantificación mediante DAPI (arqueas y bacterias) y FISH para células totales (DAPI), arqueas y el orden <i>Methanosarcinales</i> .....	74
Figura 34. Comparación entre los resultados obtenidos en la cuantificación de arqueas mediante qPCR y FISH. ....	76
Figura 35. Comparación entre los resultados obtenidos en la cuantificación del orden <i>Methanosarcinales</i> (MSL) mediante qPCR y FISH. ....	77
Figura 36. Análisis de componentes principales de las siguientes variables: volumen de biogás generado ( $V_{biogás}$ ), volumen de metano generado ( $V_{CH_4}$ ), porcentaje de metano en biogás ( $X_{CH_4}$ ), sólidos totales en el reactor ( $ST.R$ ), sólidos volátiles en el reactor ( $SV.R$ ), porcentaje de sólidos volátiles ( $X_{SV}$ ), DQO total de entrada ( $DQO.T$ ), DQO disponible metanogénicas ( $DQO.MET$ ), tiempo de retención hidráulico (TRH), tiempo de retención celular (TRC), temperatura (T), población de arqueas (arc), <i>Methanosarcinales</i> (msl), <i>Methanomicrobiales</i> (mmb), <i>Methanobacteriales</i> (mbt) y gen <i>mcrA</i> ( <i>mcrA</i> ).....	79
Figura 37. Población total de arqueas (ARC) y los órdenes estudiados, <i>Methanosarcinales</i> (MSL), <i>Methanomicrobiales</i> (MMB) y <i>Methanobacteriales</i> (MBT) en relación a la temperatura (°C) del reactor. ....	80

Figura 38. Relación del tiempo de retención hidráulico con la población de arqueas (ARC) y los órdenes estudiados, <i>Methanosarcinales</i> (MSL), <i>Methanomicrobiales</i> (MMB) y <i>Methanobacteriales</i> (MBT). .....	82
Figura 39. Población de arqueas (ARC) y los órdenes estudiados, <i>Methanosarcinales</i> (MSL), <i>Methanomicrobiales</i> (MMB) y <i>Methanobacteriales</i> (MBT) en relación al tiempo de retención celular.....	83
Figura 40. Población de arqueas (ARC) y los órdenes estudiados, <i>Methanosarcinales</i> (MSL), <i>Methanomicrobiales</i> (MMB) y <i>Methanobacteriales</i> (MBT) en relación a los sólidos totales del reactor (ST) y los sólidos volátiles (SV).....	85
Figura 41. Correlación entre los sólidos volátiles, y las células totales obtenidas mediante DAPI. ....	86
Figura 42. Producción de biogás y metano medido en L/día y porcentaje de metano respecto del total de biogás.....	87
Figura 43. Relación entre la población, medida mediante el gen <i>mcrA</i> , y el volumen de metano generado (VCH <sub>4</sub> ). .....	88
Figura 44. Población de arqueas (ARC) y los órdenes estudiados, <i>Methanosarcinales</i> (MSL), <i>Methanomicrobiales</i> (MMB) y <i>Methanobacteriales</i> (MBT) en relación a la DQO disponible para su consumo. ....	89



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caudal tratado, tiempo de retención celular (TRC), tiempo de retención hidráulico (TRH) y temperatura del reactor en las muestras estudiadas. ....	35
Tabla 2. Condiciones del agua de entrada al reactor: demanda química de oxígeno (DQO) total, DQO consumida por bacterias sulfato reductoras, DQO disponible para las arqueas metanogénicas y sólidos suspendidos totales. ....	35
Tabla 3. Condiciones del agua en el reactor anaerobio de membrana: sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), porcentaje de metano generado (%CH <sub>4</sub> ), volumen de metano generado (V CH <sub>4</sub> ) y volumen de biogás generado. ....	35
Tabla 4. Secuencia de cada <i>primer</i> para amplificar los diferentes órdenes de arqueas estudiados, tamaño del amplicón generado y referencias. ....	39
Tabla 5. Reactivos para realizar la PCR, volúmenes a añadir en el mix y concentraciones finales en la reacción para arqueas (ARC), <i>Methanosarcinales</i> (MSL), <i>Methanomicrobiales</i> (MMB), <i>Methanobacteriales</i> (MBT) y el gen <i>mcrA</i> . ....	40
Tabla 6. Número de copias/mL en cada punto de la recta de calibrado y tamaño del amplicón para cada par <i>primers</i> . ....	44
Tabla 7. Volúmenes a añadir en cada pocillo y concentración final de cada componente de la reacción para llevar a cabo la PCR cuantitativa. ....	45
Tabla 8. Ejemplo de configuración de una placa de qPCR con amplificación del oligo sintético del calibrado (C1, C2, C3, C4y C5) y de las muestras a estudiar (P1, P2, P3, P4, P5). ....	46
Tabla 9. Sondas utilizadas para FISH con sus respectivas secuencias, el porcentaje de formamida necesario y referencias. ....	48
Tabla 10. Filtros de excitación y supresor y espejos dicromáticos utilizados en el microscopio de fluorescencia. Donde BP es bandpass filter (únicamente deja pasar una cierta banda de longitud de onda) y LP es longpass filter (únicamente deja pasar grandes longitudes de onda). ....	49
Tabla 11. Concentración y pureza medida mediante los ratios 260/280 y 260/230 de la extracción de ADN de las muestras estudiadas. ....	57
Tabla 12. Cantidad (copias/mL), logaritmo de la cantidad, Ct promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los triplicados para la calibración de arqueas. ....	61
Tabla 13. Cantidad (copias/mL), logaritmo de la cantidad, Ct promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los triplicados para la calibración del orden <i>Methanosarcinales</i> . ..	62

Tabla 14. Cantidad (copias/mL), logaritmo de la cantidad, Ct promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los triplicados para la calibración del orden <i>Methanobacteriales</i> ..	63
Tabla 15. Cantidad (copias/mL), logaritmo de la cantidad, Ct promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los triplicados para la calibración del orden <i>Methanomicrobiales</i> .	64
Tabla 16. Cantidad (copias/mL), logaritmo de la cantidad, Ct promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los triplicados para la calibración del gen <i>mcrA</i> .	65
Tabla 17. Eficiencia obtenida según el tamaño del amplicón generado en la amplificación de arqueas, los órdenes <i>Methanosarcinales</i> , <i>Methanobacteriales</i> y <i>Methanomicrobiales</i> y el gen <i>mcrA</i> .	66
Tabla 18. Ct promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y cantidad de copias/mL calculados para arqueas.	67
Tabla 19. Ct promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y cantidad de copias/mL calculados para el orden <i>Methanosarcinales</i> .	67
Tabla 20. Ct promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y cantidad de copias/mL calculados para el orden <i>Methanobacteriales</i> .	67
Tabla 21. Ct promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y cantidad de copias/mL calculados para el orden <i>Methanomicrobiales</i> .	67
Tabla 22. Ct promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y cantidad de copias/mL calculados para la amplificación en el gen <i>mcrA</i> .	68
Tabla 23. Cantidad de células/mL calculadas para arqueas, <i>Methanosarcinales</i> , <i>Methanobacteriales</i> y <i>Methanomicrobiales</i> , teniendo en cuenta una cantidad de copias del gen de 2,3; 2,5; 2,4 y 2 respectivamente.	68
Tabla 24. Porcentaje de cada orden, <i>Methanosarcinales</i> (MSL), <i>Methanobacteriales</i> (MBT) y <i>Methanomicrobiales</i> (MMB) y total de arqueas metanogénicas respecto del total de arqueas.	70
Tabla 25. Porcentaje de arqueas metanogénicas y el gen <i>mcrA</i> respecto del total de arqueas.	72
Tabla 26. Media de células en cada campo obtenida mediante la cuantificación de las imágenes de la tinción DAPI, incertidumbre y células/mL calculadas.	73
Tabla 27. Porcentaje de hibridación de arqueas respecto del total de bacterias y arqueas, obtenido mediante la cuantificación de las imágenes de FISH, incertidumbre y células/mL calculadas.	74
Tabla 28. Porcentaje de hibridación del orden <i>Methanosarcinales</i> respecto del total de bacterias y arqueas, obtenido mediante la cuantificación de las imágenes de FISH, incertidumbre y células/mL calculadas.	74
Tabla 29. Posición inicial y final de cada orden estudiado en el oligo sintético.	111

---

Tabla 30. Solución de hibridación según el porcentaje de formamida.....	114
Tabla 31. Solución de lavado según el porcentaje de formamida. ....	114
Tabla 32. Copias del gen 16S en cada organismo del orden <i>Methanobacteriales</i> . ....	116
Tabla 33. Copias del gen 16S en cada organismo del orden <i>Methanosarcinales</i> . ....	116
Tabla 34. Copias del gen 16S en cada organismo del orden <i>Methanomicrobiales</i> .....	117



## RESUMEN

El tratamiento de aguas residuales tiene como principal objetivo realizar un vertido al medio receptor sin comprometer los recursos hídricos existentes. Los sistemas más empleados actualmente son los aerobios, los cuales van ligados a un elevado consumo de energía y generación de elevados volúmenes de lodos. Una de las alternativas son los sistemas anaerobios, que no sólo reducen los problemas anteriores sino que además permiten la generación de energía en forma de biogás. La combinación de este tratamiento con un proceso de filtración mediante una membrana, permite resolver los problemas derivados de la reducida tasa de crecimiento de los microorganismos anaerobios a temperatura ambiente y a reducidos tiempos de retención celular, además de obtener un efluente de mayor calidad.

Debido a las ventajas que presenta un sistema de tratamiento de agua residual basado en un reactor anaerobio de membrana sumergida, y dado que la monitorización de sistemas anaerobios se realiza mediante el estudio de los microorganismos que generan metano debido a su sensibilidad a inestabilidades en el proceso, el presente trabajo pretende estudiar en una planta piloto la dinámica poblacional de arqueas metanogénicas mediante diferentes técnicas moleculares y estudiar su relación con los parámetros operacionales del reactor.

Para ello se estudió la presencia de arqueas y de arqueas metanogénicas (órdenes *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* y *Methanococcales* y gen *mcrA*), mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo que reveló la inexistencia del orden *Methanococcales*. Posteriormente, se llevó a cabo una cuantificación de la población mediante PCR cuantitativa (qPCR) e hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH), para poder realizar una comparación de las dos técnicas. Mediante qPCR el grupo predominante fue el orden *Methanosarcinales*, seguido del orden *Methanomicrobiales* y encontrándose en minoría el orden *Methanobacteriales*. En el caso de los órdenes *Methanomicrobiales* y *Methanobacteriales*, no se pudo obtener una cuantificación mediante FISH debido a la menor sensibilidad del método, dado que presentaban una concentración menor a un 1% respecto del total de arqueas y bacterias y la cuantificación resultaría imprecisa. En cuanto a las tendencias en la población de arqueas y del orden *Methanosarcinales*, éstas resultaron similares mediante ambas técnicas, lo que confirma la validez de los métodos desarrollados.

Posteriormente, se observó que el aumento o disminución en la población de arqueas y los órdenes estudiados se veía relacionado con algunas variables del proceso. En cuanto a la relación con la temperatura, las arqueas metanogénicas se ven favorecidas por un aumento de ésta, sobre todo el orden *Methanomicrobiales*. Esto es debido a que las reacciones biológicas

se encuentran sensiblemente influidas por la temperatura, y en el caso de orden *Methanomicrobiales*, parece ser que presenta una mayor sensibilidad. Respecto a la producción de metano, se ha observado una relación con el gen *mcrA*, dado que es el gen que codifica la enzima que cataliza el paso final en la metanogénesis. A pesar de esto, se encuentran variaciones en la relación entre el gen *mcrA* y la producción de metano, dado que mediante qPCR se mide identidad y no actividad de las arqueas metanogénicas, y es posible que haya una elevada población de arqueas metanogénicas pero éstas no encontrarse activas.

Por el contrario, parece ser que la población no se vea afectada por variaciones en los tiempos de retención celular e hidráulico (al menos en los rangos estudiados). Además, tampoco se ha encontrado relación con los sólidos volátiles, debido a que se encuentra presente en el reactor una elevada fracción volátil, la cual no corresponde únicamente a arqueas o bacterias.

Debido a lo comentado anteriormente, resulta muy interesante estudiar comunidades metanogénicas para detectar cambios en reactores anaerobios mediante qPCR, dado que la técnica amplía la información obtenida mediante métodos más tradicionales (FISH) y es posible la monitorización de otros grupos más difíciles de detectar.

## 1. INTRODUCCIÓN

El objetivo principal de la depuración de aguas residuales es realizar su vertido al medio receptor sin dar lugar a un deterioro en la calidad de las aguas y los ecosistemas. Debido al desarrollo industrial y crecimiento poblacional insostenibles, que llevan ligado un vertido de grandes cantidades de productos contaminantes, los estándares de efluentes se han vuelto cada vez más estrictos en un esfuerzo por preservar los recursos hídricos existentes. Por lo tanto, es necesario un aumento en la eficiencia de las plantas de tratamiento de aguas residuales y a su vez, realizarlo con un bajo coste de funcionamiento.

Las tecnologías actuales más empleadas para el tratamiento de las aguas residuales urbanas están basadas en la implantación de sistemas aerobios de fangos activados, caracterizadas por un elevado consumo de energía debido a la aireación, generación de elevados volúmenes de fango y además, suelen ir acompañadas de impactos ambientales secundarios, como la emisión de CO<sub>2</sub>. Las plantas de tratamiento no sólo tienen que eliminar materia orgánica y nutrientes, sino también las bacterias y los virus presentes en ellas (Visvanathan *et al.*, 2000). Además, la eliminación de los lodos generados es cada vez más difícil y costosa por su contenido en metales pesados que provocan que no puedan ser utilizados posteriormente en tierras agrícolas (Rosenberger *et al.*, 2002). Es por esto que se hace necesaria la investigación e implementación de nuevos métodos y sistemas de tratamiento más sostenibles y de menor impacto, cumpliendo además con un menor gasto energético.

Mediante sistemas de tratamiento de aguas anaerobios, los problemas derivados de los tratamientos aerobios pueden ser reducidos. En primer lugar, se reducen los elevados costes derivados de la aireación ya que no es necesario oxígeno, y la producción de lodos es menor (Lew *et al.*, 2009). Por otro lado, se genera biogás, una mezcla de metano (CH<sub>4</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). El metano producido tiene una gran importancia debido a su posible utilización como fuente de energía, ya sea para producir calor y mantener la temperatura en el reactor o para la producción de energía.

A pesar de dichas ventajas, los tratamientos anaerobios presentan una menor eliminación de materia orgánica y no eliminan nutrientes, además de presentar una reducida velocidad de crecimiento de los microorganismos implicados con un corto tiempo de retención hidráulico (TRH) (Haandel & Lettinga, 1994). Pero este problema puede resolverse aplicando la separación de la biomasa mediante una membrana en lugar de utilizar un decantador convencional. Ésta, puede retener la biomasa eficazmente, produciendo un efluente libre de sólidos y prevenir desperdicios involuntarios de lodos (Huang *et al.*, 2011), además de poder

escoger el tamaño de poro del sistema de filtración para impedir el paso de los microorganismos y así, controlar perfectamente la calidad microbiológica del agua de salida. De esta manera, es posible lograr una alta concentración de biomasa en el reactor mediante un corto tiempo de retención hidráulico junto con largos tiempos de retención de sólidos (o tiempos de retención celular) (Huang *et al.*, 2011, 2013). Al permanecer más tiempo la biomasa en el sistema e impedir las membranas su salida, la materia orgánica particulada puede ser hidrolizada y descompuesta debido al elevado tiempo de retención de sólidos (Lew *et al.*, 2009) y los problemas derivados del bajo rendimiento en el crecimiento de arqueas anaerobias a temperatura ambiente quedan resueltos sin necesidad de aumentar el volumen necesario del reactor.

Debido a las ventajas que presentan los tratamiento anaerobios junto a la utilización de una membrana, y dado que la monitorización de sistemas anaerobios se realiza mediante el estudio de los microorganismos que generan metano debido a su sensibilidad a inestabilidades en el proceso, el presente trabajo pretende estudiar la dinámica poblacional de arqueas metanogénicas en un reactor anaerobio de membrana sumergida mediante diferentes técnicas moleculares y estudiar su relación con los parámetros operacionales del reactor.

## **1.1. BIOREACTORES DE MEMBRANA**

Los biorreactores de membrana más comunes consisten en un reactor de crecimiento celular y un dispositivo de filtración de membrana combinados en un único proceso. La unidad de membrana puede ser colocada externamente o sumergida en el reactor. En el sistema externo (flujo lateral), la unidad de membrana trabaja independientemente del reactor. El influente entra en el reactor y es degradado por los microorganismos. A continuación, su efluente es conducido a la unidad de filtración que generalmente funciona en flujo cruzado, donde una bomba proporciona la velocidad y la presión transmembrana, suponiendo un gasto energético extra. El permeado de la membrana es el producto tratado y el fango concentrado retenido es recirculado al biorreactor.

Las velocidades proporcionadas por las bombas suelen ser altas (1-3 m/s), lo que da lugar a flujos relativamente altos, conllevando un rápido ensuciamiento de las membranas (Kang *et al.*, 2002; Fuchs *et al.*, 2003). Pero al encontrarse la membrana en el exterior del biorreactor se facilita el proceso de limpieza y mantenimiento al no ser necesario vaciarlo.

Por otro lado, las altas velocidades del flujo cruzado dan lugar a altas tasas de rotura por cizallamiento hidráulico (Hu & Stuckey, 2006) que puede resultar en una reducción en la actividad de los microorganismos (Brockmann & Seyfried, 1996), reduciendo a su vez la producción de biogás (Kim *et al.*, 2001, 2005).

En los sistemas sumergidos, el módulo de membrana se encuentra sumergido dentro del reactor, llevando a cabo la filtración y la degradación de la materia orgánica al mismo tiempo y en el mismo tanque. En estos sistemas no tiene por qué ser necesario el bombeo para llevar a cabo la filtración, dado que la presión transmembrana es accionada por la cabeza hidrostática del nivel del líquido por encima de la membrana; pero en caso de que no sea adecuada, se puede utilizar una bomba auxiliar. El control del ensuciamiento de la membrana se logra mediante el barrido continuo de biogás o aire que recorre su superficie y provoca su agitación para ayudar al desprendimiento de los sólidos que se van depositando sobre su superficie. Por lo tanto, para llevar a cabo la exhaustiva limpieza de la membrana es necesario parar el reactor dada la imposibilidad de acceder a ella. Por el contrario, presenta la ventaja de no necesitar un bombeo de recirculación.

## 1.2. TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS ANAEROBIOS

Un proceso biológico se define como anaerobio cuando tiene lugar en un ambiente en el que no se encuentra presente oxígeno ni nitratos. En este tipo de procesos se dan lugar diferentes 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 son bacterias estrictamente anaerobias.

Los procesos anaerobios se dan en tres pasos sucesivos:

- Hidrólisis: es el proceso de transformación de partículas suspendidas y moléculas de gran tamaño (proteínas, lípidos y carbohidratos) en moléculas más pequeñas, como pueden ser aminoácidos, azúcares y ácidos grasos de cadena larga, por la acción de bacterias acidogénicas. El resultado de dicho proceso da lugar a un incremento en la materia orgánica soluble.
- Acidogénesis: es el proceso de transformación de la materia orgánica disuelta en un conjunto de ácidos volátiles de cadena corta como son acético, propiónico y butírico, además de la formación de hidrógeno. Al igual que la hidrólisis, dicho proceso es

llevado a cabo por las bacterias acidogénicas. Por otro lado, estos ácidos volátiles de cadena corta son transformados en ácido acético e hidrógeno por parte de las bacterias acetogénicas.

- Metanogénesis: dicho proceso consiste en la conversión del ácido acético o el hidrógeno en metano por parte de las arqueas metanogénicas, las cuales pueden ser hidrogenotróficas o acetoclásticas.

De esta manera, la estabilidad del proceso depende del equilibrio entre las tasas de crecimiento simbióticas de los principales grupos de bacterias y arqueas, es decir, bacterias acidogénicas, acetogénicas y arqueas metanogénicas (Schinik, 1997). Además, las condiciones de operación como son los tiempos de retención, la temperatura y las fluctuaciones en entrada de materia orgánica hacen que los reactores sean muy susceptibles dando lugar a una inestabilidad en el proceso.

El presente trabajo se centra únicamente en el último paso de un proceso biológico anaerobio, la metanogénesis, estudiando la población de las arqueas que la llevan a cabo, cuyas principales características son la formación de grandes cantidades de metano como principal producto de su metabolismo energético y que son anaerobios estrictos. Obtienen su energía para el crecimiento de la conversión de un número limitado de sustratos a gas metano, de los cuales los principales son  $H_2 + CO_2$  y acetato. Además, también pueden ser utilizados algunos compuestos como formiatos, alcoholes o metilos. No hay que confundir las arqueas metanogénicas con los llamados productores de minimetano que son otros microorganismos anaeróbicos que también producen metano, pero en pequeñas cantidades, como consecuencia de reacciones secundarias de su metabolismo normal (Rimbault *et al.*, 1988).

La lista de sustratos para el crecimiento de arqueas metanogénicas puede dividirse en tres grupos. En el primer grupo, el sustrato energético es  $H_2$ , formiato, o ciertos alcoholes y el aceptor de electrones es  $CO_2$ , que se reduce a metano. La capacidad de utilizar  $H_2$  como un electrón donante para la reducción de  $CO_2$  es casi universal entre las arqueas metanogénicas. Asimismo, algunas también utilizan formiatos y alcoholes, como propanol y etanol, pero la capacidad de utilizarlos es menos común (Bleicher *et al.*, 1989; Zellner & Winter, 1987; Kiene *et al.*, 1986; Widdel, 1986). Algunas arqueas metanogénicas también pueden utilizar monóxido de carbono como un electrón donante, pero el crecimiento es muy lento (Daniels *et al.*, 1977).

En el segundo grupo, el sustrato energético es una variedad de compuestos metilados como metilamina (König & Stetter, 1982) y trimetilamina (Sowers & Ferry, 1985), y pueden servir como sustratos para unos cuantos taxones de arqueas metanogénicas.

En el tercer grupo, el acetato es la principal fuente de metano, pero la capacidad de catabolizar este sustrato se limita a las especies de *Methanosarcina* (Ahring & Westermann, 1985; Zinder *et al.*, 1985) y *Methanosaeta* (Nozhevnikova & Chudina, 1984; Huser *et al.*, 1982; Zinder *et al.*, 1987) del orden *Methanosarcinales*. La síntesis de metano se lleva a cabo mediante una reacción acetoclástica, en la cual el carbono metilo del acetato es reducido a metano y el carbono carboxilo es oxidado a CO<sub>2</sub>.

Los órdenes de arqueas metanogénicas y sus características son los siguientes:

- *Methanomicrobiales* (Garcia *et al.*, 2003)

Todos los organismos pertenecientes al orden *Methanomicrobiales* pueden crecer utilizando H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> como sustrato, mientras que muchos de ellos pueden utilizar formiatos y unos pocos pueden utilizar alcoholes. Por el contrario, no pueden utilizar acetato ni compuestos metilados. Su rango de temperatura óptima de crecimiento es de 0-60°C y pueden vivir en diversos hábitats anaerobios como sedimentos marinos (Rivard *et al.*, 1983; Romesser *et al.*, 1979) y de agua dulce (Harris *et al.*, 1984; Corder *et al.*, 1983; Blotevogel *et al.*, 1991), digestores anaerobios (Ollivier *et al.*, 1985), tractos gastrointestinales de mamíferos (Lin *et al.*, 1997; Paynter & Hungate, 1968; Jarvis *et al.*, 2000).

- *Metanobacteriales* (Bonin & Boone, 2003)

Los organismos pertenecientes al orden *Metanobacteriales* crecen generalmente usando H<sub>2</sub> para reducir el CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub>. Algunos miembros de este orden pueden utilizar formiatos, CO<sub>2</sub> o alcoholes como sustrato. Al igual que otros ordenes metanogénicos, pueden habitar diversos hábitats anaerobios como sedimentos marinos y de agua dulce (König, 1984), digestores anaerobios (Bryant & Boone, 1987; Kotelnikova *et al.*, 1993), aguas subterráneas (Kotelnikova *et al.*, 1998), entornos geotérmicos y el tracto gastrointestinal de animales (Biavati *et al.*, 1988). El rango de temperatura de crecimiento es de 15-97°C.

- *Methanosarcinales* (Kendall & Boone, 2003)

Los organismos pertenecientes al orden *Methanosarcinales* pueden utilizar el rango de sustrato más amplio de todos los metanógenos: muchos pueden crecer reduciendo CO<sub>2</sub> con H<sub>2</sub>, con compuestos de metilo, o mediante acetato. Algunas especies pueden usar sólo uno de esos esquemas catabólicos, pero otros pueden usar los tres. Además, es el único orden en el cual es posible la utilización de acetato como sustrato. El hábitat de las *Methanosarcinales* es muy diverso al igual que en otros órdenes, como

en sedimentos marinos (Elberson & Sowers, 1997; Sowers *et al.*, 1984) y de agua dulce (Boone *et al.*, 1986; Kevbrin *et al.*, 1997), tractos gastrointestinales de animales y sus heces (Jarvis *et al.*, 2000), digestores anaerobios (Mah & Kuhn, 1984; Zinder *et al.*, 1987) y su rango de temperatura óptimo de crecimiento es de 2-70°C.

- *Methanopyrales* (Huber & Stetter, 2001)

Los organismos pertenecientes al orden *Methanopyrales* únicamente utilizan como sustrato H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> siendo incapaces de utilizar los otros posibles sustratos utilizados por otros órdenes. Dicho orden únicamente contiene especies hipertermofílicas dado que su rango de temperatura óptimo de crecimiento es de 84-110°C, no pudiendo crecer por debajo de 80°C.

- *Methanococcales* (Whitman & Jeanthon, 2003)

Los organismos pertenecientes al orden *Methanococcales* utilizan como sustrato H<sub>2</sub> y algunas veces pueden utilizar formiatos. En cambio, no pueden utilizar acetato, ni compuestos metilados o alcoholes. Presentan una gran diversidad en el rango óptimo de temperatura de crecimiento variando de 18 a 94°C. Únicamente se han podido aislar de ambientes marinos y requieren sales marinas para un crecimiento óptimo (Burggraf *et al.*, 1990; Keswani *et al.*, 1996; Lai & Shih, 2001)

Dadas las características de los diferentes órdenes de arqueas metanogénicas, el orden *Methanopyrales* no está incluido en el presente trabajo dado que su presencia en el reactor anaerobio de membrana resulta imposible al presentar rangos de temperatura óptimos para su crecimiento de 84 a 110°C (Huber & Stetter, 2001). En el caso del orden *Methanococcales*, el cual únicamente ha podido aislarse de ambientes con elevada salinidad (Whitman & Jeanthon, 2003), se ha estudiado su posible presencia en el reactor a pesar de intuir su ausencia.

### 1.3. CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES MICROBIANAS

Los microorganismos se encuentran en la naturaleza formando comunidades donde generalmente existen como miembros de poblaciones mixtas. Su identificación mediante métodos convencionales requiere el aislamiento de cultivos puros, que además resultan inadecuados para el estudio de la biodiversidad en una población mixta. La posibilidad de identificar poblaciones específicas de microorganismos de muestras ambientales sin necesidad de aislamiento e identificación mediante métodos culturales está revolucionando la ecología

microbiana, dado que están surgiendo nuevas aplicaciones y técnicas. Generalmente, las más utilizadas son técnicas genético-moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa, la microscopía de fluorescencia o una combinación de ambas. Este tipo de técnicas son más rápidas que los métodos basados en cultivo pero también son más costosas además de requerir personal más especializado. Dichas técnicas genético-moleculares están basadas normalmente en la subunidad pequeña del ARN (ARNr 16S para procariontes) o los genes que lo codifican, aunque también pueden basarse en el estudio de otros genes alternativos característicos del organismo que se desea identificar o estudiar.

### 1.3.1. ÁCIDOS NUCLEICOS

Los ácidos nucleicos, ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), son macromoléculas formadas por la repetición de monómeros denominados nucleótidos. Por tal motivo, ADN y ARN son considerados polinucleótidos.

Los nucleótidos son las unidades básicas de los ácidos nucleicos y son el resultado de la unión entre pentosa (formada por azúcar de 5 átomos de carbono), una base nitrogenada y una molécula de fosfato.

El ADN contiene la información genética de las células, mientras que el ARN expresa dicha información. Existen tres tipos de ARN para expresar dicha información, según la función que cumpla este ácido nucleico. El ARN mensajero (ARNm) contiene la información para sintetizar las proteínas en el ribosoma mediante el proceso de traducción. El ARN de transferencia tiene como función captar aminoácidos, transportarlos y transferirlos colocándolos en el lugar adecuado que indica la secuencia de nucleótidos del ARNm para llegar a la síntesis de la proteína. Y por último, el ARN ribosómico, el más abundante en porcentaje, tiene una función estructural, puesto a que aporta la estructura tridimensional donde se lleva a cabo la síntesis.

#### 1.3.1.1. ADN

El ADN está constituido por dos cadenas polinucleotídicas cuyas secuencias son complementarias entre sí. La complementariedad se basa en el enlace entre las bases nitrogenadas (Figura 1). En el ADN existen 4 bases nitrogenadas que son: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T) donde adenina es complementaria a citosina mientras que guanina lo es a timina. La doble cadena de ADN presenta una composición antiparalela, donde la organización de las hebras del ADN son cadenas paralelas pero con direcciones opuestas, es

decir, que en una doble hélice, la dirección de los nucleótidos en una hebra ( $3' \rightarrow 5'$ ) es opuesta a la dirección en la otra hebra ( $5' \rightarrow 3'$ ). Este emparejamiento de las bases se realiza mediante

enlaces de hidrógeno. El emparejamiento de las bases adenina - timina es más débil que el emparejamiento guanina - citosina ya que la adenina y la timina se estabilizan mediante dos enlaces de hidrógeno mientras que la guanina y la citosina se estabilizan mediante tres puentes de hidrógeno (Figura 1).

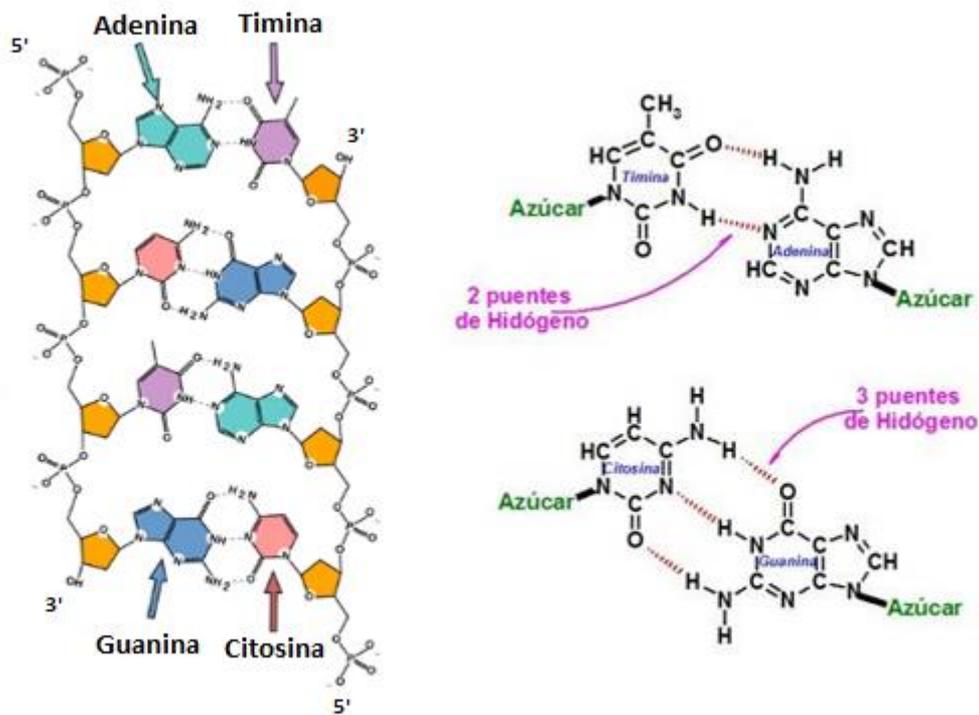


Figura 1. Estructura de doble cadena de ADN y enlaces entre Adenina y Timina y Citosina y Guanina. Modificado de <https://goo.gl/mtp9t8> y <https://goo.gl/M6ip2o>.

### 1.3.1.2. ARNr 16S

El ribosoma procariota tiene un coeficiente de sedimentación de 70S y se disocia en dos subunidades: la subunidad mayor de (50S) y la subunidad menor de (30S). Cada subunidad es un complejo ribonucleoproteico constituido por proteínas ribosómicas y moléculas ARNr específicas. La subunidad mayor tiene dos tipos de ARNr, 5S constituido por 120 nucleótidos y 23S constituido por 2904 nucleótidos, y 31 proteínas, mientras que la subunidad menor tiene una sola molécula de ARNr, 16S de 1542 nucleótidos y 21 proteínas (Figura 2).

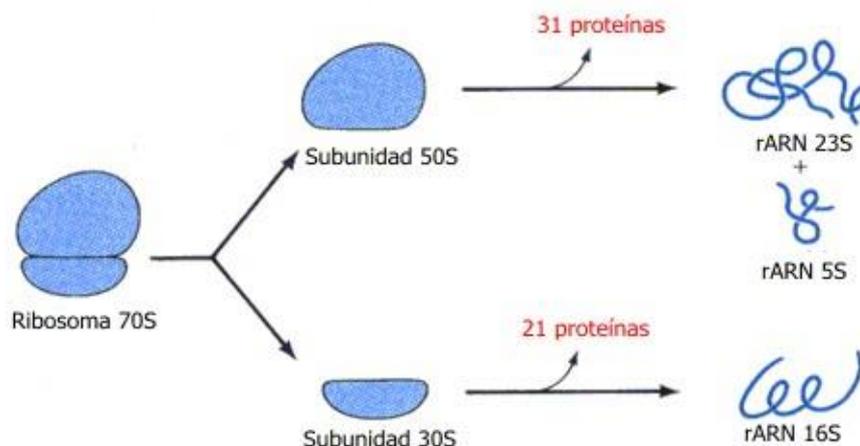


Figura 2. Ribosomas de las células procariotas y sus dos subunidades y macromoléculas que lo componen. Fuente: <https://goo.gl/pkqkZu>

El ARNr 16S es un componente de la subunidad 30S de los ribosomas procariotas de 1.542 nucleótidos, codificados por el gen ADN ribosomal 16S (ADNr 16S) (Rodicio & Mendoza, 2004). Presenta diferentes funciones relacionadas con la síntesis proteica: La estructural, actuando como un andamio definiendo la posición de las proteínas del ribosoma, y la de participación en la unión y reconocimiento del ARNm al ribosoma para después llevar a cabo su traducción.

El ARN ribosómico 16S es considerado como un reloj molecular o cronómetro evolutivo dado que es una molécula altamente conservada a lo largo de la evolución, a pesar de presentar regiones variables (Sanz & Köchling, 2007). El ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena alternando con regiones de cadena sencilla (Neefs, 1990). Dicha estructura presenta regiones variables concentradas en áreas específicas y otras altamente conservables, incluso comunes a todos los seres vivos (Tortoli, 2003; Hugenholtz, 2002) las cuales se pueden observar en la siguiente imagen (Figura 3) (Tortoli, 2003). Es por esto que es una de las macromoléculas más usadas en análisis filogenético debido a su alto contenido en información, naturaleza conservativa, distribución universal y abundancia (Lane, 1985). El trabajo de Carl Woese sobre el análisis comparativo de ARNr 16S y 18S proporcionó un marco objetivo para determinar relaciones evolutivas entre organismos. Encontró que la vida celular puede ser dividida en tres dominios, uno eucariota y dos procariotas (bacterias y arqueas) (Woese y Fox, 1977; Woese, 1990). A partir de este momento, el análisis de la secuencia de los ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos reveló la presencia de secuencias características denominadas oligonucleótidos firma que comparten todos los miembros de un determinado grupo, y nunca presentes en otros, pudiendo de esta manera identificar organismos (Woese, 1985). Estas secuencias características permiten la

identificación de organismos pertenecientes a un mismo dominio, hasta a una determinada especie (Sanz & Köchling, 2007).

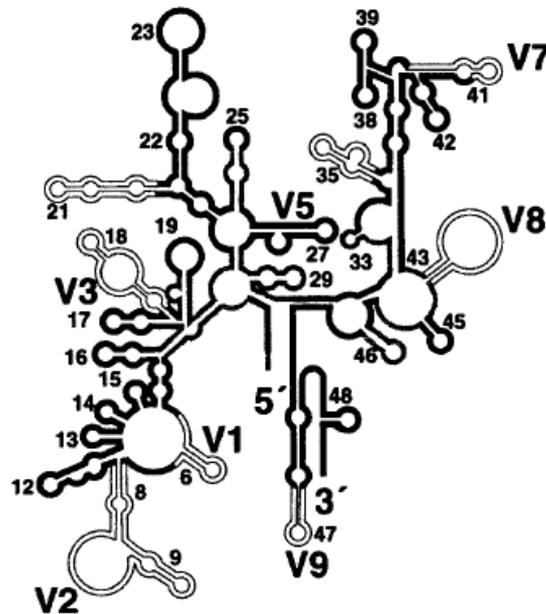


Figura 3. Estructura secundaria del ARNr 16S mostrando secuencias altamente conservadas en negrita y secuencias variables o hipervariables en doble línea. V1 a V9 indica las regiones más variables. (Tortoli, 2003)

### 1.3.2. GEN *mcrA*

El gen *mcrA* codifica la subunidad  $\alpha$  de metil enzima M reductasa, la enzima que cataliza el paso final en la metanogénesis (Ferry, 1999; Reeve *et al.*, 1997), por lo que dicho gen es exclusivo de los metanógenos. Dada esta exclusividad, es posible detectar la presencia y abundancia de arqueas metanogénicas en muestras ambientales (Springer *et al.*, 1995; Luton *et al.*, 2002; Gagnon *et al.*, 2011).

## 1.4. TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES MICROBIANAS

### 1.4.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (siglas de Polymerase Chain Reaction, en su nombre en inglés) fue desarrollada en 1983 por el Doctor Kary Mullis (Saiki *et al.*, 1985). Esta reacción permite la producción de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN).

Normalmente la diana suelen ser los genes que codifican el ARNr 16S para poder realizar un análisis filogenético, pero también es posible utilizar genes metabólicos.

Para poder llevar a cabo la reacción, es indispensable disponer de fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento que se pretende amplificar. Dichos fragmentos llamados *primers*, servirán como cebadores para que la enzima polimerasa incorpore nucleótidos complementarios a la cadena que actúa de molde. La cantidad de fragmento amplificado tras la reacción se puede visualizar mediante técnicas simples de separación de fragmentos de ADN.

Los componentes para llevar a cabo la PCR son (Figura 4):

- El ADN que se pretende amplificar, es decir, obtener una copia de un fragmento. Este ADN se conoce como ADN molde.
- Enzima polimerasa. Una enzima capaz de generar una copia de ADN a partir del ADN que actúa como molde. La enzima más comúnmente utilizada en PCR es la producida por la bacteria *Thermus Aquaticus* cuya temperatura óptima se encuentra sobre los 72°C (Kubista *et al.*, 2006). Su termoestabilidad es tal que es capaz de soportar las altas temperaturas que se dan en el proceso de PCR (su vida media es de 40 minutos a 95°C (Van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).
- *Primers* o cebadores. Moléculas cortas de oligonucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases de cadena sencilla. Cada par de *primers* es complementario a una de las dos hebras de ADN y definen los extremos de la secuencia que se pretende amplificar.
- Nucleótidos libres. La enzima polimerasa crea la cadena complementaria añadiendo dichos nucleótidos en forma de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) a partir del *primer* que se ha unido al ADN molde.
- Iones divalentes. Magnesio ( $Mg_2^+$ ), que comúnmente se agrega como cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), el cual es necesario para la acción de la enzima y facilita la unión del *primer* al ADN molde.
- Una solución tampón o buffer que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.

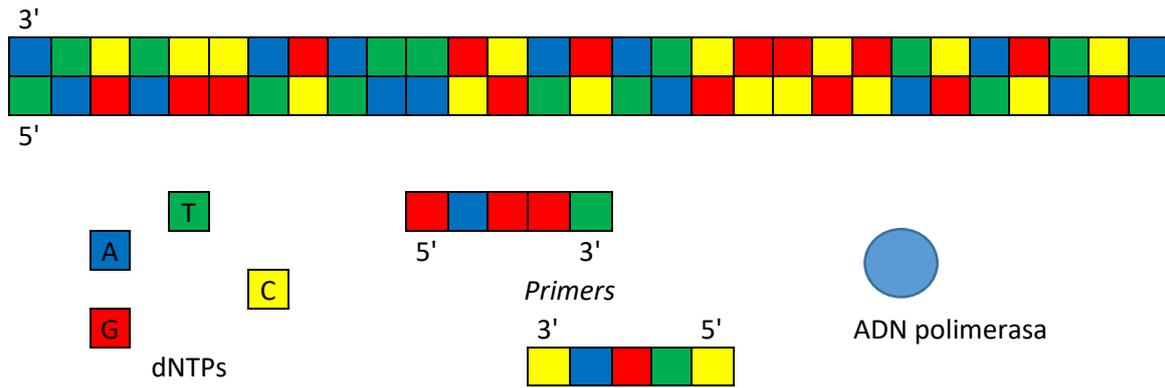
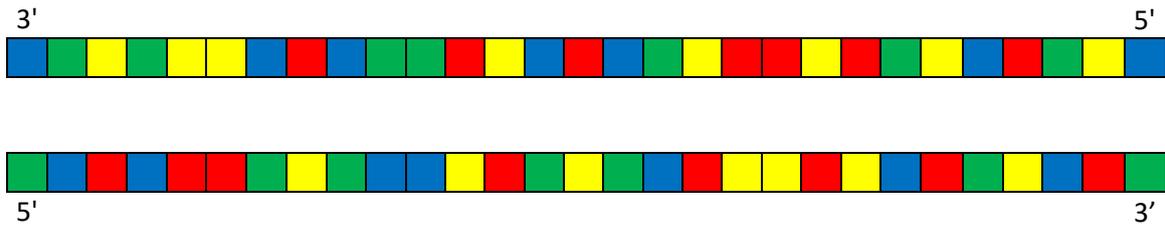


Figura 4. Componentes necesarios para la PCR.

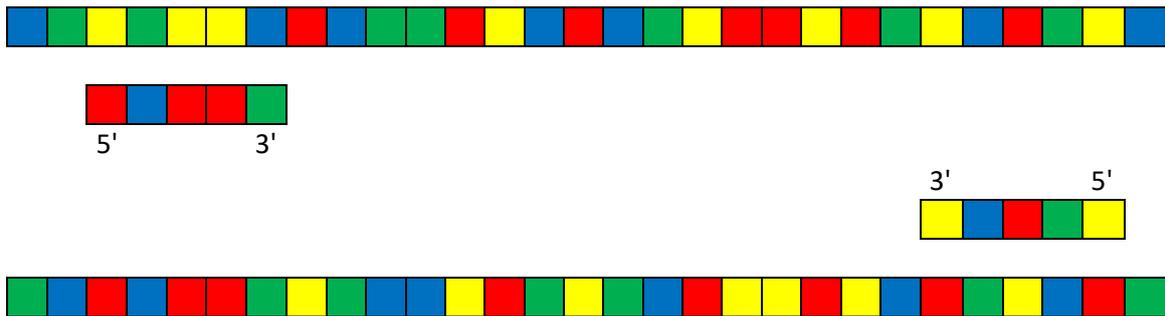
El proceso que tiene lugar durante la PCR se lleva a cabo en tres fases (Figura 5):

- La primera de ellas es la desnaturalización. Es necesario que el ADN se desnaturalice, es decir, que las dos hebras de ADN se separen. Esta fase se lleva a cabo elevando la temperatura a unos 95°C.
- La segunda etapa consiste en un descenso de la temperatura. Con ello se consigue que los *primers* se unan al ADN molde por complementariedad. Esta segunda fase se conoce como hibridación y se descende la temperatura hasta aproximadamente 60°C dependiendo del organismo del que se quiera amplificar el ADN. La temperatura en esta fase y la cantidad de iones divalentes que se incorporan a la reacción influyen directamente en la especificidad de la PCR. Cuanto mayor sea la temperatura en la fase de hibridación, más específica será la reacción dado que la unión entre el cebador y la cadena molde resulta más difícil. En condiciones de temperatura elevadas, el cebador sólo se unirá a la cadena molde si son complementarios en todos sus nucleótidos. Por otro lado, los incrementos de concentración de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) hacen disminuir la especificidad de la reacción al facilitar la unión del *primer* a al ADN molde. (Van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008)
- Por último, la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' del cebador. Esta última fase es la conocida como elongación o extensión y se realiza a 72°C para Taq polimerasa. Los fragmentos de ADN generados en el ciclo anterior sirven como ADN molde para el ciclo posterior, de manera que se produce un aumento exponencial del número de fragmentos generados (Van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Al final del proceso se obtiene una cantidad aproximada de fragmento igual al producto de la cantidad inicial de ADN molde por  $2^n$ , siendo n el número de ciclos.

### DESNATURALIZACIÓN



### HIBRIDACIÓN



### ELONGACIÓN

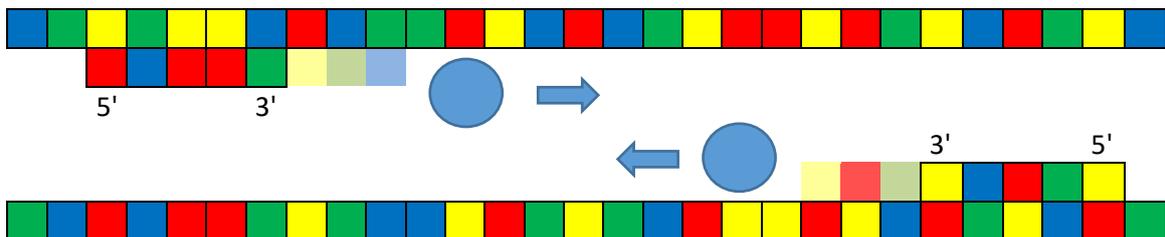


Figura 5. Fases de la PCR, desnaturalización, hibridación y elongación.

Para comprobar la calidad (presencia de amplicones no específicos) y el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados, se utiliza la electroforesis en gel de agarosa. El proceso consiste en la separación de las moléculas a través de una matriz tamponada, en este caso la agarosa, que funciona como un filtro separando las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable de la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren del polo negativo hacia el polo positivo durante la electroforesis. La velocidad de separación de fragmentos de ADN por electroforesis es regulada a través de la concentración de agarosa en el gel y el voltaje aplicado. La agarosa funciona filtrando los fragmentos haciendo que los de menor tamaño migren más rápidamente que aquellos de mayor tamaño. Aumentando la concentración de agarosa se dificulta el movimiento de los

fragmentos a lo largo del gel. Mientras que por otro lado, el incremento del voltaje aumenta proporcionalmente la velocidad de migración.

Para poder realizar la visualización de los fragmentos, los ácidos nucleicos son tintados con colorantes fluorescentes que se intercalan entre las pares de bases que conforman el ácido nucleico permitiendo su visualización al iluminar el gel con luz ultravioleta. Es tradicional utilizar para ello bromuro de etidio, pero dado su carácter mutagénico y cancerígeno, se han desarrollado alternativas más seguras como EuroSafe de Euroclone.

#### 1.4.1.1. PCR EN TIEMPO REAL

Una variante de la PCR es la RT-qPCR (Real Time qPCR) que se puede abreviar como qPCR que permite la cuantificación de ADN producto de la amplificación a partir de la medición de la intensidad de la fluorescencia que va aumentando a medida que los ciclos de la amplificación avanzan. Sólo unos cuantos estudios han utilizado qPCR para examinar cuantitativamente comunidades de metanógenos, y la mayoría están dirigidos al gen 16S ARNr (Hori *et al.*, 2006; Sawayama *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2005, 2006), aunque también se ha utilizado la técnica dirigiéndose al gen *mcrA* (Steinberg & Regan, 2009; Nunoura *et al.*, 2006).

Para determinar el número de copias en un gen en particular, se determina una fluorescencia basal o línea base, que son los ciclos iniciales de PCR donde no hay cambios significativos en la señal de fluorescencia. A continuación, se determina una señal umbral de fluorescencia o Threshold fijado en la región exponencial de la amplificación y por encima de la línea de base. Este punto es el momento en el que la eficacia de la amplificación se vuelve máxima y constante. El número de ciclos de PCR que se necesitan para generar dicha señal fluorescente es definido como ciclo umbral o Ct (Cycle Threshold). Estos valores aumentan de manera proporcional cuanto menos cantidad inicial de ADN, y esta relación se emplea para calcular el número de copias de ADN presentes en la muestra (Tse & Capeau, 2003)

A los componentes de la PCR se añade un fluorocromo intercalar, en este caso es utilizado SYBR Green, el cual al excitarse mediante luz azul ( $\lambda=488$  nm) emite luz verde ( $\lambda=522$  nm) (Zipper *et al.*, 2004). Dicho compuesto emite fluorescencia únicamente cuando se intercala en ADN de doble cadena (Higuchi *et al.*, 1993). De esta manera, a medida que aumenta el producto de PCR (amplicones) se observa una mayor fluorescencia (Ririe *et al.*, 1997).

Uno de los métodos de cuantificación en PCR en Tiempo Real es el método de cuantificación absoluta que permite identificar un número determinado de moléculas de ADN y compara las amplificaciones de las muestras de ácidos nucleídos de interés con las amplificaciones de una

curva estándar preparada con concentraciones conocidas de la misma secuencia de interés. Dicha curva estándar está basada en una serie de diluciones del estándar, que debe contener la misma secuencia que el gen que se quiere amplificar, y además se debe conocer la concentración inicial o número de copias iniciales. Esta curva estándar, debe tener un comportamiento lineal, el cual se evalúa mediante dos propiedades: la eficiencia y el coeficiente de correlación. La eficiencia es determinada mediante la siguiente ecuación (1) a partir de la pendiente de la recta de calibrado. (Pfaffl, 2001):

$$E = 10^{(-1/pendiente)} - 1 \quad (1)$$

Una eficiencia del 100% viene determinada por una pendiente de -3,32, siendo los valores de eficiencias de  $100 \pm 20\%$  aceptables (Yun *et al.*, 2006).

Por otro lado, el coeficiente de correación  $R^2$  debe presentar un valor superior a 0.989 indicando así el grado de ajuste de la recta. (Yun *et al.*, 2006).

## 1.4.2. TÉCNICAS BASADAS EN LA MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA

### 1.4.2.1. DAPI

DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en Adenina y Timina en secuencias de ADN, emitiendo luz azul al iluminar con luz ultravioleta. DAPI se puede utilizar tanto en células vivas como en células fijadas, y al tener una alta afinidad por el ADN es usado frecuentemente para realizar recuentos de células.

### 1.4.2.2. HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (FISH)

Una buena vía para estudiar las poblaciones microbianas es la hibridación fluorescente in situ (FISH) por su sencillez y rapidez en la obtención de resultados. Dicho método permite la detección, identificación y recuento de especies en medios naturales (Amann *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1993).

Se produce la hibridación ADN-rARN 16S, el cual es el objetivo más común para las sondas de hibridación (Amann *et al.*, 1990a; Stahl *et al.*, 1988). Para ello se utilizan sondas de ADN sintético de unos 15-25 nucleótidos (Amann *et al.*, 1990a) a las cuales se les une una molécula fluorescente (fluorocromo). Dichas sondas son complementarias de regiones específicas de los ARN ribosómicos 16S, reconociendo dichas regiones en células fijadas e hibridando con ellas in situ, formando así un híbrido de doble cadena.

Una de las ventajas de la técnica de FISH es que se pueden usar 2 o más sondas simultáneamente en la misma preparación. Para identificar cada población o grupo de bacterias, son necesarias sondas específicas para cada una de ellas y para diferenciarlas en una misma muestra estas deberán marcarse con fluorocromos que emitan luz a diferente longitud de onda.

Del mismo modo una misma célula puede hibridarse con 2 o más sondas diferentes cuya diana sobre los ribosomas es diferente. Si cada sonda se marca con un fluorocromo diferente, la misma célula puede mostrar ambos colores. Esto permite trabajar con sondas diseñadas para detectar a diferentes niveles taxonómicos, por ejemplo género y especie. Debido a las regiones altamente conservables del ARNr 16S es posible distinguir los géneros o taxones superiores, como por ejemplo los tres reinos: arquea, eucariotas y eubacteria (Woese, 1987). Por otro lado, las especies o subespecies también pueden distinguirse mediante sondas complementarias a las regiones más variables (Stahl *et al.*, 1988)

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente Trabajo Final de Master es estudiar la dinámica poblacional de arqueas metanogénicas en un reactor anaerobio de membranas y su relación con los parámetros operacionales.

Los objetivos específicos se detallan a continuación:

- Identificar la población de arqueas metanogénicas en las muestras mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Cuantificar la población de arqueas metanogénicas en las muestras mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).
- Cuantificación de células totales con tinción de ADN celular mediante DAPI y microscopía de fluorescencia.
- Cuantificar la población de bacterias, arqueas y los diferentes órdenes de arqueas metanogénicas mediante FISH.
- Comparar los resultados obtenidos mediante FISH y PCR cuantitativa.
- Relacionar los cambios poblacionales con los parámetros operacionales del reactor.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. MUESTRAS ESTUDIADAS

Las muestras utilizadas para el estudio proceden de una planta piloto que se encuentra en la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) Carraixet, en Alboraya. Dicha planta piloto consta de un biorreactor anaerobio de membrana sumergida (SAnMBR) el cual se alimenta con el efluente del pretratamiento de la EDAR Carraixet (posterior al desbaste y tamizado y al desarenador-desengrasador).

##### 3.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA PILOTO

La planta se caracteriza por la combinación de un sistema de tratamiento anaerobio seguido de una etapa de ultrafiltración de fibra hueca sumergida en dos módulos.

Los elementos que componen la planta piloto son los siguientes (Figura 6):

- Rotofiltro (RTF): Después del pretratamiento en la EDAR, se lleva a cabo un pretratamiento más exhaustivo en un rotofiltro con una luz de paso de 0,5 mm para eliminar partículas gruesas que podrían perjudicar los elementos posteriores.
- Tanque de regulación (TR): Consiste en un depósito de 0,3 m<sup>3</sup> que incluye un sistema de agitación mecánica mediante paletas para homogeneizar y amortiguar las variaciones de carga.
- Reactor anaerobio (AnR): El agua es bombeada hasta un reactor anaerobio de 1,3 m<sup>3</sup> de volumen total en el que se deja un espacio de cabeza de 0,4 m<sup>3</sup> para el almacenamiento del biogás. Parte de este biogás es recirculado e inyectado de nuevo en el reactor para mantener una continua agitación, además de llevar a cabo una recirculación de fango. El reactor se encuentra rodeado de una camisa calefactora para permitir el control de la temperatura.
- Tanques de membrana (TM1 y TM2): Tras el reactor, se encuentran dos tanques de membrana de 0,8 m<sup>3</sup> cada uno, de los cuales 0,2 m<sup>3</sup> están destinados a la recolección y almacenamiento de biogás. Cada tanque incluye un módulo de membranas de ultrafiltración de 0,05 µm de diámetro de poro con una superficie total de filtración de 30 m<sup>2</sup> por módulo. Al igual que en el reactor, se produce una recirculación de biogás

para mantener los tanques homogeneizados y además minimizar la deposición de partículas en la superficie de las membranas.

- Desgasificadores (DV1 y DV2): Permiten la separación del biogás y el permeado, dado que el gas es arrastrado junto con la fase líquida al pasar por el sistema de filtración.
- Tanque CIP (Clean in place): Es un depósito de limpieza in situ de 0,2 m<sup>3</sup> en el que se almacena una parte del permeado para la posterior limpieza de las membranas.

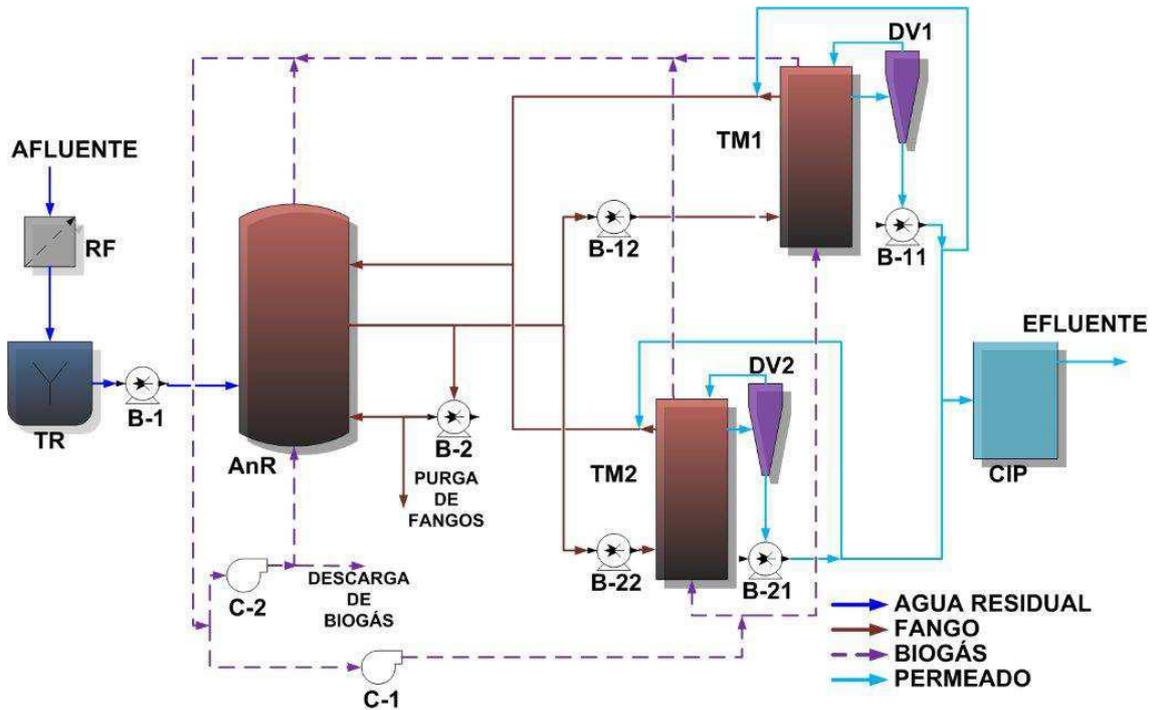


Figura 6. . Esquema de la planta piloto de reactor anaerobio de membrana sumergida (A. Jiménez, 2012).

### 3.1.2. TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras se lleva a cabo dos veces por semana en el afluente, efluente y en el propio reactor anaerobio. Las muestras utilizadas en el presente estudio se tomaron del reactor anaerobio entre marzo de 2015 y febrero de 2016.

Posteriormente a la toma, las muestras de fango son inmediatamente almacenadas en microtubos de 1 mL a -20 °C para caracterizar la población microbiana involucrada en el proceso de digestión anaerobia. Al mismo tiempo, también se fijaron muestras para su posterior análisis mediante FISH. Para ello se utilizó paraformaldehído (PFA) en el caso de las bacterias Gram negativas y etanol en el caso de las Gram positivas (ver protocolo en el ANEXO III)

### 3.1.3. PARÁMETROS DE FUNCIONAMIENTO/OPERACIÓN EN EL PERIODO DE ESTUDIO

Las condiciones del agua de entrada a la planta piloto y las del reactor, los parámetros operacionales y la producción de biogás y metano correspondiente a las fechas en las que se tomaron las muestras se muestran en las siguientes tablas (Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3).

Tabla 1. Caudal tratado, tiempo de retención celular (TRC), tiempo de retención hidráulico (TRH) y temperatura del reactor en las muestras estudiadas.

Muestra	Fecha	Tiempo acumulado	Caudal (L/d)	TRC (d)	TRH (h)	Tª (°C)
P1	13/03/2015	0	2169,2	70	22,2	26
P2	25/06/2015	104	2734,7	100	18,3	29
P3	13/08/2015	153	2699,4	100	18,5	32
P4	08/09/2015	179	2522,6	100	19,9	28
P5	01/02/2016	325	2132,0	140	24,0	28

Tabla 2. Condiciones del agua de entrada al reactor: demanda química de oxígeno (DQO) total, DQO consumida por bacterias sulfato reductoras, DQO disponible para las arqueas metanogénicas y sólidos suspendidos totales.

Muestra	S-SO <sub>4</sub> DQO (mg/L)	DQO total (mg/L)	DQO (mg/L) disponible metanogénicas	SST (mg/L)
P1	293	442	149,0	242
P2	253,9	452,9	199,0	132
P3	174	322,5	148,5	190
P4	181	414,5	233,0	248
P5	232	478,5	246,5	221

Tabla 3. Condiciones del agua en el reactor anaerobio de membrana: sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), porcentaje de metano generado (%CH<sub>4</sub>), volumen de metano generado (V CH<sub>4</sub>) y volumen de biogás generado.

Muestra	ST (mg/L)	SV (mg/L)	%CH <sub>4</sub>	V CH <sub>4</sub> (L/d)	V biogás (L/d)
P1	11033	7429	53,0	118,0	224,8
P2	11561,5	7868	44,8	88,3	197,1
P3	8525	5595	41,3	62,0	150,1
P4	9110,5	6083	28,7	67,7	235,9
P5	10198	6882	34,0	53,1	156,1

## 3.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qPCR)

### 3.2.1. EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN fue extraído mediante el kit comercial E.Z.N.A.<sup>®</sup> Soil DNA Kit de Omega Biotek (Figura 7) de acuerdo con las instrucciones del fabricante realizando pequeñas modificaciones (ANEXO I). Dicho procedimiento permite obtener un ADN celular de alta pureza a partir de muestras ambientales, así como llevar a cabo la correcta reacción en cadena de la polimerasa, al eliminar proteínas e inhibidores de la muestra.



Figura 7. Kit comercial E.Z.N.A. Soil DNA Kit para la extracción de ADN.

La solución obtenida se analizó posteriormente mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermo Scientific (Figura 8) para obtener la concentración de ADN de las muestras y comprobar su pureza realizando mediciones de absorción a 230, 260 y 280 nm.

Primeramente, se utilizaron 1,5  $\mu$ L de Elution Buffer (blanco) para calibrar las mediciones y a continuación se realizaron las medidas con 1,5  $\mu$ L de las muestras a analizar.



Figura 8. Espectrofotómetro NanoDrop 2000. Fuente: <https://goo.gl/JY2Ebe>

El programa proporciona la concentración de ADN en las muestras además de calcular los ratios de pureza a partir de la relación de absorbancia a 230, 260 y 280 nm. Una relación 260/280 de aproximadamente 1,8 es aceptable para un ADN puro. Si la relación es inferior, puede indicar la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorben cerca de los 280 nm. Por otro lado, la relación 260/230 se utiliza como una medida secundaria de la pureza con valores entre 2,0–2,2. En caso de que el ratio sea inferior, puede indicar presencia de otros contaminantes que absorben a 230 nm como algunos compuestos orgánicos (Thermo Scientific, technical buletin).

Por último, las muestras fueron alicuotadas a una concentración de 1 ng/ $\mu$ L para conservarlas a -20 °C para su posterior análisis.

### 3.2.2. AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE PCR

La PCR es un procedimiento que tiene como principal ventaja una alta especificidad y sensibilidad para detectar genes determinados o secuencias de genes conocidas. Durante el proceso se trabajó en una cabina de flujo laminar vertical Telstar Mini-V/PCR (Figura 9) para asegurar las condiciones de esterilidad. Dicha cabina cuenta con un sistema de radiación UV con el cual se esterilizaba el material a utilizar durante 15 minutos para la disociación de oligonucleótidos y así eliminar el riesgo de contaminación.



Figura 9. Cabina de flujo laminar vertical Telstar Mini-V/PCR.

Para llevar a cabo la PCR se emplearon los siguientes componentes:

- Buffer, MgCl<sub>2</sub> y Taq polimerasa: NZYtaq DNA polymerase de NZYTech.
- Nucleótidos trifosfato (dNTPs): dNTPs NZYMix de NZYTech.
- ADN
- Agua estéril, esterilizada mediante autoclave y filtrada por 0.22  $\mu\text{m}$  tras paso por luz UV.
- *Primers* Forward y Reverse para cada orden de arqueas metanogénicas, ordenados al fabricante Sigma Aldrich. En la siguiente tabla (Tabla 4), se muestran cada par de *primers* y su correspondiente secuencia.

Tabla 4. Secuencia de cada *primer* para amplificar los diferentes órdenes de arqueas estudiados, tamaño del amplicón generado y referencias.

Grupo objetivo	Nombre F/R	Tamaño amplicón (pb)	Secuencia 5' - 3'	Referencia
Gen <i>mcrA</i>	<i>mcrA</i> <i>mcrA</i> -rev	409	GGTGGTGTMGGDTTCACMCATTA CGTTCATBGCCTAGTTVGGRTAGT	Steinberg y Regan (2008)
Arqueas	921F M1100R	169	AGGAATTGGCGGGGAGCA CGGGTCTCGCTCGTTACC	Einen <i>et al.</i> (2008)
<i>Methanosarcinales</i>	812F 1159R	354	GTAACGATRYTCGCTAGGT GGTCCCCACAGWGTACC	Yu <i>et al.</i> (2005)
<i>Methanobacteriales</i>	MBT-857F MBT-929R	108	CGAAGGGAAGCTGTTAAGT TCCACGCGTTGTGGTGCT	Yu <i>et al.</i> (2005)
<i>Methanomicrobiales</i>	MMB-749F MMB-832R	84	TCCGACAGTGAGGAACGAAAGCTG CACCTAACGCGCATAGTTTAC	Yu <i>et al.</i> (2005)
<i>Methanococcales</i>	MCC-686F MCC-832R	152	TAGCGGTGAAATGCGTTGATCC CACCTAGTCCGCAGAGTTTA	Yu <i>et al.</i> (2005)

Los volúmenes adicionados de cada componente para obtener la concentración final deseada en el mix fueron los mostrados en la siguiente tabla (Tabla 5), siendo el volumen total de reacción de 25  $\mu$ L.

El ADN de cada muestra se introducía en su microtubo correspondiente de 200  $\mu$ L y por otro lado se preparaba el mix para n muestras + 1 (excluyendo el ADN), en tubos de 2 mL. Para ello se iban añadiendo los componentes del mix, añadiendo en último lugar la Taq Polimerasa que se conserva a -20 °C para dificultar su desnaturalización. Por último, se añadía la cantidad correspondiente de mix en los microtubos con ADN para llegar a los 25  $\mu$ L.

Tabla 5. Reactivos para realizar la PCR, volúmenes a añadir en el mix y concentraciones finales en la reacción para arqueas (ARC), *Methanosarcinales* (MSL), *Methanomicrobiales* (MMB), *Methanobacteriales* (MBT) y el gen *mcrA*.

Componente	ARC, MSL		MMB, MBT, <i>mcrA</i>	
	Volumen a añadir (μL)	Concentración mix	Volumen a añadir (μL)	Concentración mix
Buffer (10 X)	2,5	1,0	2,5	1,0
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,0	4,0	2,0	4,0
dNTPs (10 mM)	1,25	0,5	1,25	0,5
Forward (10 mM)	1,25	0,5	1,25	0,5
Reverse (10 mM)	1,25	0,5	1,25	0,5
Taq (5u/μL)	0,25	0,05	0,25	0,05
Muestra ADN (1 ng/μL)	1,25	0,05	12,5	0,5
H <sub>2</sub> O	15,25		4,0	
Total	25		25	

Cabe destacar que no se consiguieron amplificar los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales* y el gen *mcrA* con las concentraciones iniciales (las utilizadas para arqueas y *Methanosarcinales*). Para solventar dicho problema se fueron realizando variaciones (ver apartado 4.2) hasta encontrar las concentraciones idóneas (Tabla 5). En el caso del orden *Methanococcales*, no se consiguió la amplificación, por lo que en el resto el estudio no se ha tenido en cuenta dicho orden.

Una vez realizadas las mezclas, se llevó a cabo la amplificación del ADN en un termociclador Prime Thermal Cycler de Techne, donde las condiciones fueron las siguientes (Figura 10):

- Desnaturalización inicial: 10 minutos a 95 °C
  - Desnaturalización: 30 segundos a 95 °C
  - Anillamiento: 45 segundos a 60 °C
  - Elongación: 45 segundos a 72 °C
  - Elongación final: 10 minutos a 72 °C
  - Conservación a 4°C
- } Repetición 30 ciclos

a)



b)



Figura 10. a) Termociclador Prime Thermal Cycler y b) condiciones de amplificación.

Como ya se ha comentado anteriormente, al encontrar problemas a la hora de amplificar los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales* y el gen *mcrA*, también se aumentó el número de ciclos de 30 a 40 para optimizar el proceso.

### 3.2.3. COMPROBACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR MEDIANTE SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para evaluar si el ADN se ha amplificado correctamente y si se encuentran presentes en las muestras los órdenes estudiados, se realizaba la visualización de los productos obtenidos mediante electroforesis. Para ello se preparaba un gel de agarosa al 1% añadiendo 0,6 g de agarosa en 40 mL de TAE 50X (Tris-Acetato-EDTA) para mantener la carga negativa y uniforme de los grupos fosfato del ADN. La mezcla se disolvía llevándola a ebullición y después se dejaba enfriar ligeramente. A continuación se adicionaban 2  $\mu$ L de EuroSafe de EuroClone. Por último, se colocaba el peine en el molde y se vertía la mezcla, dejando solidificar a temperatura ambiente, como se observa en la siguiente imagen (Figura 11).

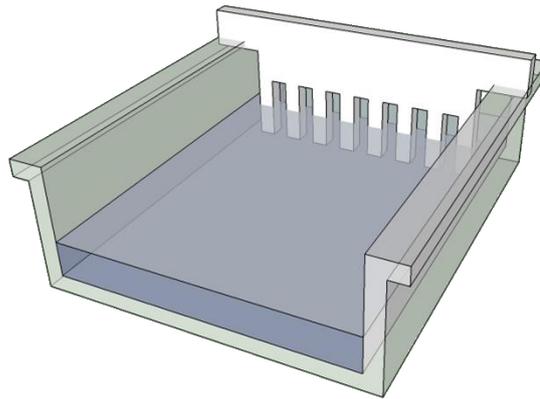


Figura 11. Molde para gel de electroforesis.

Una vez solidificado el gel de agarosa, se retiraba el peine y se vertía TAE sobre el recipiente hasta cubrir completamente el gel.

En el primer carril, se utilizaba un marcador de peso molecular NZYDNA Ladder VII de NZYTech que representa una escala a intervalos entre 100 y 3000 pares de bases en un total de 14 bandas (Figura 12).

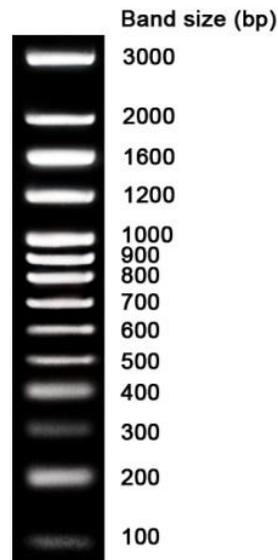


Figura 12. Marcador de peso molecular NZYDNA Ladder VII. *Modificado de <https://goo.gl/89uKjq>*

En el resto de carriles, se introducía una mezcla de 5  $\mu$ L de muestra y 2  $\mu$ L de buffer de carga 6X NZYDNA Loading Dye de NZYTech para aportar densidad a la muestra y facilitar la precipitación al fondo del pocillo. Además permite marcar el frente de avance de la

electroforesis, al contener tres colorantes diferentes (xileno cianol, azul de bromofenol y naranja G) que migran al mismo punto que los fragmentos de ADN de tamaño determinado.

Para realizar la comprobación de la correcta amplificación y los falsos positivos, se añadía un negativo (agua estéril sustituyendo al ADN) y un positivo. Para ello se utilizó un oligo sintético (ANEXO II) en el que se encuentran presentes las secuencias características de arqueas, los órdenes estudiados y el gen *mcrA*. La metodología aplicada para su diseño es una modificación del trabajo publicado por May *et al.* en 2015.

Tras la carga del gel, éste se sometía a una corriente eléctrica de 115 V durante 40 minutos.

Por último, el resultado era visualizado en un transluminador MiniBis Pro de DNR (Figura 13) mediante radiación ultravioleta. Dicho transluminador permite la adquisición de imágenes con una cámara de alta resolución mediante el programa informático Gel Capture de DNR.



Figura 13. Transluminador MiniBis Pro.

### 3.2.4. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qPCR)

La cuantificación de los diferentes órdenes de arqueas metanogénicas presentes en las muestras se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

Primeramente se realizó una calibración para cada orden. De esta manera, partiendo de la concentración conocida de ADN presente en el oligo sintético y el tamaño del amplicón resultante de la amplificación, se pudieron calcular el número de copias/mL del 16S rDNA tal y como se muestra en la siguiente fórmula (2) (Yu *et al*, 2005):

$$16S\ rDNA\ (copias/mL) = \frac{\text{concentración 16S rDNA (g/mL)} * 6,023^{23}(\text{copias/mol})}{\text{tamaño del amplicón 16S rDNA (bp)} * 660\ (g\ 16S\ rDNA/mol/bp)} \quad (2)$$

Para poder realizar la recta de calibrado, se efectuaron cuatro diluciones seriadas a 1:100 partiendo de una concentración de ADN de 0,1 ng/μL (1·10<sup>-7</sup> g/mL) para C1. De esta manera las restantes concentraciones fueron: 1·10<sup>-9</sup> g/mL para C2, 1·10<sup>-11</sup> g/mL para C3, 1·10<sup>-13</sup> g/mL para C4 y 1·10<sup>-15</sup> g/mL para C5. Los resultados obtenidos partiendo de la fórmula anterior fueron los siguientes (Tabla 6):

Tabla 6. Número de copias/mL en cada punto de la recta de calibrado y tamaño del amplicón para cada par *primers*.

<i>Primers</i>	Tamaño amplicón (bp)	C1 (copias/mL)	C2 (copias/mL)	C3 (copias/mL)	C4 (copias/mL)	C5 (copias/mL)
<b>mlas/mcraR</b>	409	2,23E+11	2,23E+09	2,23E+07	2,23E+05	2,23E+03
<b>ARC-931F/M1100R</b>	169	5,40E+11	5,40E+09	5,40E+07	5,40E+05	5,40E+03
<b>MSL-812F/1159R</b>	354	2,58E+11	2,58E+09	2,58E+07	2,58E+05	2,58E+03
<b>MBT-857F/929R</b>	108	8,45E+11	8,45E+09	8,45E+07	8,45E+05	8,45E+03
<b>MMB-749F/832R</b>	84	1,09E+12	1,09E+10	1,09E+08	1,09E+06	1,09E+04

Para amplificar el ADN en tiempo real (qPCR) se utilizaron los siguientes (Tabla 7):

- Oligo sintético.
- ADN (0,6 ng/μL).
- *Primers Forward y Reverse*.

- Power SYBR® Green PCR Master Mix de Thermo Fisher Scientific. El mix contiene dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Taq Polimerasa y SYBR® Green.
- Agua estéril.
- Placas para qPCR, MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode de Thermo Fisher.
- Film adhesivo MicroAmp® Optical Adhesive Film de Thermo Fisher.

El volumen total a añadir en cada pocillo de las placas era de 25  $\mu$ L. Primeramente se adicionaba el ADN, y en un tubo aparte de 2 mL se preparaba la mezcla con el mix y los *primers* para n muestras +1.

Para obtener la concentración final deseada de cada componente en cada pocillo, las cantidades a añadir fueron las siguientes (Tabla 7):

Tabla 7. Volúmenes a añadir en cada pocillo y concentración final de cada componente de la reacción para llevar a cabo la PCR cuantitativa.

Componente	Volumen a añadir ( $\mu$ L)	Concentración final
Power SYBR® Green	12	-
Forward (25 mM)	0,5	0,25
Reverse (25 mM)	0,5	0,25
Muestra ADN (0.6 ng/ $\mu$ L)	12,5	0,3
<b>Total</b>	25	-

Tanto la amplificación de las muestras como la del oligo sintético para el calibrado, se realizaba por triplicado para reducir los errores y obtener así un valor más fiable de la cuantificación. Además, se añadía, también por triplicado, la amplificación de un control negativo (NTC) para comprobar la ausencia de contaminación en el proceso.

De esta manera, el ejemplo de una placa de qPCR sería el siguiente (Tabla 8) (Figura 14):



Figura 14. MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode de Thermo Fisher

Tabla 8. Ejemplo de configuración de una placa de qPCR con amplificación del oligo sintético del calibrado (C1, C2, C3, C4y C5) y de las muestras a estudiar (P1, P2, P3, P4, P5).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	C1	C2	C3	C4	C5						
B	NTC	C1	C2	C3	C4	C5						
C	NTC	C1	C2	C3	C4	C5						
D												
E												
F	NTC	P1	P2	P3	P4	P5						
G	NTC	P1	P2	P3	P4	P5						
H	NTC	P1	P2	P3	P4	P5						

Una vez preparada la placa con todos los componentes, se procedía a su sellado con el film adhesivo y se llevaba a cabo la amplificación de ADN en un termociclador de PCR cuantitativa StepOnePlus™ Real-Time PCR System de Thermo Fisher Scientific (Figura 15).



Figura 15. Termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System. Fuente: <https://goo.gl/NarN3F>

Las condiciones de amplificación de tiempo y temperatura fueron las utilizadas para PCR.

A partir del valor del ciclo umbral (Ct) de las diferentes diluciones del oligo sintético y el logaritmo del número de copias/ $\mu$ L calculado anteriormente, se obtiene la recta de calibrado. Mediante la ecuación de la recta de regresión resultante se puede calcular el número de copias/ $\mu$ L en cada una de las muestras a estudiar, a partir del valor de Ct obtenido en estas (Figura 16).

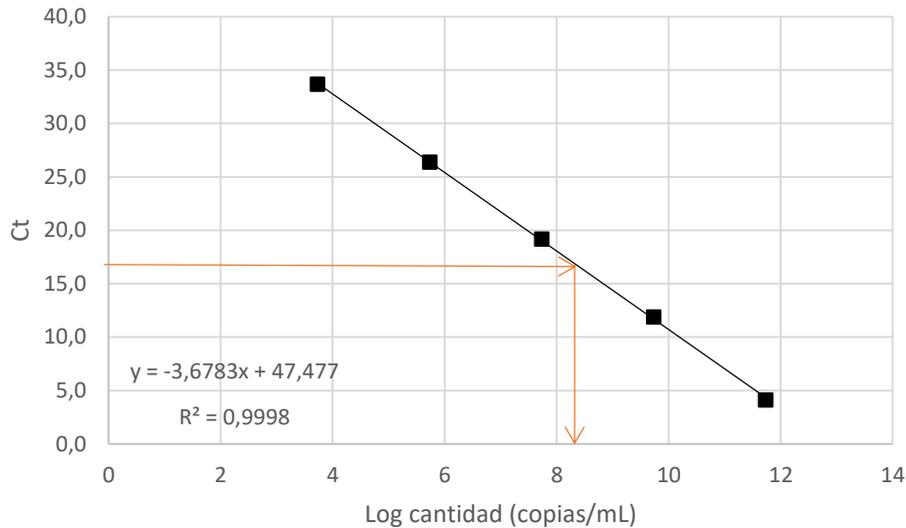


Figura 16. Ejemplo de recta de calibrado, ecuación de la recta, valor de  $R^2$  y cálculo de cantidad de copias a partir de un Ct.

Por ejemplo, a partir de un Ct de 16,7, y sustituyendo en la ecuación de la recta, se obtiene un logaritmo de la cantidad de 8,3, lo que da lugar a  $2,34 \cdot 10^8$  copias/mL (3).

$$16,7 = -3,6783x + 47,477 \rightarrow x = 8,3 \rightarrow 10^{8,3} = 2,34 \cdot 10^8 \quad (3)$$

### 3.3. TÉCNICAS BASADAS EN MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Las técnicas utilizadas en microscopía de fluorescencia y el procedimiento para llevarlas a cabo es el siguiente:

#### 3.3.1. DAPI

El marcador fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) se utilizó para teñir el ADN y de esta manera cuantificar el número de células totales presentes en las muestras, ya sean bacterias o arqueas.

Una vez fijadas las muestras en el portaobjetos (realizando el mismo procedimiento de fijación que para la hibridación mediante FISH, apartado 3.3.2, ANEXO III), el procedimiento es el siguiente:

- Añadir 10  $\mu\text{L}$  de DAPI a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en cada celda.
- Incubar en oscuridad durante 15 minutos.

- Lavar con agua Milli-Q.
- Dejar secar a temperatura ambiente.

### 3.3.2. HIBRIDACIÓN IN SITU CON SONDAS FLUORESCENTES (FISH)

La hibridación in situ con sondas fluorescentes se realizó para la identificación de bacterias, arqueas y los órdenes *Methanosarcinales*, *Methanobacterales* y *Methanomicrobiales*. Además de la identificación, también es posible realizar una cuantificación a partir de los resultados obtenidos en la tinción DAPI, mediante el análisis de las señales de FISH a partir de una imagen digital.

Las sondas utilizadas para ello, sus respectivas secuencias y el porcentaje de formamida necesario para realizar la hibridación son las siguientes (Tabla 9):

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

Objetivo	Sonda	Secuencia	% Formamida	Referencia
Bacterias (EUB MIX)	EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0-70%	Amann <i>et al.</i> (1990b)
	EUB338-II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	0-50%	Daims <i>et al.</i> (1999)
	EUB338-III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	0-50%	Daims <i>et al.</i> (1999)
Arqueas	ARC915	GTGCTCCCCGCAATTCCT	35%	Stahl & Amann (1991)
<i>Methanosarcinales</i>	MSMX860	GGCTCGCTTACGGCTTCCT	45%	Raskin <i>et al.</i> (1994)
<i>Methanomicrobiales</i>	MG1200b	CTGATAATTCGGGGCATGCTG	20%	Crocetti <i>et al.</i> (2006)
<i>Methanobacterales</i>	MB311	ACCTGTCTCAGGTTCCATCTCC	30%	Crocetti <i>et al.</i> (2006)

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-tetrametilrodamina), 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:

- Bacterias en FAM y arqueas en TAMRA
- Bacterias y arqueas en FAM y *Methanosarcinales* en TAMRA
- Bacterias y arqueas en FAM y *Methanomicrobiales* en TAMRA
- Bacterias y arqueas en FAM y *Methanobacteriales* en TAMRA

Una vez definida la configuración, la hibridación se llevó a cabo siguiendo el protocolo FISH para la detección de microorganismos en fangos activos (ANEXO III).

### 3.3.3. VISUALIZACIÓN EN EL MICROSCOPIO Y CUANTIFICACIÓN

La visualización de los resultados se realizó en un microscopio de epifluorescencia Leica DM 2500 (Figura 17) 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. La luz se refleja en un espejo dicromático e 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.

Los filtros de fluorescencia utilizados son los siguientes (Tabla 10):

Tabla 10. Filtros de excitación y supresor y espejos dicromáticos utilizados en el microscopio de fluorescencia. Donde BP es bandpass filter (únicamente deja pasar una cierta banda de longitud de onda) y LP es longpass filter (únicamente deja pasar grandes longitudes de onda).

Filter Cube	Excitation Range	Excitation Filter	Dichromatic Mirror	Suppression Filter
A	UV	BP 340-380	400	LP 425
I3	blue	BP 450-490	510	LP 515
N2.1	green	BP 515-560	580	LP 590



Figura 17. Microscopio Leica DM 2500. Fuente: <https://goo.gl/GSknez>

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

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 60X en 20 campos para el canal azul en el caso de DAPI y para los canales rojo y verde en el caso de FISH. Obtenidas las imágenes, fue utilizado un software de *Matlab* (Borrás, 2008) mediante el cual se descompone la imagen en una escala de grises, para posteriormente realizar una binarización (Figura 18 y Figura 19) 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*).

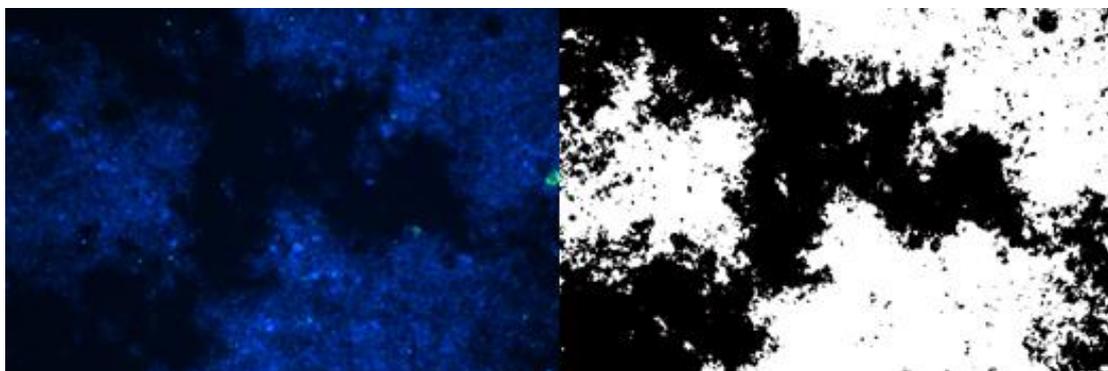


Figura 18. Ejemplo de binarización para llevar a cabo la cuantificación DAPI en Matlab.

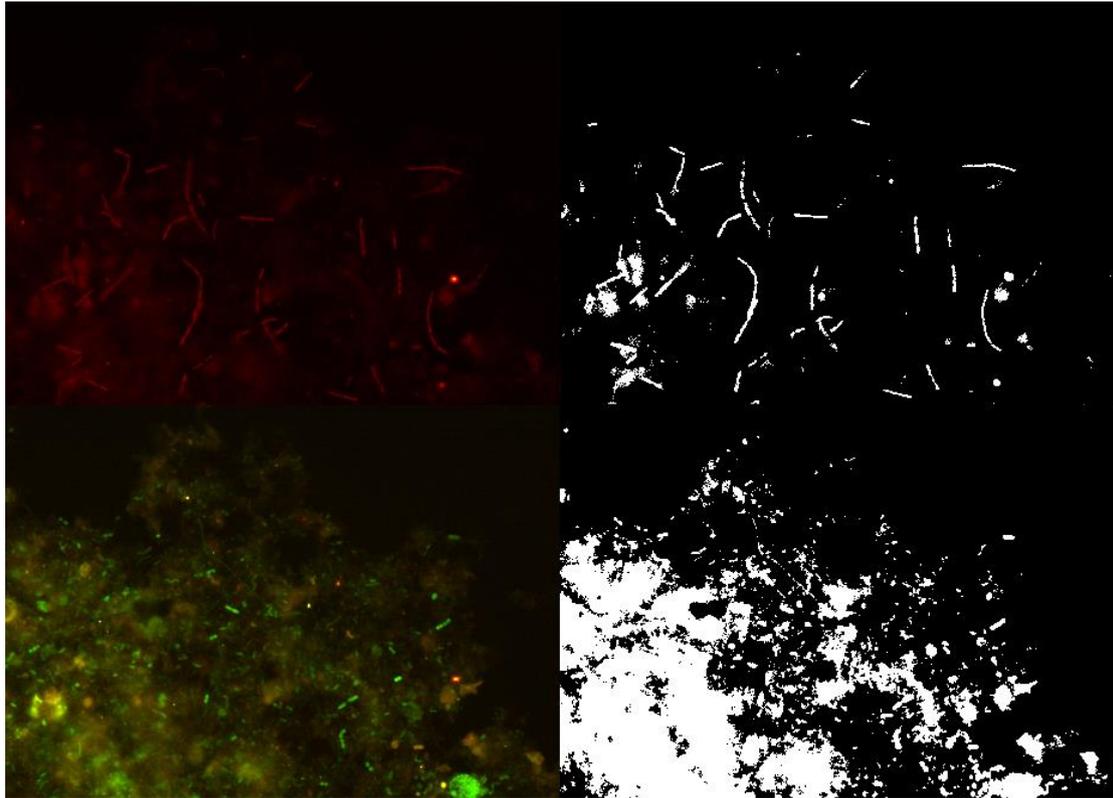


Figura 19. Ejemplo de binarización para llevar a cabo la cuantificación FISH en Matlab.

En el caso de DAPI, el software utilizado (Borrás, 2008) genera un archivo Excel con un recuento de los pixels en cada canal. A partir de una aproximación de 275 pixeles que ocupa una bacteria o arquea (célula) más su resplandor, obtiene el número aproximado de células en cada campo (foto) y la media de células/foto, además de la desviación estándar y la incertidumbre (medida de dispersión teniendo en cuenta el número de campos) (4) y un gráfico de barras donde se representan las células/campo y una media acumulada (Figura 20). Conociendo el diámetro del pocillo de 7000  $\mu\text{m}$ , se calculó el área total de este de 38484510  $\mu\text{m}^2$ . Sabiendo las dimensiones de las fotos de 1944x2592 pixeles y que un pixel son 0,063  $\mu\text{m}$ , se obtuvo un área de foto de 20024  $\mu\text{m}^2$ , por lo que se cubriría el área total del pocillo con 1922 fotos. De esta manera, a partir de la media de bacterias/foto, las fotos que se pueden realizar en un pocillo y la cantidad de muestra añadida al pocillo, se calcularon el número de células/mL.

$$\text{Incertidumbre} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (4)$$



### 3.4.1. MEDIA ARITMÉTICA

La media aritmética es el promedio de un conjunto de valores, siendo la medida de la tendencia central de dichos valores. La media se define por la siguiente ecuación (5):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (5)$$

Donde:

$\bar{X}$  = media aritmética

n = número de valores de la variable X

$X_i$  = valores de la variable X

### 3.4.2. DESVIACIÓN ESTÁNDAR

La desviación estándar o desviación típica es una medida de dispersión. Es necesario conocer la desviación que presentan los datos en su distribución respecto de la media aritmética. La desviación estándar se define por la siguiente ecuación (6), aplicando la corrección de Bessel, la cual consiste en el uso de n-1 en la fórmula de la desviación estándar para corregir el sesgo estadístico.

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (6)$$

Donde:

$\sigma$  = desviación estándar

$\bar{X}$  = media aritmética

N = número de valores de la variable X

$X_i$  = valores de la variable X

### 3.4.3. COEFICIENTE DE VARIACIÓN

El coeficiente de variación es la relación entre la desviación estándar de una muestra y su media, mostrando una mejor interpretación del grado de variabilidad que mediante la desviación estándar. El coeficiente de variación se define por la siguiente ecuación (7):

$$Cv = \frac{\sigma}{|\bar{x}|} \quad (7)$$

Donde:

Cv = coeficiente de variación

$\sigma$  = desviación estándar

$|\bar{X}|$  = media aritmética en valor absoluto

### 3.4.4. AJUSTE DE UNA RECTA POR MÍNIMOS CUADRADOS

Se conoce que la ecuación de una recta que relaciona dos magnitudes x e y es la siguiente ecuación lineal (8):

$$y = ax + b \quad (8)$$

Donde:

a = pendiente

b = ordenada en el origen

El método más efectivo para determinar los parámetros a y b se conoce como la técnica de mínimos cuadrados y se define por las siguientes ecuaciones (9) y (10):

$$a = \frac{n(\sum x_i y_i) - (\sum x_i)(\sum y_i)}{n(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2} \quad (9)$$

$$b = \frac{(\sum y_i) - a(\sum x_i)}{n} \quad (10)$$

Donde:

n = número de medidas

$X_i$  = valores de la variable X

$Y_i$  = valores de la variable Y

### 3.4.5. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE PEARSON Y COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN $R^2$

El coeficiente de correlación de Pearson es una medida de la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas. Se dice que la correlación es perfecta positiva cuando exactamente en la medida que aumenta una de ellas aumenta la otra, en cambio, la relación es perfecta negativa cuando en la medida que aumenta una variable disminuye la otra. Por lo tanto el coeficiente de correlación de Pearson oscila entre -1 y +1 y se define por la siguiente ecuación (11), aunque comúnmente se suele utilizar el coeficiente de determinación  $R^2$ , que es simplemente el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson, evitando de esta manera los valores negativos.

$$r_{xy} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}} \quad (11)$$

Donde:

$X_i$  = valores de la variable X

$\bar{X}$  = media aritmética de la variable X

$Y_i$  = valores de la variable Y

$\bar{Y}$  = media aritmética de la variable Y

### 3.4.6. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)

El método de componentes principales permite estudiar la relación entre variables, es decir, estudiar su interdependencia. El objetivo es transformar un conjunto de variables originales en un nuevo conjunto de variables escaladas a varianza unitaria y desviación 0, denominadas componentes principales. Éstas se expresan como una combinación lineal de las variables originales, de las cuales únicamente se seleccionan las aquellas que expliquen una mayor variabilidad entre las muestras, aquellas que tienen un mayor peso en el análisis. Por ello, el PCA es considerado un buen método de reducción de datos que detecta las correlaciones más destacadas entre variables sin tener que reducir el volumen de información.

Por lo general, el análisis de componentes principales se representa en dos dimensiones en una escala de -1 a 1 para dos componentes principales ortogonales entre sí. En ellas se pueden

observar las proyecciones de las variables originales sobre las nuevas componentes obtenidas. Estas son un conjunto de vectores con partida en el origen y cuya longitud equivale a la contribución en la formación de dicha componente, ya que se calcula a partir de la desviación estándar de la variable.

Por último, a partir de un PCA es posible obtener el carácter de la correlación entre dos variables mediante el cálculo del coseno del ángulo conformado entre dos variables. Dos variables están correlacionadas entre sí positivamente si el ángulo formado por sus dos vectores es pequeño, mientras que por el contrario, si el ángulo formado es cercano a  $180^\circ$ , la correlación es negativa. En el caso de que el ángulo formado se cercano a  $90^\circ$ , la correlación será nula.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas utilizadas en el estudio son los siguientes:

### 4.1. EXTRACCIÓN DE ADN

En la tabla siguiente (Tabla 11) se muestran los resultados de la extracción de ADN de las muestras.

Tabla 11. Concentración y pureza medida mediante los ratios 260/280 y 260/230 de la extracción de ADN de las muestras estudiadas.

Muestra	Concentración ADN (ng/μL)	Ratio 260/280	Ratio 260/230
13/03/2015	49,80	1,92	1,47
25/06/2015	54,10	1,92	0,27
13/08/2015	80,90	1,89	1,78
08/09/2015	72,50	1,88	1,88
01/02/2016	185,00	1,90	0,65

Como se puede comprobar, en todas las extracciones se ha obtenido una concentración de ADN suficiente (>1 ng/μL) para poder realizar la posterior amplificación del ADN mediante PCR. En cuanto a la pureza de las muestras, éstas presentan valores superiores pero muy cercanos a 1,8 para el ratio 260/280, por lo que se puede confirmar que el ADN extraído es de alta pureza y no presenta contaminación por proteínas. No ocurre lo mismo para el ratio 260/230, el cual presenta valores muy inferiores al rango óptimo de 2,0–2,2 en dos de las muestras, aunque dicho ratio no supone un grave problema al tratarse de un indicador secundario de pureza y sólo indica contaminación por algunos compuestos orgánicos que absorben a 230 nm como hidratos de carbono o fenoles.

### 4.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La PCR se aplicó para la identificación de los siguientes grupos: arqueas y los órdenes *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* y *Methanococcales* a partir del gen 16S rDNA y arqueas metanogénicas mediante el gen mcrA.

Dada la dificultad encontrada a la hora de amplificar los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales* y el gen *mcrA*, se optimizó la identificación de estos grupos. Para ello se fueron realizando variaciones en las concentraciones de ADN. Primeramente, se duplicó la cantidad de ADN añadida, pasando de 1,25  $\mu\text{L}$  a 2,5  $\mu\text{L}$  sin obtener resultados. Seguidamente se multiplicó por 5, pasando a añadir 6,25  $\mu\text{L}$  de ADN. De esta manera, se siguió sin conseguir la amplificación, por lo que se volvió a aumentar la cantidad de ADN a 12,5  $\mu\text{L}$  y además se aumentaron el número de ciclos de 30 a 40 para obtener mayor número de copias del fragmento amplificado. Estas dificultades son debidas, como se puede comprobar en los resultados de la cuantificación mediante qPCR (ver apartado 4.3.2), a que los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales* se encuentran en minoría en las muestras estudiadas, por lo que es necesario aumentar la concentración de ADN. En cuanto al gen *mcrA*, fue necesario optimizar las condiciones para su amplificación dado que presenta una secuencia y longitud diferente al gen 16S rDNA.

Para visualizar los resultados de PCR se fueron ajustando los tiempos en la electroforesis hasta poder observar correctamente el marcador de peso molecular, para facilitar así, la identificación del tamaño del fragmento obtenido en la amplificación.

Las siguientes imágenes de electroforesis (Figura 22, Figura 23, Figura 24) muestran la correcta amplificación del ADN y por lo tanto la existencia en las muestras estudiadas de Arqueas, los órdenes *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales*, además de la amplificación en el gen *mcrA*. Esto se puede comprobar con la correcta posición de las bandas, que indican el tamaño del amplicón (ver Tabla 4), en el gel. Para ello la banda se debe encontrar en el lugar correspondiente a su tamaño de amplicón respecto a las bandas del marcador de peso molecular.

En el caso del orden *Methanococcales*, era de esperar su ausencia en las muestras estudiadas dado que suelen crecer en ambientes de elevada salinidad (Esteves, 2014; Whitman & Jeanthon, 2003).

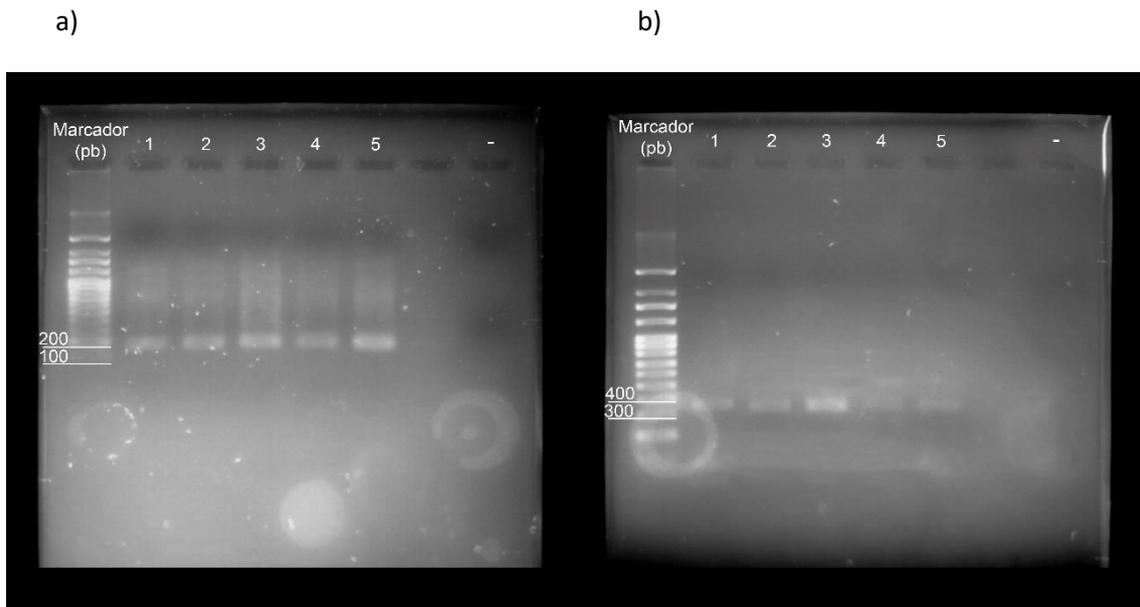


Figura 22. Imágenes de electroforesis para comprobar la amplificación de a) Arqueas y b) el orden *Methanosarcinales* respectivamente.

Se puede comprobar como para arqueas, el tamaño del amplicón se encuentra entre 200 y 100 pb, siendo este de 169 pb. En el caso del orden *Methanosarcinales*, cuyo amplicón es de 354 pb, éste se encuentra entre 300 y 400 pb. La ausencia de bandas en los controles negativos indican la ausencia de falsos positivos y contaminación.

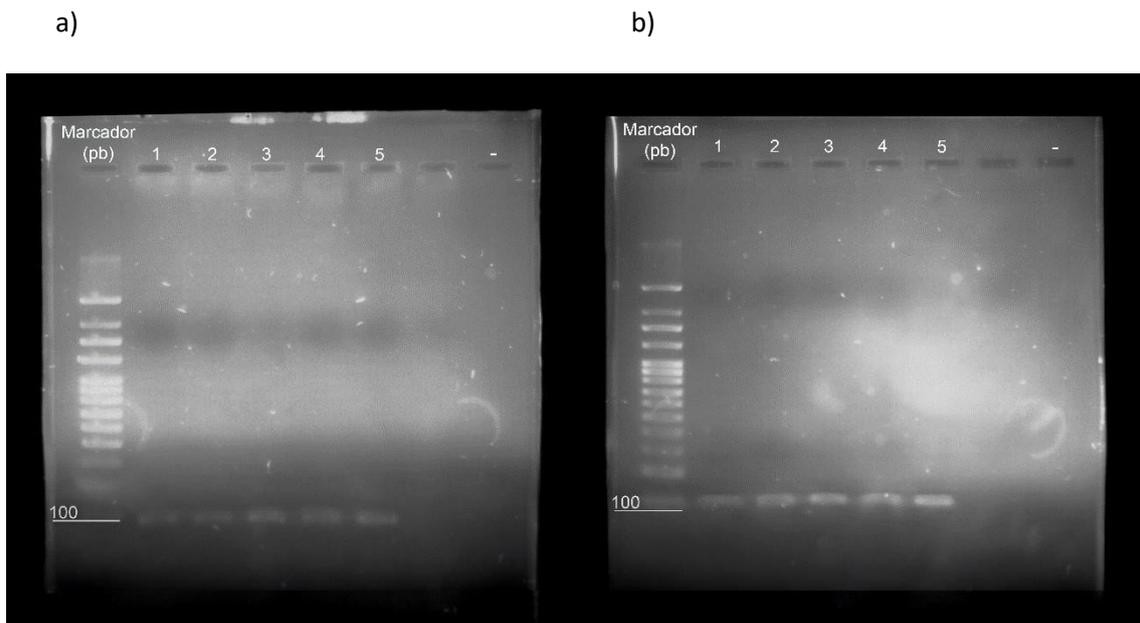


Figura 23. Imágenes de electroforesis para comprobar la amplificación de a) el orden *Methanomicrobiales* y b) el orden *Methanobacteriales* respectivamente.

Para los órdenes *Methanomicrobiales* y *Methanobacteriales*, el tamaño de amplicón debe ser de 84 y 108 pb respectivamente. Se puede comprobar como en el caso de MMB el amplicón no llega a las 100 pb y para MBT, se encuentra justo en la banda de 100 pb.

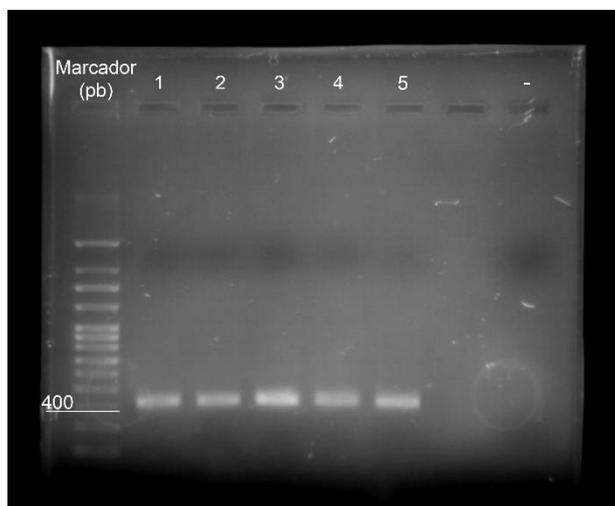


Figura 24. Imágenes de electroforesis para comprobar la amplificación del gen mcrA.

En cuanto a la amplificación del gen mcrA, el amplicón resultante debe ser de 409 pb, y se puede observar cómo se encuentra en la banda de las 400 pb.

Al comprobarse la existencia de dichos órdenes en las muestras y conocer las condiciones idóneas para llevar a cabo con éxito la amplificación de ADN, se procedió a realizar la cuantificación mediante qPCR.

### 4.3. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

#### 4.3.1. RECTAS DE CALIBRADO

Para poder realizar una cuantificación de las arqueas a estudiar, es necesaria una recta de calibrado, obtenida a partir del valor Ct de diferentes diluciones de una muestra con una cantidad de copias conocida. Dicho valor Ct promedio obtenido de los triplicados, además del cálculo de la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada cantidad de copias/mL y el logaritmo de dicha cantidad, se muestra en las siguientes tablas (Tabla 12, Tabla 13, Tabla 14, Tabla 15 y Tabla 16). Los datos se han graficado (Ct/log cantidad (copias/mL)) (Figura 25,

Figura 26, Figura 27, Figura 28 y Figura 29) dando lugar a las rectas de calibrado, en las que se muestra la ecuación de la recta y el valor de  $R^2$ .

Las rectas de calibrado tanto para arqueas, los órdenes estudiados y el gen *mcrA* son las siguientes:

- Recta de calibrado utilizada para la cuantificación de arqueas.

Tabla 12. Cantidad (copias/mL), logaritmo de la cantidad, Ct promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los triplicados para la calibración de arqueas.

Cantidad (copias/mL)	Log cantidad	Ct promedio	Desviación estándar	Coficiente Variación
5,40E+11	11,7	4,1	0,02	0,004
5,40E+09	9,7	11,9	0,10	0,008
5,40E+07	7,7	19,2	0,06	0,003
5,40E+05	5,7	26,4	0,18	0,007
5,40E+03	3,7	33,7	0,19	0,006

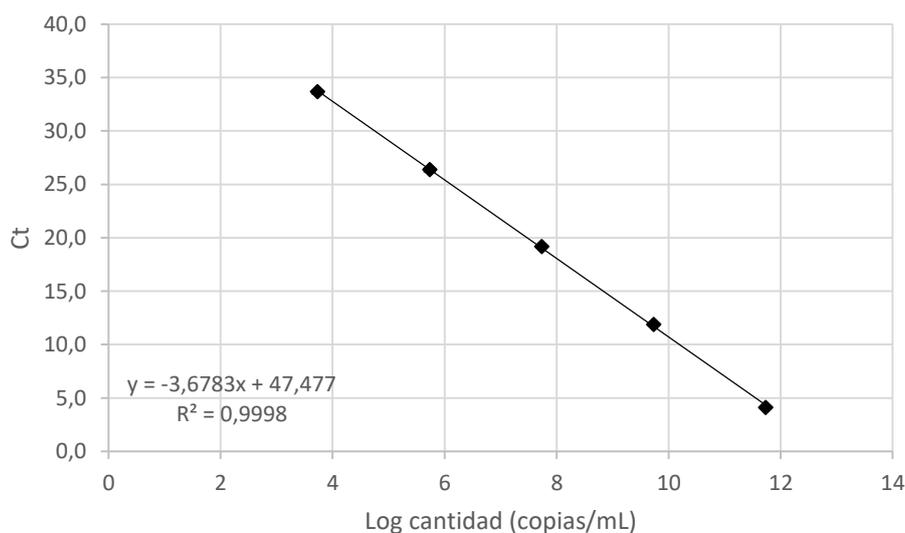


Figura 25. Recta de calibrado utilizada en la cuantificación de arqueas, ecuación de la recta y valor de  $R^2$ .

La recta de calibrado presentó un  $R^2$  de 0,9998 (Figura 25) indicando una buena correlación entre el valor de Ct y el número de copias de ADN. La eficiencia de la técnica fue del 87%, un valor comprendido entre  $100 \pm 20\%$ . Los coeficientes de variación menores a 0,1 indican una muy reducida variabilidad de los datos respecto de la media (Tabla 12).

- Recta de calibrado utilizada para la cuantificación del orden *Methanosarcinales*.

Tabla 13. Cantidad (copias/mL), logaritmo de la cantidad, Ct promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los triplicados para la calibración del orden *Methanosarcinales*.

Cantidad (copias/mL)	Log cantidad	Ct promedio	Desviación estándar	Coefficiente Variación
2,58E+10	10,4	9,7	0,28	0,029
2,58E+08	8,4	18,4	0,11	0,006
2,58E+06	6,4	26,9	0,15	0,006
2,58E+04	4,4	33,9	0,27	0,008

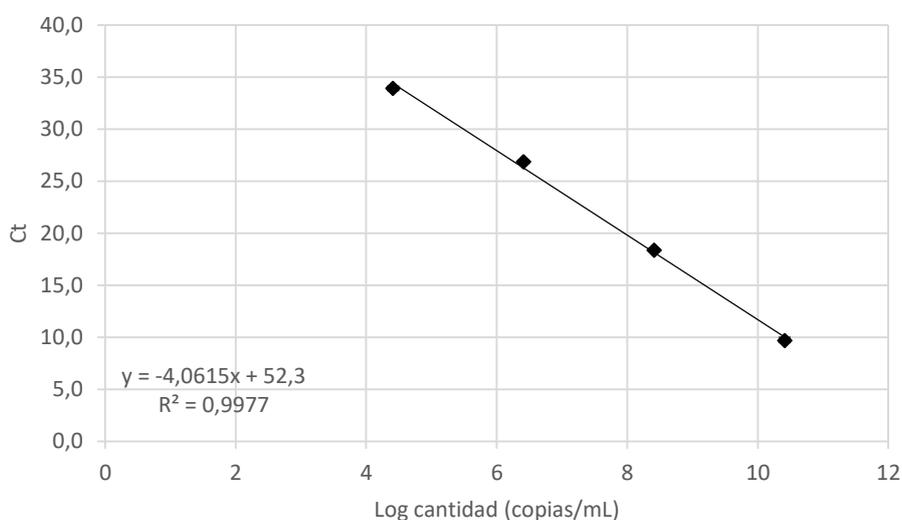


Figura 26. Recta de calibrado utilizada en la cuantificación del orden *Methanosarcinales*, ecuación de la recta y valor de  $R^2$ .

Cabe destacar que se encontraron dificultades a la hora de realizar la calibración de dicho orden. Los Ct obtenidos para las concentraciones de 2.58E+11 y 2.58E+3 copias/mL se desviaron demasiado de la línea de tendencia, por lo que se realizó la calibración de nuevo, esta vez comenzando las diluciones a partir de 2.58E+10 copias/mL y hasta 2.58E+4 copias/mL. De esta manera, la recta de calibrado presentó un  $R^2$  de 0,9977 (**¡Error! No se encuentra el rigen de la referencia.**) indicando una buena correlación entre el valor de Ct y el número de copias de ADN. La eficiencia de la técnica fue del 76%, un valor alejado del rango óptimo, pero encontrándose muy cercano. Esta disminución en la eficiencia es causada por el tamaño del amplicón generado en el proceso (354 pb), dado que el rango óptimo para llevar a cabo una correcta amplificación es de 50-150 pb (Thermo Fisher Scientific, 2011). Los coeficientes de

variación menores a 0,1 indican una muy reducida variabilidad de los datos respecto de la media (Tabla 13).

- Recta de calibrado utilizada para la cuantificación del orden *Methanobacteriales*.

Tabla 14. Cantidad (copias/mL), logaritmo de la cantidad, Ct promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los triplicados para la calibración del orden *Methanobacteriales*.

Cantidad (copias/mL)	Log cantidad	Ct promedio	Desviación estándar	Coficiente Variación
8,45E+09	9,9	9,4	0,03	0,003
8,45E+07	7,9	16,9	0,13	0,008
8,45E+05	5,9	23,8	0,06	0,003
8,45E+03	3,9	30,9	0,49	0,016

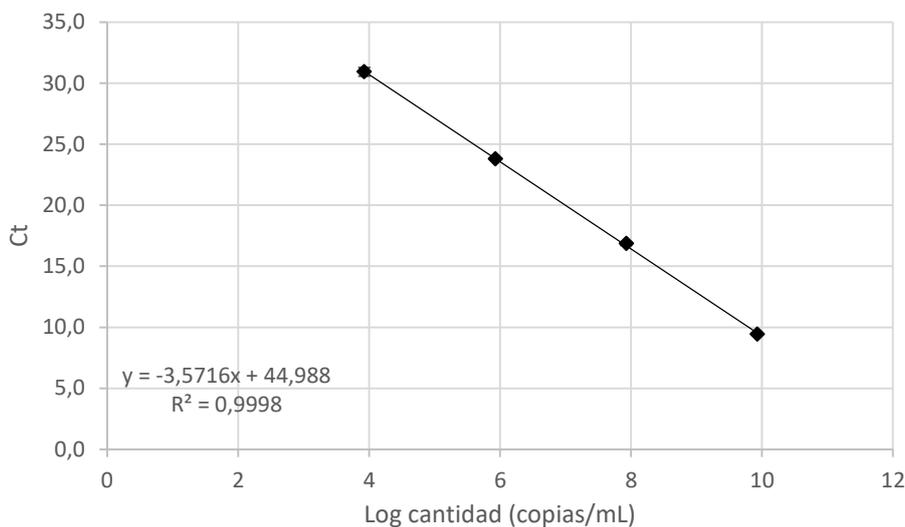


Figura 27. Recta de calibrado utilizada en la cuantificación del orden *Methanobacteriales*, ecuación de la recta y valor de  $R^2$ .

El quinto punto correspondiente a 8,45E+011 copias/mL no obtuvo valor de Ct en ninguno de los triplicados al tratarse de una elevada cantidad de copias y superar el umbral en un ciclo demasiado inicial. De esta manera, la recta de calibrado presentó un  $R^2$  de 0,9998 (Figura 27) indicando una buena correlación entre el valor de Ct y el número de copias de ADN. La eficiencia de la técnica fue del 91%, un valor comprendido en el rango óptimo. Los coeficientes de variación menores a 0,1 indican una muy reducida variabilidad de los datos respecto de la media (Tabla 14).

- Recta de calibrado utilizada para la cuantificación del orden *Methanomicrobiales*.

Tabla 15. Cantidad (copias/mL), logaritmo de la cantidad, Ct promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los triplicados para la calibración del orden *Methanomicrobiales*.

Cantidad (copias/mL)	Log cantidad	Ct promedio	Desviación estándar	Coefficiente Variación
1,09E+10	10,0	10,4	0,33	0,032
1,09E+08	8,0	17,9	0,20	0,011
1,09E+06	6,0	24,3	0,09	0,004
1,09E+04	4,0	31,8	0,47	0,015

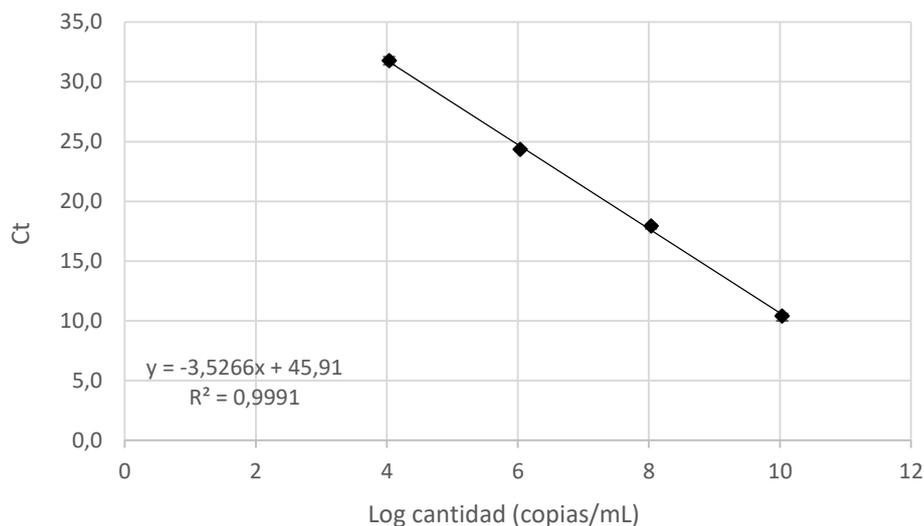


Figura 28. Recta de calibrado utilizada en la cuantificación del orden *Methanomicrobiales*, ecuación de la recta y valor de  $R^2$ .

Como ha ocurrido en la recta de calibrado del orden anterior, el quinto punto correspondiente a  $1,09E+012$  copias/mL no obtuvo valor de Ct. De esta manera, la recta de calibrado presentó un  $R^2$  de 0,9991 (Figura 28) indicando una buena correlación entre el valor de Ct y el número de copias de ADN. La eficiencia de la técnica fue del 92%, un valor comprendido en el rango óptimo. Los coeficientes de variación menores a 0,1 indican una muy reducida variabilidad de los datos respecto de la media (Tabla 15).

- Recta de calibrado utilizada para la cuantificación del gen *mcrA*.

Tabla 16. Cantidad (copias/mL), logaritmo de la cantidad, Ct promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los triplicados para la calibración del gen *mcrA*.

Cantidad (copias/mL)	Log cantidad	Ct promedio	Desviación estándar	Coficiente Variación
2,23E+11	11,3	5,4	0,04	0,007
2,23E+09	9,3	15,0	0,14	0,009
2,23E+07	7,3	24,2	0,08	0,003
2,23E+05	5,3	31,9	0,17	0,005

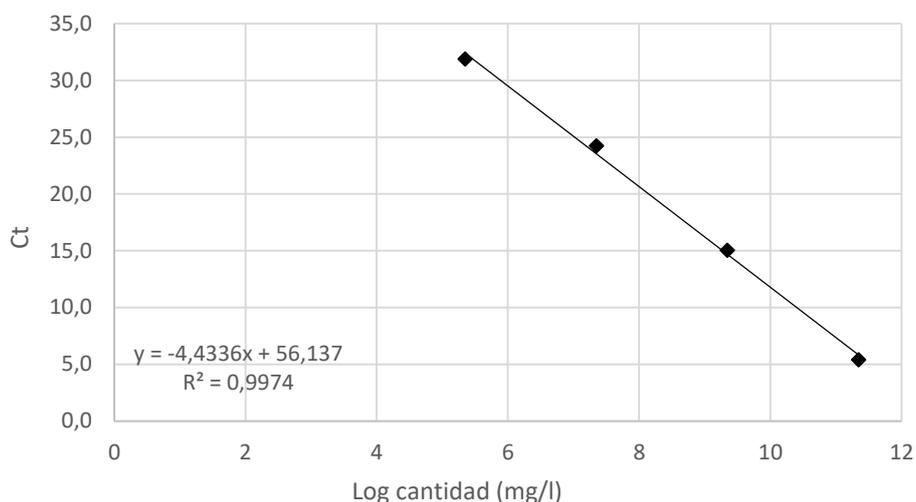


Figura 29. Recta de calibrado utilizada en la cuantificación del gen *mcrA*, ecuación de la recta y valor de  $R^2$ .

La recta de calibrado presentó un  $R^2$  de 0,9974 (Figura 29) indicando una buena correlación entre el valor de Ct y el número de copias de ADN. La eficiencia de la técnica fue del 68%, un valor alejado de rango óptimo debido al tamaño del amplicón (409 pb). Los coeficientes de variación menores a 0,1 indican una muy reducida variabilidad de los datos respecto de la media (Tabla 16).

En cuanto a las eficiencias de amplificación, éstas disminuyen a medida que aumenta la longitud del amplicón (Debode *et al.*, 2017). El fabricante del reactivo SYBR Green utilizado también advierte de la pérdida de eficiencia en la amplificación según el tamaño de amplicón y recomienda una longitud de 50 a 150 pb (Thermo Fisher Scientific, 2011).

La siguiente tabla confirma dicha relación entre la eficiencia de la amplificación y tamaño del amplicón para arqueas, los órdenes estudiados y el gen *mcrA* (Tabla 17).

Tabla 17. Eficiencia obtenida según el tamaño del amplicón generado en la amplificación de arqueas, los órdenes *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales* y el gen *mcrA*.

Grupo estudiado	Longitud amplicón (pb)	Eficiencia (%)
<i>Methanomicrobiales</i>	84	92%
<i>Methanobacteriales</i>	108	91%
Arqueas	169	87%
<i>Methanosarcinales</i>	354	76%
<i>mcrA</i>	409	68%

Grandes tamaños de amplicón llevan ligada una menor eficiencia, dado que puede haber fragmentos de éste que no puedan llegar a amplificarse correctamente durante el proceso, obteniendo una pendiente de la recta de calibrado menor que el valor óptimo (-3,32), el cual da un valor de eficiencia del 100% (Yun *et al.*, 2006). Esto repercutirá en el cálculo de las copias al realizar la posterior cuantificación, las cuales se verán disminuidas (ver cálculo en apartado 3.2.4).

En este caso, y para evitar los errores en la cuantificación debidos a la eficiencia, habría que rediseñar el oligo sintético para *mcrA* y el orden *Methanosarcinales* para amplificar un fragmento más corto que diera lugar a amplicones más pequeños, y por lo tanto, a una mayor eficiencia de la técnica. Por otro lado, podría realizarse un cambio en el fluorocromo intercalar SYBR Green por sondas TaqMan, diseñadas para incrementar la especificidad de la PCR cuantitativa. Dichas sondas son específicas para cada estudio e hibridan específicamente en producto de PCR obtenido (amplicón). De esta manera, la fluorescencia emitida está relacionada directamente con la cantidad de amplicón producido.

#### 4.3.2. RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN MEDIANTE qPCR

A partir de las rectas de calibrado y su ecuación, se calcularon las copias/mL mediante el Ct promedio del triplicado de las diferentes muestras estudiadas.

Los Ct obtenidos para cada muestra, su desviación estándar, el coeficiente de variación y el número de copias/mL calculadas, son los siguientes (Tabla 18, Tabla 19, Tabla 20, Tabla 21 y Tabla 22):

Tabla 18. Ct promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y cantidad de copias/mL calculados para arqueas.

Muestra	Ct promedio	Desviación Estándar	Coeficiente Variación	Cantidad (copias/mL)
P1	16,7	0,18	0,011	2,34E+08
P2	16,9	0,09	0,006	2,05E+08
P3	15,8	0,16	0,010	4,01E+08
P4	16,5	0,10	0,006	2,64E+08
P5	17,8	0,23	0,013	1,15E+08

Tabla 19. Ct promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y cantidad de copias/mL calculados para el orden *Methanosarcinales*.

Muestra	Ct promedio	Desviación Estándar	Coeficiente Variación	Cantidad (copias/mL)
P1	19,3	0,15	0,008	1,31E+08
P2	19,5	0,06	0,003	1,17E+08
P3	18,4	0,05	0,003	2,17E+08
P4	19,1	0,06	0,003	1,53E+08
P5	21,5	0,07	0,003	3,75E+07

Tabla 20. Ct promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y cantidad de copias/mL calculados para el orden *Methanobacteriales*.

Muestra	Ct promedio	Desviación Estándar	Coeficiente Variación	Cantidad (copias/mL)
P1	26,6	0,03	0,001	1,40E+05
P2	26,9	0,09	0,003	1,18E+05
P3	26,1	0,05	0,002	2,00E+05
P4	27,0	0,06	0,002	1,11E+05
P5	25,1	0,06	0,002	3,61E+05

Tabla 21. Ct promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y cantidad de copias/mL calculados para el orden *Methanomicrobiales*.

Muestra	Ct promedio	Desviación Estándar	Coeficiente Variación	Cantidad (copias/mL)
P1	25,2	0,34	0,014	7,54E+05
P2	23,7	0,65	0,027	2,18E+06
P3	19,4	0,27	0,014	3,22E+07
P4	20,9	0,16	0,008	1,20E+07
P5	20,8	0,22	0,011	1,36E+07

Tabla 22. Ct promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y cantidad de copias/mL calculados para la amplificación en el gen mcrA.

Muestra	Ct promedio	Desviación Estándar	Coeficiente Variación	Cantidad (copias/mL)
P1	25,0	0,25	0,010	1,06E+07
P2	24,3	0,11	0,005	1,48E+07
P3	24,9	0,22	0,009	1,11E+07
P4	25,4	0,09	0,004	8,45E+06
P5	26,9	0,05	0,002	3,85E+06

Se puede comprobar como en todos los casos las amplificaciones se han realizado correctamente y con una alta precisión dado que las desviaciones estándar y los coeficientes de variación indican una muy reducida variabilidad en los resultados de los triplicados. Además, los controles negativos no han sufrido amplificación, por lo que no ha habido presente contaminación de las muestras ni falsos positivos en las amplificaciones (datos no mostrados).

Pero estos resultados obtenidos mediante qPCR están sobreestimados dado que cada organismo puede contener más de una copia del gen estudiado y puede influir a la hora de estudiar la población (Větrovský & Baldrian, 2013). Es por esto que fue necesario corregir el número de copias/mL para obtener el número de células/mL. A partir de la base de datos de rrnDB (<https://goo.gl/BRbV54>) es posible conocer el número de copias del gen 16S en cada organismo y calcular un valor promedio para el orden estudiado (ANEXO IV). De esta manera los resultados corregidos expresados en células/mL son los siguientes (Tabla 23):

Tabla 23. Cantidad de células/mL calculadas para arqueas, *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales*, teniendo en cuenta una cantidad de copias del gen de 2,3; 2,5; 2,4 y 2 respectivamente.

Muestra	Arqueas (células/mL)	<i>Methanosarcinales</i> (células/mL)	<i>Methanobacteriales</i> (células/mL)	<i>Methanomicrobiales</i> (células/mL)
P1	1,01E+08	5,15E+07	5,83E+04	3,77E+05
P2	8,85E+07	4,61E+07	4,93E+04	1,09E+06
P3	1,74E+08	8,54E+07	8,33E+04	1,61E+07
P4	1,14E+08	6,02E+07	4,63E+04	6,02E+06
P5	4,96E+07	1,48E+07	1,50E+05	6,79E+06

En la siguiente gráfica (Figura 30) se muestran las variaciones en las diferentes muestras de la población de arqueas totales y los órdenes de metanogénicas.

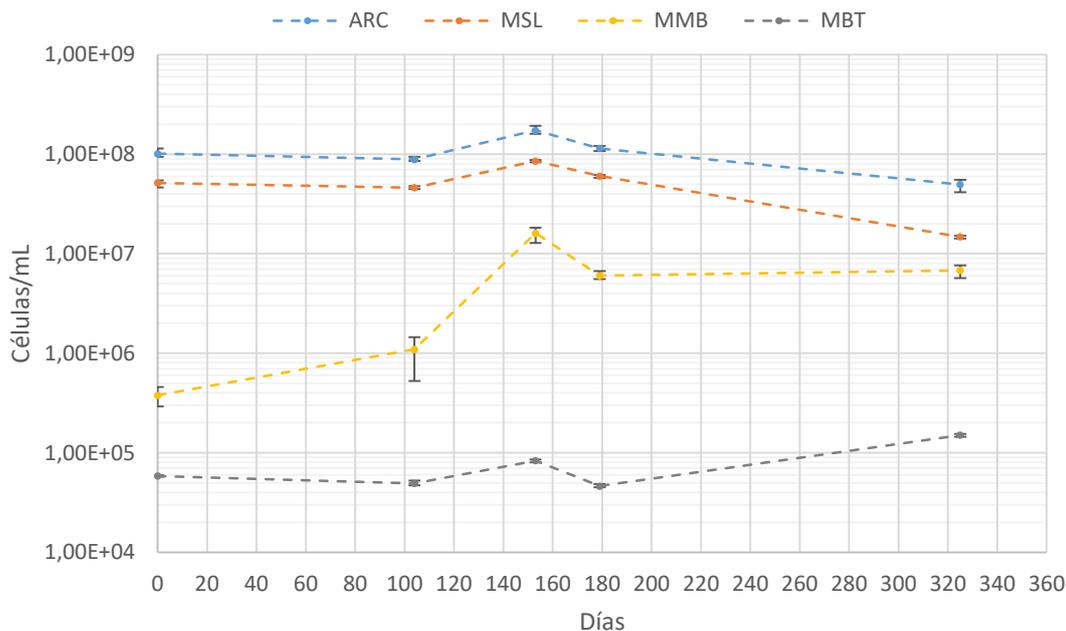


Figura 30. Cantidad de células/mL calculadas para arqueas (ARC), *Methanosarcinales* (MSL), *Methanobacteriales* (MBT) y *Methanomicrobiales* (MMB) mostrando el resultado en una escala de tiempo en días.

El rango de concentración calculada de arqueas es de  $1,74 \pm 0,2 \times 10^8$  a  $4,96 \pm 0,8 \times 10^7$  células/mL. El rango de los órdenes *Methanosarcinales* es de  $8,54 \pm 0,3 \times 10^7$  a  $1,48 \pm 0,06 \times 10^7$  células/mL, *Methanomicrobiales* de  $1,61 \pm 0,3 \times 10^7$  a  $3,77 \pm 0,8 \times 10^5$  células/mL, y *Methanobacteriales* de  $1,50 \pm 0,06 \times 10^5$  a  $4,63 \pm 0,2 \times 10^4$  células/mL. De esta manera se puede comprobar como el orden que presenta un rango mayor es *Methanomicrobiales*, habiendo mucha diferencia entre la muestra con mayor y menor cantidad.

El orden *Methanosarcinales* es el predominante durante todo el periodo, siendo el orden *Methanomicrobiales* el segundo más importante y encontrándose en minoría el orden *Methanobacteriales*. La representación obtenida resulta similar a la de los 21 digestores estudiados por Raskin *et al.* (1995), los cuales presentaban grandes variaciones en diseño y operación, pero en los cuales la representación de los órdenes de arqueas metanogénicas resultó muy similar, además de la ausencia del orden *Methanococcales*.

La tendencia del orden *Methanobacteriales* es similar a la del orden *Methanosarcinales*, exceptuando la muestra P5, en la cual la tendencia se invierte y se produce un aumento en la población. El orden *Methanomicrobiales* no sigue las tendencias anteriores sufriendo mayores fluctuaciones y cambios de unas muestras a otras, lo que podría indicar una mayor sensibilidad de dicho orden a factores externos y parámetros de operación.

Para poder realizar una mejor interpretación de los resultados, se han calculado los porcentajes de cada orden respecto al total de arqueas (Tabla 24) (Figura 31).

Tabla 24. Porcentaje de cada orden, *Mathanosarcinales* (MSL), *Methanobacteriales* (MBT) y *Methanomicrobiales* (MMB) y total de arqueas metanogénicas respecto del total de arqueas.

Muestra	MSL (%)	MBT (%)	MMB (%)	Total Metanogénicas (%)
P1	50,84	0,06	0,37	51,27
P2	52,04	0,06	1,23	53,33
P3	49,24	0,05	9,27	58,56
P4	52,72	0,04	5,27	58,03
P5	29,79	0,30	13,67	43,76

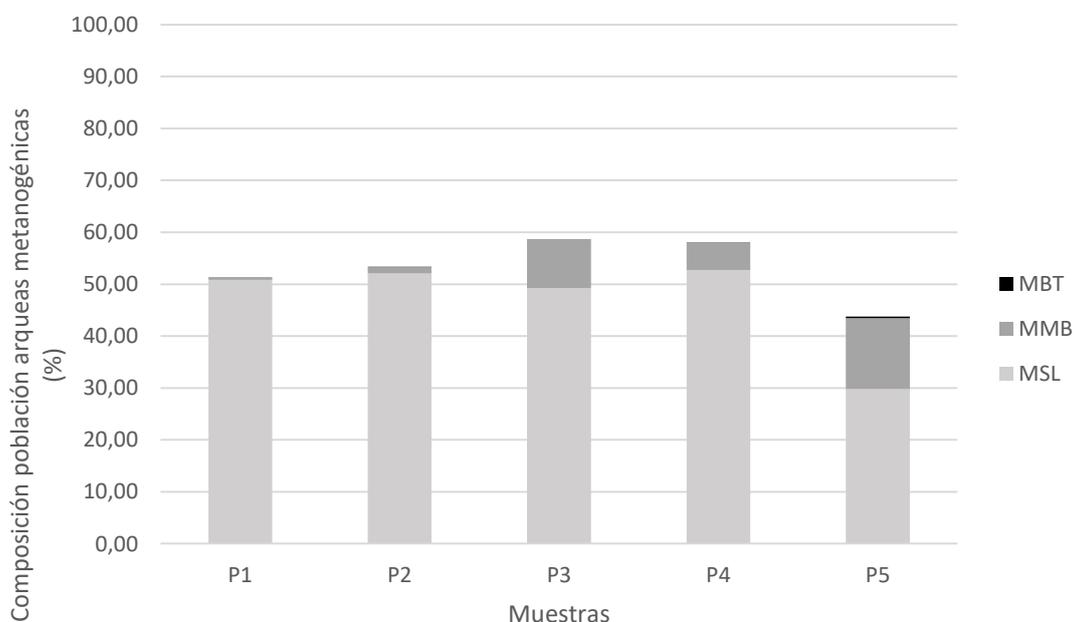


Figura 31. Composición relativa de la población de arqueas metanogénicas, *Methanosarcinales* (MSL), *Methanomicrobiales* (MMB) y *Methanobacteriales* (MBT) respecto del total de arqueas presentes en las diferentes muestras.

De esta manera se puede comprobar como el orden predominante con gran diferencia respecto al resto, es *Methanosarcinales* con aproximadamente un 50% del total de arqueas en las muestras P1, P2, P3 y P4.

Los órdenes *Methanosarcinales* y *Methanobacteriales* mantienen una población más o menos constante respecto al total de arqueas, al no producirse grandes variaciones entre las

diferentes muestras (P1, P2, P3 y P4). No ocurre lo mismo con el orden *Methanomicrobiales*, el cual va sufriendo fluctuaciones en la población, pasando de representar de un 0,4% hasta un 9,3%.

Cabe destacar que la muestra P5 no sigue ninguna tendencia con las muestras anteriores. La población de *Methanosarcinales* disminuye notablemente respecto de las restantes muestras presentando el menor valor de todas. Por otro lado, ocurre totalmente lo contrario en los restantes órdenes, los cuales sufren un notable aumento en la población, llegando a representar un 13,7% las *Methanomicrobiales* y un 0,3% el orden *Methanobacteriales*, frente a un 29,8% las *Methanosarcinales*.

En cuanto al total de metanogénicas, son las muestras P3 y P4 las que presentan un mayor porcentaje, llegando prácticamente a contener un 60% de arqueas metanogénicas respecto del total de arqueas. Dado que la población de *Methanosarcinales* y *Methanobacteriales* se mantienen más o menos constantes, este aumento en el total es debido al aumento en la población del orden *Methanomicrobiales*. En cambio, la muestra que menor porcentaje contiene de arqueas metanogénicas es la P5, en la que la población disminuye notablemente, sobre todo del orden *Methanosarcinales*.

Respecto a la amplificación del gen *mcrA*, únicamente se puede encontrar una copia del gen en cada organismo (Ferry, 1992), por lo que no es necesario realizar una corrección de los resultados obtenidos. En la siguiente gráfica se muestra el resultado de la amplificación del gen *mcrA* y el total de las arqueas metanogénicas obtenidas mediante qPCR (Figura 32). Además, también se ha obtenido el porcentaje representado por el total de arqueas metanogénicas y el gen *mcrA* respecto del total de arqueas (Tabla 25).

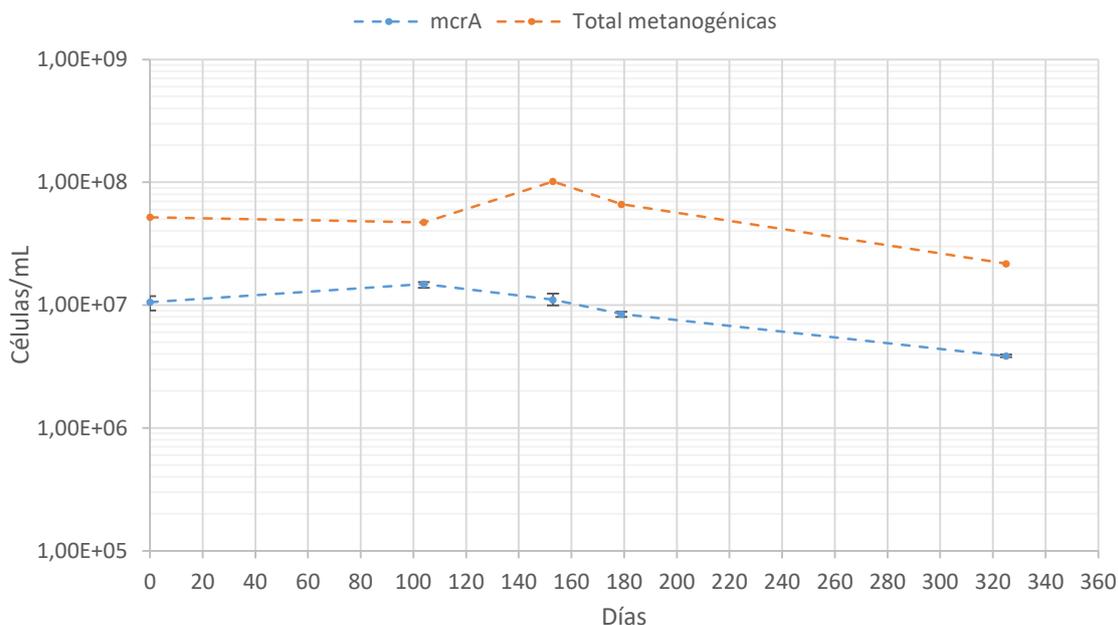


Figura 32. Comparación entre la amplificación del gen 16S, graficando el total de arqueas metanogénicas, y el gen mcrA.

Tabla 25. Porcentaje de arqueas metanogénicas y el gen mcrA respecto del total de arqueas.

Muestra	Total metanogénicas (%)	Total mcrA (%)
P1	51,27	10,46
P2	53,33	16,73
P3	58,56	6,37
P4	58,03	7,40
P5	43,76	7,75

Las tendencias de la amplificación en el gen mcrA y el total de arqueas metanogénicas no coincide en todas las muestras, además de encontrar una diferencia media de  $5 \times 10^7$  copias/mL entre ambos genes. En cuanto al porcentaje que representa el gen mcrA respecto del total de arqueas, éste debería ser similar al obtenido mediante el total de metanogénicas y se puede comprobar como no es así para ninguna muestra. Esto es debido que se trata de dos genes diferentes y los resultados deberían ser similares pero no necesariamente iguales. Por otro lado, la eficiencia de la amplificación del gen mcrA también influye en los resultados. El estudio de dicho gen presenta un tamaño de amplicón demasiado grande para obtener elevadas eficiencias. Como ya se ha comentado anteriormente al realizar las rectas de calibrado (ver 4.3.1), una disminución en la eficiencia es debida a una menor pendiente, lo que conlleva a una disminución en la cantidad de copias calculadas. Además, encontramos la

corrección de las copias obtenidas mediante qPCR a células/mL debido al número de veces que se encuentra presente el gen 16S en cada organismo. Esto puede conllevar a un error en el cálculo, al no encontrarse secuenciados todos los organismos pertenecientes a los órdenes estudiados.

A pesar de que la tendencia de ambas cuantificaciones (metanogénicas y gen *mcrA*) no es exactamente la misma, sí que se observa una clara similitud entre ambas. No ocurre lo mismo con el valor de las cuantificaciones, las cuales presentan una gran diferencia para el total de metanogénicas y el gen *mcrA*, debido al estudio de genes diferentes, la eficiencia del gen *mcrA* y la corrección de copias a células.

#### 4.4. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE DAPI Y FISH

Los resultados obtenidos de la tinción de ADN mediante DAPI para células totales (arqueas y bacterias) (Tabla 26) y los obtenidos mediante FISH (% hibridación), son los siguientes (Tabla 27 y Tabla 28) (Figura 33). En muchas ocasiones, una forma de convertir los porcentajes FISH (valores relativos), en valores absolutos, es utilizar los sólidos suspendidos de la muestra, que en teoría, están relacionados directamente con el número de células en la muestra, por lo que en el apartado 4.6 se ha realizado la comprobación de esta hipótesis. Al no haber una relación directamente proporcional entre ambas variables, para transformar los porcentajes de hibridación obtenidos mediante FISH en número de células/mL, se ha utilizado el número de células totales/mL obtenidos mediante la tinción DAPI (como se ha comentado anteriormente, tiñe todo el ADN presente en la muestra).

Tabla 26. Media de células en cada campo obtenida mediante la cuantificación de las imágenes de la tinción DAPI, incertidumbre y células/mL calculadas.

Muestra	Células/campo	Incertidumbre	Células/mL
P1	3090	206	7,42E+08
P2	4579	581	1,10E+09
P3	4035	618	9,69E+08
P4	3592	620	8,63E+08
P5	4851	662	1,17E+09

Tabla 27. Porcentaje de hibridación de arqueas respecto del total de bacterias y arqueas, obtenido mediante la cuantificación de las imágenes de FISH, incertidumbre y células/mL calculadas.

Muestra	%hib ARC/total	Incertidumbre	Células ARC/mL
P1	11,8	1,42	8,78E+07
P2	9,0	0,70	9,92E+07
P3	16,4	1,27	1,59E+08
P4	13,2	1,56	1,14E+08
P5	7,1	0,72	8,29E+07

Tabla 28. Porcentaje de hibridación del orden *Methanosarcinales* respecto del total de bacterias y arqueas, obtenido mediante la cuantificación de las imágenes de FISH, incertidumbre y células/mL calculadas.

Muestra	%hib MSL/total	Incertidumbre	Células MSL/mL
P1	5,9	0,65	4,38E+07
P2	3,8	0,59	4,21E+07
P3	6,2	0,91	6,04E+07
P4	4,8	0,67	4,16E+07
P5	3,9	0,46	4,55E+07

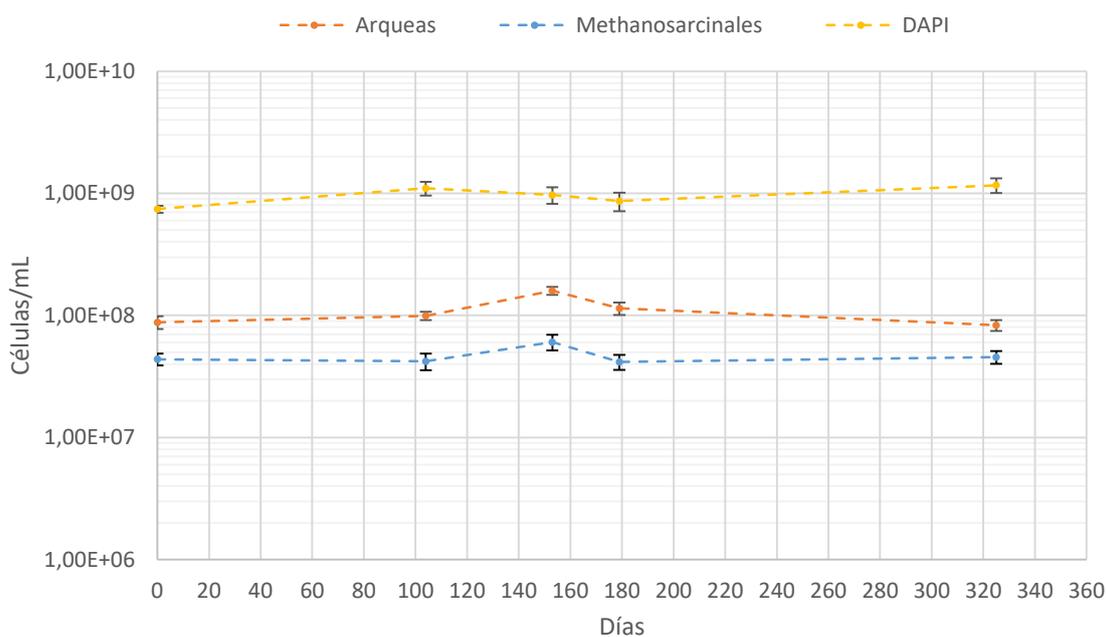


Figura 33. Resultados obtenidos en la cuantificación mediante DAPI (arqueas y bacterias) y FISH para células totales (DAPI), arqueas y el orden *Methanosarcinales*.

Se puede observar como las arqueas totales y el orden *Methanosarcinales* siguen la misma tendencia. En el caso de DAPI, la tendencia no coincide con las anteriores. Esto es debido a que se lleva a cabo una tinción de todo el ADN presente en la muestra, ya sean bacterias o arqueas,

pudiendo haber fluctuaciones en la población de ambas y producir una variación en la cantidad total de células.

La incertidumbre, utilizada como medida de dispersión en lugar de la desviación estándar para tener en cuenta el número de campos estudiados, presenta valores en torno al 1% para la hibridación de arqueas y menores a 1% en el caso del orden *Methanosarcinales*.

Cabe destacar que en cuanto a los órdenes *Methanomicrobiales* y *Methanobacteriales*, el porcentaje de hibridación de dichos ordenes respecto del total resultó ser menor que un 1% en la mayoría de las muestras, por lo que no se ha realizado una cuantificación de estos órdenes mediante la técnica FISH, dado que la baja sensibilidad del método daría lugar a una cuantificación imprecisa al tratarse de un porcentaje tan reducido.

Los resultados obtenidos mediante el método FISH presentan valores admisibles y razonables en cuanto a cantidad de arqueas en las muestras, además de presentar una incertidumbre reducida. Por el contrario, presenta una baja sensibilidad y por lo tanto la obtención de una cuantificación imprecisa a la hora de cuantificar organismos que se encuentran en un porcentaje muy reducido.

En el siguiente apartado, se realiza una comparación de las dos técnicas (FISH y qPCR), para comprobar si las tendencias en la población obtenidas mediante ambas son similares, siendo así las dos técnicas útiles para el estudio de poblaciones metanogénicas.

#### **4.5. COMPARACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE qPCR y FISH**

En las siguientes gráficas (Figura 34 y Figura 35), se muestran los resultados obtenidos mediante las dos técnicas utilizadas (qPCR y FISH) de arqueas y el orden *Methanosarcinales*. Dadas las diferencias comentadas respecto a la sensibilidad de cada método, no se han podido establecer comparaciones para los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales*.

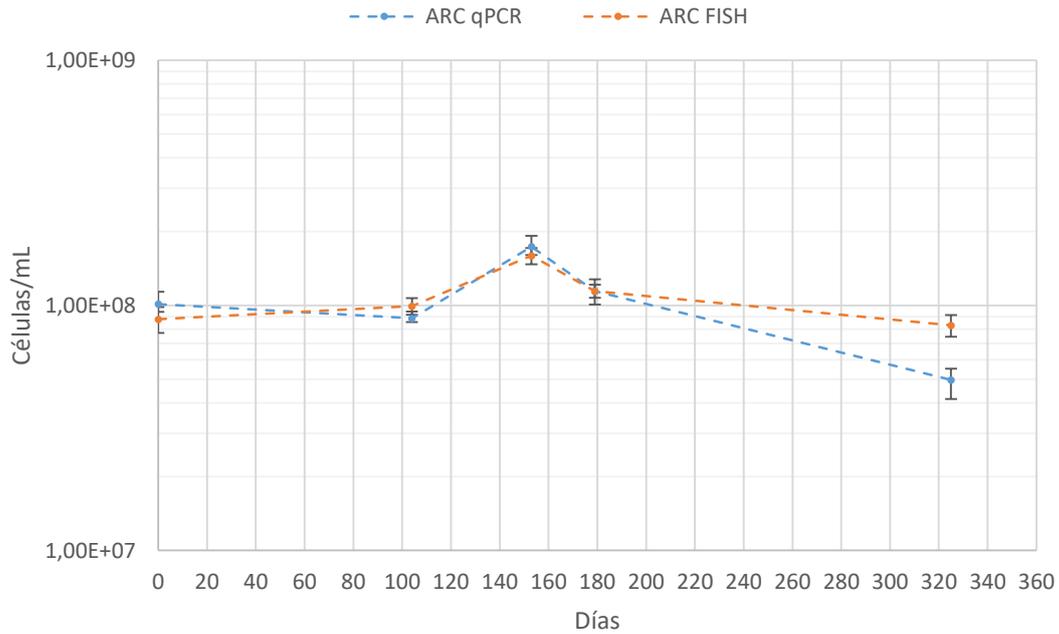


Figura 34. Comparación entre los resultados obtenidos en la cuantificación de arqueas mediante qPCR y FISH.

En la comparación respecto a la cantidad de arqueas (Figura 34), se puede observar como la tendencia y el valor de los resultados obtenidos mediante las dos técnicas es similar. Se produce una mayor diferencia en la muestra 5, donde el valor obtenido mediante FISH es notablemente mayor que el obtenido mediante qPCR, además de presentar una mayor diferencia en el valor obtenido mediante las dos técnicas. Esto es debido al elevado tiempo de retención celular al que se operaba el reactor, que da lugar a un mayor *background* en las imágenes FISH y dificulta su cuantificación.

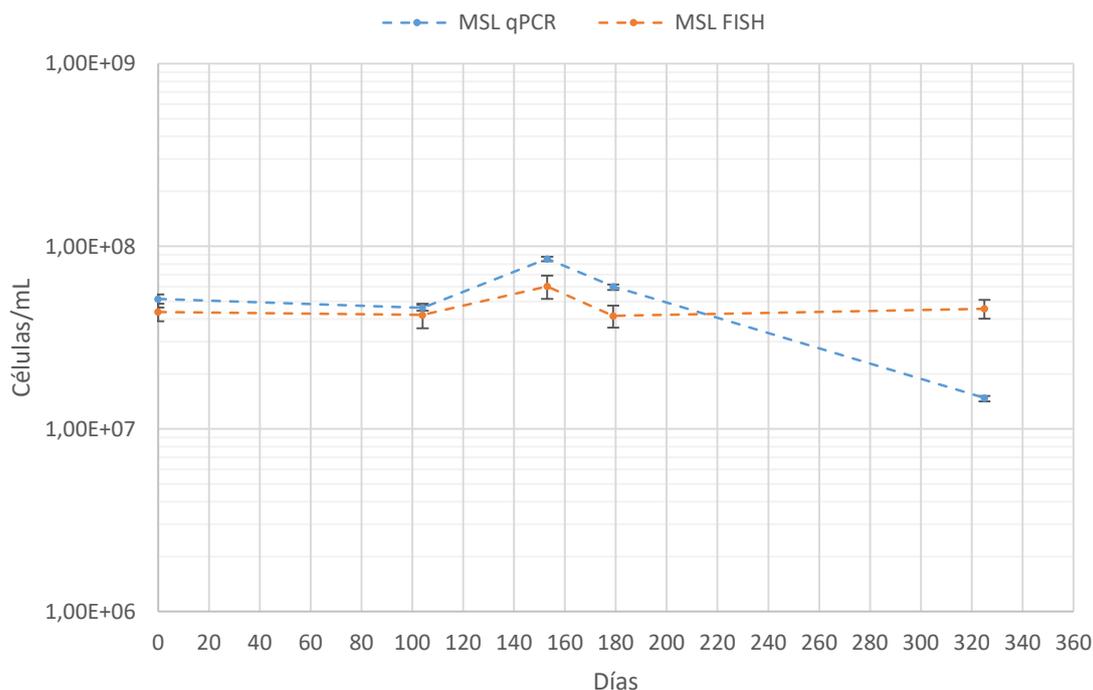


Figura 35. Comparación entre los resultados obtenidos en la cuantificación del orden *Methanosarcinales* (MSL) mediante qPCR y FISH.

En el caso del orden *Methanosarcinales* (Figura 35), se puede observar una mayor diferencia entre los resultados obtenidos mediante las dos técnicas. Por un lado, los valores obtenidos mediante FISH son algo menores que los obtenidos mediante qPCR, produciéndose una mayor diferencia en las muestras 3, 4 y 5. Por otro lado, en la muestra 5 el valor obtenido mediante FISH es notablemente mayor que el obtenido mediante qPCR, además de invertirse la tendencia.

En general, las tendencias y resultados obtenidos para los dos casos estudiados (arqueas y *Methanosarcinales*) son bastante similares mediante las dos técnicas en las muestras P1, P2, P3 y P4. Es necesario destacar la muestra número 5, que presenta en ambos casos unos resultados bastante alejados de los obtenidos mediante qPCR además de resultar valores mayores para FISH, mientras que por lo general, los resultados de FISH son menores.

Hay que tener en cuenta que en la técnica FISH pueden influir una gran cantidad de limitaciones comenzando por la homogeneidad de la muestra, pasando por las características de las fotos tomadas con el microscopio, como pueden ser el brillo y el brillo de fondo que representa falsos positivos (*background*). En este caso, la muestra P5 fue tomada del reactor cuando estaba operándose a un tiempo de retención celular de 140 días. Elevados tiempos de retención celular suponen una mayor cantidad de células muertas y su lisis, y por lo tanto una

mayor concentración de *debris* en el medio, es decir, residuo inerte no hidrolizable que se va acumulando. Al realizar la hibridación en FISH, el elevado tiempo de retención celular supone una cantidad de *debris* en la muestra tal que puede dar lugar a una imagen con un *background* muy brillante debido a la autofluorescencia, sesgando la técnica y dificultando mucho la cuantificación de estas imágenes.

En base a los resultados obtenidos mediante las dos técnicas (FISH y qPCR) es destacable la utilidad de ambas de cara al estudio de poblaciones metanogénicas en procesos anaerobios. No obstante, en el caso de muestras anaerobias con altos tiempos de retención celular la cuantificación mediante qPCR tiene la ventaja de no tratarse de un método visual y por lo tanto no ser influida por la fracción inerte. Además, mediante qPCR es posible detectar los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales*, los cuales se encuentran en minoría y no se detectan con tanta precisión mediante FISH. A pesar de dichas ventajas, qPCR presenta cierta incertidumbre debido a la eficiencia de la técnica y a la corrección de los resultados obtenidos por el número de veces que se encuentra presente el gen estudiado en cada organismo.

#### **4.6. RELACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS PARÁMETROS OPERACIONALES**

Dada la importancia de llevar a cabo un seguimiento del proceso anaerobio, es necesario relacionar las variables microbiológicas y sus variaciones en la población y las variables de operación del reactor. Debido a la mayor sensibilidad del método qPCR, además de su mayor capacidad de detección y, por lo tanto, la posibilidad de estudiar todos los órdenes de arqueas metanogénicas, se ha estudiado la relación de la población con los parámetros operacionales de mayor relevancia, como son la temperatura del reactor y los tiempos de retención tanto hidráulico como celular, la concentración de sólidos ya sean totales y volátiles, la DQO disponible para la metanogénesis y la producción de biogás y metano y su contenido en el biogás.

Cabe destacar que al realizar el estudio únicamente sobre 5 muestras, y al presentar los parámetros operacionales una reducida variabilidad, las relaciones determinadas a partir de los análisis estadísticos entre dichos parámetros y la población de arqueas metanogénicas son meramente orientativas y para nada concluyentes. Para ello se ha realizado un análisis de componentes principales (PCA), obteniendo así, una visión global de las relaciones entre los

parámetros mencionados anteriormente y la población obtenida mediante qPCR de arqueas, los órdenes estudiados y los grupos metanogénicos (calculados a partir del gen *mcrA*).

En la siguiente imagen (Figura 36) se muestra dicha relación en dos dimensiones en base a dos componentes principales, CP1 con un 43% de variabilidad en el eje de ordenadas y CP2 con un 33% de variabilidad en el eje de abscisas, representando en total un 76% de la variabilidad de los datos. Además, también se muestran los círculos de correlaciones, de centro 0 y radio 0,5 y 1, indicando la contribución de cada variable a dicha componente.

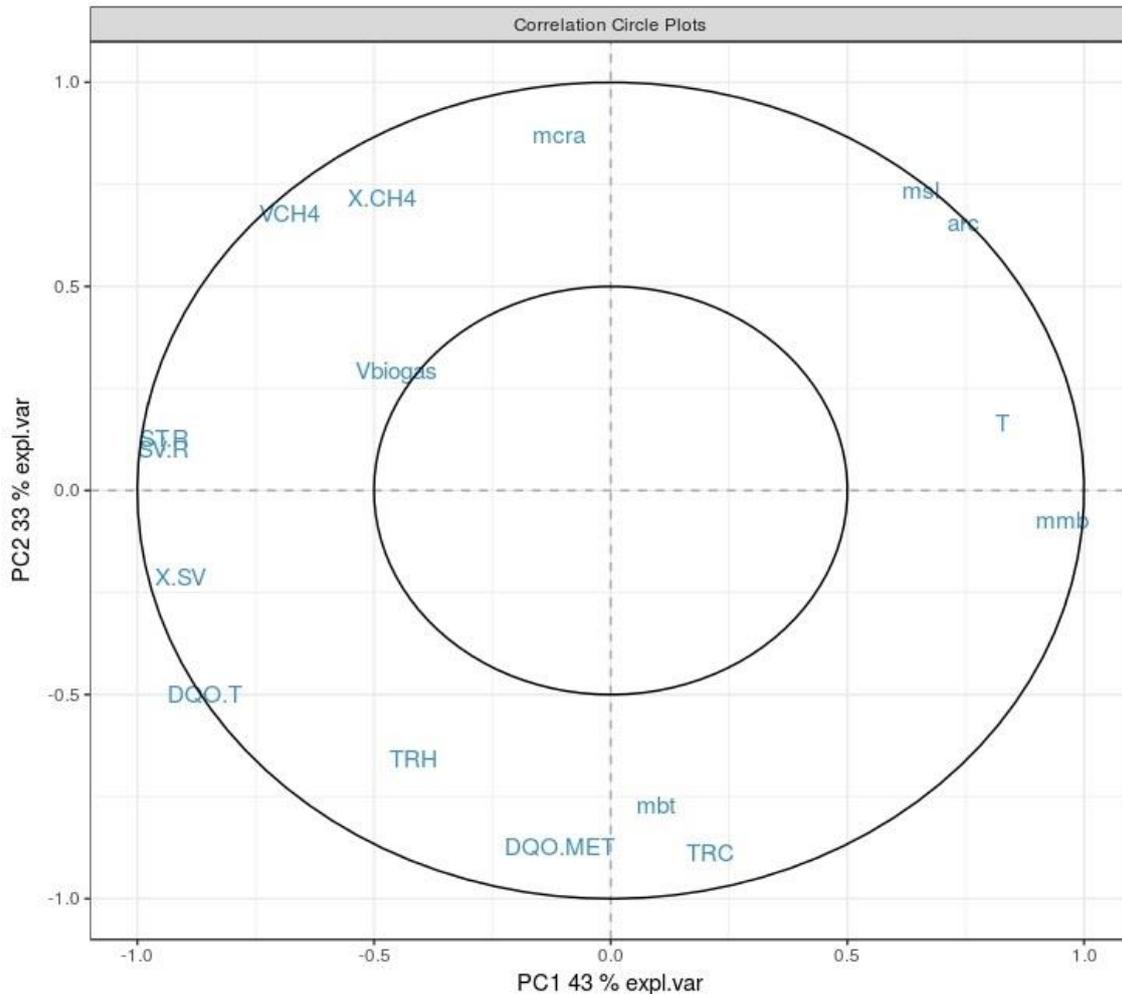


Figura 36. Análisis de componentes principales de las siguientes variables: volumen de biogás generado (Vbiogas), volumen de metano generado (VCH4), porcentaje de metano en biogás (X.CH4), sólidos totales en el reactor (ST.R), sólidos volátiles en el reactor (SV.R), porcentaje de sólidos volátiles (X.SV), DQO total de entrada (DQO.T), DQO disponible metanogénicas (DQO.MET), tiempo de retención hidráulico (TRH), tiempo de retención celular (TRC), temperatura (T), población de arqueas (*arc*), *Methanosarcinales* (*msl*), *Methanomicrobiales* (*mmb*), *Methanobacteriales* (*mbt*) y gen *mcrA* (*mcrA*).

Se puede observar como el orden *Methanomicrobiales* se encuentra correlacionado con la temperatura debido a su cercanía. El orden *Methanosarcinales* y las arqueas presentan una

elevada correlación entre ellas, dado que la mayor contribución a la población total de arqueas es debida al orden *Methanosarcinales*. A su vez, ambas variables también se encuentran correlacionadas con la temperatura, aunque en menor medida. En cuanto a los sólidos, ya sean totales o volátiles, no presentan una correlación positiva con la población en general (ARC, MSL, MMB, MBT, mcrA) al no encontrarse en proximidad. Respecto a los tiempos de retención celular e hidráulico, tampoco se encuentra relación positiva entre estos y la población, exceptuando el orden *Methanobacteriales*, el cual presenta una elevada correlación con el tiempo de retención celular.

En cuanto al gen *mcrA*, éste presenta una correlación positiva con la generación de metano y el porcentaje respecto del total de biogás. Mientras que por el contrario, no presenta correlación con la DQO disponible.

A continuación se muestra y analiza lo observado en el análisis de componentes principales respecto de la temperatura (Figura 37), del tiempo de retención hidráulico (Figura 38), del tiempo de retención celular (Figura 39), los sólidos totales y volátiles (Figura 40), el biogás y metano producido (Figura 43) y la DQO disponible para el consumo de arqueas metanogénicas (Figura 44).

En la siguiente gráfica (Figura 37) se muestra la relación entre la población de arqueas y las variaciones en la temperatura:

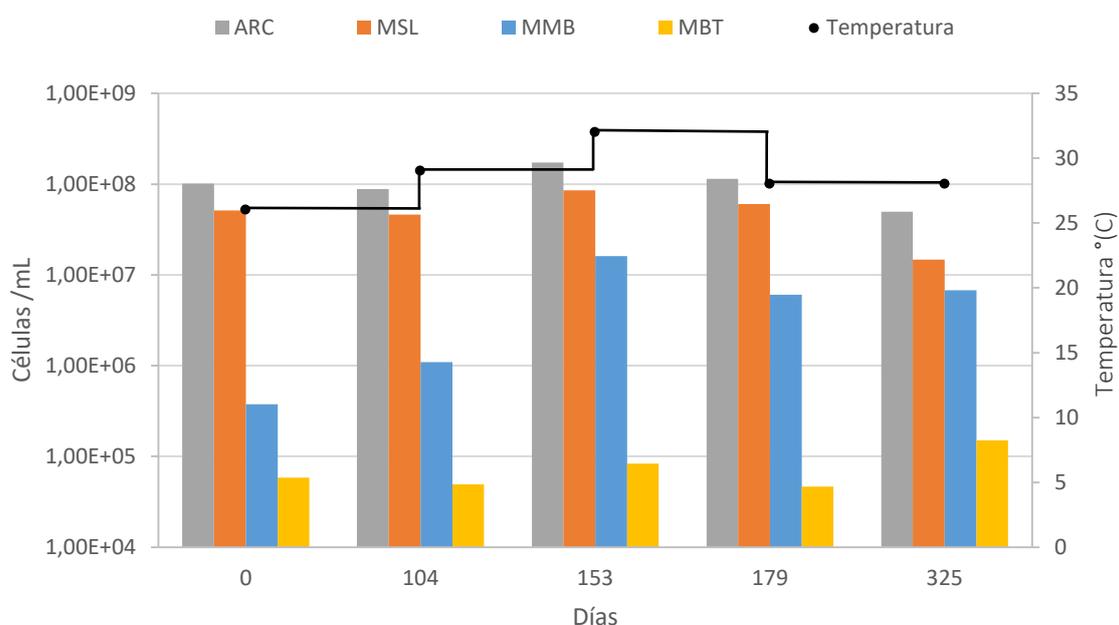


Figura 37. Población total de arqueas (ARC) y los órdenes estudiados, *Methanosarcinales* (MSL), *Methanomicrobiales* (MMB) y *Methanobacteriales* (MBT) en relación a la temperatura (°C) del reactor.

Como se observa, la población de arqueas se ve beneficiada con un aumento de la temperatura. Esto se debe a que la velocidad de las reacciones biológicas depende de una forma muy sensible de la temperatura, viéndose favorecidas con ésta (Ferrer & Seco, 2007). En este caso, se producen fluctuaciones en la temperatura y no se mantiene constante en el reactor dado que en verano se trabaja con temperatura libre en la planta, mientras que el resto del año se mantiene constante a 28 °C. Es por esto, por lo que no se pueden apreciar grandes cambios, debido a que el rango de temperatura del reactor en las fechas estudiadas sufre variaciones únicamente de 26-32°C. A pesar de esto, sí que se puede observar una tendencia similar y un máximo en la población de arqueas y los órdenes *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales* en la muestra P3, debido a un aumento de la temperatura a 32°C. La temperatura afecta también a otras fases de los procesos anaerobios, como puede ser la hidrólisis, pudiendo favorecer la degradación de materia orgánica y por lo tanto, favorecer un aumento en la población.

En el caso del orden *Methanomicrobiales*, su crecimiento se encuentra muy ligado a la temperatura al seguir prácticamente la misma tendencia, como también se ha observado en el análisis de componentes principales. Comenzando con una temperatura de 26°C, y una muy reducida representación de dicho orden respecto del total de arqueas (0,4%), conforme se produce un aumento de temperatura, la población va aumentando, teniendo un crecimiento muy pronunciado de la muestra P2 a la muestra P3, donde la temperatura es máxima y llega a representar un 9,3% de la población. En cambio, en la siguiente muestra P4, donde la temperatura ha disminuido, la población del orden *Methanomicrobiales* vuelve a caer, representando un 5,3%. El resto de órdenes con respecto al total de arqueas apenas sufre fluctuaciones, mientras que el orden *Methanomicrobiales* va aumentando o disminuyendo su población y su representación respecto del total según aumenta o disminuye la temperatura. Esto sugiere que dicho orden presenta una mayor sensibilidad a la temperatura que el resto de órdenes, viéndose más o menos favorecido por las fluctuaciones de ésta.

En la siguiente gráfica (Figura 38) se muestra la relación entre la población de arqueas y el tiempo de retención hidráulico:

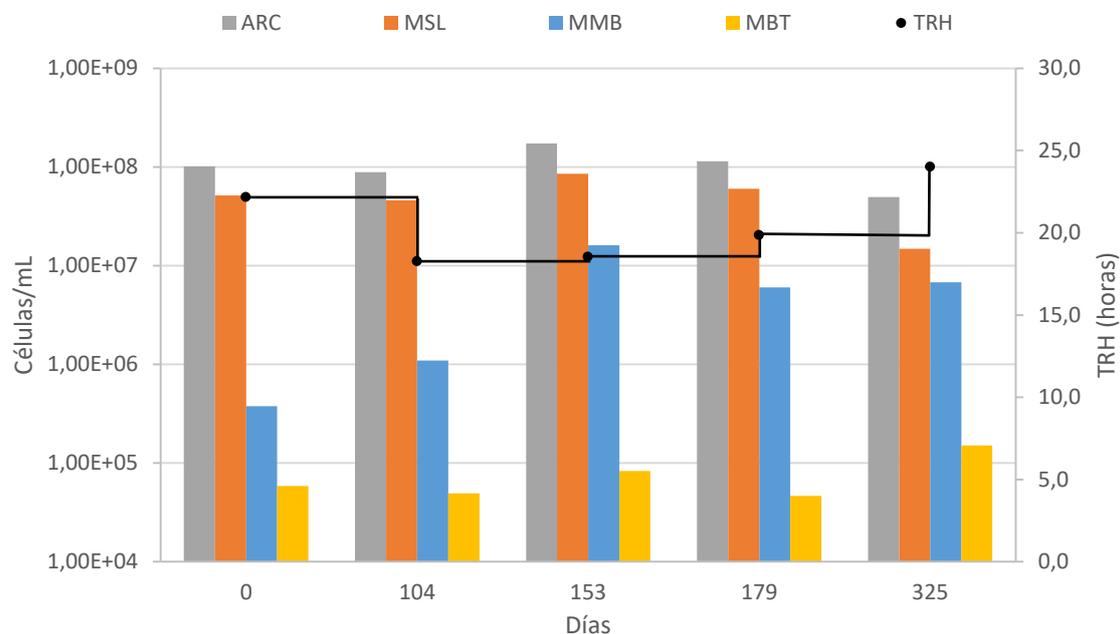


Figura 38. Relación del tiempo de retención hidráulico con la población de arqueas (ARC) y los órdenes estudiados, *Methanosarcinales* (MSL), *Methanomicrobiales* (MMB) y *Methanobacteriales* (MBT).

En cuanto al tiempo de retención hidráulico (Figura 38), se puede observar como a pesar de sufrir una disminución en las muestras P2, P3 y P4, la población no se ve afectada, sino todo lo contrario. Este aumento en la población es debido a otros parámetros, presumiblemente a la temperatura, pero lo que nos indica el TRH en este caso, es que a pesar de sufrir una disminución, las arqueas son capaces de degradar la materia orgánica presente en el agua y crecer, aunque se disminuya el tiempo de retención de ésta en el reactor y dispongan de menos tiempo para la degradación. Aparentemente se está operando el reactor a unos tiempos de retención hidráulico suficientemente altos como para que el crecimiento de las arqueas metanogénicas no se vea afectado. Sería interesante conocer el tiempo de retención hidráulico a partir del cual la población comienza a verse afectada.

En la siguiente gráfica (Figura 39) se muestra la relación entre la población de arqueas y el tiempo de retención celular:

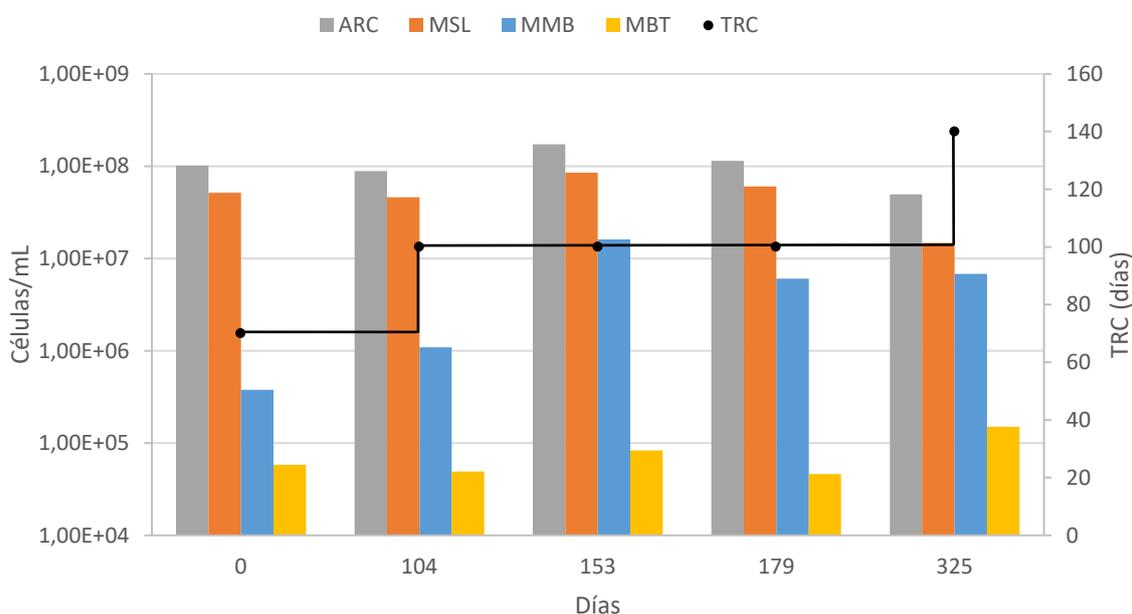


Figura 39. Población de arqueas (ARC) y los órdenes estudiados, *Methanosarcinales* (MSL), *Methanomicrobiales* (MMB) y *Methanobacteriales* (MBT) en relación al tiempo de retención celular.

Respecto al tiempo de retención celular (Figura 39), su aumento no supone un gran cambio en las arqueas y los órdenes estudiados, ya que la población y su representación respecto del total de arqueas se mantiene más o menos constante. Además, el análisis de componentes principales no muestra una correlación entre las poblaciones (ARC, MSL, MMB, mcrA) y el tiempo de retención celular.

No se puede saber con seguridad a que se debe la disminución en la población en la última muestra del orden *Methanosarcinales*, y por el contrario el aumento en los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales*. En el caso de orden *Methanosarcinales*, el cual ha predominado en todas las muestras representando aproximadamente un 50% del total de arqueas, su abundancia ha disminuido hasta un 29,8%. En cuanto al orden *Methanomicrobiales*, su abundancia relativa supone un 13,7%, mientras que en otras muestras únicamente ha representado un 0,37%. Por último, El orden *Methanobacteriales* también aumenta su población, pasando de representar un 0,05% respecto del total de arqueas, hasta un 0,3% en la última muestra.

Cabe destacar que al tratarse de un reactor anaerobio de membrana, ésta retiene los sólidos en el reactor y permite desacoplar los tiempos de retención hidráulico y celular. Al retener los

sólidos, y por lo tanto también a los microorganismos durante unos tiempos tan elevados, los microorganismos menos favorecidos por las condiciones ambientales y de operación actuales, pueden volver a proliferar en cuanto las condiciones sean más favorables, y posiblemente sea lo que ocurra con los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales*.

Autores sugieren que estos cambios en las poblaciones se deben a que ha habido una disminución en la concentración de ácido acético o un aumento en la producción de hidrógeno (Padmasiri *et al.*, 2007). Una disminución en la concentración de ácido acético supone también una disminución en la población de *Methanosarcinales*, dado que es el único orden con organismos acetoclásticos, y estos suponen la gran mayoría de la población de *Methanosarcinales* (Song *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2005). Por otro lado, un aumento en la producción de hidrógeno en el sistema supone un aumento en la población de los órdenes hidrogenotróficos (*Methanomicrobiales* y *Methanobacteriales*) al disponer de una mayor cantidad de sustrato.

En investigaciones anteriores también se ha observado como en condiciones estresantes la mayor parte de la metanogénesis se lleva a cabo por organismos hidrogenotróficos, dado que presentan una menor sensibilidad, teniendo por lo tanto, una ventaja frente a los organismos acetoclásticos. Estas condiciones estresantes pueden ser altas concentraciones de amonio (Song *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2013; Fotidis *et al.*, 2013), pHs desfavorables (Hao *et al.*, 2012), elevadas concentraciones de ácidos grasos volátiles (Hori *et al.*, 2006), potasio, sodio o metales pesados (Schnürer *et al.*, 1999).

En la siguiente gráfica (Figura 40) se muestra la relación entre la población de arqueas y los sólidos totales y volátiles presentes en el reactor:

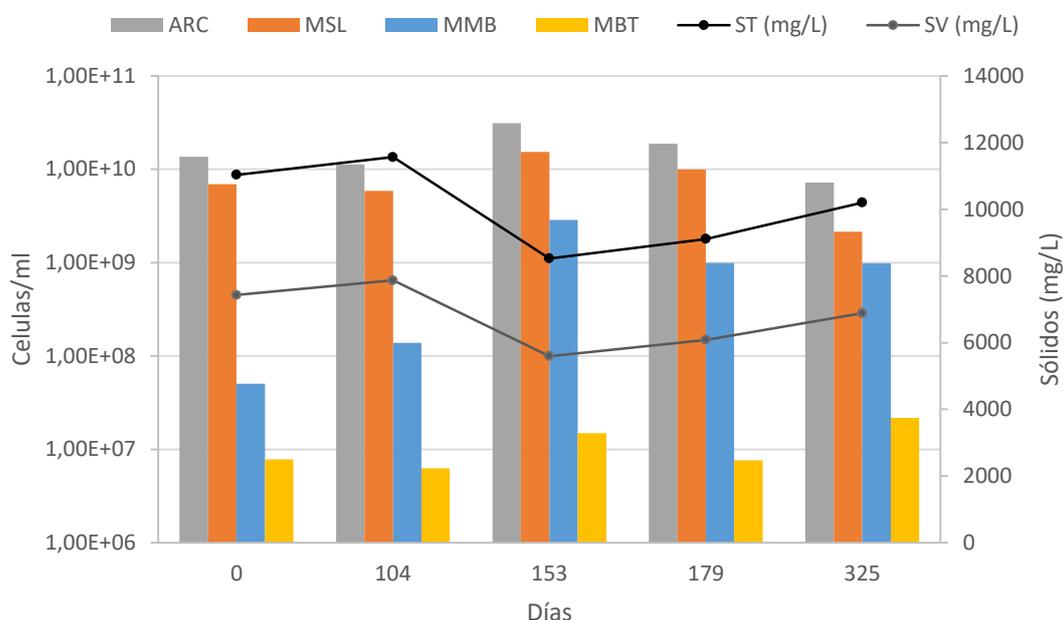


Figura 40. Población de arqueas (ARC) y los órdenes estudiados, *Methanosarcinales* (MSL), *Methanomicrobiales* (MMB) y *Methanobacteriales* (MBT) en relación a los sólidos totales del reactor (ST) y los sólidos volátiles (SV).

En cuanto a los sólidos totales presentes en el reactor y los sólidos volátiles (Figura 40), se observa como no existe una relación directa entre la población de arqueas y los sólidos, tanto para los totales como para los volátiles. En cuanto a las tendencias, son muy similares en ambos, lo que indica que la fracción volátil se mantiene relativamente constante durante el periodo de tiempo del estudio.

Como se ha comentado en el apartado 4.4, un procedimiento habitual para convertir los valores relativos obtenidos mediante microbiología (% hibridación FISH) en valores absolutos, es multiplicarlos por los sólidos volátiles (SV), de manera que se está suponiendo que la cantidad de SV y la cantidad de células/ml son directamente proporcionales. Con el fin de comprobar esta hipótesis y comprobar que no existe regresión lineal y por lo tanto una correlación entre los sólidos volátiles y la población de arqueas y bacterias, se han graficado los resultados obtenidos mediante DAPI y los sólidos volátiles. (Figura 41).

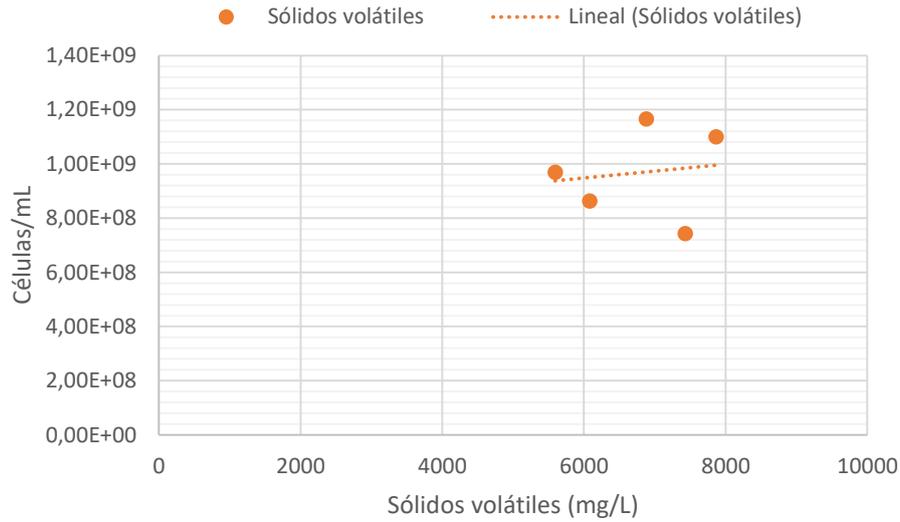


Figura 41. Correlación entre los sólidos volátiles, y las células totales obtenidas mediante DAPI.

La gráfica anterior muestra como no existe correlación lineal entre los sólidos volátiles con la población de bacterias y arqueas, lo que indica que no hay una relación de dependencia entre ambas variables. Esto es debido a que en el reactor se encuentra una elevada fracción volátil no asociada a arqueas y bacterias. Sería un error, por tanto, asumir una relación directamente proporcional entre los sólidos y las arqueas y bacterias en sistemas anaerobios con membrana trabajando a elevados tiempos de retención celular, puesto que como se ha comprobado en este caso, dicha relación no tiene lugar.

En cuanto a la producción de biogás y metano, en la siguiente gráfica se muestran las variaciones en las diferentes muestras, además de presentar el porcentaje de metano en el biogás (Figura 42).

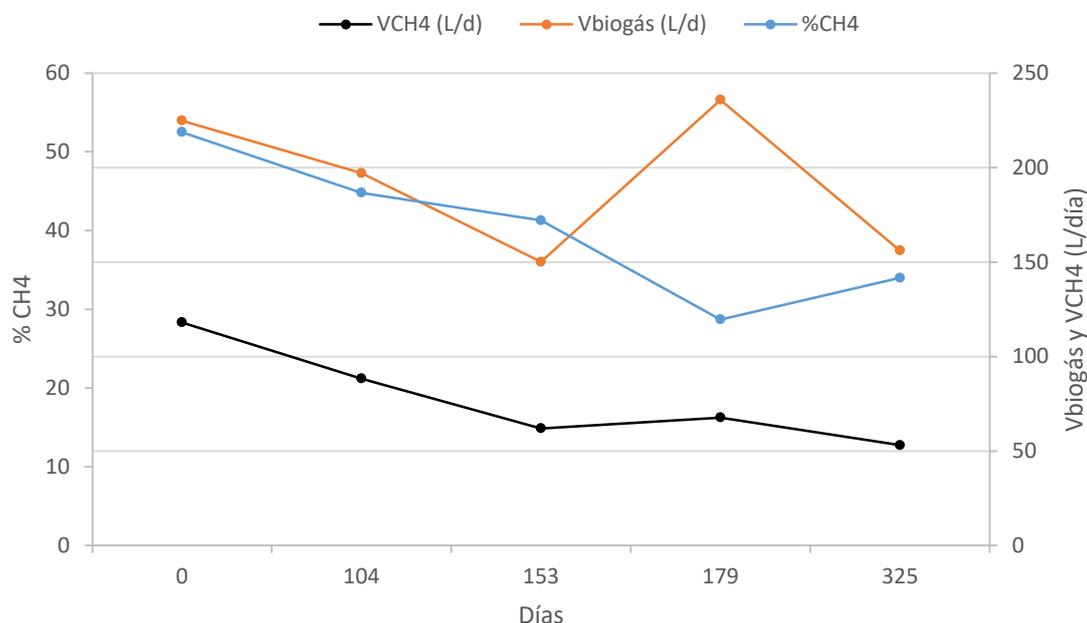


Figura 42. Producción de biogás y metano medido en L/día y porcentaje de metano respecto del total de biogás.

Se puede observar como la producción de biogás y metano sufren variaciones durante el periodo de estudio de 225 L/día a 150 L/día y de 118 L/día a 53 L/día respectivamente. En la tercera muestra, se produce una disminución más pronunciada, debida posiblemente a la disminución en la DQO disponible para la metanogénesis (ver Figura 44). Mientras que en la última muestra donde vuelve a disminuir la producción, se presupone que es por un descenso en la población.

Respecto al porcentaje de metano en el biogás, éste no se mantiene estable durante el periodo de estudio, sufriendo fluctuaciones entre un 52,5% y un 28,7%.

Del mismo modo que mediante el PCA se ha encontrado una correlación con el gen mcrA (Figura 36), también se puede observar la relación entre el gen y la producción de metano y biogás en la siguiente gráfica (Figura 43).

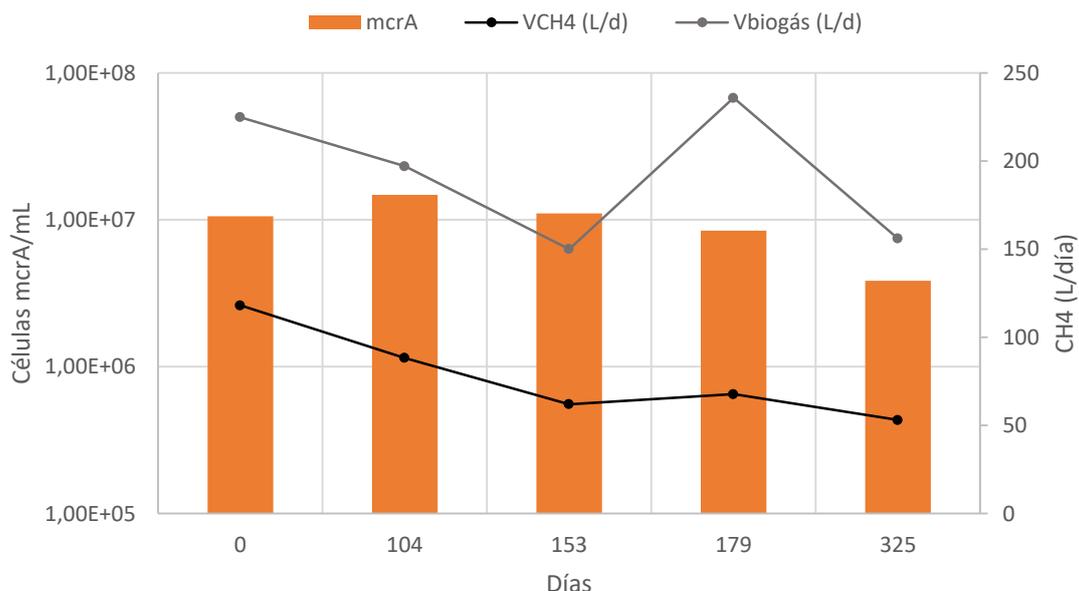


Figura 43. Relación entre la población, medida mediante el gen mcrA, y el volumen de metano generado (VCH4).

Se puede comprobar como existe una relación positiva entre las variables, sobre todo entre el gen mcrA y la producción de metano (VCH4). Esto es debido a que se trata del gen que codifica la subunidad  $\alpha$  de metil enzima M reductasa, la enzima que cataliza el paso final en la metanogénesis, reduciendo el enlace del grupo metilo de la metil coencima generando metano (Friedrich, 2005; Ferry, 1999; Reeve *et al.*, 1997), por lo que el estudio de dicho gen resulta muy útil para realizar un seguimiento de la población metanogénica. En cuanto a la producción de biogás (Vbiogás), no se observa de una alta correlación, debido sobre todo a la tercera y cuarta muestra. Cabe destacar, que mediante el análisis de los genes 16S ARNr y mcrA, se detecta identidad, no actividad, por lo que no se puede asumir que a mayor población, mayor generación de metano, dado que se pueden detectar organismos que en realidad no se encuentran activos. Esta podría ser una de las posibles causas de esta divergencia entre la población y la generación de metano.

Respecto a la DQO disponible para el consumo de las arqueas metanogénicas, se puede observar la relación con la población de arqueas en la siguiente gráfica (Figura 44):

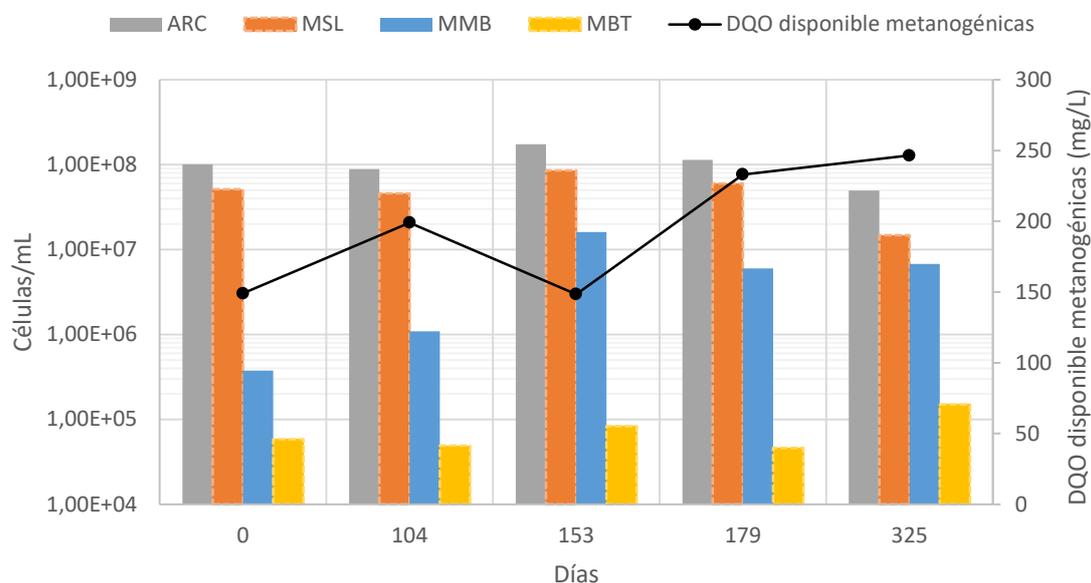


Figura 44. Población de arqueas (ARC) y los órdenes estudiados, *Methanosarcinales* (MSL), *Methanomicrobiales* (MMB) y *Methanobacterales* (MBT) en relación a la DQO disponible para su consumo.

Como ya se ha comprobado en el análisis de componentes principales, no se observa una relación entre la población y la DQO disponible. No se puede establecer una relación dado que no se conoce qué fracción de ella es consumida por las arqueas metanogénicas. Además, aunque se pueda encontrar disponible una mayor cantidad de DQO, las metanogénicas pueden presentar una menor actividad y no haber relación entre la DQO disponible y la consumida. Para ello sería necesario conocer la DQO de salida del sistema y poder conocer el porcentaje de eliminación, tal y como han realizado otros autores (Padmasiri *et al.*, 2007).



## 5. CONCLUSIONES

De los objetivos planteados al comienzo del presente trabajo y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en su desarrollo, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

Al identificar la población de arqueas metanogénicas en las muestras mediante PCR, resulta necesario optimizar los parámetros limitantes como son la concentración de ADN y el número de ciclos.

A la hora de realizar la cuantificación mediante qPCR y obtener para ello las rectas de calibrado, se han observado disminuciones en la eficiencia del método debidas al tamaño del amplicón generado. De esta manera, contra mayor resulta el tamaño del amplicón, la eficiencia en la amplificación obtiene un valor menor. La amplificación en el gen *mcrA* (409 pb) resulta la más afectada, obteniendo una eficiencia del 68%, un valor muy poco aceptable dado que se encuentra muy alejado del rango óptimo  $100 \pm 20\%$ . Esto da lugar a una disminución en las copias calculadas y por lo tanto a una cuantificación menor de la real.

Por otro lado, dado que el gen ARNr 16S puede presentarse más de una vez en cada organismo, fue necesario realizar una corrección en las copias obtenidas mediante qPCR a células. Dicha corrección no puede resultar del todo fiable dado que no se encuentran secuenciados todos los organismos pertenecientes a cada orden, lo que da lugar a un posible error en el cálculo de la población.

En cuanto a la cuantificación mediante FISH, no fue posible realizar una cuantificación de los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales*, debido a la sensibilidad del método, dado que se encuentran en minoría y representan menor de un 1% de la población total en el reactor. Por lo tanto el método no resulta del todo útil en el caso de arqueas metanogénicas.

Al realizar una comparación de los resultados obtenidos mediante FISH y qPCR, la tendencia en las poblaciones son similares, exceptuando el la muestra P5, donde se obtiene un resultado mayor mediante FISH. Esto es debido a un elevado tiempo de retención celular, el cual implica una mayor cantidad de materia inerte dando lugar a un *background* muy brillante dificultando una correcta cuantificación.

Por lo tanto, el método qPCR resulta más adecuado para el estudio de metanógenos, debido a la posibilidad de detectar todos los órdenes estudiados y con elevada precisión, y no ser influido por la fracción inerte. A pesar de estas ventajas, presenta los problemas derivados de la eficiencia de la técnica y la necesaria realización de una corrección de las copias a células.

En cuanto a los parámetros operacionales, debido a que éstos presentan una reducida variabilidad, y dado que únicamente se ha realizado el estudio de 5 muestras, las relaciones obtenidas entre estos y la población son meramente orientativos y no pueden llegar a ser concluyentes. Para determinar los parámetros más influyentes se realizaron análisis estadísticos basados en componentes principales que arrojaron los siguientes resultados.

Respecto a la temperatura y a pesar de sufrir reducidas variaciones, se ha observado una influencia positiva en la población en general, pero sobre todo en el orden *Methanomicrobiales*, el cual aumenta o disminuye de manera notable su población y su representación respecto del total de arqueas en función de la temperatura. Esto es debido a que las reacciones biológicas dependen de una manera muy sensible de la temperatura.

El tiempo de retención hidráulico no influye en la población, dado que ésta no se ve afectada al sufrirse una disminución del tiempo que permanece el agua en el reactor. A los tiempos de retención a los que se está operando el reactor, las arqueas metanogénicas tienen capacidad de degradar la materia orgánica y seguir creciendo. Por lo tanto, resultaría interesante conocer el mínimo tiempo de retención hidráulico a partir del cual la población se vería afectada.

El tiempo de retención celular parece no influir en la población. La variación que se produce en la población al llevarse a cabo un cambio de 100 a 140 días en el tiempo de retención celular, es presumiblemente a cambios en los sustratos o a situaciones estresantes. Dado que no se disponen de datos correspondientes a dichas variables, no se puede esclarecer qué motivos han dado lugar a dichas variaciones.

En cuanto a los sólidos volátiles, éstos no presentan una relación directa con la población, lo que puede ser debido a que se encuentra en el reactor una elevada fracción volátil la cual no corresponde a arqueas o bacterias. Por lo tanto, sería un error suponer una relación entre ambas variables en reactores anaerobios con membrana operados a elevados tiempos de retención celular.

Respecto a la producción de metano, se ha observado una relación con la cuantificación del gen *mcrA*, dado que es el gen que codifica la enzima que cataliza el paso final en la metanogénesis. La relación entre ambas variables presenta pequeñas variaciones debidas a que mediante el análisis de los genes 16S ARNr y *mcrA*, se detectan individuos pero no su actividad, por lo que a mayor cantidad de arqueas metanogénicas no es necesariamente una mayor generación de metano.

Por último, en cuanto a la DQO disponible para las arqueas metanogénicas, no se encuentra relación con la población debido a lo comentado anteriormente, la actividad. Aunque se

disponga de una mayor cantidad de DQO, las metanogénicas pueden presentar una menor actividad y no haber relación entre ambas variables.



## 6. RECOMENDACIONES

Al concluir con el trabajo, se recomendaría realizar los ensayos anteriores pero con ciertas variaciones:

- Tomar un mayor número de muestras para poder llevar a cabo una relación con parámetros operacionales más esclarecedora y fiable.
- Añadir al estudio las familias *Methanosarcinaceae* y *Methanosaetaceae*, las únicas que realizan la metanogénesis acetoclástica. De esta manera será posible conocer en mayor medida (dado que *Methanosaetaceae* utiliza únicamente acético, pero *Methanosarcinaceae* pueden utilizar otros sustratos) la contribución a la metanogénesis por cada ruta (hidrogenotrófica o acetoclástica).
- Realizar la cuantificación mediante qPCR, pero en este caso sobre el ARN específicamente el codificado por el el gen *mcrA*, para de esta manera poder medir la actividad de las arqueas metanogénicas y no únicamente su identidad.
- Rediseñar el oligo sintético para amplificar un fragmento más corto y obtener un amplicón más pequeño para el gen *mcrA* y el orden *Methanosarcinales*, y aumentar así eficiencia de la técnica.
- Sustituir el fluorocromo intercalar SYBR Green por sondas TaqMan, diseñadas para incrementar la especificidad de la PCR cuantitativa.
- Realizar una medición de un mayor número de parámetros de los que actualmente no se disponen datos, como pueden ser la DQO de salida, el amonio o los ácidos grasos volátiles, para tener un control sobre los sustratos o posibles sustancias inhibidoras.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahring, B. K., & Westermann, P. (1985). Methanogenesis from acetate: physiology of a thermophilic, acetate-utilizing methanogenic bacterium. *FEMS microbiology letters*, 28(1), 15-19.
- Amann, R. I., Krumholz, L., & Stahl, D. A. (1990a). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of bacteriology*, 172(2), 762-770.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., & Stahl, D. A. (1990b). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and environmental microbiology*, 56(6), 1919-1925.
- Biavati, B., Vasta, M., & Ferry, J. G. (1988). Isolation and characterization of "Methanosphaera cuniculi" sp. nov. *Applied and environmental microbiology*, 54(3), 768-771.
- Bleicher, K., Zellner, G., & Winter, J. (1989). Growth of methanogens on cyclopentanol/CO<sub>2</sub> and specificity of alcohol dehydrogenase. *FEMS microbiology letters*, 59(3), 307-312.
- Blotevogel, K. H., Gahl-Janßen, 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. (2003). The Order *Methanobacteriales*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., & Stackebrandt, E. (Eds.) *The Prokaryotes, Vol. 3. Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. 3rd ed. Springer Verlag. New York.
- Boone, D. R., Worakit, S., Mathrani, I. M., & Mah, R. A. (1986). Alkaliphilic methanogens from high-pH lake sediments. *Systematic and applied microbiology*, 7(2-3), 230-234.
- Borrás, L. (2008). Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de microorganismos presentes en sistemas EBPR. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 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 formicicum* MF. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(2), 171-171.
- Burggraf, S., Fricke, H., Neuner, A., Kristjansson, J., Rouvier, P., Mandelco, L., & Stetter, K. O. (1990). *Methanococcus igneus* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen from a shallow submarine hydrothermal system. *Systematic and Applied Microbiology*, 13(3), 263-269.
- 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). *Journal of microbiological methods*, 65(1), 194-201.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., & Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and applied microbiology*, 22(3), 434-444.
- Daniels, L., Fuchs, G., Thauer, R. K., & Zeikus, J. G. (1977). Carbon monoxide oxidation by methanogenic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 132(1), 118-126.
- Debode, F., Marien, A., Janssen, E., Bragard, C., & Berben, G. (2017). Influence of the amplicon length on real-time PCR results. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 21, 3-11.
- Einen, J., Thorseth, I. H., & Øvreås, L. (2008). Enumeration of Archaea and Bacteria in seafloor basalt using real-time quantitative PCR and fluorescence microscopy. *FEMS microbiology letters*, 282(2), 182-187.
- 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.

- Esteves, S. (2014). Demonstrating Management Systems at Full-Scale Anaerobic Digestion Plants.
- Ferrer, J y Seco, A. (2007). Tratamientos Biológicos de Aguas Residuales. 2ª ed. Editorial UPV. Valencia, España.
- Ferry, J. G. (1992). Biochemistry of methanogenesis. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 27(6), 473-503.
- Ferry, J. G. (1999). Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(1), 13-38.
- Fotidis, I. A., Karakashev, D., Kotsopoulos, T. A., Martzopoulos, G. G., & Angelidaki, I. (2013). Effect of ammonium and acetate on methanogenic pathway and methanogenic community composition. *FEMS microbiology ecology*, 83(1), 38-48.
- Friedrich, M. W. (2005). Methyl-coenzyme M reductase genes: unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing archaea. *Methods in enzymology*, 397, 428-442.
- 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. *Water Research*, 37(4), 902-908.
- Gagnon, N., Barret, M., Topp, E., Kalmokoff, M., Massé, D., Masse, L., & Talbot, G. (2011). A novel fingerprint method to assess the diversity of methanogens in microbial systems. *FEMS microbiology letters*, 325(2), 115-122.
- Garcia, J. L., Ollivier, B., & Whitman, W. B. (2003). The Order *Methanomicrobiales*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., & Stackebrandt, E. (Eds.) *The Prokaryotes, Vol. 3. Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. 3rd ed. Springer Verlag. New York.
- Hao, L. P., Lü, F., Li, L., Shao, L. M., & He, P. J. (2012). Shift of pathways during initiation of thermophilic methanogenesis at different initial pH. *Bioresource technology*, 126, 418-424.
- Harris, J. E., Pinn, P. A., & Davis, R. P. (1984). Isolation and characterization of a novel thermophilic, freshwater methanogen. *Applied and environmental microbiology*, 48(6), 1123-1128.

- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nature Biotechnology*, *11*(9), 1026-1030.
- 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.
- 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.
- 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. *Water research*, *45*(2), 705-713.
- 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.
- Huber, R. & Stetter K. O. (2001). Order I. *Methanopyrales* ord. nov. In: Boone, D. R., Castenholz, R. W., & Garrity, G. M. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. 2nd ed. Springer Verlag. New York
- Hugenholtz, P. (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome biology*, *3*(2), reviews0003-1.
- Huser, B. A., Wuhrmann, K., & Zehnder, A. J. (1982). *Methanotherix soehngeni* gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Archives of Microbiology*, *132*(1), 1-9.
- Jarvis, G. N., Strömpl, C., Burgess, D. M., Skillman, L. C., Moore, E. R., & Joblin, K. N. (2000). Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. *Current microbiology*, *40*(5), 327-332.
- Jímenez, A. L. (2012). Estudio en planta piloto de la aplicación de la tecnología de membranas para el tratamiento anaerobio de aguas residuales urbanas. Estudio de la condiciones críticas de filtración.

- Kang, I. J., Yoon, S. H., & Lee, C. H. (2002). Comparison of the filtration characteristics of organic and inorganic membranes in a membrane-coupled anaerobic bioreactor. *Water research*, 36(7), 1803-1813.
- Kendall, M. M., & Boone, D. R. (2003). The Order *Methanosarcinales*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., & Stackebrandt, E. (Eds.) *The Prokaryotes, Vol. 3. Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. 3rd ed. Springer Verlag. New York.
- 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.
- Kevbrin, V. V., Lysenko, A. M., & Zhilina, T. N. (1997). Physiology of the alkaliphilic methanogen Z-7936, a new strain of *Methanosalsus zhilinaeae* isolated from Lake Magadi. *MICROBIOLOGY-AIBS-C/C OF MIKROBIOLOGIJA*, 66, 261-266.
- Kiene, R. P., Oremland, R. S., Catena, A., Miller, L. G., & Capone, D. G. (1986). Metabolism of reduced methylated sulfur compounds in anaerobic sediments and by a pure culture of an estuarine methanogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(5), 1037-1045.
- Kim, J. O., Kim, Y. H., Ryu, J. Y., Song, B. K., Kim, I. H., & Yeom, S. H. (2005). Immobilization methods for continuous hydrogen gas production biofilm formation versus granulation. *Process Biochemistry*, 40(3), 1331-1337.
- Kim, J. S., Lee, C. H., & Chang, I. S. (2001). Effect of pump shear on the performance of a crossflow membrane bioreactor. *Water research*, 35(9), 2137-2144.
- König, H. (1984). Isolation and characterization of *Methanobacterium uliginosum* sp. nov. from a marshy soil. *Canadian journal of microbiology*, 30(12), 1477-1481.
- König, H., & Stetter, K. O. (1982). Isolation and characterization of *Methanolobus tindarius*, sp. nov., a coccoid methanogen growing only on methanol and methylamines. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*, 3(4), 478-490.
- Kotelnikova, S. V., Macario, A. J., & Pedersen, K. (1998). *Methanobacterium subterraneum* sp. nov., a new alkaliphilic, eurythermic and halotolerant methanogen isolated from deep granitic groundwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(2), 357-367.

- Kotelnikova, S. V., Obratsova, A. Y., Gongadze, G. M., & Laurinavichius, K. S. (1993b). *Methanobacterium thermoflexum* sp. nov. and *Methanobacterium defluvii* sp. nov., thermophilic rod-shaped methanogens isolated from anaerobic digester sludge. *Systematic and applied microbiology*, *16*(3), 427-435.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... & Ståhlberg, A. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, *27*(2), 95-125.
- Lai, M. C., & Shih, C. J. (2001). Characterization of *Methanococcus voltaei* strain P2F9701a: a new methanogen isolated from estuarine environment. *Current microbiology*, *42*(6), 432-437.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *82*(20), 6955-6959.
- Lew, B., Tarre, S., Beliaevski, M., Dosoretz, C., & Green, M. (2009). Anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) for domestic wastewater treatment. *Desalination*, *243*(1-3), 251-257.
- Lin, C., Raskin, L., & Stahl, D. A. (1997). Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology*, *22*(4), 281-294.
- Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J., & Riley, P. W. (2002). The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology*, *148*(11), 3521-3530.
- Mah, R. A., & Kuhn, D. A. (1984). Transfer of the type species of the genus *Methanococcus* to the genus *Methanosarcina*, naming it *Methanosarcina mazei* (Barker 1936) comb. nov. et emend. and conservation of the genus *Methanococcus* (Approved Lists 1980) with *Methanococcus vannielii* (Approved Lists 1980) as the type species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *34*(2), 263-265.
- May, T., Koch-Singenstreu, M., Ebling, J., Stantscheff, R., Müller, L., Jacobi, F., ... & König, H. (2015). Design and application of a synthetic DNA standard for real-time PCR analysis of microbial communities in a biogas digester. *Applied microbiology and biotechnology*, *99*(16), 6855-6863.

- Neefs, J. M., Van de Peer, Y., Hendriks, L., & De Wachter, R. (1990). Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic acids research*, *18*(Suppl), 2237-2330.
- Nozhevnikova, A. N., & Chudina, V. I. (1984). Morphology of the thermophilic acetate methane bacterium *Methanotherix thermoacetophila* sp.nov. *Microbiology*, *53*(5), 756-760.
- Nunoura, T., Oida, H., Toki, T., Ashi, J., Takai, K., & Horikoshi, K. (2006). Quantification of mcrA by quantitative fluorescent PCR in sediments from methane seep of the Nankai Trough. *FEMS microbiology ecology*, *57*(1), 149-157.
- Ollivier, B. M., Mah, R. A., Garcia, J. L., & Robinson, R. (1985). Isolation and Characterization of Methanogenium aggregans sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *35*(2), 127-130.
- Padmasiri, S. I., Zhang, J., Fitch, M., Norddahl, B., Morgenroth, E., & Raskin, L. (2007). Methanogenic population dynamics and performance of an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) treating swine manure under high shear conditions. *Water research*, *41*(1), 134-144.
- Paynter, M. J. B., & Hungate, R. E. (1968). Characterization of Methanobacterium mobilis, sp. n., isolated from the bovine rumen. *Journal of Bacteriology*, *95*(5), 1943-1951.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, *29*(9), 2002-2007.
- Raskin, L., Stromley, J. M., Rittmann, B. E., & Stahl, D. A. (1994). Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(4), 1232-1240.
- 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.
- Reeve, J. N., Nölling, J., Morgan, R. M., & Smith, D. R. (1997). Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first?. *Journal of bacteriology*, *179*(19), 5975.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., & Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*, *245*(2), 154-160.

- Rimbault, A., Niel, P., Virelizier, H., Darbord, J. C., & Leluan, G. (1988). L-Methionine, a precursor of trace methane in some proteolytic clostridia. *Applied and environmental microbiology*, 54(6), 1581-1586.
- Rivard, C. J., Henson, J. M., Thomas, M. V., & Smith, P. H. (1983). Isolation and characterization of *Methanomicrobium paynteri* sp. nov., a mesophilic methanogen isolated from marine sediments. *Applied and environmental microbiology*, 46(2), 484-490.
- Rodicio, M. R., & Mendoza, M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(4), 238-245.
- Romesser, J. A., Wolfe, R. S., Mayer, F., Spiess, E., & Walther-Mauruschat, A. (1979). *Methanogenium*, a new genus of marine methanogenic bacteria, and characterization of *Methanogenium cariaci* sp. nov. and *Methanogenium marisnigri* sp. nov. *Archives of Microbiology*, 121(2), 147-153.
- 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.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.
- Sanz, J. L., & Köchling, T. (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: an overview. *Process Biochemistry*, 42(2), 119-133.
- Sawayama, S., Tsukahara, K., & Yagishita, T. (2006). Phylogenetic description of immobilized methanogenic community using real-time PCR in a fixed-bed anaerobic digester. *Bioresource technology*, 97(1), 69-76.
- Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and molecular biology reviews*, 61(2), 262-280.
- Schnürer, A., Zellner, G., & Svensson, B. H. (1999). Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS microbiology ecology*, 29(3), 249-261.
- Song, M., Shin, S. G., & Hwang, S. (2010). Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater. *Bioresource technology*, 101(1), S23-S28.

- Sowers, K. R., Baron, S. F., & Ferry, J. G. (1984). *Methanosarcina acetivorans* sp. nov., an acetotrophic methane-producing bacterium isolated from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(5), 971-978.
- Sowers, K. R., & Ferry, J. G. (1985). Trace metal and vitamin requirements of *Methanococcoides methylutens* grown with trimethylamine. *Archives of microbiology*, 142(2), 148-151.
- Springer, E., Sachs, M. S., Woese, C. R., & Boone, D. R. (1995). Partial gene sequences for the A subunit of methyl-coenzyme M reductase (*mcrI*) as a phylogenetic tool for the family Methanosarcinaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(3), 554-559.
- Stahl, D. A. & Amann, R. (1991). Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics. In: Stackebrandt, E., & Goodfellow, M., (Eds.) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester.
- Stahl, D. A., Flesher, B., Mansfield, H. R., & Montgomery, L. (1988). Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(5), 1079-1084.
- Steinberg, L. M., & Regan, J. M. (2008). Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6663-6671.
- Steinberg, L. M., & Regan, J. M. (2009). *mcrA*-targeted real-time quantitative PCR method to examine methanogen communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(13), 4435-4442.
- Thermo Fisher Scientific (2011). User Guide Power SYBR® Green PCR Master Mix and Power SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit
- Thermo Scientific. NanoDrop Spectrophotometers. Technical Bulletin. Assessment of Nucleic Acid-Purity.<http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>
- Tortoli, E. (2003). Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 319-354.
- Tse, C., & Capeau, J. (2003). Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Annales de Biologie Clinique* 61(3), 279-293

- Van Haandel, A. C., & Lettinga, G. (1994). Anaerobic sewage treatment: a practical guide for regions with a hot climate. John Wiley & Sons.
- Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., & Hays, J. P. (2008). Principles and technical aspects of PCR amplification. Springer Verlag, Berlin.
- Větrovský, T., & Baldrian, P. (2013). The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS one*, 8(2), e57923.
- 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.
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., & Schleifer, K. H. (1993). Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied and environmental microbiology*, 59(5), 1520-1525.
- Whitman, W. B., and Jeanthon, C. (2003). The Order *Methanococcales*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., & Stackebrandt, E. (Eds.) *The Prokaryotes, Vol. 3. Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. 3rd ed. Springer Verlag. New York.
- Widdel, F. (1986). Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), 1056-1062.
- Williams, J., Williams, H., Dinsdale, R., Guwy, A., & Esteves, S. (2013). Monitoring methanogenic population dynamics in a full-scale anaerobic digester to facilitate operational management. *Bioresource technology*, 140, 234-242.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2), 221-271.
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088-5090.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.

- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Macke, T. J., & Fox, G. E. (1985). A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Systematic and Applied Microbiology*, 6(2), 143-151.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., & Hwang, S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and bioengineering*, 89(6), 670-679.
- Yu, Y., Kim, J., & Hwang, S. (2006). Use of real-time PCR for group-specific quantification of acetoclastic methanogens in anaerobic processes: population dynamics and community structures. *Biotechnology and bioengineering*, 93(3), 424-433.
- Yun, J. J., Heisler, L. E., Hwang, I. I., Wilkins, O., Lau, S. K., Hycza, M., ... & Der, S. D. (2006). Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic acids research*, 34(12), e85.
- Zellner, G., & Winter, J. (1987). Secondary alcohols as hydrogen donors for CO<sub>2</sub>-reduction by methanogens. *FEMS microbiology letters*, 44(3), 323-328.
- Zinder, S. H., Anguish, T., & Lobo, A. L. (1987). Isolation and characterization of a thermophilic acetotrophic strain of Methanotrix. *Archives of microbiology*, 146(4), 315-322.
- Zinder, S. H., Sowers, K. R., & Ferry, J. G. (1985). Notes: Methanosarcina thermophila sp. nov., a thermophilic, acetotrophic, methane-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 35(4), 522-523.
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic acids research*, 32(12), e103.



## ANEXO I

### Protocolo de extracción de ADN mediante E.Z.N.A.<sup>®</sup> Soil DNA

#### Kit

El contenido del kit es el siguiente:

- HiBind<sup>®</sup> DNA Mini Columns
- 2mL Collection Tubes
- Glass Beads
- HTR Reagent
- SLX-Mlus Buffer
- DS Buffer
- P2 Buffer
- XP1 Buffer
- Elution Buffer
- SPW Wash Buffer

Para realizar la extracción de ADN se ha seguido el siguiente protocolo facilitado por el fabricante. Cabe destacar que se han realizado varias modificaciones con las que se ha facilitado la extracción y se ha obtenido un ADN de mayor pureza.

1. Transferir 500 mg de beads a un tubo de centrifuga de 1,5mL.
2. Añadir de 0,2-1,0 g de muestra al tubo de centrifuga con las beads. (Modificado a 1mL de muestra previamente centrifugada durante 3 minutos a 17000 x *g* de la cual se ha descartado el sobrenadante)
3. Añadir 1 mL de SLX-Mlus Buffer. Agitar en vórtex a máxima velocidad durante 3-5 minutos para lisar las células de la muestra. (Modificado el tiempo a 10 minutos)
4. Añadir 100 µL de DS Buffer y agitar en vórtex.
5. Incubar a 70°C durante 10 minutos y agitar en vórtex una vez acabada la incubación. (Modificado el tiempo a 20 minutos).  
Para bacterias gram positivas, realizar una segunda incubación de 2 minutos a 95°C. (Modificado el tiempo a 5 minutos)
6. Centrifugar a 3.000 rpm durante 3 minutos. (Modificado el tiempo a 5 minutos)
7. Transferir 800 µL de sobrenadante en un nuevo tubo de centrifuga de 2mL.
8. Añadir 270 µL de P2 Buffer y agitar en vórtex.
9. Incubar en hielo durante 5 minutos.

10. Centrifugar a  $\geq 13.000 \times g$  durante 5 minutos.
11. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de centrifuga de 2mL.
12. Añadir 750  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Agitar invirtiendo el tubo de 20 a 30 veces.
13. Centrifugar a  $\geq 13.000 \times g$  durante 10 minutos. (Modificado el tiempo a 20 minutos)
14. Descartar el sobrenadante sin arrastrar el pellet.
15. Invertir el tubo en un papel absorbente durante 1 minuto para drenar el líquido.
16. Añadir 200  $\mu\text{L}$  de Elution Buffer (precalentado a 70 °C) y agitar en el vórtex.
17. Incubar a 70 °C durante 20 minutos para disolver el pellet.
18. Añadir 100  $\mu\text{L}$  HTR Reagent y agitar en vórtex.
19. Esperar 2 minutos a temperatura ambiente.
20. Centrifugar a  $\geq 13.000 \times g$  durante 2 minutos.
21. Transferir el sobrenadante a un tubo de centrifuga nuevo de 2 mL.
22. Añadir 300  $\mu\text{L}$  de XP1 Buffer y agitar en vórtex.
23. Insertar una HiBind® DNA Mini Column en un tubo Collection Tube de 2mL.
24. Transferir la muestra.
25. Centrifugar a 10.000  $\times g$  durante 1 minuto.
26. Descartar el líquido filtrado y reutilizar el tubo Collection Tube.
27. Añadir 300  $\mu\text{L}$  de XP1 Buffer.
28. Centrifugar a 10.000  $\times g$  durante 1 minuto.
29. Descartar el líquido filtrado y reutilizar el tubo Collection Tube.
30. Transferir la columna HiBind® DNA Mini Column a un tubo nuevo Collection Tube de 2 mL.
31. Añadir 700  $\mu\text{L}$  de SPW Wash Buffer.
32. Centrifugar a 10.000  $\times g$  durante 1 minuto.
33. Descartar el líquido filtrado y reutilizar el tubo Collection Tube.
34. Repetir los pasos 31-33 para un segundo lavado con SPW Wash Buffer.
35. Centrifugar la columna vacía HiBind® DNA Mini Column a  $\geq 13.000 \times g$  durante 2 minutos.
36. Transferir la columna HiBind® DNA Mini Column a un tubo nuevo de 1,5 mL.
37. Añadir 100  $\mu\text{L}$  de Elution Buffer (precalentado a 70 °C) directamente en el centro de la membrana.
38. Incubar a 70 °C durante 15 minutos.
39. Centrifugar a  $\geq 13.000 \times g$  durante 1 minuto.
40. Repetir los pasos 37-39 para un segundo lavado.
41. Descartar la columna HiBind® DNA Mini Column y guardar el ADN a -20 °C

## ANEXO II

### Secuencia del oligo sintético

El diseño del oligo sintético (May *et al.*, 2015) para realizar las curvas de calibrado está compuesto de las siguientes secuencias correspondientes a los diferentes órdenes estudiados. En la tabla siguiente (Tabla 29), se muestra la posición de inicio y final en el oligo sintético de cada orden. Las secuencias en minúscula han sido generadas aleatoriamente y son mostradas en la tabla como espaciadores.

Posición	Secuencia	Posición
1	ACTCCTACGGGAGGCAGGGTGGTGTAGGATTCACACAGTAG	41
42	TAAACGATACTCGCTAGGTAGGAATTGGCGGGGAGCACGA	82
83	AGGGAAGCTGTTAAGTTAGCGGTGAAATGCGTTGATCCAC	123
124	CTAACGCGCATAGTTTACCAACATCGTCCATACCCAGGGtttttt	168
169	tAGCACCAACGCGTGGAttttttttttttCAGCTTTCGTTCTCA	216
217	CTGTCCGAtttttGGTAACGAGCGAGACCCGttttTAAACTCTGC	261
262	GGACTAGGTGtccgcttctaatagcacacaccgggcaatacgagctcaagc	312
313	cagtctcgagtaacgctcatcagcaaacgaaagagtttaaggctcgctaattc	366
367	gcactgtcaggtccccttgggtgtttttgtGGTACTCTGTGGGGACttttt	418
419	tttttACTATCCTAACTACGCGATGAACGtttttttttttGGATTA	467
468	GATACCCTGGTAGTCtttttttttttTGCGGTAAGTACTGCTACAC	511

Tabla 29. Posición inicial y final de cada orden estudiado en el oligo sintético.

Forward							
BAC F	MET F	MSL F	ARC F	MBT F	MCC F	SRB F	MMB F
1 - 17	18 - 40	41 - 60	61 - 79	80 - 98	99 - 120	142 - 162	201 - 224

Reverse							
MMB R	MBT R	ARC R	MCC R	MSL R	MET R	BAC R	SRB R
121 - 141	170 - 187	230 - 247	252 - 271	397 - 413	425 - 448	462 - 482	495 - 511



## ANEXO III

### Protocolo FISH para la detección de microorganismos en fangos activos

El protocolo a seguir para la identificación de los microorganismos mediante FISH es el siguiente:

#### A. FIJACIÓN

1. Centrifugar 1 mL de cultivo líquido a 5.000 g durante 3 minutos.
2. a) Para organismos Gram negativos:
  - Eliminar 750  $\mu$ L de sobrenadante.
  - Añadir 750  $\mu$ L de PFA al 4% y mantener a 4°C durante 1-3 horas.
2. b) Para organismos Gram positivos:
  - Eliminar 500  $\mu$ L de sobrenadante.
  - Añadir 500  $\mu$ L de Etanol (98%) y mantener a 4°C durante 4-16 horas.
3. Centrifugar a 500 g durante 3 minutos y eliminar el sobrenadante.
4. Lavar y resuspender con PBS 1x y volver a centrifugar.
5. Eliminar el sobrenadante y resuspender en PBS 1x y Etanol (frío) en la misma proporción.
6. Almacenar en congelador a -20°C.

#### B. HIBRIDACIÓN

7. Colocar 8  $\mu$ L de células fijadas en cada pocillo de portas con pocillos previamente gelatinizados. Secar a temperatura ambiente.
8. Deshidratar en etanol al 50%, 80% y 100% durante 3 minutos cada uno.
9. Preparar la solución de hibridación (2000  $\mu$ L) según el porcentaje de formamida (Tabla 30). Debe de ser manipulada en campana extractora.

Tabla 30. Solución de hibridación según el porcentaje de formamida.

Reactivo	% Formamida						
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%
NaCl (5M)	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
Formamida	200 µL	400 µL	500 µL	600 µL	700 µL	800 µL	900 µL
H <sub>2</sub> O MiliQ	1.398 µL	1.198 µL	1.098 µL	998 µL	898 µL	798 µL	698 µL
SDS 10%	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

10. Por cada pocillo, añadir 1 µL de sonda y 8 µL de solución de hibridación. Para dos sondas, añadir 0,5 µL de cada sonda y 8 µL de solución de hibridación. Incubar a 46°C durante 1-2 horas.
11. Preparar la solución de lavado (50 mL) según % de formamida (Tabla 31). Atemperar en baño a 48°C.

Tabla 31. Solución de lavado según el porcentaje de formamida.

Reactivo	% Formamida						
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%
NaCl (5M)	4.500 µL	2.150 µL	1.490 µL	1.020 µL	700 µL	460 µL	300 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
H <sub>2</sub> O MiliQ	44,45 µL	46,3 µL	47,94 µL	47,43 µL	47,75 µL	47,06 µL	48,15 µL
SDS 10%	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

12. Sacar el portaobjetos de la estufa rápidamente, lavar con solución de lavado e introducir en la solución de lavado. Incubar a 48°C durante 10-15 minutos.
13. Lavar con agua MilliQ, secar rápidamente en oscuridad. (Una vez seco, el portaobjetos se puede congelar).



## ANEXO IV

### Número de copias del gen 16S presentes en cada organismo

En las siguientes tablas (Tabla 32, Tabla 33 y Tabla 34) se muestra el número de copias del gen 16S en cada organismo perteneciente a cada orden estudiado.

Tabla 32. Copias del gen 16S en cada organismo del orden *Methanobacteriales*.

<b>Grupo/Fuente</b>	<b>Organismo</b>	<b>Copias 16S</b>
<b><i>Methanobacteriales</i></b>		<b>2,4</b>
T01437	Methanobacterium sp. AL-21	2
T02957	Methanobacterium sp. MB1	2
T01509	Methanobacterium sp. SWAN-1	3
T01166	Methanobrevibacter ruminantium M1	2
T00539	Methanobrevibacter smithii ATCC 35061	2
T02687	Methanobrevibacter sp. AbM4	3
T00313	Methanosphaera stadtmanae DSM 3091	4
T01297	Methanothermobacter marburgensis Marburg	2
T00009	Methanothermobacter thermautotrophicus deltaH	2
T01351	Methanothermus fervidus DSM 2088	2

Tabla 33. Copias del gen 16S en cada organismo del orden *Methanosarcinales*.

<b>Grupo/Fuente</b>	<b>Organismo</b>	<b>Copias 16S</b>
<b><i>Methanosarcinales</i></b>		<b>2,5</b>
T00341	Methanococcoides burtonii DSM 6242	3
T01261	Methanohalobium evestigatum Z-7303	2
T01211	Methanohalophilus mahii DSM 5219	3
T02280	Methanobolus psychrophilus R15	3
T02418	Methanomethylovorans hollandica DSM 15978	2
T01468	Methanosaeta concilii GP6	2
T01990	Methanosaeta harundinacea 6Ac	1
T00417	Methanosaeta thermophila PT	2
T01541	Methanosalsum zhilinae DSM 4017	3
T00080	Methanosarcina acetivorans C2A	3
T00271	Methanosarcina barkeri fusaro, chromosome 1	3
T00082	Methanosarcina mazei Go1	3
T02477	Methanosarcina mazei Tuc01	3

Tabla 34. Copias del gen 16S en cada organismo del orden *Methanomicrobiales*.

<b>Grupo/Fuente</b>	<b>Organismo</b>	<b>Copias 16S</b>
<b><i>Methanomicrobiales</i></b>		<b>2,0</b>
T00823	Methanosphaerula palustris E1-9c	3
T00472	Methanocorpusculum labreanum Z	3
T02189	Methanoculleus bourgensis MS2	1
T00477	Methanoculleus marisnigri JR1	1
T01312	Methanoplanus petrolearius DSM 11571	2
T00578	Methanoregula boonei 6A8	1
T02392	Methanoregula formicicum SMSP	1
T00325	Methanospirillum hungatei JF-1	4