

# **DINÁMICA Y DISTRIBUCIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN DOS BIORREACTORES DE LODOS ACTIVADOS EN PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS**

Por

Alexis Valentín Vargas

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS  
En  
BIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ  
2009

Aprobado por:

\_\_\_\_\_  
Rafael Montalvo-Rodríguez, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Carlos Rodríguez-Minguela, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Arturo Massol-Deyá, Ph.D.  
Presidente, Comité Graduado

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Lorenzo Saliceti Piazza, Ph.D.  
Representante de Estudios Graduados

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nanette Difffoot-Carlo, Ph.D.  
Director de Departamento

\_\_\_\_\_  
Fecha

## ABSTRACT

Biological wastewater treatment systems are recognized today as the most common biotechnological application in the World. But despite of their widely distributed use, there is a very limited knowledge of their distinctive microbial diversity, the dynamics between populations, and biogeographical pattern in the community structure, especially in tropical environments. In order to comprehend the highly complex microbial dynamics of these ecosystems, two activated sludge bioreactors in Puerto Rico were studied. Temporal and spatial variations of dominant populations, as well as patterns between community variations and operational parameters were assessed during a 13 months period through molecular techniques, consisting of t-RFLP and clone libraries analyses. Both biological and environmental data were analyzed using a combination of multivariate statistical tools, including: Canonical Correspondence Analysis, Non-Metric Multidimensional Scaling and Analysis of Similarity. Although an apparent overlapping between populations was observed, the results revealed significant differences between the two treatment plants and shows that the microbial community in the smaller bioreactor (Adjuntas, 0.6 millions of gallons per day, MGD) is more unstable and inefficient than the community in the bigger one (Mayagüez, 28 MGD). We identified operational parameters such as pH, solid and hydraulic retention times, and flow showing strong correlations with shifts in the community structure. The bacterial community in Adjuntas bioreactor appeared to be more susceptible to chemical variations in the influent wastewater. Furthermore, the shorter solid retention time of the system ( $\approx 5$  days) promotes a codominance of microbial populations, which results in system instability. In both plants, bacteria from the *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* and the *Bacteroidetes* were the most abundant groups, which differed from some diversity studies previously published. In general, our findings demonstrate that each treatment plant has a distinctive microbial community structure while the microbial community at the smaller bioreactor was more inconsistent in the water cleaning process than the community in the Mayagüez bioreactor. These findings can contribute to the development and implementation of more stable, efficient and less expensive biological treatment systems.

## RESUMEN

Los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales son reconocidos hoy día como la aplicación biotecnológica más común en el mundo. A pesar de su amplio uso, existe un conocimiento muy limitado sobre sus aspectos biológicos, incluyendo: diversidad microbiana, dinámica de comunidades y patrones biogeográficos; especialmente en ambientes tropicales. Con el propósito de comprender mejor las complejas dinámicas microbianas en estos ecosistemas, se estudiaron dos biorreactores de lodos activados en Puerto Rico. Por medio de las técnicas moleculares de t-RFLP y bibliotecas de clones ambientales se estudiaron variaciones temporales y espaciales en las poblaciones dominantes, al igual que relacionaron variaciones en la comunidad microbiana y variaciones en parámetros operacionales durante un periodo de 13 meses. Tanto datos biológicos como ambientales fueron analizados utilizando una combinación de herramientas estadísticas multivariadas, incluyendo: Análisis Canónico de Correspondencia, Análisis de Escalamiento Multidimensional No-Métrico y Análisis de Similitud. Aunque se observó un aparente solapamiento entre las poblaciones, los resultados revelaron diferencias significativas entre las dos plantas de tratamiento y mostraron que la comunidad microbiana en el reactor de menor capacidad (Adjuntas, 0.6 millones de galones diarios, MGD) es más inestable e ineficiente que la comunidad en el reactor de mayor capacidad (Mayagüez, 28 MGD). Pudimos identificar parámetros como el pH, tiempos de retención hidráulica y retención de sólidos, y flujo mostrando fuertes correlaciones con cambios en la estructura comunitaria. La comunidad bacteriana en el biorreactor de Adjuntas demostró ser más susceptible a variaciones químicas en el agua del afluente. Además, los cortos tiempos de retención de sólidos del sistema ( $\approx 5$  días) promueven una codominancia de poblaciones bacterianas en el biorreactor, lo que resulta en inestabilidad del sistema. En ambas plantas, bacterias pertenecientes a las *Proteobacterias*, *Cyanobacterias* y los *Bacteroidetes* fueron los grupos más abundantes, lo que difiere de otros estudios previamente publicados. En general, nuestros hallazgos demostraron que cada planta de tratamiento posee una comunidad bacteriana distintiva, mientras que la comunidad microbiana en el reactor de menor capacidad fue más inconsistente en el proceso de tratamiento que la comunidad en el reactor de Mayagüez. Los resultados de este estudio pueden contribuir al desarrollo e implementación de sistemas de tratamiento biológico más estables, eficientes y menos costosos.

**DINÁMICA Y DISTRIBUCIÓN DE COMUNIDADES  
BACTERIANAS EN DOS BIORREACTORES DE LODOS  
ACTIVADOS EN PLANTAS DE TRATAMIENTO DE  
AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS**

**© ALEXIS VALENTÍN VARGAS, 2009**  
Todos los derechos reservados

*A mis Padres por siempre ofrecerme su apoyo incondicional y ser mis guías en todo el camino hasta alcanzar esta meta, y a Dios por regalarme vida todos los días para poder llegar hasta aquí.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Biología de la Universidad de Puerto Rico en Mayagüez por darme la oportunidad de realizar aquí mi maestría y por apoyarme como asistente de cátedra.

A mi consejero y presidente de comité Dr. Arturo Massol Deyá por su confianza, sus consejos, su paciencia y por darme la oportunidad de completar mi investigación de tesis en su Laboratorio de Ecología Microbiana Tropical (TMEL).

A los miembros de mi comité graduado Dr. Rafael Montalvo Rodríguez y el Dr. Carlos Rodríguez Minguela por todos sus consejos y sugerencias durante el proceso de esta investigación y mis años de maestría, y por facilitarme equipos y materiales de sus laboratorios.

A todos los miembros del TMEL, especialmente a Enid Rodríguez, Dubiezel Medina, Gloried Toledo, Alejandro Caro, Gina Rodríguez y Elba Díaz, por todo su apoyo y asistencia investigativa e intelectual en el desarrollo de mi tesis.

A Magaly Zapata, el Dr. Carlos Ríos y Katherine Carrero por facilitarme equipos y materiales de sus laboratorios.

A Gladys Toro por su paciencia y valiosa asistencia en la realización de los t-RFLP.

A todos los empleados y la administración de las plantas de tratamiento de Adjuntas y Mayagüez de la AAA, especialmente al Ing. Jorge Jiménez y al Sr. Yamil Lugo por su asistencia en la colección de muestras y por proveer la mayoría de los datos ambientales y operacionales utilizados en este estudio.

Al Dr. Craig Criddle y todas las personas que apoyaron el establecimiento de la Red Mundial de Monitoreo de Biorreactores por que sin ellos la idea original de esta investigación nunca hubiese existido.

A Lyra Medina por su apoyo incondicional, su amor y por toda su asistencia en los trabajos de investigación de esta tesis.

A toda mi familia, especialmente mis padres y hermanos, por todo el apoyo y comprensión durante estos 4 años de maestría.

A todo el personal del Departamento de Biología y todos mis amigos, especialmente a Vanessa, Gloried, Duby, Alejo, Gina y Enid por ser como mi familia y hacer de estos años una experiencia muy grata y educativa.

## TABLA DE CONTENIDO

|                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------|-----|
| ABSTRACT .....                                                             | ii  |
| RESUMEN .....                                                              | iii |
| AGRADECIMIENTOS .....                                                      | vi  |
| LISTA DE FIGURAS .....                                                     | ix  |
| LISTA DE TABLAS .....                                                      | xii |
| INTRODUCCIÓN .....                                                         | 1   |
| OBJETIVOS.....                                                             | 7   |
| <i>Objetivo General</i> .....                                              | 7   |
| <i>Objetivos Específicos</i> .....                                         | 7   |
| REVISIÓN DE LITERATURA.....                                                | 8   |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....                                                  | 28  |
| <i>Área de estudio</i> .....                                               | 28  |
| <i>Plan de muestreo</i> .....                                              | 32  |
| <i>Determinación de parámetros ambientales y operacionales</i> .....       | 33  |
| <i>Análisis molecular de las comunidades microbianas en los lodos</i>      |     |
| <i>activados</i> .....                                                     | 35  |
| <i>Extracción de ADN metagenómico de las comunidades microbianas</i> ..... | 37  |
| <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> .....                     | 39  |
| <i>Polimorfismos del Largo del Fragmento Terminal de Restricción</i>       |     |
| <i>(t-RFLP)</i> .....                                                      | 40  |
| <i>Análisis In-Sílico de los perfiles de t-RFLP</i> .....                  | 42  |
| <i>Análisis estadístico de los perfiles de t-RFLP</i> .....                | 45  |
| <i>Análisis de Escalamiento Multidimensional No-Métrico (NMDS)</i> ...     | 46  |
| <i>Análisis de similaridad (ANOSIM)</i> .....                              | 48  |
| <i>Porcentaje de Similitud (SIMPER)</i> .....                              | 48  |
| <i>Análisis Canónico de Correspondencia (CCA)</i> .....                    | 49  |
| <i>Clonación de productos de PCR de genes del 16S ARN ribosomal</i> .....  | 51  |
| RESULTADOS.....                                                            | 55  |
| <i>Estructura de las comunidades bacterianas en las unidades de</i>        |     |
| <i>tratamiento biológico</i> .....                                         | 55  |
| <i>Polimorfismos del Fragmento Terminal de Restricción (t-RFLP)</i> ...    | 55  |
| <i>Análisis estadístico de los resultados del t-RFLP</i> .....             | 57  |
| <i>Bibliotecas genómicas ambientales de genes del 16S rARN</i> .....       | 70  |
| <i>Análisis de diversidad y riqueza de especies</i> .....                  | 78  |
| <i>Análisis de restricción In-Sílico de las bibliotecas genómicas</i>      |     |
| <i>ambientales</i> .....                                                   | 83  |

|                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Efecto de factores ambientales y operacionales en las comunidades bacterianas</i> .....                                        | 90  |
| <i>Parámetros ambientales y operacionales</i> .....                                                                               | 90  |
| <i>Análisis Canónico de Correspondencia (CCA)</i> .....                                                                           | 94  |
| DISCUSIÓN .....                                                                                                                   | 108 |
| CONCLUSIONES .....                                                                                                                | 139 |
| LITERATURA CITADA .....                                                                                                           | 141 |
| APÉNDICES .....                                                                                                                   | 154 |
| <i>Apéndice 1. Gráficas de parámetros ambientales y operacionales de las plantas de Adjuntas y Mayagüez</i> .....                 | 155 |
| <i>Apéndice 2. Diagramas de Shepard y valores de estrés del Análisis de Escalamiento Multidimensional No-Métrico (NMDS)</i> ..... | 164 |
| <i>Apéndice 3. Gráficas de Análisis Canónico de Correspondencia (CCA) mostrando efecto de arco</i> .....                          | 165 |



## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estructura de la Planta de Tratamiento de Mayagüez (A) y las partes de su biorreactor de lodos activados (B) .....                                                                                                                                                        | 30 |
| Figura 2. Estructura de la Planta de Tratamiento de Adjuntas (A) y las partes de su biorreactor de lodos activados (B) .....                                                                                                                                                        | 31 |
| Figura 3. Riqueza de fragmentos terminales de restricción (OTUs) detectados en los perfiles de t-RFLP para cada planta de tratamiento: Mayagüez (A) y Adjuntas (B).....                                                                                                             | 58 |
| Figura 4. Perfil de t-RFLP de genes de 16S rARN cortados con la enzima <i>Hae</i> III, correspondientes a los biorreactores de las plantas de de Adjuntas (Adj) y Mayagüez (May).....                                                                                               | 59 |
| Figura 5. Análisis de Escalamiento Multidimensional No-Métrico construido del consenso de las poblaciones bacterianas identificadas por los patrones de restricción de las 3 enzimas de restricción en los t-RFLPs .....                                                            | 62 |
| Figura 6. Análisis de Escalamiento Multidimensional No-Métrico construido del consenso de las poblaciones bacterianas identificadas por los patrones de restricción de las 3 enzimas de restricción en los t-RFLPs (incluye envoltura convexa) .....                                | 63 |
| Figura 7. Análisis de Escalamiento Multidimensional No-Métrico construido del consenso de las poblaciones bacterianas identificadas por los patrones de restricción de las 3 enzimas de restricción en los t-RFLPs (sin incluir la primeras 2 muestras de planta de Mayagüez) ..... | 64 |
| Figura 8. Análisis filogenético general de secuencias ambientales obtenidas de las bibliotecas de clones construidas de las plantas de Mayagüez (A) y Adjuntas (B).....                                                                                                             | 72 |
| Figura 9. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de genes del 16S rARN en la dirección 5'-3' obtenidas de las bibliotecas de clones de la planta de tratamiento de Mayagüez .....                                                                                 | 74 |

|                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 10. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de genes del 16S rARN en la dirección 3'-5' (complemento reverso) obtenidas de las bibliotecas de clones de la planta de tratamiento de Mayagüez ..... | 75 |
| Figura 11. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de genes del 16S rARN en la dirección 5'-3' obtenidas de las bibliotecas de clones de la planta de tratamiento de Adjuntas.....                        | 76 |
| Figura 12. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de genes del 16S rARN en la dirección 3'-5' (complemento reverso) obtenidas de las bibliotecas de clones de la planta de tratamiento de Adjuntas ..... | 77 |
| Figura 13. Curvas de refracción de las bibliotecas de clones construidas de las muestras de los reactores aerobios de las plantas de Mayagüez y Adjuntas .....                                                             | 81 |
| Figura 14. Análisis de cobertura de las bibliotecas de clones ambientales de las muestras de reactor aerobio de las plantas de tratamiento de Mayagüez (A) y Adjuntas (B) .....                                            | 82 |
| Figura 15. Electroforesis de t-RFLP de las muestras de las etapas anóxica y aerobia del biorreactor y del recirculado de la planta de tratamiento de Mayagüez.....                                                         | 88 |
| Figura 16. Electroforesis de t-RFLP de las muestras de la etapa aerobia del biorreactor y del licor mezclado de la planta de tratamiento de Adjuntas.                                                                      | 89 |
| Figura 17. Promedios de las concentraciones de amoníaco y nitrato medidos en muestras de las distintas etapas de tratamiento de la planta de Mayagüez .....                                                                | 93 |
| Figura 18. Comparación de la remoción de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (BOD) en las plantas de tratamiento de Mayagüez y Adjuntas .....                                                                                 | 95 |
| Figura 19. Comparación de la remoción de los Sólidos Suspendidos Totales (TSS) en las plantas de tratamiento de Mayagüez y Adjuntas .....                                                                                  | 95 |
| Figura 20. Concentraciones de la Demanda Biológica de Oxígeno medidas por el método de 5 días en el efluente y el afluente de las plantas de tratamiento de Mayagüez (A) y de Adjuntas (B).....                            | 96 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 21. Análisis Canónico de Correspondencia mostrando la relación entre los parámetros ambientales y operacionales colectados o calculados los mismos días del muestreo en comparación con las comunidades bacterianas correspondientes a los primeros 11 meses de muestreo en la planta de Mayagüez ..... | 102 |
| Figura 22. Análisis Canónico de Correspondencia mostrando la relación entre los parámetros ambientales y operacionales colectados o calculados durante los meses de muestreo en comparación con las comunidades bacterianas correspondientes a los primeros 11 meses de muestreo en la planta de Mayagüez..... | 103 |
| Figura 23. Análisis Canónico de Correspondencia mostrando la relación entre los parámetros ambientales y operacionales colectados los mismos días del muestreo en comparación con las comunidades bacterianas de todo los 13 meses de muestreo en la planta de Adjuntas.....                                   | 106 |
| Figura 24. Análisis Canónico de Correspondencia mostrando la relación entre los parámetros ambientales y operacionales colectados o calculados durante los meses de muestreo en comparación con las comunidades bacterianas de todo los 13 meses de muestreo en la planta de Adjuntas .....                    | 107 |

## LISTA DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Listado de parámetros incluidos en el análisis ambiental de las condiciones dominantes en cada sistema de tratamiento .....                                                             | 36 |
| Tabla 2. Resultados de ANOSIM de la comparación de perfiles de t-RFLP .....                                                                                                                      | 65 |
| Tabla 3. Resultados de SIMPER binario (presencia/ausencia) de los fragmentos producidos por la enzima <i>Hae</i> III- 25%.....                                                                   | 67 |
| Tabla 4. Resultados de SIMPER binario (presencia/ausencia) de los fragmentos producidos por la enzima <i>Msp</i> I- 25% .....                                                                    | 68 |
| Tabla 5. Resultados de SIMPER binario (presencia/ausencia) de los fragmentos producidos por la enzima <i>Rsa</i> I- 25%.....                                                                     | 69 |
| Tabla 6. Índices ecológicos y características estadísticas de las bibliotecas de clones ambientales construidas de muestras de los reactores de tratamiento aerobio de Mayagüez y Adjuntas ..... | 79 |
| Tabla 7. Restricción <i>In-Silico</i> de secuencias (solo 5'-3') de clones ambientales obtenidas de la biblioteca genómica de la planta de tratamiento de Mayagüez.....                          | 84 |
| Tabla 8. Restricción <i>In-Silico</i> de secuencias (solo 5'-3') de clones ambientales obtenidas de la biblioteca genómica de la planta de tratamiento de Adjuntas.....                          | 85 |
| Tabla 9. Fragmentos terminales de restricción de la biblioteca de clones de la planta de tratamiento de Mayagüez identificados en la electroforesis del t-RFLP .....                             | 86 |
| Tabla 10. Fragmentos terminales de restricción de la biblioteca de clones de la planta de tratamiento de Adjuntas identificados en la electroforesis del t-RFLP .....                            | 87 |

## INTRODUCCIÓN

En las sociedades modernas el tratamiento de aguas residuales domésticas se ha convertido en una necesidad por la importancia de este proceso en reducir la contaminación ambiental y proteger la salud de los seres humanos. Las aguas residuales domésticas son principalmente una combinación de desechos fisiológicos de origen humano y la llamada “agua gris” que es una combinación de los desechos de lavado (ducha, lavado de ropa y trastes) y preparación de alimentos (Maier *et al.*, 2009). Otros componentes importantes de las aguas residuales domésticas que llegan a los sistemas de tratamiento incluyen: desechos industriales (algunos son pre-tratados), desechos de agricultura y aguas de escorrentía. La principal meta de los sistemas de tratamiento de aguas residuales es reducir la demanda bioquímica de oxígeno disuelto (BOD) consumido por microorganismos durante la oxidación bioquímica de materia orgánica e inorgánica (ej. amoníaco). Así, una reducción en el BOD se considera una consecuencia directa de la remoción de los contaminantes presentes en el agua residual por la acción metabólica de la comunidad de microorganismos en el sistema.

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales, en su mayoría, se componen de dos etapas: un tratamiento primario y un tratamiento secundario. El tratamiento primario envuelve una separación física de la mayoría de los sólidos suspendidos en el afluente de la planta por medio de rejillas, un sistema de remoción de arena y un tanque clarificador primario que remueve los sólidos

por sedimentación. El tratamiento secundario envuelve degradación biológica en donde los sólidos suspendidos y disueltos restantes son descompuestos por microorganismos en un reactor de tratamiento, generalmente conocido como un biorreactor (Bitton, 2005, Maier *et al.*, 2009). La biomasa producida es removida y el efluente restante es sometido a un sistema de desinfección y luego libreado de la planta de tratamiento. Algunos sistemas de tratamiento especializados pueden incluir un tratamiento terciario para la remoción de compuestos específicos (ej. compuestos nitrogenados).

El método de de tratamiento biológico más utilizado, y quizás el más eficiente, es el sistema de digestión en tanques de aeración, popularmente conocido como el sistema de Lodos Activados (Maier *et al.* 2009). Este proceso consiste esencialmente en un tratamiento aerobio que oxida materia orgánica a  $\text{CO}_2$  y agua,  $\text{NH}_4$  y nueva biomasa celular. El tratamiento por lodos activados incluye dos pasos principales: degradación de materia orgánica e inorgánica en el tanque o reactor aerobio, seguido por una separación física de los lodos y el agua tratada por medio de sedimentación en un clarificador secundario (Dignac *et al.*, 2000). El efluente del tratamiento primario es bombeado a un tanque de tratamiento y es mezclado con una solución rica en bacterias conocida como lodo activado. Este proceso forma lo que se conoce como el licor mezclado, que es agua liberada del tratamiento primario más un inóculo de microorganismos en forma de lodo obtenido generalmente del clarificador secundario. Aire u oxígeno puro es inyectado al biorreactor promoviendo la mezcla de los lodos con el agua del afluente, el crecimiento de bacterias y la descomposición de la materia

orgánica suspendida. El licor mezclado tratado va al clarificador secundario donde se retiene la biomasa celular floculada y sedimentada en el fondo del tanque para eventualmente ser removida (Bitton, 2005; Maier *et al.* 2009). Parte de los sólidos removidos del clarificador secundario son recirculados y sirven de inóculo para mantener una constancia en la comunidad bacteriana que domina en el biorreactor y facilitar una oxidación más rápida de la materia orgánica (Bitton, 2005).

En los Estados Unidos existen más de 15,000 plantas de tratamiento que procesan sobre 35 mil millones de litros de agua diariamente y al menos el 75% de ellas posee tratamiento secundario o terciario (Bitton, 2005). Sin embargo, a pesar de su amplio uso, se conoce poco sobre los aspectos biológicos del funcionamiento de estos sistemas. Estos procesos de tratamiento se ha utilizado desde el Siglo XIX como modelos de ingeniería donde las mejorías de diseño han sido alcanzadas empíricamente (Graham y Smith, 2004; Curtis *et al.*, 2003). Muchos esfuerzos se enfocan en mejorar los procesos de ingeniería pero pocas investigaciones han logrado establecer el vínculo entre la estructura y función específica de la comunidad microbiana con el diseño y operación de los biorreactores (Wagner *et al.*, 1993). Además, estudios dependientes de cultivo dirigidos a descifrar la diversidad de bacterias en sistemas de tratamiento biológicos (Días y Bath, 1964; Días y Bath, 1965) demostraron ser poco confiables y crearon falsas percepciones de los organismos dominantes en estos sistemas (Eschenhagen *et al.* 2002; Hiraishi *et al.*, 1998; de los Reyes *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1993; Snaidr *et al.*, 1997). Con el

desarrollo de técnicas moleculares independientes de cultivo en estudios de diversidad en lodos activados (Hugenholtz *et al.*, 1998; Snaird *et al.*, 1997; Saikaly *et al.*, 2005) se han mejorado las opciones para estudiar de forma más confiable y eficiente la ecología de los microorganismos que componen estas complejas comunidades (Curtis *et al.*, 2003; Hughes-Martiny *et al.*, 2006). Entendiendo la verdadera diversidad y abundancia de poblaciones en las distintas etapas del tratamiento y cómo estas fluctúan a través del tiempo y el espacio, en respuesta a variaciones operacionales y cómo estas fluctuaciones afectan la eficiencia de las operaciones, se podrían desarrollar sistemas más estables, eficientes, rápidos y menos costosos.

Un estudio minucioso de la dinámica de las comunidades microbianas que dominan en sistemas de lodos activados, especialmente en los biorreactores, es imperativo para optimizar los procesos de tratamiento y mejorar los diseños de ingeniería partiendo desde un punto de vista biológico. Yuan y Blackall (2002) plantean que los procesos de control y estrategias operacionales convencionales optimizan los procesos de lodos activados más como un sistema químico que biológico. Esta estrategia podría optimizar el proceso a corto plazo pero deterioraría su desempeño a largo plazo debido a su potencial impacto adverso sobre el componente microbiológico. Ellos proponen que la optimización de la estructura y propiedades de la comunidad microbiana debe ser parte explícita de las metas de operación y diseño en una planta de tratamiento. Sin embargo, la limitación mayor para la optimización de las comunidades microbianas en los biorreactores resulta, precisamente, de datos inadecuados



referentes a la función, estructura y dinámica de las comunidades bacterianas (Yuan y Blackall, 2002). Esto resulta principalmente de la dependencia de técnicas de cultivo y microscopia que han demostrado ser poco confiables.

La investigación que se presenta en este reporte estuvo dirigida a mejorar el entendimiento de la dinámica de las poblaciones bacterianas que habitan en biorreactores de los lodos activados en dos plantas de tratamiento con distintas capacidades de tratamiento y ubicación geográfica. Se estudió por medio de técnicas moleculares independientes de cultivo: las variaciones temporales en la diversidad de las poblaciones bacterianas más abundantes, se determinó si estas variaciones poblacionales están relacionadas a la separación geográfica de los sistemas, y si estaban influenciadas por las variaciones en parámetros operacionales en las distintas etapas del tratamiento. La principal técnica molecular empleada en el estudio fue la técnica de Polimorfismos del Largo del Fragmento Terminal de Restricción (t-RFLP, por sus siglas en inglés). Este método se destaca en estudios de ecología microbiana por ser altamente reproducible, relativamente sencillo y sensible a las poblaciones presentes en una comunidad compleja, ya que puede detectar poblaciones que se encuentran en concentraciones tan bajas como el 0.1-1.0% de la comunidad total (Blackwood *et al.*, 2003; Dunbar *et al.*, 2000; Schütte *et al.*, 2008). Esto facilita que el t-RFLP pueda emplearse para monitorear cambios en comunidades bacterianas a través de tiempo y espacio y que pueda ayudar a asociar cambios en la estructura comunitaria con cambios en el ambiente. Además, los avances en la aplicación de métodos estadísticos multivariados

para el análisis de la gran cantidad de datos generados en un estudio por medio de t-RFLP (Ramette, 2007; Shutte *et al.*, 2008) han facilitado análisis más objetivos, completos y reproducibles.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

- Estudiar la dinámica de comunidades microbianas en biorreactores aerobios de plantas de lodos activados para el tratamiento biológico de aguas residuales domésticas.

### **Objetivos Específicos:**

- Evaluar la estructura y dinámica de las comunidades bacterianas en biorreactores aerobios de lodos activados de dos plantas de tratamiento, una en Adjuntas, P.R. y otra en Mayagüez P.R., mediante la aplicación de las técnicas moleculares de t-RFLP y bibliotecas de clones ambientales.
- Identificar patrones característicos en la estructura de las comunidades microbianas de cada planta de tratamiento que puedan estar asociados al diseño de los biorreactores o a las condiciones geográficas de cada lugar.
- Establecer relaciones entre las variaciones en las comunidades microbianas, los parámetros operacionales y la estabilidad del sistema de tratamiento mediante la aplicación de métodos estadísticos multivariados.

## REVISIÓN DE LITERATURA

El crecimiento acelerado de las poblaciones humanas a nivel mundial ha propiciado el desarrollo de tecnologías que ayuden a manejar los problemas sociales y ambientales que este crecimiento conlleva. Uno de las tecnologías más antiguas diseñada con el fin de amortiguar el impacto de las actividades antropogénicas, son los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Existen evidencias de que tan temprano como en el año 3000 a.C. ya existían sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas en ciudades de Asia y Europa (Graham y Smith, 2004).

A pesar de que existe evidencia arqueológica de que sociedades como los Babilónicos y los Romanos diseñaron tecnologías muy sofisticadas para coleccionar y disponer de sus desperdicios, la aplicación de reglamentación ambiental para el manejo de aguas residuales no fue adoptada por sociedades antiguas, hasta que la revolución industrial en el siglo XIX forzó la intervención política (Lindera y Seviour, 2002). Los sólidos suspendidos son las impurezas más visibles en las aguas residuales, y es por esto que los primeros sistemas de tratamiento de agua residuales domésticas introducidos a finales del siglo XIX fueron diseñados como unidades para la separación de sólidos y líquidos por medio de sedimentación, proceso que es conocido hoy día como tratamiento primario. Con la operación de los primeros sistemas de tratamiento se fue haciendo evidente que estas unidades solo podían tratar el agua parcialmente por una simple razón: una gran porción del material orgánico en las aguas

residuales está disuelto y no se sedimenta y por tanto no se remueve en este tratamiento primario (van Andel y van der Lubbe, 2007). En el Reino Unido, a principios de siglo pasado, se establecieron los primeros estándares para la calidad de aguas tratadas que existieron en el Mundo por la presión ejercida sobre el gobierno para que buscara soluciones para los problemas sanitarios (epidemias, olores indeseables) que el mal manejo de los desperdicios provocaba. Estos primeros estándares de calidad impulsaron el desarrollo de sistemas de tratamiento más sofisticados que pudiesen cumplir con los nuevos reglamentos, lo que propició la aparición de sistemas de tratamiento secundario (biológico) (van Andel y van der Lubbe, 2007). Esto a su vez resultó en la invención del proceso de lodos activados en el 1914 (Arden y Lockett, 1914-1915).

Arden y Lockett (1914) notaron que la aeración de aguas domésticas resultaba en un incremento en las tasas de remoción de materia orgánica, mientras que al mismo tiempo se observaba la formación de agregados macroscópicos de biomasa que podían separarse del agua por sedimentación, formando lo que ellos llamaban un lodo biológico. Arden y Lockett fueron exitosos en el diseño de este nuevo sistema de tratamiento principalmente gracias a la idea de retener parte de la biomasa producida en el proceso y rehusarla como inóculo para tratar nuevo material en vez de descartarla completamente como había sido la práctica estándar en sistemas biológicos hasta ese momento (van Andel y van der Lubbe, 2007). Aplicando esta estrategia ellos demostraron que los tiempos de aeración necesarios para

degradar los compuestos orgánicos en el agua residual y alcanzar nitrificación completa eran significativamente más cortos que aquellos necesarios en otros sistemas de tratamiento existentes para esa época que no rehusaban la biomasa como inóculo. Ellos nombraron este nuevo sistema de tratamiento como el sistema de Lodos Activados y lo pusieron en práctica con la operación de la primera planta piloto de lodos activados en 1914 y la primera planta de tratamiento a gran escala instalada en Inglaterra para el 1915 (Lindera y Seviour, 2002).

El sistema de lodos activados constituye el formato de operación más utilizado hoy día para el tratamiento secundario de aguas residuales domésticas en el Mundo (Eschenhagen *et al.*, 2003). Los lodos activados no son más que una suspensión de cultivos de microorganismos mixtos que crecen en biorreactores para tratar desperdicios, oxidar materia orgánica biodegradable y transformarla en biomasa y CO<sub>2</sub>, para luego flocularse y removerse por sedimentación en clarificadores secundarios (Bitton, 2005). Los agregados o flóculos formados al unirse microorganismos y partículas suspendidas constituyen biopelículas donde los microbios colonizan y se adhieren a las superficies disponibles formando una comunidad compuesta de procariotas, hongos y protozoarios que interactúan y purifican la corriente del afluente (Graham y Smith, 2004).

Con el pasar de los años y el crecimiento de la necesidad de establecer sistemas de tratamiento más eficientes, se han desarrollado mejoras sustanciales a las unidades de tratamiento pero la mayoría de las veces desde

una perspectiva de ingeniería sin indagar en la ciencia detrás de los complejos procesos microbiológicos que allí se llevan a cabo. Aun así, la producción de agua limpia y el mejoramiento en los sistemas de tratamiento de desperdicios a través de la ciencia aplicada se considera uno de los mayores logros de la ingeniería moderna. Sostener y mantener este logro es uno de los mayores retos para el futuro (Curtis *et al.*, 2003).

Según Graham y Smith, (2004) dos eventos importantes han propiciado el mejoramiento de las prácticas de manejo de desperdicios en el último siglo: la demostración de la ubicuidad e importancia de los microorganismos en el ambiente, y el descubrimiento por medio de la ingeniería sanitaria de que la aireación de desperdicios domésticos suspendidos en líquido acelera las tasas de degradación de los mismos, reduciendo la toxicidad del agua tratada. A medida que se propiciaban estas mejoras se hacía cada vez más evidente que estos procesos de tratamiento dependían considerablemente de las actividades de biodegradación llevadas a cabo por comunidades complejas de microorganismos. Pero, a pesar de esta evidencia, el mejoramiento de estos sistemas ha sido lento y modesto por la poca importancia que se le ha prestado a los procesos microbiológicos (Wagner *et al.*, 1993).

A pesar de que ya para 1914 se le había atribuido cierta importancia a los sólidos activados y la aireación en los procesos de tratamiento, y que ya para la década de los 40 se presentaban los primeros esfuerzos para entender la microbiología en plantas de tratamiento secundario (Allen, 1944), Graham y Smith (2004) señalan que no fue hasta la década de 1950 que se comenzó a

reconocer la integración de factores bioquímicos y ecológicos como fundamentales para el funcionamiento efectivo de los sistemas. Tan reciente como en la década de los 70 aun se consideraba la biomasa de los lodos activados como una población independiente de microorganismos (Lawrence y McCarty, 1970), cuando hoy día se conoce bien que esta es en realidad una comunidad compleja de poblaciones microbianas interactuando (Curtis *et al.*, 2003).

Microorganismos procariotas, especialmente bacterias, son el componente principal de estos complejos ecosistemas microbianos en las unidades de tratamiento ya que son los responsables de la remoción de la mayoría de la materia orgánica y los nutrientes en el agua sin tratar (Kaewpipat and Grady, 2000; Wagner y Loy, 2002). Por esto los sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales están diseñados para mantener altas densidades y actividades microbianas para satisfacer las demandas de purificación. Por décadas los microbiólogos han estudiado la estructura, dinámica y función de las complejas comunidades microbianas en los biorreactores comparando sistemas que funcionan adecuadamente con sistemas en mal funcionamiento para poder entender su rol en la eficiencia del tratamiento (Amann *et al.*, 1998). Un sin número de estudios se han realizado para entender estas comunidades microbianas, que incluyen estudios de cambios espaciales y temporales en la estructura de las comunidades microbianas (Boon *et al.*, 2000; Curtis y Craine, 1998; Forney *et al.*, 2001; Stamper *et al.*, 2003), estudios de la relación entre la diversidad microbiana y la



estabilidad del sistema de tratamiento (von Castein *et al.*, 2002) y de la correlación entre la diversidad microbiana y los parámetros ambientales (Boon *et al.*, 2003). En general la mayoría de los estudios se han enfocado en monitorear la estructura de las comunidades como el factor principal en dirigir la operación de la planta de tratamiento hacia mayores tasas de eliminación y estabilidad (Amann *et al.*, 1998). Todas estas investigaciones resaltan que para poder mejorar el funcionamiento de los sistemas de tratamiento en términos de estabilidad, eficiencia y consistencia es necesario un conocimiento más amplio de la dinámica y ecología de las comunidades microbianas en los reactores de tratamiento (Loy *et al.*, 2002; Wagner y Loy, 2002), lo que se sustenta por estudios ecológicos que demuestran que la diversidad de las comunidades microbianas está relacionada positivamente a la estabilidad de los ecosistemas en donde se encuentran (Briones y Raskin, 2003; Naeem y Li, 1997; Tilan, 1999).

Sin embargo, muchos factores han dificultado el que se pueda alcanzar un entendimiento amplio y adecuado del componente microbiológico de las plantas de tratamiento. Por ejemplo, muchos diseños y estudios dirigidos a mejorar los sistemas han fracasado en estabilizar las comunidades microbianas debido posiblemente a la naturaleza no lineal de estas complejas comunidades lo que causa que estas respondan muchas veces a cambios en la ambiente de maneras impredecibles que pueden ser consideradas caóticas (Kaewpipat y Grady, 2002; Kooi *et al.*, 1997). También se ha señalado la preferencia por el uso de reactores a escala de laboratorio en estudios dirigidos a mejorar los

sistemas de tratamiento (Padayachee *et al.*, 2006). Estos reactores a escala de laboratorio resultan ser inadecuados en reflejar las verdaderas condiciones de operación de un reactor a gran escala, creando un gran abismo entre las contribuciones teóricas y las contribuciones prácticas de estos estudios (Saikaly *et al.*, 2005). Pero de todas las dificultades que ha tenido el desarrollo de un entendimiento adecuado de las comunidades microbianas en sistemas de tratamiento, el mayor reto lo ha presentado la amplia utilización de técnicas dependientes de cultivo y de microscopía para caracterizar estas complejas comunidades.

Hasta principios de la década de 1990 estos estudios dependían de las herramientas que habían estado disponibles desde principios del siglo pasado: microscopios y medios de cultivo (Amann *et al.*, 1998). Todo el conocimiento generado sobre la composición de las comunidades microbianas en sistemas de lodos activados alrededor del Mundo hasta ese momento, hoy día se considera obsoleto y lejos de la realidad. Está documentado que menos del 16% de los microorganismos en cualquier muestra de lodos activados puede ser cultivado en el laboratorio con los métodos disponibles y que los métodos de microscopía tradicional pueden ser muy subjetivos y poco precisos en la clasificación de microorganismos por su morfología (Loy *et al.*, 2002). Así el uso de cultivos y otros métodos tradicionales ofrece una imagen incompleta de la comunidad microbiana dominante en las distintas etapas del tratamiento. Aun el medio de cultivo microbiológico menos selectivo es poco probable que pueda promover el crecimiento de más del 1% de las especies bacterianas presentes en una

muestra de lodos activados (Sevior y Maszenan, 2002). A pesar de que los procesos biológicos de tratamiento han sido utilizados intencional y exitosamente por más de un siglo, debido a estas limitaciones metodológicas el conocimiento de la microbiología real de estos sistemas de tratamiento de aguas residuales ha comenzado a surgir en apenas los últimos 20 años (Loy *et al.*, 2002).

Hoy día es ampliamente reconocido que estos estudios dependientes de cultivo y microscopia, de alguna u otra forma, crearon falsas percepciones de las poblaciones bacterianas dominantes en los sistemas de tratamiento (Wagner *et al.*, 1993) y de aquellas que tienen mayor influencia sobre los parámetros operacionales (De los Reyes *et al.*, 1997). Según Eschenhagen *et al.* (2003) los métodos independientes de cultivo aplicados a estudios de diversidad en plantas de tratamiento de lodos activados están prejuiciados por la selección de especies que obviamente no representan la estructura real de la comunidad dominante. Estos métodos favorecen el crecimiento de poblaciones que quizás no son dominantes en el sistema pero dominan bajo las condiciones de aislamiento (Hiraishi *et al.*, 1998, Yoshie *et al.*, 2004), mientras excluyen aquellas poblaciones realmente dominantes que por razones de estrés ambiental no se reflejan en los cultivos (Watanabe *et al.*, 1998).

Con el fin de reducir los errores intrínsecos e ineludibles que conllevan el uso de métodos dependientes de cultivo para los estudios de diversidad y ecología de microorganismos en las plantas de tratamiento, recientemente se han propuesto métodos moleculares independientes de cultivos para estos

propósitos (Hugenholtz *et al.*, 1998; Loy *et al.*, 2002; Onuki *et al.*, 2000; Wilderer *et al.*, 2002). La aplicación de métodos moleculares a los ecosistemas de lodos activados, no solamente han revelado un nivel de diversidad microbiana sin precedentes, pero también han cuestionado muchas ideas antiguas sobre la composición de estas comunidades microbianas. Por ejemplo, cuestionan cuáles son las bacterias responsables de procesos importantes en los sistemas como la remoción de fósforo y nitrógeno, y aquellas envueltas en problemas con la sedimentación de los lodos (Seviour y Maszenan, 2002). Especies de bacterias que antes se consideraban como organismos modelos de estos sistemas de tratamiento, resultaron no ser importantes en los procesos reales (Loy *et al.*, 2002) y otras especies de procariotas que antes no eran tomadas en consideración, como las arqueas nitrificadoras, resultaron ser importantes en los biorreactores (Park *et al.*, 2006).

Algunos de estos ejemplos son destacados por Wagner *et al.* (2002) para enfatizar la inconsistencia de los métodos moleculares y aquellos dependientes de cultivo. Por ejemplo, tradicionalmente se consideraba que especies del género *Nitrosomonas* (oxidadoras de amoníaco) y *Nitrobacter* (oxidadoras de nitrito) eran los componentes principales de las comunidades nitrificadoras en estas plantas de tratamiento. Sin embargo métodos moleculares han demostrado que especies de los géneros *Nitrosococcus* y *Nitrospira* son generalmente más comunes y dominantes en estos ecosistemas. También destacan la sobreestimación de la contribución del género *Acinetobacter* en el proceso de remoción de poli-fosfatos y la subestimación de microorganismos

claves en procesos de formación de flóculos sedimentables y desnitrificación en los reactores de tratamiento. Snaidr *et al.*, (1997) también reportan discrepancias entre resultados de métodos dependientes e independientes de cultivo. Ellos encontraron que métodos independientes de cultivo resaltan la dominancia de especies de la subclase Beta de las *Proteobacteria* que habían sido subestimadas con métodos de cultivo, mientras que especies de la subclase Gamma, como las del genero *Acinetobacter*, habían sido sobreestimadas.

Aunque cada técnica que se utiliza conlleva cierto error dependiente de las limitaciones de sus metodologías (Snaidr *et al.*, 1997), estos métodos moleculares resultan ser más efectivos en alcanzar descifrar la verdadera diversidad de estos ambientes y en el establecimiento de relaciones ecológicas y dinámicas de los microorganismos que componen la comunidad de cada biorreactor (Saikaly *et al.*, 2005; Eschenhagen *et al.*, 2003; Hiraishi *et al.*, 1989). Con mucha eficacia se han utilizado distintas técnicas independientes de cultivo que incluyen métodos químicos directos como: análisis de perfiles de quinonas (Hiraishi *et al.*, 1989; Hiraishi *et al.*, 1998), análisis de patrones de ácidos grasos (Werker *et al.*, 2003) y análisis de poliamina (Auling *et al.*, 1991); métodos moleculares directos como: Hibridización In-Situ de Fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés) (Juretschko *et al.*, 2002; Thomsen *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 1993); métodos moleculares indirectos como: análisis de Polimorfismo del Largo de Fragmentos Terminales de Restricción (t-RFLP, por sus siglas en inglés) (Terahara *et al.*, 2004; Saikaly *et al.*, 2005), Bibliotecas de Clones Ambientales (Blackall *et al.*, 1998; Eschenhagen *et al.*, 2003; Layton *et al.*, 2000; Sakano *et*

*al.*, 2002), Electroforesis en Gel de Gradiente Denaturalizante (DGGE, por sus siglas en inglés) (Boon *et al.*, 2002-2003; Cebrón *et al.*, 2004; Kaewpipat and Grady, 2002), Análisis de Restricción de genes de ARN Ribosomal Amplificado (ARDRA, por sus siglas en inglés) (Gich *et al.*, 2000), Microarreglos de ADN (Dennis *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2005) y Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (Boon *et al.*, 2003; Dionisi *et al.*, 2003).

La aplicación de estos procedimientos han facilitado establecer posibles relaciones entre las variaciones operacionales y poblacionales en los biorreactores (De los Reyes *et al.*, 1997; Layton *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2000) y la posible variación biogeográfica de las comunidades microbianas en cada planta de tratamiento (Curtis *et al.*, 2003). Sin embargo, aun con todos estos avances en el estudio de la ecología microbiana de los sistemas de lodos activados, falta mucho camino por recorrer antes de poder establecer y aplicar efectivamente criterios de diseño y operación basados primordialmente en la optimización del componente biológico de las plantas de tratamiento (Hallin *et al.*, 2005). En vista de los avances recientes en ecología microbiana, la aplicación de métodos de biología molecular, la aplicación de herramientas de bioinformática en estudios ambientales y en el estudio de la biogeografía microbiana, todo considerado bajo el contexto de sistemas de ingeniería biológicos, se podrían desarrollar estudios más competentes para solucionar problemas comunes en plantas de tratamiento de agua residuales a partir del mejor entendimiento de la diversidad y dinámica de las poblaciones que interactúan en estos ecosistemas (Bond *et al.*, 1999).

Uno de los métodos moleculares que ha recibido mayor atención en los últimos años y que ha sido aplicado con éxito en una gran variedad de estudios de ecología microbiana es el método de t-RFLP (Blackwood 2003; Schütte *et al.*, 2008; Stres, 2006). El método de t-RFLP constituye una herramienta poderosa para el estudio de las comunidades microbianas y sus dinámicas, caracterizado por ser relativamente rápido y reproducible (Kitts, 2001; Theis, 2007). Esta técnica envuelve el uso de iniciadores para PCR marcados con moléculas fluorescentes. Los genes amplificados en el PCR, los cuales son del mismo tamaño, son sometidos a digestiones enzimáticas separadas en geles de poliacrilamida, y finalmente visualizados utilizando un secuenciador de ADN. En el secuenciador solo son detectados aquellos fragmentos del gen que emiten fluorescencia y que se produjeron por medio de la restricción enzimática. Estos fragmentos terminales que varían en tamaño para grupos filogenéticos distintos, son conocidos como fragmentos terminales de restricción (TRFs) o unidades taxonómicas operacionales (OTUs) y son utilizados para caracterizar la diversidad y estructura de comunidades microbianas en el ambiente (Saikaly *et al.*, 2005).

La naturaleza dinámica y compleja de las comunidades microbianas en los biorreactores de lodos activados impone un nivel de dificultad considerable para aquellos estudios que traten de comparar comunidades en distintos sistemas de tratamiento. Debido a que las comunidades cambian constantemente, muestras aisladas proveen solo una representación parcial de la composición real. Esto sugiere que para el estudio comparativo de varias

plantas de tratamiento se deben analizar muestras suficientes a través de periodos prolongados de tiempo para poder generar una imagen representativa de la comunidades y su dinámica (Kaewpipat y Grady, 2002). La versatilidad y facilidad de implementar el análisis de comunidades microbianas por medio de t-RFLP, presenta este método como una herramienta ideal para caracterizaciones más completas de comunidades microbianas en múltiples plantas de tratamiento durante largos periodos de muestreo. Al mismo tiempo, la técnica provee suficiente información para poder correlacionar las fluctuaciones en estructura de las comunidades con cambios en los parámetros fisicoquímicos que las afectan (Kitts, 2001). Esto es importante si se considera que actualmente una de las mayores faltas de conocimiento en estudios de la ecología de lodos activados es el entendimiento de la relación entre el desempeño de las comunidades y los parámetros ambientales y operacionales a los que son sometidas (Saikaly *et al.*, 2005).

Se debe tomar en consideración que la gran cantidad de datos que son generados en un análisis de t-RFLP de tal magnitud son casi imposibles de analizar manualmente de forma objetiva. En este caso la aplicación de métodos estadísticos multivariados facilita un análisis matemático más completo, rápido y objetivo de estos grandes grupos de datos (Ramette, 2007). Muchos de estos métodos estadísticos multivariados que han sido desarrollados para facilitar estudios ecológicos han podido ser aplicados eficazmente en el análisis de comunidades microbianas en distintos ambientes (Córdova-Kreylos *et al.*, 2006; Muckian *et al.*, 2007; Nelson y Mele, 2007; Pringault *et al.*, 2008), incluyendo



biorreactores de lodos activados (Boon *et al.*, 2002). Recientemente se ha destacado en la literatura la aplicación de una amplia variedad de métodos multivariados en el análisis de perfiles de t-RFLP para poder resaltar complejos gradientes ecológicos que no podrían ser detectados visualmente (Benette *et al.*, 2008, Culman *et al.*, 2008; Osborne *et al.*, 2006; Rees *et al.*, 2004; Schütte, 2008). Entre la variedad de métodos multivariados disponibles para estudios de ecología microbiana se pueden destacar el análisis de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS) (Clarke, 1993), aplicado en la comparación de distintas comunidades microbianas en gradientes de tiempo y espacio utilizando medidas de distancia (Ramette, 2007); Análisis de Similitud (ANOSIM) (Clarke, 1993), utilizado para determinar significancia de las diferencias observadas entre dos o más grupos aplicando medidas de distancia (Ramette, 2007); y el Análisis Canónico de Correspondencia (ter Braak y Verdonschot, 1995), utilizado para relacionar fluctuaciones en la estructura de las comunidades estudiadas con variaciones en los parámetros ambientales (Ramette, 2007).

Como se mencionó anteriormente, un aspecto ecológico importante de las comunidades bacterianas en biorreactores de lodos activados que debe ser estudiado es la existencia de patrones biogeográficos en la estructura de dichas comunidades (Curtis *et al.*, 2003). Considerar que la distribución de poblaciones es consistente en sistemas de tratamiento físicamente distantes y que están sometidos a presiones ambientales distintas, es un concepto equivocado que se ha descubierto progresivamente con la aplicación de métodos moleculares.

Aunque es una disciplina relativamente reciente y poco desarrollada, la biogeografía microbiana ha cobrado un gran interés en los últimos años que ha surgido con el desarrollo de estas técnicas moleculares que permiten estudiar poblaciones microbianas importantes en cualquier ecosistema aun cuando nunca han sido cultivadas (Fierer, 2008; Hughes-Martiny *et al.*, 2006). Patrones biogeográficos en la distribución de poblaciones microbianas a través de gradientes ambientales han sido estudiados en distintos ambientes (Dolan, 2005; Fierer y Jackson, 2006; Green *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2005), e inclusive se ha sugerido la existencias de estos patrones en sistemas de tratamiento de aguas residuales (van der Gast *et al.*, 2006). El hecho de que los microorganismos presentes en biorreactores de tratamiento están contenidos en un espacio limitado y que tienen tiempos de generación relativamente cortos en estos ambientes permite estudios más completos de la ecología de estas comunidades tan complejas y diversa en periodos cortos de tiempo (Graham y Smith, 2004). Esto facilita el que se puedan establecer patrones biogeográficos entre plantas físicamente distantes y que sirven a poblaciones humanas distintas para desarrollar un conocimiento más amplio de cómo la diversidad bacteriana en cada planta de tratamiento particular afecta su funcionamiento y estabilidad (Curtis *et al.*, 2003).

Según Curtis *et al.*, (2003) es normal la existencia de variaciones poblacionales constantes en los sistemas de tratamiento y que estas variaciones surjan simplemente de la naturaleza compleja de las comunidades microbianas. Ellos señalan que uno de los factores que tiene mayor influencia sobre la

estabilidad de las comunidades es la composición del afluente; idea que también ha sido sustentada por otros investigadores (Hiraishi *et al.*, 1998; Terahara *et al.*, 2004). Curtis *et al.*, (2003) proponen que los biorreactores en plantas de lodos activados pueden ser considerados como “islas biológicas independientes” (MacArthur y Wilson, 1967) ya que deben existir variaciones en la comunidad promedio de cada planta de tratamiento como consecuencia de su ubicación geográfica y las condiciones ambientales que la influyen. Esta teoría de las Islas Biogeográficas, según Curtis *et al.*, (2003), sustenta la idea de que los biorreactores con mayor capacidad pueden soportar una mayor diversidad de especies y ser más estables, mientras que biorreactores más pequeños tendrán altas tasas de extinción y una mayor susceptibilidad de las especies nuevas invasoras y los componentes químicos del afluente. Estas características hacen que los sistemas con poca capacidad tiendan a ser más inestables. Esto pone en desventaja de eficiencia a sistemas de tratamiento locales, sumado a otros aspectos como el hecho de que las plantas de lodos activados pequeñas conllevan un costo energético *per cápita* mayor (Balmér y Mattsson, 1994). La idea de aplicar la teoría de las Islas Biogeográficas a sistemas de tratamiento también ha sido investigada y propuesta por otros investigadores (van der Gast *et al.*, 2006).

Además de la remoción de materia orgánica en el afluente, los sistemas de lodos activados tienen la capacidad de reducir y hasta eliminar nutrientes que pueden ser perjudiciales para el ambiente si son liberados en exceso en el efluente. Los dos principales nutrientes, a cuya remoción se le da mayor

importancia en estos sistemas de tratamiento, son el fósforo (Liao *et al.*, 2003; Mino, 1999) y el nitrógeno (Cervantes-Carrillo *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2003; Barnard, 2006). En especial, la remoción de nitrógeno se ha manejado como un tema de suma importancia en sistemas de tratamiento debido a su toxicidad y al protagonismo de los compuestos nitrogenados en los problemas de eutroficación que se reportan en los tributarios que reciben los efluentes (Park *et al.*, 2006; Cervantes-Carrillo *et al.*, 2000). Muchos estudios se han enfocado en descifrar las comunidades de bacterias y arqueas nitrificadoras (Holben *et al.*, 1998; Juretschko *et al.*, 1998; Daims *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2006; Nelly *et al.*, 2005) estipulando que estas son las responsables de oxidar nitrógeno contenido entre la materia orgánica. Mas sin embargo, la transformación de amoníaco a nitratos y nitritos no resuelve el problema de contenido de nitrógeno en el efluente ya que estos compuestos, por su alta solubilidad, permanecen en el agua tratada. Por otro lado, las poblaciones desnitrificadoras poseen el rol crucial de transformar por respiración anaerobia estos compuestos inorgánicos nitrogenados hasta compuestos gaseosos (Zumft, 1997). Por esta razón es importante estudiar la eficiencia de las comunidades bacterianas en biorreactores de lodos activados tomando en consideración la reducción de nitratos y nitritos como una medida más completa de la remoción de compuestos nitrogenados en el agua tratada.

Ya se ha probado que estimular el crecimiento de bacterias nitrificadoras en sistemas de tratamiento resulta muy lento y costoso (Sakano *et al.*, 2002; Holben *et al.*, 1998). Sin embargo, los procesos de oxidación de amoníaco y

nitrito son los más comunes en biorreactores aerobios, lo que ha menospreciado la posibilidad de estimular bacterias desnitrificadoras como un complemento importante en el proceso de remoción de nitrógeno. Wagner *et al.*, (1993) encontraron por métodos independientes de cultivo que las poblaciones dominantes de bacterias (80%) en sistemas de tratamiento de lodos activados correspondían a *Proteobacteria* de las subclases  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Estos hallazgos son sustentados por otros estudios más recientes, como los de Sakano *et al.*, (2002) y Yashie *et al.*, (2004) que obtuvieron resultados similares. Esto es importante si se considera que la mayoría de las desnitrificadoras verdaderas descritas se agrupan en géneros pertenecientes a estos tres grupos filogenéticos (Hielen *et al.*, 2006). Los procesos de desnitrificación que estos grupos median son más rápidos y eficientes que los de nitrificación. Barragán *et al.*, (2005), reportan que una concentración tan alta como 164 mg/L de nitratos puede ser removida completamente por desnitrificación con suficientes fuentes de carbono en un periodo de 13 horas. Estimular la desnitrificación en los biorreactores también reduciría el tiempo de retención hidráulica (Hallin *et al.*, 2006), la demanda bioquímica de oxígeno (Zeng *et al.*, 2004) y hasta se podrían mejorar los procesos de remoción de fósforo en agua tratada (Chung *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2004).

Al igual que las concentraciones de nutrientes en las aguas residuales, otros parámetros fisicoquímicos, ambientales y operacionales ejercen presiones selectivas sobre las comunidades que dominan en cada reactor, lo que puede tener un efecto directo en la estabilidad y eficiencia del sistema de tratamiento.

Un parámetro importante que puede destacarse es el tiempo de retención de sólidos (SRT), también conocido como tiempo de retención de lodos o edad de los lodos. Este parámetro ha sido estudiado recientemente por su importancia y posible influencia en determinar la estructura y eficiencia de las comunidades microbianas en los sistemas de tratamiento de lodos activados (Bolzonella *et al.*, 2005; Clara *et al.*, 2005, Kreuzinger *et al.*, 2004; Saikaly *et al.*, 2005). Este parámetro representa el tiempo que permanece en el sistema la biomasa bacteriana producida en el reactor de tratamiento. Tiempos de retención muy cortos (<5 días) pueden perjudicar poblaciones bacterianas importantes que poseen tiempos de generación prolongados que sobrepasan el SRT, como por ejemplo las poblaciones nitrificadoras (Saikaly y Oerther, 2004). Estas poblaciones no logran establecerse y muchas veces son eliminadas del sistema. Manejar el SRT es importante para mantener la eficiencia de tratamiento ya que dependiendo del tiempo que se le provea a las distintas poblaciones bacterianas para poder crecer y establecerse en el reactor de tratamiento, se puede generar una estructura comunitaria más estable y metabólicamente diversa (Hallin *et al.*, 2005). Generalmente, SRTs de aproximadamente 10 días son considerados ideales (Hallin *et al.*, 2005; Saikaly y Oerther, 2004).

En general, la ecología de las comunidades microbianas en sistemas de tratamiento de aguas residuales es tan importante que estos sistemas podrían ser considerados como modelos de estudio para los ecólogos microbianos (Daims *et al.*, 2006). Daims *et al.* (2006) destacan que estos ecosistemas no tienen comparación en el contexto de hábitats con comunidades microbianas tan

complejas funcionando bajo condiciones tan bien definidas y controlables como en estos sistemas de ingeniería. Estudiar la diversidad, abundancia, distribución y dinámica de comunidades microbianas en biorreactores a gran escala utilizando principalmente métodos moleculares, ayudaría a desarrollar conocimientos esenciales sobre relaciones entre estructura y función para un mejoramiento progresivo y sensato de estos sistemas biológicos. Aunque ecólogos microbianos e ingenieros difieren en sus intereses y metas principales, la integración de sus conocimientos sobre el funcionamiento de los sistemas biológicos de tratamiento es esencial para que en el futuro se puedan fusionar los estudios de ciencia fundamental con la práctica (Daims *et al.*, 2005).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

Las muestras utilizadas en este estudio se colectaron en dos plantas de tratamiento biológico (secundario) de aguas residuales domésticas en dos municipios de Puerto Rico. Ambos sistemas de tratamiento biológico funcionan mediante biorreactores de lodos activados, cuyo componente principal consiste de un tanque de concreto en donde se mezclan y airean poblaciones microbianas junto al agua del efluente mediante aire inyectado a presión. Como lugar principal del estudio se seleccionó una planta de tratamiento regional en el municipio de Mayagüez (Figura 1A) y con fines mayormente comparativos se seleccionó una planta de tratamiento municipal localizada en el municipio de Adjuntas (Figura 2A).

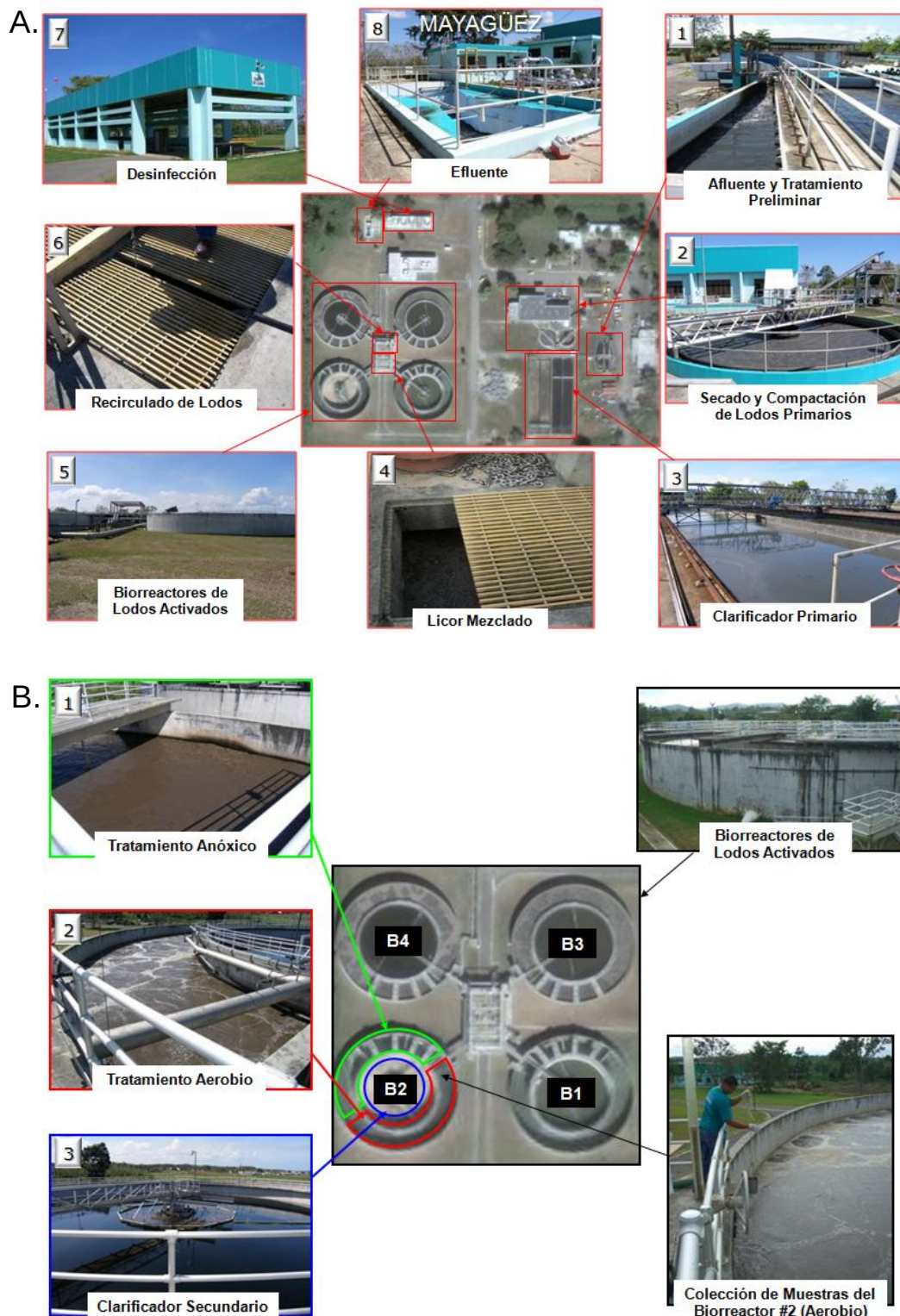
La Planta Regional de Tratamiento de Aguas Usadas de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados de Mayagüez (PRASA Mayagüez WWTP) está localizada en la carretera #2 (ramal #342), Km 32.8 (latitud: 18.24° N y longitud: 67.15° O) en el sector el Maní del barrio Sabanetas del Municipio de Mayagüez. Esta planta de tratamiento posee 4 biorreactores de lodos activados (Figura 1B) con una capacidad máxima total de 28 millones de galones diarios (MGD). Generalmente la planta utiliza simultáneamente solo dos de los cuatro biorreactores manejando en promedio unos 11 MGD (aproximadamente 5.5 MGD por tanque). En su función de planta regional la misma recibe aguas



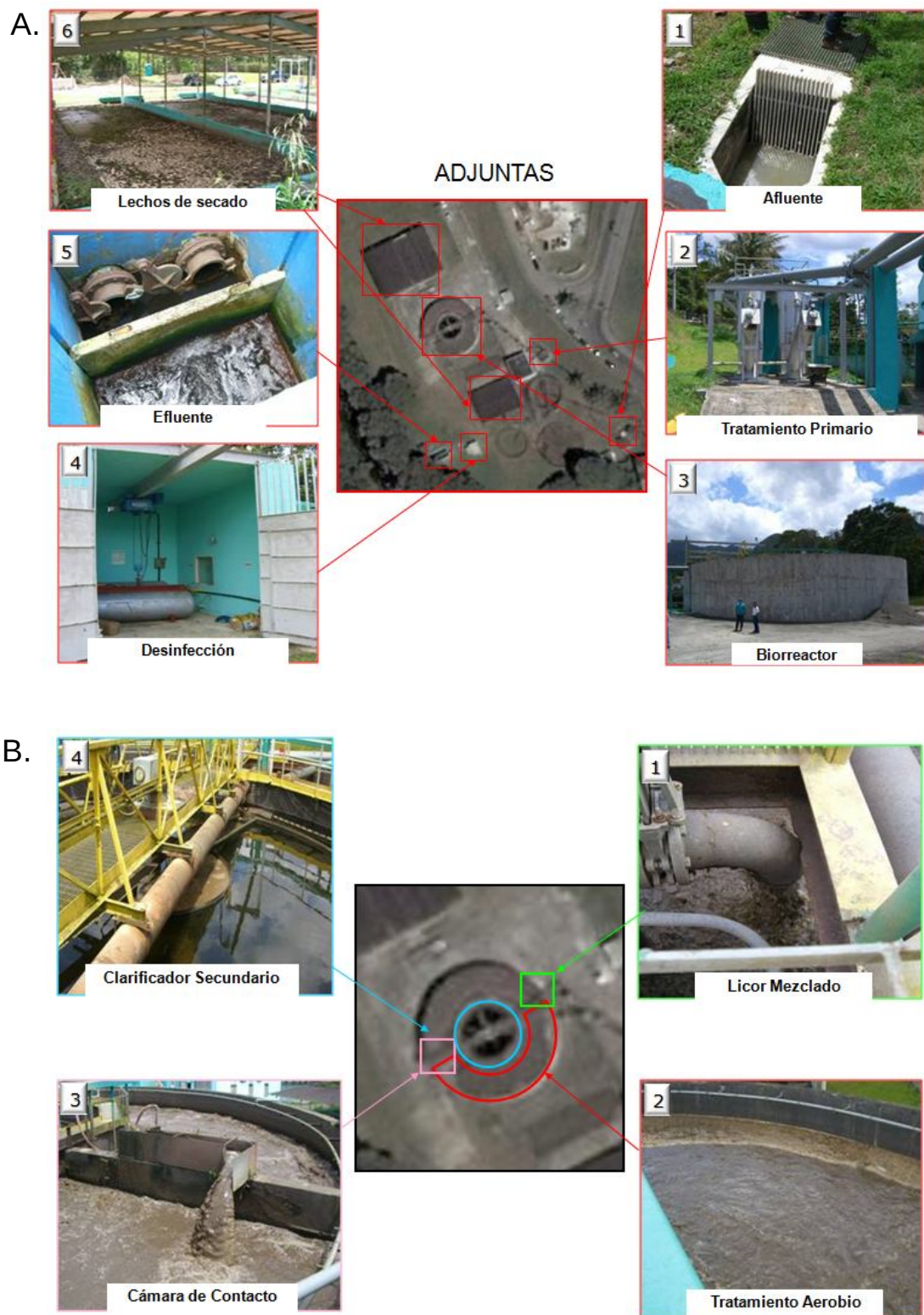
residuales domésticas y aguas de escorrentía de los municipios de Añasco, Hormigueros, Las Marías, Maricao y Mayagüez. El área de cobertura de la planta está ocupada por una población aproximada de 165,000 habitantes y recibe un promedio de 69 pulgadas de precipitación anualmente. El efluente de la planta de tratamiento es descargado por un tubo submarino en el área de la Bahía de Mayagüez bajo el permiso de descarga de aguas tratadas: NPDES No. PR 0023795.

La Planta Municipal de Tratamiento de Aguas Usadas de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados de Adjuntas (PRASA Adjuntas WWTP) está localizada en la Calle Canas junto a la Carretera 123 (latitud: 18.17° N y longitud: 66.73° O) en el barrio Pueblo del Municipio de Adjuntas. Esta es una planta de tratamiento secundario que opera con un biorreactor de lodos activados (Figura 2B) con una capacidad máxima de 0.6 MGD, aunque en promedio maneja unos 0.5 MGD. Como planta de tratamiento municipal, esta solo recibe aguas residuales domésticas y aguas de escorrentía del Municipio de Adjuntas. El área de cobertura de la planta está ocupada por una población aproximada de 19,000 habitantes y recibe un promedio de 74 pulgadas de precipitación anualmente. El efluente de la planta de tratamiento es descargado al río Cidra bajo el permiso de descarga de aguas tratadas: NPDES No. PR 0020214.

Todas las imágenes de satélite utilizadas en las figuras 1 y 2 para presentar la estructura de las plantas de tratamiento fueron obtenidas del programa gratuito Google Earth.



**Figura 1.** Estructura de la Planta de Tratamiento de Mayagüez (A) y las partes de su biorreactor de lodos activados (B). Los números indican la secuencia general del proceso de tratamiento.



**Figura 2.** Estructura de la Planta de Tratamiento de Adjuntas (A) y las partes de su biorreactor de lodos activados (B). Los números indican la secuencia general del proceso de tratamiento.

## **Plan de Muestreo**

Las muestras de lodos fueron colectadas durante un periodo de 13 meses que se extendió desde enero del 2007 hasta enero del 2008. Durante los primeros seis meses del muestreo se colectaron muestras bisemanales y durante los últimos 7 meses se colectaron muestras mensuales. Las muestras que fueron finalmente utilizadas para el análisis de las variaciones de las comunidades bacterianas en ambas plantas de tratamiento fueron colectadas el primer miércoles de cada mes en la planta de tratamiento de Mayagüez y el primer sábado de cada mes en la planta de Adjuntas. Las muestras de ambas plantas se colectaron en horas de la mañana, generalmente entre 9:00 a.m. y 12:00 p.m.

En la planta de Mayagüez se colectaron muestras de 6 puntos distintos: efluente, licor mezclado, recirculado (desecho), reactor en la etapa anóxica, reactor en la etapa aerobia y afluente. De la planta de Adjuntas se colectaron muestras de dos puntos correspondientes al licor mezclado y a la etapa aerobia del reactor. De cada uno de los puntos por cada muestreo se colectaron 100 mL de lodos divididos en dos tubos plásticos de centrifuga estériles de 50 mL cada uno. Solo de la muestra del efluente de la planta de Mayagüez se colectaron y almacenaron 500 mL de agua en una botella de cristal esterilizada por cada muestreo. Las muestras se colectaron utilizando jarras de plástico o aluminio que se enjuagaban entre cada muestra. Las muestras fueron inmediatamente transportadas en hielo hasta el Laboratorio de Ecología Microbiana Tropical en

la Universidad de Puerto Rico en Mayagüez donde se procesaban al momento o se almacenaban a 4°C hasta ser procesadas.

### **Determinación de parámetros ambientales y operacionales**

Para cada una de las muestras colectadas se realizaron medidas de distintos parámetros dentro de un periodo de 48 horas luego del muestreo, con excepción de las medidas de pH que se realizaron inmediatamente luego de transportar las muestras al laboratorio. Se midieron concentraciones de distintos nutrientes mediante análisis colorimétrico utilizando el sistema de colorimetría HACH DR/890. Se analizaron los siguientes nutrientes: Nitrato (mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N) utilizando el método de Reducción de Cadmio (8039), Amoníaco (mg/L  $\text{NH}_3$ -N) utilizando el método de Salicilato (8155), y Fósforo (Ortofosfato, mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$ ) utilizando el método de Ácido Ascórbico (8048) adaptado del Método Estándar 4500-PE para aguas residuales que es equivalente al método 365.2 de la Agencia Federal para la Protección del Ambiente (USEPA). De ser necesario, se realizaron diluciones de las muestras para poder obtener valores de concentración dentro de los límites de detección de cada método.

En el laboratorio también se determinaron las concentraciones de bacterias desnitrificadoras en las muestras de lodos de las distintas etapas de tratamiento de ambas plantas mediante el método del Número Más Probable (MPN, por sus siglas en inglés). De cada muestra se extrajo un mililitro que se utilizó como inóculo para el ensayo. Todas las muestras se diluyeron en una



solución amortiguadora de NaCl 0.85% hasta  $1 \times 10^{-7}$ , con excepción de la muestra del efluente de la planta de Mayagüez que se diluyó solo hasta  $1 \times 10^{-4}$ . De cada dilución se inocularon tres réplicas en tubos de ensayo con Caldo de Nitrato y un tubo Durham invertido para la colección de gas producto de la desnitrificación. Las muestras se incubaron por un periodo de 14 días. Como resultados positivos se consideraron aquellos tubos de ensayo donde se acumuló gas en el tubo Durham. Todos los tubos para desnitrificación fueron comprobados añadiendo un mililitro de una solución de ácido sulfúrico 81% y difenilamina 0.5%. La producción de un color azul intenso en la interfase entre la solución ácida y el medio de cultivo se consideró como indicativo de presencia de nitrato. La ausencia de color señala un resultado positivo: el nitrato fue reducido por desnitrificación. Para cada grupo de réplicas se calculó el Número Más Probable, basado en los dígitos obtenidos del conteo de réplicas positivas para desnitrificación, utilizando el programa: MPN Calculator (<http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.htm>). Los resultados se expresaron como el número de unidades desnitrificadoras por mililitro en la muestra inicial.

Los demás parámetros ambientales y operacionales que se utilizaron en este estudio fueron provistos por cada una de las plantas de tratamiento (Tabla 1). Algunos de los parámetros de la planta de Mayagüez fueron medidos los mismos días de los muestreos en el Laboratorio de Procesos de dicha planta y los demás fueron medidos los mismos meses de muestreo en los laboratorios centrales de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados. Todos los parámetros

de la planta de Adjuntas fueron medidos mensualmente y provistos por los laboratorios centrales de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados. Algunos de los parámetros operacionales de ambas plantas fueron calculados a partir de los datos provistos.

Los valores de otros parámetros medidos fueron provistos por las plantas de tratamiento pero no se incluyeron en el análisis final por distintas razones que incluyen: datos incompletos, falta de relevancia para los objetivos del proyecto, y/o la mayoría de los datos fuera de los límites de detección del método utilizado. Estos parámetros incluyen: pH de lodos prensados, pH del efluente, MLSS del desecho u otros reactores no monitoreados, color, oxígeno disuelto del efluente, sólidos sedimentables del efluente, grasa y aceite del efluente, nitrito+nitrato del efluente, cianuro total, sulfito total, fluoruro total, arsénico total, cadmio total, bario total, plomo total, manganeso total, níquel total, plata total, zinc total, selenio total, radio 226+ radio 228 total, estroncio 90 total, cloro residual total del efluente, 2,4,6-Trichlorophenol, 2,4-Dichlorophenol, 2, 4-Dimethylphenol, 2, 4-Dinitrophenol, 2-Chlorophenol, 2-Methyl-4,6-Dinitrophenol, Pentachlorophenol, Bis (2-Ethylhexyl) Phtalate, y Lindane.

### **Análisis molecular de las comunidades microbianas en los lodos activados**

Las comunidades microbianas en las dos plantas de tratamiento estudiadas fueron monitoreadas utilizando técnicas moleculares independientes

**Tabla 1.** Listado de parámetros incluídos en el análisis ambiental de las condiciones dominantes en cada sistema de tratamiento.

| Parámetro               | Unidad    | Límite    | Frecuencia de análisis | Tipo de muestra | Fuente |
|-------------------------|-----------|-----------|------------------------|-----------------|--------|
| Amoniaco                | mg/L      | N/A       | 1/día                  | AT              | TMEL   |
| Amoniaco total efluente | mg/L      | 15 Mx     | 1/mes                  | AT              | AAA    |
| BOD 5 días afluente     | mg/L      | N/A       | 2/mes (P)              | CP              | CA     |
| BOD 5 días efluente     | mg/L      | 30 Mx     | 2/mes (P)              | CP              | AAA    |
| Cobre total             | µg/L      | 183 Mx    | 1/mes                  | AT              | AAA    |
| COD afluente            | mg/L      | N/A       | 4/día (P)              | AT              | CA     |
| COD efluente            | mg/L      | /         | 4/día (P)              | AT              | LPM    |
| Coliformes fecales      | UFC/100mL | 2,000 Mx  | 1/mes                  | AT              | AAA    |
| Coliformes totales      | UFC/100mL | 10,000 Mx | 1/mes                  | AT              | AAA    |
| F/M                     | F/M       | 0.15-0.50 | N/A                    | CA              | CA     |
| “Feed-Rate”             | lb/min    | N/A       | N/A                    | CA              | CA     |
| flujo                   | MGD       | D/P       | Constante (P)          | GR              | AAA    |
| Fósforo reactivo        | mg/L      | N/A       | 1/día                  | AT              | TMEL   |
| Fósforo total           | mg/L      | 4.52 Mx   | 1/mes                  | AT              | AAA    |
| HRT                     | Horas     | N/A       | N/A                    | CA              | CA     |
| Mercurio total          | µg/L      | 0.051 Mx  | 1/mes                  | AT              | AAA    |
| MLSS reactor #2         | mg/L      | N/A       | 4/día (P)              | AT              | LPM    |
| MLVSS reactor #2        | mg/L      | N/A       | 4/día (P)              | AT              | CA     |
| Nitrato                 | mg/L      | N/A       | 1/día                  | AT              | TMEL   |
| NMP-desnitrificadoras   | UFC/mL    | N/A       | 1/día                  | AT              | TMEL   |
| pH                      | pH        | 6-9       | 1/día                  | AT              | TMEL   |
| Remoción de BOD-5       | %         | 85 Mn     | N/A                    | CA              | AAA    |
| Remoción de TSS         | %         | 85 Mn     | N/A                    | CA              | AAA    |
| SRT                     | Días      | N/A       | N/A                    | CA              | CA     |



|                      |      |         |                          |    |              |
|----------------------|------|---------|--------------------------|----|--------------|
| Surfactantes totales | µg/L | 120 Mx  | 1/mes                    | AT | AAA          |
| Temperatura          | °C   | 32.2 Mx | 4/día (P)                | AT | AAA          |
| TKN                  | µg/L | /       | 1/mes                    | AT | AAA          |
| TSS afluente         | mg/L | N/A     | 4/día (P) o<br>2/mes (P) | AT | CA           |
| TSS efluente         | mg/L | 30 Mx   | 4/día (P) o<br>2/mes (P) | AT | LPM o<br>AAA |
| Turbiedad efluente   | NTU  | 75 Mx   | 4/día (P) o<br>1/mes     | AT | LPM o<br>AAA |

BOD= demanda biológica de oxígeno, COD= demanda química de oxígeno, F/M= proporción de alimento y microorganismos, "Feed-Rate"= tasa de alimentación, HRT= tiempo de retención hidráulica, MLSS= sólidos suspendidos del licor mezclado, MLVSS= sólidos suspendidos volátiles del licor mezclado, NMP= número más probable, TSS= sólidos suspendidos totales, SRT= tiempo de retención de sólidos, TKN= nitrógeno total de Kjeldahl, UFC= unidades formadoras de colonias, MGD= millones de galones diarios, NTU= unidades de turbiedad Nefelométricas, Mx= máximo, Mn= mínimo, (P)= promedio, AT= atrapado o "grap", CP= composición, CA= calculado, GR= grabado, TMEL= Laboratorio de Ecología Microbiana Tropical, AAA= Laboratorio Central de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados, LPM= Laboratorio de Procesos de Mayagüez, N/A= no aplica, "/"= dato no provisto, D/P= dependiente de la capacidad máxima de la planta.

de cultivos para poder observar la composición y los cambios de las comunidades a nivel de poblaciones. Para este análisis se realizaron extracciones de ADN metagenómico ambiental y estas a su vez se utilizaron para realizar bibliotecas de clones y análisis de t-RFLP.

### **Extracción de ADN metagenómico de las comunidades microbianas**

Las muestras de lodos almacenadas en tubos de centrifuga de 50 mL fueron homogeneizadas por agitación vigorosa y vórtice por 1 minuto. De cada una de las muestras se extrajeron dos alícuotas de los lodos mediante centrifugaciones repetidas a 10,000g por 5 minutos en microtubos estériles de 1.5 mL. Generalmente se centrifugaron 3 mL de cada una de las muestras por cada alícuota, aunque en algunos casa se utilizaron hasta 4.5 mL. El

sobrenadante fue descartado entre cada centrifugación y se conservó el precipitado que sería utilizado para realizar la extracción de ADN metagenómico. Una alícuota se utilizó para la extracción y la otra se almacenó a -80°C para experimentos futuros. Las muestras del efluente de la planta de Mayagüez fueron procesadas filtrando 250 mL de las mismas a través de una membrana estéril de 0.2 µm. El filtro se cortó asépticamente en recuadros pequeños y los pedazos se colectaron en microtubos de 1.5 mL. Antes de la extracción, las muestras se lavaron dos veces utilizando 1 mL de agua destilada, desionizada y estéril. Para esto se resuspendió el precipitado en el agua y luego se centrifugó a 10,000g por 5 minutos. Las muestras del efluente de la planta de Mayagüez no fueron lavadas. Las extracciones del ADN se realizaron utilizando el “FastDNA® SPIN Kit for Soil” de la compañía Qbiogene siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones menores. A las muestras en los tubos de “Lysing Matrix E” se le añadieron cristales de Polivinilpirrolidona (PVPP) lavados con ácido a una concentración de 0.1% y fueron colocadas en agitación por 15 minutos a máxima velocidad. En el paso final del protocolo, se le añadió a cada muestra 75 µL de agua deionizada libre de nucleasas y se dejó en contacto con la matriz de sílice por dos minutos antes de hacer la centrifugación final a 14,000g por 1 minuto.

El resultado de cada extracción de ADN fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa 1% en una solución de Tris-acetato-EDTA 1X (TAE) y teñido con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/mL. Se

utilizó como estándar de peso molecular el ADN del bacteriófago Lambda cortado con la enzima de restricción *Hind* III. La electroforesis se condujo a 90 V.

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para el análisis molecular de las comunidades microbianas en las plantas de tratamiento se utilizó el gen del 16S ARN ribosomal (rARN) como indicador de las poblaciones bacterianas. Este gen se amplificó a partir de distintas concentraciones del ADN metagenómico extraído. La concentración inicial del ADN para cada reacción de PCR se estandarizó para cada muestra dependiendo del contenido de inhibidores en las mismas. Generalmente se utilizó directamente 1 µL (100 ng/µL) de la extracción de ADN por cada reacción de 50 µL o 1 µL de una dilución entre 1/10 y 1/50 del ADN en agua destilada, desionizada y estéril. Para la amplificación se utilizaron los iniciadores universales para bacterias: 27F (8Fm) (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1393R (1406R) (5'-ACGGGCGGTGTGTACA-3'). El volumen final de cada reacción de PCR fue de 50 µL y contenía: 1 µL de amortiguador para polimerasa *Taq* (10X), 8 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 4 µL de una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's, 2.5 mM de cada uno en proporción 1:1:1:1), 1µL de polimerasa *Taq* (5 U/µL), 2µL de cada iniciador (1 pmol/µL), 1 µL de albúmina de suero bovino no metilada (20 mg/mL), y 26 µL de agua destilada, desionizada y estéril. En algunos casos para reducir el efecto de inhibidores en la muestra, se añadió sulfóxido de dimetilo (DMSO) a una

concentración final de 3% y ese volumen se descontó del volumen final de agua en la reacción.

La amplificación se realizó utilizando los siguientes parámetros de reacción: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos que consistieron de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, apareamiento de iniciadores a 53°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos. El protocolo se completó con una extensión final a 72°C por 8 minutos. Las muestras amplificadas se comprobaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% como antes descrito. Para estimar el peso molecular y la concentración del producto de amplificación, se utilizó como estándar de peso molecular el ADN del bacteriófago Lambda cortado con las enzimas de restricción *Hind* III y *Eco* RI.

### **Polimorfismos del Largo del Fragmento Terminal de Restricción (t-RFLP)**

Para el análisis de las comunidades bacterianas en las plantas de tratamiento mediante la técnica de t-RFLP, se utilizaron productos de amplificación del gen del 16S rARN obtenidos mediante el protocolo de PCR antes descrito, con la excepción de que se utilizó el iniciador 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') marcado con el fluorocromo IRDye<sup>®</sup> 700 en el extremo 5'. Las muestras de ADN marcadas con el fluorocromo siempre se manejaron con la menor exposición posible a la luz.

Cada producto de amplificación fue sometido a tres digestiones enzimáticas por separado con las enzimas de restricción: *Hae* III, *Rsa* I y *Msp* I, cuyas secuencias palindrómicas de restricción son comunes en genes del 16S rARN. Cada reacción poseía un volumen total de 15  $\mu$ L y consistía de: 150 ng de ADN, 1.5  $\mu$ L de amortiguador (10X) correspondiente a cada enzima de restricción, 0.5  $\mu$ L de la enzima de restricción (10 U/ $\mu$ L), y agua destilada, desionizada y estéril hasta completar los 15  $\mu$ L. El volumen final del agua dependió del volumen de producto de PCR añadido. Las digestiones se incubaron por 4 horas a 37°C, seguido de una incubación a 65°C por 10 minutos para inactivar las enzimas de restricción, y finalmente refrigeradas a 4°C hasta ser procesadas.

Para poder observar los perfiles de t-RFLP de las digestiones de genes de 16S rARN, se prepararon alícuotas de 2  $\mu$ L de cada digestión mezcladas con 2  $\mu$ L de la solución IR<sup>2</sup> Stop Solution que contenía formamida desionizada al 10% (LI-COR Biosciences). Estas se desnaturalizaron a 94°C por 4 minutos y fueron transferidas inmediatamente a 4°C previo a la electroforesis. Las alícuotas preparadas de cada digestión fueron procesadas en un Analizador de ADN LI-COR Biosciences modelo 4300 (LICOR Inc.) y se visualizaron en geles de poliacrilamida (KB<sup>plus</sup> Gel Matrix, LI-COR) a una concentración de 6.5% y 0.25 mm de grosor, preparadas con 20 mL de KB<sup>plus</sup> Gel Matrix, 150  $\mu$ L de persulfato de amonio al 10% y 20 mL de TEMED al 15% con un tiempo de polimerización de 2 horas aproximadamente. Antes de procesar las muestras se realizó una pre-corrida con los siguientes parámetros: 1500 Voltios, 40 mA, 40 W y 50°C por

20 minutos; utilizando el buffer TBE 1X (KB<sup>Plus</sup> LI-COR). Luego se sirvió en la gel 1.0 µL de cada muestra desnaturalizada y se utilizó el marcador de peso molecular de 50-700 pb IRDye<sup>®</sup> 700 (KB<sup>Plus</sup> LI-COR) en los carriles extremos y un carril intermedio. La electroforesis se realizó durante 4 horas utilizando los mismos parámetros de la pre-corrida. Se obtuvo una imagen digitalizada de cada corrida con el programa Saga Lite 1.0, utilizada para el análisis *In-Sílico* de los t-RFLP.

### **Análisis *In-Sílico* de los perfiles de t-RFLP**

El análisis *In-Sílico* de los fragmentos terminales de restricción (t-RFs) se llevo a cabo en el programa Gel-Pro Analyzer 4.5. Para este análisis se tomo en consideración la presencia de fragmentos terminales únicos correspondientes a una Unidad Taxonómica Operacional (OTU) independiente basado en su peso en pares de bases determinado con respecto al marcador molecular de 50-700 pb. Solo se consideraron aquellos t-RFs con un peso molecular dentro del rango de medida del marcador molecular utilizado. También se consideró la abundancia relativa de cada t-RF basada en la intensidad de la señal de fluorescencia, observada en los electroferogramas como la altura de los pico. La abundancia relativa de cada t-RF fue estandarizada dividiendo la altura de cada pico por la suma de la altura de todos los picos en una misma muestra.

Luego de obtener una matriz cruda de los datos de los t-RFs detectados y sus abundancias relativas, esta se utilizó para separar los picos verdaderos de

aquellos que podían ser considerados como ruido utilizando un programa creado con el lenguaje computacional *Clisp*, el cual utiliza interacciones para calcular valores críticos por encima de los cuales se puede considerar un t-RFs como “verdadero”. Basado en una versión modificada del método propuesto por Abdo *et al.* (2006), el programa calculó el promedio de los datos por cada muestra y luego determinó la desviación estándar asumiendo que la media verdadera de los valores era igual a cero. Todos aquellos valores de cada muestra que fueron iguales o mayores al criterio determinado como: la media de los valores más dos desviaciones estándar, se consideraron como una señal real y fueron retirados del grupo de datos. Este mismo procedimiento se siguió repitiendo recalculándose con los valores restantes en los nuevos grupos de datos que se iban generando hasta que no se encontraron valores mayores o iguales al criterio que pudiesen ser considerados como picos verdaderos. Todos los valores del grupo de datos menores al valor del criterio final obtenido del análisis fueron descartados al ser considerados como ruido.

La nueva matriz procesada en donde se eliminaron aquellos t-RFs considerados como ruido del método, fue sometida a un nuevo procedimiento con otro programa también basado en *Clisp* para alinear o agrupar los t-RFs seleccionados con el fin de reducir aquellos errores de lectura producidos en la corrida de la electroforesis. La movilidad electroforética de los t-RFs fue comparada con la de un estándar de peso molecular conocido, pero la variabilidad entre cada corrida resulta en pequeñas discrepancias de peso aun en fragmentos terminales de las mismas poblaciones bacterianas, por tal razón

los resultados de los t-RFLPs necesitan ser alineados (Schutte *et al.*, 2008). Para esto, los pesos de los fragmentos fueron asignados o agrupados en categorías de OTUs llamadas “Bins”. Cada “bin” puede incluir uno o más filotipos de bacterias dependiendo de la complejidad de las comunidades analizadas, de la relación evolutiva de las poblaciones presentes y del poder de resolución de los iniciadores y enzimas utilizados (Schutte *et al.*, 2008). El programa basado en *Clisp* se empleó para crear un listado de todos los posibles grupos de t-RFs (“bins”), evitando agrupar aquellos pesos moleculares cercanos (diferencia de 1-2 pb) en una misma muestra que se repetían en dos o más muestras, y creando grupos que podían ir desde un tamaño específico hasta 7 tamaños distintos. Este análisis se repitió dos veces, una vez de 50 pb a 700 pb y la segunda vez en dirección contraria, de 700 pb a 50 pb. De los dos listados de posibles “bins” se seleccionaron aquellos que incluían el mayor número de representantes y a su vez tratando de seleccionar la mayor cantidad de “bins”. De los “bins” seleccionados se construyó la matriz final unificada en donde los pesos moleculares correspondientes a cada t-RF se determinaron como el promedio de los pesos moleculares incluídos en cada “bin”.

Todos los análisis antes descritos realizados mediante la implementación de lenguaje computacional *Clisp* se llevaron a cabo de forma independiente por cada uno de los perfiles de t-RFLP generados por cada una de las enzimas de restricción incluidas en el análisis.

Las matrices de t-RFs ya depuradas se utilizaron para encontrar a que posibles grupos filogenéticos podrían asociarse estos fragmentos extraídos de



los perfiles de t-RFLP. Para esto se realizó un análisis de restricción *In-Sílico* de secuencias depositadas en la base de datos del RDP que pudieran ser amplificadas con los mismos iniciadores y cortadas con las mismas enzimas de restricción utilizadas en el procedimiento de t-RFLP antes descrito. Este análisis se llevó a cabo utilizando el programa PAT+ (<http://mica.ibest.uidaho.edu/pat.php>) para el análisis de t-RFLPs disponible en línea en el paquete de programas del Microbial Community Analysis III (MiCA). Luego se compararon los pesos moleculares de los t-RFs con los resultados del análisis de PAT+ teniendo en cuenta los pesos moleculares de todos los fragmentos incluidos en cada "bin". Se seleccionaron como posibles grupos filogenéticos aquellos taxones que incluyeran una mayoría de secuencias de especies descritas, preferiblemente de cepas tipo. De no haber especies descritas, se utilizaban como referencia cepas cultivadas no descritas o secuencias de organismos no cultivados, en ese mismo orden de preferencia.

### **Análisis Estadístico de los perfiles de t-RFLP**

Las matrices finales generadas por cada enzima de restricción fueron utilizadas para realizar varios análisis estadísticos multivariados de los cambios en las comunidades bacterianas en las plantas de tratamiento monitoreadas. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa PAleontological STatistics 1.86 (PAST). Los análisis realizados fueron los siguientes: Análisis de Escalamiento Multidimensional No-Métrico (NMDS, por

sus siglas en inglés), utilizado para observar cuán parecidas son las comunidades microbianas; Análisis de Similaridad (ANOSIM, por sus siglas en inglés), utilizado para evaluar la significancia de las diferencias observadas; Análisis Canónico de Correspondencia (CCA, por sus siglas en inglés), utilizado para asociar fluctuaciones poblacionales con cambios en parámetros ambientales; y Porcentaje de Similaridad (SIMPER, por sus siglas en inglés), utilizado para determinar la importancia de poblaciones específicas en las diferencia total observada entre comunidades.

### ***Análisis de Escalamiento Multidimensional No-Métrico (NMDS)***

Para observar los cambios en las comunidades bacterianas a través del tiempo comparando la Planta de Tratamiento de Mayagüez contra la Planta de Tratamiento de Adjuntas, se seleccionaron los datos correspondientes a los reactores aerobios de ambas plantas y se sometieron a un análisis de Escalamiento Multidimensional No-Métrico. Previo al análisis, valores correspondientes a los 13 meses de muestro y las tres enzimas de restricción utilizadas se agruparon por cada planta de tratamiento y se utilizaron para calcular una matriz de distancia con el coeficiente de similaridad de Bray-Curtis (Bray y Curtis, 1957). Esta matriz de distancia se sometió al análisis de NMDS basado en la misma medida de similaridad. El método consiste de un algoritmo basado en medidas de distancia o similaridad que toma en cuenta todas las variables que componen una muestra y compara las muestras entre ellas para

determinar cómo se separan unas de otras. El algoritmo utilizado en nuestro análisis fue descrito por Taguchi y Oono (2004) y utilizado por ellos en el análisis de resultados obtenidos de métodos moleculares (Taguchi y Oono, 2005). El resultado del cálculo basado en la medida de similaridad o distancia seleccionada se utiliza para representar cada muestra como un punto en una gráfica que puede ser en dos o tres dimensiones implícitas entre dos ejes de coordenadas. Aquellas comunidades con una estructura más parecida se encuentran más cercanas entre ellas en el plano de la gráfica que aquellas comunidades más distintas. Como parte de los resultados del análisis, el programa también genera una gráfica de Shepard y un valor de estrés que nos dice cuán confiable fue el resultado final. Mientras más bajo el valor de estrés, más confiables es el resultado de la gráfica. El algoritmo puede producir un resultado distinto por cada corrida de NMDS, dependiendo de las condiciones iniciales seleccionadas al azar. El programa automáticamente hace 11 corridas por cada intento y ofrece como resultado aquella gráfica con el menor valor de estrés. Con el objetivo de obtener la mejor gráfica posible, el análisis se repitió 10 veces para así seleccionar la mejor gráfica (menor valor de estrés) de entre 110 corridas. Para poder visualizar como cambian las comunidades de cada planta de tratamiento a través del tiempo, los puntos representando cada comunidad se unieron con flechas que señalan la dirección en que cambian de un mes a otro. En otros casos los valores de cada planta se rodearon con envolturas convexas para poder señalar un posible solapamiento entre las comunidades.

### ***Análisis de Similitud (ANOSIM)***

Para determinar si las diferencias entre las comunidades bacterianas observadas en las gráficas de NMDS eran estadísticamente significativas, se llevaron a cabo Análisis de Similitud (ANOSIM). Este es un método no-paramétrico que determina diferencias significativas entre dos o más grupos basado en cualquier medida de distancia. Este se enfoca en comparar las diferencias entre los grupos con las diferencias dentro de los grupos. Los resultados de ANOSIM ( $R$ ) pueden ir desde -1 hasta 1, aunque generalmente van de 0 a 1. Valores de  $R$  entre 0 y 0.25 significan que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, valores entre 0.25 y 0.5 reflejan diferencias entre los grupos pero marcadas por un solapamiento significativo, mientras que valores entre 0.5 y 1 reflejan diferencias estadísticamente significativas. La significancia ( $p$ ) de cada resultado se computa con 10,000 replicas de una permutación de la membresía de los grupos. Valores de  $p$  menores a 0.01 señalan que el valor de  $R$  es significativo. Para este análisis se utilizaron las mismas matrices de distancia calculadas con el coeficiente de similitud de Bray-Curtis que se utilizaron en el análisis de NMDS.

### ***Porcentaje de Similitud (SIMPER)***

Para poder determinar cuáles de las poblaciones detectadas en los análisis de t-RFLP contribuyeron en mayor proporción (%) a separar las

comunidades de bacterias presentes en los reactores de las de plantas de tratamiento monitoreadas, se realizó otro análisis estadístico multivariado conocido como Porcentaje de Similitud (SIMPER). Este método se ejecuta con los datos crudos ya que calcula de forma implícita una matriz de distancia con el coeficiente de similitud de Bray-Curtis. Tomando en consideración los errores que pueden surgir en una estimación adecuada de la abundancia relativa de las distintas poblaciones a través del tiempo, especialmente cuando se trabaja con varias electroforesis distintas, determinamos que lo más adecuado era considerar solo la presencia o ausencia de las distintas poblaciones. Por esta razón todos los valores de las 3 enzimas de restricción sometidos al SIMPER fueron transformados previo al análisis en una matriz de presencia/ausencia (1/0) de especies.

### ***Análisis Canónico de Correspondencia (CCA)***

Para observar la relación entre los cambios en las comunidades microbianas de cada planta de tratamiento y los parámetros ambientales y operacionales medidos durante los meses de muestreo, se llevó a cabo un cuarto análisis estadístico llamado Análisis Canónico de Correspondencia (CCA). Este es un análisis de correspondencia basado en una matriz lugares/especies (en nuestro caso: muestras por mes/t-RFs) en donde a cada lugar (comunidad) le fue asignado valores correspondientes a una o más variables ambientales. El algoritmo utilizado para este método (Legendre y

Legendre, 1998) calcula puntuaciones que corresponden a cada muestra (comunidad) como un todo y las variables individuales de cada muestra (poblaciones) y estas puntuaciones se grafican en relación a los parámetros ambientales. De esta manera se representan los resultados en dos dimensiones: las muestras y sus componentes como puntos distribuidos en través del plano y las variables ambientales se ilustran como vectores que salen desde el centro (cero) de los dos ejes de ordenación. Cada vector posee un largo y una orientación particular. El largo del vector corresponde a la significancia que tiene esta variable en relación a los cambios poblacionales de cada comunidad. La posición del vector con respecto a los ejes corresponde a la aportación de esta variable a los cambios en la muestra que ese eje representa. La posición de las muestras con respecto a los vectores de las variables ambientales indica como los cambios en esta comunidad se relacionan a cada parámetro o como las poblaciones responden a cada parámetro. Los ejes de ordenación son combinaciones lineales de las variables ambientales. La ordenación de las variables biológicas (poblaciones o t-RFs) es dada como puntuaciones asignadas a las comunidades o muestras y las variables ambientales son graficadas en correlación con estas puntuaciones. De cada gráfica se obtienen valores Eigen que ilustran la significancia de cada uno de los ejes calculados en representar el efecto de los parámetros ambientales sobre las comunidades microbianas. El resultado final puede ser una gráfica de tres componentes en donde se ilustran los vectores (flechas) correspondientes a cada variable ambiental, los valores correspondientes a cada comunidad y los valores

correspondientes a cada población. Para nuestro análisis solo se ilustraron en las gráficas los valores correspondientes a las comunidades microbianas y los vectores de las variables ambientales, y se utilizó el escalamiento tipo 1 que enfatiza la relación entre las comunidades (Legendre y Legendre, 1998). Los parámetros medidos los mismos días de cada muestreo fueron separados de aquellos medidos durante los meses de muestreo.

Todos los valores sometidos al análisis de CCA, tanto los valores de abundancia relativa de los t-RFs como los valores de los distintos parámetros ambientales, fueron transformados por su raíz cuadrada. Se utilizaron datos transformados por raíz cuadrada por que esto reduce la influencia de poblaciones relativamente más comunes en los datos crudos y así se obtienen resultados que son más informativos en el análisis (Blackwood *et al.*, 2003, Grant y Ogilvie, 2003). Se prefiere este método de transformación ya que, por el contrario, otros métodos de transformación para datos de t-RFLP y parámetros ambientales aplicados a CCA pueden resultar en una sobreestimación de la contribución de especies raras o poco representadas en los patrones de t-RFLPs (Legendre y Gallagher, 2001).

### **Clonación de productos de PCR de genes del 16S ARN ribosomal**

Se construyeron dos bibliotecas de clones ambientales de genes de 16S rARN (≈700 pb) amplificados de muestras de ADN total de los reactores aerobios de las plantas de Adjuntas y Mayagüez correspondientes al mes de

julio de 2007. Estas amplificaciones se llevaron a cabo mediante el protocolo de PCR antes descrito. Los productos de amplificación se purificaron con el Wizard® Plus SV Gel and PCR Clean-up System (Promega®), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos de PCR purificados fueron ligados al vector pGEM®-T, siguiendo las instrucciones del fabricante del pGEM®-T Vector System (Promega®). Luego 100 µL de cada suspensión de células transformadas fueron esparcidos en un medio Luria Bertani (LB) agar que contenían X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-B-D galactopiranosidasa), IPTG (isopropil-B-D-galactopiranosidasa) y 50 µg/mL de ampicilina. Estos platos de cultivo se incubaron en oscuridad a 37°C por un periodo aproximado de 18-20 horas y luego se seleccionaron y aislaron al azar 100 clones de cada muestra. Los clones seleccionados fueron cultivados en 5 mL de caldo de Luria conteniendo 50 µg/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C en una incubadora agitadora a aproximadamente 125 rpm por un periodo de 24 horas para luego proceder con la extracción de plásmidos. Los plásmidos fueron aislados de los cultivos con el sistema de purificación Wizard® Plus SV DNA Purification System (Promega®), mediante el protocolo de centrifugación. La presencia de plásmidos aislados se comprobó y cuantificó en geles de agarosa como antes descrito. Los plásmidos purificados fueron concentrados al vacío en el sistema Savant DNA 120 SpeedVac® (Thermo Scientific®). Noventa y seis plásmidos de cada biblioteca de clones fueron seleccionados al azar y se almacenaron en platos de reacción de PCR de 96 fosas que se cubrieron con un sellador de poliestireno. Los platos se



enviaron al High-Throughput Sequencing Unit del Departamento de Ciencias Genómicas de la Universidad de Washington en Seattle, Washington, para secuenciación utilizando el iniciador T7.

Para realizar una identificación preliminar, las secuencias de cada clon fueron analizadas con la base de datos de RDP 10 (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) utilizando el algoritmo del RDP Classifier. Para la detección de secuencias quiméricas se utilizó el programa Chek-Chimera también disponible en RDP, y el programa Ballerophon para la detección de quimeras en alineamientos múltiples de secuencias. Las secuencias de ambas bibliotecas de clones fueron separadas en las que se secuenciaron en la dirección 5'-3' del gen y aquellas que se secuenciaron en la dirección contraria debido a la inserción aleatoria de productos de PCR durante la ligación. De forma independiente, cada uno de los grupos de secuencias fueron alineados utilizando el algoritmo "Infernal" (Inference of RNA Alignments) incluido como estándar en el RDP 10 (Cole et al., 2009) ya que este toma en consideración la estructura secundaria del 16S rARN y provee un mejor soporte a secuencias parciales cortas que otros algoritmos de alineamiento, como ClustalW (Nawrocki y Eddy, 2007). Las secuencias alineadas se sometieron a un análisis filogenético para determinar sus parientes más cercanos utilizando la herramienta de Sequence Match y la base de datos del RDP 10. Los grupos de secuencias de cada biblioteca de clones se compararon utilizando la herramienta Library Compare basada en el algoritmo de Classifier del RDP 10.

El análisis de agrupamiento de secuencias y la construcción de los árboles filogenéticos se llevo a cabo utilizando el programa MEGA 4.

Con el objetivo de describir las características de las bibliotecas de clones construidas de genes del 16S rARN, se llevaron a cabo análisis estadísticos y se calcularon índices de diversidad ecológica. Se calcularon los índices de diversidad de Shannon-Weaver ( $H$ ) y el índice recíproco de Simpson's ( $1/D$ ), los índices de riqueza de especies de Jackard,  $S_{\text{Chao}}$  y  $S_{\text{ACE}}$  y el número de filotipos o unidades taxonómicas operacionales (OTU's). Todos estos índices se obtuvieron utilizando el programa DOTUR (Distance Based OTU and Richness Determination software, <http://plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotar.html>). Con los resultados de DOTUR también se pudieron construir curvas de refracción para comparar la riqueza de especies observadas en las bibliotecas de clones. Además, se estimó el índice de cobertura de ambas bibliotecas mediante el programa en línea de ASLO (Limnology and Oceanography Methods, <http://www.aslo.org/lomethods/free/2004/0114.html>). El programa Web-LIBSHUFF (<http://libshuff.mib.uga.edu>) se utilizó para determinar si las bibliotecas de clones construidas poseían diferencias estadísticamente significativas mediante la comparación de las curvas de cobertura de cada biblioteca.

## RESULTADOS

### Estructura de las comunidades bacterianas en las unidades de tratamiento biológico

#### *Polimorfismos de Fragmentos Terminales de Restricción (t-RFLP)*

Los cambios en la estructura de las comunidades de bacterias en ambas unidades de tratamiento fueron monitoreadas a través de los 13 meses de muestreo utilizando la técnica independiente de cultivo de t-RFLP. Cada una de las tres enzimas de restricción utilizadas en este análisis generaron fragmentos terminales a partir de genes del 16S rARN bacteriano amplificados de muestras ambientales que pudieron ser detectados por fluorescencia y que corresponden a grupos bacterianos distintos. Cada fragmento fue considerado para el análisis como una población independiente, aunque en muchos casos un mismo fragmento terminal podría corresponder a especies bacterianas distintas. Los cambios en las comunidades bacterianas se analizaron considerando la presencia o ausencia de fragmentos terminales y la abundancia relativa de las poblaciones basada en la intensidad de la señal de fluorescencia. Los patrones de restricción de las comunidades generaron perfiles distintivos en cada planta y a través de los meses del muestreo. En general, la enzima de restricción *Hae* III fue la que más fragmentos terminales de restricción generó dentro del rango de 50 a 700 pb, seguida en promedio por la enzima *Msp* I y por último *Rsa* I (Figura

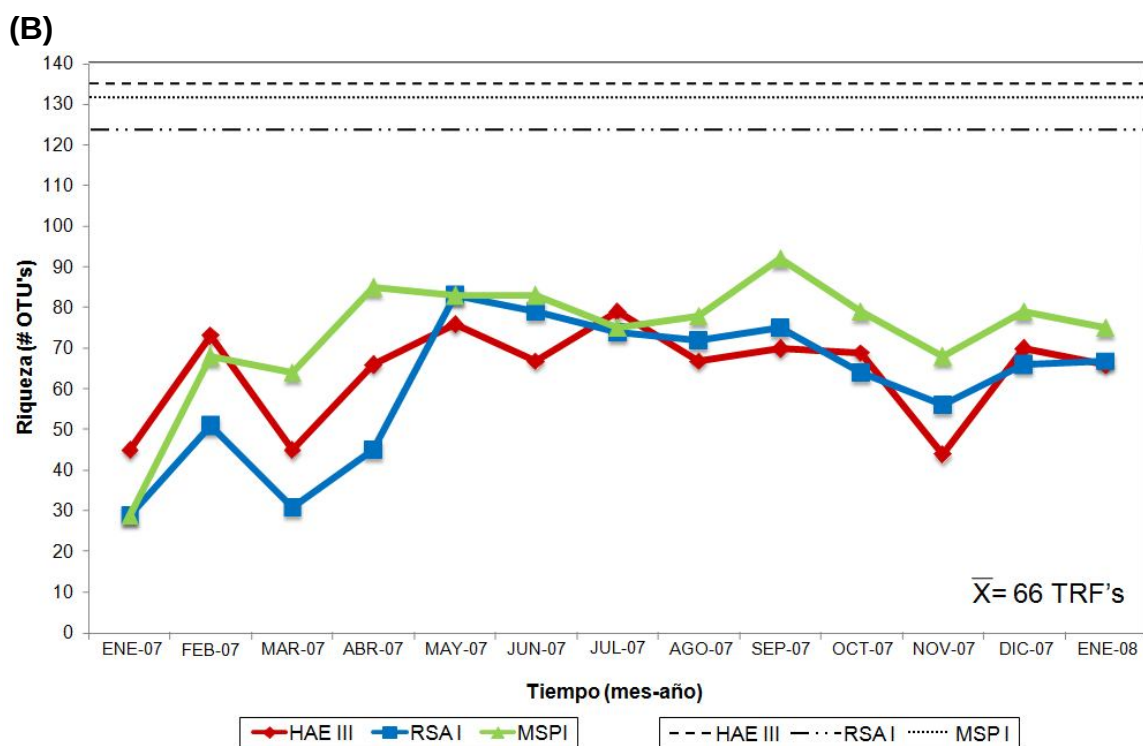
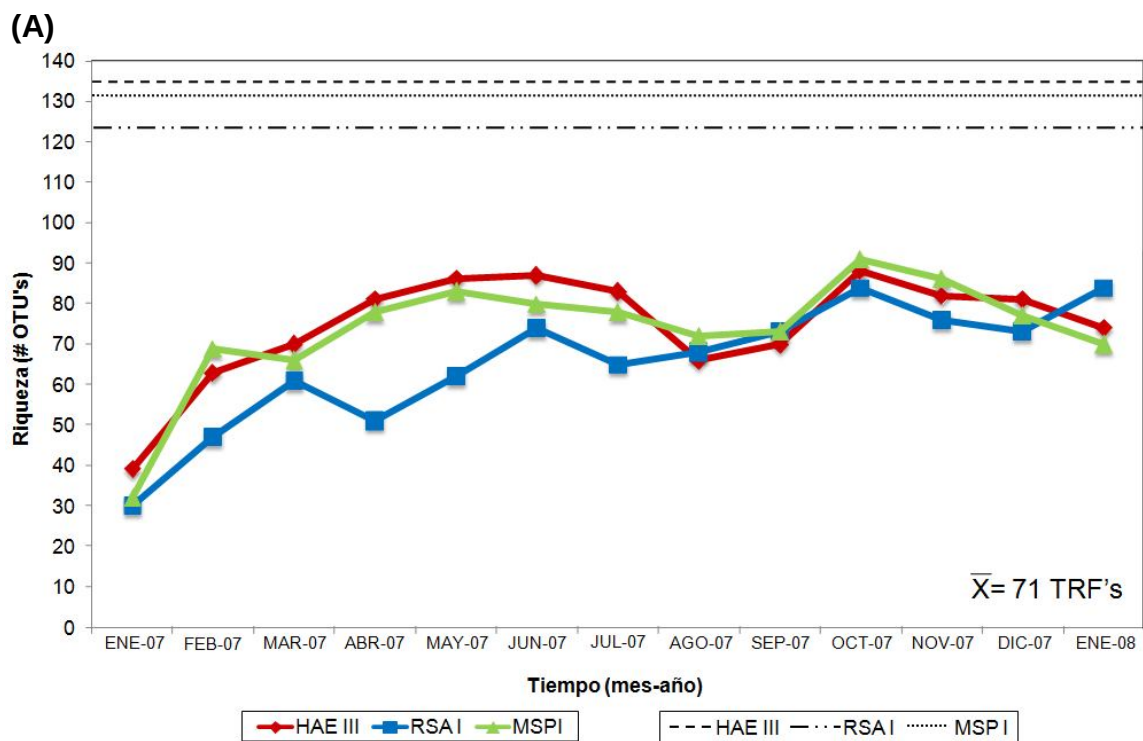
3). En promedio en la planta de Mayagüez se detectaron unos  $71 \pm 15$  fragmentos terminales por cada muestra y en la planta de Adjuntas se detectaron unos  $66 \pm 16$  fragmentos por cada muestra, luego de agrupar los fragmentos por “binning”. Con el fin de analizar los cambios en la comunidad bacteriana directamente en la unidad de tratamiento de lodos activados de las plantas, para el análisis final solo se utilizaron resultados de las matrices correspondientes a las comunidades de los tanques aerobios de cada una. Los demás resultados no se utilizaron ya que las muestras tomadas en los distintos puntos de las plantas de tratamiento durante un mismo tiempo no mostraban diferencias significativas entre sus poblaciones (Figura 4). Los tanques aerobios son la etapa de tratamiento más importante de los sistemas de lodos activados, y por ende fueron el punto de mayor interés en el análisis comparativo de las dos plantas de tratamiento.

En los t-RFLP analizados en Gel-Pro se observaron fragmentos terminales relativamente comunes en todos los meses de muestreo e inclusive algunos de ellos son compartidos por las comunidades de ambas plantas, como por ejemplo: *Hae* III- 377 pb, 296 pb, 218 pb; *Msp* I- 545 pb, 507 pb, 149 pb; *Rsa* I- 484 pb, 470 pb, 58 pb. También se pudieron observar fragmentos correspondientes a poblaciones que no pudieron ser incluidas en el análisis por la limitación del rango de medida de pesos moleculares que provee el marcador molecular (fragmentos menores a 50 pb o mayores a 700 pb). Las mayores diferencias entre puntos de muestreo dentro de una misma planta de tratamiento,

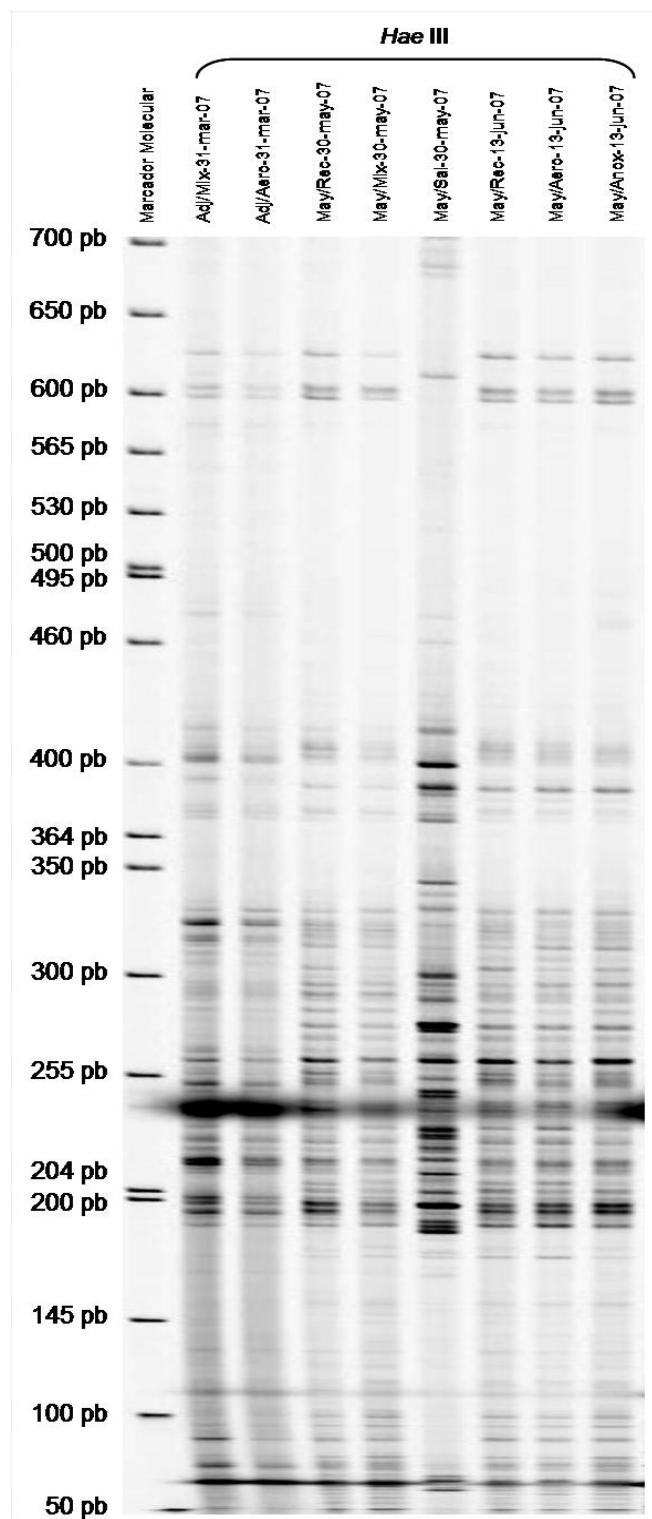
se observaron entre las muestras de entrada y salida (afluente y efluente) y las muestras de la unidad de tratamiento de la planta de Mayagüez.

### ***Análisis estadístico de los resultados de t-RFLP***

Varios análisis estadísticos se realizaron utilizando los valores de las matrices de t-RFLP para evaluar fluctuaciones en la composición de las comunidades bacterianas en los biorreactores estudiados. Cambios en la estructura de las comunidades bacterianas fueron analizados por el método de Escalamiento Multidimensional No-Métrico (NMDS). En el diagrama bidimensional se pueden observar los puntos correspondientes a las comunidades de Mayagüez y los puntos correspondientes a las comunidades de Adjuntas a través del tiempo de muestreo (Figura 5). Cada uno de los puntos correspondientes a cada planta individual se unieron con flechas que señalan como la comunidad va cambiando a través del tiempo. Cada punto se generó a partir de valores de una comunidad consenso derivada de los resultados de las tres enzimas de restricción utilizadas en el t-RFLP. La gráfica presentada fue seleccionada por el valor de estrés más bajo de entre 110 gráficas generadas a partir de una matriz de distancia construida con el algoritmo de Bray-Curtis. Los valores de estrés representan la significancia de los valores presentados en los dos primeros ejes de ordenación que generalmente son los más informativos. En todas las gráficas generadas se obtuvieron valores de estrés adecuados ( $\leq 0.1$ ) para el NMDS (Apéndice 2).



**Figura 3.** Riqueza de fragmentos terminales de restricción (OTUs) detectados en los perfiles de t-RFLP para cada planta de tratamiento: Mayagüez (A) y Adjuntas (B). Las líneas entre cortadas señalan el total de fragmentos detectados por cada enzima durante todo el tiempo de muestreo. Se indica la media de fragmentos detectados para cada planta.



**Figura 4.** Perfil de t-RFLP de genes del 16S rARN cortados con la enzima *Hae* III, correspondientes a los biorreactores de las plantas de Adjuntas (Adj) y Mayagüez (May). Se incluyen muestras de las siguientes etapas de tratamiento: tanque aerobio (Aero), tanque anóxico (Anox), licor mezclado (Mix), recirculado (Rec), efluente/salida (Sal).

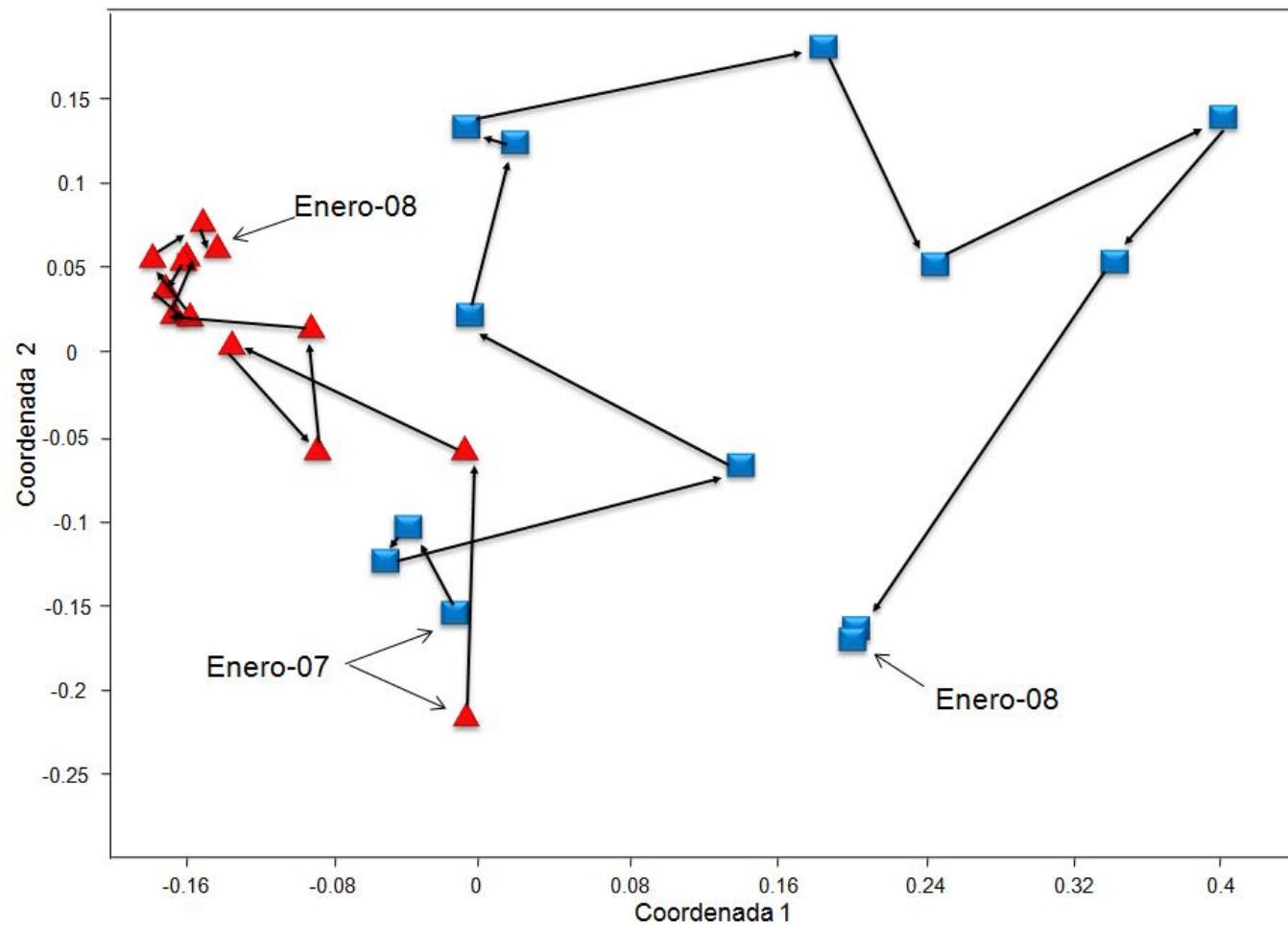
En la figura 5 se observan los cambios a través del tiempo de las comunidades de ambas plantas. Los puntos correspondientes a las comunidades de Adjuntas se separan durante la mayoría del muestreo de las comunidades de Mayagüez. Esto podría significar que las plantas poseen comunidades bacterianas con estructuras particulares o únicas, que difieren de un sistema de tratamiento a otro. A pesar de esta evidente separación, también se observa solapamiento de las poblaciones que componen las comunidades de cada planta en los primeros meses de muestreo (Figura 6). Los primeros meses de muestreo de Mayagüez parecen estar más distantes o mostrar mayores diferencias en la comunidad que el resto de las muestras y evidentemente son los responsables del solapamiento observado entre las plantas. Si estas muestras no se consideran en el análisis, un nuevo ordenamiento de las variables comprueba que en la mayoría del tiempo las comunidades de ambas plantas divergen entre ellas y el solapamiento que se observaba por las la presencia de poblaciones compartidas ya no es significativo (Figura 7).

También se observa que la distancia entre los puntos de las comunidades de Adjuntas varía más que los puntos correspondientes a la planta de Mayagüez. En la figura 5 se observa que el ordenamiento de los valores correspondientes a la estructura comunitaria en el biorreactor de la planta de Mayagüez coloca las comunidades muy cercanas entre ellas y a medida que pasa el tiempo de muestreo parecen ser más semejantes. Esto se hace más evidente en los últimos meses de muestreo. En el biorreactor de Adjuntas se observa lo contrario, el ordenamiento de los valores de las comunidades en el

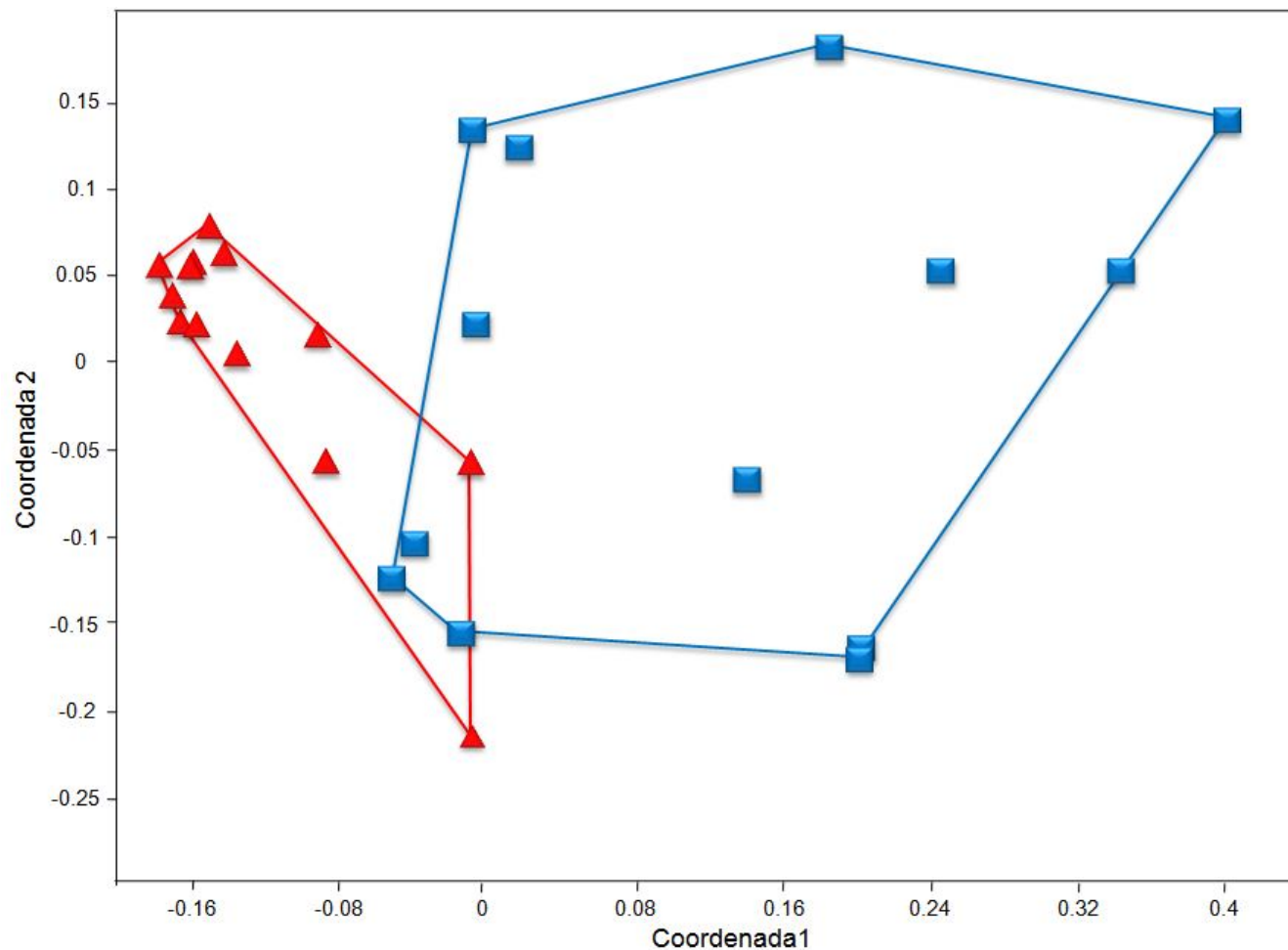


plano de la grafica es mucho más fluctuante y las comunidades parecen ser muy distintas entre sí durante todo el año. Las comunidades de algunos meses de muestreo parecen ser más semejantes entre ellas (ej. diciembre 2007 y enero 2008), pero en general la separación de las comunidades es mucho mayor en proporción a la separación de las comunidades de Mayagüez. Esto señala que la estructura de la comunidad dominante en el reactor de Adjuntas es menos estable que aquella que domina en el reactor de Mayagüez durante el tiempo de muestreo.

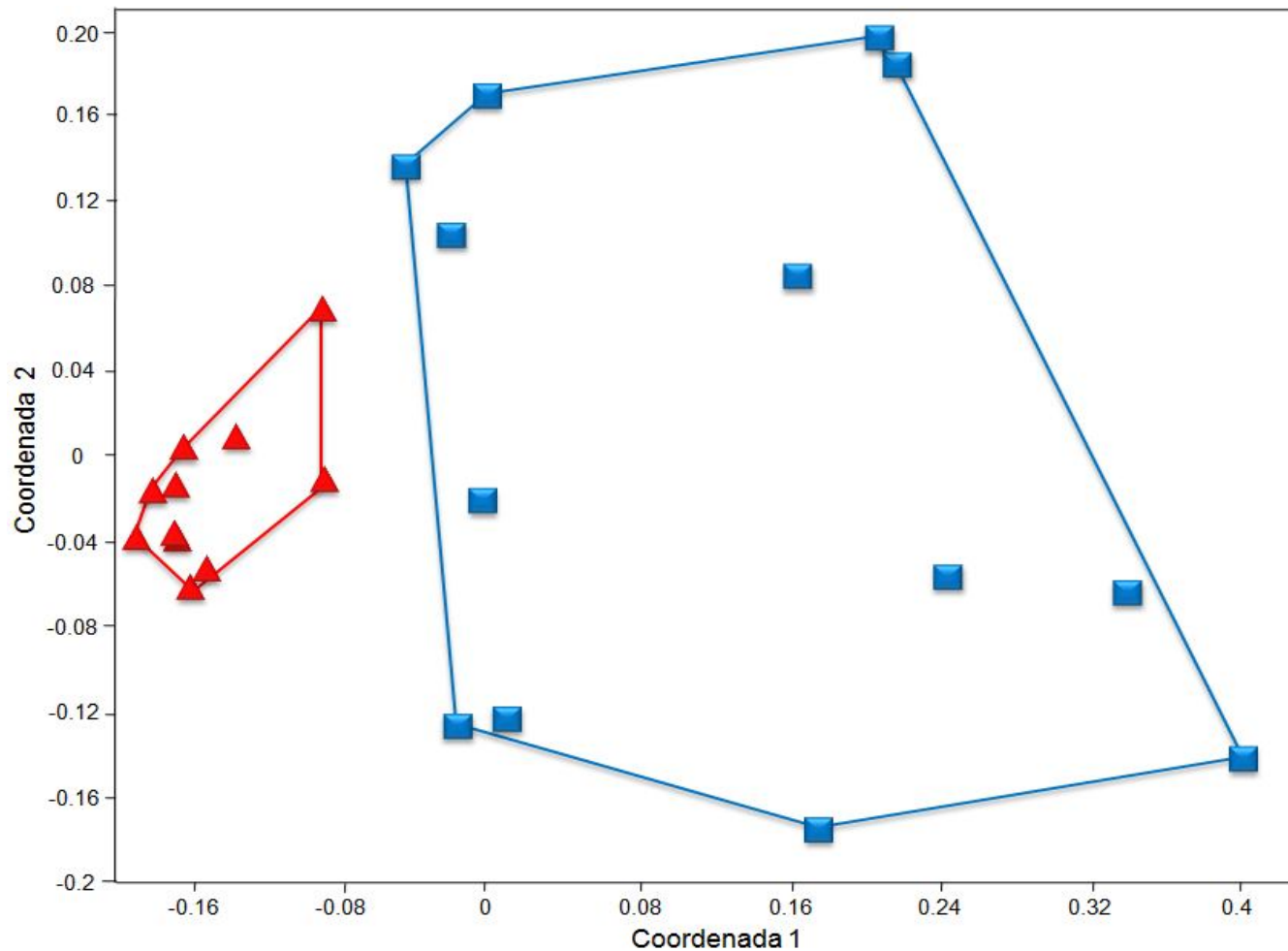
Las diferencias que se observan en las gráficas de NMDS entre las muestras de una misma planta y entre los grupos de muestras de cada planta, fueron analizadas estadísticamente para probar la significancia de estas diferencias. La significancia de estas diferencias se probó utilizando el Análisis de Similitud multivariado (ANOSIM). Los resultados del ANOSIM (Tabla 2) demuestran que hay diferencias entre las comunidades de cada planta pero con un solapamiento significativo ( $R = 0.4518$ ). Para probar que este solapamiento se debe a la cercanía las muestras de los primeros meses de la planta de Mayagüez que están más cercanas a las muestras de Adjuntas, se repitió nuevamente ANOSIM pero sin las muestras de enero y febrero de 2007 de la planta de Mayagüez y este demostró que las comunidades de cada planta son significativamente distintas entre sí ( $R = 0.5119$ ).



**Figura 5.** Análisis de Escalamiento Multidimensional No Métrico construido del consenso de las poblaciones bacterianas identificadas por los patrones de restricción de las tres enzimas de restricción en los t-RFLPs. Se comparan las comunidades correspondientes a: Reactor Aerobio de Mayagüez (▲) y Reactor Aerobio de Adjuntas (■). Las flechas indican la dirección de cambio de las comunidades durante los trece meses de muestreo, se señalan el primer y último mes de muestreo de cada planta.



**Figura 6.** Análisis de Escalamiento Multidimensional No Métrico construido del consenso de las poblaciones bacterianas identificadas por los patrones de restricción de las tres enzimas de restricción en los t-RFLPs. Se comparan las comunidades correspondientes a: Reactor Aerobio de Mayagüez (▲) y Reactor Aerobio de Adjuntas (■). Las comunidades correspondientes a cada planta de tratamiento fueron agrupadas en una envoltura convexa para resaltar un posible solapamiento.



**Figura 7.** Análisis de Escalamiento Multidimensional No Métrico construido del consenso de las poblaciones bacterianas identificadas por los patrones de restricción de las tres enzimas de restricción en los t-RFLPs. Se comparan las comunidades correspondientes a: Reactor Aerobio de Mayagüez (▲) y Reactor Aerobio de Adjuntas (■). Las comunidades correspondientes a cada planta de tratamiento fueron agrupadas en una envoltura convexa para resaltar un posible solapamiento.

**Tabla 2.** Resultados de ANOSIM de la comparación de perfiles de t-RFLP

| Perfiles comparados                     | ANOSIM |                |
|-----------------------------------------|--------|----------------|
|                                         | R      | Valor <i>p</i> |
| Mayagüez-Adjuntas                       | 0.4518 | < 0.0001       |
| Mayagüez (sin ene/07 & feb/07)-Adjuntas | 0.5119 | < 0.0001       |
| Mayagüez-Mayagüez.                      | 0.5690 | < 0.0001       |
| Adjuntas-Adjuntas                       | 0.7287 | < 0.0001       |

Para determinar estadísticamente la separación entre las comunidades de cada planta individual, se realizaron dos nuevos ANOSIM comparando las comunidades de cada biorreactor entre ellas mismas. Los resultados de ANOSIM demuestran que las comunidades de Adjuntas son estadísticamente más variables entre sí ( $R= 0.7287$ ) que las comunidades de la planta de Mayagüez ( $R= 0.5690$ ).

Con el análisis de Porcentaje de Similitud (SIMPER) se determinó cuales de las poblaciones bacterianas representadas en los t-RFLPs poseían un grado mayor de contribución sobre las diferencias observadas entre las comunidades de los biorreactores. Para presentar los resultados más significativos, se seleccionaron aquellas poblaciones que contribuyeron aproximadamente al 25% del total de las diferencias entre ambas comunidades para los patrones de restricción producidos con cada enzima de restricción individual (Tablas 3, 4 y 5). Para encontrar a que posibles grupos filogenéticos podrían ser asociados estos fragmentos extraídos de los perfiles de t-RFLP, se realizó un análisis de restricción *In-Silico* de secuencias depositadas en la base

de datos del RDP y los resultados se compararon con el SIMPER. Se seleccionaron como posibles grupos filogenéticos aquellos taxones que incluyeran una mayoría de secuencias de especies descritas, preferiblemente de cepas tipo. De no haber especies descritas, se utilizaban como referencia cepas cultivadas no descritas o secuencias de organismos no cultivados, en ese mismo orden de preferencia.

Del análisis se desprende que la mayoría de las poblaciones que contribuyeron a este 25% de las diferencias son poblaciones dominantes en el biorreactor de la planta de tratamiento de Mayagüez. Algunos de estos fragmentos terminales no pudieron ser asociados a ningún grupo en específico descrito o publicado en las bases de datos genéticas, pero en general la mayoría de los fragmentos pudieron asociarse a uno o dos grupos filogenéticos distintos. Menos de 10 fragmentos terminales pudieron ser asociados a géneros bacterianos específicos. La mayoría de las poblaciones incluidas en el análisis se ligaron a bacterias pertenecientes a los filos de *Firmicutes* (Gram positivos) y distintas clases de *Proteobacteria*. Cuatro de los fragmentos pudieron ligarse a secuencias detectadas en las bibliotecas metagenómicas ambientales (señalados con negrillas en las tablas).

**Tabla 3.** Resultados de SIMPER binario (presencia/ausencia) de los fragmentos producidos por la enzima *Hae* III- 25% (Promedio Global de Disimilaridad: 41.62) Los signos de interrogación indican que estos fragmentos no pudieron ligarse a ningún grupo filogenético en específico. Las negrillas señalan fragmentos detectados en las bibliotecas de clones. Nombres entre paréntesis indica el taxón más probable dentro del grupo taxonómico mayor correspondiente.

| OTU<br>(PM<br>promedio) | Contribución | % Contribución | % Acumulativo | Media abund.<br>Mayagüez | Media abund.<br>Adjuntas | Reactor<br>(Lugar) | Grupo Filogenético                      |
|-------------------------|--------------|----------------|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|-----------------------------------------|
| 220                     | 0.5585       | 1.342          | 1.342         | 0.846                    | 0.077                    | Mayagüez           | <i>Firmicutes, Chloroflexi,</i>         |
| 613                     | 0.5396       | 1.296          | 2.638         | 0.231                    | 0.923                    | Adjuntas           | <i>Betaproteobacteria</i>               |
| 64                      | 0.452        | 1.086          | 3.724         | 0.692                    | 0.154                    | Mayagüez           | <i>Flavobacterium sp.</i>               |
| 627                     | 0.4428       | 1.064          | 4.788         | 0.769                    | 0.308                    | Mayagüez           | <i>Alphaproteobacteria, Firmicutes,</i> |
| 122                     | 0.4399       | 1.057          | 5.845         | 0.769                    | 0.308                    | Mayagüez           | <i>Actinobacteria</i>                   |
| 182                     | 0.4388       | 1.054          | 6.899         | 0.692                    | 0.231                    | Mayagüez           | ?                                       |
| 147                     | 0.4384       | 1.053          | 7.952         | 0.769                    | 0.308                    | Mayagüez           | <i>Actinobacteria</i>                   |
| 301                     | 0.4331       | 1.041          | 8.993         | 0.692                    | 0.231                    | Mayagüez           | <i>Firmicutes, Bacteroidetes,</i>       |
| 240                     | 0.4247       | 1.020          | 10.01         | 0.846                    | 0.385                    | Mayagüez           | <i>Actinobacteria, Cyanobacteria</i>    |
| 400                     | 0.4181       | 1.006          | 11.02         | 0.692                    | 0.308                    | Mayagüez           | <i>Firmicutes, Delta-</i>               |
| 556                     | 0.4146       | 0.996          | 12.01         | 0                        | 0.538                    | Adjuntas           | <i>Gammaproteobacteria</i>              |
| 467                     | 0.4094       | 0.984          | 13            | 0.615                    | 0.231                    | Mayagüez           | <i>Firmicutes, Alphaproteobacteria,</i> |
| 342                     | 0.4084       | 0.981          | 13.98         | 0.692                    | 0.385                    | Mayagüez           | <i>Cyanobacteria</i>                    |
| 620                     | 0.4069       | 0.978          | 14.96         | 0.923                    | 0.462                    | Mayagüez           | <i>Delta-Gammaproteobacteria</i>        |
| 245                     | 0.4039       | 0.970          | 15.93         | 0.692                    | 0.385                    | Mayagüez           | <i>Epsilonproteobacteria</i>            |
| 391                     | 0.4017       | 0.965          | 16.89         | 0.385                    | 0.692                    | Adjuntas           | <i>(Helicobacteraceae)</i>              |
| 678                     | 0.4002       | 0.962          | 17.85         | 0.692                    | 0.385                    | Mayagüez           | ?                                       |
| 142                     | 0.3986       | 0.958          | 18.81         | 0.385                    | 0.692                    | Adjuntas           | <i>Firmicutes (Clostridiales)</i>       |
| 268                     | 0.3985       | 0.957          | 19.77         | 0.692                    | 0.385                    | Mayagüez           | <i>Bacteroidetes</i>                    |
| 72                      | 0.3967       | 0.953          | 20.72         | 0.692                    | 0.385                    | Mayagüez           | <i>Proteobacteria, Firmicutes</i>       |
| 178                     | 0.396        | 0.951          | 21.67         | 0.615                    | 0.308                    | Mayagüez           | <i>Delta-Gammaproteobacteria</i>        |
| 446                     | 0.3939       | 0.946          | 22.62         | 0.615                    | 0.308                    | Mayagüez           | <i>Cyanobacteria</i>                    |
| 425                     | 0.3916       | 0.941          | 23.56         | 0.769                    | 0.462                    | Mayagüez           | <i>Gemmatimonadetes, Bacteroidetes,</i> |
| 158                     | 0.3911       | 0.940          | 24.5          | 0.615                    | 0.385                    | Mayagüez           | <i>Firmicutes</i>                       |
|                         |              |                |               |                          |                          |                    | <i>Firmicutes, Bacteroidetes,</i>       |
|                         |              |                |               |                          |                          |                    | <i>Proteobacteria, Acidobacteria</i>    |
|                         |              |                |               |                          |                          |                    | <i>Alphaproteobacteria</i>              |
|                         |              |                |               |                          |                          |                    | <i>Actinobacteria</i>                   |
|                         |              |                |               |                          |                          |                    | ?                                       |
|                         |              |                |               |                          |                          |                    | <i>Delta-Gammaproteobacteria</i>        |
|                         |              |                |               |                          |                          |                    | <i>Alphaproteobacteria, Firmicutes</i>  |

**Tabla 4.** Resultados de SIMPER binario (presencia/ausencia) de los fragmentos producidos por la enzima *Msp* I- 25% (Promedio Global de Disimilaridad: 38.34) Los signos de interrogación indican que estos fragmentos no pudieron ligarse a ningún grupo filogenético en específico. Las negrillas señalan fragmentos detectados en las bibliotecas de clones. Nombres entre paréntesis indica el taxón más probable dentro del grupo taxonómico mayor correspondiente.

| <b>OUT<br/>(PM<br/>promedio)</b> | <b>Contribución</b> | <b>% Contribución</b> | <b>% Acumulativo</b> | <b>Media abund.<br/>Mayagüez</b> | <b>Media abund.<br/>Adjuntas</b> | <b>Reactor<br/>(lugar)</b> | <b>Grupo Filogenético</b>                                         |
|----------------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 83                               | 0.4752              | 1.239                 | 1.239                | 0.0769                           | 0.692                            | Adjuntas                   | <i>Bacteroidetes, Firmicutes, Beta-Gammaproteobacteria</i>        |
| 299                              | 0.4711              | 1.229                 | 2.468                | 0.154                            | 0.769                            | Adjuntas                   | <i>Firmicutes</i>                                                 |
| 187                              | 0.4651              | 1.213                 | 3.681                | 0.923                            | 0.308                            | Mayagüez                   | <i>Bacteroidetes, Firmicutes (Lactobacillus)</i>                  |
| 68                               | 0.4529              | 1.181                 | 4.863                | 0.769                            | 0.231                            | Mayagüez                   | <i>Actinobacteria, Firmicutes</i>                                 |
| 462                              | 0.4463              | 1.164                 | 6.027                | 0.692                            | 0.154                            | Mayagüez                   | <i>Gammaproteobacteria</i>                                        |
| 660                              | 0.446               | 1.163                 | 7.19                 | 0.615                            | 0                                | Mayagüez                   | ?                                                                 |
| 566                              | 0.4425              | 1.154                 | 8.344                | 0.231                            | 0.769                            | Adjuntas                   | <i>Firmicutes</i>                                                 |
| 250                              | 0.4175              | 1.089                 | 9.433                | 0.308                            | 0.769                            | Adjuntas                   | <i>Proteobacteria</i>                                             |
| 667                              | 0.4173              | 1.088                 | 10.52                | 0.769                            | 0.308                            | Mayagüez                   | <i>Nitrospira</i>                                                 |
| 326                              | 0.4153              | 1.083                 | 11.6                 | 0.308                            | 0.769                            | Adjuntas                   | <i>Beta-Gammaproteobacteria</i>                                   |
| 597                              | 0.415               | 1.082                 | 12.69                | 0.692                            | 0.231                            | Mayagüez                   | ?                                                                 |
| 217                              | 0.4101              | 1.070                 | 13.76                | 0.231                            | 0.692                            | Adjuntas                   | <i>Firmicutes (Clostridiales)</i>                                 |
| 98                               | 0.4013              | 1.047                 | 14.8                 | 0.615                            | 0.231                            | Mayagüez                   | <i>Bacteroidetes (Bacteroidales)</i>                              |
| 266                              | 0.3913              | 1.021                 | 15.82                | 0.385                            | 0.769                            | Adjuntas                   | <i>Acidobacteria, Deinococcus, Spirochaetes, Fusobacter</i>       |
| 255                              | 0.3897              | 1.016                 | 16.84                | 0.308                            | 0.692                            | Adjuntas                   | <i>Firmicutes</i>                                                 |
| 425                              | 0.3838              | 1.001                 | 17.84                | 0.615                            | 0.231                            | Mayagüez                   | ?                                                                 |
| 586                              | 0.3815              | 0.995                 | 18.84                | 0.692                            | 0.385                            | Mayagüez                   | <i>Firmicutes</i>                                                 |
| 122                              | 0.3807              | 0.993                 | 19.83                | 0.692                            | 0.385                            | Mayagüez                   | <i>Firmicutes, Proteobacteria, Thermus</i>                        |
| 310                              | 0.3797              | 0.990                 | 20.82                | 0.385                            | 0.692                            | Adjuntas                   | <i>Gammaproteobacteria, Firmicutes</i>                            |
| 681                              | 0.3785              | 0.987                 | 21.81                | 0.692                            | 0.385                            | Mayagüez                   | ?                                                                 |
| 182                              | 0.3783              | 0.987                 | 22.79                | 0.846                            | 0.462                            | Mayagüez                   | <i>Gammaproteobacteria, Firmicutes</i>                            |
| 406                              | 0.375               | 0.978                 | 23.77                | 0.462                            | 0.923                            | Adjuntas                   | <i>Alphaproteobacteria</i>                                        |
| <b>172</b>                       | 0.3733              | 0.974                 | 24.75                | 0.385                            | 0.615                            | Adjuntas                   | <i>Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Planctomycetes</i> |



**Tabla 5.** Resultados de SIMPER binario (presencia/ausencia) de los fragmentos producidos por la enzima *Rsa I*- 25% (Promedio Global de Disimilaridad: 40.81) Los signos de interrogación indican que estos fragmentos no pudieron ligarse a ningún grupo filogenético en específico. Las negrillas señalan fragmentos detectados en las bibliotecas de clones. Nombres entre paréntesis indica el taxón más probable dentro del grupo taxonómico mayor correspondiente.

| OUT<br>(PM<br>promedio) | Contribución | % Contribución | % Acumulativo | Media abund.<br>Mayagüez | Media abund.<br>Adjuntas | Reactor<br>(lugar) | Grupo Filogenético                                                                     |
|-------------------------|--------------|----------------|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| 175                     | 0.6263       | 1.535          | 1.535         | 0.923                    | 0.154                    | Mayagüez           | <i>Bacteroidetes, Firmicutes</i>                                                       |
| 502                     | 0.565        | 1.384          | 2.919         | 0.769                    | 0.078                    | Mayagüez           | <i>Firmicutes</i>                                                                      |
| 629                     | 0.5271       | 1.292          | 4.211         | 0.231                    | 0.769                    | Adjuntas           | <i>Streptococcus sp.</i>                                                               |
| 509                     | 0.4841       | 1.186          | 5.397         | 0.692                    | 0.308                    | Mayagüez           | <i>Firmicutes</i>                                                                      |
| 140                     | 0.4765       | 1.168          | 6.564         | 0.692                    | 0.231                    | Mayagüez           | ?                                                                                      |
| 552                     | 0.4732       | 1.160          | 7.724         | 0.231                    | 0.692                    | Adjuntas           | <i>Firmicutes, Proteobacteria</i>                                                      |
| 215                     | 0.4698       | 1.151          | 8.875         | 0.692                    | 0.308                    | Mayagüez           | ?                                                                                      |
| 341                     | 0.4693       | 1.150          | 10.02         | 0.692                    | 0.308                    | Mayagüez           | <i>Alphaproteobacteria</i>                                                             |
| 114                     | 0.4669       | 1.144          | 11.17         | 0.154                    | 0.615                    | Adjuntas           | <i>Bacteroidetes</i><br><i>(Sphingobacteriales)</i>                                    |
| 686                     | 0.4598       | 1.127          | 12.3          | 0.769                    | 0.385                    | Mayagüez           | <i>Alphaproteobacteria</i>                                                             |
| 587                     | 0.4578       | 1.122          | 13.42         | 0.538                    | 0.078                    | Mayagüez           | ?                                                                                      |
| 306                     | 0.4564       | 1.118          | 14.54         | 0.385                    | 0.692                    | Adjuntas           | <i>Flavobacteriaceae</i>                                                               |
| 274                     | 0.4465       | 1.094          | 15.63         | 0.615                    | 0.154                    | Mayagüez           | <i>Firmicutes, Verrucomicrobia</i>                                                     |
| 375                     | 0.4463       | 1.094          | 16.72         | 0.769                    | 0.462                    | Mayagüez           | ?                                                                                      |
| 211                     | 0.4405       | 1.079          | 17.8          | 0.231                    | 0.615                    | Adjuntas           | <i>Deltaproteobacteria,</i><br><i>Firmicutes, Actinobacteria,</i><br><i>Nitrospira</i> |
| 192                     | 0.4387       | 1.075          | 18.88         | 0.615                    | 0.308                    | Mayagüez           | <i>Firmicutes, Actinobacteria</i>                                                      |
| 117                     | 0.4384       | 1.074          | 19.95         | 0.462                    | 0.846                    | Adjuntas           | <i>Alphaproteobacteria,</i><br><i>Firmicutes</i>                                       |
| 650                     | 0.4361       | 1.069          | 21.02         | 0.538                    | 0.154                    | Mayagüez           | <i>Gammaproteobacteria,</i><br><i>Bacteroidetes</i>                                    |
| 205                     | 0.4301       | 1.054          | 22.07         | 0.462                    | 0.692                    | Adjuntas           | <i>Firmicutes (Clostridiales)</i>                                                      |
| 268                     | 0.43         | 1.054          | 23.13         | 0.692                    | 0.462                    | Mayagüez           | <i>Fusobacterium sp.</i>                                                               |
| 642                     | 0.429        | 1.051          | 24.18         | 0.615                    | 0.385                    | Mayagüez           | <i>Gammaproteobacteria</i>                                                             |
| 112                     | 0.4285       | 1.050          | 25.23         | 0.692                    | 0.462                    | Mayagüez           | <i>Bacteroidetes, Proteobacteria</i>                                                   |

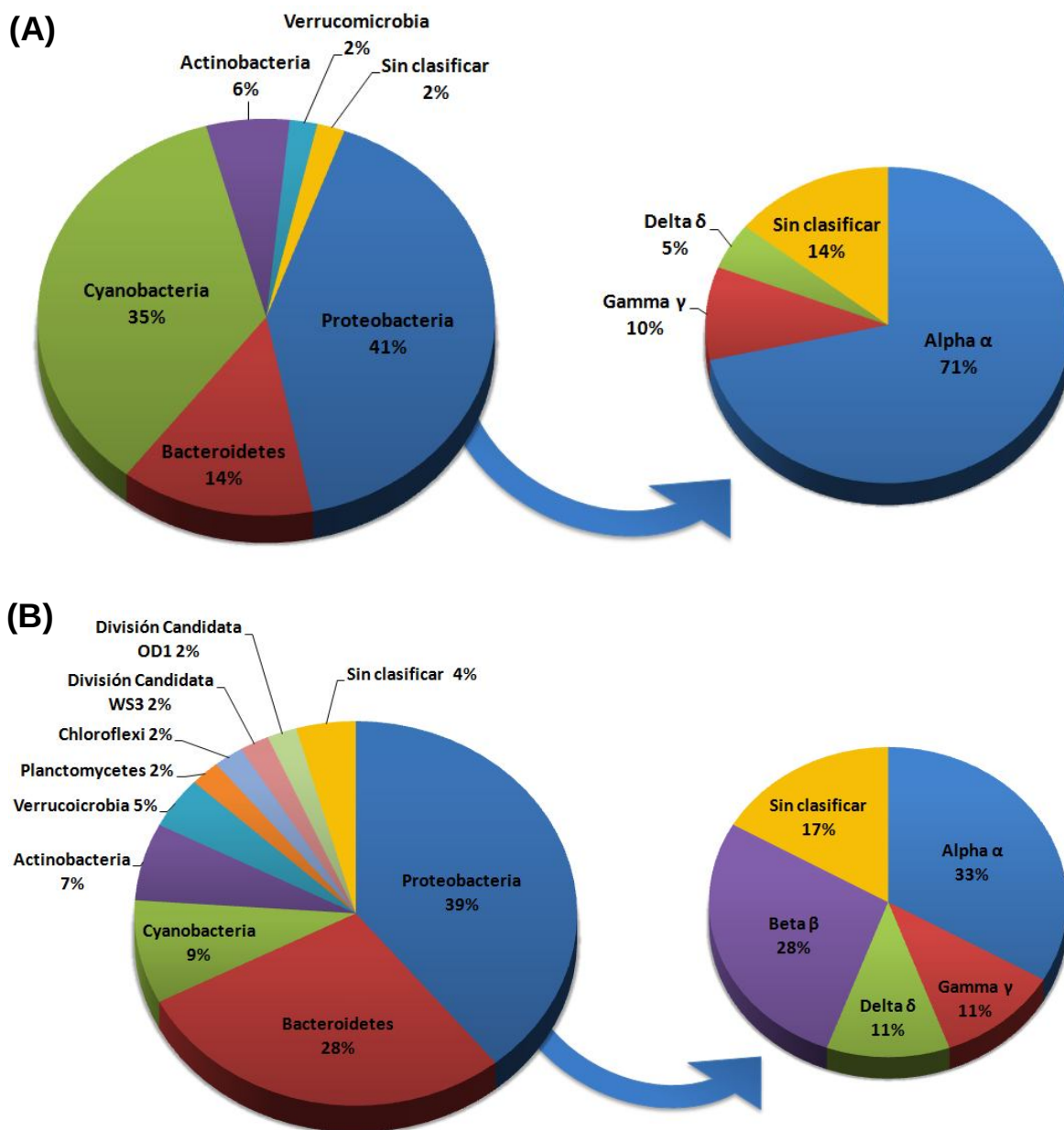
## **Bibliotecas genómicas ambientales de genes del 16S rARN**

Se construyeron dos bibliotecas de genómicas ambientales mediante la secuenciación de 96 clones seleccionados al azar por cada uno de los biorreactores estudiados. Luego de descartarse aquellas secuencias menores a 400 pb, todas aquellas secuencias de calidad sospechosa o consideradas quimeras y aquellas ocupadas por partes del vector de clonación, se obtuvieron 51 secuencias de la biblioteca de Mayagüez y 46 secuencias de la biblioteca de Adjuntas consideradas de buena calidad y utilizadas para el análisis filogenético. La mayoría de las secuencias parciales utilizadas finalmente en el análisis sobrepasaron las 700 pb, lo que representa aproximadamente un 50% del gen completo.

Todas las secuencias recuperadas fueron clasificadas bajo el dominio Bacteria. Las secuencias de Mayagüez se asociaron a 6 grupos distintos a nivel de filo (Figura 8-A), y las de Adjuntas se asociaron a 10 grupos distintos al mismo nivel (Figura 8-B). Las secuencias fueron divididas en dos grupos de acuerdo a la orientación (5'-3' ó 3'-5') del gen secuenciado. El análisis filogenético de los 4 grupos de secuencias se presenta en las figuras: 9, 10, 11 y 12. Algunas de las secuencias de las bibliotecas de clones seleccionadas por ser de buena calidad y utilizadas para el análisis filogenético general, no fueron utilizadas para la construcción final de los árboles filogenéticos ya que afectaban negativamente la topología de los árboles generados. Las razones principales fueron: la posición adelantada de inicio de la secuencia (la secuencias carecían

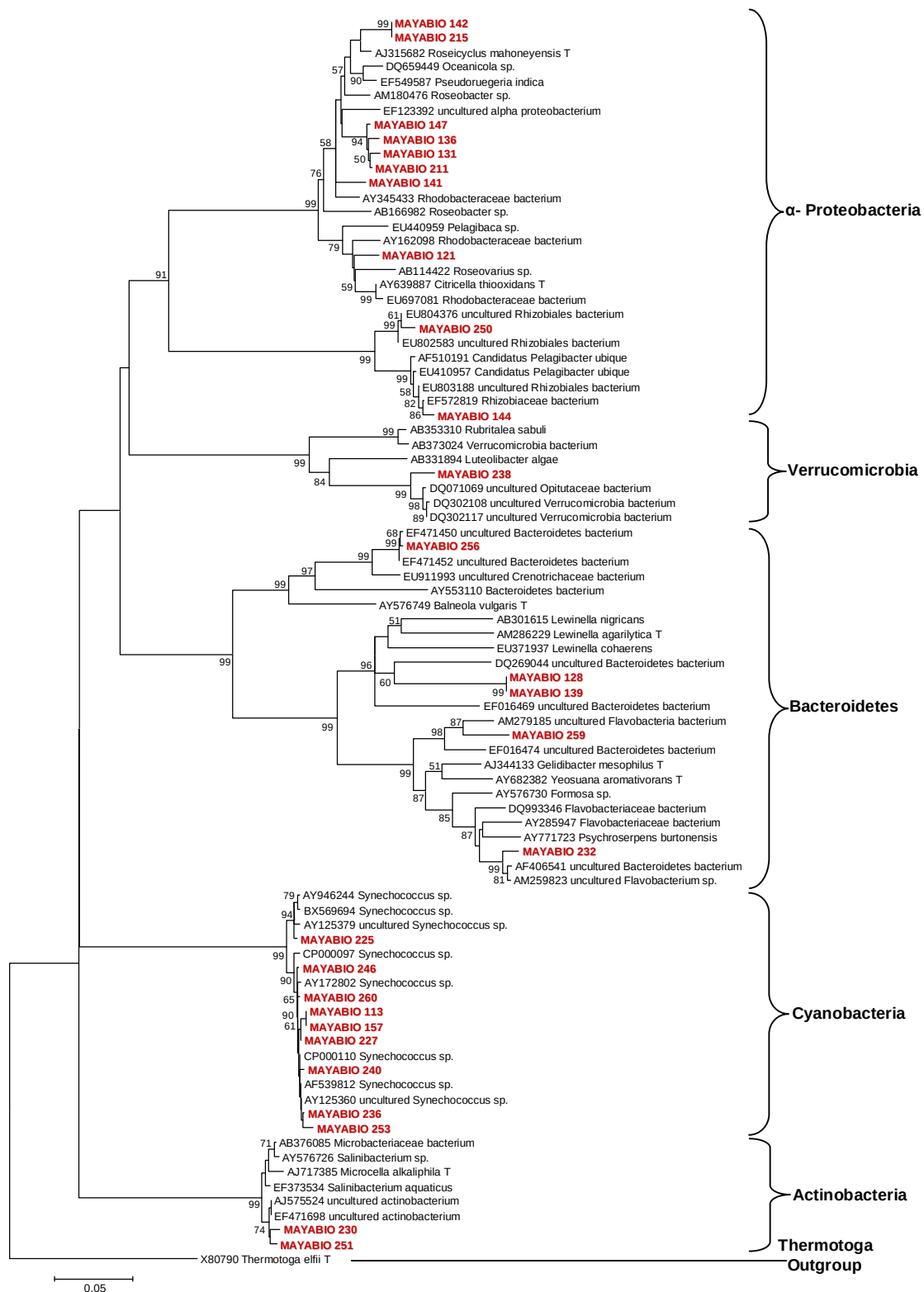
de las primeras ~200 pb, desde el iniciador 27F) y el tamaño (< 600 pb). De la biblioteca de Mayagüez no se reutilizaron las siguientes secuencias (entre paréntesis el taxón más cercano con un por ciento de identidad mayor al 80% o el por ciento más alto): MAYABIO-152 (89% *Deltaproteobacteria*), MAYABIO-126 (94% *Proteobacteria*), MAYABIO-138 (100% *Flavobacteria*), MAYABIO-106 (100% *Rhodobacteraceae*), MAYABIO-149 (92% *Gammaproteobacteria*), MAYABIO-150 (100% *Rhodobacteraceae*), MAYABIO-143 (100% *Rhodobacteria*) y MAYABIO-151 (38% *Chloroflexi*). De la biblioteca de Adjuntas no se utilizaron las siguientes secuencias: ADJUBIO-221 (100% *Xanthomonadaceae*) y ADJUBIO-256 (99% *Alphaproteobacteria*).

El análisis filogenético demostró que para ambas bibliotecas los clones más dominantes pertenecen a los grupos de *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* y *Bacteroidetes*. Las diferencias más notables entre ambas bibliotecas de clones incluyeron las presencias de secuencias relacionadas a *Planctomyces*, *Betaproteobacteria*, *Chloroflexi*, y los filos putativos WS3 y OD1 en el biorreactor de Adjuntas, mientras que dichos grupos no se detectaron en Mayagüez. Las secuencias de Adjuntas también se caracterizaron por una alta diversidad de secuencias relacionadas a los *Bacteroidetes*. Por otro lado las secuencias de la planta de Mayagüez se caracterizaron por una alta frecuencia en la detección de secuencias de Cyanobacterias relacionadas al género de los *Synechococcus* y de *Alphaproteobacteria* relacionadas a la familia de las *Rhodobacteraceae*.

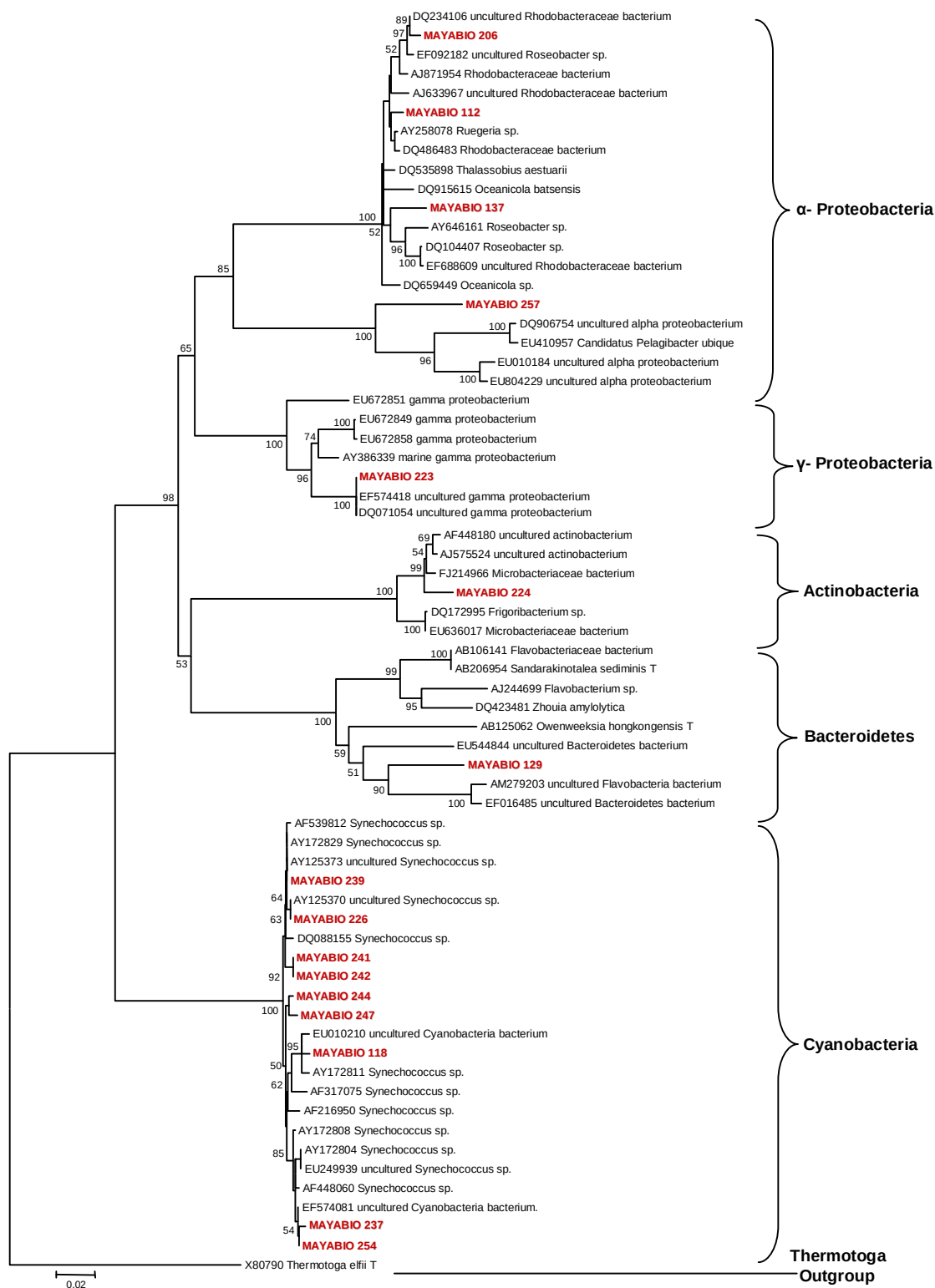


**Figura 8.** Análisis filogenético general de las secuencias ambientales obtenidas de las bibliotecas de clones construidas de las plantas de Mayagüez (A) y Adjuntas (B). Las graficas de la izquierda ilustran la frecuencia relativa de las secuencias con los distintos filos bacterianos y las de la derecha muestran las distintas clases en las que se dividieron las *Proteobacteria*. Las secuencias incluidas en los grupos nombrados “Sin clasificar” poseen una identidad menor al 80% en relación al pariente más cercano en el RDP 10, los parientes más cercanos (% identidad) son los siguientes: Adjuntas-*Chloroflexi* (38%), *Gammaproteobacteria* (63%), *Alphaproteobacteria* (78%), *Alphaproteobacteria* (78%); Mayagüez- *Chloroflexi* (65%), *Thermomicrobia* (38%), *Gammaproteobacteria* (58%), *Gammaproteobacteria* (79%), *Gammaproteobacteria* (69%).

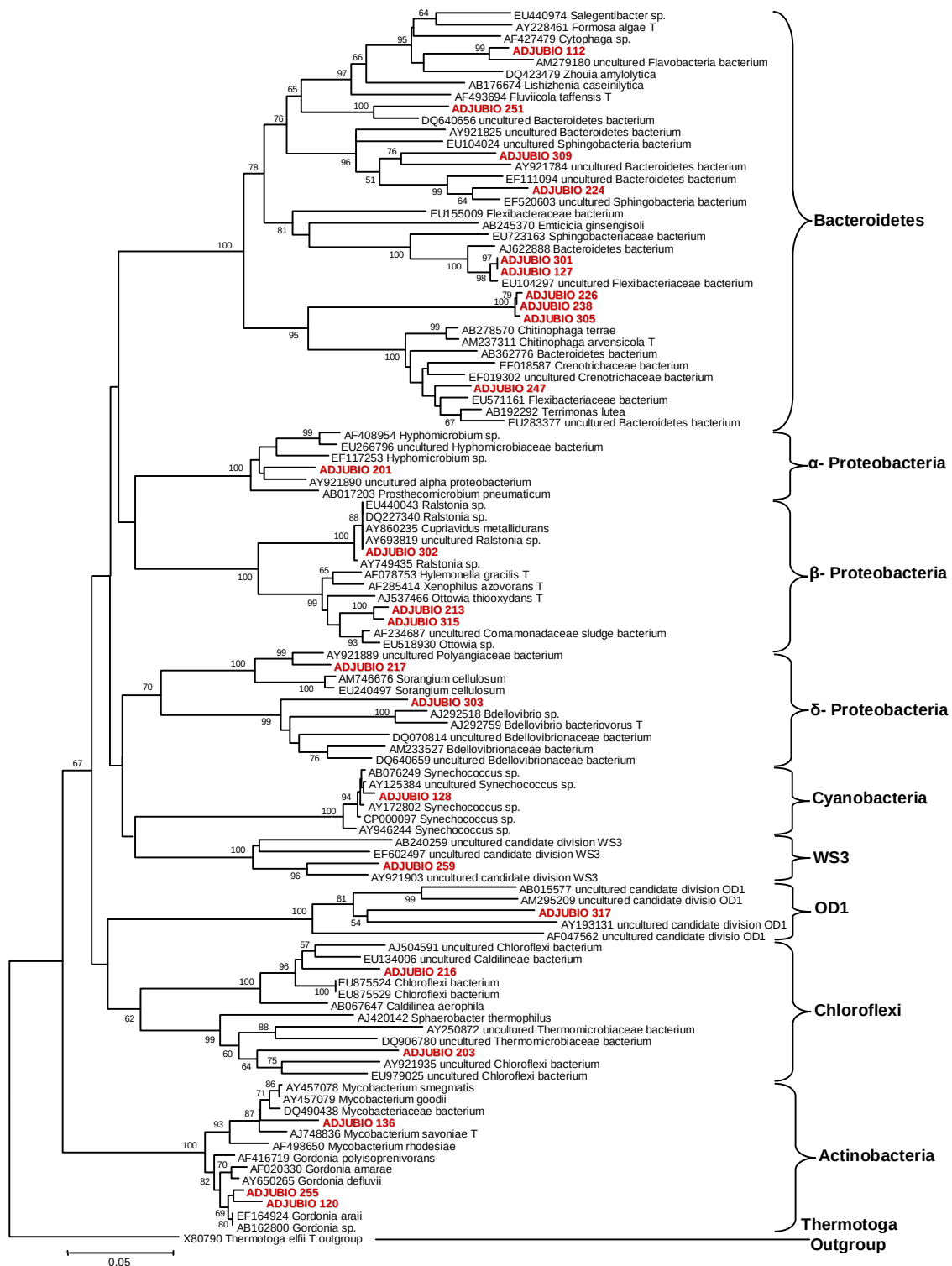
**Descripción de las figuras 9-12:** El análisis filogenético se condujo utilizando el programa MEGA 4. Cada árbol filogenético fue construido a partir de secuencias de genes del 16S rARN obtenidas de las bibliotecas de clones ambientales y las de sus parientes más cercanos obtenidas del RDP 10. Se incluyó la secuencia del 16S rADN de la cepa tipo de la bacteria *Thermotoga elfii* como grupo externo. Los corchetes a la derecha de los diagramas encierran las secuencias asociadas a cada taxón indicado, ya sea un filo o clase de *Proteobacteria*. La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de “Neighbor-Joining”. Junto a cada rama se muestran los por cientos (>50) de árboles replicados en donde el taxón asociado se agrupó igual en la prueba de “bootstrap” (2000 réplicas). El árbol se trazó a escala, en donde el largo de las ramas está en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Estas distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de “Maximum Composite Likelihood” y sus unidades equivalen al número de bases sustituidas por cada posición en la secuencia del gen. Todas las posiciones en las secuencias conteniendo “gaps” se eliminaron automáticamente del análisis.



**Figura 9.** Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de genes del 16S rARN en la dirección 5'-3' obtenidas de las bibliotecas de clones de la planta de tratamiento de Mayagüez.

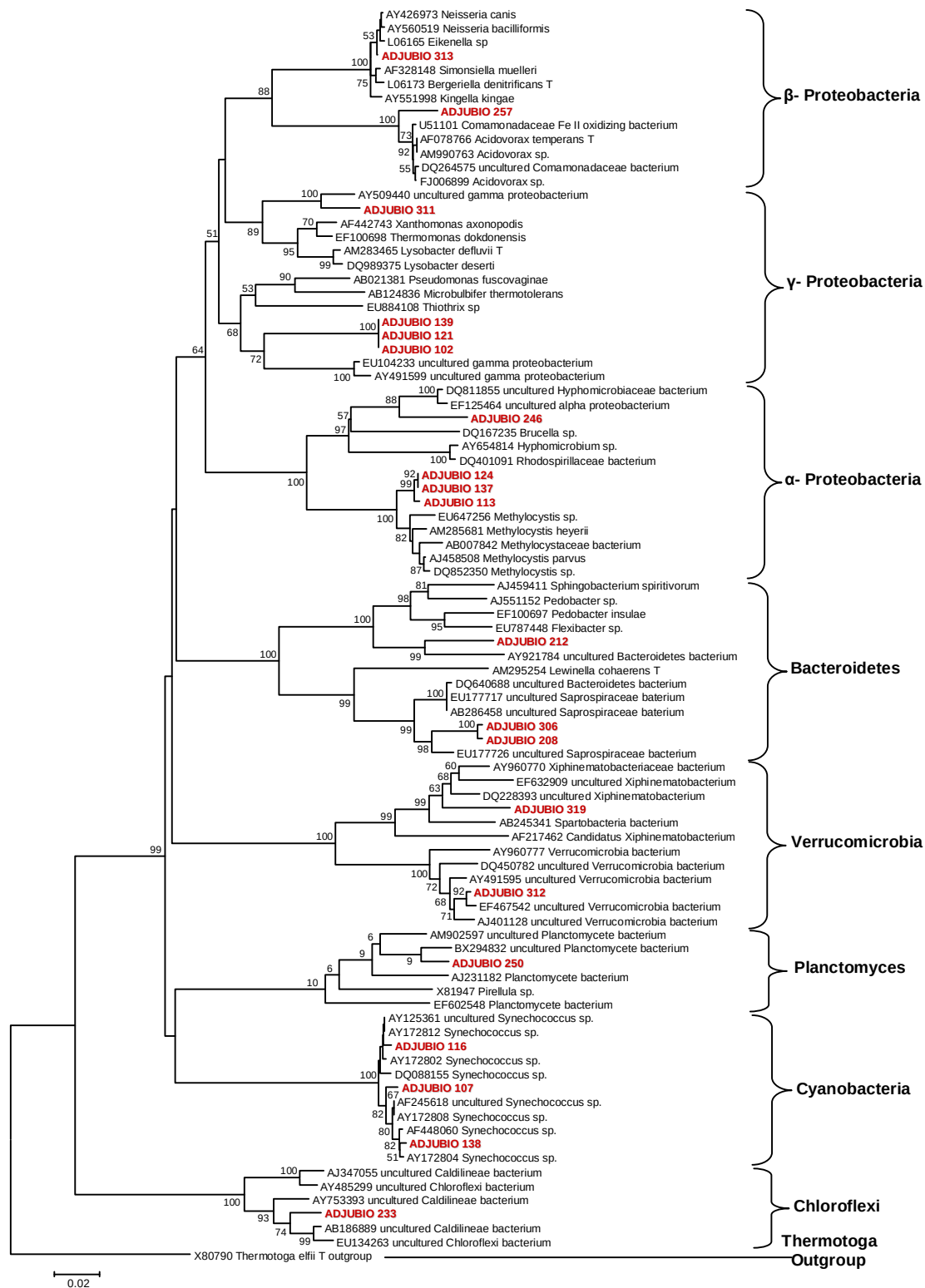


**Figura 10.** Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de genes del 16S rARN en la dirección 3'-5' (complemento reverso) obtenidas de las bibliotecas de clones de la planta de tratamiento de Mayagüez.



**Figura 11.** Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de genes del 16S rARN en la dirección 5'-3' obtenidas de las bibliotecas de clones de la planta de tratamiento de Adjuntas.





**Figura 12.** Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de genes del 16S rARN en la dirección 3'-5' (complemento reverso) obtenidas de las bibliotecas de clones de la planta de tratamiento de Adjuntas.

### ***Análisis de diversidad y riqueza de especies***

Para obtener valores comparables de la diversidad taxonómica de las comunidades de bacterias en los reactores de tratamiento, se calcularon índices de diversidad y riqueza de especies (Tabla 6). La medida de diversidad para definir una Unidad Taxonómica Operacional (OTU o filotipo) se basó en un 97% de identidad para ambas bibliotecas de clones. La riqueza de OTU para cada uno de los cuatro grupos en los que se dividieron las bibliotecas genómicas (por cada planta y por la posición en que se secuenció el gen) se obtuvo utilizando el programa DOTUR. Sin embargo, debido a que el análisis en este programa está basado en alineamientos múltiples entre las secuencias, el mismo no pudo ser utilizado para determinar cuántos filotipos distintos en total componían cada biblioteca. En su lugar se utilizó el algoritmo de Classifier en la base de datos de RDP 10 ya que este puede determinar qué secuencias se clasifican bajo un mismo filotipo con un 97% de identidad basado en su relación con secuencias publicadas en la base de datos y no en la relación determinada por un alineamiento entre las mismas secuencias. En este análisis de riqueza de especies se obtuvo que la biblioteca de clones correspondiente a la planta de tratamiento de Adjuntas resultó ser más rica en especies con 34 filotipos de entre 46 secuencias incluidas, mientras que la biblioteca de la planta de Mayagüez resultó con sólo 20 filotipos de 51 secuencias incluídas en el análisis.

Los resultados obtenidos del programa de DOTUR también fueron utilizados para calcular distintos índices de diversidad y riqueza (Tabla 6), y para

**Tabla 6.** Índices ecológicos y características estadísticas de las bibliotecas de clones ambientales construídas de muestras de los reactores de tratamiento aerobio de Mayagüez y Adjuntas.

| Índice ecológico                                  | Mayagüez |          |       | Adjuntas |          |       |
|---------------------------------------------------|----------|----------|-------|----------|----------|-------|
|                                                   | 5'-3'    | 3'-5' CR | Media | 5'-3'    | 3'-5' CR | Media |
| Índice diversidad Shannon and Weaver ( <i>H</i> ) | 2.16     | 1.73     | 1.95  | 2.92     | 2.51     | 2.71  |
| Índice diversidad de Simpson ( <i>1/D</i> )       | 0.14     | 0.23     | 0.19  | 0.02     | 0.05     | 0.04  |
| Índice de riqueza de Jaccard                      | 20       | 50.5     | 35.2  | 51.1     | 156      | 103.6 |
| Índice de riqueza $S_{Chao\ 1}$                   | 17.2     | 30       | 23.6  | 50       | 36.5     | 43.3  |
| Índice de riqueza $S_{ACE}$                       | 28.1     | 39.2     | 33.7  | 60.5     | 31.9     | 46.2  |
| Riqueza de OTU's                                  | 13       | 9        | 11    | 20       | 14       | 17    |
| Por ciento de cobertura (%)                       | 78       | 64       | 71    | 36       | 57       | 47    |

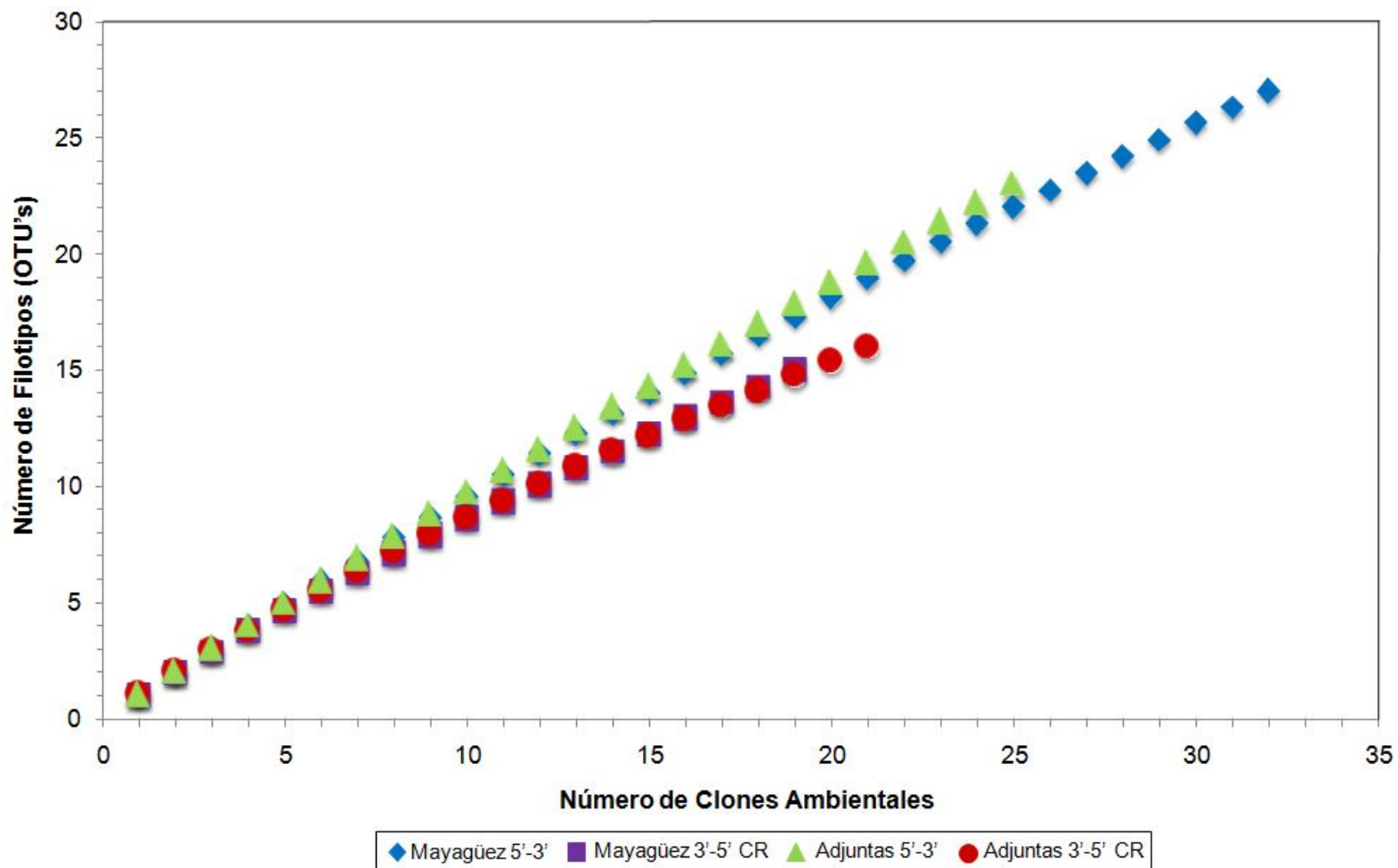
**OTU-** Unidad Taxonómica Operacional, **CR-** Complemento reverso

construir curvas de refracción (Figura 13). Los índices de diversidad de Shannon and Weaver (*H*) y el de Simpson (*1-D*) demostraron que la biblioteca genómica de Adjuntas reflejó una mayor diversidad de especies de bacterias en su biorreactor, en comparación con la relativamente baja diversidad identificada en la muestra de Mayagüez. De manera consistente, los índices de riqueza de especies Jaccard,  $S_{Chao\ 1}$  y  $S_{ACE}$  indican que la riqueza de especies bacterianas es mayor en las muestras de Adjuntas que en las de Mayagüez. Las curvas de refracción, que son utilizadas para comparar la riqueza de especies observadas en ambientes que han sido muestreados de forma desigual, demostraron que las bibliotecas genómicas de ambas plantas de tratamiento requieren una mayor cantidad de secuencias clonadas para poder alcanzar una tendencia continua en

la curva (Figura 13). Alcanzar una tendencia continua en la gráfica describiría adecuada y proporcionalmente la riqueza del ambiente muestreado.

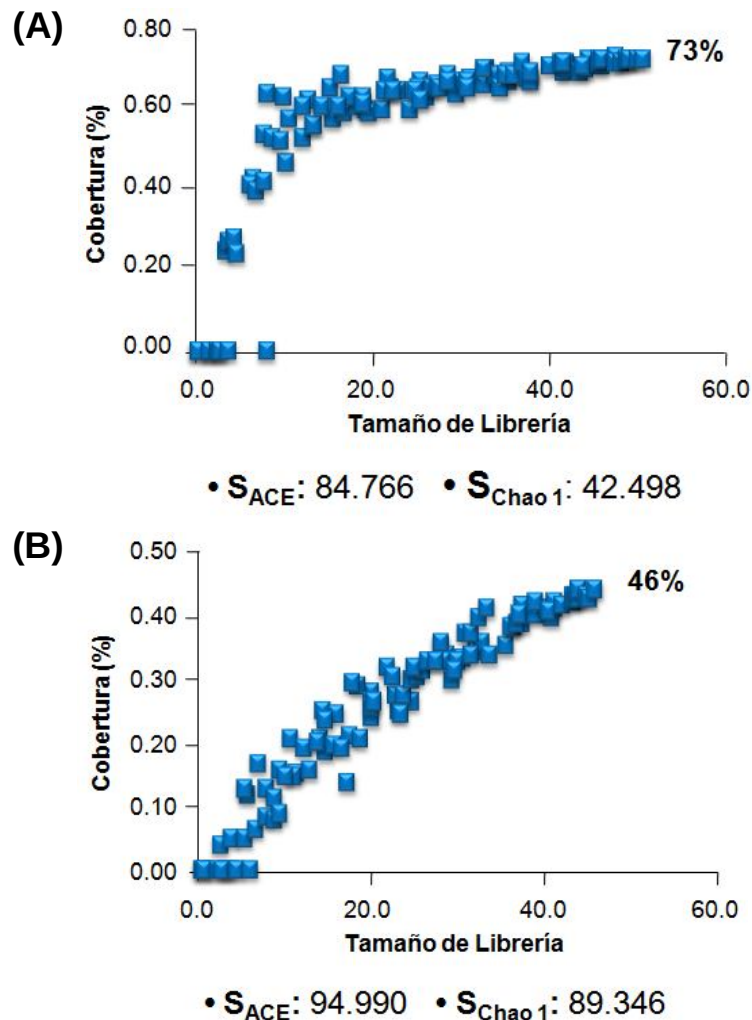
Para medir el grado de representatividad alcanzado entre las muestras y el ambiente real, se calculó el Índice de Buena Cobertura (GCI, por sus siglas en inglés) utilizando el algoritmo de ASLO para determinar tamaño de bibliotecas de clones (<http://www.aslo.org/lomethods/free/2004/0114a.html>). Para esto se utilizaron los valores de OTUs calculados con la herramienta de Classifier del RDP. De los resultados de ASLO se desprenden gráficas de cobertura y medidas de los índices de riqueza de especies:  $S_{Chao\ 1}$  y  $S_{ACE}$  (Figura 14). En los resultados del análisis se observa que, a pesar de que se necesitarían más secuencias de ambos reactores para obtener una cobertura más significativa, la biblioteca de clones de la planta de Mayagüez resultó ser más completa y representativa con un 73% de cobertura. La biblioteca de Adjuntas resultó estar muy por debajo de valores aceptables de cobertura (46%) lo que demuestra que indudablemente esta biblioteca requiere más secuencias para obtener una representación adecuada de la comunidad bacteriana. Los índices de riqueza sostienen esta idea ya que demuestran que, a pesar de que la biblioteca de Adjuntas posee menos secuencias, resulta ser más rica en especies que la biblioteca de Mayagüez.

Finalmente, para poder evaluar cuan significativas son las diferencias entre las bibliotecas genómicas de ambas plantas de tratamiento, se calcularon valores de  $p$  utilizando el programa WEB-LIBSHUFF (<http://libshuff.mib.uga.edu>).



**Figura 13.** Curvas de refracción de las bibliotecas de clones construídas de las muestras de los reactores aerobios de las plantas de Mayagüez y Adjuntas.

La siguiente fórmula:  $p = 1 - (1 - a)^{k(k-1)}$ , se utilizó para calcular el valor  $p$  estándar para dos bibliotecas. Se estableció un por ciento de confianza de  $p = 0.05$ , en donde  $k$  es el número de bibliotecas a ser comparadas. El valor de  $p$  estándar fue de  $p = 0.0253$ . Los valores  $p$  obtenidos del análisis estuvieron por debajo de  $p = 0.003$ , lo que revela diferencias significativas entre las bibliotecas clones del 16S rADN de ambas plantas de tratamiento ya que estos valores se encuentran por debajo del valor  $p$  mínimo esperado.



**Figura 14.** Análisis de cobertura de las bibliotecas de clones ambientales de las muestras de reactor aerobio de las plantas de tratamiento de Mayagüez (A) y Adjuntas (B).

### ***Análisis de restricción In-Silico de las bibliotecas genómicas ambientales***

Los resultados generales del análisis de restricción *In-Silico* de los genes secuenciados en la dirección 5'-3' para ambas bibliotecas de clones se presentan en las Tablas 7 y 8. Todos los fragmentos generados *In-Silico* fueron asociados a grupos filogenéticos descritos (Tablas 9 y 10) y todos, excepto uno, pudieron ser detectados en las fotos de electroforesis de t-RFLP (Figuras 15 y 16). Aquellos fragmentos en una misma biblioteca que diferían por más o menos una base de longitud fueron localizados en la foto de t-RFLP como un mismo fragmento terminal. Fragmentos mayores a 700 pb o menores a 50 pb no pudieron ser localizados en las fotos por estar fuera del rango de medida que provee el marcador de peso molecular. El fragmento de 117 pb correspondiente al clon MAYABIO-144 de la biblioteca genómica de Mayagüez fue la única secuencia de ambas bibliotecas que no pudo ser localizada en ninguno de los perfiles de t-RFLP obtenidos. Algunos fragmentos correspondieron proporcionalmente en su intensidad de fluorescencia con las frecuencias con que fueron detectados en las bibliotecas genómicas, como por ejemplo los fragmentos correspondientes a *Synechococcus* de la biblioteca genómica de Mayagüez en los perfiles de restricción de las 3 enzimas utilizadas.

**Tabla 7.** Restricción *In-Silico* de secuencias (orientación 5'-3') de clones ambientales obtenidas de la biblioteca genómica de la planta de tratamiento de Mayagüez. Las marcas diagonales (/) indican que no se encontraron cortes de la enzima correspondiente dentro de la secuencia parcial.

| Nombre de secuencia | Enzima de restricción- Peso molecular del fragmento terminal |              |              | <700 pb | % de identidad y filogenia     |
|---------------------|--------------------------------------------------------------|--------------|--------------|---------|--------------------------------|
|                     | <i>Hae</i> III                                               | <i>Rsa</i> I | <i>Msp</i> I |         |                                |
| MAYABIO 106         | 39                                                           | /            | /            | ✓       | 100% <i>Rhodobacteraceae</i>   |
| MAYABIO 113         | 291                                                          | 422          | 491          |         | 100% <i>Synechococcus</i>      |
| MAYABIO 121         | 39                                                           | 422          | 439          |         | 100% <i>Rhodobacteraceae</i>   |
| MAYABIO 128         | 381                                                          | 104          | 81           |         | 95% <i>Haliscomenobacter</i>   |
| MAYABIO 131         | 39                                                           | /            | 439          |         | 100% <i>Rhodobacteraceae</i>   |
| MAYABIO 136         | 39                                                           | /            | 439          | ✓       | 100% <i>Rhodobacteraceae</i>   |
| MAYABIO 139         | 381                                                          | 104          | 81           |         | 99% <i>Haliscomenobacter</i>   |
| MAYABIO 141         | 39                                                           | /            | 439          |         | 100% <i>Rhodobacteraceae</i>   |
| MAYABIO 142         | 39                                                           | /            | 130          |         | 100% <i>Rhodobacteraceae</i>   |
| MAYABIO 143         | 39                                                           | /            | 439          | ✓       | 100% <i>Rhodobacteraceae</i>   |
| MAYABIO 144         | 117                                                          | 25           | 150          |         | 80% <i>Alphaproteobacteria</i> |
| MAYABIO 147         | 39                                                           | /            | 439          |         | 100% <i>Rhodobacteraceae</i>   |
| MAYABIO 149         | 72                                                           | /            | 433          | ✓       | 92% <i>Gammaproteobacteria</i> |
| MAYABIO 150         | 39                                                           | /            | 439          | ✓       | 100% <i>Rhodobacteraceae</i>   |
| MAYABIO 151         | 207                                                          | 437          | 190          |         | 38% <i>Chloroflexi</i>         |
| MAYABIO 210         | 291                                                          | 422          | 491          |         | 100% <i>Synechococcus</i>      |
| MAYABIO 211         | 39                                                           | /            | 439          |         | 100% <i>Rhodobacteraceae</i>   |
| MAYABIO 215         | 39                                                           | /            | 130          |         | 100% <i>Rhodobacteraceae</i>   |
| MAYABIO 225         | 138                                                          | 421          | 490          |         | 100% <i>Synechococcus</i>      |
| MAYABIO 227         | 291                                                          | 422          | 491          |         | 100% <i>Synechococcus</i>      |
| MAYABIO 230         | 232                                                          | 99           | 167          |         | 100% <i>Actinomycetales</i>    |
| MAYABIO 232         | 39                                                           | 314          | 95           |         | 100% <i>Flavobacteriaceae</i>  |
| MAYABIO 236         | 291                                                          | 422          | 491          |         | 100% <i>Synechococcus</i>      |
| MAYABIO 238         | 227                                                          | 474          | 148          |         | 98% <i>Rubritalea</i>          |
| MAYABIO 240         | 291                                                          | 422          | 491          |         | 100% <i>Synechococcus</i>      |
| MAYABIO 246         | 291                                                          | 422          | 491          |         | 100% <i>Synechococcus</i>      |
| MAYABIO 250         | 228                                                          | 25           | 440          |         | 79% <i>Alphaproteobacteria</i> |
| MAYABIO 251         | 232                                                          | 459          | 167          |         | 100% <i>Actinomycetales</i>    |
| MAYABIO 252         | 180                                                          | 474          | 151          |         | 100% <i>Balneola</i>           |
| MAYABIO 253         | 291                                                          | 422          | 454          |         | 100% <i>Synechococcus</i>      |
| MAYABIO 259         | /                                                            | 314          | 93           |         | 100% <i>Flavobacteriaceae</i>  |
| MAYABIO 260         | 291                                                          | 422          | 491          |         | 100% <i>Synechococcus</i>      |



**Tabla 8.** Restricción *In-Silico* de secuencias (orientación 5'-3') de clones ambientales obtenidas de la biblioteca genómica de la planta de tratamiento de Adjuntas. Las marcas diagonales (/) indican que no se encontraron cortes de la enzima correspondiente dentro de la secuencia parcial.

| Nombre de Secuencia | Enzima de restricción- Peso molecular del fragmento terminal |              |              | <700 pb | % de identidad y filogenia     |
|---------------------|--------------------------------------------------------------|--------------|--------------|---------|--------------------------------|
|                     | <i>Hae</i> III                                               | <i>Rsa</i> I | <i>Msp</i> I |         |                                |
| ADJUBIO 112         | /                                                            | 314          | 93           |         | 98% <i>Flavobacteriaceae</i>   |
| ADJUBIO 120         | 67                                                           | 80           | 161          |         | 100% <i>Corynebacterineae</i>  |
| ADJUBIO 127         | 39                                                           | 45           | 541          |         | 93% <i>Flexibacteraceae</i>    |
| ADJUBIO 128         | 291                                                          | 422          | 491          |         | 100% <i>Synechococcus</i>      |
| ADJUBIO 136         | 186                                                          | 432          | 279          |         | 90% <i>Mycobacterium</i>       |
| ADJUBIO 201         | 39                                                           | 118          | 439          |         | 99% <i>Rhizobiales</i>         |
| ADJUBIO 23          | 226                                                          | 451          | 139          |         | 38% <i>Thermomicrobia</i>      |
| ADJUBIO 213         | 198                                                          | 427          | 139          |         | 98% <i>Comamonadaceae</i>      |
| ADJUBIO 216         | 227                                                          | 451          | 171          |         | 100% <i>Caldilinea</i>         |
| ADJUBIO 217         | 75                                                           | /            | 78           | ✓       | 100% <i>Polyangiaceae</i>      |
| ADJUBIO 221         | 39                                                           | 472          | 429          |         | 100% <i>Xanthomonadaceae</i>   |
| ADJUBIO 224         | 39                                                           | 312          | 132          |         | 100% <i>Bacteroidetes</i>      |
| ADJUBIO 226         | /                                                            | 110          | 538          | ✓       | 89% <i>Bacteroidetes</i>       |
| ADJUBIO 238         | /                                                            | 110          | 538          | ✓       | 96% <i>Bacteroidetes</i>       |
| ADJUBIO 247         | 325                                                          | 114          | 91           |         | 100% <i>Sphingobacteriales</i> |
| ADJUBIO 251         | 286                                                          | 313          | 93           |         | 100% <i>Bacteroidetes</i>      |
| ADJUBIO 255         | 67                                                           | 80           | 161          |         | 100% <i>Gordonia</i>           |
| ADJUBIO 259         | 217                                                          | 489          | 176          |         | 94% Candidate Division WS3     |
| ADJUBIO 301         | 39                                                           | 472          | 541          |         | 98% <i>Flexibacteraceae</i>    |
| ADJUBIO 302         | 200                                                          | 120          | 430          |         | 100% <i>Cupriavidus</i>        |
| ADJUBIO 303         | 75                                                           | 81           | 468          |         | 89% <i>Bdellovibrionales</i>   |
| ADJUBIO 305         | /                                                            | 110          | 538          | ✓       | 95% <i>Bacteroidetes</i>       |
| ADJUBIO 309         | 39                                                           | 312          | 207          |         | 98% <i>Bacteroidetes</i>       |
| ADJUBIO 315         | 198                                                          | 427          | 139          |         | 98% <i>Comamonadaceae</i>      |
| ADJUBIO 317         | 254                                                          | 450          | 161          |         | 84% Candidate Division OD1     |

**Tabla 9.** Fragmentos terminales de la biblioteca de clones de la planta de tratamiento de Mayagüez identificados en la electroforesis del t-RFLP. Aquellos fragmentos que diferían por una base de longitud se agruparon como un solo fragmento de restricción. Fragmentos menores a 50 pb no fueron señalados en la foto. El fragmento de 117 pb de *Hae* III no pudo ser localizado.

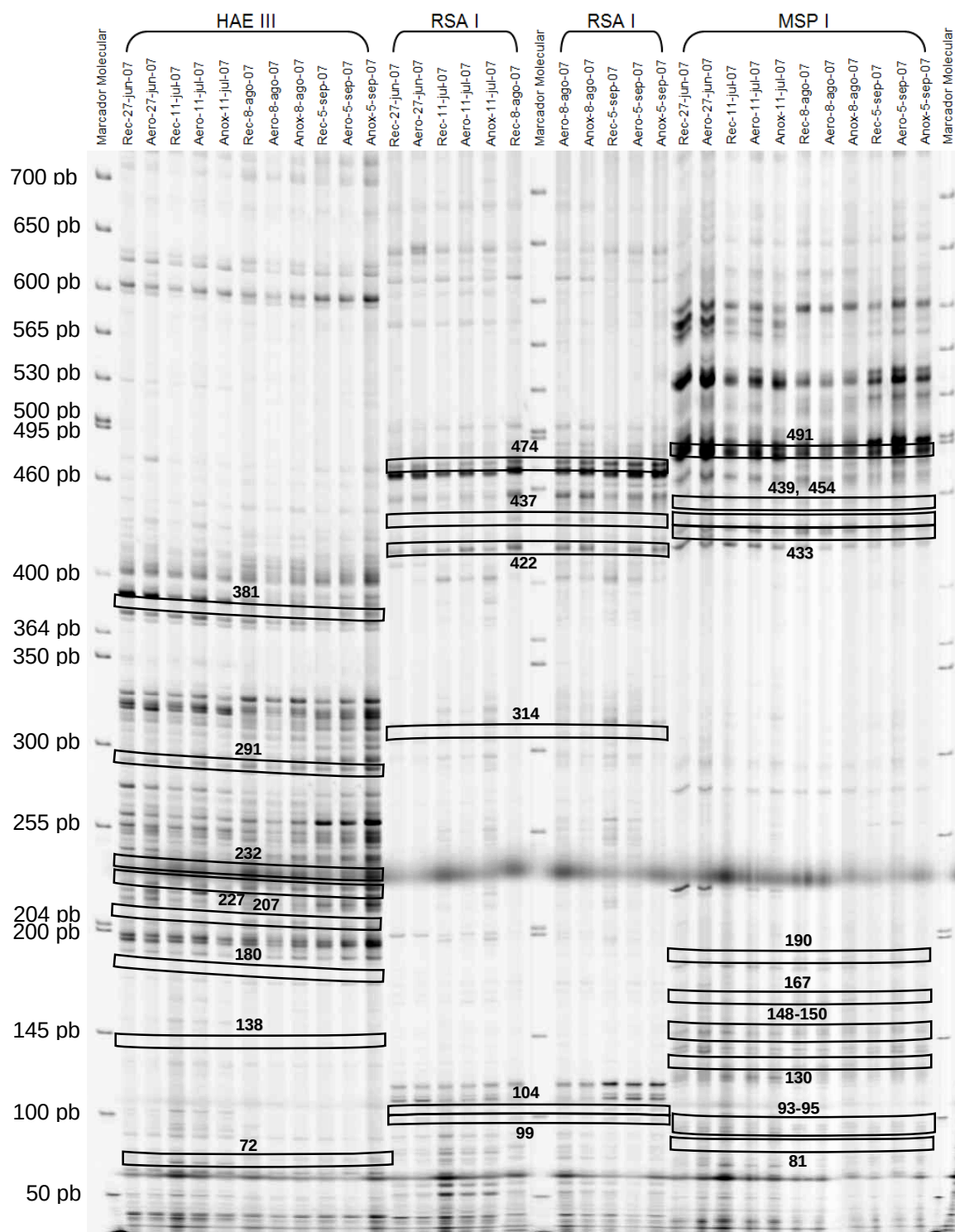
| <i>Hae</i> III |                                                      | <i>Rsa</i> I |                                                | <i>Msp</i> I |                                                    |
|----------------|------------------------------------------------------|--------------|------------------------------------------------|--------------|----------------------------------------------------|
| Tamaño         | Filo                                                 | Tamaño       | Filo                                           | Tamaño       | Filo                                               |
| 39             | <i>Alphaproteobacteria</i><br><i>Bacteroidetes</i>   | 25           | <i>Alphaproteobacteria</i>                     | 81           | <i>Bacteroidetes</i>                               |
| 72             | <i>Gammaproteobacteria</i>                           | 99           | <i>Actinobacteria</i>                          | 93           | <i>Bacteroidetes</i>                               |
| 117            | <i>Alphaproteobacteria</i>                           | 104          | <i>Bacteroidetes</i>                           | 95           | <i>Bacteroidetes</i>                               |
| 138            | <i>Cyanobacteria</i>                                 | 314          | <i>Bacteroidetes</i>                           | 130          | <i>Alphaproteobacteria</i>                         |
| 180            | <i>Bacteroidetes</i>                                 | 422          | <i>Cyanobacteria</i>                           | 148          | <i>Verrucomicrobia</i>                             |
| 207            | * <i>Chloroflexi</i>                                 | 437          | * <i>Chloroflexi</i>                           | 150          | <i>Alphaproteobacteria</i><br><i>Bacteroidetes</i> |
| 227            | <i>Alphaproteobacteria</i><br><i>Verrucomicrobia</i> | 474          | <i>Bacteroidetes</i><br><i>Verrucomicrobia</i> | 167          | <i>Actinobacteria</i>                              |
| 232            | <i>Actinobacteria</i>                                |              |                                                | 190          | * <i>Chloroflexi</i>                               |
| 291            | <i>Cyanobacteria</i>                                 |              |                                                | 433          | <i>Gammaproteobacteria</i>                         |
| 381            | <i>Bacteroidetes</i>                                 |              |                                                | 439          | <i>Alphaproteobacteria</i>                         |
|                |                                                      |              |                                                | 454          | <i>Cyanobacteria</i>                               |
|                |                                                      |              |                                                | 491          | <i>Cyanobacteria</i>                               |

\* Estos fragmentos poseen un % de identidad bajo (<80%) con este grupo filogenético.

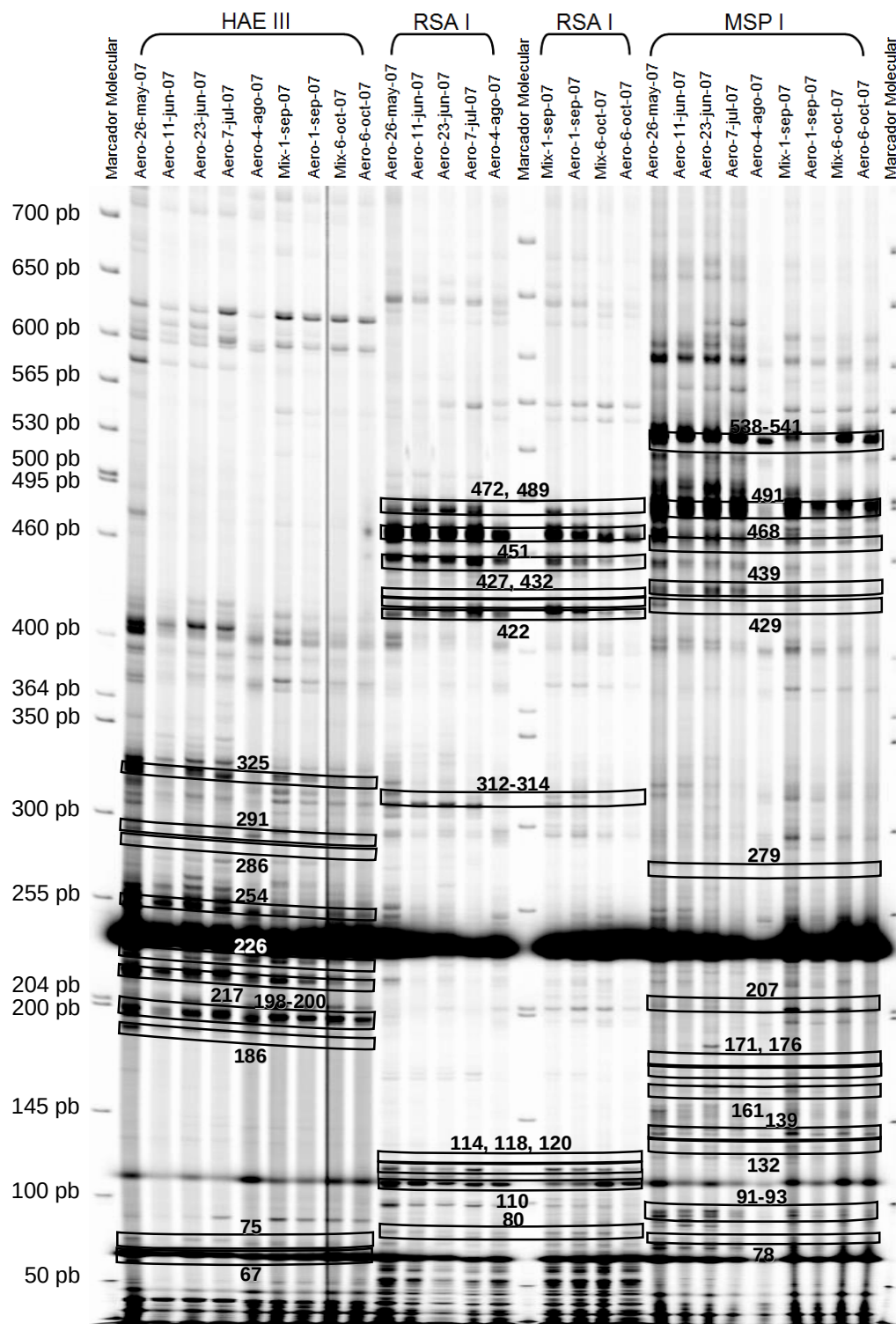
**Tabla 10.** Fragmentos terminales de la biblioteca de clones de la planta de tratamiento de Adjuntas identificados en la electroforesis del t-RFLP. Aquellos fragmentos que diferían por una base de longitud se agruparon como un solo fragmento de restricción. Fragmentos menores a 50 pb no fueron señalados en la foto.

| <i>Hae</i> III |                                                                                  | <i>Rsa</i> I |                                                                                                         | <i>Msp</i> I |                                                                                  |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Tamaño         | Filo                                                                             | Tamaño       | Filo                                                                                                    | Tamaño       | Filo                                                                             |
| 39             | <i>Alphaproteobacteria</i><br><i>Bacteroidetes</i><br><i>Gammaproteobacteria</i> | 45           | <i>Bacteroidetes</i>                                                                                    | 78           | <i>Deltaproteobacteria</i>                                                       |
| 67             | <i>Actinobacteria</i>                                                            | 80           | <i>Actinobacteria</i><br><i>Deltaproteobacteria</i>                                                     | 91           | <i>Bacteroidetes</i>                                                             |
| 75             | <i>Deltaproteobacteria</i>                                                       | 110          | <i>Bacteroidetes</i>                                                                                    | 93           | <i>Bacteroidetes</i>                                                             |
| 186            | <i>Actinobacteria</i>                                                            | 114          | <i>Bacteroidetes</i>                                                                                    | 132          | <i>Bacteroidetes</i>                                                             |
| 198            | <i>Betaproteobacteria</i>                                                        | 118          | <i>Alphaproteobacteria</i>                                                                              | 139          | <i>Betaproteobacteria</i><br>* <i>Thermomicrobia</i><br><i>Actinobacteria</i>    |
| 200            | <i>Betaproteobacteria</i>                                                        | 120          | <i>Betaproteobacteria</i>                                                                               | 161          | <i>Candidate Division</i><br><i>OD1</i>                                          |
| 217            | <i>Candidate Division WS3</i>                                                    | 312          | <i>Bacteroidetes</i>                                                                                    | 171          | <i>Chloroflexi</i>                                                               |
| 226            | <i>Chloroflexi</i><br>* <i>Thermomicrobia</i>                                    | 314          | <i>Bacteroidetes</i>                                                                                    | 176          | <i>Candidate Division</i><br><i>WS3</i>                                          |
| 254            | <i>Candidate Division OD1</i>                                                    | 422          | <i>Cyanobacteria</i>                                                                                    | 207          | <i>Bacteroidetes</i>                                                             |
| 286            | <i>Bacteroidetes</i>                                                             | 427          | <i>Betaproteobacteria</i>                                                                               | 279          | <i>Actinobacteria</i><br><i>Betaproteobacteria</i><br><i>Gammaproteobacteria</i> |
| 291            | <i>Cyanobacteria</i>                                                             | 432          | <i>Actinobacteria</i><br><i>Chloroflexi</i><br><i>Candidate Division OD1</i><br>* <i>Thermomicrobia</i> | 429          |                                                                                  |
| 325            | <i>Bacteroidetes</i>                                                             | 451          | <i>Bacteroidetes</i><br><i>Gammaproteobacteria</i>                                                      | 439          | <i>Alphaproteobacteria</i>                                                       |
|                |                                                                                  | 472          |                                                                                                         | 468          | <i>Deltaproteobacteria</i>                                                       |
|                |                                                                                  | 489          | <i>Candidate Division WS3</i>                                                                           | 491          | <i>Cyanobacteria</i>                                                             |
|                |                                                                                  |              |                                                                                                         | 538          | <i>Bacteroidetes</i>                                                             |
|                |                                                                                  |              |                                                                                                         | 541          | <i>Bacteroidetes</i>                                                             |

\* Estos fragmentos poseen un % de identidad bajo (<80%) con este grupo filogenético.



**Figura 15.** Electroforesis de t-RFLP de las muestras de las etapas anóxica y aerobia del biorreactor y del recirculado de la planta de tratamiento de Mayagüez. Los recuadros encierran las bandas correspondientes a los pesos moleculares identificados en la restricción *In-Silico* de los clones ambientales.



**Figura 16.** Electroforesis de t-RFLP de las muestras de la etapa aerobia del biorreactor y del licor mezclado de la planta de tratamiento de Adjuntas. Los recuadros encierran las bandas correspondientes a los pesos moleculares identificados en la restricción *In-Silico* de los clones ambientales.

## **Efecto de factores ambientales y operacionales en las comunidades bacterianas**

### ***Parámetros ambientales y operacionales***

La composición de la comunidad bacteriana en los biorreactores de lodos activados está generalmente influenciada por factores ambientales y operacionales que de alguna forma afectan las actividades metabólicas de las distintas poblaciones. Conocer los factores que tienen mayor influencia en la estabilidad de las comunidades bacterianas en un sistema de tratamiento puede ayudar a desarrollar mejores técnicas de manejo y sistemas más eficientes. Con el objetivo de identificar aquellos factores que afectan en un mayor grado la estructura de las comunidades bacterianas, aproximadamente 26 parámetros operacionales y condiciones ambientales fueron observados.

Los parámetros operacionales variaron en la forma en que fueron colectados y la fuente de información de la cual provenían los datos. Algunos datos correspondían a parámetros medidos diariamente en el laboratorio de la planta de tratamiento, otros se midieron en nuestro laboratorio el mismo día del muestreo y los restantes fueron provistos por los laboratorios centrales de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados.

La mayoría de los parámetros seleccionados se analizaron utilizando herramientas estadísticas multivariadas. Algunos parámetros se manejaron de manera independiente por arrojar información importante que podría destacar

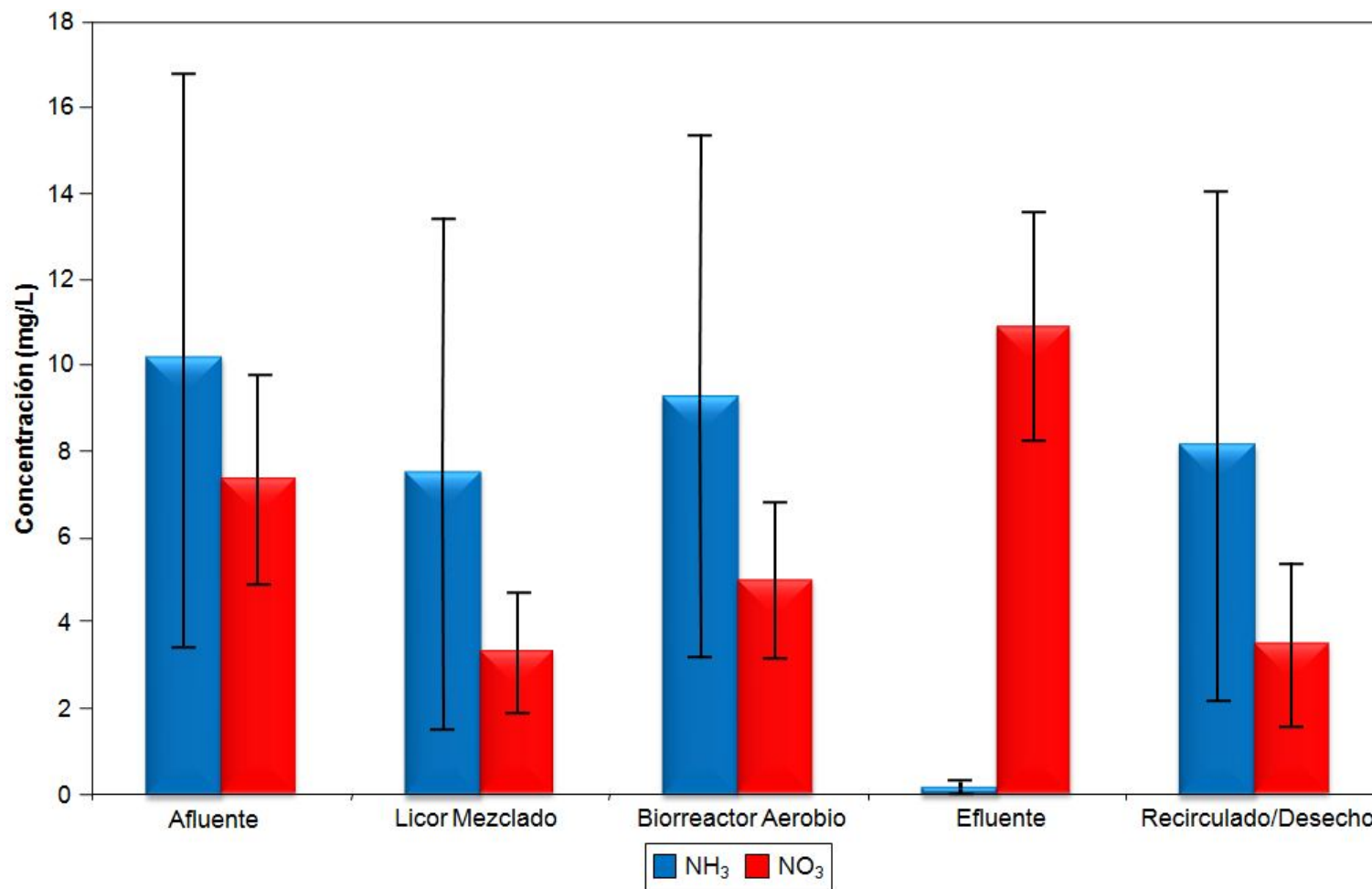
aspectos fundamentales de la dinámica bacteriana que ocurre en los reactores de ambas plantas de tratamiento. Dos de estos parámetros fueron las concentraciones de amoníaco y nitrato a través del sistema de tratamiento (Figura 17). En esta figura se ilustra cómo las concentraciones de estos nutrientes cambia en el sistema de tratamiento de la planta de Mayagüez desde el afluente hasta el efluente. En el diagrama se puede apreciar que las concentraciones de amoníaco disminuyen significativamente en el efluente de la planta en comparación con las concentraciones que llegan al sistema. En algunas ocasiones la unidad de tratamiento alcanza casi un 100% de eficiencia en el proceso de remoción de amoníaco. Esto generalmente se considera como una alta eficiencia del sistema en la remoción de nitrógeno en el biorreactor. Sin embargo, la gráfica también demuestra que las concentraciones de nitrato, que puede ser una forma oxidada de amoníaco, aumentan significativamente en el efluente de la planta. En muchas ocasiones estas concentraciones sobrepasan los límites establecidos por la Ley Federal de Aguas Limpias para las concentraciones de nitrato en descargas de agua tratadas. Esto puede demostrar que la eficiencia de remoción de compuestos nitrogenados en el reactor es sobrestimada porque las concentraciones finales de nitrato aumentan con respecto a las concentraciones del afluente, produciendo estas sales contaminantes altamente solubles. Los resultados para la planta de Adjuntas de estos mismos parámetros son consistentes con los resultados de Mayagüez, pero no se ilustran por falta de réplicas en los resultados de amoníaco y nitrato

del afluente y efluente de la planta que solo fueron medidos durante el último muestreo.

Otros parámetros considerados de forma independiente incluyen la remoción de Demanda Biológica de Oxígeno (BOD) y de los Sólidos Suspendidos Totales (TSS). Estos parámetros representan principalmente la eficiencia de las comunidades microbianas en los reactores removiendo materia orgánica e inorgánica en el agua del afluente. En la figura 18 se presenta la remoción de BOD comparando ambas plantas de tratamiento. En general, se puede observar que la comunidad de Mayagüez es más consistente en la remoción de materia orgánica, manteniendo generalmente una remoción de 98%. Por el otro lado la comunidad de Adjuntas demuestra ser mucho menos consistente removiendo BOD, con valores promedios mensuales tan bajos como 89%. A pesar de que ambas plantas cumplen con los límites establecidos por ley para descarga de BOD, estas observaciones demuestran diferencias en la eficiencia de las estructuras comunitarias dominantes a través del tiempo.

Los resultados de remoción de TSS (Figura 19) son consistentes con los de remoción de BOD, ya que se observa claramente que la eficiencia de remoción en la planta de Mayagüez es más alta y constante que en la planta de Adjuntas. Estos resultados podrían ser también un reflejo de la estabilidad en la estructura bacteriana en los reactores ya que comunidades bacterianas inestables pueden propiciar una disminución en la capacidad de sedimentación de los lodos en el clarificador secundario. Una pobre sedimentación de los lodos



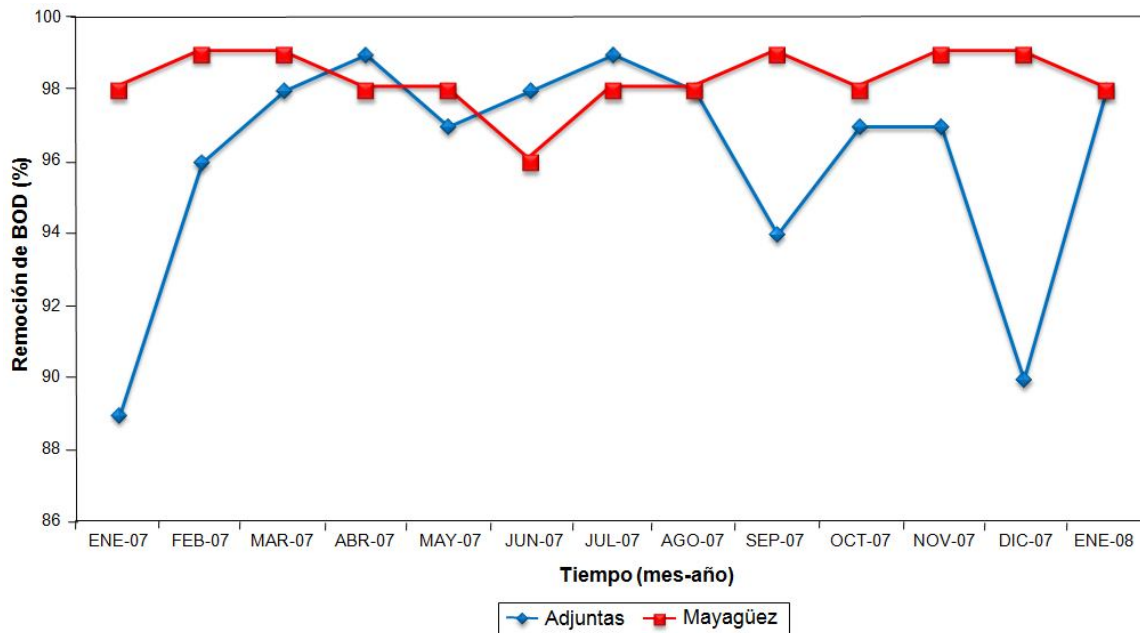


**Figura 17.** Promedios de las concentraciones de amoníaco y nitrato medidos en muestras de las distintas etapas de tratamiento de la planta de Mayagüez.

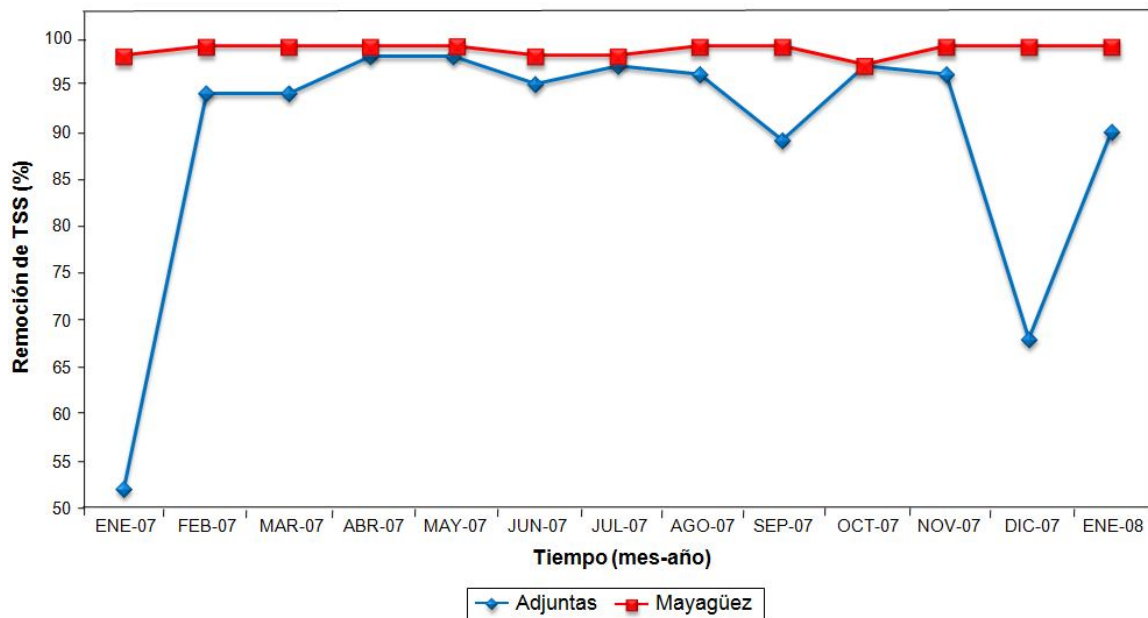
en el clarificador secundario aumenta las concentraciones de TSS en el efluente. Las concentraciones del BOD en las plantas de tratamiento muestran un patrón distintivo para la unidad de Adjuntas (Figura 20). Las concentraciones de BOD del efluente y del afluente parecen ser inversamente proporcionales la mayoría del tiempo. Esto sugiere que cuando las concentraciones de materia orgánica son mayores en el afluente la eficiencia de la comunidad en la remoción de materia orgánica en el reactor parece aumentar. Este patrón no se puede observar cuando se comparan los mismos parámetros para la planta de Mayagüez. Aquí la remoción de materia orgánica en el reactor parece ser más constante sin ser influenciada significativamente por las concentraciones de materia orgánica que llegan al sistema de tratamiento.

### ***Análisis Canónico de Correspondencia (CCA)***

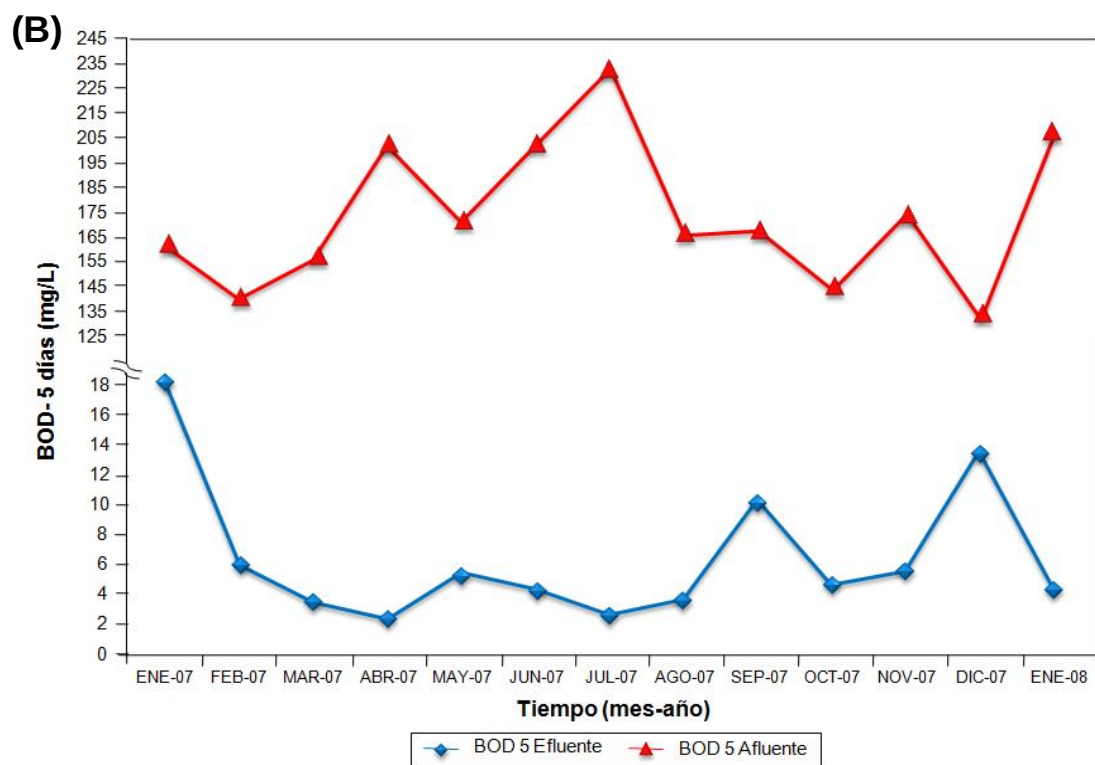
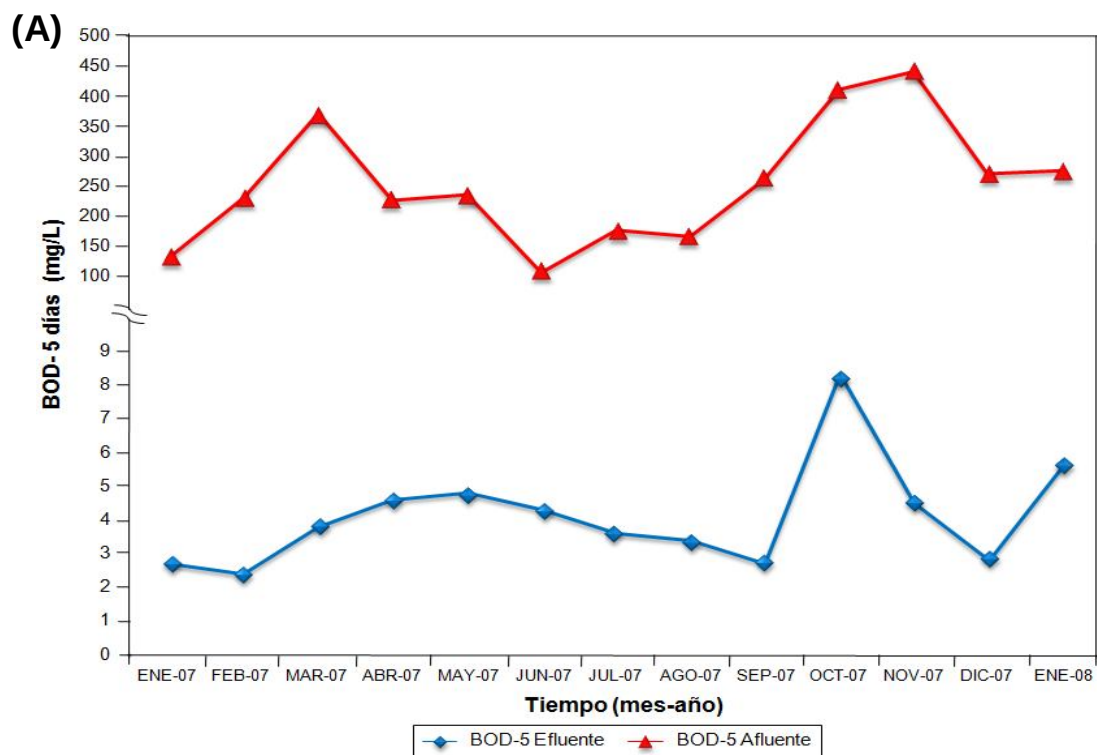
Para poder hacer una estimación adecuada del efecto que tenían los múltiples parámetros operacionales medidos en cada planta sobre las comunidades bacterianas en los reactores, se seleccionó una herramienta estadística multivariada que estima el efecto de todos los parámetros al mismo tiempo sobre las comunidades estudiadas por medio de t-RFLP. De esta forma se establecen cuáles parámetros tiene más influencia sobre los cambios poblacionales que se observan en los perfiles de fragmentos terminales. Estos complejos gradientes se estudiaron utilizando la técnica de Análisis Canónico de



**Figura 18.** Comparación de la remoción de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (BOD) en las plantas de tratamiento de Mayagüez y Adjuntas



**Figura 19.** Comparación de la remoción de los Sólidos Suspendidos Totales (TSS) en las plantas de tratamiento de Mayagüez y Adjuntas



**Figura 20.** Concentraciones de la Demanda Biológica de Oxígeno medidas por el método de 5 días en el efluente y el afluente de las plantas de tratamiento de Mayagüez (A) y de Adjuntas (B).

Correspondencia (CCA). Las gráficas de CCA para las dos plantas de tratamiento se realizaron utilizando los parámetros medidos mensualmente independientemente de los que se midieron los mismos días del muestreo. En los diagramas solo se incluyeron los valores correspondientes a cambios temporales en las comunidades y los vectores de los parámetros operacionales. Los valores resultantes de la ordenación correspondiente a las poblaciones individuales fueron obviados del análisis. Solo se presentan los dos primeros ejes de ordenación de cada diagrama por ser generalmente los más informativos.

Para la planta de Mayagüez se compararon un total de 23 parámetros ambientales con las comunidades en los distintos meses de muestreo. Estos se separaron en un grupo de 14 parámetros medidos o calculados con las medidas tomadas los mismos días en que se tomaron las muestras y otro grupo de 9 parámetros que incluye los parámetros obtenidos durante los meses de muestreo. Para las gráficas de CCA generadas se descartaron las variables biológicas correspondientes a las comunidades del reactor de Mayagüez para los meses de enero y febrero del 2007. Esto se debe a que en las gráficas en que se incluyen estos dos meses de muestreo se genera un efecto de arco entre las variables que no propicia una estimación adecuada del efecto de los parámetros ambientales sobre el resto de las comunidades. Cuando un efecto de arco es observado en una gráfica de CCA, es ampliamente recomendado que las variables que estén provocándolo sean eliminadas del análisis (Armitage *et al.*, 2004; ter Braak y Smilauer, 1998; Zuur *et al.* 2007) (ver Apéndice 3)

Para la planta de Adjuntas se utilizaron un total de 18 parámetros ambientales y operacionales para generar las gráficas de CCA. Estos se separaron en un grupo de 4 parámetros correspondientes a medidas hechas los mismos días del muestreo y otro grupo de 14 parámetros correspondientes a medidas realizadas durante los meses del muestreo.

En la figura 21 se observan los parámetros de medición diaria en comparación con las comunidades detectadas por los perfiles de t-RFLP en el reactor de la planta de Mayagüez a través de los últimos 11 meses de muestreo. Los dos ejes de ordenación presentados ilustran significativamente el 32% de las variaciones en las comunidades influenciadas por los parámetros incluidos en el análisis. Como se aprecia en el diagrama la mayoría de las comunidades ilustradas se agrupan a la derecha del segundo eje. Las restantes 4 comunidades correspondientes a los primeros 4 meses incluidos en el análisis se localizaron en los cuadrantes 1 y 4 a la izquierda de del segundo eje de ordenación. La posición de las muestras con respecto a los vectores puede reflejar relaciones positivas si una línea perpendicular al vector trasada desde la muestra lo interseca en algún punto, o pueden reflejar relaciones negativas si esta línea perpendicular no interseca el vector. Mientras más cercanas se encuentran las muestras al vector y mayor sea el largo del vector, más fuertes serán las correlaciones entre cambios en la comunidad bacteriana de esa muestra y el parámetro que ese vector representa. Cada eje representa un por ciento del total de la variación que se observa en la distribución de las muestras,

mientras menor sea el ángulo formado entre el vector uno de los ejes, mayor influencia tiene ese vector sobre los cambios que ese eje particular representa.

Se observa que los vectores de Sólidos Suspendidos Totales (TSS-E, por sus siglas en inglés) y Demanda Química de Oxígeno (COD-E, por sus siglas en inglés) en el efluente, que pueden ser un reflejo de la eficiencia de las comunidades en el reactor, se relacionan fuerte y negativamente a la mayoría de las muestras a través de los meses de muestreo incluidos. También en su mayoría se observan relaciones negativas con los vectores correspondientes a los parámetros de Proporción de Alimento y Microorganismos (F/M, por sus siglas en inglés), pH, COD del afluente y bacterias desnitrificadoras contabilizadas por el Número Más Probable (MPN). La mayoría de la comunidades mostraron relaciones positivas con los vectores de concentraciones de nutrientes ( $\text{PO}_4$  y  $\text{NO}_3$ ), Tiempo de Retención de Sólidos (SRT, por sus siglas en inglés), Sólidos Suspendidos en el Licor Mezclado (MLSS y MLVSS, por sus siglas en inglés) y la Tasa de Alimentación (Feed-Rate). Todos estos últimos parámetros están asociados a las condiciones predominantes dentro del reactor al momento del muestreo. La mayoría de los parámetros incluidos en el diagrama presentan relaciones más fuertes con los cambios representados por el primer eje de ordenación. En cuanto a la materia orgánica e inorgánica que llega a la planta de tratamiento por el afluente, los TSS no aparentan tener tanta importancia como las concentraciones de COD. Este último muestras relaciones fuertemente positivas con el F/M. También se destaca la relación negativa que se observa entre las concentraciones de

bacterias desnitrificadoras en el reactor y las concentraciones de nitrato, y la relación fuertemente positiva entre este nutriente y el SRT. Los parámetros que aparentan tener una mayor influencia sobre la estabilidad de las comunidades bacterianas son el pH, el SRT, el F/M y las concentraciones de materia orgánica que llegan a la planta y están disponibles en el reactor.

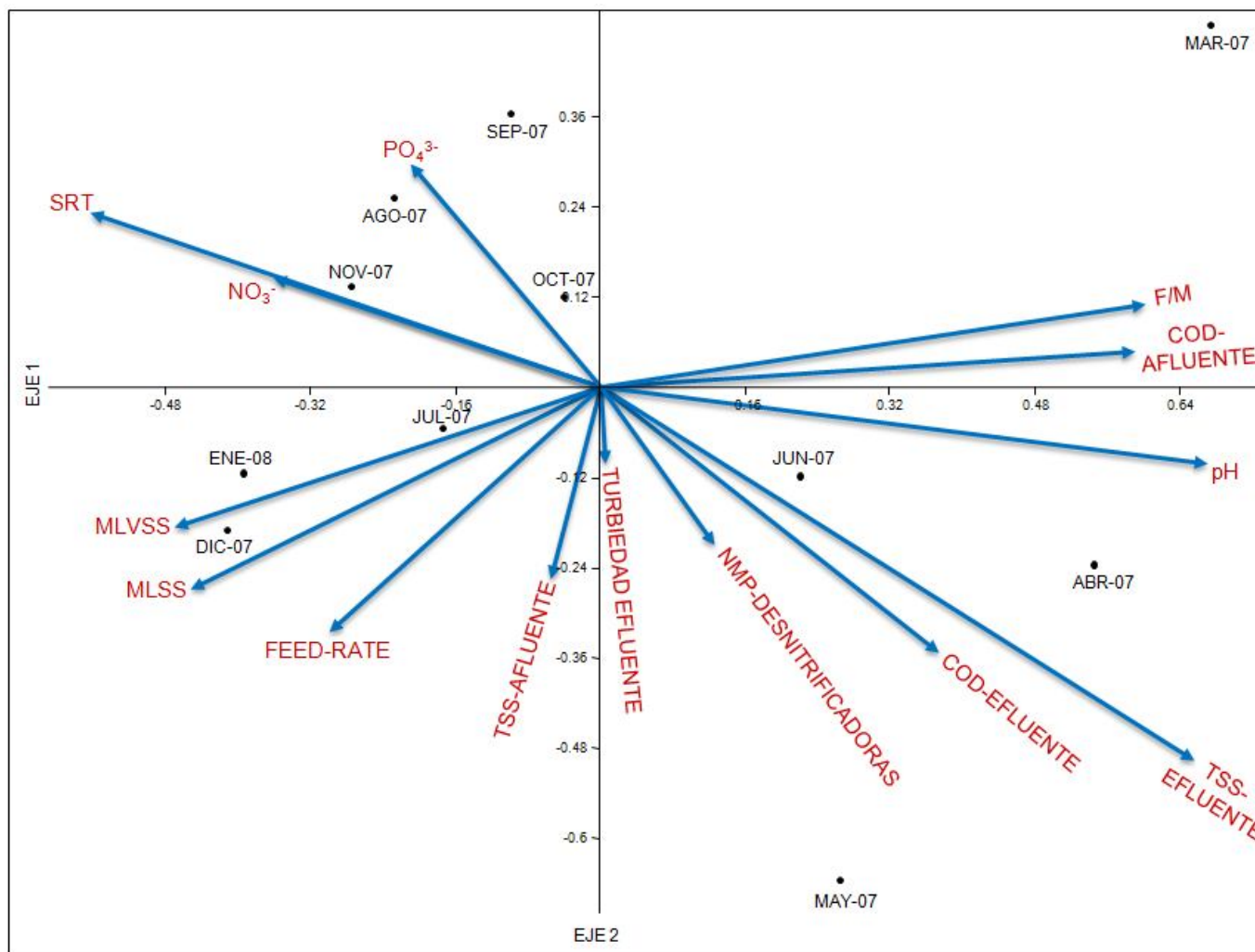
En la segunda gráfica de CCA se observan los parámetros medidos mensualmente en comparación con las comunidades detectadas por los perfiles de t-RFLP en el reactor de la planta de Mayagüez a través de los últimos 11 meses de muestreo (Figura 22). Los dos ejes de ordenación presentados ilustran significativamente el 38% de las variaciones en las comunidades influenciadas por los parámetros incluidos en el análisis. Como se aprecia en el diagrama la mayoría de las comunidades de bacterias ilustradas se agrupan a la derecha del segundo eje. Al igual que en la gráfica anterior, las restantes 4 comunidades correspondientes a los primeros 4 meses incluidos en el análisis se localizaron en los dos cuadrantes opuestos, a la izquierda del segundo eje de ordenación.

Se observa que la mayoría de las comunidades bacterianas localizadas en el diagrama se relacionan positivamente a los parámetros de Temperatura (°C), flujo de afluente y las concentraciones de mercurio, coliformes totales y BOD en el afluente. También se muestran relaciones fuertes pero negativas de la mayoría de las muestras con el Tiempo de Retención Hidráulica (HRT, por sus siglas en inglés) y las concentraciones de Surfactantes Totales. Las concentraciones de Nitrógeno total por el método de Kjeldahl (TKN), a pesar de

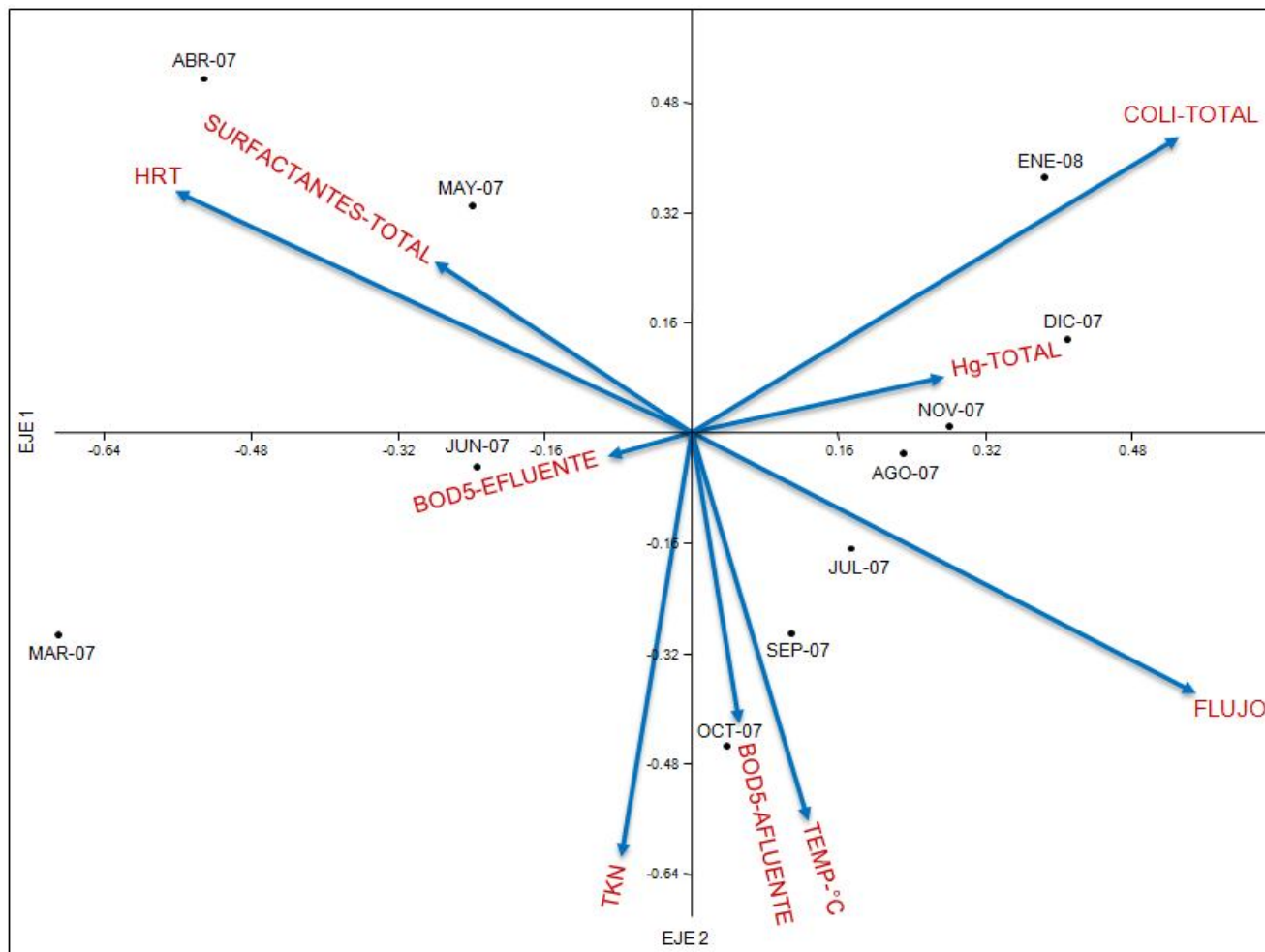


que aparentar tener una fuerte influencia sobre las fluctuaciones de bacterias en el reactor, no se puede asociar a una mayoría de las muestras. Casi un 50% de las muestras se relacionan a este positivamente y el otro 50% se relacionan negativamente. El BOD del efluente aparenta ser el parámetro menos significativo en ilustrar fluctuaciones en la comunidad de bacteria. Los factores que aparentan tener una mayor influencia sobre las comunidades de bacteria son el HRT y el flujo asociado principalmente a los cambios representados por el primer eje de ordenación, y el TKN y la temperatura asociados principalmente a los cambios ilustrados por el segundo eje de ordenación. Un aspecto destacado es la fuerte relación inversamente proporcional entre el HRT y el flujo de agua en el afluente.

En la tercera y cuarta gráfica de CCA se observan los parámetros medidos los mismos días de muestreo y mensualmente respectivamente en comparación con las comunidades detectadas por los perfiles de t-RFLP en el reactor de la planta de Adjuntas a través de todos los 13 meses de muestreo (Figuras 23 y 24). Los dos ejes de ordenación presentados en la primera figura ilustran significativamente el 76% de las variaciones en las comunidades influenciadas por los parámetros incluidos en el análisis y los dos ejes de la segunda gráfica ilustran significativamente el 32% de las variaciones. Como se aprecia en el diagrama que ilustra los parámetros tomados los mismos días del muestreo, la mayoría de las comunidades de bacterias se agrupan en la parte superior del primer eje de ordenación. Por otro lado, las comunidades de



**Figura 21.** Análisis Canónico de Correspondencia en dos dimensiones mostrando la relación entre los parámetros ambientales y operacionales colectados o calculados los mismos días del muestreo en comparación con las comunidades bacterianas correspondientes a los primeros 11 meses de muestreo en la planta de Mayagüez, estimadas a partir de los perfiles de t-RFLP.



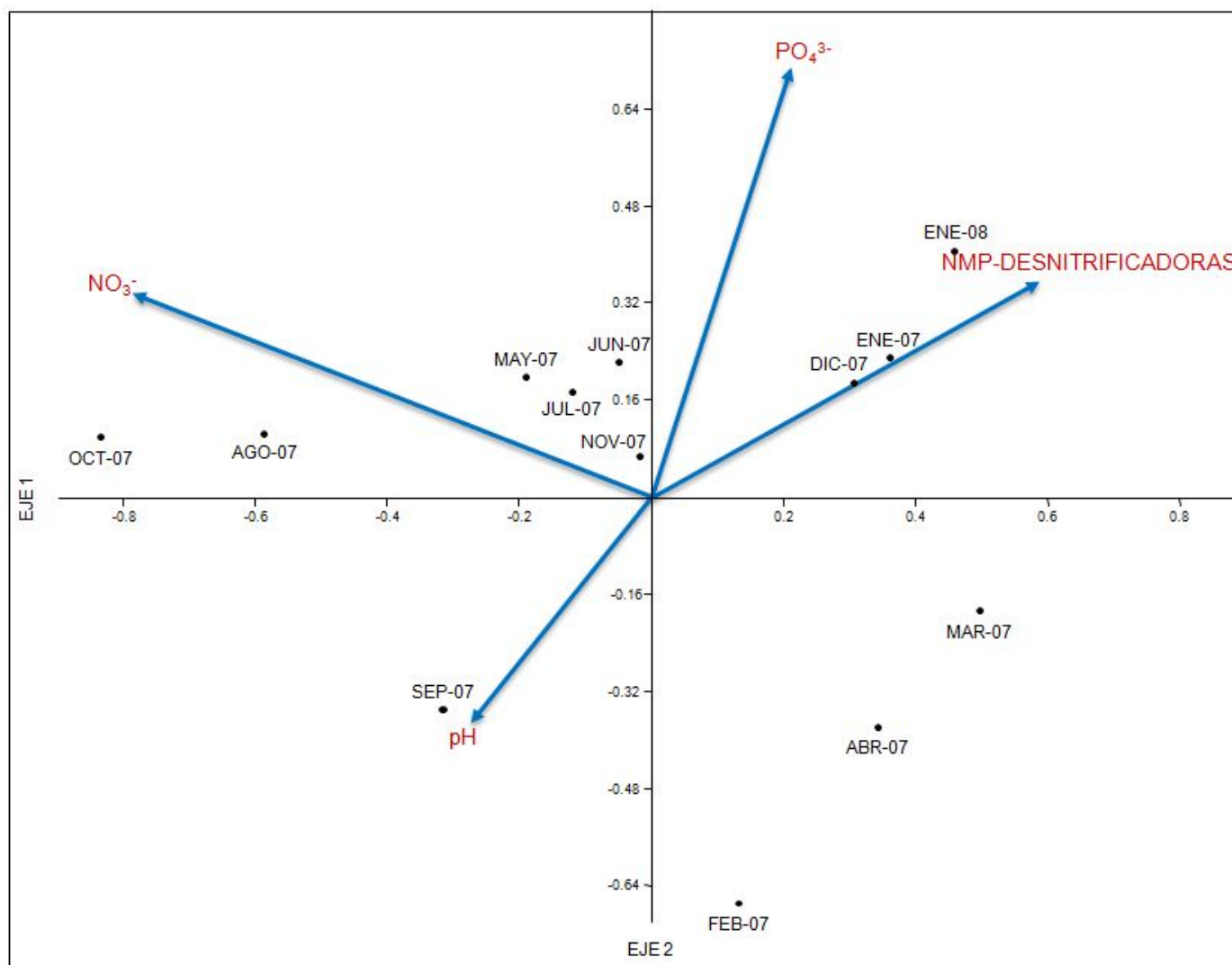
**Figura 22.** Análisis Canónico de Correspondencia en dos dimensiones mostrando la relación entre los parámetros ambientales y operacionales colectados o calculados durante los meses de muestreo en comparación con las comunidades bacterianas correspondientes a los primeros 11 meses de muestreo en la planta de Mayagüez, estimadas a partir de los perfiles de t-RFLP.

bacterias graficadas junto a los parámetros tomados mensualmente se distribuyen casi equitativamente entre los cuatro cuadrantes del plano de ordenación.

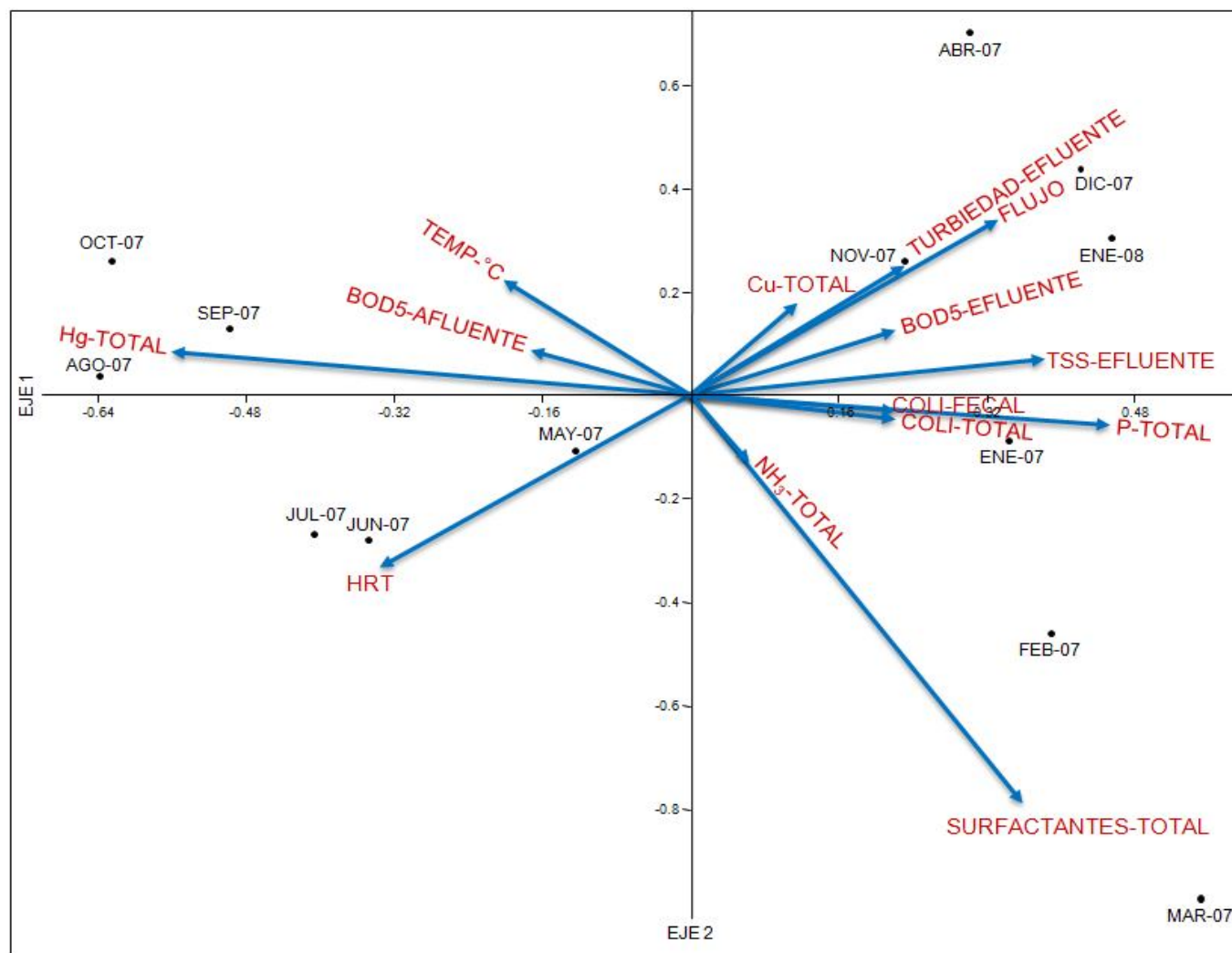
En la primera de las gráficas de CCA de la planta de tratamiento de Adjuntas (Figura 23) se observan 4 parámetros medidos el mismo día del muestro con respecto a las comunidades bacterianas. Se observa claramente que la mayoría de las comunidades a través del tiempo de muestro muestran relaciones positivas con las concentraciones de nutrientes ( $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4^-$ ) y las concentraciones de bacterias desnitrificadoras. De forma muy similar a los resultados obtenidos para las comunidades de la planta de Mayagüez, las concentraciones nutrientes muestran relaciones positivas mientras que el pH muestra relaciones negativas con la mayoría de las muestras en el diagrama. Sin embargo, a diferencia de los resultados de Mayagüez, en los resultados de la planta de Adjuntas las concentraciones de nutrientes parecen tener más importancia explicando las fluctuaciones en las comunidades bacterianas que las medidas de pH. También de forma consistente con los resultados obtenidos en la planta de Mayagüez, las concentraciones de nitrato muestran relaciones negativas con las concentraciones de bacterias desnitrificadoras en el reactor, estimadas por el método del Número Más Probable.

En la segunda gráfica de CCA para la planta de tratamiento de Adjuntas (Figura 24) se graficaron las comunidades de bacterias en relación a los parámetros medidos mensualmente provistos por los laboratorios centrales de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados. En este diagrama lo primero que se

observa es que la gran mayoría de los parámetros graficados muestran influencias fuertes sobre los cambios representados por el primer eje de ordenación. Los patrones de asociación entre la mayoría de las comunidades bacterianas y los parámetros operacionales y ambientales no son tan evidentes como en las gráficas anteriores. Sin embargo, de análisis se desprenden algunos aspectos importantes. Se puede observar que, al igual que en la planta Mayagüez, el HRT posee relaciones fuertes negativas con la mayoría de las comunidades y se localiza inversamente proporcional al flujo del afluente. Se observa que parámetros como las concentraciones de Mercurio total (T-Hg) y surfactantes totales que están determinadas por las concentraciones de estos compuestos que llegan a través del afluente, tienen una significancia mayor que estos mismos parámetros en la planta de tratamiento de Mayagüez. En contraste, parámetros como la temperatura, el BOD del afluente y las concentraciones de coliformes aparentan tener una menor significancia ilustrando las fluctuaciones poblacionales que ambos ejes de ordenación representan. Otros parámetros que parecen tener una relación importante con las fluctuaciones en las comunidades bacterianas en el reactor de tratamiento son las concentraciones de sólidos suspendidos totales y fósforo total en el efluente.



**Figura 23.** Análisis Canónico de Correspondencia en dos dimensiones mostrando la relación entre los parámetros ambientales y operacionales colectados los mismos días del muestreo en comparación con las comunidades bacterianas correspondientes a los 13 meses de muestreo en la planta de Adjuntas, estimadas a partir de los perfiles de t-RFLP.



**Figura 24.** Análisis Canónico de Correspondencia en dos dimensiones mostrando la relación entre los parámetros ambientales y operacionales colectados o calculados durante los meses de muestreo en comparación con las comunidades bacterianas correspondientes a los 13 meses de muestreo en la planta de Adjuntas, estimadas a partir de los perfiles de t-RFLP.

## DISCUSIÓN

Los sistemas de tratamiento secundario o biológico, han sido manejados históricamente como diseños de ingeniería sin tomar necesariamente en consideración la complejidad biológica y la dinámica de las poblaciones microbianas que están interactuando en el reactor de tratamiento. Más aun, el poco conocimiento que se tiene sobre la estructura de las comunidades bacterianas que componen estos llamados “lodos”, ha sido extrapolado desde el lugar de estudio al resto del mundo como criterios de diseño y operación. Estos estudios en zonas templadas extrapolan principios derivados en un lugar a, por ejemplo, zonas tropicales asumiendo que grupos similares de microorganismos son los protagonistas en todo sistema ignorando variaciones geográficas, climáticas y culturales, entre otras. Clásicamente los diseños de ingeniería se han centrado en la hipótesis de Lourens Bass-Becking (Bass-Becking, 1934) que plantea que todos los microorganismos están en todas partes y que es el ambiente el que selecciona, o que viajan por todo el mundo y proliferan en cualquier lugar en donde encuentre condiciones ambientales adecuadas (Whitfield, 2005). Esta manera de pensar crea una imagen de las comunidades microbianas en estas plantas de tratamiento donde el mismo rango limitado de microorganismos es determinadamente seleccionados del ambiente para tratar las aguas usadas en todos los lugares y en todo momento (Curtis *et al.*, 2003)

Esta investigación se realizó con el propósito de entender mejor la estructura de estas comunidades bacterianas en el trópico, considerando



cambios temporales, en la escala de operación y la zona geográfica. Para lograr los objetivos de la investigación se utilizaron métodos moleculares independientes de cultivo y se recolectaron datos de parámetros operacionales químicos, físicos y biológicos. Los datos obtenidos propiciaron el que estos resultados fueran evaluados por medio de herramientas estadísticas multivariadas para así establecer relaciones entre parámetros biológicos de la comunidad con factores operacionales.

Utilizar métodos independientes de cultivo como las herramientas principales para desarrollar esta investigación facilitó el que se recolectara una gran cantidad de datos referentes a la estructura de las comunidades bacterianas en las dos plantas de tratamiento analizadas, creando así un retrato más claro y completo de la composición y dinámica bacteriana en estos ambientes particulares. Durante los últimos 15 años la aplicación de herramientas moleculares en el estudio microbiológico de las aguas usadas ha revolucionado la forma las ideas que se tenían sobre la ecología microbiana de estos sistemas (Wagner *et al.*, 2002). Sin embargo, muchos estudios de alguna u otra forma han podido crear estereotipos de las poblaciones bacterianas que pueden dominar en estos sistemas de tratamiento.

Estudios dependientes de cultivo claramente han subestimado la gran diversidad de microorganismos que habitan e interactúan en los biorreactores de tratamiento. En quizás unos de los primeros esfuerzos dirigidos a descifrar la fauna microbiana de los sistemas de lodos activados, Días y Bhat (1964-1965) publicaron una serie de artículos referentes a la diversidad de microorganismos

dominantes en dichos sistemas. Sus estudios dependientes de cultivo determinaron que el 80% de la comunidad bacteriana que formaba estos llamados “lodos” eran bacterias pertenecientes a la subdivisión  $\beta$  de las *Proteobacteria*, y clasificaron todas las bacterias aisladas dentro de este 80% en solo dos familias: *Commamonadaceae* y *Rhodocyclaceae*. Estos resultados evidentemente subestiman la alta diversidad bacteriana que domina en estos sistemas y que ha podido ser estudiada de forma más completa por medios independientes de cultivo. Resultados presentados durante el congreso anual 107mo de la Sociedad Americana para la Microbiología (Well *et al.*, 2007), señalan que en muestras de lodos activados de una planta de tratamiento analizada en el estado de California se detectaron un promedio de 1,606 filotipos distintos de procariotas en muestreos mensuales por medio de técnicas de microarreglos de ADN. Inclusive, los investigadores pudieron detectar más de 2,000 filotipos en uno de los muestreos.

Sin embargo, el hecho de que un estudio en particular se haya realizado por medio de técnicas independientes de cultivo, a pesar de ser más confiable, no garantiza que los resultados obtenidos en términos de la diversidad bacteriana puedan ser extrapolados automáticamente a cualquier otra planta de tratamiento distinta de la que fue sujeto de la investigación. Snaidr *et al.* (1997) realizaron un análisis de la diversidad de bacterias mediante técnicas independientes de cultivo en una planta de tratamiento de lodos activados. Ellos encontraron que más del 50% de las bacterias que pudieron ser identificadas pertenecían al grupo de las *Betaproteobacteria*. Los demás grupos identificados

en las muestras se dividieron de la siguiente forma: 19% *Gammaproteobacteria*, 12% *Epsilonproteobacteria*, 5% *Alphaproteobacteria*, 7% Gram-positivos de bajo contenido G+C, 1% *Clamidia* y 1% *Planctomycetos*. Vale la pena destacar que este estudio se realizó en la ciudad de Munich, Alemania, un ambiente templado en donde las temperaturas promedio anuales rondan los 10°C (Weatherbase, 2009). Las diferencias en temperatura promedio entre los lugares de estudio pudiese ser un factor muy importante en determinar un patrón biogeográfico en la comunidad bacteriana. Estudios en otras partes del mundo han revelado resultados que varían de un lugar a otro. Un estudio también independiente de cultivo fue realizado en Japón por Yamaguchi *et al.* (1999). Estos encontraron que la comunidad de bacterias en una planta de tratamiento de lodos activados estaba dominada por bacterias del grupo de las *Flavobacteria*, las cuales no fueron detectadas en el estudio de Alemania; mientras que un estudio en Australia (Bond *et al.*, 1994) reveló que las poblaciones dominantes en una planta local pertenecían en su mayoría a las *Betaproteobacteria* y Gram-positivos de alto contenido G+C.

En contraste con los resultados de las investigaciones antes presentadas, se puede señalar que los resultados obtenidos de nuestro estudio en las 2 plantas de tratamiento en Puerto Rico fueron significativamente distintos. Los resultados de las bibliotecas genómicas ambientales de ambas plantas de tratamiento revelan que bacterias clasificadas bajo el grupo de las *Proteobacteria* son en ambos casos las más dominantes. Sin embargo a diferencias de los estudios presentados anteriormente a modo de comparación,

en las dos plantas estudiadas, bacterias pertenecientes al grupo de las *Alphaproteobacteria* fueron las más dominantes (Figura 8). Interesantemente, el grupo de las *Betaproteobacteria* que aparece como dominante en muchos otros estudios de la ecología de los lodos activados (Lee *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1993; Snaidr *et al.* 1997; Días y Bhat, 1964), no pudo ser detectado en la muestra de la planta de Mayagüez seleccionada para construir la biblioteca de clones. A pesar de que las bibliotecas de clones construídas para ambas plantas de tratamiento estudiadas no alcanzaron un nivel adecuado de cobertura (Figuras 13 y 14), se puede argumentar que bacterias pertenecientes al grupo de las *Betaproteobacteria* en la planta de tratamiento de Mayagüez no eran suficientemente dominantes como para ser detectadas entre los clones que se seleccionaran al azar para secuenciar. A pesar de que este grupo en particular no fue detectado y ha sido descrito como de suma importancia en estos sistemas, como antes presentado, la planta de Mayagüez resultó ser la más estable en la eficiencia del tratamiento a través de todo el tiempo de muestreo (Figuras 18 y 19). Esto puede sustentar el planteamiento de que los datos extrapolados de estudios realizados en otras partes del mundo no deben ser considerados como una regla general para describir la comunidad dominante de bacterias en todas las plantas de tratamiento.

En comparación con otros estudios (Wagner y Loy, 2002; Wagner *et al.*, 2002; Eschenhagen *et al.*, 2003) en donde las *Proteobacteria* suelen ser por mucho las más dominantes, ambas plantas de tratamiento se caracterizaron por la presencia relativamente alta de bacterias de los grupos de los *Bacteroidetes*,

las *Actinobacteria* y las *Cyanobacteria*. Particularmente el grupo de las *Cyanobacteria* resultó ser relativamente común en ambas plantas de tratamiento, con la peculiaridad de que todos los clones seleccionados se relacionaron solo a un grupo: los *Synechococcus*. Este grupo de *Cyanobacteria* es muy común en zonas oceánicas tropicales, ya que prefieren temperaturas cálidas, y suelen dominar en ambientes ricos en nutrientes. Se cree que este es quizás el grupo de organismos más abundante en el mundo (Scalan y West, 2002). Sin embargo una revisión extensa de la literatura disponible revela que este es quizás el primer reporte de este grupo de bacterias en biorreactores de lodos activados. Las bibliotecas de clones de ambas plantas de tratamiento también se caracterizaron o diferenciaron de otros estudios publicados (Wagner y Loy, 2002; Wagner et. al., 2002) por la ausencia de secuencias relacionadas a los *Firmicutes* y a las *Epsilonproteobacteria*. Otros grupos detectados entre las secuencias de las bibliotecas de clones de esta investigación, como *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria* y *Planctomyces*, han sido reportados esporádicamente en los estudios antes citados.

Entre los clones secuenciados de la planta de tratamiento de Adjuntas se destacan clones perteneciente a divisiones recientemente descritas de bacterias que aun no han podido ser aisladas (Dojka et al., 1998; Harris et al., 2004). Estas son secuencias relacionadas a los llamados grupos candidatos OD1 y WS3 clasificadas bajo el dominio *Bacteria*. Al igual que en el caso de los *Synechococcus*, este parece ser el primer reporte de estos grupos en biorreactores de lodos activados a gran escala. Los hallazgos más cercanos a la

detección de estos grupos en lodos activados corresponden a una investigación en donde detectaron ambos grupos en un digestor anaerobio de una planta de tratamiento de aguas usadas (Chouari *et al.*, 2005) y una investigación que detectó la presencia del grupo OP11 en un biorreactor a escala de laboratorio (Dabert *et al.*, 2001). Al momento de esa publicación el grupo OD1 se encontraba englobado dentro de este grupo putativo OP11 hasta que fueron separados en publicaciones posteriores (Harris *et al.*, 2004).

A pesar que la cobertura de las bibliotecas de clones ambientales obtenidas de ambas plantas de tratamiento, especialmente los resultados de planta de tratamiento de Adjuntas (46% de cobertura), podrían no ser adecuadas para una caracterización significativa de la diversidad de bacterias en los biorreactores aerobios, a grandes rasgos se puede observar que estas plantas poseen patrones característicos que las diferencian entre ellas y de otras plantas estudiadas (Wagner y Loy, 2002; Wagner *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1993; Snaidr *et al.* 1997; Días y Bhat, 1964; Eschenhagen *et al.*, 2003). Esta puede ser la primera evidencia encontrada en el presente estudio que demuestra que comunidades de bacterias en distintas plantas de lodos activados, separadas geográficamente, pueden poseer estructuras distintas y patrones característicos en cuanto a las poblaciones dominantes que podrían corresponder a factores ambientales, geográficos y hasta culturales. Si esto se observó a pequeña escala, dos plantas de tratamiento en una misma isla, podríamos esperar que a mayor escala (ej. distintos países) las diferencias sean mayores. Aun así, no hay evidencia que demuestre que estas diferencias en las

estructura de las comunidades de bacterias puedan tener un efecto adverso en la eficiencia del tratamiento biológico. Es posible que las comunidades en cada lugar específico evolucionen hasta establecerse una comunidad óptima para tratar las aguas del afluente por la selección de poblaciones con la capacidad de manejar la composición química particular de esas aguas bajo las presiones ambientales particulares de su ubicación geográfica.

Aunque en el pasado se han realizado esfuerzos significativos por entender la composición de las comunidades microbianas que dominan en estos biorreactores de lodos activados, es importante destacar que la mayoría de estos estudios se han realizado utilizando biorreactores a escala de laboratorio (Wagner y Loy, 2002). La ventaja de poder estudiar el sistema de tratamiento a largo plazo sin salir del laboratorio y la facilidad de poder controlar factores ambientales y operacionales y observar sus efectos en las comunidades de bacterias podrían ser los factores más importantes para que se hayan preferido estos sistemas en dichas investigaciones. En otros estudios los investigadores han procurado controlar las condiciones ambientales durante el manejo de los sistemas e inclusive se han corrido los experimentos utilizando agua de afluente e inóculos de biorreactores de plantas de tratamiento a escala completa (Dabert et al., 2001; Padayachee et al., 2006). Sin embargo, por otra parte se ha demostrado que en los reactores a escala de laboratorio, que se corrieron en réplicas y bajo condiciones controladas semejantes a las sistemas reales, las comunidades de bacterias y su estructura no fueron reproducibles y tendían a divergir a través del tiempo (Saikaly et al., 2005; Boon et al., 2000; Eichner et al.,

1999; Forney *et al.*, 2001; Kaewpipat y Grady, 2002). Estos resultados concuerdan en que las comunidades de bacterias en estos reactores a escala de laboratorio son altamente dinámicas y continuamente fluctuantes, en comparación con plantas de tratamiento a escala completa que no presentan esta dinámica, o al menos no tan marcada.

Posibles explicaciones a estas diferencias tan marcadas entre la estructura de las comunidades microbianas en los reactores replicados a escala de laboratorio y los reactores a escala completa son ofrecidas por Kaewpipat y Grady (2002) y Curtis *et al.* (2003). Kaewpipat y Grady afirman que la estructura de las comunidades bacterianas en sistemas de tratamiento a escala de laboratorio podría demostrar características de sistemas caóticos y eso podría corresponder a distintos factores bióticos y abióticos, como competencia por los recursos, tasas altas de depredación o a perturbaciones ambientales relacionadas a nuevas condiciones de operación (tiempos de retención de sólidos e hidráulicos, proporción de microorganismos y alimento, etc.) que sean distintas a las condiciones presentes en los biorreactores a mayor escala y que creen nuevas presiones selectivas sobre la comunidad bacteriana. Curtis y sus colaboradores también atribuyen las diferencias en la estructura de las comunidades bacterianas de reactores replicados a escala de laboratorio a la presencia de dinámicas caóticas entre las poblaciones bacterianas y que estas dinámicas no están presentes o son imperceptibles en plantas de tratamiento a gran escala. Ellos argumentan que estas diferencias en sistemas de tratamiento de distintas escalas podrían explicarse por el modelo de equilibrio de las islas



biogeográficas (MacArthur y Wilson, 1967) que predice que las islas grandes tienden a poseer una mayor diversidad y una estructura comunitaria más estable.

En nuestro estudio trabajamos analizando la estructura de las comunidades de bacterias utilizando solo plantas de tratamiento a escala completa para tener una imagen más clara de la dinámica bacteriana real en estos sistemas. Estudiamos estas teorías sobre las fluctuaciones en las comunidades bacterianas mediante la comparación de plantas de tratamiento con distintas capacidades (Mayagüez: 28 MGD; Adjuntas: 0.6 MGD) sin alterar de ninguna forma las condiciones ambientales u operacionales. Decidimos determinar si la teoría de las Islas Biogeográficas (MacArthur y Wilson, 1967) podía ser aplicada a estos sistemas de tratamiento de aguas residuales considerando cada reactor de tratamiento como una isla independiente. Los cambios en las comunidades bacterianas en tiempo y espacio fueron estudiados utilizando la técnica molecular de t-RFLP y analizados mediante una combinación de herramientas estadísticas multivariadas para poder considerar significativamente la gran cantidad de datos generados.

El primer método estadístico utilizado fue el de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS). La aplicación de este método a estudios de ecología de comunidades fue demostrada en detalle por Clarke (1993), y posteriormente su aplicación en el análisis de resultados t-RFLP (Schütte *et al.*, 2008; Rees *et al.* 2004; Culman *et al.*, 2008; Bennette *et al.*, 2008) y otros métodos moleculares (Ramette, 2007) ha sido ampliamente documentada. En

una gráfica de NMDS la distancia entre los puntos que se observan representa una distancia relativa entre las muestras basado en el nivel de similitud. Comunidades más similares aparecerán representadas como puntos más cercanos entre ellos y muestras más distintas aparecen como puntos más distantes. Este método lo utilizamos para comparar los resultados del análisis de las poblaciones bacterianas a través del tiempo y el espacio mediante el método molecular metagenómico de t-RFLP. Para el análisis de NMDS las muestras colectadas en cada planta a través de los 13 meses de muestreo fueron representadas como puntos en la gráfica correspondientes a las comunidades microbianas y la distancia entre ellas se basó en las diferencias entre las poblaciones particulares que componían cada comunidad. Las diferencias entre las comunidades se basaron principalmente en la presencia o ausencia y la abundancia relativa de las poblaciones que las componían y cuyas matrices fueron calculadas con la medida de distancia de Bray-Curtis (Bray y Curtis, 1957).

El análisis de NMDS muestra la distribución de las comunidades microbianas en la planta regional de tratamiento de Mayagüez y las compara con las muestras de la planta municipal de tratamiento de Adjuntas durante los trece meses de muestreo (Figura 5). Del análisis se pueden desprender tres aspectos muy importantes: (i) la comunidad bacteriana en el reactor de la planta de Mayagüez resulta ser más estable (menos fluctuante) que la comunidad en la planta de Adjuntas, (ii) cada planta posee una estructura comunitaria particular que podría corresponder a patrones biogeográficos distintivos y (iii) la estructura

de la comunidad dominante en el reactor de Mayagüez parece cambiar hacia una comunidad relativamente más estable en los últimos meses de muestreo en comparación con los primeros tres o cuatro meses.

En la gráfica la separación que se observa entre las comunidades de Adjuntas de un mes a otro es más marcada que las comunidades de Mayagüez. Esto demuestra que la comunidad que predomina en la planta de Adjuntas es más fluctuante que aquella que domina en el sistema de Mayagüez. Estas variaciones observadas en las comunidades de las dos plantas se pueden comprobar con los resultados de un Análisis de Similitud (ANOSIM) (Tabla 2), con el cual se determinó que las diferencias entre las comunidades de una planta y la otra son estadísticamente significativas. Los resultados de ANOSIM comparando las muestras de Adjuntas entre ellas ( $R = 0.7587$ ) en comparación con los resultados de Mayagüez ( $R = 0.5690$ ) demuestran claramente que las muestras de Adjuntas varían mucho más entre ellas que las de Mayagüez.

Estas fluctuaciones en la planta de Adjuntas podrían estar ligadas al tamaño de la misma y sustentado por la teoría de las Islas Biogeográficas (MacArthur y Wilson, 1967). Esta teoría establece que las comunidades en islas más pequeñas son más susceptibles a los cambios propiciados por factores externos o ambientales debido a que son sistemas insulares expuestos. Por ejemplo una población invasora podría tener un efecto mayor compitiendo con las poblaciones dominantes en la planta de Adjuntas por poseer un menor volumen o espacio. En proporción el reactor de Adjuntas maneja en promedio aproximadamente once veces menos volumen de agua por día (400,000

galones) que la unidad de tratamiento de Mayagüez (5,000,000 galones). Curtis *et al.* (2003) explican que esta teoría predice que en los biorreactores la composición de las especies cambiará a través del tiempo y que el número de especies alcanzará un equilibrio cuando la invasión de nuevas especies esté balanceada por la extinción de previas especies dominantes. Aparentemente en las islas a medida que aumentan en tamaño, las curvas de extinción se estabilizan y tienden a tener una mayor estabilidad comunitaria y diversidad. Las islas pequeñas tenderán a poseer mayores tasas de extinción y por tanto tasas de sucesión de especies más rápidas, lo que resultará en mayor variabilidad y menor estabilidad en las comunidades microbianas y los procesos que dependan de ellas.

Así también podríamos considerar que estas diferencias en la estabilidad relativa de las comunidades que componen la estructura biológica de estas plantas a través del tiempo se podrían reflejar en la eficiencia de cada una en el proceso de remoción de materia orgánica en el afluente. Se podría pensar que las fluctuaciones en las poblaciones que componen cada comunidad redunden en fluctuaciones en la eficiencia del tratamiento. Está documentado que la diversidad y composición de la comunidad microbiana en un ecosistema, como los biorreactores, esta positivamente relacionada a la estabilidad y desempeño del mismo (Curtis *et al.*, 2003; Naeem y Li, 1997; Tilman, 1999), ya sea porque esta diversidad en presencia de un disturbio provee resistencia a cambios o tasas rápidas de recuperación (Saikaly *et al.*, 2005). Aunque vale la pena recalcar que se ha probado que la estabilidad de la comunidad esta mas

correlacionada a una adecuada funcionalidad del sistema que a un aumento en la diversidad de poblaciones (Briones y Raskin, 2003). Con la evidencia de estas publicaciones, podríamos argumentar y predecir que en la planta de Adjuntas, donde las poblaciones cambian relativamente más que las que componen las comunidades de Mayagüez, el proceso de tratamiento del agua residual y la remoción de materia orgánica disuelta sea menos eficientes.

Esta hipótesis se puede sustentar si observamos los resultados de remoción de la Demanda Biológica de Oxígeno (BOD) y de los Sólidos Suspendidos Totales (TSS) (Figura 18 y 19). Durante los 13 meses de muestreo, en promedio la planta de tratamiento de Mayagüez presentó una eficiencia de remoción de BOD de 98% versus la planta de Adjuntas que presentó un 96%. Igualmente, para la eficiencia de remoción de TSS la planta de tratamiento de Mayagüez presentó un 99% y la de Adjuntas solo un 89%. Es importante observar en las graficas, no solamente los por cientos de remoción, pero también las fluctuaciones en las curvas. Estos parámetros se utilizan como una medida indirecta de la eficiencia en el proceso de tratamiento de la comunidad microbiana dominante. El BOD representa la materia orgánica disuelta que llega hasta el reactor desde el afluente y que sirve de alimento para las poblaciones que habitan el reactor. Estas poblaciones utilizan esta materia orgánica tanto como fuente de carbono para biosíntesis y como sustrato para generar moléculas energéticas. Los TSS reflejan mayormente la capacidad de sedimentación de los “lodos”. Un sistema de tratamiento que está funcionando de forma adecuada y eficiente no propicia la dominancia de microorganismos

filamentosos (Ramothokang *et al.*, 2006). Cuando estos organismos comienzan a dominar, la eficiencia del tratamiento disminuye porque los lodos que llegan al clarificador secundario no se sedimentan adecuadamente y esos sólidos suspendidos alcanzan el efluente (Jenkins *et al.*, 2003). Cuando observamos las figuras comparativas de los por cientos de remoción de ambos parámetros en las dos plantas de tratamiento, se puede apreciar en ambas que la eficiencia de la planta de Mayagüez es consistentemente más estable y, en su mayoría, mayor a la planta de Adjuntas.

Otra información importante que se desprende del NMDS es concerniente a la distribución temporal de las comunidades en cada planta. En la gráfica (Figura 6) se puede apreciar que las muestras de Mayagüez agrupan aparte de las muestras de Adjuntas lo que significa que cada planta posee una estructura comunitaria particular correspondiente a un patrón biogeográfico distintivo. Sin embargo el resultado de ANOSIM al comparar ambas plantas de tratamiento ( $R=0.4518$ ) demuestra diferencias marcadas entre las comunidades de cada planta con solapamiento en la composición de las poblaciones. Este solapamiento resulta principalmente de las muestras correspondientes a los meses de enero y febrero de 2007 de la planta de Mayagüez. Las poblaciones que dominaban en estos dos meses de muestreo en el reactor se observan distantes del resto de las poblaciones dominantes durante los meses siguientes hasta el final del muestreo. Las flechas que señalan la dirección de cambio de las comunidades de Mayagüez se mueven en dirección a una comunidad más estable que domina principalmente en los últimos 8 meses de muestreo. Así

podríamos considerar que las poblaciones que dominan en estos dos primeros meses de muestreo no son representativas de la comunidad “óptima” de la planta. Según datos provistos por el laboratorio de la planta de Mayagüez, el Reactor II evaluado en este trabajo comenzó a operar en el mismo mes de enero del 2007 cuando se tomaron las primeras muestras. Con esta información podríamos ligar la distancia marcada de las muestras de enero y febrero de 2007 al poco tiempo que llevaba operando la unidad de tratamiento. Un estudio anterior documentó que las poblaciones dominantes en un sistema de tratamiento que acaba de comenzar a operar fueron cambiando hasta que se estableció una comunidad estable y eficiente que continuo dominando hasta el final del estudio (Knight *et al.*, 1995). Por lo tanto, podríamos argumentar que los cambios de la comunidad recién establecida en el reactor corresponden a un proceso de maduración en donde la comunidad cambia progresivamente en dirección a una estructura comunitaria más eficiente que se mantiene relativamente estable durante el resto del año.

Si consideramos que estas dos primeras muestras de Mayagüez no son representativas de la comunidad dominante y repetimos el NMDS, obtenemos un panorama distinto (Figura 7). Las comunidades de cada planta agrupan totalmente aisladas y el resultado de ANOSIM ( $R= 0.5119$ ) sustenta que el solapamiento no es significativo. Eliminando estas muestras del análisis no pretendemos manipular los datos, sino argumentar que si el estudio desde un principio no hubiese considerado estas dos muestras y en cambio se hubiese extendido hasta marzo del 2008, el solapamiento nunca hubiese sido evidente.

Con este resultado en donde se establecen diferencias estadísticamente significativas, podemos sustentar la hipótesis de que las comunidades de cada planta corresponden a patrones geográficos particulares y ligados a lugar donde se encuentran. Las condiciones ambientales que dominan en cada lugar y las características del afluente, que es un reflejo de los hábitos de la comunidad humana que lo genera y las condiciones del terreno impactado por el agua de escorrentía, podrían ser los factores principales en hacer que las bacterias dominantes o su abundancia entre plantas sean distintas. Este resultado también ayuda a sustentar la aplicación de la teoría de las Islas Biogeográficas a los reactores de lodos activados ya que la composición y diversidad de las poblaciones que dominan en sistemas insulares responderán a las condiciones geográficas y presiones ambientales que imperen en cada lugar (Curtis *et al.*, 2003). Los datos para estos dos primeros meses de muestreo no se consideraron en análisis posteriores.

Para determinar qué factores ambientales podrían afectar o propiciar cambios en las comunidades de bacterias en cada planta, durante todo los trece meses de muestreo se recolectaron datos de parámetros operacionales que se utilizarían para comparar con los datos biológicos (Apéndice A). Para poder establecer el efecto que tenían los parámetros ambientales sobre las poblaciones bacterianas que componían la comunidad en cada muestreo, se utilizó otro método estadístico conocido como Análisis Canónico de Correspondencia (CCA), descrito por primera vez por ter Braak (1986). El CCA es un método multivariado de correspondencia que emplea una matriz de



poblaciones por muestra en donde a cada muestra se le han asignado valores correspondientes a una o más variables. La aplicación de este método multivariado a estudios ecológicos (ter Braak y Verdonschot, 1995; Palmer, 1993) y técnica moleculares incluyendo t-RFLP (Schütte *et al.*, 2008; Ramette, 2007) ha sido bien documentado.

Los parámetros que se colectaron el mismo día del muestreo y los datos correspondientes a los promedios mensuales se graficaron individualmente para reducir el ruido en la interpretación de los resultados por la posibilidad de que se generaran relaciones artificiales entre parámetros medidos en tiempos distintos. Los datos de los dos primeros meses de muestro de la planta de Mayagüez que fueron eliminados de este análisis, a parte del hecho de que no representan adecuadamente a la comunidad predominante en Mayagüez, no se consideraron por que propician un efecto de arco en la gráfica de CCA. El efecto de arco es un artefacto estadístico que ocurre cuando hay una relación unimodal fuerte entre los cambios poblacionales y las variaciones de los parámetros ambientales. Se forma una distorsión en donde los valores con respecto al segundo eje son una función arqueada del primer eje (ter Braak y Prentice, 1988). Sin embargo, según la información ya presentada las diferencias en estas dos comunidades de bacterias en realidad no corresponden a un efecto de las condiciones ambientales sino al poco tiempo de establecidas. Esto provoca que no se ilustre adecuadamente la relación entre las muestras y los parámetros ambientales. Considerando que esto puede llevar a conclusiones erróneas del

efecto de los parámetros sobre las muestras, se decidió eliminar estas muestras del análisis.

La figura 21 muestra la relación de datos medidos diariamente contra los datos del t-RFLP de la planta de Mayagüez. En este diagrama los datos de demanda química de oxígeno (COD), sólidos suspendidos totales (TSS) y turbidez del efluente son parámetros que reflejan la eficiencia del tratamiento o la actividad de las poblaciones microbianas en el reactor, o sea que no afectan a la comunidad sino que son un efecto de ella. Como se aprecia en la gráfica, los vectores de TSS y COD del efluente se relacionan fuerte y negativamente a la mayoría de las muestras a través del tiempo de muestreo. Esto se puede interpretar como el fuerte efecto negativo de cambio que sufren estos parámetros con respecto a la estabilidad y eficiencia de la comunidad. Estas observaciones apoyan igualmente los resultados de NMDS (Figura 5) y los porcentajes de remoción de TSS y BOD con respecto a la estabilidad de la planta (Figuras 18 y 19). En la grafica las comunidades que aparecen más distantes del resto y que representan relaciones positivas con estos dos parámetros son aquellas que en el NMDS aparecen más distantes y que podrían estar reflejando esa transición progresiva hacia una comunidad distintiva de la unidad. Aun así en los resultados de remoción de TSS y BOD para estos primeros meses de muestreo aparentan ser igual de eficientes, es decir, el periodo de ajuste microbiano en la unidad no parece afectar adversamente la eficiencia de operación.

Por otro lado si tomamos en consideración la materia orgánica e inorgánica que llega a la planta, esta si tendría un efecto directo sobre los microorganismos en el reactor. Los sólidos suspendidos totales del afluente no aparentan tener tanta importancia como la demanda química de oxígeno. Esto se podría deber a que la mayoría de la materia que compone los sólidos suspendidos totales en la entrada de la planta son removidos en el tratamiento primario y no llegan al reactor. Sin embargo, el COD que incluye la materia orgánica disuelta y que alimenta a las bacterias en el reactor posee una relación más fuerte con los cambios en las comunidades y una relación fuertemente positiva con la proporción de alimento y microorganismos (F/M). Concentraciones bajas de materia orgánica disuelta afectan la proporción del F/M, lo que redundaría en una variación en la eficiencia de la comunidad del reactor. Aun así, la eficiencia de la comunidad presente en la planta de tratamiento de Mayagüez no parece afectarse significativamente por las fluctuaciones en las concentraciones de materia orgánica que llegan a la planta por el afluente (Figura 20). Las concentraciones finales en el efluente parecen tener una relación más proporcional a las concentraciones en el afluente. Esto contrasta con la gráfica de la planta de Adjuntas que muestra lo contrario, una relación inversamente proporcional marcada entre las concentraciones de BOD en el afluente de la planta versus el efluente. Con estos resultados podríamos pensar que la estructura de la comunidad establecida en la planta de Mayagüez es más eficiente amortiguando el impacto de cambios en los componentes del afluente.

Parámetros específicos de las condiciones en el reactor ilustran relaciones positivas fuertes con las comunidades bacterianas, incluyendo: las concentraciones de nutrientes, el tiempo de retención de sólidos (SRT), los sólidos suspendidos del licor mezclado (MLSS, MLVSS) y las tasas de alimentación (Feed Rate). También muestran relaciones negativas fuertes con el pH. Las concentraciones de nitrato muestran una relación negativa con las concentraciones de bacterias desnitrificadoras en el reactor contabilizadas por el método del número más probable (NMP). Esto puede corresponder a que las concentraciones de nitrato aumentan cuando la actividad de estas bacterias disminuye. Aun así, el tamaño del vector del NMP de bacterias desnitrificadoras demuestra que estas no tienen mucha importancia en el reactor aerobio ya que se favorecen mayormente en ambientes anóxicos. El nitrato también muestra relación, pero fuertemente positiva, con el tiempo de retención de sólidos. Esto demuestra que el nitrato aumenta significativamente por la acción de las bacterias nitrificadoras que oxidan amoníaco en la zona aerobia del reactor y que aumenta en proporción al tiempo de contacto. Los parámetros que más afectan la estabilidad de las comunidades en el reactor de Mayagüez son el pH, el tiempo de retención de sólidos, el F/M y las concentraciones de materia orgánica.

De forma muy similar la planta de Adjuntas muestra relaciones fuertemente positivas de la mayoría de las comunidades con las concentraciones de nitrato y negativa con las medidas de pH (Figura 23). También, al igual que Mayagüez, el nitrato tiene una relación negativa a la

concentración de bacterias desnitrificadoras en el reactor. Los resultados de remoción de nitrato y amoníaco (Figura 17) en el reactor de ambas plantas de tratamiento muestran que la actividad de las bacterias nitrificadoras es mucho más importante que el efecto que tienen las bacterias desnitrificadoras reduciendo nitratos por medio de respiración anaerobia. Esto es de esperarse porque los procesos de nitrificación se favorecen en ambientes aerobios. Las concentraciones de ambos componentes inorgánicos cambian drásticamente en el efluente de las plantas con relación a las concentraciones en el reactor.

La eficiencia de remoción de nitrógeno en los reactores se mide generalmente calculando la concentración de amoníaco total en el efluente de la planta. Evidentemente las plantas de tratamiento podrían considerarse como sistemas muy efectivos en la remoción de nitrógeno si se considera que los porcentajes de remoción de amoníaco en los reactores puede llegar a casi un 100%. Sin embargo las concentraciones de nitratos y nitritos en el efluente son sumamente altas, sobrepasando muchas veces los límites establecidos en la Ley Federal de Aguas Limpias (límite de  $\text{NO}_3^-$ : 10mg/L), lo que demuestra que en los reactores está ocurriendo una transformación del nitrógeno y no una remoción significativa en la biomasa. Estas altas concentraciones de nitrato y nitrito en el efluente pueden propiciar periodos de eutrofización en los cuerpos de agua donde se descargan. Un proceso de desnitrificación completa como un sistema de tratamiento “terciario” luego del tratamiento en el reactor aerobio podría aumentar la eficiencia de estas plantas en la remoción de nitrógeno inorgánico (Bozek et al., 2005; Mujeriego y Asano, 1999; Maier et al. 2009). La

desnitrificación completa genera como producto final de la ruta reductora nitrógeno molecular o gaseoso que es liberado a la atmósfera y no se acumula en los lodos ni en el agua del efluente (Gerardi, 2003).

Sin embargo, desarrollar estrategias para aumentar las tasas de desnitrificación en la etapa anóxica del reactor podría ser más beneficioso aun ya que proveería una fuente de aceptadores de electrones antes del tratamiento aerobio, esto a su vez reduciría drásticamente la demanda de oxígeno dando espacio para una reducción en la cantidad de aire necesaria en el reactor y redundaría en una reducción significativa en el costo de operario (Marchetto *et al.*, 2003). Esto puede ser muy importante si se considera que aproximadamente de un 60%-80% del costo global de operación de una planta de tratamiento puede estar ligado a los procesos de aeración de los lodos en el biorreactor (Chachuat *et al.*, 2001). En años recientes se han propuesto distintas alternativas para reducir la demanda de oxígeno, aumentar las tasas de desnitrificación y reducir costos de operación, aun en plantas de tratamiento que carecen de etapas anóxicas en el biorreactor (ej. reactor de Adjuntas). Una de estas alternativas es la aeración alternada en el reactor aerobio. Periodos de aeración alternados con periodos anóxicos, pueden incrementar la remoción de nitrógeno en el agua favoreciendo la remoción simultanea, o sea en el mismo tanque de tratamiento, de amoníaco (en periodos aerobios), nitrato y nitrito (en periodos anóxicos) (Marchetto *et al.*, 2003; Pollice *et al.*, 2002). El grupo de Pollice *et al.* (2002) asegura que mediante aeración alternada o aeración continua pero reducida al mínimo de aire inyectado posible, se puede favorecer

la oxidación parcial de amoníaco. Esta oxidación parcial conlleva que el amoníaco sea oxidado solo hasta nitrito y que de este proceda el proceso de desnitrificación. Esto reduciría la demanda de oxígeno y materia orgánica necesaria para favorecer la oxidación de nitrito a nitrato y todos los requisitos energéticos necesario para la reacción de reducción inversa. Estudios futuros son necesarios para determinar cuanta es la cantidad mínima de oxígeno necesaria en cada biorreactor particular para llevar cabo un proceso de tratamiento eficiente y a la vez que se reducen los costos de operación.

En la figura 22, se presenta el CCA de los resultados de coliformes totales, mercurio total, BOD5 del efluente, surfactantes totales y nitrógeno total por el método de Kjeldahl. Estos parámetros son afectados por el nivel de actividad microbiana en el reactor. En la planta de Adjuntas el BOD5 del efluente, el mercurio total, surfactantes totales, la turbiedad del efluente, cobre total, TSS del efluente, coniformes fecales y totales, fósforo total y amoníaco total, también representan resultados del efluente afectados por la actividad microbiana en el reactor (Figura 24). Para ambas plantas la mayoría de las comunidades muestran relaciones fuertemente positivas con las medidas del flujo promedio diario y fuertemente negativas con el tiempo de retención hidráulica. Estos dos parámetros son inversamente proporcionales en el proceso de tratamiento porque a mayor flujo menor será el tiempo de retención en el sistema de tratamiento. Evidentemente estos son parámetros muy importantes en los sistemas de tratamiento, determinando en gran medida la eficiencia biológica en el reactor.

Una observación interesante es que las concentraciones de nutrientes, de surfactantes totales y de metales parecen tener un efecto más marcado en la planta de Adjuntas que Mayagüez. Los vectores de estos parámetros en la planta de Adjuntas son más significativos representando fluctuaciones en las poblaciones bacterianas del reactor que parámetros como las concentraciones de materia orgánica que llegan al reactor, la temperatura y el pH de los lodos, en comparación con los resultados del CCA para la Planta de Mayagüez. Sin embargo a pesar de que la materia orgánica no parece tener tanta importancia en la planta de Adjuntas, si observamos las gráficas comparativas de concentración de BOD en el afluente y el efluente de la planta podemos observar claramente que la materia orgánica también tiene un efecto adverso significativo en la comunidad bacteriana del reactor (Figura 20). Cuando comparamos esta gráfica con la de Mayagüez, se puede deducir que la comunidad en la planta de Adjuntas posee una eficiencia de tratamiento casi inversamente proporcional a la concentración de materia orgánica que recibe; patrón que no es perceptible en los resultados de Mayagüez. Con estos resultados podríamos argumentar preliminarmente que el hecho de que el reactor de la planta de Adjuntas sea más pequeño lo hace más susceptible a presentar cambios significativos en las poblaciones dominantes por el efecto de estos componentes orgánicos e inorgánicos que llegan a través del afluente ya sea por descargas domésticas o por escorrentías.

Como habíamos argumentado anteriormente las diferencias entre ambas plantas de tratamiento en términos de variaciones poblacionales y eficiencia en



el tratamiento podían explicarse por la teoría de las Islas Biogeográficas (MacArthur y Wilson, 1967), tomando en consideración tanto la ubicación como el tamaño del reactor. Los resultados de las bibliotecas de clones de ambas plantas señalaron una mayor diversidad en la planta de Adjuntas. Pero si consideramos que la cobertura de las bibliotecas no fue amplia y que los promedios en la riqueza de especies detectadas en el t-RFLP para ambas plantas durante el mes de julio de 2007 no mostraron diferencias significativas (promedio de TRF's= 76 Adjuntas, 75 Mayagüez), podríamos pensar que hay otros factores importantes afectando, y que el tamaño y la ubicación geográfica solo ofrecen parte de la explicación.

Un parámetro muy importante que ha sido señalado en la literatura como de suma importancia para entender las fluctuaciones caóticas entre las poblaciones que componen las comunidades en los reactores de tratamiento y que podría completar la explicación de las diferencias marcadas entre las dos plantas de tratamiento es el Tiempo de Retención de Sólidos (SRT), también conocido como el Tiempo de Retención de Lodos o la edad de los lodos (Clara *et al.*, 2005). En general, SRTs relativamente largos son más adecuados y eficientes principalmente por que favorecen el establecimiento de poblaciones importantes (ej. bacterias nitrificadoras) para la remoción de materia orgánica, nutriente y otros contaminantes inorgánicos que tienen tiempos de generación prolongados, o sea, poblaciones de crecimiento lento (Bozek *et al.*, 2005; Pollice *et al.*, 2002; Clara *et al.*, 2005; Saikaly *et al.*, 2005). Esto permite el enriquecimiento de estas bacterias y consecuentemente el establecimiento de

una comunidad bacteriana más estable y fisiológicamente más diversa. Tiempos cortos favorecen que poblaciones importantes que aun no estuviesen completamente establecidas sean lavadas de la planta. Según Clara *et al.* (2005) esto determina la correlación tan estrecha que existe entre la eficiencia del tratamiento y el SRT. Ellos aseguran que la concentración final en el efluente de cualquier compuesto químico es dependiente del SRT de operación e independiente de las concentraciones en el afluente. Distintas investigaciones concuerdan en que SRTs de aproximadamente 10 días son adecuados para una reducción significativa en la demanda de oxígeno para la oxidación de compuestos orgánicos y amoníaco, mejoran la remoción de otros nutrientes como el fósforo y hasta favorecen la remoción de microcontaminantes que por sus bajas concentraciones generalmente no estimula rutas de degradación a bajos SRTs (Pollice *et al.*, 2002; Clara *et al.*, 2005; Saikaly *et al.*, 2005).

Según datos provistos por la planta de Adjuntas, esta funciona generalmente con SRTs que fluctúan entre 3.5 y 6 días, mientras que la planta de Mayagüez durante el tiempo de muestreo funcionó en promedio con un SRT de 11 días. Vale la pena señalar que este SRT tan bajo en la planta de Adjuntas está directamente ligado a su capacidad máxima diaria, en otras palabras, está ligado a su tamaño. La planta de Mayagüez por poseer una capacidad mayor, puede favorecer SRTs mayores y procesos de tratamiento más estables. Esto podría ofrecer una explicación favorable para las fluctuaciones tan marcadas en la eficiencia de tratamiento y en la estructura de las comunidades bacterianas en la planta de Adjuntas.

La teoría de la dinámica no lineal de comunidades microbianas en sistemas de ingeniería biológicos (May, 1974) sostiene que la actividad irregular de las comunidades microbianas puede surgir simplemente de la naturaleza compleja de estos sistemas biológicos. Esta teoría podría ayudar a explicar por qué los procesos biológicos se vuelven más impredecibles cuando los tiempos de retención de sólidos son menores (Curtis *et al.* 2003). SRTs bajos tienden a incrementar las tasas de crecimiento específico de las células bacterianas y esto resulta en mayores fluctuaciones en la dinámica operacional y estructuras comunitarias menos estables. Para reducir este efecto adverso en la dinámica de operación, los ingenieros progresivamente se han inclinado a diseñar reactores con mayor capacidad que permitan SRTs mayores (Curtis *et al.* 2003).

Saikaly y Oerther (2004) desarrollaron un modelo ecológico matemático para describir el mecanismo detrás de la dinámica caótica de las comunidades bacterianas en los sistemas de lodos activados. El modelo demostró que la competencia entre las poblaciones produce oscilaciones en la estructura de la comunidad y que estas oscilaciones en la abundancia de especies permiten la coexistencia de más especies en un ambiente que recursos limitantes. Sus resultados contradicen el principio de exclusión competitiva que establece que la competencia entre especies redundante en equilibrio. Para estos sistemas de tratamiento ellos encontraron que bajo SRTs largos (>6 días) la comunidad bacteriana podía alcanzar una estabilidad en donde si ocurría la exclusión competitiva y esto redundaba en una reducción en la diversidad de especies. En tiempos de retención cortos la dinámica caótica de las comunidades se mantiene

constante a través del tiempo (no ocurre exclusión competitiva), mientras que en SRTs prolongados la exclusión competitiva llegaba a dominar en periodos largos de tiempo. (Saikaly *et al.*, 2005). Esto significa que a medida que pasa el tiempo la comunidad se hace más estable, solo si los tiempos de retención de los lodos en el sistema sobrepasan los 6 días, con un tiempo optimo cercano a los 10 días (Saikaly *et al.*, 2005). Estos planeamientos podrían explicar por qué la comunidad de Adjuntas nunca llegan a estabilizarse aun en una operación continua del reactor, mientras que la comunidad de Mayagüez a través del tiempo ( $\approx$  5 meses, Figura 5) y con SRTs prolongados puede llegar a establecerse con una estructura estable y consistentemente eficiente.

Saikaly *et al.* (2005) encontraron que la distribución de las especies es más uniforme en aquellos reactores con SRTs menores, demostrando en general que los reactores con SRTs menores a 6 días tendían a ser más diversos y menos estables. Está reconocido y probado en ecología que dinámicas no equilibradas o caóticas y oscilaciones constantes en la abundancia de especies favorecen la coexistencia de poblaciones (Huisman y Weissing, 1999, 2001). Así, Saikaly *et al.* (2005) prueban que la competencia entre las poblaciones en reactores con SRTs bajos resulta en oscilaciones constantes en la abundancia de las especies y que estas dinámicas fluctuantes realmente promueven una mayor diversidad. En SRT mayores a los 6 días comienza a dominar la exclusión competitiva de especies y se reduce la diversidad por la dominancia de poblaciones específicas. Mientras más prolongados sean los

tiempos de retención de los lodos, la aparición de poblaciones dominantes por medio de la exclusión competitiva ocurre más rápido (Saikaly *et al.*, 2005).

Estos planteamientos ayudan a sostener los resultados generales obtenidos en nuestro estudio con respecto a la estructura de las comunidades microbianas en ambos reactores. Los mismos explican por qué se detectó una mayor riqueza de bacterias en la planta de Adjuntas, que debido a la relativamente baja capacidad de la planta y su SRT promedio, la estructura de su comunidad bacteriana no es estable y no hay poblaciones significativamente dominantes si no una codominancia de muchas especies que cambian constantemente sin poder alcanzar un estado óptimo de funcionamiento. Estas fluctuaciones poblacionales no facilitan consistencia en la eficiencia del tratamiento porque las poblaciones que podrían considerarse como las más adecuadas para tratar el afluente específico de la planta bajo las condiciones ambientales y geográficas específicas de su localización tienen grandes dificultades estableciéndose y dominando consistentemente a través del tiempo. En contraste, la planta de tratamiento de Mayagüez por tener una capacidad mayor y SRTs mayores, favorece el establecimiento de poblaciones consistentemente dominantes que sostienen a través del tiempo una mayor eficiencia de tratamiento. A su vez, los resultados presentados explican la diferencia entre los resultados del t-RFLP y las bibliotecas de clones. Estos resultan en cierta inconsistencia ya que los t-RFLP demuestran que las comunidades bacterias de ambas plantas comparten una riqueza de especies similar, mientras que las bibliotecas de clones demuestran que la comunidad de

Adjuntas posee una estructura menos organizada por la presencia de muchas especies en codominancia (12 Filos detectados) y la comunidad de Mayagüez posee una jerarquía más específica y estable en cuanto a la dominancia de las poblaciones que la componen (6 Filos detectados).

En general los resultados de esta investigación demuestran que las comunidades de ambas plantas de tratamiento poseen estructuras distintas y que la estabilidad de cada una está directamente ligada a la eficiencia y consistencia del proceso de tratamiento y las condiciones de operación de los reactores (capacidad y tiempos de retención de sólidos). Mas estudios de este tipo podrían ayudar a entender mejor y quizás predecir las variaciones en los biorreactores. Estas predicciones podrían ser consideradas o incorporadas en el diseño de nuevos tipos de unidades de tratamiento. Así las comunidades bacterianas podrían estar permitidas a variar dentro de un marco operacional controlado (Curtis *et al.*, 2003). La meta final sería diseñar sistemas de lodos activados para máxima estabilidad y consistencia (dentro de un rango adecuado), y no con el propósito de alcanzar un punto de operación específico.

## CONCLUSIONES

- La poblaciones dominantes en los reactores de las dos plantas de tratamiento estudiadas difieren de estudios en otras partes del Mundo (muchos de ellos realizadas en ambientes templados). Esto demuestra que a gran escala existen patrones biográficos distintos en los reactores de tratamiento y que los resultados de diversidad microbiana obtenidos del estudio de una planta particular no pueden ser extrapolados directamente a otras plantas de tratamiento.
- La estructura de las comunidades bacterianas que dominan en los reactores de tratamiento de las plantas de lodos activados de Mayagüez y Adjuntas son significativamente distintas y corresponden principalmente a las condiciones de operación de cada planta y las condiciones geográficas particulares de su ubicación.
- La comunidad microbiana en el reactor de Mayagüez cambió progresivamente desde que el reactor comenzó a operar hasta alcanzar una estructura que se mantuvo relativamente estable durante el resto del estudio, especialmente en los últimos 8 meses monitoreados.
- La comunidad bacteriana que domina en el reactor de tratamiento de Adjuntas es considerablemente más variable que la comunidad dominante en la planta de Mayagüez. Esta inestabilidad parece provocar inconsistencia en la eficiencia de operación del biorreactor.

- Las fluctuaciones marcadas en la estructura comunitaria del reactor de Adjuntas parecen corresponder a tiempos cortos de retención de sólidos ( $\approx 5$  días) que limitan el establecimiento de poblaciones importantes para un tratamiento más eficiente.
- La comunidad bacteriana en la planta de Mayagüez es menos susceptible a cambios en su estructura por las concentraciones de compuestos orgánicos (ej. surfactantes) e inorgánicos (ej. metales, nutrientes) disueltos que llegan por el afluente. Sin embargo, la comunidad bacteriana de Adjuntas presenta mayor susceptibilidad a estos parámetros que a factores ambientales, como el pH y la temperatura.
- La dinámica de funcionamiento de los reactores no facilita la remoción de nitratos disueltos en el agua del afluente, cuyas concentraciones tienden a aumentar significativamente luego del tratamiento aerobio. Este excedente de nitrato podría contribuir a reducir la demanda por oxígeno como aceptador final de electrones en la operación del sistema si se estimulan procesos de desnitrificación en los biorreactores.



## LITERATURA CITADA

- Abdo, Z., U. M. E. Schüette, S. J. Bent, C. J. Williams, L. J. Forney, P. Joyce. 2006. Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Environ. Microbiol.* 8: 929–938.
- Allen, L. A. 1944. The bacteriology of activated sludge. *J. Hygiene.* 43: 424-431.
- Amann, R., H. Lemmer, M. Wagner. 1998. Mini-review: Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. *FEMS Microb. Ecol.* 25: 205-215.
- Arden, E., W. T. Lockett. 1914. Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters. *J. Soc. Chem. Ind.* 33: 523-534.
- Arden, E., W. T. Lockett. 1914. Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters. Part II. *J. Soc. Chem. Ind.* 33: 1122-1132.
- Arden, E., W. T. Lockett. 1915. Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters. Part III. *J. Soc. Chem. Ind.* 34: 937-948.
- Armitage, R. P., M. Kent, R. E. Weaver. 2004. Identification of the spectral characteristics of British semi-natural upland vegetation using direct ordination: a case study from Dartmoor, UK. *Int. J. Rem. Sen.* 25: 3369-3388.
- Auling, G., F. Pilz, H. Busse, S. Karrasch, M. Streichan, G. Schon. 1991. Analysis of the polyphosphate accumulating microflora in phosphorus-eliminating, anaerobic-aerobic activated sludge systems by using diaminopropane as a biomarker for rapid estimation of *Acinetobacter* spp. *Appl. Envir. Microbiol.* 57: 3585-3592.
- Balmér, P., B. Mattsson. 1994. Wastewater treatment plant operation costs. *Wat. Sci. Technol.* 30: 7-15.
- Barnard, J. L. 2006. Biological nutrient removal: Where we have been, where we are going?. *79<sup>th</sup> Annual Water Environment Federation Technical Exhibition and Conference.* 1-25.
- Barragán, P., M. Roeckel, E. Aspé, M. C. Martí. 2005. Efectos de la carga orgánica sobre la desnitrificación de vertidos proteicos y salinos. *XVI Congreso Chileno de Ingeniería Química*, Universidad de Frontera.
- Bass-Becking, Lourens G.M. 1934. Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. W. P. van Stockum & Zoon N.V., The Hague, Netherlands.

- Bennett, L. T., S. Kasel, J. Tibbits. 2008. Non-parametric multivariate comparisons of soil fungal composition: Sensitivity to thresholds and indications of structural redundancy in T-RFLP data. *Soil Biol. Biochem.* 40: 1601–1611.
- Bitton, G. 2005. Wastewater microbiology. *Wiley-Liss*, New York. 3<sup>rd</sup> edition.
- Blackall, L. L., P. C. Burrell, H. Gwilliam, D. Bradford, P. L. Bond, P. Hugenholtz. 1998. The use of 16S rDNA clone libraries to describe the microbial diversity of activated sludge communities. *Wat. Sci. Technol.* 37: 451-454.
- Blackwood, C. B., T. Marsh, S. H. Kim, E. A. Paul. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 926–932.
- Bolzonella, D., P. Pavan, P. Battistoni, F. Cecchi. 2005. Mesophilic anaerobic digestion of waste activated sludge: influence of the solid retention time in the wastewater treatment process. *Process Biochemistry.* 40: 1453-1460.
- Bond, P. L., L. L. Blackall, J. Keller. 1994. Phosphate-removing microbes: New insights on their ecology. *Water- Melbourne then Artarmon.* 21:17-20.
- Bond, P. L., R. Erhart, M. Wagner, J. Keller, L. L. Blackall. 1999. Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems. *Appl. Envir. Microbiol.* 65: 4077–4084.
- Boon, N., E. M. Top, W. Verstraete, S. D. Siciliano. 2003. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-Chloroaniline shock load. *Appl. Envir. Microbiol.* 69: 1511–1520.
- Boon, N., J. Goris, P. De Vos, W. Verstraete, E. M. Top. 2000. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroanilinedegrading *Comamonas testosteroni* strain, l2gfp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2906–2913.
- Boon, N., W. De Windt, W. Verstraete, E. M. Top. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from deferent wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol Ecol.* 39: 101-112.
- Bozek, F., J. Navratil, J. Kellner. 2005. Efficiency of nitrification and denitrification processes in wastewater treatment plants. A. Omelchenko, A. A. Pivovarov, W. J. Swindall. Modern tools and methods of water treatment for improving living standards. *Springer*: Dordrecht, The Netherlands. pp 209–217.

- Bray, J. R., J. T. Curtis. 1957. An ordination of the upland forest communities of southern wisconsin. *Ecol. Monographs*. 27: 325-349.
- Briones, A., L. Raskiny. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 270–276.
- Cébron, A., M. Coci, J. Garnier, H. J. Laanbroek. 2004. Ammonia-oxidizing bacterial community structure in the lower Seine river: Impact of Paris wastewater effluents. *Appl. Envir. Microbiol.* 70: 6726–6737.
- Cervantes-Carrillo, F., J. Pérez, J. Gómez. 2000. Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. *Rev. Lat. Microbiol.* 42: 73-82.
- Chachuat, B., N. Roche, M. A. Latifi. 2001. Dynamic optimization of small size wastewater treatment plants including nitrification and denitrification processes. *Comp. Chem. Eng.* 25: 585–593.
- Chouari, R., D. L. Paslier, C. Dauga, P. Daegelen, J. Weissenbach, A. Sghir. 2005. Novel major bacterial candidate division within a municipal anaerobic sludge digester. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2145-2153.
- Chung, J., Y. Kim, D. Lee, H. Shim, J. Kim. 2006. Characteristics of denitrifying phosphate accumulating organisms in an anaerobic-intermittently aerobic process. *Environ Eng. Sci.* 23: 981-993.
- Clara, M., N. Kreuzinger, B. Strenn, O. Gans, H. Kroiss. 2005. The solids retention time: a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Wat. Res.* 39: 97-106.
- Clarke, K. R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian J. Ecol.* 18: 117-143.
- Clarke, K.R., R. M. Warwick. 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, second ed. PRIMER-E, Plymouth, UK, pp 170.
- Cole, J. R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R. J. Farris, A. S. Kulam Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, T. Marsh, G. M. Garrity, J. M. Tiedje. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37: D141-D145.
- Cordova-Kreylos, A. L., Y. Cao, P. G. Green, H.-M, Hang, K. M. Kuivila, M. G. LaMontagne, L. C. van de Werfhorst, P. A. Holden, K. M. Scow. 2006.

- Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California salt marsh sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3357-3366.
- Culman, S. W., H. G. Gauch, C. B. Blackwood, J. E. Thies. 2008. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. *J. Microbiol. Meth.* 75: 55–63.
- Curtis, T. P., N. G. Craine. 1998. The comparison of the diversity of activated sludge plants. *Wat. Sci. Technol.* 37: 71-78.
- Curtis, T.P., I. M. Head, D. W. Graham. 2003. Theoretical ecology in engineering biology. *Environ Sci Technol.* 37: 64A–70A.
- Dabert, P., B. Sialve, J. P. Delgens. 2001. Characterization of the microbial 16S rDNA diversity of an aerobic phosphorus removal ecosystem and monitoring of its transition to nitrate respiration. *Appl Envir Technol.* 55: 500–509.
- Daims, H., J. L. Nielsen, P. H. Nielsen, K. Schleifer, M. Wagner. 2001. In-situ characterization of *Nitrospira*-Like Nitrite-Oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Envir. Microbiol.* 67: 5273–5284.
- Daims, H., M. W. Taylor, M. Wagner. 2006. Wastewater treatment: a model system for microbial ecology. *Trends Biotechnol.* 24: 483-489.
- De los Reyes, F. L., W. Ritter, L. Raskin. 1997. Group-specific small-subunit rRNA hybridization probes to characterize filamentous foaming in activated sludge systems. *Appl. Envir. Microbiol.* 63: 1107–1117.
- Dennis, P., E. A. Edwards, S. N. Liss, R. Fulthorpe. 2003. Monitoring gene expression in mixed microbial communities by using DNA microarrays. *Appl. Envir. Microbiol.* 69: 769–778.
- Dignac, M. F., P. Ginestet, D. Rybacki, A. Bruchet, V. Urbain, P. Scribe. 2000. Fate of wastewater organic pollution during activated sludge treatment: nature of residual organic matter. *Wat. Res.* 34: 4185-4194.
- Dionisi, H. M., G. Harms, A. C. Layton, I. R. Gregory, J. Parker, S. A. Hawkins, K. G. Robinson, G. S. Sayler. 2003. Power analysis for real-time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction. *Appl. Envir. Microbiol.* 69: 6597–6604.
- Dojka, M. A., P. Hugenholtz, S. K. Haack, N. R. Pace. 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon-and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3869–3877.

- Dolan, J. R. 2005. Biogeography of aquatic microbes: An introduction to the biogeography of aquatic microbes. *Aquat. Microb. Ecol.* 41: 39-48.
- Eichner, C. A., R. W. Erb, K. N. Timmis, I. Wagner-Dobler. 1999. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 102–109.
- Eschenhagen, M., M. Schuppler, I. Röske. 2003. Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents. *Wat. Res.* 37: 3224-3232.
- Fernandez, A. S., S. A. Hashaham, S. L. Dollhopf, L. Raskin, O. Glagoleva, F. B. Dazzo, R. F. Hickey. C. S. Criddle. J. M. Tiedje. 2000. Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl. Envir. Microbiol.* 66: 4058–4067.
- Fierer, N. 2008. Microbial biogeography: patterns in microbial diversity across space and time. In: *Accessing Uncultivated Microorganisms: from the Environment to Organisms and Genomes and Back*. K. Zengler (editor). *ASM Press*, Washington DC, pp. 95-115.
- Fierer, N., R. B. Jackson. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS*. 103: 626–631.
- Forney, L. J., W. T. Liu, J. B. Guckert, Y. Kumagai, E. Namkung, T. Nishihara, R. J. Larson. 2001. Structure of microbial communities in activated sludge: Potential implications for assessing the biodegradability of chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 49: 40–53.
- Gerardi, M. H. 2003. Nitrification and denitrification in the activated sludge process. *John Wiley and Sons*, New York. 1<sup>st</sup> edition.
- Gich, F. B., E. Amer, J. B. Figueras, C. A. Abella, M. D. Balaguer, M. Poch. 2000. Assessment of microbial community structure changes by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *Internatl. Microbiol.* 3: 103-106.
- Graham, D. W., V. H. Smith. 2004. Designed ecosystem services: Application of ecological principles in wastewater treatment engineering. *Front Ecol Environ.* 4: 199–206.
- Grant, A., L. A. Ogilvie. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6342–6343.
- Green, J. L., B. J. M. Bohannan, R. J. Whitaker. 2008. Microbial biogeography: From taxonomy to traits. *Science*. 320: 1039-1043.

- Hallin, S., P. Lydmark, S. Kokalj, M. Hermansson, F. Sörensson, A. Jarvis, P.-E. Lindgren. 2005. Community survey of ammonia-oxidizing bacteria in full-scale activated sludge processes with different solids retention time. *J. Appl. Microbiol.* 99: 629-640.
- Harris, J. K., S. T. Kelley, N. R. Pace. 2004. New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 845–849.
- Heylen, K., D. Gevers, B. Vanparys, L. Wittebolle, J. Geets, N. Boon, P. de Vos. 2006. The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environ. Microbiol.* 8: 2012-2021.
- Hiraishi, A., K. Masamune, H. Kitamura. 1989. Characterization of the bacterial population structure in an anaerobic-aerobic activated sludge system on the basis of respiratory quinone profiles. *Appl. Envir. Microbiol.* 55: 897-901.
- Hiraishi, A., Y. Ueda, J. Ishihara. 1998. Quinone profiling of bacterial communities in natural and synthetic sewage activated sludge for enhanced phosphate removal. *Appl. Envir. Microbiol.* 64: 992–998.
- Holben W. E., K. Noto, T. Sumino, Y. Suwa. 1998. Molecular analysis of bacterial communities in a three-compartment granular activated sludge system indicates community-level control by incompatible nitrification processes. *Appl. Envir. Microbiol.* 64: 2528–2532.
- Hu, Z., M. C. Wentzel, G. A. Ekama. 2003. Modelling biological nutrient removal activated sludge systems—a review. *Wat Res.* 37: 3430-3444.
- Hugenholtz, P., B. M. Goebel, N. R. Pace. 1998. Minireview: Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180: 4765–4774.
- Hughes-Martiny, J. B., B. J. M. Bohannan, J. H. Brown, R. K. Colwell, J. A. Fuhrman, J. L. Green, M. C. Horner-Devine, M. Kane, J. Adams-Krumins, C. R. Kuske, P. J. Morin, S. Naeem, L. Øvreås, A. Reysenbach, V. H. Smith, J. T. Staley. 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Rev.: Microbiol.* 4: 102-112.
- Huisman, J., F. J. Weissing. 1999. Biodiversity of plankton by species oscillations and chaos. *Nature.* 402: 407–410.
- Huisman, J., F. J. Weissing. 2001. Biological conditions for oscillations and chaos generated by multispecies competition. *Ecology.* 82: 2682–2695.

- Jenkins, D., M.G. Richard, G.T. Daigger. 2003. Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming and other solids separation problems. *IWA Publishing*. 3<sup>rd</sup> edition.
- Juretschko, S., A. Loy, A. Lehner, M. Wagner. 2002. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Sys. Appl. Microbiol.* 25: 84-99.
- Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K. Schleifer, A. Pommerening-Röser, H. Koops, M. Wagner. 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Envir. Microbiol.* 64: 3042–3051.
- Kaewpipat, K., C.P.L. Grady Jr. 2002. Microbial population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors. *Wat. Sci. Technol.* 46: 19-27.
- Kelly, J. J., S. Siripong, J. McCormack, L. R. Janus, H. Urakawa, S. El-Fantroussi, P. A. Noble, L. Sappelsa, B. E. Rittmann, D. A. Stahl. 2005. DNA microarray detection of nitrifying bacterial 16S rRNA in wastewater treatment plant samples. *Wat. Res.* 39: 3229–3238.
- Kitts, C. L. 2001. Terminal restriction fragment patterns: A tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curr. Issues. Intest. Microbiol.* 2: 17-25.
- Knight, G. C., E. M. Seviour, R. J. Seviour, J. A. Soddell, K. C Lindrea, W. Strachan, B. de Grey, R. C. Bayl. 1995. Development of the microbial community of a full scale biological nutrient removal activated sludge plant during start-up. *Wat. Res.* 29: 2085-2093.
- Kooi, B. W., M. P. Boer, S. A. L. M. Kooijman. 1997. Complex dynamic behaviour of autonomous microbial food chains. *J. Math. Biol.* 36: 24–40.
- Kreuzinger, N., M. Clara, B. Strenn, H. Kroiss. 2004. Relevance of the sludge retention time (SRT) as design criteria for wastewater treatment plants for the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals from wastewater. *Wat. Sci. Techol.* 50: 149-156.
- Lawrence, A. W., P. L. McCarty. 1970. Unified basis for biological treatment design and operation. *Proc. Am. Soc. Civil Eng. J. San. Eng. Div.* 96: 757-778.
- Layton, A. C., P. N. Karanth, C. A. Lajoie, A. J. Meyers, I. R. Gregory, R. D. Stapleton, D. E. Taylor, G. S. Sayler. 2000. Quantification of *Hyphomicrobium* populations in activated sludge from an industrial wastewater treatment

- system as determined by 16S rRNA analysis. *Appl. Envir. Microbiol.* 66: 1167–1174.
- Lee, N., P. H. Nielsen, K. H. Andreasen, S. Juretschko, J. L. Nielsen, K.-H. Schleifer, M. Wagner. 1999. Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography—a new tool for structure-function analyses in microbial Ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1289-1297.
- Legendre, P., E. D. Gallagher. 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*. 129: 271–280.
- Legendre, P., L. Legendre. 1998. Numerical ecology. *Elsevier*. 2nd English edition. pp 853.
- Liao, P.H., D. S. Mavinic, F. A. Koch. 2003. Release of phosphorus from biological nutrient removal sludges: A study of sludge pretreatment methods to optimize phosphorus release for subsequent recovery purposes. *Environ. Eng. Sci.* 2: 369–381.
- Lindrea, K. C., R. J. Seviour. 2002. Activated sludge: The process. In *The Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Edited by G. Bitton. *John Wiley & Sons*: New York. pp 74-80.
- Loy, A., H. Daims, M. Wagner. 2002. Activated sludge: molecular techniques for determining community composition. In *The Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Edited by G. Bitton. *John Wiley & Sons*: New York. pp 26-43.
- MacArthur, R., E. Wilson. 1967. The Theory of Island Biogeography; *Princeton University Press*: Princeton, NJ.
- Maier, R. M., I. L. Pepper, C. P. Gerba. 2009. Environmental microbiology. *Elsevier: Academic Press*. 2<sup>nd</sup> edition.
- Marchetto, M., E. P. Gianotti, J. R. Campos, R. C. Pires, E. de Mattos-Moraes. 2003. Estimate of denitrifying microbiota in tertiary sewage treatment and kinetics of the denitrification process using different sources of carbon. *Brazilian J. Microbiol.* 34: 104-110.
- May, R. M. 1974. Stability and complexity in model ecosystems. *Princeton University Press*: Princeton, NJ.
- Mino, T. 2000. Review: Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal. *Biochem. (Moscow)*. 65: 405-413.



- Muckian, L., R. Grant, E. Doyle, N. Clipson. 2007. Bacterial community structure in soils contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere*. 68: 1535-1541.
- Mujeriego, R., T. Asano. 1999. The role of advanced treatment in wastewater reclamation and reuse. *Wat. Sci. Technol.* 40: 1-9.
- Naeem, S., S. B. Li. 1997. Biodiversity enhances ecosystem reliability. *Nature*. 390: 507–509.
- Nawrocki, E. P., S. R. Eddy. 2007. Query-dependent banding (QDB) for faster RNA similarity searches. *PLoS Comput. Biol.* 3: 540-554.
- Nelson, D. R., P. M. Mele. 2007. Subtle changes in rhizosphere microbial community structure in response to increased boron and sodium chloride concentrations. *Soil Biol. Biochem.* 39: 340–351.
- Onuki, M., H. Satoh, T. Mino, T. Matsuo. 2000. Application of molecular methods to microbial community analysis of activated sludge. *Wat. Sci. Technol.* 42: 17–22.
- Osborne, C. A., G. N. Rees, Y. Bernstein, P. H. Janssen. 2006. New threshold and confidence estimates for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 127-1278.
- Padayachee, P., A. Ismail, F. Bux. 2006. Elucidation of the microbial community structure within a laboratory-scale activated sludge process using molecular techniques. *Wat. Inst. South Africa*. 32: 679-686.
- Palmer, M. W. 1993. Putting things in even better order: the advantages of canonical correspondence analysis. *Ecology*. 74: 2215-2230.
- Park, H., G. F. Wells, H. Bae, C. S. Criddle, C. A. Francis. 2006. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Appl. Envir. Microbiol.* 72: 5643–5647.
- Pollice, A., V. Tandoi, C. Lestingi. 2002. Influence of aeration and sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate. *Wat. Res.* 36: 2541–2546.
- Pringault, O., R. Duran, S. Jacquet, J.-P. Torréton. 2008. Temporal variations of microbial activity and diversity in marine tropical sediments (New Caledonia Lagoon). *Microb. Ecol.* 55: 247-258.
- Ramette, A. 2007. Mini-review: Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 142–160.

- Ramothokang, T. R., D. Naidoo, F. Bux. 2006. 'Morphological shifts' in filamentous bacteria isolated from activated sludge processes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 845–850.
- Rees, G. N., D. S. Baldwin, G. O. Watson, S. Perryman, D. L. Nielsen. 2004. Ordination and significance testing of microbial community composition derived from terminal restriction fragment length polymorphisms: application of multivariate statistics. *Antonie van Leeuwenhoek.* 86: 339–347.
- Saikaly, P. E., D. B. Oerther. 2004. Bacterial competition in activated sludge: Theoretical analysis of varying solids retention times on diversity. *Microb. Ecol.* 48: 274–284.
- Saikaly, P. E., P. G. Stroot, D. B. Oerther. 2005. Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5814–5822.
- Sakano, Y., K. D. Pickering, P. F. Strom, L. J. Kerkhof. 2002. Spatial distribution of total, ammonia oxidizing, and denitrifying bacteria in biological wastewater treatment reactors for bioregenerative life support. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2285–2293.
- Scanlan, D. J., N. J. West. 2002. Molecular ecology of the marine cyanobacterial genera prochlorococcus and synechococcus. *FEMS Microbiol. Ecol.* 40: 1-12.
- Schütte, U. M. E., Z. Abdo, S. J. Bent, C. Shyu, C. J. Williams, J. D. Pierson, L. J. Forney. 2008. Mini-review: Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl Microbiol Biotechnol.* 80: 365–380.
- Seviour, R. J., A. M. Maszenan. 2002. Activated sludge: The microbial community. In the Encyclopedia of Environmental Microbiology. Edited by G. Bitton. *John Wiley & Sons*: New York. pp 68-74.
- Snaidr, J., R. Amann, I. Huber, W. Ludwig, K. Schleifer. 1997. Phylogenetic analysis and in-situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2884–2896.
- Stamper, D. M., M. Walch, R. N. Jacobs. 2003. Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 852-860.
- Stres, B. 2006. The first decade of terminal restriction fragment length polymorphism (t-RFLP) in microbial ecology. *Acta Agriculturae Slovenica.* 88: 65-73.

- Taguchi, Y. H., Y. Oono. 2005. Relational patterns of gene expression via non-metric multidimensional scaling analysis. *Bioinformatics*. 21: 730–740.
- Taguchi, Y. H., Y. Oono. 2004. Novel non-metric MDS algorithm with confidence level test. Published online at: <http://www.granular.com/MDS/src/paper.pdf>.
- Taylor, M. W., P. J. Schupp, R. de Nys, S. Kjelleberg, P. D. Steinberg. 2005. Biogeography of bacteria associated with the marine sponge *Cymbastela concentrica*. *Environ. Microbiol.* 7: 419-433.
- ter Braak, C. J. F. 1986. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*. 67: 1167-1179.
- ter Braak, C. J. F., I. C. Prentice. 1988. A theory of gradient analysis. *Adv. Ecol. Res.* 18: 271–317.
- ter Braak, C. J. F., P. E. M. Verdonschot. 1995. Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology. *Aquat. Sci.* 57: 255-289.
- ter Braak, C. J. F., P. Smilauer. 1998. CANOCO Reference manual and users guide to CANOCO for Windows: Software for canonical community ordination-Version 4. *Microcomputer Power*. Ithaca, NY. 352 pp.
- Terahara, T., T. Hoshino, S. Tsuneda, A. Hirata, Y. Inamori. 2004. Monitoring the microbial population dynamics and the start-up stage of wastewater treatment reactor by terminal restriction fragment length polymorphism analysis based on 16S rRNA gene sequences. *J. Biosci. Bioeng.* 6: 425-428.
- Thies, J. E. 2007. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71: 579-591.
- Thomsen, T. R., J. L. Nielsen, N. B. Ramsing, P. H. Nielsen. 2004. Micromanipulation and further identification of FISH-labelled microcolonies of a dominant denitrifying bacterium in activated sludge. *Environ. Microbiol.* 6: 470-479.
- Tilman, D. 1999. The ecological consequences of changes in biodiversity: a search for general principles. *Ecology*. 80: 1455–1474.
- van der Gast, C. J., B. Jefferson, E. Reid, T. Robinson, M. J. Bailey, S. J. Judd, I. P. Thompson. 2006. Bacterial diversity is determined by volume in membrane bioreactors. *Environ. Microbiol.* 8: 1048-1055.
- van Haandel, A., J. van der Lubbe. 2007. Handbook biological wastewater treatment: design and optimisation of activated sludge systems. *Quist Publishing*: Leidschendam, Netherlands.

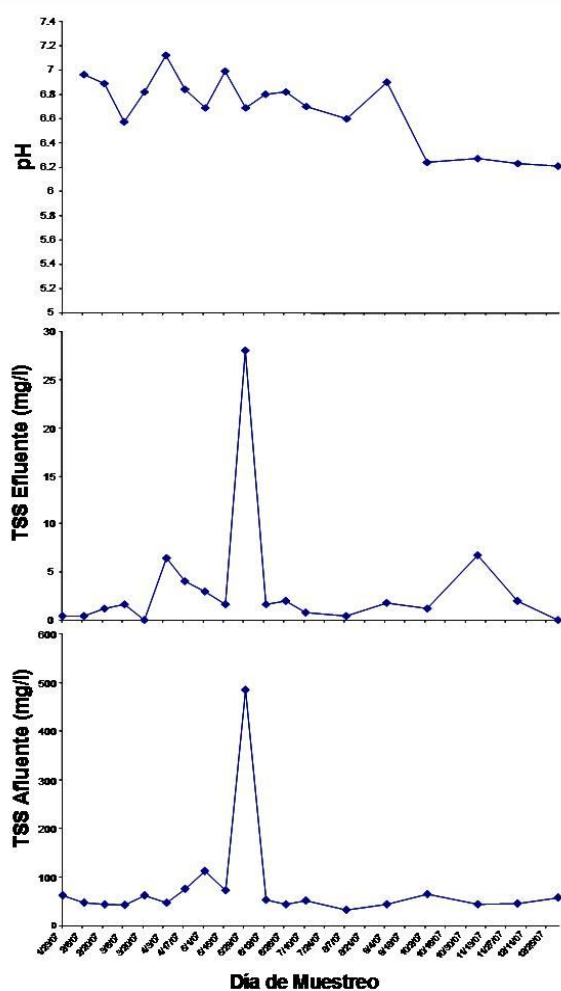
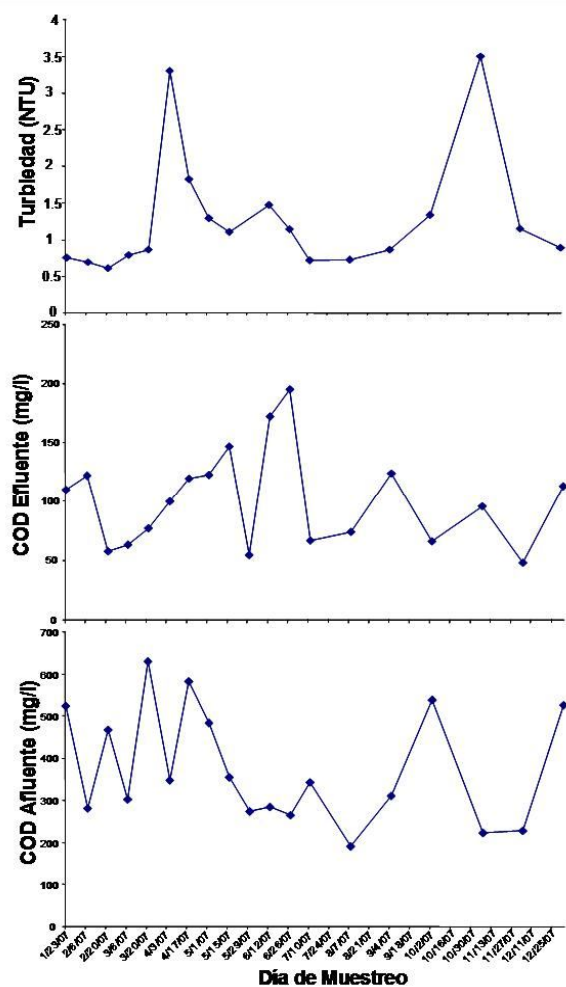
- von Canstein, H., S. Kelly, Y. Li, and I. Wagner-Dobler. 2002. Species diversity improves the efficiency of mercury-reducing biofilms under changing environmental conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2829-2837.
- Wagner, M., A. Loy, R. Nogueira, U. Purkhold, N. Lee, H. Daims. 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek.* 81: 665-680.
- Wagner, M., A. Loy. 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 218-227.
- Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer, K. Schleifer. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: Inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1520-1525.
- Watanabe, K., S. Yamamoto, S. Hino, S. Harayama. 1998. Population dynamics of henol-degrading bacteria in activated sludge determined by *gyrB*-targeted quantitative PCR. *Appl. Envir. Microbiol.* 64: 1203–1209.
- Weatherbase. 2009. Historical weather for Munich, Germany. Weatherbase website.
- Wells, G. F., E. X. Pérez, H. D. Park, L. C. Sepúlveda-Torres, B. Eggleston, E. L. Brodie, T. Z. DeSantis, G. L. Andersen, T. C. Hazen, C. A. Francis, C. S. Criddle, A. A. Massol-Deyá. 2007. Q-070: Application of high-density oligonucleotide microarrays to the study of crenarchaeota community structure and dynamics in an aerated activated sludge wastewater treatment plant. American Society for Microbiology 107th General Meeting. Toronto, Canada.
- Werker, A. G., J. Becker, C. Huitema. 2003. Assessment of activated sludge microbial community analysis in full-scale biological wastewater treatment plants using patterns of fatty acid isopropyl esters (FAPEs). *Wat. Res.* 37: 2162-2172.
- Whitfield, J. 2005. Biogeography: is everything everywhere?. *Science.* 310: 960-961.
- Wilderer, P. A., H.-J. Bungartz, H. Lemmer, M. Wagner, J. Keller, S. Wuertz. 2002. Modern scientific methods and their potential in wastewater science and technology. *Wat. Res.* 36: 370-393.
- Yamaguchi, N., Y. Itoh, M. Masuhara, K. Tana, M. Nasu. 1999. In situ analysis of community structure in activated sludge with 2-hydroxy-3 naphthoic acid-2 phenylanilide phosphate and fast red TR in situ hybridization. *Microbes Environ.* 14: 1-8.

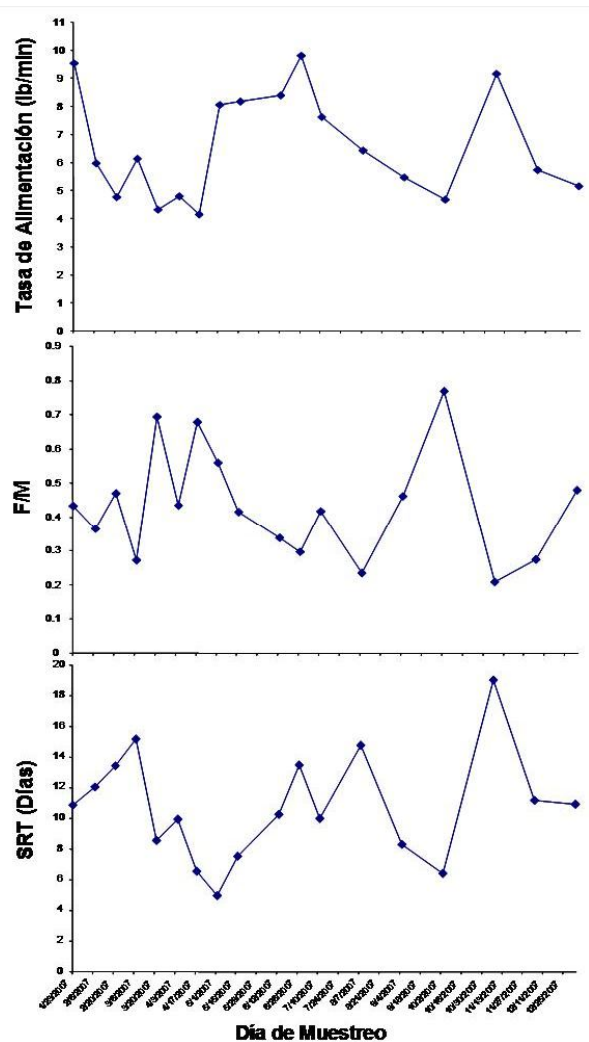
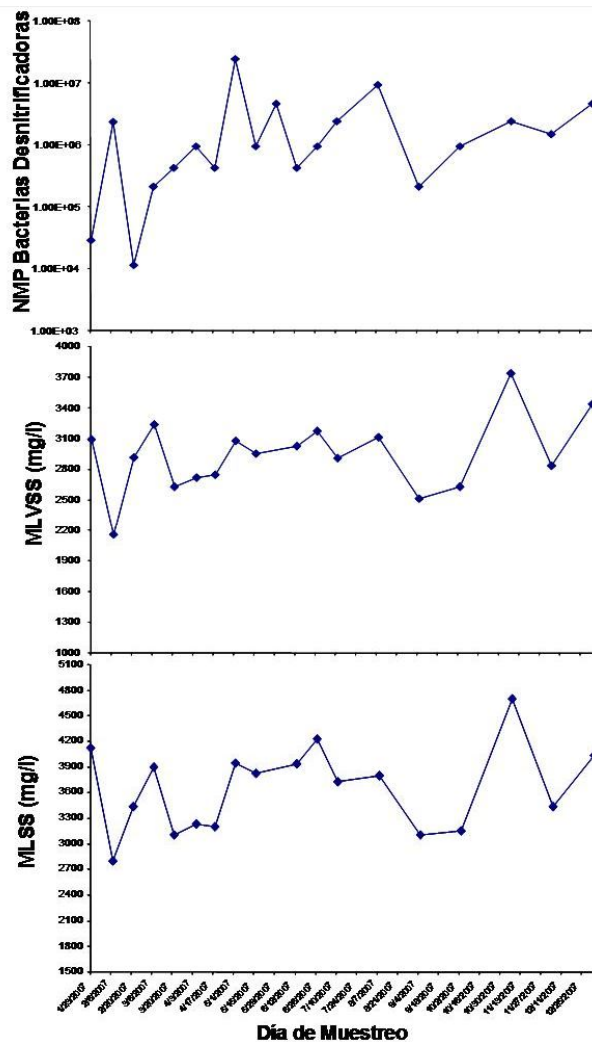
- Yoshie, S., N. Noda, S. Tsuneda, A. Hirata, Y. Inamori. 2004. Salinity decreases nitrite reductase gene diversity in denitrifying bacteria of wastewater treatment systems. *Appl. Envir. Microbiol.* 70: 3152–3157.
- Yuan, Z., L. L. Blackall. 2002. Sludge population optimization: a new dimension for the control of biological wastewater treatment systems. *Wat. Res.* 36: 482-490.
- Zeng, R. J., R. Lemaire, Z. Yuan, J. Keller. 2004. A novel wastewater treatment process: simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal. *Wat. Sci. Technol.* 50: 163–170.
- Zumft, W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 533–616.
- Zuur, A. F., E. N. Ieno, G. M. Smith. 2007. Analysing ecological data- Section 13.6: Problems with Ca and CCA. *Springer*, New York. 1<sup>st</sup> edition. pp 243-244.

## **APÉNDICES**

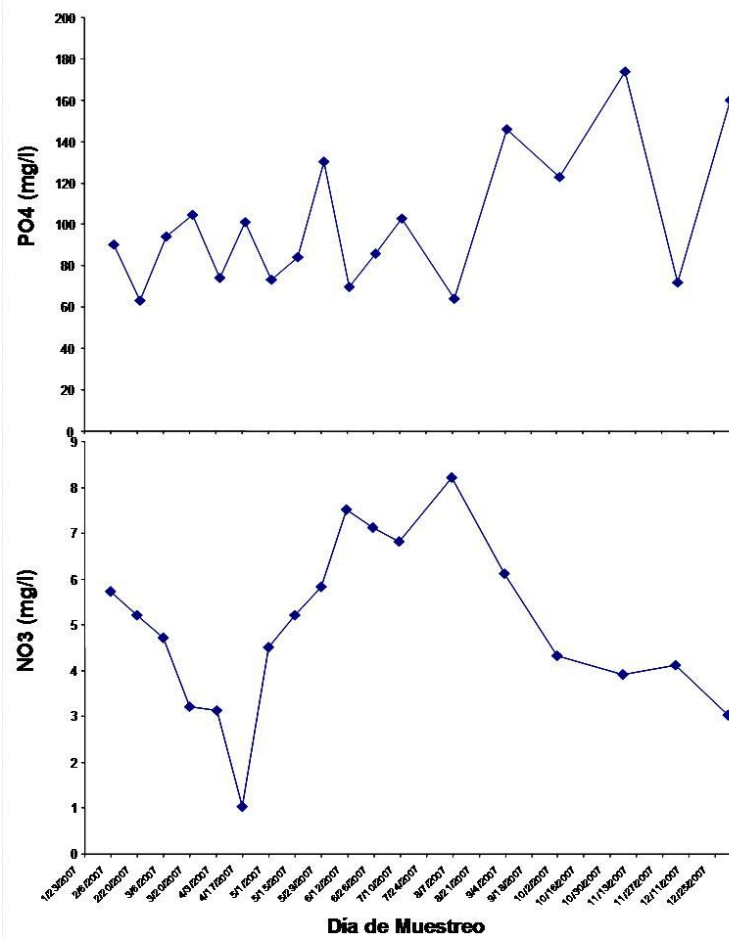
## Apéndice 1. Gráficas de parámetros ambientales y operacionales de las plantas de Mayagüez y Adjuntas

### A. Parámetros diarios de la planta de tratamiento de Mayagüez.

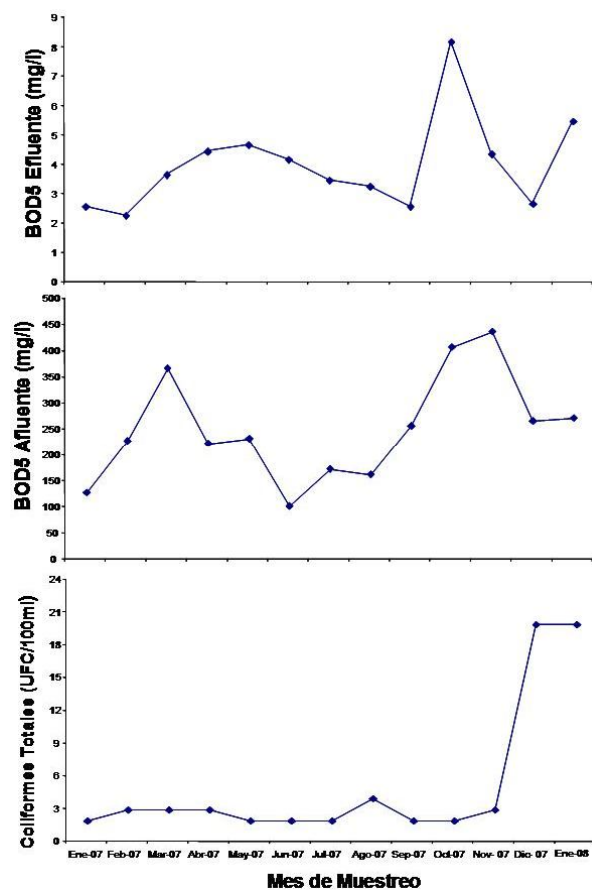
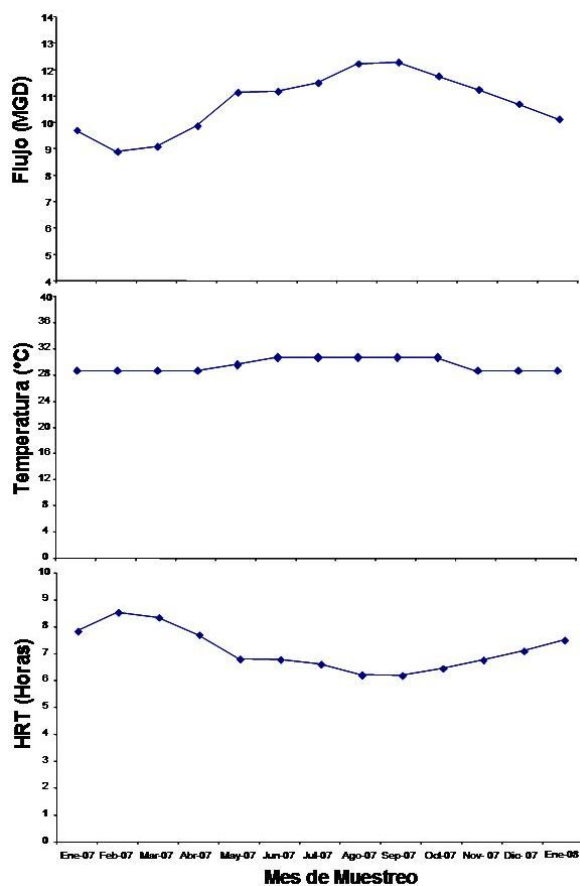


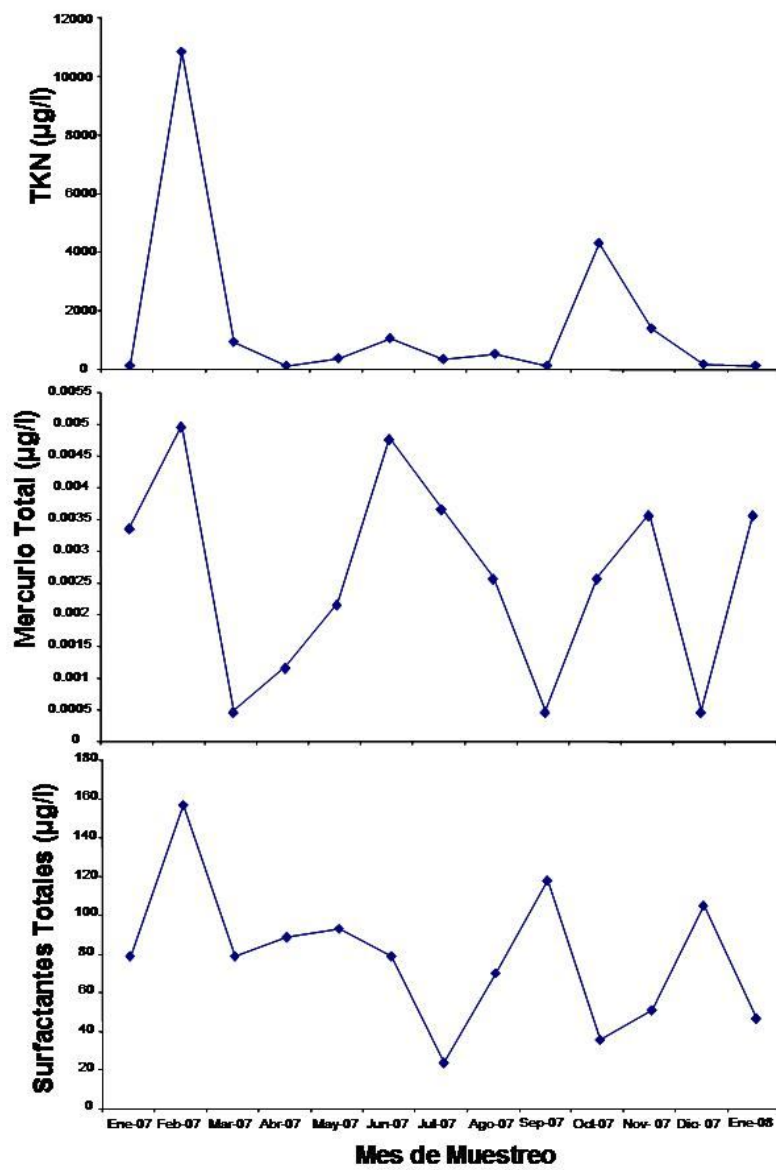




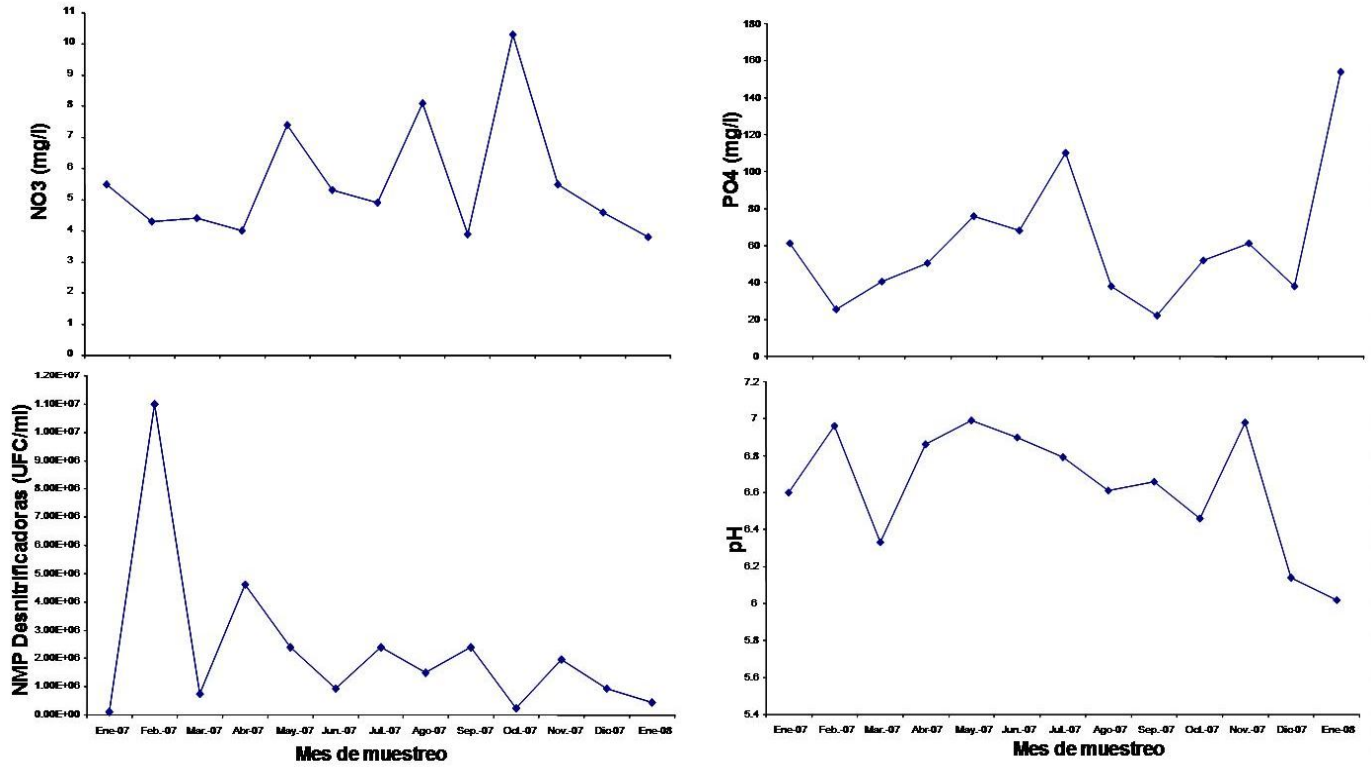


## B. Parámetros mensuales de la planta de tratamiento de Mayagüez

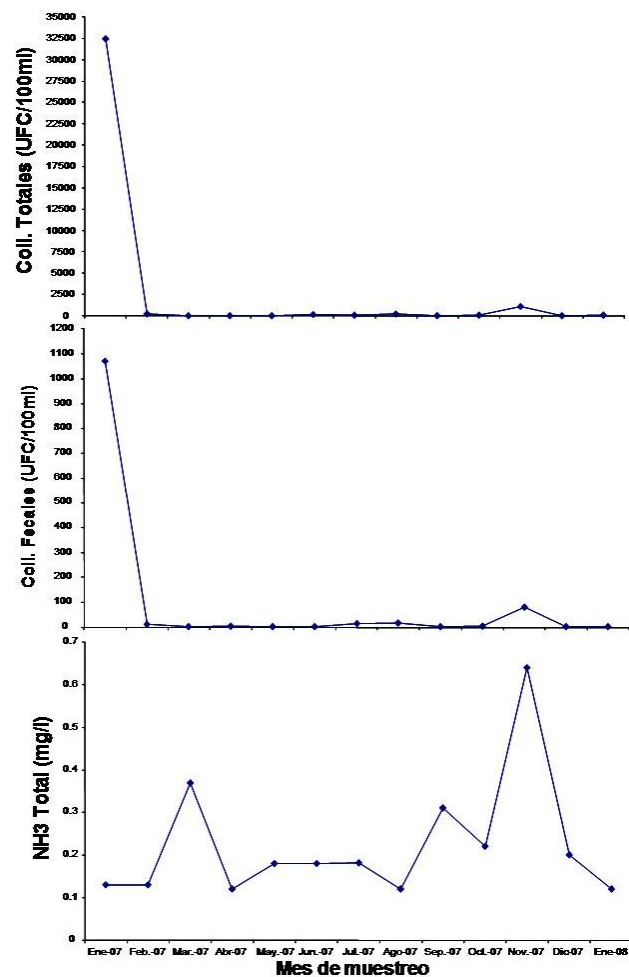
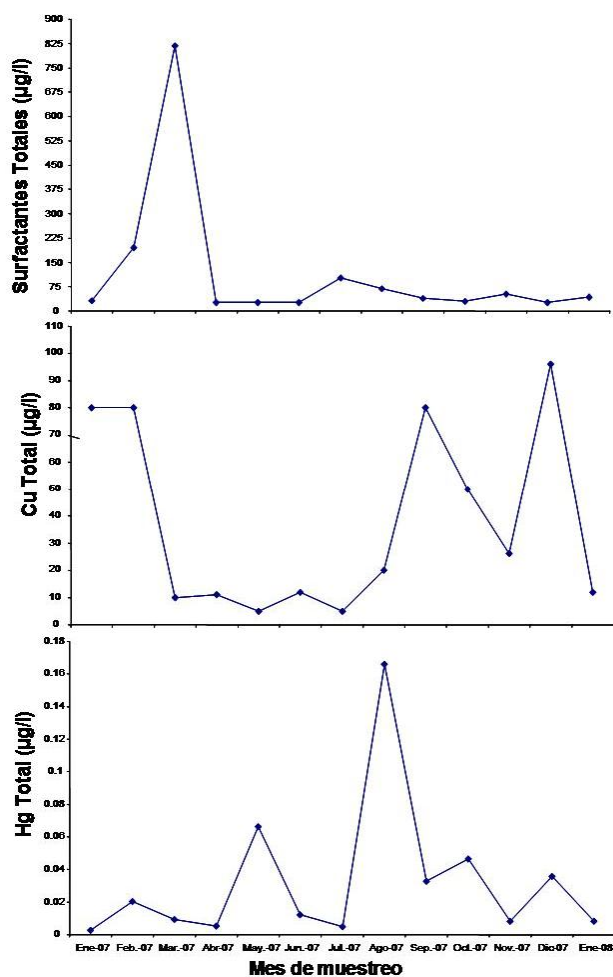


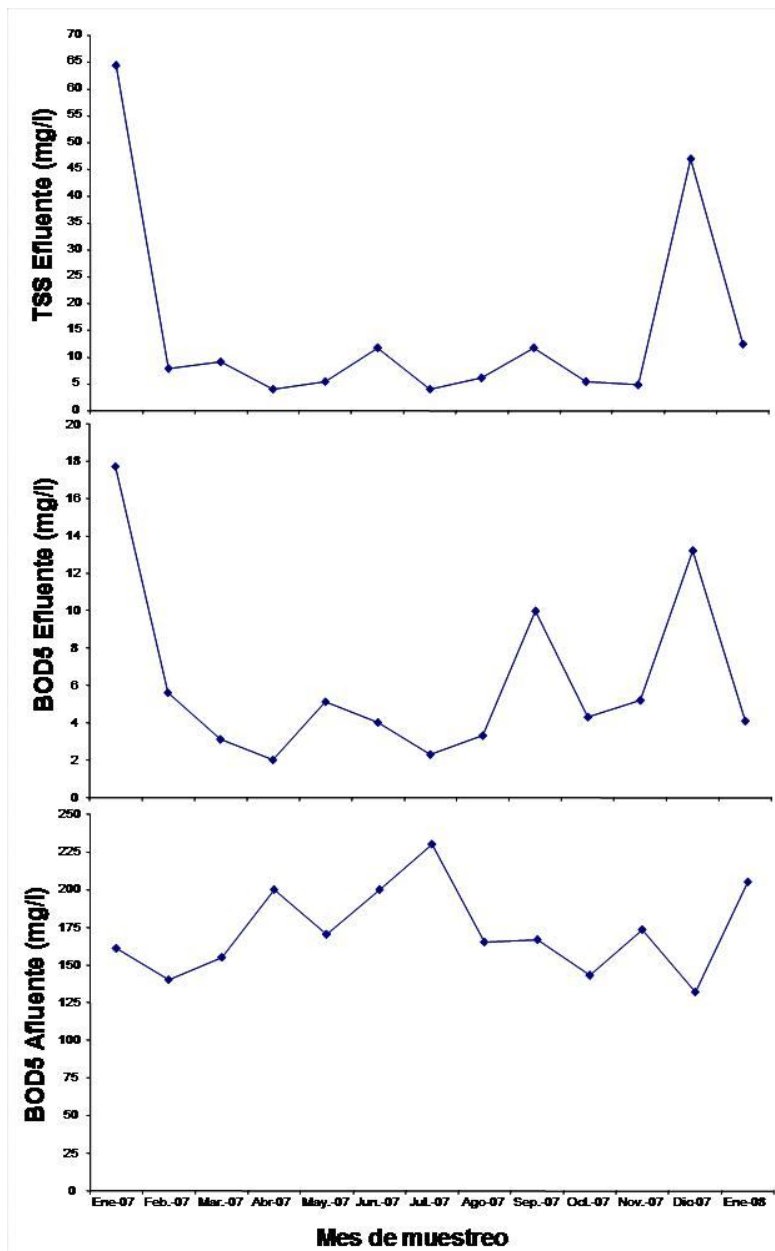


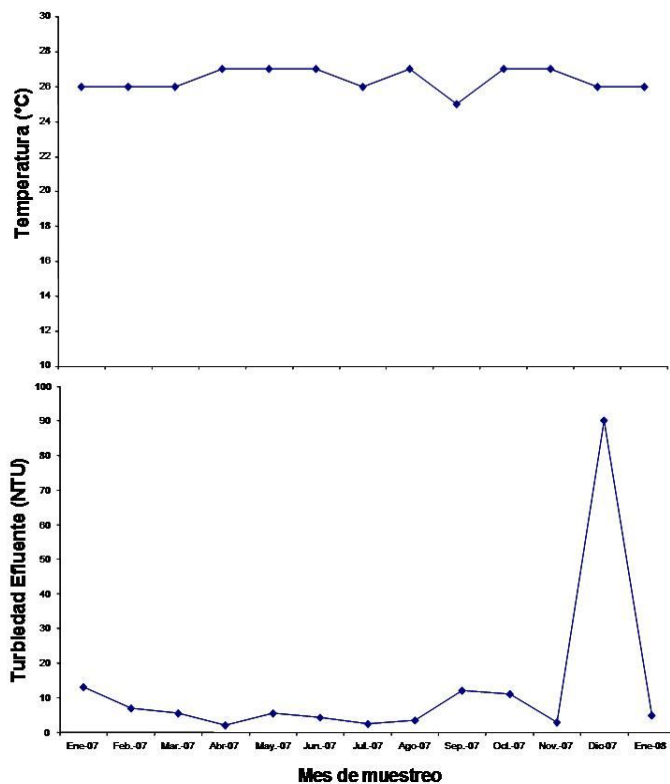
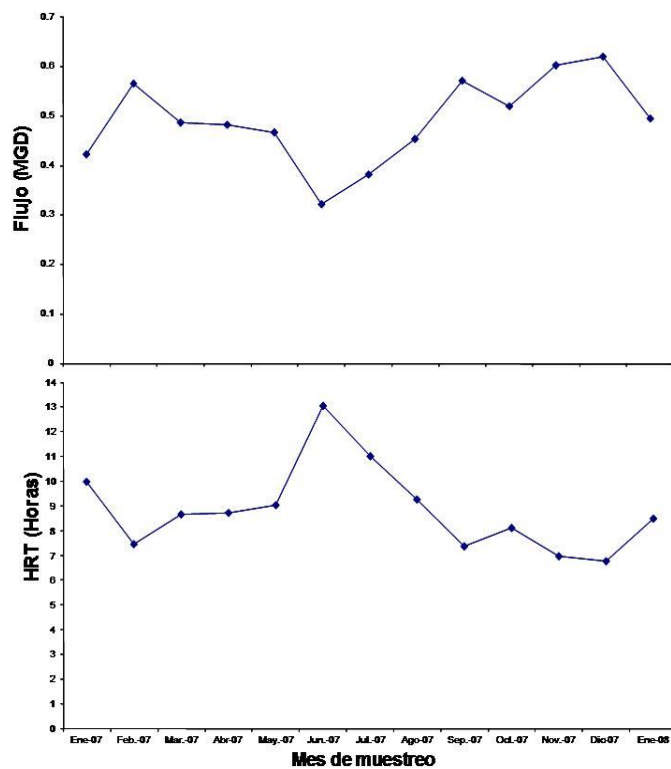
### C. Parámetros diarios de la planta de tratamiento de Adjuntas



## D. Parámetros mensuales de la planta de tratamiento de Adjuntas

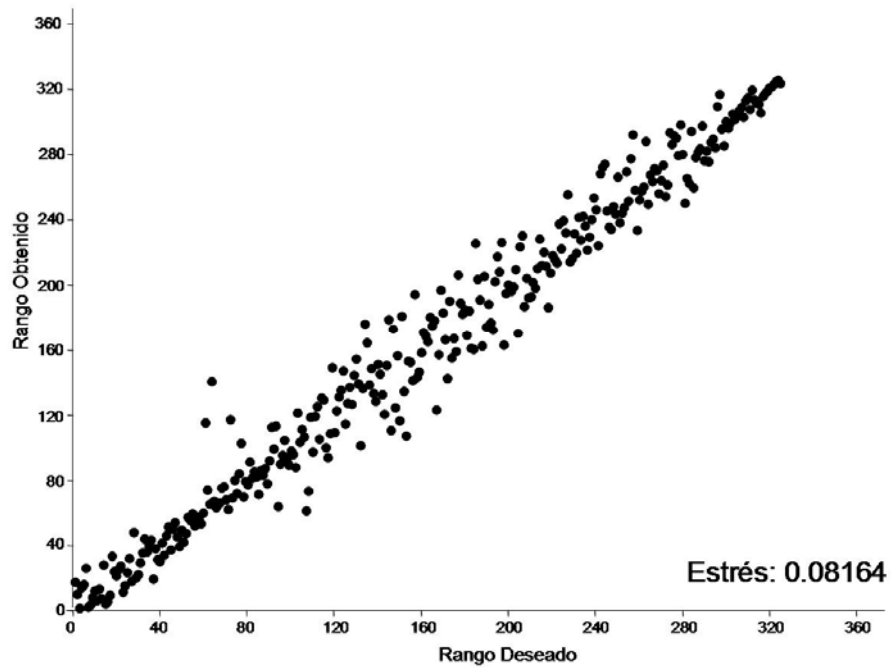




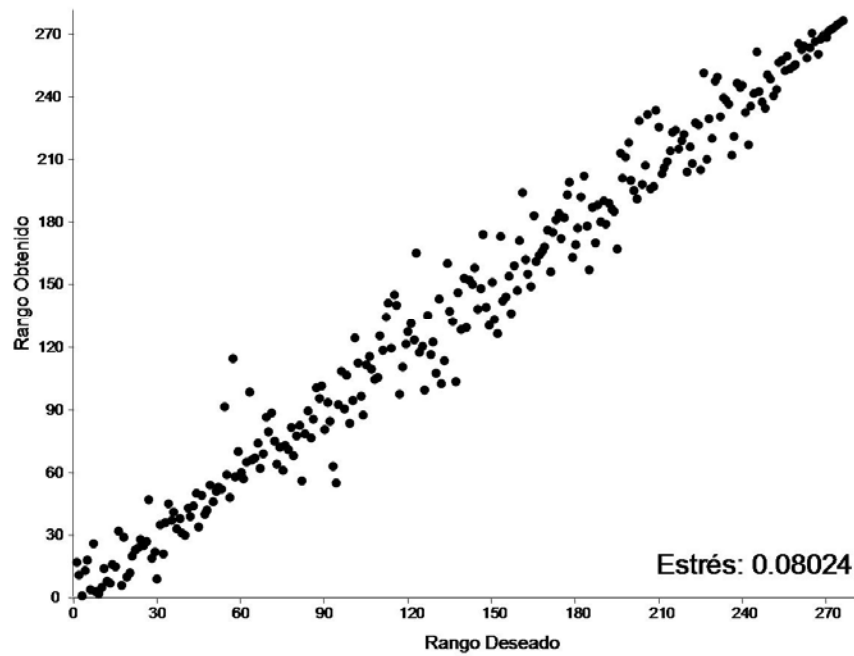


**Apéndice 2.** Diagramas de Shepard y valores de estrés para las gráficas de NMDS. A: figuras 5-6, B: figura 7.

(A)



(B)





**Apéndice 3.** Graficas de CCA de las muestras de Mayagüez ilustrando el efecto de arco provocado por las muestras de enero y febrero de 2007.

