



**UNIVERSIDAD DE
VALLADOLID**



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

**MASTER OFICIAL EN
INGENIERÍA AMBIENTAL**

**CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA
BACTERIANA PRESENTE EN
BIORREACTORES DE MICROALGAS
ALIMENTADOS CON PURINES**

Prado Carrascal, Ana Isabel

Tutoría : Dr. García Encina, Pedro

Co-tutoría: Dra. Pérez Fernández, Rebeca

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente

Valladolid, Septiembre 2016

Los Drs. PEDRO ANTONIO GARCIA ENCINA, Catedrático de Tecnología del Medio Ambiente, y REBECA PÉREZ FERNÁNDEZ, Investigadora Postdoctoral en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid,

CERTIFICAN:

Que ANA ISABEL PRADO CARRASCAL ha realizado bajo su dirección el Trabajo Fin de Máster “*CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA PRESENTE EN BIORREACTORES DE MICROALGAS ALIMENTADOS CON PURINES*”, con una duración de 5 meses (24 créditos).

Valladolid, 15 de Septiembre de 2016

Reunido el Tribunal designado en Junta de Sección para la evaluación de Trabajos fin de Máster, y después de atender a la defensa del trabajo *“CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA PRESENTE EN BIORREACTORES CON MICROALGAS ALIMENTADOS CON PURINES”*, presentado por la alumna Ana Isabel Prado Carrascal, con una dedicación de 5 meses y realizado bajo la dirección del Catedrático de Tecnología Ambiental PEDRO GARCÍA ENCINA y la Dra. REBECA PÉREZ FERNÁNDEZ, Investigadora Postdoctoral del Departamento de Ingeniería Química, decidió otorgarle la calificación de _____.

Valladolid, 15 de Septiembre de 2016

RESUMEN

La producción intensiva ganadera, con una alta concentración de animales estabulados, conlleva la generación de grandes cantidades de residuos semilíquidos o purines, cuyo vertido no controlado puede generar contaminación tanto en los suelos como en las aguas superficiales y subterráneas, lo que provoca importantes problemas ambientales que han obligado a legislar su gestión. El tratamiento de los purines tiene por objetivo básico reducir la materia orgánica y el contenido de nutrientes, lo que se consigue mediante diferentes metodologías. Los procesos en los que se utilizan consorcios de microalgas y bacterias se han demostrado útiles para este fin. Estos sistemas utilizan purines en las concentraciones adecuadas como aporte de nutrientes para el crecimiento de la biomasa microalgal. Si bien en estos procesos la especie de microalga utilizada es seleccionada entre las más adaptadas a las condiciones de operación de los biorreactores, la composición de la microbiota bacteriana es poco conocida. El estudio de las comunidades bacterianas establecidas y su evolución en el tiempo es importante debido a los efectos que la actividad bacteriana puede tener sobre el crecimiento microalgal y por tanto, sobre el rendimiento del sistema. El uso combinado de técnicas biomoleculares como PCR y DGGE permite estudiar la diversidad de las comunidades bacterianas presentes en estos ecosistemas complejos. El análisis del patrón de bandas obtenido a partir de las diferentes muestras analizadas permite determinar la biodiversidad en cada una de ellas y su similitud, factores vinculados a las condiciones de operación. La secuenciación de las bandas más representativas obtenidas de la DGGE proporciona datos sobre los principales grupos presentes en las muestras: α y γ *Proteobacteria* (géneros *Rubribacterium*, *Thiocapsa*, *Dokdonella*), *Firmicutes* (géneros *Clostridium*, *Turicibacter*), *Acidobacteria* (género *Blastocatella*), *Actinobacteria* (géneros *Lamia*, *Ilumatobacter*), *Chloroflexi* (género *Oscillochloris*) y *Chlamydiae* (género *Parachlamydia*).

ABREVIATURAS

A	Adenina, base púrica
ADNasa	Enzima desoxiribonucleasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr 16S	Ácido desoxirribonucleico ribosomial de la fracción 16 unidades Svedberg del ribosoma bacteriano
ARN	Ácido ribonucleico
APS	Persulfato amónico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Citoxina, base pirimidínica
d	Día
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
DBO	Demanda Biológica de Oxígeno
DQO	Demanda Química de Oxígeno
FISH	Hibridación fluorescente in situ
G	Guanina, base púrica
H'	Índice de Shannon- Wiener
NCBI	National Center for Biotechnology Information
O₂	Oxígeno gaseoso
pdb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RDP	Ribosomal Database Project
T	Timina, base pirimidínica
TAE	Tris acetato y ácido etileno diamino tetra-acético
TEMED	Tetrametiletilendiamida
w/v	peso/volumen

ÍNDICE de TABLAS

Tabla I	Composición media de purines procedentes de la ganadería intensiva	8
Tabla II	Procedencia y características de las muestras analizadas	20
Tabla III	Secuencia de nucleótidos de los primers utilizados	21
Tabla IV	Composición de las soluciones stock formadoras del gel de poliacrilamida con gradiente de urea y formamida	22
Tabla V	Índice de similitud entre las muestras	30
Tabla VI	Clasificación RDP de las bandas secuenciadas	36

ÍNDICE de FIGURAS

Figura 1	Esquema general del proceso de digestión anaerobia	10
Figura 2	Principio de la oxigenación fotosintética en los procesos de eliminación de la DBO	11
Figura 3	Biorreactores tipo Raceway y capa fina	12
Figura 4	Biorreactor tubular experimental	12
Figura 5	Obtención de amplicones del gen ADNr 16S mediante PCR	15
Figura 6	Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (DGGE)	16
Figura 7	Sistema de preparación de geles de DGGE	23
Figura 8	Sistema de electroforesis DCode™ Universal Mutation Detection System	24
Figura 9	Visualización de las secuencias Forward y Reverse con el programa Chromas lite	26
Figura 10	Patrón de bandas obtenido en la DGGE	28
Figura 11	Dendrograma basado en la similitud entre las muestras	31

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	8
1.1	Procesos utilizados para el tratamiento de purines	9
1.2	Tipos principales de biorreactores	11
1.3	Técnicas biomoleculares utilizadas para la identificación de la microbiota bacteriana	13
1.4	Secuenciación y análisis de las secuencias	16
2	OBJETIVO	19
3	MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1	Muestras a analizar	20
3.2	Extracción del ADN bacteriano de las muestras	20
3.3	Comprobación de la presencia de ADN bacteriano mediante electroforesis en gel de agarosa	21
3.4	Amplificación del ADNr 16S bacteriano mediante PCR	21
3.5	Separación mediante electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)	22
3.6	Análisis de la imagen de la DGGE con Gel Comproar II	24
3.7	Secuenciación de las bandas más representativas de la DGGE	25
3.8	Estudio de las secuencias: identificación taxonómica mediante herramientas bioinformáticas para DNAr 16S	26
4	RESULTADOS y DISCUSIÓN	28
4.1	Biodiversidad de las muestras	28
4.2	Índices de similitud	29
4.3	Dinámica de las comunidades bacterianas	31
5	CONCLUSIONES	40
6	ANEXOS	
	ANEXO I: Protocolo Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) para extracción de ADN	41
	ANEXO II: Protocolo para limpieza de bandas GenElute PCR DNA Purification Kit Sigma-Aldrich	43
7	BIBLIOGRAFÍA	44

1 INTRODUCCIÓN

Los purines generados en las explotaciones ganaderas intensivas de porcino y vacuno son una mezcla semisólida de estiércoles, aguas de lavado y otros restos orgánicos, caracterizados por sus altas concentraciones de materia orgánica, una relación DBO₅/DQO entre 0,2 y 0,4, un elevado contenido de nitrógeno y fósforo en relación al carbono y la presencia de metales pesados. Su composición media varía en función de diversos factores como el animal de procedencia, su alimentación, la estructura de la granja, el sistema de limpieza, las aguas pluviales, el tiempo y tipo de almacenamiento, la época del año, etc... (Tabla I).

Tabla I: Composición media de purines procedentes de la ganadería intensiva

Parámetro	Rango
DQO	38.000-42.000 mg/l
DBO ₅	10.000-20.000 mg/l
Sólidos totales	60.000-70.000 mg/l
N total	3.000-4.700 mg/l
P total	900-1.300 mg/l
pH	7.4-8.8
Humedad (%)	93-94

Parte de los purines generados pueden ser aprovechados en agricultura como fertilizante, pero la gran parte se producen en zonas donde no pueden ser utilizados en los terrenos próximos y se convierten, por tanto, en residuos. La liberación indiscriminada de estos excedentes ganaderos puede producir la alcalinización del medio, la sobredosificación de nitratos y fosfatos en los suelos de cultivo, la contaminación de los acuíferos en forma de nitrato o amonio y la eutrofización de las aguas superficiales (Ibekwe et al. 2016), por lo que actualmente la legislación (Real Decreto 2828/1998, Real Decreto 324/2000 de 3 de Marzo, Decreto 987/2008) prohíbe su emisión directa al medioambiente y obliga a su gestión.

El tratamiento de purines tiene como objetivos principales la reducción de la materia orgánica, tanto en suspensión como disuelta, la eliminación de los nutrientes inorgánicos y la reducción de metales. Esto hace necesario el desarrollo e implementación de sistemas que traten los efluentes de forma eficiente y a bajo coste, utilizando, en la mayoría de los casos, procesos biológicos.

Como paso previo al tratamiento, la estabilización de los purines se realiza en estanques o lagunas al aire libre, donde los requerimientos de O_2 se obtienen únicamente a través de la superficie del estanque.

1.1 Procesos utilizados para el tratamiento de purines

El tratamiento de los purines tiene un coste derivado de su recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación. La selección del proceso o conjunto de procesos depende de las características del purín a tratar (cantidad de materia orgánica, pH, metales, etc...), de la cantidad de efluente y del costo y disponibilidad de terrenos cercanos que reduzcan los gastos en almacenamiento y transporte.

Actualmente, la mayoría de las plantas de tratamiento de purines consisten en plantas de cogeneración en las que se emplea gas natural para generar electricidad y aprovechar el calor residual de la combustión para secar térmicamente los purines. Sin embargo, estas plantas no son sostenibles económicamente a largo plazo debido al alto coste del gas natural utilizado, lo que hace necesario encontrar nuevos sistemas de tratamiento de los purines que sean más eficientes y respetuosos medioambientalmente.

Los tratamientos biológicos son capaces de reducir los niveles de nutrientes y materia orgánica en los purines por la acción de microorganismos, tanto en presencia como en ausencia de O_2 :

- En los tratamientos aerobios, una comunidad muy heterogénea de microorganismos produce la eliminación de nutrientes presentes en un sustrato también heterogéneo y con grandes volúmenes de operación, en presencia de O_2 . Normalmente es un sistema continuo en el que se produce una gran cantidad de biomasa, lo que provoca un problema secundario de contaminación (fangos activos).

- En los tratamientos anaerobios la materia orgánica es descompuesta por la acción de diversas poblaciones bacterianas en ausencia de O_2 para dar CO_2 y CH_4 . Como no hay presencia de oxidante, en el proceso se obtiene un fango digerido que puede ser revalorizado como abono, un digestato líquido que puede ser concentrado y utilizado como fertilizante y una fracción gaseosa o biogás que puede ser utilizado para mantener el digestor anaerobio a la temperatura óptima de operación (38 °C) o para acelerar la evaporación del digestato.

La degradación anaerobia de la materia orgánica requiere la participación de procariontes anaerobios, facultativos o estrictos, que utilizan secuencialmente los productos metabólicos generados a través de cuatro pasos sucesivos en una relación sintrófica en la que los productos generados por la actividad metabólica de unos

microorganismos son utilizados como sustratos por otros grupos. Los pasos son: hidrólisis por enzimas extracelulares de bacterias hidrolíticas (*Bacillus*, *Peptococcus*, *Anaerovibrio*), acidogénesis por bacterias homoacéticas anaerobias obligadas (*Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*), acetogénesis por bacterias acetogénicas productoras de CO₂ y H₂ (*Acetobacterium*, *Syntrophobacter*, *Desulfovibrio*) y metanogénesis por arqueas metanogénicas (*Methanobacterium*, *Ethanoecoccus*, *Methanosarcina*) (Figura 1).

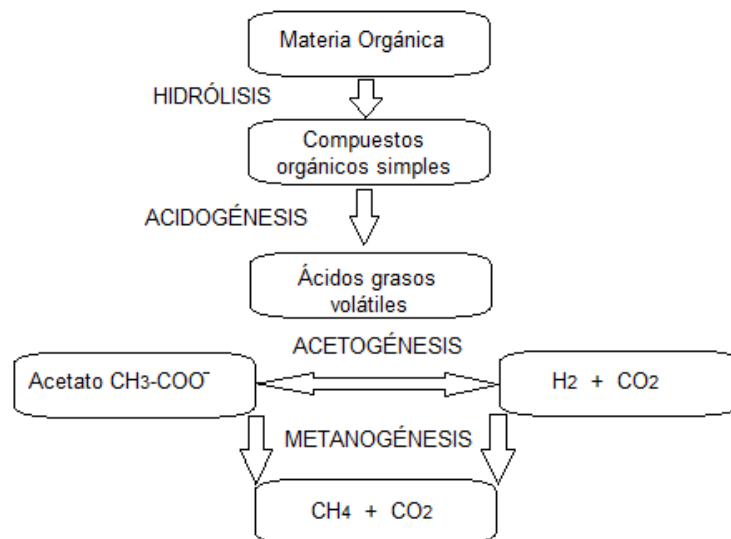


Figura 1: Esquema general del proceso de digestión anaerobia

Los procesos anaerobios presentan ciertas ventajas respecto a los aerobios, pero tienen el inconveniente de que los organismos anaerobios crecen muy lentamente, por lo que para operar con un volumen de reactor razonable y tiempos hidráulicos de residencia cortos, la biomasa debe de estar inmovilizada en el reactor o ser recirculada en el sistema.

Como alternativa a la gestión convencional de purines, actualmente se está estudiando la posibilidad de utilizarlos como fuente de nutrientes en grandes cantidades y de bajo coste en la producción de biomasa microalgal, que puede ser utilizada posteriormente en alimentación, producción de biofertilizantes o biocombustibles (Subashchandrabose et al. 2011). La producción se realiza en biorreactores en los que microalgas seleccionadas entre las especies resistentes a ambientes con alta carga de materia orgánica y metales pesados y de rápido crecimiento (*Chlorella*, *Scenedesmus*) se cultivan de forma masiva y muy eficiente conjuntamente con comunidades de bacterias.

Los purines aportados al reactor en la concentración idónea se constituyen en la fuente de nitrógeno y el fósforo, cuya falta limita el crecimiento de la biomasa microalgal, evitando así el aporte de fertilizantes sintéticos que encarecen el proceso (Morales-Amaral, 2015). A su vez, las bacterias aerobias presentes degradan la materia orgánica utilizando como oxidante el O₂ producido por las algas en el proceso

de la fotosíntesis. La relación simbiótica microalga/bacteria es clara desde el momento en que el organismo fotosintético provee al sistema del O_2 necesario para que las bacterias degraden la materia orgánica y consumiendo al mismo tiempo el carbono inorgánico (CO_2) producido en la respiración de las bacterias (Muñoz, R. 2006) (Figura 2).

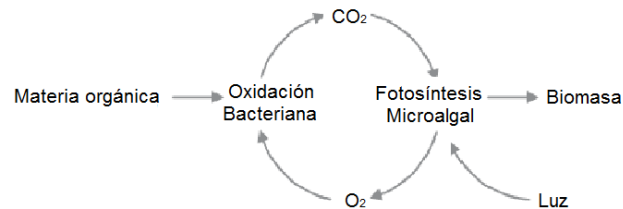


Figura 2: Principio de la oxigenación fotosintética en los procesos de eliminación de la DBO (Muñoz, R. 2006)

De esta manera, la depuración de los purines por los consorcios microalgas/bacterias permite la recuperación del nitrógeno y fósforo contenido en el efluente, el reciclado de la fracción líquida que puede ser usada posteriormente para el riego y la reducción de las emisiones de CO_2 frente a los sistemas de tratamiento convencionales.

1.2 Tipos principales de biorreactores

El cultivo a gran escala de microalgas exige el control riguroso de los factores que determinan su crecimiento óptimo: medio de cultivo, intercambio de gases, iluminación, temperatura y pH. Los biorreactores utilizados deben presentar una serie de características como son proporcionar la cantidad suficiente de luz y gases, minimizar la sedimentación, presentar una alta tasa de transferencia de masa sin dañar las células y además, ser sencillos de operar y tener un bajo coste económico. Atendiendo a su diseño, se clasifican básicamente en abiertos y cerrados.

.- Biorreactores abiertos: La producción comercial de microalgas se está realizando actualmente en reactores abiertos, debido a su facilidad de construcción y operación, su bajo coste y su durabilidad. Presentan diversos diseños (Figura 3).

→ Los reactores tipo carrusel o Raceway consisten en una cámara elíptica con un tabique central en la que el flujo circula impulsado por paletas rotatorias que aseguran la homogenización y un continuo desplazamiento de la suspensión celular.

→ En los biorreactores thin-layer o de capa fina, el cultivo desciende resbalando por una superficie inclinada, de larga pendiente y escasa

profundidad (1-2 cm) lo que permite crear turbulencias y una fina capa de cultivo.



Figura 3: Bioreactores tipo Raceway (izquierda) y capa fina (derecha). Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Almería.

Las limitaciones de estos sistemas abiertos incluyen el gran tamaño que requieren, la dependencia del clima, las pérdidas por evaporación y las potenciales contaminaciones del cultivo por organismos externos.

.- Biorreactores cerrados: El más característico es el reactor tubular, en el que la suspensión celular se recircula a través de tubos de vidrio o plástico transparentes. De esta manera, la iluminación se optimiza y la evaporación se reduce, permitiendo facilitar la operación en continuo (Figura 4). Se utilizan en la producción de microalgas que generen productos de elevado valor comercial, puesto que el coste de su construcción y mantenimiento es elevado.



Figura 4: Biorreactor tubular experimental. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid

Los biorreactores albergan un gran número de especies que forman complejas comunidades en las que se establecen interacciones que provocan la evolución de estas comunidades en el tiempo. Las microalgas y las bacterias influyen en los sistemas mediante múltiples modelos de interrelación (Ramanan et al. 2016). El conocer cuáles son los microorganismos implicados y comprender las interacciones

que se establecen entre los mismos es importante para el correcto funcionamiento de los biorreactores. Normalmente, la especie de microalga es conocida e inoculada en el reactor, eligiendo la más adecuada para un fin concreto. Sin embargo la composición y estructura de las comunidades bacterianas no son totalmente conocidas (Ferrero et al. 2012).

Durante los procesos biológicos se producen cambios en las comunidades bacterianas, observándose que las comunidades aerobias normalmente presentes en los purines son sustituidas por otras adaptadas a las nuevas condiciones (Alitalo et al. 2015). Estas especies proceden tanto de los purines aportados como de contaminaciones externas al biorreactor, además de las poblaciones bacterianas mutualistas asociadas a las microalgas (Ye et al. 2016).

La funcionalidad de esta comunidad compleja dependerá de las relaciones establecidas entre las poblaciones, que a su vez se verán afectadas por las condiciones de operación y de las condiciones climáticas en las que se encuentra el sistema (Unnithan et al. 2014), lo que implica que una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes a las interacciones establecidas entre las poblaciones de microalga y las de bacterias podría facilitar el desarrollo de procesos biotecnológicos más eficientes (Kouzuma et al. 2015). La identificación de las especies bacterianas implicadas en la producción de biomasa microalgal puede ser crítica en la productividad, ya que se ha demostrado la relación entre las estructuras de las comunidades y el rendimiento de los sistemas (Yanling et al. 2008).

1.3 Técnicas biomoleculares utilizadas para la identificación de la microbiota bacteriana

Las técnicas de microbiología tradicionales usadas para la caracterización de las comunidades microbianas requieren de células viables en medios de cultivo que contengan la cantidad de nutrientes requeridos para el crecimiento del microorganismo. Sin embargo, y debido en parte al desconocimiento de los requerimientos de estas especies en condiciones naturales, estas técnicas cultivo-dependientes solo permiten detectar menos de un 10% de las poblaciones microbianas presentes en medios complejos como son los biorreactores.

Actualmente, las técnicas de caracterización microbiana independientes de cultivo basadas en herramientas de Biología Molecular son ampliamente usadas para la identificación de especies bacterianas no cultivables en medios de laboratorio. Existe una gran variedad de técnicas moleculares para la detección de los microorganismos, la gran mayoría basada en la clonación de fragmentos de ADN o ARN, en la hibridación (RFLP's o fragmentos de restricción de longitud polimórfica, transferencia por aplastado o squash blot, ARN de cadena doble, FISH, etc...) y en la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, PCR anidada, RAPDs o polimorfismo del ADN

amplificado al azar, etc...). Estas últimas permiten seguir la dinámica de la población proporcionando un análisis semicuantitativo de la diversidad de los ecosistemas complejos. Una de las herramientas moleculares más utilizada se basa en la replicación y secuenciación de ciertos genes del cromosoma bacteriano mediante la combinación de las técnicas de PCR y DGGE.

El gen *rrs* o gen ADNr 16S es la macromolécula utilizada actualmente en los estudios de detección bacteriana, debido a que presenta una alternancia de regiones altamente conservadas en la evolución, comunes a todas las especies bacterianas, y de regiones hipervariables que sólo están conservadas entre especies evolutivamente muy próximas. Estas regiones hipervariables permiten diferenciar unas especies de otras, incluidas las más próximas y por lo tanto, se utilizan para ubicar cada especie en su propio grupo taxonómico (Rodicio y Mendoza, 2004).

Las regiones hipervariables V6–V8 del gen ADNr 16S son amplificadas mediante PCR. La técnica, desarrollada en 1986 por K. Mullys (Mullys et al. 1986) permite la replicación in vitro de estas secuencias específicas del ADNr 16S en un proceso que requiere los siguientes pasos (Figura 5):

- 1.- Desnaturalización del ADNr 16S: La doble cadena se desnaturaliza en cadenas sencillas cuando se eleva su temperatura hasta los 95 °C.

- 2.- Una ADN polimerasa termoestable utiliza esta cadena sencilla como molde para la síntesis de la cadena antiparalela y complementaria a partir de oligonucleotídicos sintéticos de 18-30 pdb (pares de bases) denominados iniciadores, cebadores o primers, que sirven de punto de partida al proporcionar el grupo 3´–OH libre necesario. La elección de los primers adecuados es crítica en este tipo de estudios (Fredriksson et al. 2013) pero también lo es la ADN polimerasa, ya que la utilización de diferentes ADN polimerasas influye en el análisis final de la PCR-DGGE (Balázs et al. 2013). En la PCR convencional se usan un par de primers específicos del Dominio Bacteria para delimitar los extremos de la secuencia que se desea amplificar.

- 3.- Mediante ciclos repetitivos de calentamiento y enfriamiento, se amplifican las secuencias, obteniendo un elevado número de copias. Como al copiar un fragmento de ADN bicatenario aparecen dos fragmentos idénticos, en cada ciclo se duplica la cantidad de ADN en un proceso exponencial donde tras n ciclos se producen 2^n copias. Así, tras 30 ciclos se pueden obtener $2^{30} = 10^9$ copias del ADN.

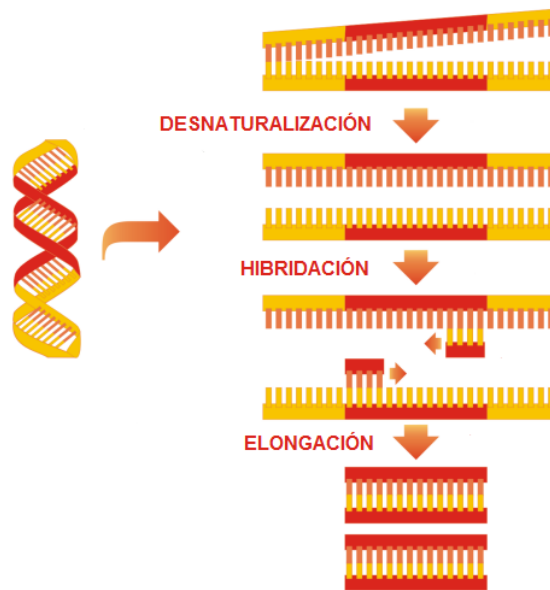


Figura 5: Obtención de amplicones del gen ADNr 16S mediante PCR

El resultado final de la PCR es una mezcla de todas las variantes de los genes DNAr 16S presentes en la muestra que es necesario separar. En 1983, Fisher y Lerman (Fisher y Lerman, 1983) introdujeron la técnica de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización o DGGE, método capaz de separar fragmentos de ADN de tamaño similar pero que difieren en la secuencia de nucleótidos.

La técnica utiliza un gradiente lineal creciente desnaturalizante de una mezcla de urea y formamida incorporada a lo largo de un gel de poliacrilamida. El gel de poliacrilamida es resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida (AA:BA 37.5:1) que forma un hidrogel en estado viscoso que permite que las cadenas puedan deslizarse unas sobre otras. El tamaño del poro está determinado por la concentración total de acrilamida presente.

La posterior electroforesis en cámara vertical permite la migración de los fragmentos de ADN bicatenario en respuesta a la carga neta de la molécula hasta encontrar la concentración de urea y formamida que desnaturaliza la doble hélice. En este punto la migración de la cadena se interrumpe o es considerablemente más lenta. La concentración desnaturalizante a la cual las cadenas se separan depende de la presencia de los pares de bases A=T o C≡G, es decir, del número de puentes de hidrógeno establecidos entre las cadenas antiparalelas (Figura 6).

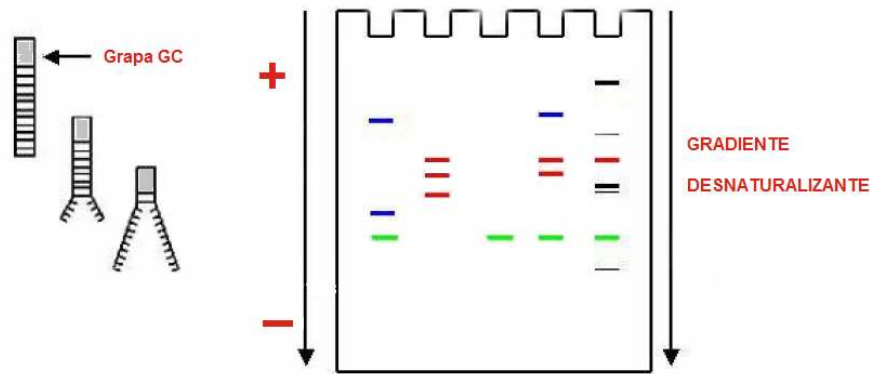


Figura 6: Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (DGGE)

El resultado de la DGGE muestra un patrón de bandas que representa la huella molecular de la diversidad génica bacteriana presente en la muestra de partida, en la que cada banda representa un miembro de la comunidad, ya que las bandas obtenidas son formas diferentes del gen ADN 16S que varían, a veces muy poco, en sus secuencias de nucleótidos.

Las ventajas de la técnica PCR-DGGE son múltiples. Se ha demostrado que el método es eficiente en la amplificación de las regiones conservadas del ADNr 16S bacterianos utilizando primers universales, de forma rápida y reproducible, permitiendo analizar simultáneamente un elevado número de muestras (Ji et al. 2004). Sin embargo, también presenta ciertos inconvenientes como la posible sobrestimación de la biodiversidad, la no detección de bacterias que representen menos del 1% de la comunidad o la formación de artefactos (Neilson et al. 2013).

A pesar de esto, un sencillo análisis con técnicas de imagen del patrón de bandas obtenido en la DGGE revela la biodiversidad de las muestras puesto que cada banda podría representar una especie de la comunidad, mientras que su intensidad indicaría el porcentaje de participación de dicha especie en el total de la comunidad, debido a que la intensidad de cada banda es proporcional a la cantidad de ADNr 16S. A partir de estos parámetros, es posible determinar el índice de Shannon-Wiener, que estima la biodiversidad de cada una de las muestras.

1.4 Secuenciación y análisis de las secuencias

Para conocer qué especie corresponde a cada banda obtenida en la PCR/DGGE es necesario realizar la secuenciación de los ADN 16S y comparar las secuencias con otras conocidas de los mismos genes presentes en bases de datos, obteniendo así la huella génica (*genetic fingerprint*) de la comunidad microbiana.

La secuenciación consiste en la determinación del orden preciso de los nucleótidos de los ADNr 16S obtenidos. Se utilizan fundamentalmente tres métodos para secuenciar el ADN:

.- Método de Sanger o método de secuenciación por dideoxynucleótidos (Sanger et al. 1977). La técnica se basa en la interrupción controlada de la replicación del ADN *in vitro* mediante una PCR en la que se utiliza un solo primer y a la que se agregan dideoxynucleotidos (ddNTPs) marcados que carecen del grupo hidroxilo en el extremo 3'. Se preparan cuatro tubos de reacción con el ADN de hebra sencilla que se desea secuenciar. A cada tubo se le añade un dideoxynucleótido trifosfato (ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP) de manera que cuando uno de estos se incorpora a una cadena de ADN en crecimiento acaban con la elongación de la misma, lo que implica la formación de una mezcla de cadenas de ADN de distintas longitudes. Los productos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa, obteniendo un patrón de bandas del cual es posible deducir la secuencia del ADN.

.- Secuenciación automatizada. Se utilizan primers marcados con pigmentos fluorescentes. Los productos se separan por electroforesis automatizada y las bandas se detectan por espectroscopia de fluorescencia.

.- Pirosecuenciación. Se basa en añadir las bases una después de otra, en orden conocido. Si la base añadida es la necesaria para su incorporación a la cadena en síntesis se libera un pirofosfato, formando un complejo que aporta la energía necesaria para la liberación de una señal luminosa. El secuenciador captura la señal y la reproduce como un pico en un pirograma.

Los cromogramas obtenidos por secuenciación automática corresponden a las secuencias complementarias de cada doble cadena de ADNr 16S. Incluyen el dato crudo leído por el secuenciador automático, la secuencia de nucleótidos y las calidades de los picos. La base concreta mostrada viene determinada por el pico más alto en esa posición. En ocasiones, el software que interpreta el cromograma no es capaz de determinar qué base debe asignarse en una posición concreta y nombra estas posiciones ambiguas como N. Normalmente la secuencia propuesta por el software tiene una gran parte final que hay que eliminar. Por eso, es importante revisar los cromogramas de forma manual y depurarlos antes de continuar con el análisis.

Una vez obtenida la secuencia consenso se introduce en bases de datos *online*, de acceso público o privado, con el objetivo de identificar las especies bacterianas mediante la comparación con otras secuencias depositadas en estas bases. El proceso incluye tres pasos:

1).- Comprobación de la ausencia de artefactos: Uno de los inconvenientes en la PCR-DGGE es la aparición de artefactos (co-emigración de fragmentos de

ADN similares pero diferentes, formación de moléculas heteroduplex durante la PCR que producen bandas dobles, amplificaciones preferenciales en la PCR o la formación de quimeras) lo que afecta a la estimación de la diversidad.

2).- Alineación y análisis de la similitud de las secuencias: La identificación de los filos bacterianos presentes en las muestras se completa con la comparación con secuencias conocidas y la determinación del índice de similitud, de manera que pueda inferirse la identidad del microorganismo.

3).- Determinación de la posición taxonómica: Las secuencias se introducen en bases de datos que las clasifican dentro de uno de grupos del Dominio Bacteria en base a las secuencias del gen DNAr 16S. Los principales grupos son Phylum I *Aquificae*, Phylum II *Thermotogae*, Phylum III *Termodesulfobacteria*, Phylum VI *Chloroflexi*, Phylum VIII *Nitrospira*, Phylum X *Cyanobacteria*, Phylum XXI *Chlorobi*, Phylum XII *Proteobacteria*, Phylum XIII *Firmicutes*, Phylum XIV *Actinobacteria*, Phylum XV *Planctomycetes*, Phylum XVI *Chlamydiae*, Phylum XVII *Spirochaetes*, Phylum XIX *Acidobacteria*, Phylum XX *Bacteroidetes*, Phylum XXI *Fusobacteria*, Phylum XXII *Verrucomicrobiota* (Clasificación bacteriana según el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology).

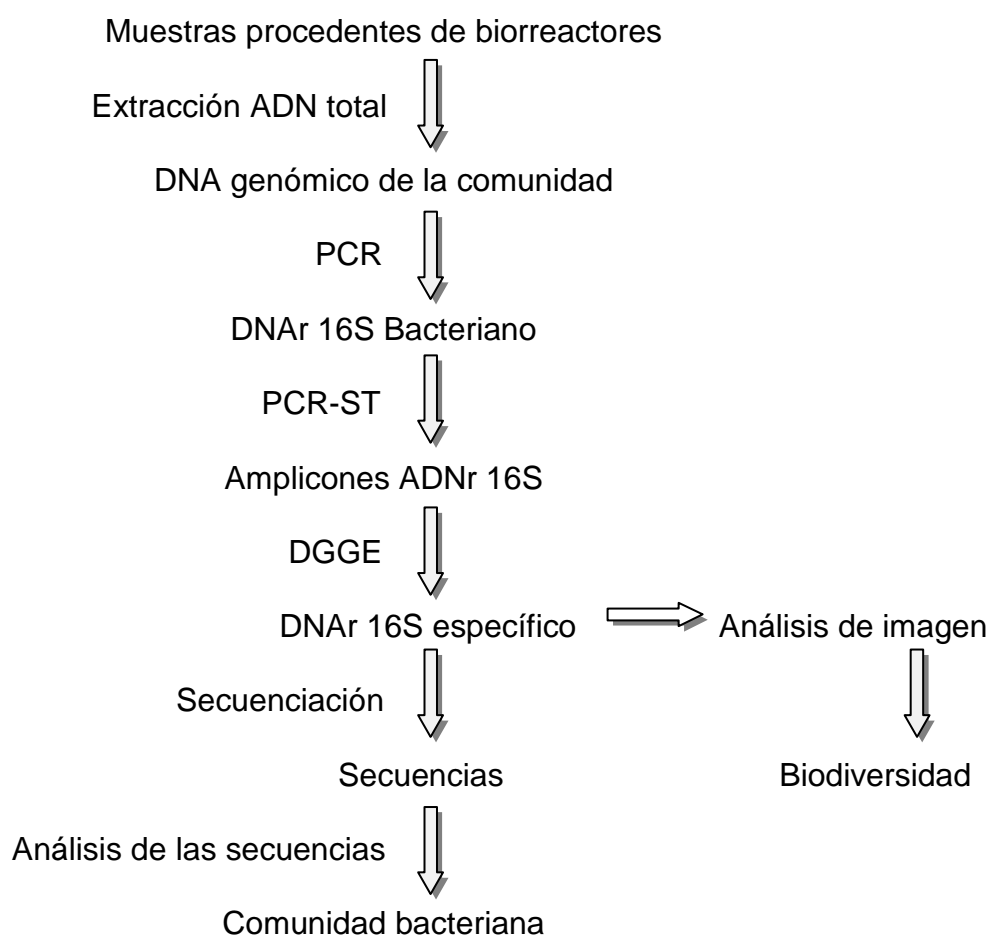
Las herramientas bioinformáticas también permiten obtener un dendograma de la comunidad bacteriana, representación gráfica donde se visualizan las relaciones evolutivas entre los organismos presentes según el grado de similitud y sus distancias taxonómicas.

Hay que tener en cuenta que la secuenciación del ADNr 16S mediante PCR-DGGE tiene las limitaciones inherentes a las técnicas moleculares, de manera que las huellas genéticas obtenidas deben ser interpretadas como indicadores y no como medida absoluta del grado de diversidad de la comunidad. Para obtener la determinación exacta de las especies bacterianas serían necesarios estudios comparativos de los genomas bacterianos completos, lo que implica que la técnica por sí sola no aportará siempre una identificación definitiva a nivel de género.

En el Trabajo Fin de Master se utilizan técnicas de biología molecular (PCR-DGGE) para la detección de la microbiota bacteriana presente en biorreactores inoculados con microalgas en los que se usan purines procedentes de ganado vacuno y porcino (predigeridos y no digeridos respectivamente) como fuente de nutrientes, contribuyendo así a la gestión de los excedentes de purines generados en ganadería intensiva. El conocer estas comunidades microalga/bacteria permite profundizar en la dinámica del ecosistema y puede ser la base para mejorar las condiciones de funcionamiento de los biorreactores y en consecuencia, aumentar la productividad de la biomasa microalgal.

2 OBJETIVO

Las comunidades bacterianas presentes en los biorreactores utilizados para la eliminación de purines no son bien conocidas. La finalidad del Trabajo Fin de Máster es la determinación de estas comunidades y su variación en función de las condiciones de operación, mediante su análisis con técnicas moleculares (PCR-DGGE) siguiendo el siguiente esquema general:



Con los datos obtenidos se pretende establecer el índice de biodiversidad de cada muestra, el grado de similitud entre ellas y los grupos de bacterias más representativos presentes en las comunidades bacterianas desarrolladas, vinculando los datos con las condiciones de operación de los diferentes biorreactores.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestras a analizar

Las muestras de partida han sido enviadas desde la Universidad de Almería y consisten en material liofilizado procedente de diversos reactores externos tipo Raceway y capa fina, de diferente tamaño y con un aporte de purines de distinta procedencia (porcino no digeridos y vacuno predigeridos por digestión anaerobia) y diferente tasa de dilución (caudal/volumen), todos ellos mantenidos a un pH 8, considerado el óptimo para el crecimiento microalgal (Posadas, 2015) mediante el aporte de aire enriquecido con CO₂ (Pawlowski, 2014).

Las muestras han sido recogidas en estado estacionario en fechas diferentes y presentan las características especificadas en la Tabla II.

Tabla II: Procedencia y características de las muestras analizadas

Muestra N°	Reactor	Características de la muestra	Tasa de dilución d ⁻¹
1	Capa Fina 1.200 l	2,5 % Purín de cerdo, no digerido	0.3
2	Capa Fina 1.200 l	5 % Purín de cerdo, no digerido	0.3
3	Capa Fina 1.200 l	10 % Purín de cerdo, no digerido	0.3
4	Capa Fina 1.200 l	2,5 % Purín de vaca, predigerido	0.3
5	Capa Fina 1.200 l	5 % Purín de vaca, predigerido	0.3
6	Capa Fina 1.200 l	10 % Purín de vaca, predigerido	0.3
7	Capa Fina 1.200 l	20 % Purín de vaca, predigerido	0.3
8	Capa Fina 1.200 l	10 % Purín de cerdo, no digerido	0.3
9	Raceway 2.400 l	10 % Purín de cerdo, no digerido	0.2
10	Raceway 700 l	10 % Purín de cerdo, no digerido	0.15
11	Raceway 750 l	10 % Purín de cerdo, no digerido	0.3

3.2 Extracción del ADN bacteriano de las muestras

Las muestras se pesan y se diluyen con H₂O libre de ADNasas, obteniendo concentraciones de materia orgánica de 150 mg/ml.

De estas diluciones se toman 400 µl sobre los que se procede a la obtención del ADN puro mediante reactivos comerciales. Los pasos seguidos para la extracción del ADN fueron los recomendados por el protocolo del Fast@DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, LLC, Ref 11-6560-200), utilizado para el aislamiento del material genómico de células del suelo y otras muestras ambientales para su posterior amplificación (Anexo I).

Tras la obtención del ADN genómico de la comunidad se comprueba la presencia de ADN en el material extraído mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa.

3.3 Comprobación de la presencia de ADN bacteriano mediante electroforesis en gel de agarosa

Se realiza un gel de agarosa al 1,6 %. Una vez solidificado se coloca en la cámara de electroforesis (Power Basic Bio-Rac) cubriéndolo totalmente con buffer TAE 1x y se añaden 5 µl de HyperLadder 50bp (Bioline) como marcador de peso molecular. En el resto de los pocillos se carga 1 µl de Loading Dye concentración 2x, 2 µl de TAE 1x y 5 µl del DNA obtenido de cada muestra. El gel se corre a voltaje constante de 95 V durante 60 min. Se revela en una solución de revelado con 50 ml de TAE 1x y 12 µl de GelRed™ (Nucleotic Acid Gel Satín 10.000x, Biotium) durante 50 min en agitación orbital y oscuridad.

3.4 Amplificación del ADNr 16S bacteriano mediante PCR

Los primers utilizados son 0968F y 1401R (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), específicos para el ADNr 16S del Dominio Bacteria. Como en la DGGE posterior la resolución óptima se consigue con moléculas de ADN que no se desnaturalizan por completo, se requiere el uso de un primer con una grapa GC que evite que las cadenas se separen por completo. Esta grapa es una secuencia de 30-50 pdb de GC que se añaden en el extremo 5´ del primer 0968F, co-amplificándose con el segmento de ADN a analizar (Myers et al. 1987) (Tabla III).

Tabla III: Secuencia de nucleótidos de los primers utilizados

Primer	Secuencia
1401 R	5´ CGG TGT GTA CAA GAC CC 3´
0968 F	5´ AAC GCG AAG AAC CTT AC 3´
0968 F-GC	5´ C GCC CGG GGC GCG CCC CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGG GGG AAC GCG AAG AAC CTT AC 3´

El proceso de amplificación se realiza con 2 µl del DNA extraído, 2 µl de primer 1401R 10 µM, 2 µl de primer 0968F-GC 10 µM, 25 µl de Biomix (Bioline Bio-25012, Ecogen) y 19 µl de agua libre de ADNAsas, obteniendo un volumen final de 50 µl. Se necesita también realizar un control negativo con 2µl de primer 1401R, 2µl de primer 0968F-GC, 25 µl de ADN-polimerasa Biomix y 21 µl de agua libre de ADNAsas para comprobar la no presencia de contaminación. Las muestras se llevan a un termociclador (Cyclader BioRad iQ5 Multicolor Real-time PCR Detention system) que permite la automatización del proceso. El programa después de un primer paso de predesnaturalización a 94 °C durante 5 min, realiza la repetición de una serie de 32 ciclos consistentes en tres etapas:

- Desnaturalización: 95 °C durante 30 s.
- Hibridación: 56 °C durante 30 s.
- Elongación o replicación: 72 °C durante 10 s.

Posteriormente a la etapa de ciclos, los productos de la PCR son sometidos a 10 min finales de elongación a 72 °C. Al final del proceso, un ciclo final a 4 °C permite conservar los productos hasta que se retiren para su uso.

El resultado de la PCR se estima por electroforesis en gel de agarosa al 1,6% con 5 µl de la PCR, 2 µl TAE1x y 1 µl de Loading Dye 2x, testado con 5µl de Hypperladder, mantenida a 95 V durante 60 min. Para la posterior visualización de los geles se revelan con GelRed en agitación suave durante 50 min y se comprueba la presencia de ADN en las bandas con un transiluminador.

3.5 Separación mediante electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)

La separación de los genes amplificados con tamaño similar pero diferente secuencia o amplicones se realiza mediante DGGE en gel de poliacrilamida al 8% (w/v) con un gradiente desnaturalizante de urea-formamida de 45 a 65%, concentración adecuada para la separación del ADN bacteriano, con el equipo DCode™ Universal Mutation Detection System (Laboratorios BioRad).

Para la separación de los ADNs se emplean dos capas de gel a diferente concentración de acrilamida: el gel superior concentrador o Stack, con un tamaño de poro más grande, y el gel inferior o de separación, de poro más pequeño. Las composiciones de las soluciones stock formadoras de gel se encuentran definidas en la Tabla IV.

Tabla IV: Composición de las soluciones stock formadoras del gel de poliacrilamida con gradiente de urea y formamida

Solución LOW 6% AA:BA	LD1	TAE 50x AA:BA H ₂ O Milli Q	1 ml 15 ml Hasta 100 ml
	LD2 80% UF	Urea TAE 50x AA:BA Formamida H ₂ O Milli Q	34 mg 1 ml 15 ml 32 ml Hasta 100 ml
Solución HIGHT 10 % AA:BA	HD1	TAE 50x AA:BA H ₂ O Milli Q	1 ml 25 ml Hasta 100 ml
	HD2 80% UF	Urea TAE 50x AA:BA Formamida H ₂ O Milli Q	34 mg 1 ml 25 ml 32 ml Hasta 100 ml

Para la preparación del gel con gradiente desnaturizante se monta el sistema estanco de cristales como se muestra en la Figura 7.

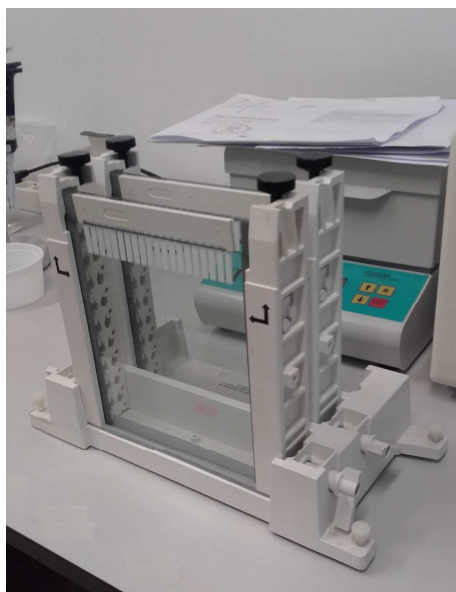


Figura 7: Sistema de preparación de geles de DGGE

Se cargan 40 µl de la PCR amplificada y 5 µl de 3x Sequencing Gel Loading Dye Ultrapure grade (Amresco, code E 268). Además, se preparan los estándares con 40 µl de cada muestra y se carga como estandar 40 µl de la mezcla y 5 µl de 3x Sequencing Gel Loading Dye Ultrapure grade.

Para realizar la electroforesis se corre el gel durante 16 horas a corriente constante de 85 V y a 60 °C (Figura 8).

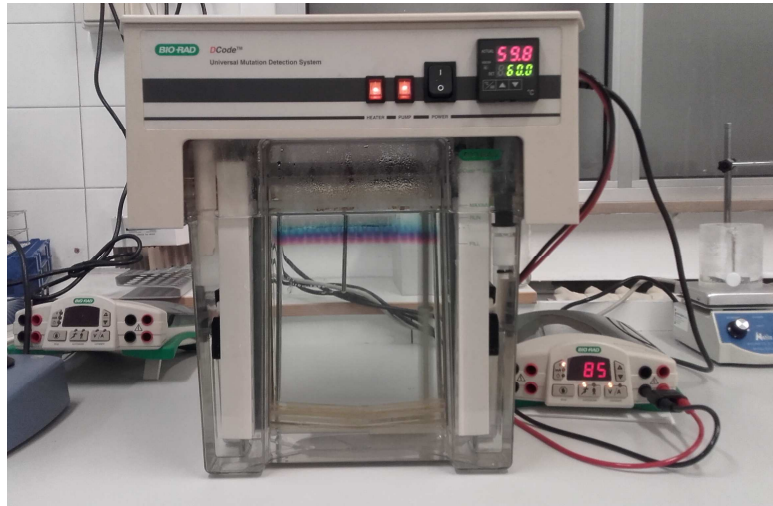


Figura 8: Sistema de electroforesis DCode™ Universal Mutation Detection System

Una vez finalizada la electroforesis el gel se tiñe con 200 ml de TAE 0,5x y 50 μ l GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium), en oscuridad y con agitación manual durante 90 min. De esta manera, las moléculas de ADN que se han agrupado en la matriz formando una banda pueden ser visualizadas por fluorescencia aplicando luz ultravioleta. El gel obtenido se coloca sobre un transiluminador y se fotografía con la cámara Kodak Capture GL 100.

3.6 Análisis de la imagen de la DGGE con Gel Comprador II

Los patrones de bandas de la DGGE se comparan con el programa Gel Comprador II™, software que determina la presencia o ausencia de bandas en cada muestra, así como la intensidad de las mismas, permitiendo el análisis y la comparación de los patrones obtenidos en la DGGE. Después de la normalización de la imagen, se definen las bandas presentes en cada muestra utilizando el algoritmo de búsqueda de bandas del propio programa.

Posteriormente, a partir de las curvas densitométricas de las bandas obtenidas en la DGGE se calcula el índice de diversidad de Shannon-Wiener (H') y el grado de similitud entre las muestras mediante el coeficiente de correlación de Pearson (Häne, 1993).

El índice de Shannon-Wiener responde a la siguiente fórmula:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

Siendo:

.- S: Número total de especies, es decir, de bandas observadas en cada muestra de la DGGE.

.- p_i : Abundancia relativa de cada especie, es decir, intensidad de cada una de las bandas en cada muestra. Se basa en la altura de los picos correspondientes a la medida de la densidad de las bandas. Se obtiene dividiendo n_i , que es la altura de cada pico individual y N, que es la suma total de las alturas de todos los picos en las curvas densitométricas, obteniendo la intensidad relativa de cada banda.

3.7 Secuenciación de las bandas más representativas de la DGGE

Para secuenciar los productos de la DGGE se seleccionan las bandas más representativas e intensas del gel de poliacrilamida y se escinden con una cuchilla estéril. Las muestras son introducidas en eppendorf para la posterior extracción del ADN. Para ello se añade a cada banda extraída 50 μ l de H₂O libre de DNAsas, se incuban 1 hora en baño de agua a 60 °C y se dejan enfriar a temperatura ambiente.

Para reamplificar el ADN recuperado de cada banda se realiza una PCR de amplificación con 5 μ l de ADN recuperado de la banda, 25 μ l de Biomix (Bioline Bio-25012, Ecogen), 2 μ l del primer 1401R, 2 μ l del primer 0968F y 16 μ l de H₂O libre de DNAsas, obteniendo un volumen final de 50 μ l. Para el control negativo se testa una mezcla de 25 μ l de Biomix (Bioline Bio-25012, Ecogen), 2 μ l de cada uno de los primers 1401R y 0968F y 21 μ l de H₂O libre de DNAsas, hasta un volumen final de 50 μ l. El programa realiza un primer paso a 94 °C, durante 5 min, 30 ciclos a 94 °C durante 30 s (desnaturalización), 56 °C durante 30 s (hibridación) y 72 °C durante 1 min (elongación), un tercer paso de 72 °C durante 10 min y mantenimiento final a 4 °C. Finalmente se comprueba que la amplificación ha transcurrido de forma correcta con una electroforesis en gel de agarosa al 1,6% con 4 μ l del resultado de la PCR.

Existen unos requisitos mínimos de calidad para el ADN a secuenciar por lo que antes del envío para secuenciación, los productos de la PCR se purifican con el kit GenElute™ PCR DNA Purification Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante (Anexo II).

Es necesaria la comprobación de la presencia de ADN antes de enviar a secuenciar con 5 μ l de los productos de la PCR en gel de agarosa. Para esto se hace un densitometrado con el programa Kodak para saber aproximadamente la concentración que presenta la muestra, ya que la concentración mínima de ADN para mandar a secuenciar es de 10 ng/ μ l.

Una vez comprobado que la concentración de ADN es la adecuada, las muestras han de ser preparadas para su secuenciación mediante el método Sanger (Secuenciador 3730 xl, Secugen, Madrid <https://www.secugen.es>). La secuenciación es un proceso

análogo a la PCR que utiliza el ADN 16S como molde pero donde los primers Forward y Reverse actúan en reacciones independientes. Por esto, de cada ADN 16S extraído de las bandas se envían dos muestras de 15 µl, a la primera se añade 1,5 µl del primer 1401R 5 µM y a la segunda se añade 1,5 µl del primer 0968F 5 µM.

3.8 Estudio de las secuencias: identificación taxonómica mediante herramientas bioinformáticas para DNAr 16S

Las secuencias recibidas son analizadas mediante herramientas bioinformáticas. Estas herramientas son las siguientes:

.- Programa Chromas lite (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>): Permite la visualización de los cromogramas Forward y Reverse de cada muestra, que es necesario depurar. Para ello se abren las dos secuencias y se solapan, obteniendo por comparación la secuencia consenso de cada banda obtenida en la DGGE (Figura 9).

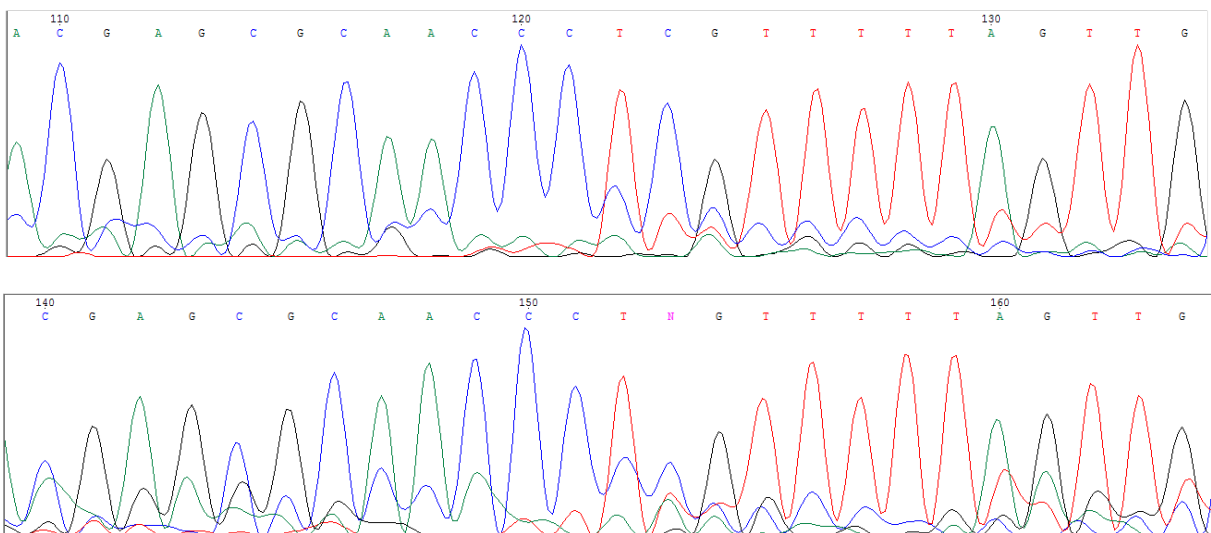


Figura 9: Visualización de las secuencias Forward y Reverse con el programa Chromas lite

.- Programa Mega 7 (www.megasoftware.net/): Permite la realización de alineación múltiple de las secuencias e inferir árboles filogenéticos, así como la estimación de las tasas de evolución molecular.

.- Base de datos RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>): Establece la clasificación taxonómica de la banda con un límite de confianza entre el 50 y el 80% (Wang et al. 2007).

.- Herramienta Decipher (<https://decipher.sanger.ac.uk/>): Determina la presencia de quimeras en las secuencias (secuencias mezcla de varios ADN).

.- Base de datos BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>): Base de datos de la NCBI que mediante algoritmos de búsqueda permite comparar una secuencia con todas las depositadas en dicha base de datos y determinar el grado de similitud entre secuencias (McGinnis y Madden, 2004). El resultado informa sobre la identidad de la bacteria, el porcentaje de similitud y el porcentaje de la secuencia que ha sido comparada.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Biodiversidad de las muestras

Con el fin de evaluar la riqueza y uniformidad de especies se calculó el índice de Shannon-Wiener (H') (Figura 10). Este índice adquiere un valor $H' = 0$ cuando hay una sola especie (una única banda) en la muestra y su valor es máximo cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos (todas las bandas de la muestra presentan la misma intensidad). De acuerdo con McDonald (2003), el índice típicamente oscila entre 1.5 y 3.5.

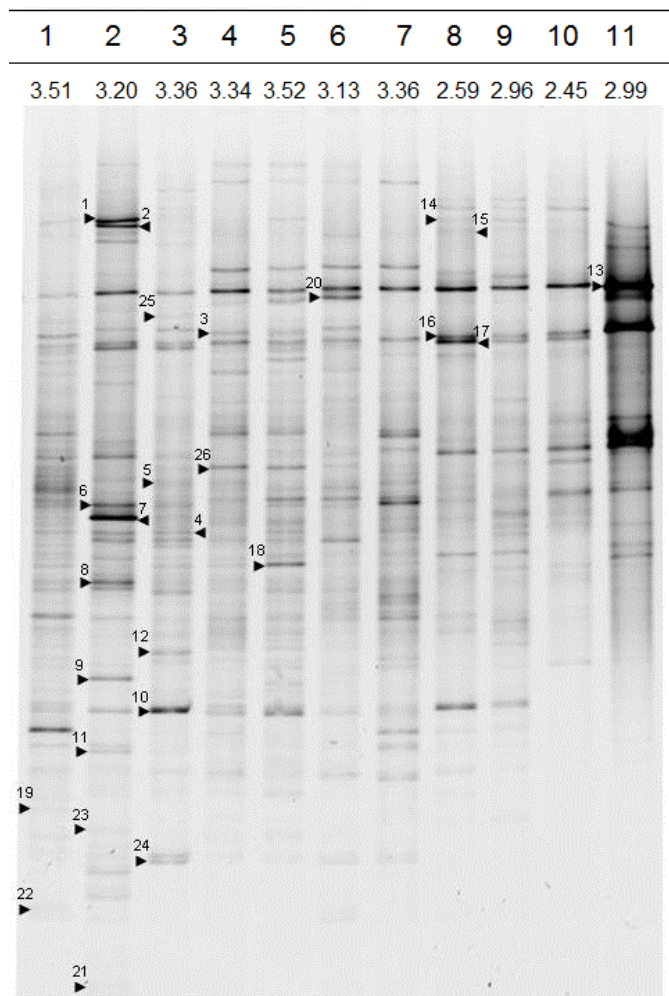


Figura 10: Patrón de bandas obtenido en la DGGE. Las muestras se indican en la parte superior del gel junto con el valor del índice de Shannon-Wiener obtenido para cada una de ellas. Las flechas indican las 26 bandas secuenciadas escindidas del gel, cada una de ellas numerada para su identificación.

De forma general, la biodiversidad desciende en situaciones de estrés ecológico (variaciones de la temperatura, disponibilidad de nutrientes, pH, salinidad, etc...) mientras que aumenta en comunidades maduras en condiciones óptimas, donde no existen factores de restricción del crecimiento.

Los índices de diversidad calculados a partir de la DGGE presentan un rango de H' que varía entre 2.45 y 3.52, lo que pone de relieve una riqueza bacteriana y uniformidad relativamente altas. Las muestras procedentes de biorreactores tipo capa fina presentan los índice H' más altos que las procedentes de biorreactores tipo Raceway, independientemente de si los purines aportados han sido previamente digeridos o no. Las muestras 1 y 5 presentan los mayores H' (3.51 y 3.52 respectivamente). Ambas muestras proceden de biorreactores de capa fina con la misma tasa de dilución (0.3 d^{-1}) pero alimentados con diferentes porcentajes de purines de cerdo y vaca, lo cual parece indicar que es la tasa de dilución el factor condicionante del aumento de la biodiversidad en las muestras.

Por otro lado, la muestra con un H' más bajo es la 10 (2.45) que corresponde a un biorreactor Raceway de 700 l alimentado con un 10 % de purín de cerdo y una tasa de dilución de 0.15 d^{-1} , la más baja de todas las muestras, lo que sugiere que un menor aporte de nutrientes al biorreactor puede condicionar el desarrollo de la microbiota bacteriana.

Estos datos parecen indicar que no es la influencia del tipo de alimentación el factor condicionante de la biodiversidad de las muestras sino la tasa de dilución, ya que se observa que la mayor parte de las muestras con una elevada tasa de dilución también presentan mayores índices de biodiversidad.

Hay que tener en cuenta que cuando el cociente $\text{ADN}_{\text{alga}}/\text{ADN}_{\text{bacteriano}}$ es alto también se encuentra el ADN presente en los cloroplastos de las microalgas, por lo que es posible que se produzca una cierta interferencia sobre la señal microbiana y como resultado se obtenga una infravaloración de la comunidad bacteriana.

4.2 Índices de similitud

Los índices de similitud obtenidos de la comparación de las muestras por parejas indican una correspondencia moderada entre ellas (Tabla V). Cuatro índices de similitud se encuentran por debajo del 20%, lo que indica baja similitud mientras que otras cuatro se sitúan por encima del 80%.

Tabla V: Índices de similitud entre las muestras

	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10	Muestra 11
Muestra 1	28.4	35.9	32.9	36.6	19.6	46.0	19.6	24.8	35.5	13.8
Muestra 2		42.7	36.3	37.6	32.0	42.3	37.9	46.7	28.4	11.8
Muestra 3				59.3	29.9	40.8	51.2	41.8	20.6	6.4
Muestra 4				73.5	75.4	74.3	73.0	81.4	63.4	51.0
Muestra 5					64.1	64.1	58.7	63.5	52.7	33.5
Muestra 6						65.1	63.2	68.5	65.8	55.8
Muestra 7							54.7	67.7	67.5	36.4
Muestra 8								85.8	80.4	50.9
Muestra 9									87.7	50.5
Muestra 10										60.9

La mayor similitud se encontró entre las muestras 9 y 10 (87.7%), procedentes de biorreactores Raceway de diferente volumen, alimentados ambos con purín de cerdo y con una tasa de dilución de 0.2 y 0.15 d⁻¹ respectivamente. Esto parece sugerir que son las parecidas condiciones de operación de ambos biorreactores el condicionante de la similitud entre las muestras. Las muestras 4 y 6, procedentes de biorreactores tipo capa fina presentaron un índice de similitud igualmente muy alto (75.4 %). Ambas muestras tienen la misma tasa de dilución de purín de vaca (0.3 d⁻¹) lo que indicaría que tasa de dilución un factor que influye en la similitud entre las muestras.

Además, la muestra 8 procedente de una biorreactor tipo capa fina alimentado con purín de cerdo al 10% y tasada de dilución 0.3 d⁻¹ también presenta una alta similitud con las muestras 9 y 10 (85.8 y 80.4% respectivamente), lo que sugiere de que el tipo de reactor no parece ser determinante en el desarrollo de las comunidades bacterianas. Pero por otro lado, la menor similitud se encontró entre las muestras 3 y 11 (6.4 %), que corresponden con biorreactores alimentados con el mismo tipo de purín y con la misma tasa de dilución, pero el primero de tipo capa fina y el segundo tipo Raceway. Esto parece sugerir que el tipo de reactor sí influye la evolución de la comunidad microbiana, debido a que en el primero la biomasa microbiana tiende a formar biofilms mientras que en segundo el movimiento continuo permite el mantenimiento de las bacterias en suspensión.

También destaca el índice de similitud entre las muestras 3 y 8, procedentes de biorreactores capa fina alimentados con purín de cerdo e idéntica tasa de dilución (0.3 d⁻¹) y sin embargo, su índice de similitud fue de un 51.2 %, relativamente bajo teniendo en cuenta que las condiciones de operación consideradas son idénticas entre ambas muestras. Esto es debido probablemente a que las muestras fueron recogidas en diferentes momentos del año con condiciones climáticas distintas con lo que aparece un nuevo factor abiótico no controlable que incide sobre el grado de similitud entre las muestras.

A la vista de estos resultados, no parece posible establecer un único factor claro que condicione el desarrollo de comunidades similares en los biorreactores. La tasa de dilución sí parece tener influencia sobre la similitud, pero hay que considerar también la influencia de otros factores no considerados hasta ahora y que podrían contribuir a la evolución de las poblaciones, como son las condiciones climáticas presentes en el momento de recogida de las muestras (Posadas, 2015).

La representación gráfica de los índices de similitud se visualiza mediante un dendrograma (Figura 11). En éste se observa que la muestra 1, con una mayor dilución del purín de cerdo, es la que presenta una menor similitud con el resto, seguida de las muestra 2 y 3, con condiciones de operación similares a la muestra 1. Las muestras 4, 6 y 7 presentan alta similitud lo que parece razonable ya que todas proceden de reactores del mismo tipo alimentados con purín de vaca con la misma tasa de dilución. Las muestras 8, 9 y 10 son también muy similares (por encima del 80%), alimentados con el mismo tipo de purín pero en biorreactores de diferente tipo y distintas tasas de dilución, lo que parece contradecir los datos anteriores, si bien puede ser explicado de nuevo si se tiene en cuenta las condiciones de luz y temperatura en las que se encuentran los biorreactores.

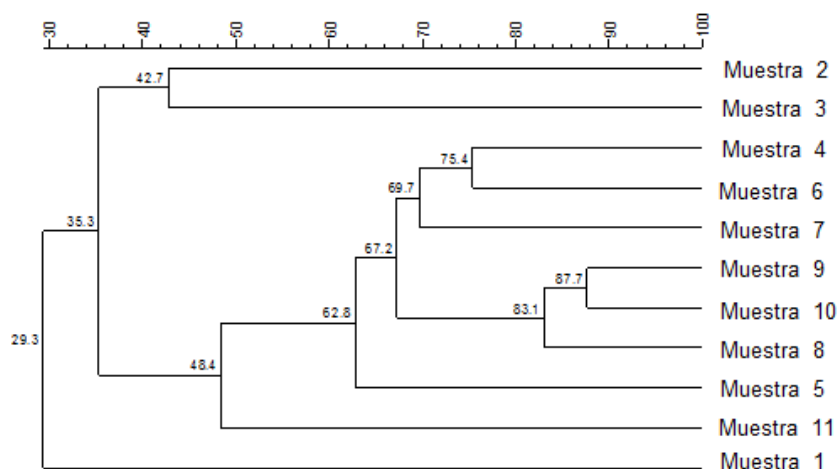


Figura 11: Dendrograma obtenido basado en el grado de similitud entre las muestras

4.3 Dinámica de las comunidades bacterianas

De las bandas más representativas escindidas del gel producto de la DGGE fueron secuenciadas 26. La comparación de las secuencias resueltas en la base de datos RDP determinó la presencia de siete filos diferentes (Tabla VI): *Proteobacteria* (12 bandas), *Firmicutes* (5 bandas), *Actinobacteria* (2 bandas), *Acidobacteria* (1 banda),

Chloroflexi (2 bandas), *Bacteroidetes* (2 bandas) y *Chlamydiae* (1 banda), mientras que una banda se mantuvo sin clasificar (banda 26). Los resultados proporcionados por la base de datos RDP fueron consistentes con los resultados obtenidos de la herramienta de búsqueda Blast.

La banda 1 fue asignada a Clase *Alphaproteobacteria* del Phylum *Proteobacteria*. En esta clase se encuentra una elevada variedad de estrategias metabólicas, incluyendo organismos fotosintéticos, fijadores de nitrógeno, oxidantes de amoníaco y metilotrofos (Williams, 2007). Organismos con un 99% de similitud han sido encontrados en sistemas municipales de distribución de agua corriente (Ross, 2014).

Las bandas 2 y 3 fueron asignadas al Orden *Rizobiales*, que incluye bacterias púrpuras no del azufre, normalmente fotoheterótrofas, capaces de usar diversas fuentes de carbono y de dadores de e^- para la fotosíntesis, como ácidos orgánicos, aminoácidos, alcoholes, azúcares, benzoato o tolueno. Crecen rápidamente en medios con un ácido orgánico, en presencia de luz y en condiciones anaeróbicas (Madigan, 2009). Organismos de este tipo con un 99% de similitud se han encontrado en lodos de depuradora de aguas residuales procedentes de la industria petrolera (Wu, 2014) y en comunidades bacterianas precedentes de enmiendas de hidrocarburos en medios salinos con una similitud del 97% (Jurelevicius, 2013).

La banda 4 fue clasificada dentro de la Familia *Rhodobacteriaceae*, que incluye organismos formadores de biofilms en medios marinos (Elifantz, 2013). Se han encontrado organismos con un 95 % de similitud en fangos activos procedentes de tratamiento de aguas residuales (Wang, 2014) y en reactores mesófilos anaerobios para el tratamiento de aguas residuales.

Las bandas 5, 6, 7, 8 y 9 se asignaron al género *Rubribacterium*, descubierto por primera vez en áreas litorales salinas. El género presenta bacterioclorofila a y carotenoides como pigmentos fotosintéticos y pH óptimo de crecimiento de 8.5-9.5 (Boldareva, 2009). Este género se ha encontrado con un 96% de similitud de diversos ambientes como en flóculos microbianos en aguas salobres (Yuhana, 2009).

Las bandas 10 y 11 se asignaron al género *Thiocapsa* (Clase *Gammaproteobacteria*, Orden *Chromatiales*), que se encuentra en ambientes acuáticos anóxicos, normalmente de agua dulce con un pH óptimo de 6.5. En condiciones anóxicas y en presencia de luz utilizan el SH_2 como dador de e^- , para la fotosíntesis, oxidándolo a S_2 como producto de oxidación intermedio, se deposita en gránulos en el interior celular. Cuando el sulfuro es limitante utilizan el S_2 como donador de e^- para la fotosíntesis, que se oxida a SO_4^{2-} (Jonkers, 1999). El género se ha encontrado en aguas salobres y en biofilms rosas (Srinivas, 2008) con un 99 % de similitud.

La banda 12 fue asignada al género *Dokdonella* (Clase *Gammaproteobacteria*, Orden *Xanthomonadales*), aerobio estricto, heterótrofo, inicialmente aislado del suelo y cuya actividad in situ no ha sido estudiada, si bien se sabe que su crecimiento óptimo se

produce a 30 °C y pH 6-7 (Li, 2013). El género se ha encontrado en ambientes como filtros percoladores usados en el tratamiento de aguas residuales (Maestre, 2008) y en consorcios microbianos involucrados en la oxidación del metano en condiciones micro-aeróbicas (Liu, 2014) con un 99 % de similitud.

Las bandas 13, 14 y 15 se asignaron al género *Clostridium* XI dentro de la Clase *Clostridia* del Phylum *Firmicutes*. Es un bacilo anaerobio estricto formador de endosporas, con crecimiento óptimo a 37 °C y pH 7-7.4. Incluye especies homoacéticas capaces de utilizar purinas como el ácido úrico, xantina, hipoxantina y guanina, como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, produciendo acetato, CO₂ y NH₃. Estas especies son organismos modelo para la investigación de la fermentación de los purines (Hartwich, 2012). El género se ha encontrado en ambientes como los lodos generados en las plantas de tratamiento de las aguas residuales con un 99 % de similitud (Wang, 2015).

Las bandas 16 y 17 se asignaron al género *Turcibacter* dentro de la Clase *Erysipelotrichia* del Phylum *Firmicutes*. En reactores anaerobios se encuentra formando parte de la biomasa de bacterias conjuntamente con el género *Clostridium* donde participan en los procesos de fermentación (Li, 2015).

La banda 18 fue asignada al género *Iamia*, que pertenece al Orden *Acidimicrobiales* dentro del Phylum *Actinobacteria*, encontrado por primera vez en equinodermos marinos (Kurahashi, 2009) y cuyo papel en los ecosistemas no ha sido estudiado. También se ha encontrado en digestores mesófilos anaerobios de aguas residuales urbanas (Riviere, 2009).

La banda nº se asignó al el género *Illuminobacter*, organotrófico que crece en condiciones neutras o ligeramente alcalinas. Algunas especies de este género se han aislado en ambientes marinos (Matsumoto, 2013). Se han encontrado organismos con un 92 y 91 % de similitud en suelos agrícolas (Lal, 2012) y en sedimentos marinos contaminados por hidrocarburos (Acosta-González, 2013).

La banda 20 se asignó al género *Blastocatella*, dentro el Phylum *Acidobacteria*, encontrado por primera vez en suelos (Foesel, 2013). Es un género Gram-, aeróbico, con metabolismo quimioorganotrófico, mesófilo y halotolerante. Otros ambientes en los que ha sido encontrado son fangos activos procedentes de aguas industriales (Layton, 2004) y reactores anaerobios a gran escala (Calusinska, 2016) con una similitud del 99 %.

La banda 21 fue asignada al Phylum *Chloroflexi* que grupa bacterias formadoras de colonias filamentosas que constituyen biofilms. Se han encontrado organismos con un 99 % de similitud en biofilms de aguas cálidas (Ross, 2010).

La banda 22 se asignó al género *Oscillochloris* (Phylum *Chloroflexi*, Orden *Chloroflexales*). Se trata de una bacteria filamentosas de gran tamaño, de 2 a 5 µm de

ancho y varios de cientos de μm de largo, fotoautótrofa del azufre, mesófila y diazotrófica (fija N en forma de amonio) (Kuznetsov, 2011). Se han encontrado organismos con un 92 % de similitud en ambientes ricos en S_2 (Bañeras, 2009).

Las bandas 23 y 24 se asignaron al Phylum *Bacteroidetes*, bacterias anaerobias ampliamente distribuidas en suelo, sedimentos, agua dulce y salada e intestino, colonizando prácticamente todos los tipos de hábitats. Degradan materia orgánica de alto peso molecular (Thomas, 2011). Se han encontrado organismos con un 100 de similitud en comunidades microbianas procedentes de reactores ANAMMOX (Wang, 2010).

La banda 25 se asignó al género *Parachlamidia*, dentro del Phylum *Chlamydiae*. Son bacterias endosimbiontes de protistas unicelulares del género *Amoeba*, lo que impide su cultivo en laboratorio. Los entornos ambientales en los que se desarrolla, así como su influencia en el sistema son poco conocidos (Everett, 1999) si bien se han encontrado organismos con una similitud del 95 % en plantas de tratamiento de aguas (Corsario, 2010).

Uno de los factores que puede influir en la evolución de las comunidades es el tipo de purín aportado al sistema. Los animales monogástricos contienen comunidades extremadamente complejas en su tracto intestinal, con más de 400 especies diferentes. Géneros anaerobios estrictos presentes en estas comunidades son *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium* y *Eubacterium*, sin que exista una especie dominante. Por otro lado, los rumiantes presentan en el rumen microorganismos que digieren la celulosa, hemicelulosa y el almidón, con poblaciones que incluyen especies de *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Succinimonas*, *Butyrivibrio*, *Selenomonas*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* (Atlas, 2001). Sin embargo, ninguno de estos géneros se encontró en las muestras analizadas, debido a la drástica reducción de la concentración de la materia orgánica y a la aparición de nuevos bioelementos en los purines en comparación con los parámetros presentes en los ambientes originales de éstos.

Del análisis de las bandas que aparecen en las diferentes muestras se desprende que el Phylum *Firmicutes* es el predominante en todas ellas, con los géneros *Clostridium* y *Turcibacter* como poblaciones dominantes, independientemente del tipo de reactor, tipo de purín aportado o de la tasa de dilución. Estos géneros son endobacterias anaerobias estrictas, implicados en los procesos fermentativos. El Phylum *Proteobacteria* también está presente en todas las muestras. Las bacterias de la Clase *Alphaproteobacteria* aparecen formando comunidades muy representadas sobre todo en las muestras 1, 2 y 3, todas ellas procedentes de biorreactores tipo capa fina, y menos representadas en la 8, 9 y 10. Estas comunidades son capaces de utilizar materia orgánica en presencia de luz y en condiciones anaerobias para crecer formando biofilms. Las bacterias de la Clase *Gammaproteobacteria* aparecen

mayormente en las muestras 3 y 8, ambas con las mismas condiciones de operación. Son bacterias rojas del azufre implicadas en procesos fotosintéticos a temperaturas de 30 °C y pH neutros. Las poblaciones del Phylum Actinobacteria se encuentran en todas las muestras excepto 2, 8 y 11, las tres procedentes de biorreactores alimentados con purines de cerdo. Su presencia indica ambientes neutros. La presencia de la acidobacteria quimiolitotrofa *Blastocatella* en las muestras 4 a 11 indica también un ambiente mesófilo apropiado para el crecimiento microalgal. El Phylum *Chloroflexi* o bacterias verdes no del azufre, aerobias facultativas formadoras de biofilms aparece en las muestras 1, 2 y 6, los dos primeros alimentados con purín de cerdo y la tercera con purín de vacuno, todas ellas procedentes de biorreactores de capa fina. La presencia de bacterias del Phylum *Bacteroidetes*, habituales en el tracto intestinal de mamíferos y vinculados a la degradación de materia orgánica de gran tamaño se encuentra en las muestras 1 a 7, todos tipo capa fina, pero no en las muestras extraídas de los biorreactores tipo Raceway. Las bacterias endosimbiontes del género *Parachlamydia* presentes en la muestra 3 indica una comunidad con la presencia de protozoos del género *Amoeba*. En estas asociaciones mutualistas el endosimbionte bacteriano parece que contribuye a completar los requerimientos nutritivos del protozoo, pero no parece estar relacionada con el crecimiento de la biomasa microalgal.

La estructura de las comunidades bacterianas evoluciona con el tiempo debido a que las poblaciones presentes en un entorno concreto son sustituidas por otras cuando cambian las condiciones (Brooks, 2014). Desde este punto de vista relacionar las condiciones de operación con la estructura de la comunidad microbiana y con su cambio en el tiempo resulta interesante para mantener la estabilidad y rendimiento de los biorreactores dedicados a la obtención de biomasa algal. De esta manera, abordar el estudio de los biorreactores no solo desde el punto de vista de la ingeniería sino también de la ecología microbiana, conduciría a soluciones de consenso entre ambos criterios, ya que la interpretación ecológica puede proporcionar información útil sobre el funcionamiento que ayude a aumentar la eficiencia del proceso. A pesar de esto, la bibliografía actualmente disponible sobre la estructura de las comunidades bacterianas en consorcio con microalgas son muy escasas.

Por otro lado, el seguimiento de las comunidades microbianas presentes en los biorreactores posibilitaría detectar con antelación y prevenir problemas operacionales. Sin embargo, hay que tener en cuenta que a día de hoy resulta difícil realizar predicciones a largo plazo debido a la complejidad de los sistemas, a la variabilidad de los purines aportados y a los factores abióticos no controlables (luz, temperatura, contaminaciones externas) que hacen que puedan desarrollarse nuevos géneros que den lugar a un nuevo equilibrio en las comunidades.

Tabla VI: Clasificación RDP de las bandas secuenciadas con al menos un 50% de nivel de confianza y sus correspondencias más cercanas obtenidas con la herramienta de búsqueda Blast con sus porcentajes de similitud y los ambientes de los que han sido recuperados (Intensidad < 20 = x, 20 ≤ Intensidad ≥ 80 = xx, intensidad > 80= xxx)

Taxonomic placement (50% confidence level)	Band n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Closest relatives in Blast name (accession number)	Similarity (%)	Source of origin
Phylum Proteobacteria															
Class Alphaproteobacteria	1	x	xxx	x	x					xx	x		Uncultured bacterium (KC497134)	99	Municipal drinking water distribution system tap water
													Uncultured bacterium (EU835393)	99	RO membrane biofilm
													Uncultured bacterium (AY957891)	98	Drinking water biofilm
Order Rhizobiales	2		xxx									xx	Uncultured bacterium (KJ783103)	99	Petrochemical wastewater treatment plant sludge
													Uncultured bacterium (HQ681950)	97	Activated sludge
													Uncultured bacterium (KT798637)	97	Anaerobic reactor inoculated with sludge coming from a mesophilic WWTP anaerobic reactor
													Uncultured bacterium (KR185739)	95	Simultaneous wastewater treatment and biogas upgrading with microalgae and bacteria
	3	xx			xx	xx						xx	Uncultured bacterium (KC307964)	97	Freshwater
													Uncultured bacterium (HF545890)	95	Biofilm
													Uncultured alpha proteobacterium (AY192063)	95	EBPR sludge
Order Rhodobacterales															
Family Rhodobacteraceae	4	xx	xx	xx		xx	x	xx					Uncultured bacterium (KJ808504)	95	Activated sludge
													Uncultured Alphaproteobacteria bacterium (CU922171)	95	Mesophilic anaerobic digester which treats municipal wastewater sludge
													Uncultured alpha proteobacterium (KC633599)	95	Activated sludge of a full-scale WWTP
													Uncultured bacterium (JN391674)	95	Activated sludge in aerobic tank of activated sludge reactor
Genus Rubribacterium	5		xx	xx	xx		x	xx					Uncultured alpha proteobacterium (AB491854)	96	Microbial flocs floating in brackish water of a pond in a whiteleg shrimp hatchery
													<i>Rubribacterium polymorphum</i> (NR116472)	95	Litoral zone of small soda lake
													Uncultured <i>Rhodobacteraceae</i> bacterium (FJ516820)	95	Biofilm
	6	xx	xxx	xx		xx	xx	xxx					<i>Rubribacterium polymorphum</i> (NR116472)	94	Litoral zone of small soda lake
													Uncultured alpha proteobacterium (AB491854)	94	Microbial flocs floating in brackish water of a pond in a whiteleg shrimp hatchery
	7	xx	xxx	x	x			xx	x				Uncultured alpha proteobacterium (AB491854)	96	Microbial flocs floating in brackish water of a pond in a whiteleg shrimp hatchery
													<i>Rubribacterium polymorphum</i> (NR116472)	95	Litoral zone of small soda lake
													Uncultured <i>Rhodobacteraceae</i> bacterium (FJ516820)	95	Biofilm
	8	xx	xxx	xx	x	x						x	Uncultured alpha proteobacterium	97	Unvegetated soil environments at the Falkland Islands

															(EF220476)		
															Uncultured bacterium (KJ756940)	92	Waste water treatment plant's biofilter
															Uncultured alpha proteobacterium (KF826986)	92	Biofilm
															Uncultured Alphaproteobacteria (CU918637)	92	Mesophilic anaerobic digester which treats municipal wastewater sludge
	9		xx												<i>Rubribacterium polymorphum</i> (NR116472)	97	Litoral zone of small soda lake
															Uncultured <i>Rhodobacteraceae</i> bacterium (FJ516820)	96	Biofilm
Class Gammaproteobacteria																	
Order Chromatiales																	
Family Chromatiaceae																	
Genus Thiocapsa																	
	10	x	xx	xxx	xx		x	x	xxx	xx					<i>Thiocapsa roseopersicina</i> (NR041729)	99	Culture Collection
															<i>Thiocapsa rosea</i> (NR028864)	99	Culture Collection
															<i>Thiocapsa subramaniana</i> (AM779060)	99	Brackish water
															<i>Thiocapsa sp</i> (FM177598)	98	Surface water with pink mat
	11		xx	x											<i>Thiocapsa sp</i> (FN293074)	99	Freshwater pond
															<i>Thiocapsa rosea</i> (NR114687)	99	Culture Collection
															<i>Thiocapsa pendens</i> (NR114686)	99	Culture Collection
															<i>Thiocapsa roseopersicina</i> (Y12364)	99	Culture Collection
Order Xanthomonadales																	
Family Xanthomonadaceae																	
Genus Dokdonella																	
	12			xx		x									Uncultured bacterium (FM213011.1)	99	Biotrickling filter removing H ₂ S from water treatment sludge
															Uncultured <i>Dokdonella sp</i> (JN217047)	99	Anaerobic culture
															Uncultured bacterium (JN192033)	99	Membrane biorreactor inoculated with activated sludge sewage from the urban solid waste
															Uncultured bacterium (JF284314)	99	Biofilm on the surface of poly component packing
Phylum Firmicutes																	
Class Clostridia																	
Order Clostridiales																	
Family Peptostreptococcaceae																	
Genus Clostridium XI																	
	13	xx	xxx	xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	Uncultured bacterium (KJ808501)	98	Activated sludge
															Uncultured bacterium (KJ013791)	98	Sediment samples
															Uncultured bacterium (KJ907458)	98	Anaerobic digester treating brown water and food waste under microaeration conditions
															Uncultured <i>Clostridium sp</i> (KJ590269)	98	Hydrolytic digester fed with a straw/hay mixture operated at 55 degree C
	14		xx	x	x		x		x	x	x				Uncultured bacterium (KM281159)	97	Farm soil
															Uncultured bacterium (KJ571142)	97	Food garbage and cow dung
															Uncultured bacterium (JX898052)	97	Mechanically separated cow slurry
	15		xx	x		x			x					xx	Uncultured bacterium (KJ808497)	98	Activated sludge
															Uncultured <i>Clostridium sp</i>	98	Hydrolytic digester fed with a straw/hay mixture

5 CONCLUSIONES

.- La biodiversidad de las comunidades medida con el índice de Shannon-Wiener aumenta en los biorreactores con mayor tasa de dilución, independientemente del tipo de biorreactor y del tipo de purines aportados.

.- Los índices de similitud entre muestras no permiten definir un único factor claro de operación que defina la composición de las comunidades bacterianas, sino que todos los factores parecen influir en mayor o menor medida, además de otros factores no controlables como las condiciones de luz y temperatura dependientes del clima a la que están sometidos los biorreactores.

.- El volumen de los biorreactores no parece influir en la estructura de las comunidades microbianas, pero sí el tipo de biorreactor, que condiciona que las bacterias se encuentren suspendidas o constituyendo biofilms.

.- Los géneros comunes en todas las comunidades obtenidas de las muestras corresponden al Phylum *Firmicutes*, concretamente *Clostridium* y *Turicibacter*, géneros anaerobios estrictos implicados en procesos fermentativos.

.- El Phylum *Bacteroidetes* aparece exclusivamente en los biorreactores de capa fina, lo que indica que las condiciones de operación en estos resultan favorables para su crecimiento.

.- Otros grupos encontrados pertenecen a los Phylum *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* y *Chloroflexi*, además de bacterias endosimbiontes del Phylum *Chlamydiae*.

6 ANEXOS

ANEXO I

Protocolo para extracción de ADN

Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Ref 11-6560-200)

- 1.- 400 µl de muestra se añaden sobre el tubo lysing Matrix E para lisar el contenido celular
- 2.- Añadir 978 µl de Sodium Phosphate buffer al tubo lysing Matrix E
- 3.- Añadir 122 µl de MT buffer al tubo lysing Matrix E
- 4.- Homogeneizar en minibeatbeater, 160 s
- 5.- Centrifugar 10´ a 14.000 rpm para la eliminación de restos de tamaño grande y células con pared celular compleja del lisado
- 6.- Pasar el sobrenadante a tubo de 2 ml limpio y añadir 250 µl de PPS (protein precipitation solution). Voltear a mano 10 veces
- 7.- Centrifugar 10´ a 14.000 rpm para precipitar el sedimentado
- 8.- Pasar el sobrenadante a tubo falcon de 50 ml. Añadir 1 ml de Binding Matrix E y dejar una hora en agitación orbital Shaker a 120 rpm
- 9.- Extraer 600 µl del tubo falcon y pasar a tubo Spin Filter. Centrifugar 1´ a 14.000 rpm. Desechar el volumen de abajo. Repetir la transferencia y la centrifugación hasta acabar el volumen del tubo falcon en el mismo Spin Filter, desechando el flujo que ha pasado a través del filtro
- 10.- Añadir 500 µl de SEWS-M (solución de lavado) al tubo Spin Filter (con 100 ml de etanol puro, al 100%) para lavar impurezas una vez que el DNA está unido a la matriz de unión
- 11.- Centrifugar 2´ a 14.000 rpm. Desechar la parte inferior
- 12.- Centrifugar 2´ a 14.000 rpm para eliminar los restos de SEWS-M y etanol

13.- Pasar las columnas a tubos limpios de 2 ml y dejar abiertos durante 5´ para secado a temperatura ambiente

14.- Añadir 75 µl de DES a la columna e incubar durante 2´

15.- Centrifugar 2´ a 14.000 rpm para eluir el DNA en el tubo de recogida. Descartar la columna

16.- Guardar a 4 °C en refrigerador o a –20 °C si va a tardar en usarse

ANEXO II

Protocolo para limpieza de bandas

GenElute PCR DNA Purification (Kit Sigma-Aldrich, Ref Na1020-1KT)

- 1.- Insertar la minicolumna de unión con el anillo azul en los eppendorf proporcionados.
- 2.- Añadir a cada columna 500 µl de buffer Colum Preparation Solution
- 3.- Centrifugar 1´ a 12.000 g. Descartar eluyente
- 4.- En eppendorf poner 225 µl de Binding Solution y 45 µl de PCR y pasarlo a la columna. Añadir la mezcla a la columna azul varias veces hasta acabarla.
- 5.- Centrifugar 1´ a 14.000 g. Eliminar sobrenadante y volver a poner la columna en el eppendorf colector.
- 6.- Añadir 500 µl de Wash Solution diluida con etanol 100%
- 7.- Centrifugar 1´ a 14.000 g. Eliminar sobrenadante
- 8.- Centrifugar 2´ a 14.000 g. Eliminar sobrenadante
- 9.- Transferir la columna a tubos limpios y esperar 5 min para que se evapore el etanol
- 10.- Eluir la columna con 60 µl de Elution Solution aplicado en el centro de cada columna e incubar 1´ a temperatura ambiente.
- 11.- Centrifugar 1´ a 14.000 rpm
- 12.- Recoger el eluyente.

7 BIBLIOGRAFÍA

- .- Acosta-González A, Rosselló-Mora R, Marqués S. *Characterization of the anaerobic microbial community in oil-polluted subtidal sediments: aromatic biodegradation potential after the Prestige oil spill*. *Environmental Microbiology* (2013) 15(1): 77-92
- .- Alitalo A, Nikama J, Aura E. *Fate of faecal indicator organisms and bacterial diversity dynamics in a series of continuously fed aerated tank reactors treating dairy manure*. *Ecological Engineering* 81 (2015) 363–372
- .- Atlas, RM, Bartha, R. *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Pearson Educación, 2002. ISBN: 84-7829-039-7
- .- Attwood TK. *Introducción a la bioinformática*. Editorial Pearson Prentice Hall. ISBN: 84-2053-551-6
- .- Balázs M, Rónavári A, Németh a, Bihari Z, Rutkai E, Bartos P, Kiss I, Szvetnik A. *Effect of DNA polymerases on PCR-DGGE patterns*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84 (2013) 244e249
- .- Bañeras L, Gich F, Martínez-Medina M, Abella CA, Borrego CM. *New phylotypes of mesophilic filamentous anoxygenic phototrophic bacteria enriched from sulfide-containing environments*. *Environmental Microbiology reports* (2009) 1(1):86-93
- .- Boldareva EN, Moskalenko AA, Makhneva Z.K. et al. *Rubribacterium polymorphum gen. nov., sp. nov., a novel alkaliphilic nonsulfur purple bacterium from an Eastern Siberian soda lake*. *Microbiology* (2009) 78: 732
- .- Brooks JP, Adeli A, McLaughlin MR. *Microbial ecology, bacterial pathogens, and antibiotic resistant genes in swine manure wastewater as influenced by three swine management systems*. *Water research* 57 (2014) 96-103
- .- Calusinska M, Goux X, Fossepre M (2016). *Does more diverse mean more successful in methanogenic world?*. Institute of Science and Technology, Luxembourg
- .- Castillo, F; Roldán Ruiz, MD. *Biotecnología ambiental*. Editorial Tébar ISBN: 64-7360-211-0
- .- Corsario D, Pages GS, Catalán V, Loret JF, Greub G. *Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants*. *International Journal of hygiene and environmental health* (2010) 213(3):158-66

- .- Elifantz H, Horn G, Ayon M, Cohen Y, Minz D. *Rhodobacteraceae are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in Eastern Mediterranean coastal seawater*. DOI:10.1111/1574-6941.12122
- .- Everett KD, Bush RM, Andersen AA. *Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms*. *Int J Syst Evol Microbiol* (1999) 49: 415-440
- .- Ferrero EM, Godos I, Rodríguez EM, García-Encina PA, Muñoz R, Bécares E. *Molecular characterization of bacterial communities in algal–bacterial photobiorreactors treating piggery wastewaters*. *Ecological Engineering* 40 (2012) 121–130
- .- Fischer SG, Lerman LS. *DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory*. *Proc. NatL Acad. Sci. USA* (1983) Vol. 80, 1579-1583
- .- Foesel B, Rohde M, Overmann J. *Blastocatella fastidiosa gen. nov., sp. nov., isolated from semiarid savanna soil – The first described species of Acidobacteria subdivision*. *Systematic and Applied Microbiology* 36 (2013) 82–89
- .- Fredriksson NJ, Hermansson M, Wilén B-M. *The Choice of PCR Primers Has Great Impact on Assessments of Bacterial Community Diversity and Dynamics in a Wastewater Treatment Plant*. *PLOS ONE* 8 (10): e76431 (2013)
- .- Häne BG, Jäger K., Drexler H. *The Pearson product-moment correlation coefficient is better suited for identification of DNA fingerprint profiles than band matching algorithms*. *Electrophoresis* 14 (1993), 967–972.
- .- Hartwich K, Poehlein A, Daniel R (2012). *The Purine-Utilizing Bacterium Clostridium acidurici 9a: A Genome-Guided Metabolic Reconsideration*. *PLoS ONE* 7(12): e51662. doi:10.1371/journal.pone.0051662
- .- Ibekwe AM, Ma J, Murinda S, Reddy GB. *Bacterial community dynamics in surface flow constructed wetlands for the treatment of swine waste*. *Science of the Total Environment* 544 (2016) 68–76
- .- Ji N, Peng B, Wang G, Wang S, Peng X. *Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens*. *Journal of Microbiological Methods* 57 (2004) 409–413
- .- Jonkers HM, Jansen M, Van der Maarel M, Gernerden HV. *Aerobic turnover of dimethyl sulfide by the anoxygenic phototrophic bacterium Thiocapsa roseopersicina*. *Arch Microbiol* (1999) 172 :150–156

- .- Jurelevicius D, Álvarez VM. *Bacterial community response to petroleum hydrocarbon amendments in freshwater, marine, and hypersaline water-containing microcosms*. Appl Environ Microbiol (2013) 19:5927-35.
- .- Kouzuma A, Watanabe K. *Exploring the potential of algae/bacteria interactions*. Current Opinion in Biotechnology 2015, 33:125–129
- .- Klug WS, Cummings MR, Spencer A. *Conceptos de genética*. Editorial Pearson Prentice Hall Ed. ISBN: 978-84-205-5014-5
- .- Kurahashi M, Fukunaga Y, Sakiyama Y, Harayama s, Yokota A. *Lamia majanohamensis gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from sea cucumber Holothuria edulis, and proposal of lamiaceae fam. nov.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2009), 59, 869–873
- .- Kuznetsov BB, Ivanovsky RN, Keppen O, Sukhacheva M, Bumazhkin B, Patutina E, Beletsky A, Mardanov A, Baslerov R, Panteleeva A, Kolganova T, Ravin N, Skryabin K. *Draft Genome Sequence of the Anoxygenic Filamentous Phototrophic Bacterium Oscillochloris trichoides subsp. DG-6*. Journal of Bacteriology (2011). Vol 193, Nº 1. 321–322
- .- Lal R, Rao DL, Trimurtulu N, Malhotra J (2012). *The influence of high input farming with fertilizers and pesticides on soil microbial diversity and nitrogen fixing community in a tropical vertisol*. Molecular Biology Laboratory, Department of Zoology, University of Delhi, India
- .- Layton AC, Karanth PN, Lajoie CA. *Quantification of Hyphomicrobium populations in activated sludge from an industrial wastewater treatment system as determined by 16S rRNA analysis*. Applied Environmental Microbiology 2000 Mar;66(3):1167-74
- .- Li J, Rui J, Yao M, 2, Zhang S, 2, Yan X, Wang Y, Yan Z, Li X. *Substrate Type and Free Ammonia Determine Bacterial Community Structure in Full-Scale Mesophilic Anaerobic Digesters Treating Cattle or Swine Manure*. Frontiers in Microbiology (2015). DOI: 10.3389/fmicb.2015.01337
- .- Li Y, Zhang J, Chen Q, Yang G, Cai S, He J, Zhou S, Li S. *Dokdonella kunshanensis sp. nov., isolated from activated sludge, and emended description of the genus Dokdonella*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2013), 63, 1519–1523
- .- Liu J, Sun F, Wang L. *Molecular characterization of a microbial consortium involved in methane oxidation coupled to denitrification under micro-aerobic conditions*. Microbial Biotechnology. 2014 Jan;7(1):64-76.

- .- Maestre JP, Rovira R, Alvarez J, Fortuny M. *Biodiversity and population shifts assessment by molecular biology tools in a Biotrickling filter treating high loads of H₂S*. Chemical Engineering, Universitat Autònoma de Barcelona
- .- McDonald, G. (2003). *Biogeography: Space, Time and Life*. Wiley, New York. ISBN: 978-0-471-24193-5
- .- Madigan, MT. Brock. *Biología de los microorganismos*. Editorial Pearson (2015). ISBN: 97-8849-0352-793
- .- Matsumoto A, Kasai H, Matsuo Y, Shizuri Y, Ichikawa N, Fujita N, Omura S, Takahashi Y. *Ilumatobacter nonamiense sp. nov. and Ilumatobacter coccineum sp. nov., isolated from seashore sand*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2013), 63, 3404–3408
- .- Morales-Amaral MM, Gómez-Serrano C, Grabiél Ación F, Fernández Sevilla JM, Molina Grima E (2015). *Outdoor production of Scenedesmus sp. in thin-layer and raceway reactors using centrate from anaerobic digestion as the sole nutrient source*. Algal Research 12 (2015) Pages 99–108
- .- Muñoz R, Guieysse B. *Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review*. Water Research 40 (2006) 2799 – 2815
- .- Neilson JW, Jordan FL, Maier RM. *Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis*. Journal of Microbiological Methods 92 (2013) 256–263
- .- Pawlowski A, Mendoza JL, Guzmán JL, Berenguel M, Ación FG, Dormido S. *Effective utilization of flue gases in raceway reactor with event-based pH control for microalgae culture*. Bioresource Technology 170 (2014) 1–9
- .- Posadas E, Serejo ML, Blanco S, Pérez R, García-Encina PA, Muñoz R. *Minimization of biomethane oxygen concentration during biogás upgrading in algal–bacterial photobiorreactors*. Algal Research 12 (2015) 221–229
- .- Posadas E, Morales M, Gómez C, Ación FG, Muñoz R. *Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways*. Chemical Engineering Journal 265 (2015) 239–248
- .- Ramanan R, Kim BH, Cho DH, Oh HM, Kim HS. *Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications*. Biotechnology Advances 34 (2016) 14–29

- .- Riviere D, Desvignes V, Pelletier E. *Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge*. The ISME Journal, 2009 Jun;3(6):700-14
- .- Rodicio R, Mendoza C. *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamentos, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica Volumen 22 (2004), 238-245
- .- Rodríguez Rodríguez, E. Tesis Doctoral. *Molecular study of the dynamics and structure of the biomass in different wastewater and off-gases treatment systems*. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. Escuela de Ingenierías Industriales. Universidad de Valladolid. España
- .- Ross KA, Pace NR (2014). *Molecular phylogenetic analysis of municipal water distribution ecosystems*. MCD Biology, University of Colorado-Boulder, USA
- .- Ross KA, Pace NR, Feazel LM (2010). *Variable community structures in microbial mats of the mesothermic border of hot spring pools in YNP*. MCD Biology, University of Colorado-Boulder, USA
- .- Salazar, A. Sandoval, J. Armendáriz. *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Editorial Mc Graw Hill Education ISBN: 978-607-15-0912-3
- .- Srinivas, TN, Anil Kumar P, Sasikala C, Ramana, CV. *Cultured diversity of purple and green sulfur bacteria of a pink pond (2008)*. Centre for Environment, Institute of Science and Technology, JNT University, India
- .- Subashchandrabose SR, Ramakrishnan B, Megharaj M, Venkateswarlu K, Naidu R. *Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential*. Biotechnology Advances 29 (2011) 896–907
- .- Thomas F, Hehemann JH, Rebuffet E, Czjzek M, Michel G. *Environmental and gut Bacteroidetes: the food connection*. Frontiers in Microbiology. Review article. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00093
- .- Unnithan VV, Unc A, Smith G. *Mini-review: A priori considerations for bacteria–algae interactions in algal biofuel systems receiving municipal wastewaters*. Algal Research 4 (2014) 35–40
- .- Wang H, Yi P., Zhang SJ, Liu XC (2010). *The microbial community composition and qualifying analysis in the laboratory-scale stable partial nitrifying-ANAMMOX municipal wastewater reactor*. College of Resource and Environment, Graduate University Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

- .- Wang J, Li Q, Yang M. (2015) *Impacts of sludge bulking on functional bacteria in a full-scale municipal wastewater treatment plant*. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, China
- .- Williams KP, Sobral B, Dickerman AW. *A Robust Species Tree for the Alphaproteobacteria*. Journal of Bacteriology 189 (2007) 4578–4586
- .- Wu C, Zhou Y (2014). *Bacterial 16S rRNA sequences obtained from the petrochemical wastewater treatment plant activated sludge by clone library sequencing technology*. Research Center of Water Pollution Control Technology, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, China
- .- Yanling Y, Zhenmei LV, Hang M, Jun C. *Dynamic changes of microbial community diversity in a photohydrogen producing reactor monitored by PCR-DGGE*. Journal of Environmental Sciences (2008) 20, 1118–1125
- .- Ye J, Song Z, Wang L, Zhu J. *Metagenomic analysis of microbiota structure evolution in phytoremediation of a swine lagoon wastewater*. Bioresource Technology 219 (2016) 439–444
- .- Yuhana M (2009). *Phylogenetic affiliation of microbial flocs floating in a pond of a whiteleg shrimp (Litopenaeus vannamei) hatchery in Banyuwangi, East Java*. University of Zuerich, Institute of Plant Biology; Switzerland

*Gracias Rebeca, por tu paciencia acompañándome por el
largo y accidentado camino de la investigación*